T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ÇUKUROVA BÖLGESİNDEKİ İNFERTİL ERKEKLERDE Y KROMOZOMU (AZF genleri) MİKRODELESYONLARININ SAPTANMASI

Bil. Uzm. Safiye TAĞA

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten DİKMEN

ADANA-2008

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ÇUKUROVA BÖLGESİNDEKİ İNFERTİL ERKEKLERDE Y KROMOZOMU (AZF genleri) MİKRODELESYONLARININ SAPTANMASI

Bil. Uzm. Safiye TAĞA

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten DİKMEN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF2004 D2 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2008

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora programı çerçevesinde Safiye TAĞA (İbilioğlu) tarafından yürütülmüş olan "Çukurova Bölgesindeki İnfertil Erkeklerde Y Kromozomu (AZF genleri) Mikrodelesyonlarının Saptanması" adlı çalışma, aşağıdaki juri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:03.01.2008

İmza
Prof.Dr.Nurten DİKMEN
Ç.Ü.Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof.Dr.Suna SOLMAZ
Ç.Ü.Tıp Fakültesi

İmza
Prof.Dr.Lülüfer TAMER
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmza
Doç. Dr. Abdullah TULİ
Ç.Ü.Tıp Fakültesi

İmza
Doç.Dr.Atilla ARIDOĞAN
Ç.Ü.Tıp Fakültesi

Yukardaki tez, Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Halil Kasap
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca sevgi, sabır ve hoşgörüsü ile her konuda çok büyük desteğini gördüğüm, fedakarlığını hiç bir zaman unutamayacağım sayın hocam Prof. Dr. Nurten Dikmen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında Biyokimya Anabilim Dalı DNA Laboratuvarında çalışmalarımı yürütebilmem için bana her türlü desteği sağlayan sayın hocam Doç. Dr. Abdullah Tuli'ye yardım ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Çalışmanın koordinasyonunda Üroloji AD olarak bana her türlü desteği veren sayın Doç. Dr. Atilla Arıdoğan'a, doktora eğitimim boyunca her türlü destek ve hoşgörüsünü esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Suna Solmaz'a çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca yardım ve hoşgörülerinden dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof.Dr. Kıymet Aksoy'a, Prof. Dr. Levent Kayrın'a, Anabilim Dalı öğretim üyelerine, çalışanlarına çok teşekkür ederim. Desteklerini ve anlayışlarını esirgemeyen Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Her türlü yardım ve desteğini gördüğüm sayın Dr. Hülya Leventerler'e, örnek alımında yardımcı olan sayın İrcihan Nalbant'a, DNA laboratuvarındaki çalışmalarım sırasında anlayış ve desteklerini esirgemeyen sayın Halil Gülsev'e, Mikail Kalaycı'ya ve Erdal Özdolap'a çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmanın kurulması aşamasında çok büyük desteklerini gördüğüm VKV. Amerikan Hastanesi Moleküler Genetik Bölüm Başkanı sayın Uzm.Dr. Nesrin Erçelen'e, bilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen Bio. Burcu Yazar'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TF2004 D2 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü.Rektörlüğü Araştırma Fonu'na, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof Dr.Halil Kasap'a, Prof. Dr. Sait Polat'a ve enstitü çalışanlarına teşekkür ederim. Çalışmalarımın istatistiksel analizinde yardımcı olan sayın Yaşar Sertdemir'e, deneysel çalışmamda yardımcı olan Nükleer Tıp Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Mustafa Kibar'a ve tek. Aysun Karasoylu'ya ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince çok büyük yardımlarını gördüğüm aileme, her türlü desteğiyle yanımda olan sevgili eşime ve çocuklarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ x
ÖZET xi
ABSTRACT xii

1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİ 3
2.1. İnfertilitenin Tanımı 3
2.2. Erkek İnfertilitesinin Başlıca Nedenleri: 3
2.3. Spermatogenez 4
2.4. Erkek Faktörünün Araştırılmasında Kullanılan Önemli Testler 8
2.4.1. Semen Analizi (spermiyogram) 8
2.4.1.1. Sperm Örneğinin Alınmasında Uyulması Gereken Kurallar 8
2.4.1.2. Semenin Makroskobik İncelenmesi 9
2.4.1.3. Semenin Mikroskobik İncelenmesi 10
2.4.1.3.1. Sperm Sayımı (konsantrasyon) 10
2.4.1.3.2. Canlı ve Hareketli Sperm Oranı (motilite) 11
2.4.1.3.3. Sperm Morfolojisinin Değerlendirmesi 11
2.4.2. Normal Spermiyogram Parametreleri (WHO, 1992)[24] 14
2.4.3. Testis (yumurtalık) Biyopsisi 14
2.5. Spermatogenezin Hormonal Kontrolu 15
2.5.1. FSH, LH ve Testosteronun Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi 16
2.5.2. Prolaktin ve Erkek Üreme Sistemine Etkisi 17
2.5.3. Leptin ve Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi 19

2.5.3.1. Moleküler Yapısı 19
2.5.4. Testosteron ve Üreme Sistemi Üzerine Etki Mekanizması 22
2.5.4.1. Testosteron Sentezi 23
2.5.4.2. Androjenlerin Etki Mekanizması 24
2.6. Y Kromozomu 25
2.6.1. Evrimsel Süreçte Y kromozomu 26
2.6.2. Y Kromozomu ve Coğrafik Dağılımı 26
2.6.3. Y Kromozomunun Tarihçesi 29
2.6.4. Y Kromozomunun Özellikleri 30
2.6.5. Y Kromozomunun Anatomik Yapısı 31
2.6.6. Y Kromozomu ve SRY Geni 33
2.6.7. Y Kromozom Mikrodelesyon Tayininin Tarihçesi 34
2.6.8. Y Kromozom Delesyonlarının Oluşum Mekanizması ve Orijini 35
2.6.9. Y Kromozomu Üzerindeki AZF Gen Aileleri 35
2.6.9.1. AZFa Bölgesi 36
2.6.9.2. AZFb Bölgesi 38
2.6.9.3. AZFc Bölgesi 40
2.6.9.4. AZFd Bölgesi 42
2.6.10. Genotip-Fenotip Korelasyonu 42
2.6.11. PCR Tekniği ile Y Kromozom Mikrodelesyonlarının Saptanması 43
2.6.12. Y Kromozomu ve Testiküler Kanser ile İlişkisi 44
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 45
3.1. Gerekli Aletler 45
3.2. Gerekli Kimyasallar 46
3.3. Örneklerin Temini ve Gruplandırılması 47
3.4. Lökositten DNA İzolasyonu (Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol Yöntemi) 48
3.4.1. Yöntem 49

3.4.2. DNA'nın Konsantrasyon ve Verim Hesabı 50
3.5. Y Kromozom Mikrodelesyon Tayin Yöntemi 50
3.5.1. Yöntem 54
3.5.2. Agaroz Jel Elekroforezi 56
3.6. Folikül Stimüle Edici Hormon Tayini [72] 57
3.7. Luteinize Edici Hormon Tayini [73] 58
3.8. Testosteron Tayini [74] 59
3.9. Prolaktin Tayini 60
3.10. Leptin Tayini [76] 61
3.11.İstatistiksel Değerlendirme 62
4. BULGULAR 63
5. TARTIŞMA 84
5.1. Y Kromozomu Mikrodelesyonlarının Tayini İçin Yapılan Çalışmalar 85
5.1.1. Dünya Literatürlerinde Yer Alan Çalışmalar 85
5.1.2. Türkiye'de Yapılan Çalışmalar 97
5.1.3. Çalışmanın Y Kromozomu Yönünden Değerlendirilmesi 98
5.2. Olguların Hormonal Yönden Değerlendirilmesi 104
5.2.1. Y Kromozomu Delesyonu Görülen Olguların Değerlendirilmesi 107
5.2.2. Hormonal Değerlendirme İçin Yapılan Çalışmalar 108
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 111
7. KAYNAKLAR 113
8. ÖZGEÇMİŞ 121

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Erkek üreme sisteminin anatomik yapısı [1] 5
Şekil 2. Spermatogenezin oluşum aşamaları [23] 6
Şekil 3. Germ hücrelerinin gametlere dönüşümü (gametogenezis)[1] 7
Şekil 4 . Makler sperm sayma kamarası [25] 10
Şekil 5. Normal ve anormal sperm morfolojileri [26] 12
Şekil 6. Normal bir spermin ince yapısı [1] 13
Şekil 7. FSH ve LH'ın hedef dokulardaki etki mekanizmaları [28] 16
Şekil 8. Prolaktin hormonunun reseptörüne bağlanması [30] 17
Şekil 9. Leptin molekülünün yapısı [34] 19
Şekil 10. Leptin reseptör izoformları [32] 20
Şekil 11. Leptin reseptörünün etki mekanizması [35] 20
Şekil 12. Leptinin gonadal organlar üzerine etkisi [36] 21
Şekil 13. Testosteronun yapısı [40] 22
Şekil 14. Testosteron, FSH ve LH'ın erkek üreme sistemi üzerine etkisi [41] 23
Şekil 15. İnsan X ve Y kromozomu [42] 25
Şekil 16. Y kromozomunun tarihsel ve coğrafik dağılımı [46] 27
Şekil 17. Dünyadaki Y kromozomu haplogruplarının dağılımı [47] 28
Şekil 18. Y kromozomunun evrimleşme süreci [50] 29
Şekil 19. Y kromozomunun delesyon aralıkları [15] 31
Şekil 20. Y kromozomunu oluşturan bölgeler [51] 32
Şekil 21. Y kromozomunda SRY bölgesi [52] 33
Şekil 23. AZFb aralığının şematik haritası [13] 38
Şekil 24. AZFc aralığının şematik haritası [13] 40
Şekil 25. Y kromozom delesyon tayini için PCR karışımlarının hazırlanması 55
Şekil 26. Agaroz jelde 2 saat yürütülen örneklerin görüntüleri.....73
Şekil 27. Agaroz jelde 1,5 saat yürütülen örneklerin görüntüsü 74
Şekil 28. Y kromozomu delesyonu görülen MÖ adlı olgu (resimde olgu sıra no:1) 75
Şekil 29. Delesyon görülen bölgelerin Y kromozom haritasında gösterilmesi (MÖ).....76
Şekil 30. Y kromozomu delesyonu görülen İY adlı olgu (resim olgu sıra no:1) 77
Şekil 31 . Delesyon görülen bölgelerin Y kromozom haritasında gösterilmesi (İY) 78

Şekil 32. Y Kromozomu delesyonu görülen SM adlı olgu (resim olgu sıra no:1) 79
Şekil 33. Delesyon görülen bölgelerin Y kromozom haritasında gösterilmesi (SM).....80
Şekil 34. Y kromozomu delesyonu görülen MKR adlı olgu (resim olgu sıra no:1).....81
Şekil 35. Delesyon görülen bölgelerin Y kromozom haritasında gösterilmesi (MKR) 82
Şekil 36. Y kromozom delesyonu görülen olguların delesyon bölgelerinin haritalanması83
Şekil 37. AZF delesyonlarının testiküler histopatolojilerine göre dağılımı [121] 95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Yöntemin uyarlanması 51
Çizelge 2. Y kromozom delesyon tayininde kullanılan primer setleri [69] 52
Çizelge 3. Kullanılan primer dizileri [55,62,70] 53
Çizelge 4: Kontrol grubun özellikleri 64
Çizelge 5. Şiddetli oligospermik grup olgularının özellikleri 65
Çizelge 6. Azospermik grup olgularının özellikleri 66
Çizelge 7. Kontrol grubu plazma hormon değerleri 67
Çizelge 8. Şiddetli oligospermik grup plazma hormon değerleri 68
Çizelge 9. Azospermik grup plazma hormon değerleri 69
Çizelge 10. Grupların hormon düzeylerinin ortalama değerleri 70
Çizelge 11. Grupların hormon değerleri yönünden karşılaştırılması (''P ''değerleri) 70
Çizelge 12. Varikosel durumlarına göre grupların ortalama hormon değerleri 71
Çizelge 13. Delesyon görülen olguların özellikleri 72
Çizelge 14. Y kromozomu delesyonu (+) olguların serum hormon düzeyleri 72
Çizelge 15. Y kromozomu delesyon (+) olguların delesyon görülen bölgeleri 72
Çizelge 16. Y kromozom delesyonu görülen bölgelerin özellikleri (MÖ) 75
Çizelge 17. Y kromozom delesyonu görülen bölgelerin özellikleri (İY) 77
Çizelge 18. Y kromozomu delesyonu görülen bölgelerin özellikleri (SM) 79
Çizelge 19. Y kromozomu delesyonu görülen bölgelerin özellikleri (MKR) 81
Çizelge 20. Literatürde geçen Y kromozom mikrodelesyonlarının özeti (1995-2000)[77] 86

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aa	Aminoasit
ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
ASA	Anti Sperm Antikoru
AZF	Azospermik Faktör
BPY1	Basic Protein on Y1
BPY2	Basic Protein on Y2
CDY	Chromodomain Y
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
DAZ	Deleted in Azospermia
DAZL	DAZ Like Autosomal
DBY	Dead Box Y
DFFRY	Drosophila Fats Facets Related Y
DHT	Dihidrotestosteron
dNTP	Deoksinükleozid Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
eIF-1AY	Eukaryotic Translation-İnitiation Factor 1AY
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH	Gonadotropin Salıcı Hormon
HHT	Hipotalamik-Hipofizer-Testiküler Aks
ICSI	Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IVF	*İn vitro fertilizasyon*
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
LH	Luteinleştirici Hormon
M	Molarite
Mb	Mega baz
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre

MIS	Müllerian Inhibitory Substance
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
µmol	Mikromol
mU	Mili Ünite
mRNA	Haberci Ribonükleik asit
mtDNA	Mitokondrial DNA
ng	Nanogram
OD	Optik Dansite
PAR	Psödo Otozomal Bölge
PRY	PTB-BL Related Protein on Y
RBMY	RNA-Binding Motif on Y
RBM	RNA-Binding Motif
SSS	Santral Sinir Sistemi
SCOS	Sertoli Cell Only Sendrom
SOX9	SRY-box containing gene 9
SHBG	Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin
SRY	Sex Determining Region on Y
STR	Short-Tandem- Repeats
STS	Sequence Tagged Site(hedef-sekans-alan)
SMCY	Selected Mouse cDNA on the Y
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TB4Y	Thymosin β4 Y İsoform
TPR	Tetratricopeptide Repeat
TTY 1	Testis Transcript Y1
UTY	Ubiquitous TPR Motif on Y
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Teşkilatı)
XKRY	XK-Related Y
Yp	Y Kromozomunun Kısa Kolu
Yq	Y Komozomunun Uzun Kolu

ÖZET

Çukurova Bölgesindeki İnfertil Erkeklerde Y kromozomu Mikrodelesyonlarının (AZF genleri) İncelenmesi

İnfertilite, evli çiftlerin yaklaşık %15'ni etkilemekte ve bunun yarısını erkek infertilitesi oluşturmaktadır. Y kromozomunun uzun kolunda spermatogenezde rol alan, "Azospermik Faktör" olarak adlandırılan üç farklı bölge (AZFa, b ve c) mevcuttur. Bu gen bölgelerin delesyonu azospermi ve şiddetli oligospermi ile sonuçlanmaktadır.

Çalışmada, 63 infertil erkekte (38 azospermik, 25 şiddetli oligospermik) Y kromozom mikrodelesyonlarının görülme sıklığı, 20 spesifik STS kullanılarak, multipleks PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile incelenmiştir. Mikrodelesyon görülme sıklığı tüm olgularda %6,3 (4/63) iken, azospermik grupta %7,8 (3/38), şiddetli oligospermik grupta %4 (1/25) bulunmuştur. Azospermik grupta delesyon bulunan bir olguda AZFb ve AZFc bölgelerinin tamamı ve proksimal c/d bölgesinin kısmi delesyonu, aynı gruptaki diğer bir olguda DYS221 bölgesi hariç AZFb ve komple AZFc bölgesinin delesyonu saptanmıştır. Azospermik gruptan bir olgu ve şiddetli oligospermik gruptan bir olguda sadece komple AZFc bölgesinin delesyona uğradığı tespit edilmiştir. Spermatogenezde rol alan genlerin fonksiyonları açıklanabilirse erkek infertilitesinin etiyolojisine yönelik çalışmalara ışık tutacağına inanmaktayız.

Çalışmada, 10 fertil kontrol grup ile 63 infertil erkek (38 azospermik, 25 şiddetli oligospermik) plazma FSH, LH, testosteron, prolaktin ve leptin düzeyi yönünden "radioimmunoassay" yöntemiyle incelenmiş ve Y kromozom mikrodelesyonları ile aralarındaki olası ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Azospermik grupta FSH ve LH düzeyi anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0.000). Prolaktin düzeyi azospermik grupta kontrol grubuna oranla daha yüksek bulunmuştur (p:0.000). Bireysel olarak plazma düzeylerinde farklılıklar olsa da gruplar arasında testosteron ve leptin düzeyleri yönünden fark görülmemiştir. Yüksek FSH ve LH düzeyi testislerdeki Sertoli ve Leydig hücrelerinde yeterli cevabın oluşmadığını göstermektedir.

Anahtar sözcükler: İnfertilite, Y kromozom mikrodelesyonları, AZF genleri, hormonlar

ABSTRACT

Determination of Y Chromosome Microdeletions (AZF genes) in Infertile Men at The Çukurova Region

Infertility affects approximately 15% of all married couples and half of the cases are male related. Three different regions have been mapped on the long arm of the Y chromosome, named "Azospermic Factor" (AZFa, b and c), are involved in the control of spermatogenesis. Microdeletions in these gene loci may result in azoospermia or severe oligozoospermia.

In this study, the frequency of Y chromosome microdeletions among 63 infertile male (38 azoospermic, 25 severe oligozoospermic) evaluated by multiplex PCR (polymerase chain reaction) using 20 gene-spesific primers (STS). Microdeletions frequency were detected in all cases is 6.3% (4/63), 7.8% (3/38) of azoospermic, and 4% (1/25) of severe oligozoospermic group. We found one deletion in azoospermic group is involving complete AZFb and AZFc region and incomplete proximal c/d regions, another deletions in azoospermic group, involved AZFb and AZFc except DYS221 locus. One individual in azoospermic group and one individual in severe oligozoospermic group are involved only AZFc region. We believe that, if the functions of the all genes that play role in spermatogenesis are explained, it will be important to understanding of about the etiology of male infertility.

In this study, plasma concentrations of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), prolactin, testosterone and leptin were measured by radioimmunoassay in 10 fertile control group and 63 infertile male (38 azoospermic, 25 severe oligozoospermic) and investigated to relation Y chromosome microdeletions. FSH and LH levels were significantly elevated in azoospermic group than control and severe oligozoospermic groups (p:0.000). Prolactin levels were significantly elevated in azoospermic group than control group (P:0.000). Although the difference was found in plasma testosterone and leptin levels in between individuals, there was no statistically significant. High plasma FSH and LH levels shows that inefficient response of Sertoli and Leydig cell to these hormones.

Key words: Infertility, Y chromosome microdeletions, AZF genes, hormones

1. GİRİŞ

Düzenli bir cinsel yaşama rağmen (haftada iki kez) hiçbir korunma yöntemi uygulanmaksızın bir yıl içinde gebelik oluşmamasına infertilite denir. Normal populasyonda %15 oranında görülmektedir. Bunun yaklaşık %50'sini erkeğe bağlı infertilite oluşturmaktadır. İnfertil erkeklerin %60'ında matür germ hücre üretiminde bozukluk ya da düşük sayıda sperm üretimi görülmektedir. Erkek üreme sağlığını, kromozomal anomaliler, hormonlar, sperm üretimi, sperm kanallarında spermin taşınması ve cinsel fonksiyonlar gibi etmenler etkilemektedir. Bunlardan herhangi birindeki bozukluk infertiliteye neden olmaktadır [1,2,3].

Normalde insan diploid hücresi 22 çift otozomal ve 2 cinsiyet kromozomu olmak üzere 46 kromozomdan oluşur. Fötus (embriyoda) bipotansiyel gonadın testis ya da over yönünde mi gelişim göstereceği cinsiyet kromozomlarında taşınan genler tarafından belirlenmektedir. Yakın zamana kadar, erkek genomunun %2'lik bir kısmını oluşturan Y kromozomunun bilinen en önemli işlevi, cinsiyet belirlenmesindeki rolü idi [4,5].

Y kromozomunun kısa kolundaki SRY (seks determining region of Y) geni, testis gelişiminde esansiyel olarak kabul edilmektedir. Kadınlarda XX, erkeklerde XY biçiminde olan cinsiyet kromozomları nadir de olsa bazı erkeklerde XX biçiminde olmaktadır. Bu durum, normalde Y kromozomu üzerinde taşınan SRY gen bölgesinin, kromozom eşleşmesi sırasında X kromozomuna geçmesi ile ortaya çıkmaktadır. Anatomik olarak normal olan XX kromozom taşıyan erkekler, Y kromozomu yokluğuna bağlı olarak infertil olmaktadırlar. Aynı durum, XY dişilerde de söz konusudur. Y kromozomundaki SRY geninin kaybı ile XY dişiler oluşmaktadır [6,7]. Son yıllarda bu süreçte rol alan başka genlerin de varlığı ileri sürülmektedir. Y kromozomunun özellikle sperm oluşum aşamalarında önemli fonksiyonlara sahip olduğu, bu nedenle erkek infertilitesinin araştırılmasındaki gerekliliği giderek önem kazanmaktadır. Y kromozomunun yaklaşık %95'i mayoz esnasında rekombinasyona gitmeyen NRY (non-recombining region of Y) bölgesinden oluşur. Daima haploid durumdadır ve paternal geçişe izin verir. Bu özellikleri nedeniyle ''Y kromozom polimorfizmi'' çalışmaları, babalık tayininde, ırkların ayırımında ve populasyon tarihinde genetik geçmişin araştırılmasında çok önemlidir [8,9,10].

Y kromozomunun uzun kolu üzerindeki 11.bölgede, azospermiye neden olan ve Azospermik Faktör (AZF) olarak bilinen gen aileleri bulunmaktadır. Delesyon görülen

bölgedeki gen aktivitesinin eksikliği, spermatogenez bozukluğuna neden olmaktadır. AZF bölgesinde sperm üretim ve aktivitesinden sorumlu gen aileleri temel olarak AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd olarak sınıflandırılmaktadır. AZFa ve AZFb gen bölgeleri, sperm matürasyonunda rol alan proteinleri kodlamaktadırlar. AZFc gen bölgesi, gonadlardaki hücre proliferasyonunda, spermatojenik hücre çekirdeğinde lokalize olan RNA bağlayıcı motif içeren RBM (RNA-binding protein) protein sentezinde rol alır. AZFd gen bölgesi, sperm olgunlaşma basamaklarında görevli aktif proteinleri kodlamaktadır. Kaynaklara göre değişiklik göstermekle birlikte Y kromozomu mikrodelesyonu tespit edilen vakaların kendi içlerinde ortalama dağılımları AZFa %3, AZFb %9, AZFc %79, AZFb+c %6, AZFa+b+c %3 şeklindedir [4,10-12].

Son yıllarda artan sitogenetik ve moleküler DNA analizleri sonucunda şiddetli oligospermik ve azospermik erkeklerin %3-18'inde Y kromozomu mikrodelesyonuna rastlanmıştır. İntrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) tekniğinin gelişmesi ile birlikte babadan oğula genetik geçiş gündeme gelmiştir. Delesyonlar genetik geçiş gösterdiği gibi *de novo* olarak da ortaya çıkmaktadır [13-15].

FSH (Follikül uyarıcı hormon) ve LH (Luteinleştirici hormon) gonadları uyaran glikoprotein yapıdaki hormonlardır. FSH, kadında folliküler büyümeyi, erkekte ise spermatojenik epiteli uyararak Leydig hücrelerinden testosteron salınımını tetikler. Laktasyon hormonu olarak bilinen prolaktin düzeyinin yüksekliğinin sperm üretimi ve cinsel fonksiyon üzerine olumsuz etkisinin olduğu bilinmektedir. İnfertilite üzerine etkili olan bir diğer hormon da leptindir. Puberte için önemli bir hormon olan leptinin, ön hipofiz üzerine direk etki ederek LH ve daha fazla oranda FSH'ın salınımını uyardığı, ayrıca GnRH (gonadotropin salıcı hormon) salınım atımlarını hızlandırdığı bildirilmiştir [16,17].

Çalışmada, azospermi ve şiddetli oligospermi vakalarında yöremizdeki Y kromozom delesyonlarının saptanması, in vitro fertilizasyon (IVF) merkezlerinde, azospermik olgularda TESE (testiküler sperm ekstraksiyonu) sonucu sperm bulabilme olasılığının belirlenmesi, bu delesyonu taşıyan erkeklerin yönlendirilmeleri ve çiftlerin aydınlatılması amaçlanmıştır. Ayrıca incelenen olguların plazma FSH, LH, testosteron, prolaktin ve leptin düzeyleri ölçülerek Y kromozom delesyonları ile hormonların olası etkileşimleri değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. İnfertilitenin Tanımı

Düzenli bir cinsel yaşama rağmen (haftada iki kez) hiçbir korunma yöntemi uygulanmaksızın bir yıl içinde gebelik oluşmamasına infertilite denir. Erkek infertilitesi infertil çiftlerin %10-30'unda tek neden, %15-30'unda kadına bağlı nedene ek olarak karşımıza çıkmaktadır [1,2,15].

Erkek infertilitesinin yaklaşık %40-60'ında altta yatan neden bilinse de birçoğunda etken ortaya konamamakta ve idiopatik infertilite olarak kabul edilmektedir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmaların hız kazanması ile birlikte kromozom anomalileri (örn Klinifelter sendromu) ve Y kromozom mikrodelesyonları gibi genetik nedenlerin erkek infertilitesindeki önemi giderek açıklık kazanmaktadır. Oligospermik olan erkeklerde kromozomal problemler %2,2 iken azospermik olanlarda %15 civarındadır [18,19].

2.2. Erkek İnfertilitesinin Başlıca Nedenleri:

- **Hormonal Bozukluklar**

-İzole gonadotropin yetmezliği (Kallman sendromu),
-İzole LH ve FSH yetmezliği,
-Hiperprolaktinemi,
-Tiroid hastalıkları,
-Konjenital hipogonadotropik hastalık,
-Hipofizer yetersizlik (tümörler, infiltratif olay, ameliyat, radyasyon),
-Ekzojen hormonlar (androjen- estrojen, glukokortikoid fazla verilmesi) [16,20,21].

- **Kalıtsal gen hastalıkları ve kromozom bozuklukları**

-Klinefelter Sendromu, XX erkek , XYY sendromu,
-Turner sendromu,
-Y kromozom mikrodelesyonları,
-Myotonik distrofi,

-Hemokromatozis,

-Orak hücre anemisi,

-Germ hücre aplazisi (SCOS: Sertoli cell only sendromu).

- **Gonadotoksinler**

-İlaçlar, insektisitler,

-Radyasyon, manyetik alanlar,

-Alkol, sigara ve uyuşturucu maddeler,

-Gıda katkı maddeleri.

- **Çeşitli metabolik hastalıklar**

-Testislere travma ve omurilik zedelenmesi,

-Böbrek yetmezliği, karaciğer hastalığı,

-İmmünolojik hastalıklar, enfeksiyonlar.

- **Anormal spermatogenez**

-Kriptoorşitizm (inmemiş testis),

-Varikosel,

-Sperm kanallarında tıkanıklık,

-Sperm motilite ve fonksiyon bozukluğu,

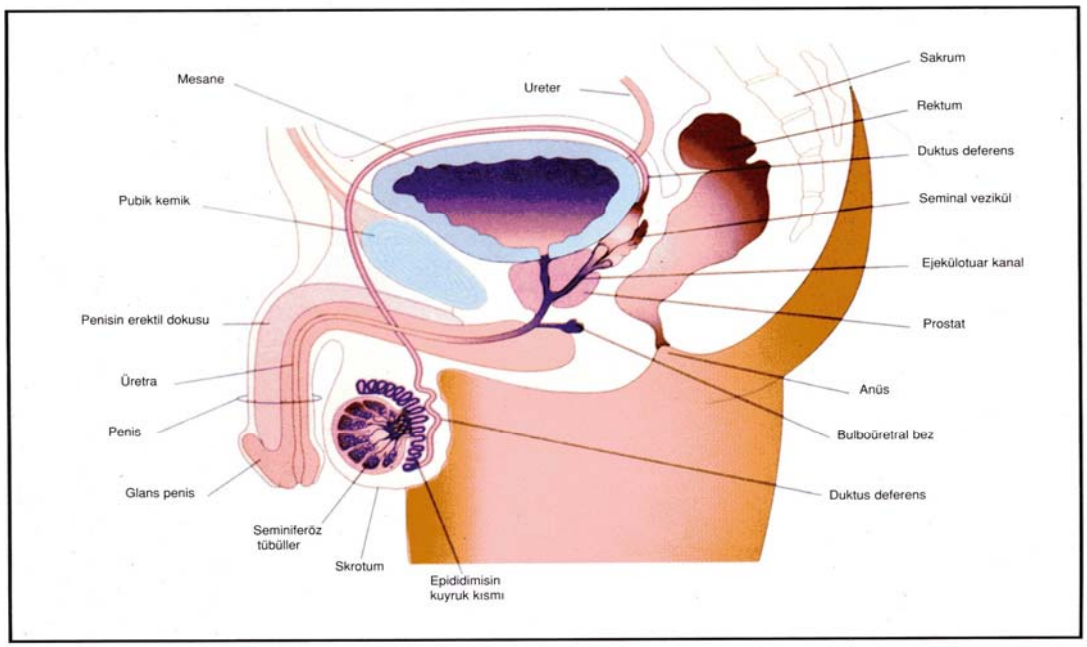
-Sperm morfoloji defekti (baş, kuyruk, akrozom vs),

-Maturasyon defekti [2,16,20,21].

2.3. Spermatogenez

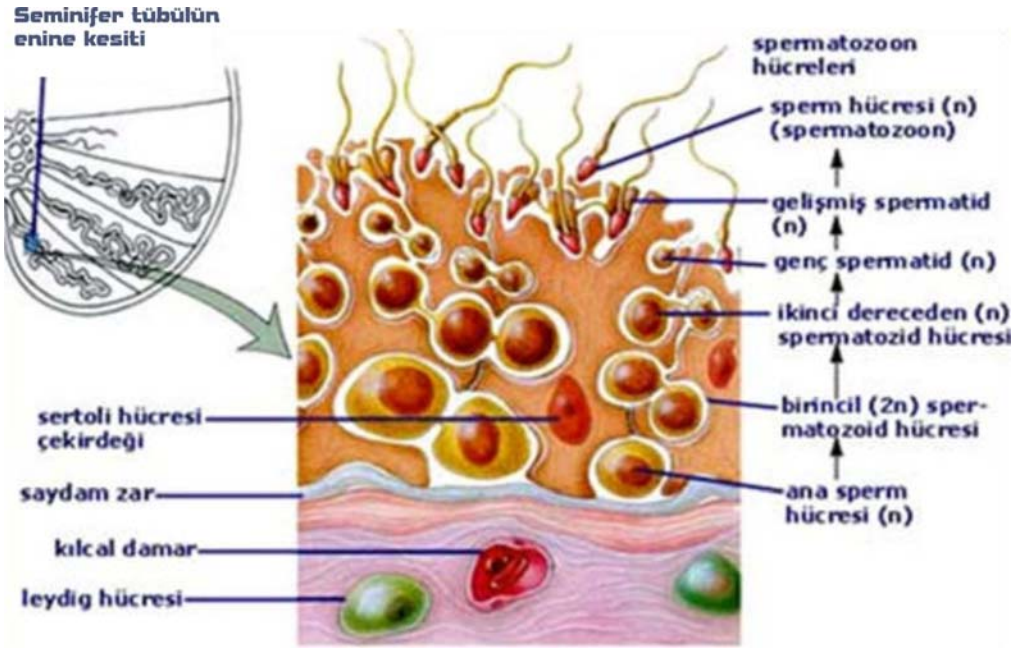
Sperm üretimi oldukça uzun ve karmaşık bir süreçtir. 72 günlük sikluslar halindeki insan spermatogenezi pubertede başlar, yaşam boyunca sürer. Germ hücrelerinin çeşitli aşamalardan geçtikten sonra sperm hücresi haline gelmesi "spermatogenez" olarak adlandırılır. Bu süreç içinde germ hücreleri mayoz bölünme sonrası 46 kromozomlu diploid halden 23 kromozomlu haploid hale gelirler ve yine 23 kromozom içeren haploid yumurta hücresi ile birleşerek yine 46 kromozomlu yeni bir bireyin oluşmasına olanak sağlarlar. Spermatogenez proliferasyon fazı, redüksiyon-bölünme fazı ve farklılaşma fazı olmak üzere üç aşamada incelenir [1,16,17,22].

Her aşamada hücreler spermatogonia, spermatosit, spermatid gibi farklı isimler alırlar. Testis dokusu, içinde kan damarları, sinir lifleri ve kas hücreleri içeren bir kapsül tarafından çevrelenmiş (skrotum) bir yapının içindedir. Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerin içinde gerçekleşir. Her bir testis içinde yaklaşık 500 seminifer tübül bulunur ve tek bir tübülün uzunluğu 30-70 santimetredir. Seminifer tübüller testis hacminin yaklaşık %80-90'ını oluştururlar (şekil 1). Bu nedenle testis hacmi kabaca sperm üretim potansiyeli hakkında fikir verir [1,17,22].



Şekil 1. Erkek üreme sisteminin anatomik yapısı [1]

Seminifer epitel farklı tip hücre grupları içermektedir. Germ hücreleri sperm yapımından sorumluyken sertoli hücreleri germ hücrelerinin etrafında destek dokusunu oluştururlar. Testislerde bulunan bir diğer hücre türü de erkek seks hormonu olan testosteron yapımını sağlayan Leydig hücreleridir. Seminifer tübül içinde spermatogenezin tüm aşamalarındaki sperm öncülü hücreler bulunur. Farklılaşma fazını tamamlayan hücreler seminifer tübül içine salınırlar. Bu nedenle testisin farklı kesimlerindeki alanlarda gelişimin değişik evrelerindeki sperm üretimi devam eder (şek 2) [1,17,22].



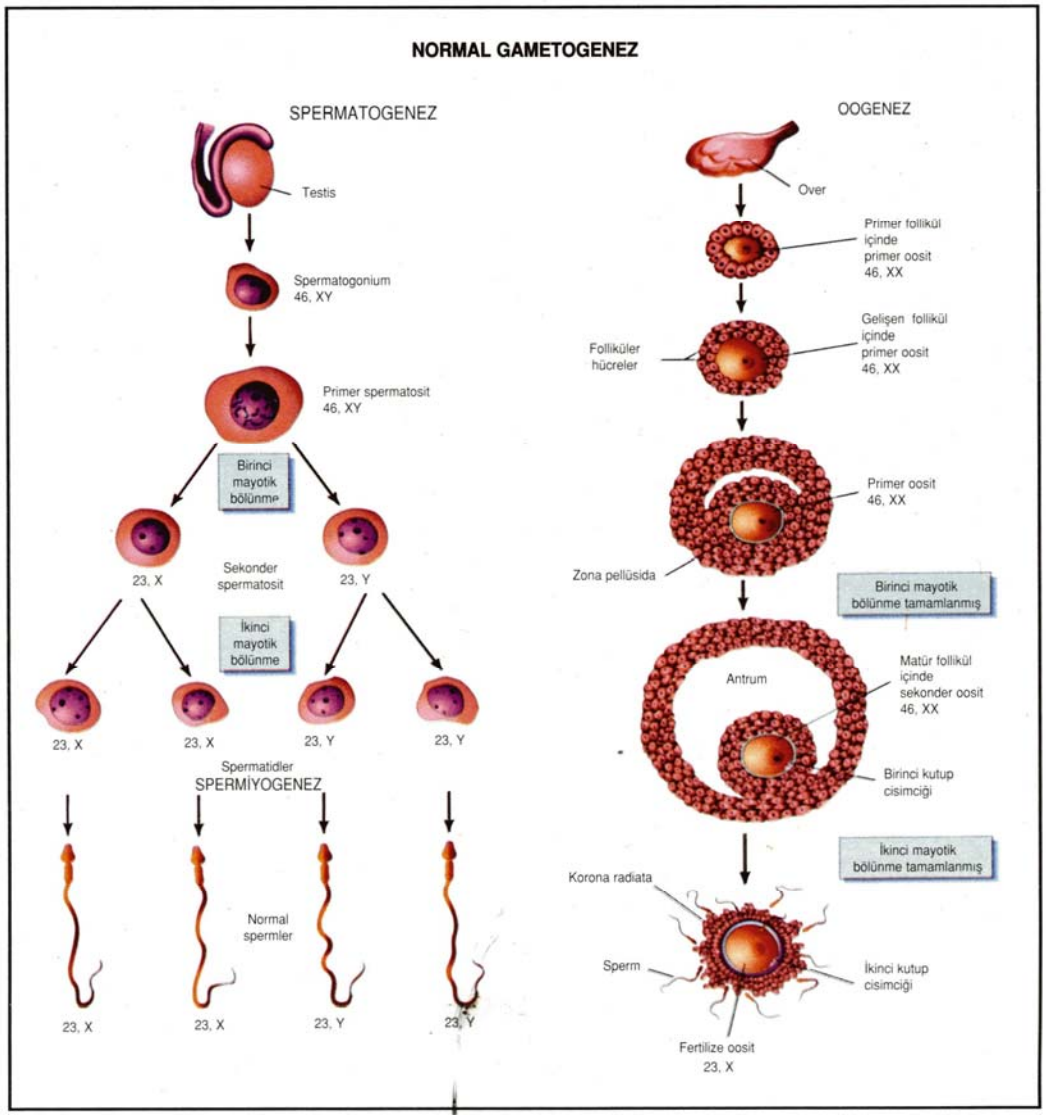
Şekil 2. Spermatogenezin oluşum aşamaları [23]

Proliferasyon Fazı: Germinal epitel içinde olgunlaşma evresinin ilk basamağındaki hücreler spermatogonyumlardır. Mitoz bölünme ile oluşan bu hücrelerin bir bölümü spermatogenezis sürecine girerken bir kısmı dejenere olur (şekil 3) [1,17,22].

Redüksiyon-Bölünme Fazı: İnsanda, koyu tip A, açık tip A ve B spermatogonyumlar olmak üzere üç grup spermatogonyum ayırt edilmiştir. Koyu tip A spermatogonyumlar açık tip A spermatogonyumlara dönüşürler. Açık tip A spermatogonyumlar da tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Tip B spermatogonyumlar ise farklılaşma sürecine girerek **primer spermatositlerin** öncüllerini oluştururlar. Primer spermatositler ise birinci mayoz bölünme ile **sekonder spermatositleri** oluşturur. Hemen arkasından ikinci mayoz bölünmeyi geçirerek haploid sayıda kromozom içeren **spermatidleri** meydana getirir. Spermatogenetik hücrelerin sertoli hücreleri arasındaki bölümde bulunması ile puberteden önce seminifer tübül lümenine geçişleri engellenir. Spermatosit adını alan hücreler DNA içeriklerini yani genetik materyallerini iki katına

çıkardıktan sonra 4 ayrı hücreye bölünürler. Bu 4 hücreden her biri artık 23 kromozom içermektedir [1,17,22].

Farklılaşma Fazı: Bölünerek genetik materyallerini yarıya indiren bu yeni hücreler uzun bir süreç sonunda farklılaşırlar. Buna spermiyogenez adı verilir. Spermiyogenez süresince üreme hücreleri hem dölleme yeteneklerini kazanırlar hem de spermlerin hareket yeteneğini sağlayan kuyruk gelişir.Tüm bu fazlar sırasında sperm öncülü hücreler seminifer epitelinin derinliklerinden yüzeye yani seminifer tübüllerin iç boşluğuna doğru ilerler [1,17,22].



Şekil 3. Germ hücrelerinin gametlere dönüşümü (gametogenezis)[1]

2.4. Erkek Faktörünün Araştırılmasında Kullanılan Önemli Testler

Erkeğe ait infertilitenin tanımlanmasında kullanılan testler geniş bir aralıkta yer almaktadır. Bunlar:

a- Spermiyogram,

b- Serum ya da seminal plazmada antisperm antikor (ASA) ölçümü,

c- Postkoital Test,

d- Spermatozoanın fertilizasyon kapasite testleri (Akrozom kapasite testleri),

e- Endokrinolojik inceleme ,

- Serbest ve total testosteron,
- FSH,
- LH,
- Prolaktin düzeyleri,

f- Kromozom analizi [2,16,20,21].

2.4.1. Semen Analizi (spermiyogram)

İnfertil çiftlerin yaklaşık %50'sinde erkek faktörüne bağlı infertilite tek veya kadına bağlı nedene ek olarak karşımıza çıkmaktadır. Semen analizi günümüz laboratuvar koşullarında yapılabilecek en basit testlerden biri olarak görülse de; belli kriterlere uygun olarak yapılmayan semen analizleri klinisyenlerin yanlış yönlendirilmesine neden olacaktır. Bu nedenle semen analizinin androloji formasyonu olan laboratuvarlarda yapılması gerekmektedir. Erkek infertilite tanısı için ilk yapılması gereken ve en basit test spermiyogram analizidir [1,2,19].

2.4.1.1. Sperm Örneğinin Alınmasında Uyulması Gereken Kurallar

Laboratuvarlara gelen her örnek gibi semen örneğinde de basit ama oldukça önemli dikkat edilmesi gereken preanalitik noktalar vardır. Bunlar:

a- Örnek almadan önce hastanın detaylı öyküsü alınmalıdır. Kabakulak, hepatit, cinsel yolla bulaşan hastalık geçirip geçirmediği, varikosel durumu, kronik hastalığı ve sürekli kullandığı ilaçlar, alkol ve sigara kullanımı sorgulanmalıdır.

b- Örnek vermeleri gereken günde 3-4 günlük cinsel perhizde olmaları gerekir. Perhiz süresinin istenilen sürenin altında olması sperm sayısının düşüklüğüne, uzun olması ise motilite düşüklüğüne, ayrıca spermin akrozin içeriğinde azalmaya neden olmaktadır.

c- Semen toplanan kapların daha önceden kimyasal ve biyolojik testlerle toksisite durumları ölçülerek bu amaca uygun toksik olmayan, steril, tek kullanımlık kaplar olmasına özen gösterilmelidir.

d- Örnek kaplarının üzerine hastanın adı-soyadı etiketi hastanın gözü önünde yapıştırılmalıdır.

e- Hasta, tüm örneği kabın içerisine alması konusunda uyarılmalı, eğer bir kısmı dışarıya kaçmışsa bu not edilmelidir.

f- Örnek verme esnasında krem ya da sabun gibi kayganlaştırıcı madde kullanılmaması ve örneğe kesinlikle bir damla dahi su kaçırmaması konusunda uyarılmalıdır.

g- Örneğin alınması ile laboratuvara teslimi en geç 20 dk içinde olmalıdır [1,2,19].

2.4.1.2. Semenin Makroskobik İncelenmesi

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasında ilk basamağı oluşturan spermiyogram analizinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 1992) tarafından belirlenen kriterler esas alınmaktadır. Semen analizi makroskopik ve mikroskobik incelemelerden oluşur [24].

Makroskobik incelemede semen, likefikasyon, görünüm, volüm ve pH özellikleri yönünden değerlendirilmektedir. Ejakülasyon sırasında akıcı olan semen daha sonra koagüle olur. Örneğin verilmesinde itibaren ejakulatın 5-30 dk içerisinde likefiye olması (sıvılaşması) gerekir. 37 ºC etüvde ya da inkübatörde bekletilmesi bu süreci kolaylaştırır. Semenin koagüle olmasına neden olan faktörler seminal vezikül; likefiye olmasını sağlayan proteolitik enzimler ise prostat kaynaklıdır. Değerlendirme likefikasyondan sonra yapılmalıdır. Renk, koku ve viskozite gibi özellikleri de belirlenerek kaydedilmelidir. Semen hacmi 2-8 ml arasında normal kabul edilir. Normal pH değeri 7,2 - 8,0 arasındadır. Akut enfeksiyonlarda pH değeri 8'in üzerine çıkabilir. pH'ın düşük

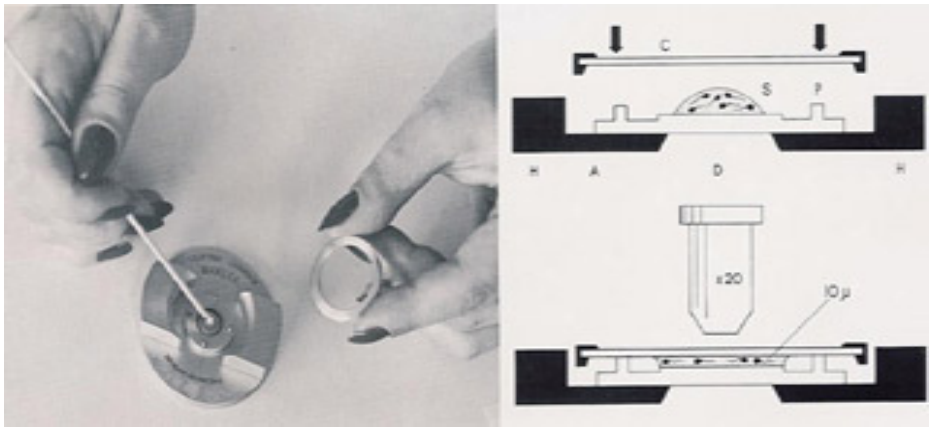
olması sperm salınımının yetersizliği nedeniyle ejakulatın daha çok asidik prostat sıvısından oluştuğunu düşündürebilir [1,2, 19].

2.4.1.3. Semenin Mikroskobik İncelenmesi

Semen analizinde mikroskobik değerlendirmenin sağlıklı sonuç verebilmesi için faz-kontrast ataşmanlı ışık mikroskobu kullanılmalı ve değerlendirmeler 10x20 büyütmede yapılmalıdır [1, 2, 19].

2.4.1.3.1. Sperm Sayımı (konsantrasyon)

Sperm sayımı için çeşitli sayım kamaraları tanımlanmış olmakla birlikte günümüzde yaygın olarak Makler sayım kamarası kullanılmaktadır (şekil 4). Semen örneğinin koyulacağı alan 10 µm derinliğinde olması spermatozoanın tek bir düzlemde serbest hareketine olanak sağlamaktadır. Böyle bir kuyucuğun olması sperm yoğunluğunun homojen yayılmasına ve iki tabaka arasında kalan spermin bastırma hızına göre konsantrasyon farkı yaratmamasını sağlamaktadır [1,2,19].



Şekil 4 . Makler sperm sayma kamarası [25]

Laboratuvarlarda sperm sayımı için farklı kamaraların kullanımı aynı hastanın farklı laboratuvarlarda oldukça farklı spermiyogram sonucu almasına neden olmakta bu da hasta ve klinisyenin güvensizliğine neden olmaktadır [1,22].

Makler sayım kamarası ile spermlerin sayıları ve hareket yüzdeleri daha kesin olarak saptanabilmektedir. 100 karelik alan içinde 10 karedeki sperm sayısı milyon/

ml'deki sayıyı verir. Sağlıklı bir sonuç alabilmek için birden fazla (en az dört) 10 kare sayılarak ortalamaları alınmalıdır. Eğer 100 karelik alan içerisinde sperm görülmemiş ise alan dışındaki bölgeler de taranmalıdır. Ejakulatta sperm görülmez ise 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek pellete bakılmalıdır. Bazı olgularda ejakulattaki sperm sayısının çok nadir olması nedeniyle santrifüj sonunda sperm görülebilmektedir. Eğer santrifüj sonunda da sperm görülmez ise ''azospermik örnek'' denilmektedir. Sağlıklı bir tanının konulabilmesi için bir hastanın 15 gün arayla en az 3 kez spermiyogram değerlendirmesi yapılmalıdır [1,19,22].

2.4.1.3.2. Canlı ve Hareketli Sperm Oranı (motilite)

Isının, sperm sayısı ve motilitesini etkileyen önemli bir faktör olması nedeniyle sayım kamaralarının 37 ºC etüvde tutulmasına dikkat edilmelidir. On karedeki toplam sperm sayısı belirlenir. On karedeki canlı spermler de sayılarak toplam spermlere oranı bulunur. Canlı ve hareketli spermlerin oranları % hareketlilik oranını belirler. Hareketlilik 4 sınıfta değerlendirilmektedir:

a- Hızlı doğrusal ilerleyici hareket
b- Yavaş doğrusal ya da doğrusal olmayan ilerleyici hareket
c- Yerinde hareket
d- Hareketsiz

Sağlıklı sonuç verebilmek için iki ayrı incelemede en az 200 sperm hücresinin hareket özellikleri değerlendirilmeli ve iki sonuç arasındaki fark %5'den fazla olmamalıdır. Motilite %0 olduğu durumlarda vitalite (canlılık) testi yapılmalıdır. Bazı örneklerde spermlerin büyük çoğunluğu vital fakat hareketsiz olabilmektedir. Vitalite testinde canlı sperm oranı > %70 olmalıdır. Klinisyenin isteğine göre motilitenin < 40'ın altında olduğu durumlarda da vitalite tayini yapılmaktadır [1,2,19,22].

2.4.1.3.3. Sperm Morfolojisinin Değerlendirmesi

Semen analizinde değerlendirilen en önemli kriterlerden birisi de spermin yapısal özelliklerinin incelenmesine dayanan morfolojik sınıflandırmadır**.** Değerlendirmede WHO ya da Kruger kesin (strict) kriterleri kullanılmaktadır. WHO kriterlerine göre normal

değer >%30 iken, Kruger kesin kriterlerine göre >%14 normal morfolojili sperm olmalıdır (şekil 5)[1,2,17,19].

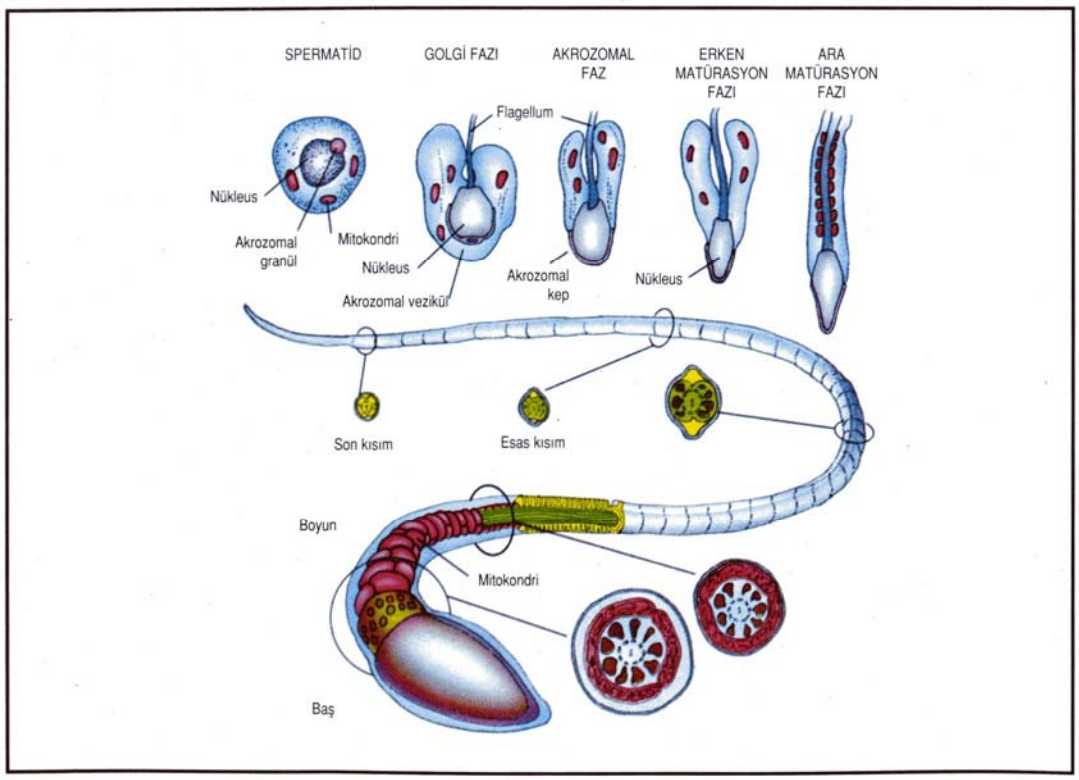


Şekil 5. Normal ve anormal sperm morfolojileri [26]

Spermlerde fertilizasyon kapasitesi ve embriyo gelişimi ile ilgili yetersizliklere rastlanması ve tekrarlayan düşüklerin araştırılmasında sperm morfolojisinin değerlendirilmesi önemli görülmektedir. Daha önceden %70'lik etanol ile yıkanmış lamlara sperm konsantrasyonuna göre damlatılan semen örneği 45 derecelik açı ile yayılarak kurutulur. Daha sonra seçilen uygun boya ile (tercihen Diff-Quick veya Spermac) boyandıktan sonra 100X objektifte immersiyon yağı altında 100 veya 200 sperm değerlendirilerek % normal morfolojili sperm oranı belirlenir. Spermler baş, kuyruk ve akrozom yapılarına göre sınıflandırılır. Kruger kriterlerine göre normal sperm morfolojisi >%14 olmalıdır (şekil 6)[1,17,19].

Normal sperm morfolojisi

Baş	Düz oval
	Akrozom, başın %40-70'ni oluşturur
	Normal ölçüler; uzunluk 5-6 µm, genişlik 2,5-3,5 µm
	Sınırda kabul edilen baş formları anormal gruba dahil edilir
Boyun	4-5 µm uzunluğunda düzgün olmalı
	Başın alt kısmına, aksiller konumda bağlanmalıdır
	Boyunda başın yarısından daha büyük sitoplazmik cisim bulunmamalıdır.
Kuyruk	50-55 µm uzunluğunda, düzgün kıvrımlı, boyun kısmından daha ince olmalı ve son kısma doğru giderek incelmelidir [1,2,19,22, 24].



Şekil 6. Normal bir spermin ince yapısı [1]

2.4.2. Normal Spermiyogram Parametreleri (WHO, 1992)[24]

Volüm : > 2 ml

Konsantrasyon : >20x10^6 /ml

Motilite : >%40

İleri doğrusal hareketlilik : >%50

Hızlı doğrusal hareketlilik : %25

Morfoloji (Kruger) : < %14 normal

Sperm konsantrasyonuna göre sınıflama:

Tanım	**Sperm sayısı (milyon/ml)**
Azospermi	0
Şiddetli oligospermi	<1
Orta oligospermi	1-5
Hafif oligospermi	5-20
Normospermi	>20

2.4.3. Testis (yumurtalık) Biyopsisi

Testis biyopsisi, azoospermi veya ileride derece oligozoospermisi olan hastalarda tıkanıklığa bağlı (obstrüktif) ve tıkanıklığa bağlı olmayan (non-obstrüktif) nedenlerin belirlenmesi için yapılır. Testis biyopsisi sonrasında travmaya bağlı kanama ve testis dokusunda harabiyet oluşabileceğinden ve günümüzde testis dokusundan elde edilen spermler mikroinjeksiyon işleminde kullanılabildiğinden tanı ve tedavi amaçlı biyopsi aynı anda yapılabilir. Testis biyopsisinin değerlendirilmesi; şu şekilde olur[2].

a- Normal spermatogenez; normal sperm üretiminin olmasıdır, azoospermi veya şiddetli oligospermi vakalarında, böyle bir biyopsi sonucu sperm kanallarında tıkanıklığı düşündürür.

b- Hipospermatogenez; sperm üretiminde görülen değişik evrelerdeki hücrelerin hepsi olmasına rağmen üretim azalmıştır. Hipotalamus, hipofiz bezi ve testiküler akstaki bozukluklara bağlı görülebilir. Normospermik olgulara göre, artmış plazma FSH düzeyi, düşük inhibin B düzeyi görülmektedir.

d- Matürasyon arresti; sperm üretiminin belli evrede duraklamasıdır. Spermatogonia ya da primer spermatosit aşamasında arrest görülebilir. Dokuda büyük oranda spermatogonia ve primer spermatosit mevcuttur ve azospermi ile sonuçlanır. Eğer kısmi bir arrest sözkonusu ise olgun spermatozoaya rastlanabilir ve oligospermi ile sonuçlanır. Artmış plazma FSH düzeyine düşük inhibin B düzeyi eşlik etmektedir.

e- SCOS sendromu; sperm üreten hücrelerin tamamen veya kısmen yokluğudur. Kanser tedavisine, geçirilmiş enfeksiyonlara ve genetiksel defektlere bağlı olabilir. Artmış plazma FSH düzeyi ve düşük inhibin B düzeyi görülmektedir.

f- Tubular fibroz; testis dokusundaki harabiyetin ileri derece olduğu durumdur. Sperm üreten hücreler ve Sertoli hücreleri kaybolmuş, Leydig hücreleri azalmıştır. Bu durum radyasyon tedavisine, kabakulak enfeksiyonuna, inmemiş testise ve testis dokusunun oksijensiz kalmasına bağlı olabilir [2,18] .

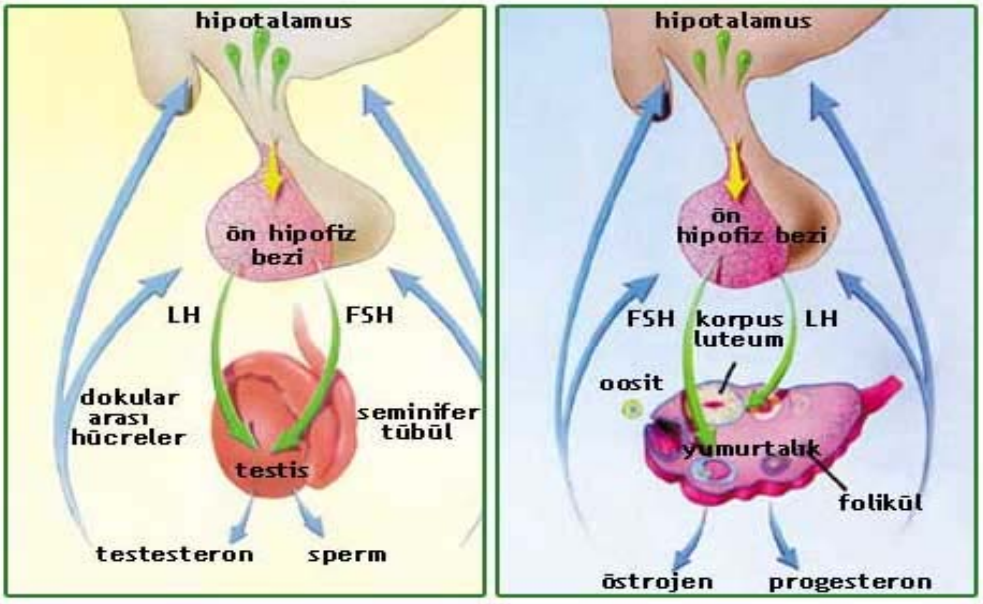
2.5. Spermatogenezin Hormonal Kontrolu

İnfertil bir erkeğin hormonal yönden değerlendirilmesine dikkatli bir öykü alınımı ile başlamalıdır. Hastanın potens ve libido durumu, çocukluk çağı ve gelişimi esnasında doğmalık anomaliler ve puberte gecikmesi, ailesel bir endokrin hastalığı, koku alma duyusu kaybı, galaktore ve görme alanı bozukluklarının varlığı öğrenilmelidir. Bu tür belirtiler hipotalamik veya hipofizer kaynaklı bir tümörün habercisi olabilmektedir. Hastanın mesleği ve yaşadığı ortam da önemlidir. Bazı pestisitler serum östradiol seviyesini yükseltmektedir. Örn. kurşuna maruz kalmak hipotalamik-hipofizer-testiküler aksı etkileyerek testosteron sentezinin baskılanmasına neden olmaktadır. Narkotik madde kullananlarda, gonadotropin sekresyonu inhibe olarak testosteron seviyesinde azalma meydana gelmektedir. Vücut geliştirme ve halter sporu ile uğraşanlarda daha çok rastlanılan, eksojen androjenik steroid alımı durumunda hipotalamus ve hipofizden gonadotropin salınımı inhibe olmakta, Leydig hücreleri testosteron yapımı için stimüle edilememekte ve spermatogenez ciddi olarak duraksamaktadır [3].

2.5.1. FSH, LH ve Testosteronun Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi

FSH ve LH gonadları uyaran glikoprotein yapıdaki hormonlardır. FSH, kadında folliküler büyümeyi erkekte ise spermatojenik epiteli uyarır. LH kadında ovulasyon için gerekliyken erkekte testiküler Leydig hücrelerinden androjen salgılanmasını uyarır.

Erkek üreme sisteminin hormonal kontrolü, hipotalamik-hipofizer-testiküler aks adı verilen, çeşitli basamaklarında geri besleme sistemleri olan bir mekanizma ile sağlanmaktadır. Santral sinir sisteminden hipotalamusa gelen noradrenerjik ve dopaminerjik uyarılar buradan GnRH sentezini ve salınımını kontrol etmektedir. GnRH pulsatil olarak salgılanır ve hipofiz ön lobundan gonadotropik hormonlar olan FSH ve LH'ın salınımını uyarır. LH ve FSH ise spermatogenezin tamamlanabilmesi ve sürekliliğinin sağlanabilmesi için gerekli gonadal steroidlerin yani testosteron ve östradiolün sentezini arttırmaktadır. GnRH'un pulsatil olarak salınması gonadotropik hormonların da pulsatil olarak salgılanmasına neden olmaktadır. Sertoli hücreleri FSH'a yanıt olarak androjen bağlayan protein salgılarlar. LH ve FSH kan dolaşımına katılarak farklı mekanizmaları etkilemektedir. LH, Leydig hücrelerinde testosteron üretimini sağlayarak spermatogenezi uyarmaktadır (şekil 7)[16,17,22,27].

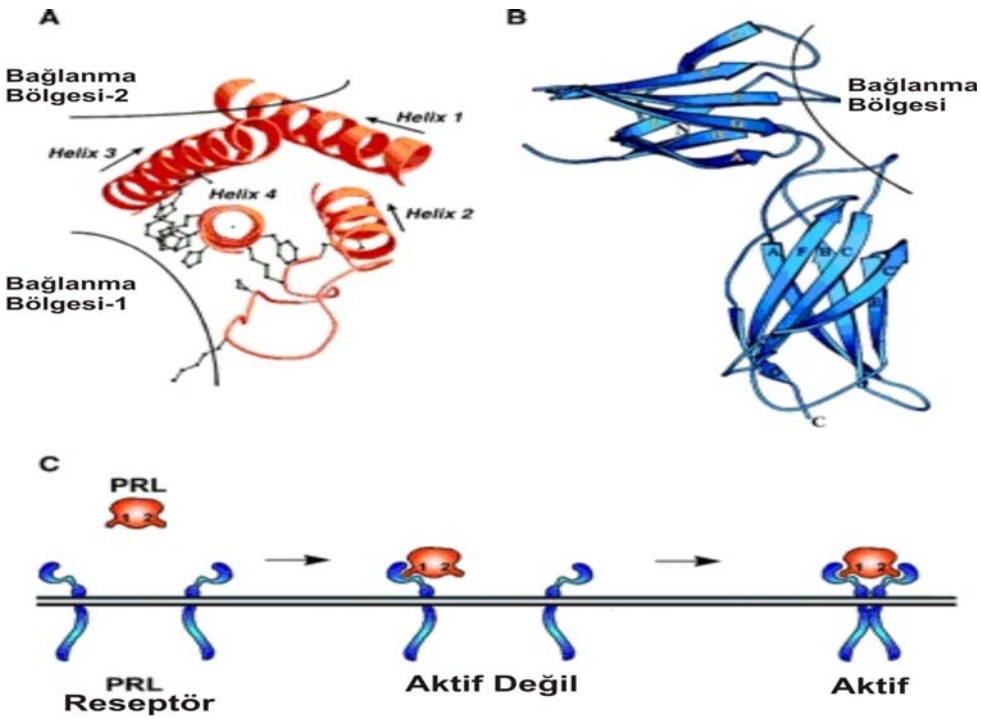


Şekil 7. FSH ve LH'ın hedef dokulardaki etki mekanizmaları [28]

2.5.2. Prolaktin ve Erkek Üreme Sistemine Etkisi

Prolaktin, 199 aminoasitten oluşan tek zincirli bir polipeptiddir. Prolaktin geni kromozom 6'ya lokalize olmuştur. Moleküler ağırlığı 24000 Dalton olan bu hormon primer olarak laktasyonla ilgilidir. Yapısal olarak olarak büyüme hormonu ve plasental laktojene benzeyen prolaktin farklı heterojeniteye sahiptir. Bu da glikolizasyon, fosforilasyon ve sülfasyondaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Hipofiz tarafından salınan dominant formu glikolize olmamış prolaktindir. Ön hipofiz bezindeki laktotrop hücrelerinin yanında göğüs ve desidua gibi diğer dokulardan da sentezlenir.

Prolaktin reseptörü hücre membranını tek bir kez geçen transmembran bir proteindir (şekil 8). Büyüme hormon reseptörü gibi, sitokin reseptör ailesi üyesidir. Sitoplazmik kuyruk uzunluğuna göre kısa, orta ve uzun formu mevcuttur. Artan prolaktin düzeyinin en önemli etkisi normal düzeydeki seks hormonlarının (kadında östrojen, erkekte testosteron) salınımını baskılamasıdır [29- 31].



Şekil 8. Prolaktin hormonunun reseptörüne bağlanması [30]

Prolaktin hormonunun birçok etkisi mevcuttur. Bunlar:

a. Meme bezini uyararak süt salgılanmasını sağlar.

b. Fazla miktardaki prolaktin, dopaminin etkisini baskılayarak seksüel potansiyelde azalmaya neden olur.

c. Santral sinir sistemindeki aksonları kapsayan myelin oluşumunda rol alan öncü hücrelerin proliferasyonunda,

d. Gebeliğin sonunda fetal akciğerde surfaktan sentezinde,

e. İmmün sistemin düzenlenmesinde,

f. Elektrolit ve su dengesinin korunmasında,

g. Büyüme ve gelişmede rol alır [29- 31].

Hayvanlarda testosteron biyosentezi için fizyolojik miktarda prolaktin salgılanması gerekliyken insanlarda yüksek prolaktin seviyeleri testosteron sentezini baskılamaktadır. Prolaktin, testiste Leydig hücrelerinde LH reseptörlerine olan affinitesi nedeniyle önemlidir ve testosteron yapımını dolaylı olarak etkilemektedir. Ancak prolaktinin spermatogenez ve sperm fonksiyonlarına etkisi halen tam olarak belirlenememiştir. Bir çok çalışma prolaktin ve semen özellikleri arasında pozitif ilişki olduğunu gösterirken, bazı çalışmalar böyle bir ilişkiyi gösterememiştir [29,31].

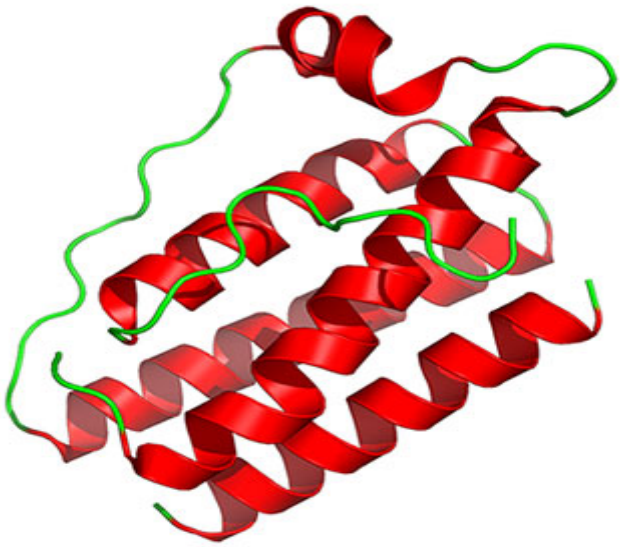
Aşırı düzeyde prolaktin salgılanması (hiperprolaktinemi) bir çeşit hipogonadotropik hipogonadizme neden olur. Sebep çoğunlukla, hipofizde yerleşen prolaktin salgılayan mikroadenomlardır. Laboratuvar testlerinde testosteron, FSH ve LH düzeyleri azalmış, prolaktin düzeyi artmıştır. Prolaktin seviyesi gün içinde değişiklikler göstermektedir. Elde edilen anormal prolaktin seviyesi bir başka ölçüm ile doğrulanmalıdır [29-31].

2.5.3. Leptin ve Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi

1994 yılında keşfedilen hormon/sitokin rolündeki leptin, protein yapıdadır. Gen transkripsiyonu ve translasyonu adipoz doku, plasenta ve gastrointestinal sistemde olmaktadır. Yüksek leptin düzeyi beyine enerji rezervinin yeterli olduğu sinyalini verir. Adipostatik etkisinden dolayı obez kişilerde kilo kaybına neden olmaktadır. Plazma leptin düzeyi, vücut kütle indeksi ve yağ yüzdesi ile direk ilişkilidir [32, 33].

2.5.3.1. Moleküler Yapısı

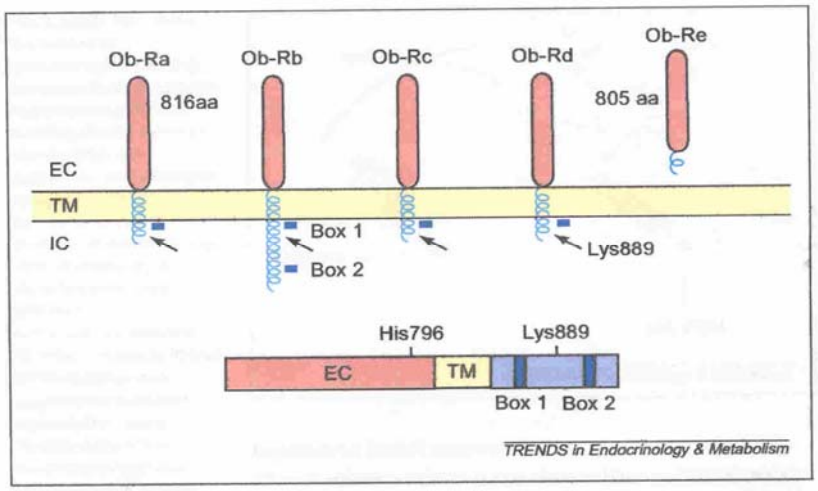
Leptin, 21 aa'lik aminoterminal sekretuar sinyal dizilimi ile birlikte 167 aa'lik bir polipeptidtir (şekil 9). Leptinin mikrozomlara translokasyonu, bu sinyal peptitten ayrılıp kan dolaşımına salınması ile olur. Dolaşımdaki leptin 146 aa ve moleküler ağırlığı 14-16 kDa'dur. Sitokin ailesinden IL-6, IL-11, IL-12, LIF ve G-CSF 'ye benzerlik gösterir. DNA'sı 15000 baz çiftinden oluşur [32,33].



Şekil 9. Leptin molekülünün yapısı [34]

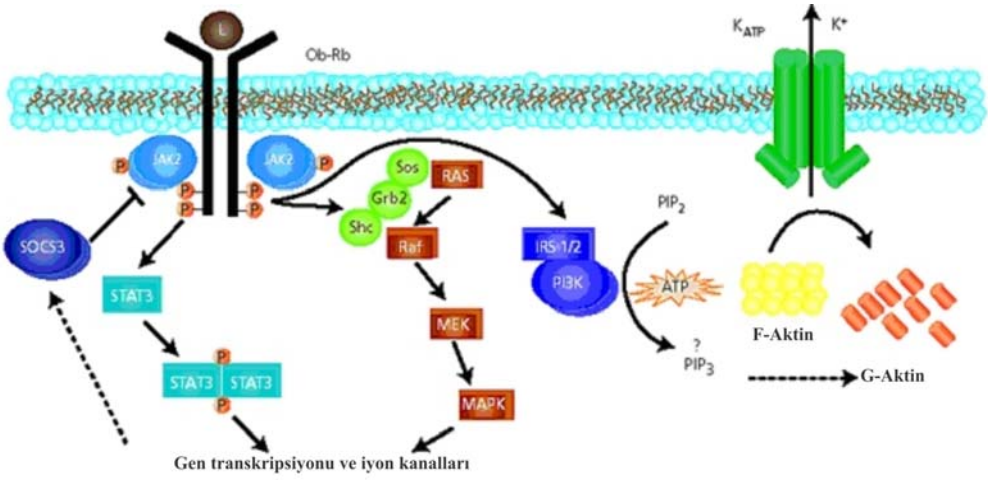
Leptin reseptörlerindeki reseptör ya da post reseptör düzeyindeki mutasyonlar sonucu leptin direnci meydana gelir ve obesite görülür. Leptin reseptörleri sınıf-I sitokin ailesindendir (şekil 10). Bu aile İnterlökin-2, interferon ve büyüme hormonu

reseptörlerini de içerir. Metabolik etkisini, SSS (santral sinir sistemi)'de ve periferal dokularda lokalize olan özel reseptörleri aracılığı ile gösterir (şekil 11)[32, 33].



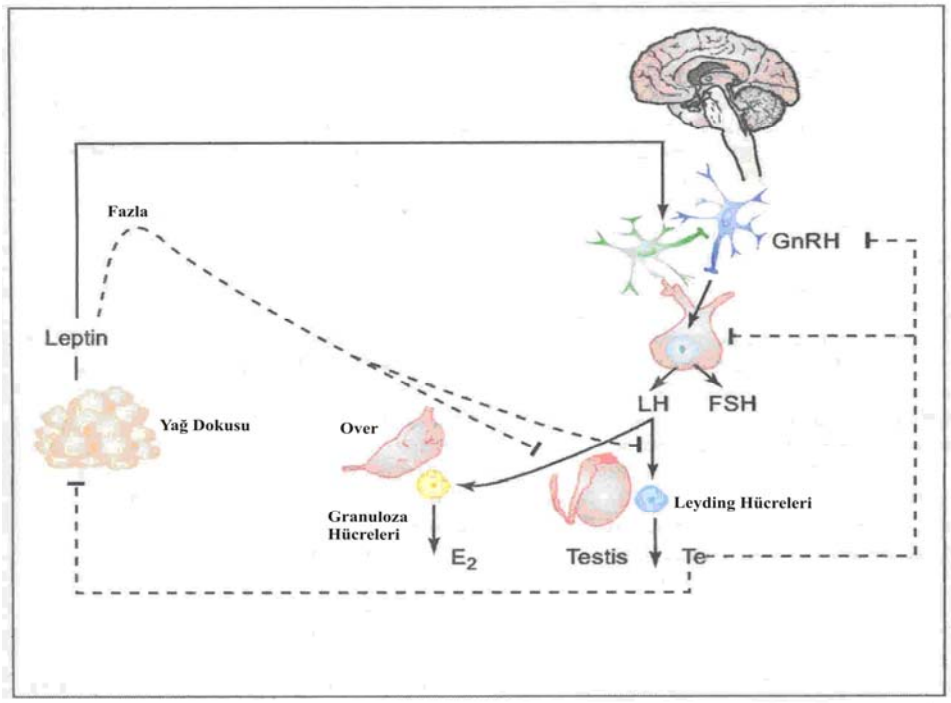
Şekil 10. Leptin reseptör izoformları [32]

Leptin ekspresyonu gıda alımıyla da etkilenir. Kemirgenlerde açlıkta leptin düzeyi önemli ölçüde düşer, beslenmeden sonra tekrar yükselir. Bu değişim insülin ile ilişkilidir. Leptin gen ekspresyonu insülin tarafından pozitif yönde indüklenir. İnsanda da açlıkta leptin düzeyi düşer beslenmeden sonra tekrar yükselir. Fakat kısa süreli kalori kısıtlamalarında leptin ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmez [32,33].



Şekil 11. Leptin reseptörünün etki mekanizması [35]

Birçok türde yapılan çalışmalarda leptinin, hipotalamus-hipofiz-gonadal aksisi etkilediği belirtilmiştir. Leptin reseptör mRNA' sı ön hipofiz ve hipotalamusta fazla miktarda bulunmaktadır. Leptinin GnRH, LH ve FSH sekresyonu üzerine etkisi çift yönlüdür (şekil 12). Hem stimülatör hem de inhibitör etki gösterir [36,37].

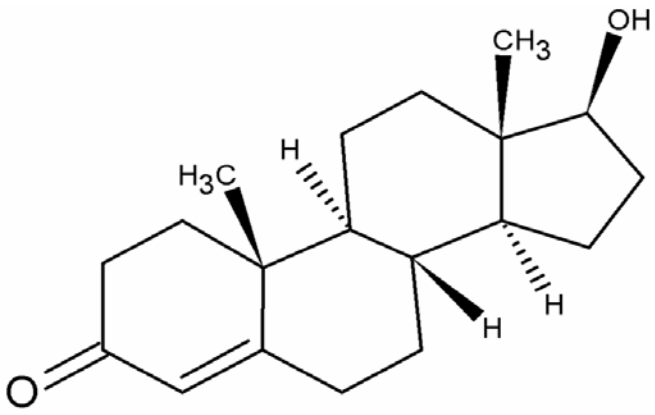


Şekil 12. Leptinin gonadal organlar üzerine etkisi [36]

Leptin sadece seks steroid üretimini değil aynı zamanda hedef organları da etkilemektedir. Leptin reseptörleri endometrium, overler, Leydig hücreleri ve meme bezi epitelinde mevcuttur. Gebe kadınlarda maternal sirkulasyonda önemli düzeyde plasenta orijinli leptin sekresyonu olduğu belirtilmiştir. Anne ile fetüs arasında besinsel düzeyin sinyalcisidir. Aneroksia Nervosa ve Bulimia Nervosa gibi beslenme bozukluklarında düşük serum leptin düzeyi ile birlikte amenore de görülmektedir. Leptin aynı zamanda kemik gelişiminde, hematopoiesiste ve damarlanmada da önemli rol oynamaktadır [33,36-38].

2.5.4. Testosteron ve Üreme Sistemi Üzerine Etki Mekanizması

Prenatal gelişim, puberte ve puberte sonrasında cinsiyet organları ve cinsiyet özelliklerinin gelişiminde testosteron önemli rol oynamaktadır. Testislerde sentezlenip plazmaya salınan en önemli andojendir (şekil 13). Testosterondan sentezlenen diğer bir androjenik steroid olan dihidrotestosteron (DHT), total kan androjenlerinin küçük bir kısmını oluşturur. Plazma Testosteron düzeyi erkeklerde yaklaşık 700 ng/dl, DHT 45 ng/dl'dir. Erkeklerde kan testosteronunun %95'i testislerde Leydig hücrelerinden sağlanmaktadır. Daha düşük oranlarda adrenal korteks ve overlerde de sentezlenmektedir. Testosteron reseptörü 76000 Dalton olup sitoplazmada ve nükleusta bulunmaktadır [39,40] .



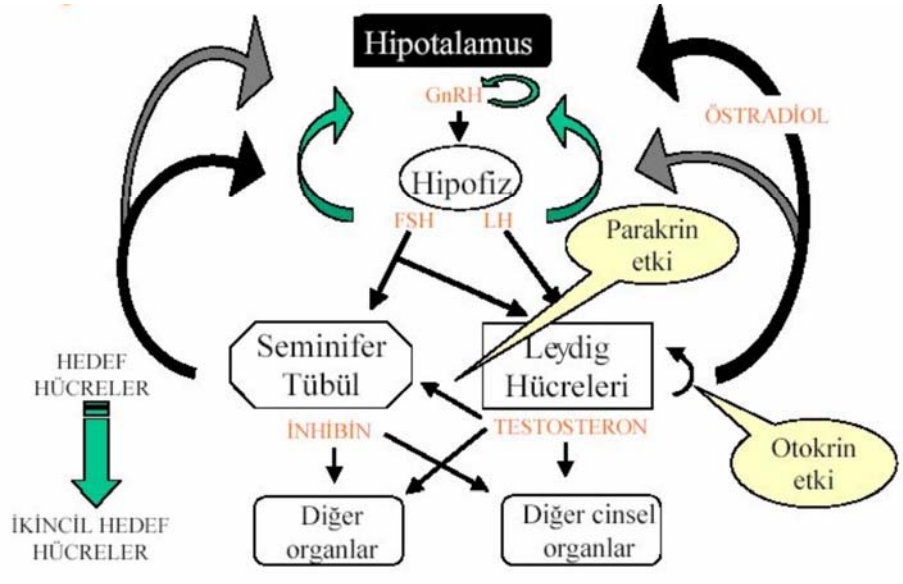
Şekil 13. Testosteronun yapısı [40]

Testosteron, puberte ile birlikte yetişkin erkeklerin yaşamı boyunca sperm üretimi, erektil potansiyel ve seks gücünün korunmasında rol alan en önemli hormondur. Testosteron üretimi hipofiz-hipotalamus-testiküler aksın düzenlenmesi ile olur. Hipotalamustan üretilen GnRH, hipofizden FSH ve LH salınımını kontrol eder. LH, Leydig hücrelerinin hücre zarındaki almaçlara bağlanır ve adenilil siklazı aktifleştirerek hücre içi cAMP (siklik adenozin monofosfat) düzeyini arttırarak steroidogenez ve testosteron üretimini uyarır. Spermatogenez, FSH ve testosteron ile düzenlenir. FSH sertoli hücrelerine bağlanarak androjen bağlayıcı proteinin (ABP) sentezini teşvik eder. ABP seminifer tübüllerin lümenine salınır ve bunun sonucunda Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron spermatogenez bölgesinde çok yüksek düzeyde bulunur[39].

Testosteron sentezinin yokluğuna hipogonadizm denir. Bu durum buluğ çağından önce görülecek olursa ikincil cinsiyet karakterleri gelişemez. Erişkin dönemde görülür ise bu karakterlerin çoğu geriler [40] .

2.5.4.1. Testosteron Sentezi

Testis kaynaklı androjenler intersitisyel dokuda Leydig hücreleri tarafından sentezlenir. Gonad steroidlerinin öncülü kolesteroldür. Kolesterol ya Leydig hücrelerinde asetattan sentezlenmekte ya da kan yolu ile testise taşınmaktadır. Burada hız kısıtlayıcı basamak kolesterol yan zincir kırpılmasıdır. Kolesterol Leydig hücrelerinde yan zincir kırıcı enzim ile pregnonolona dönüştürülmektedir. Kolesterolün pregnonolona çevrimi böbreküstü, ovaryum ve testiste aynıdır. 3-β-hidroksisteroid dehidrogenaz/izomeraz enzimi ile pregnonolondan progesteron oluşturulmaktadır. 17-α-hidroksilaz enzimi ile 17-hidroksiprogesteron açığa çıkarılır. Bu da 17,20 Liyaz enzimi ile androstendiona dönüştürülür. 17- β-hidroksisteroiddehidrogenaz enzimi ile de son olarak testosteron sentezlenmiş olur. Testosteron sentez ve salınımı LH'ın testisler üzerine uyarıcı etkisi ile olur. Geri bildirim (feed-back) mekanizması ile hipotalamusta, FSH üzerine etki ederek kendi sentezini inhibe eder (şekil14) [39,40] .



Şekil 14. Testosteron, FSH ve LH'ın erkek üreme sistemi üzerine etkisi [41]

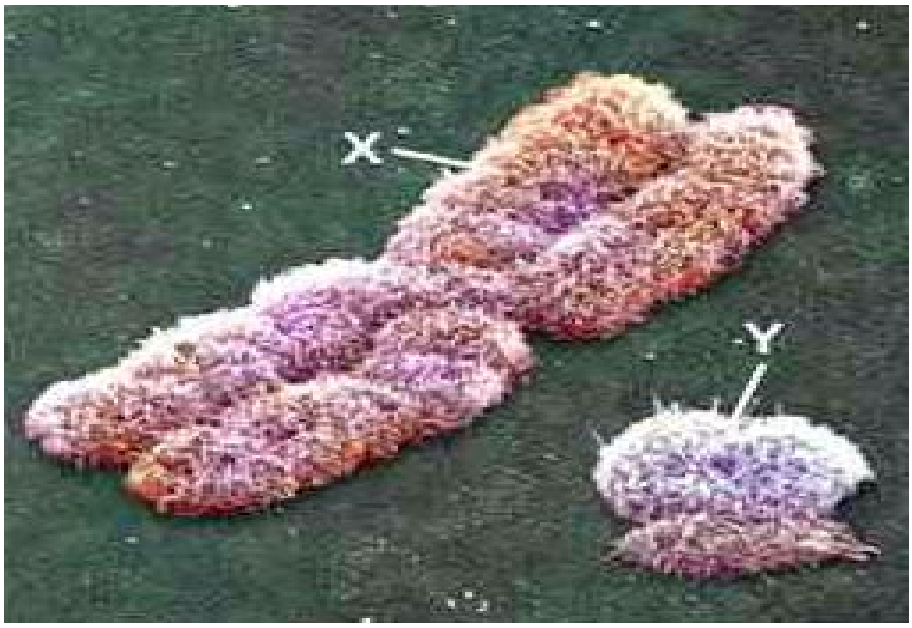
Dolaşımda testosteronun, %55'i seks hormon bağlayıcı globuline (SHBG), %40'ı albumine ve %5'i kortizol-bağlayıcı globuline bağlanarak taşınır. Testosteron etkisini ya direk olarak ya da metabolitleri üzerinden gösterir. Hedef dokularda etkisini daha aktif olan DHT'a ya da östradiole dönüşerek de gösterir. Testosteronun direk etkileri arasında Wolffian kanallarının farklılaşması ve iç genital yapının gelişimi, spermatogenezin uyarılması, seks potansiyelinin artması, kas gelişimi ve gırtlağın genişlemesi sayılabilir. Bu etkileri yanında hematolojik ve immünolojik olaylarda da rol alır[39,40] .

2.5.4.2. Androjenlerin Etki Mekanizması

Serbest testosteron edilgen veya kolaylaştırılmış sızma yolu ile plazma zarını aşarak hücreye girer. Hedef hücreler testosteronu, özel reseptörler ile hücre içinde tutulumunu sağlarlar. Dokudan dokuya değişmekle birlikte tutulan hormonun büyük bir kısmı hücre çekirdeğinde bulunur. Birçok hedef hücrenin sitoplazmasında testosteronu DHT'ye çeviren 5α-redüktaz bulunur. Tek bir sınıf almaç bulunmasına rağmen almaçların DHT'ye olan affinitesi testosterona olan affinitesinden daha fazladır. Testosteron-DHT-almaç karması çekirdekte hedef gen ve proteinlerin sentezini arttırır [39, 40].

2.6. Y Kromozomu

İnsandaki 23 çift kromozomun son çifti olan cinsiyet kromozomları, kadınlarda XX, erkeklerde XY biçimindedir. X kromozomu Y kromozomundan daha büyüktür ve daha fazla genetik bilgi içermektedir (şekil 15). Fakat dişiler, erkeklerin sahip olduğu kadar genetik bilgiyi tek bir X kromozomundan almaktadır. X kromozomlarından biri dışında diğerleri embriyonik gelişimin blastosist aşamasında inaktive olmakta, somatik hücrelerden biri ayrılarak Barr cismini oluşturmaktadır. Barr cisimleri bu hücrelerin interfaz çekirdeğinde görülmektedir. X inaktivasyon mekanizması XIST geninin (X inaktif spesifik transkript) bulunması ile anlaşılmıştır [5,8].



Şekil 15. İnsan X ve Y kromozomu [42]

Evrim sürecinin ve ırkların dağılımlarının araştırılmasına, yakın zamana kadar sadece anneden geçiş gösteren mitokondrial DNA'lar ışık tutmakta idi. Son yıllarda yapılan çalışmalar, Y kromozomunun da bu süreçte ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur. Diğer bütün kromozomlardan farklı olarak, Y kromozomunun eşi yoktur ve X kromozomuyla parça alışverişinde bulunduğu tek bölgesi uçlarıdır. Büyük bölümü rekombinasyona girmez ve yapısında tek kopya ve çoklu kopya genler mevcuttur. Sonuçta Y kromozomu, babadan oğula, oğuldan toruna vs. geçerken büyük ölçüde korunmuş olur. Her nesilde yapısına katılan zararlı ya da zararsız mutasyonlar insanlığın atasını ve coğrafi

dağılımını araştırmada onu cazip kılmaktadır. Yeryüzünde yaşayan bütün erkeklerin Y kromozomlarının, 50.000-60.000 yıl önce yaşayan bir ortak atanın Y kromozomuyla % 99,99'dan fazla benzerlik taşıyor olması oldukça ilginçtir [43] .

2.6.1. Evrimsel Süreçte Y kromozomu

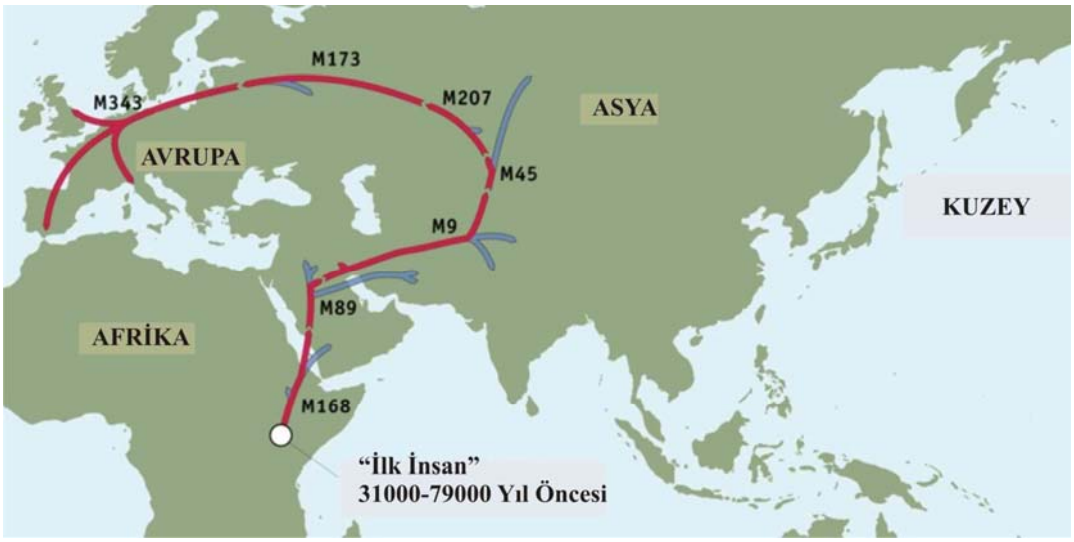
İnsanların ortak atasının, yüzbinlerce yıl önce Afrika'da ortaya çıkmış olduğu varsayılmaktadır. 1990'larda Arizona Üniversitesi ve Stanford Üniversitesi araştırmacıları tarafından Y kromozomu soy ağacının kökünün Afrika'da yer aldığı gösterilmiştir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) ile yapılan daha önceki bazı çalışmalarda, 'ilk kadın'ın da Afrika'da yaşadığı sonucunu varılmıştır. Kimi araştırmacıların gözünde, geniş alanları ve hayvan bolluğuyla Afrika savanalarını oldukça andıran Orta Asya, Afrika'yı 50.000-60.000 yıl kadar önce terkeden insanoğlunun yerleşip çoğaldığı besin kaynaklarının bol olduğu bir yer olmuştur. Yayılma önce batıya (batı Asya) doğru gerçekleşmiş, zamanla doğu, kuzey ve güney yönlerine de sürmüştür. Batı kolu, sonunda Avrupa'ya, doğu kolu da Bering Boğazı'nı geçerek Kuzey Amerika'ya ulaşmıştır. Bu iki kol 1492'de burada yeniden biraraya gelmişlerdir. Görünüş bakımından da birbirlerinden oldukça farklı hale gelen insanların gezegen üzerinde nasıl yayıldıkları ve bu farklılıkları nasıl kazandıkları-nın izleriyse, Y kromozomunda gizlenmiş durumdadır [43].

Evrim boyunca, erkek bireylerin farklılaşması için gerekli genlerin Y kromozomuna göç ettiği varsayılmaktadır. Otozomal genler mitotik bölünme sırasında eşlenikleri sayesinde DNA tamirine girebilirken Y kromozomu üzerindeki eşleniği olmayan genlerde tamir mekanizması devreye giremez. Bu durum Y kromozomunda birçok kopya genlerin oluşmasına neden olmaktadır. Spermatogenez için kritik genlerin çoklu kopyası olması yıkıcı mutasyonlar sonucu oluşan etkinin en aza indirilmesi bakımından önemli bir avantajdır [8,43-45].

2.6.2. Y Kromozomu ve Coğrafik Dağılımı

Y kromozomu içinde yazılı olan tarihsel bilgi nasıl okunuyor? Araştırmalarda örneğin Kazakistan'da, M45 olarak anılan bir Y kromozomu işaretleyici temel alınıyor. Bu işaretleyiciler, Y kromozomunda görülen mutasyon bölgeleridir. M45, insan aile ağacındaki önemli ayrım noktalarından biri olarak kabul ediliyor. Dallardan biri, kökleri

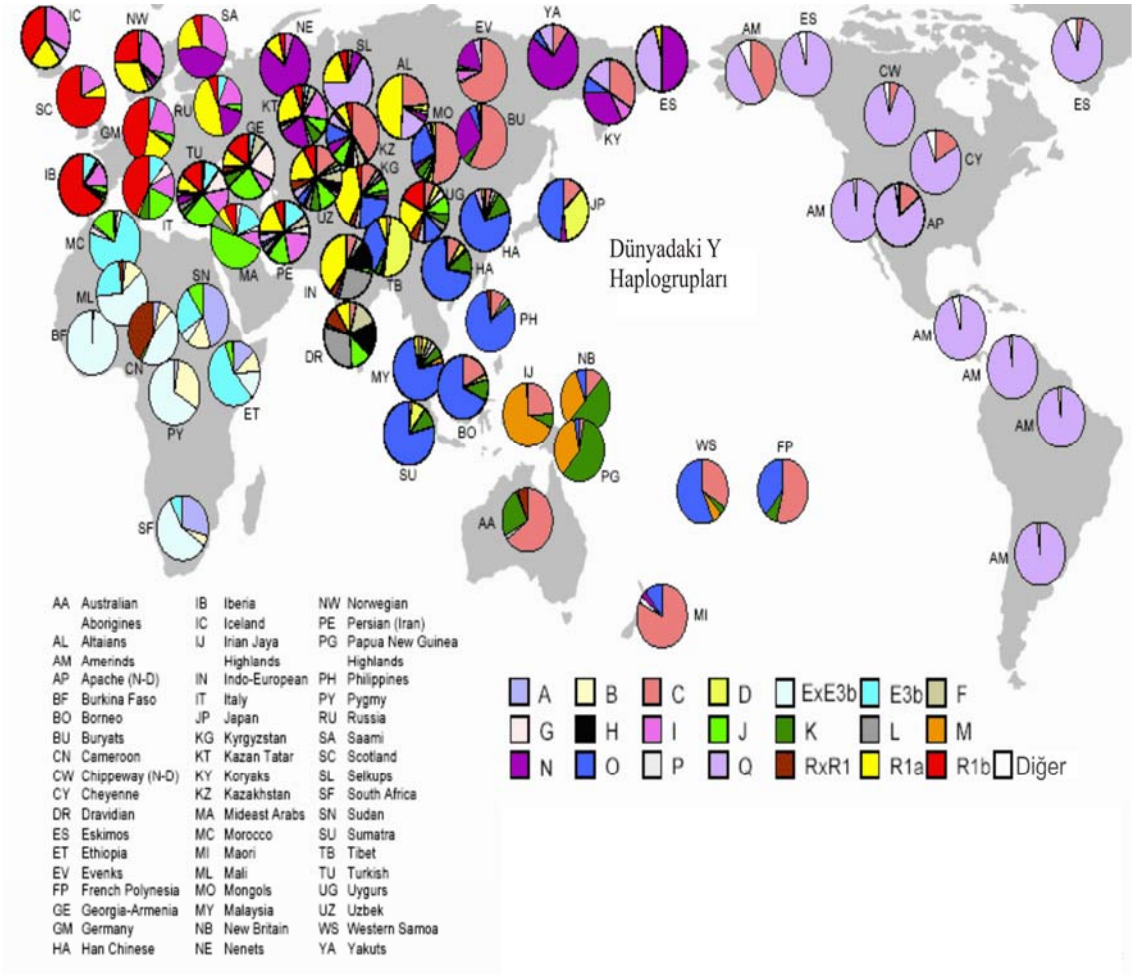
Batı Avrupa'da olan birçok kişi tarafından paylaşılan M173'e; diğeri de birçok yerli Amerikalıda bulunan M3'e yöneliyor. Avrupalı ve Amerikalılarda da M45 var; ancak Orta Asya'da M45'e sahip olup daha sonraki iki işaretleyiciye sahip olmayan, onun yerine farklı birçok mutasyon içeren kişiler de bulunuyor (şekil 16). Bunun anlamı, Orta Asya'nın, M45'in ortaya çıktığı yer olduğu; ayrıca hem Avrupa, hem de yerli Amerikalıların ortak köklerinin de burada bulunduğudur. M45'ten sonraki mutasyonların sayısıysa, araştırmacılara bu işaretleyicinin yaklaşık 35.000-45.000 yaşında olduğunu düşündürüyor. M173'ün, yaklaşık 30.000 yıl önce ortaya çıktığı görülüyor (yaklaşık olarak, Fransa'da bulunan ilk mağara resminin tarihi). M3 ise yalnızca yerli Amerikalılarda var; bu nedenle insanların Bering Boğazı'nı ilk geçip de Amerika'ya vardıkları zamandan sonra ortaya çıkmış olmalıdır denilmektedir. Bunun kesin zamanı arkeologlarca hâlâ tartışılmakta olmasına karşın, Wells ve ekibi, benzeri ipuçlarıyla yaklaşık 17.000 yıl öncesine işaret edebiliyorlar. 1492'den sonra, insanlığın 30.000 yıl kadar önce ayrılan iki büyük kolu ve dolayısıyla da genleri, yeniden biraraya gelmeye başladığı düşünülüyor. Araştırmacılar, yerli Amerikalı erkeklerin %17'sinin, Avrupalılardan miras kalmış Y kromozomu taşıdığını tahmin ediyorlar [43].



Şekil 16. Y kromozomunun tarihsel ve coğrafik dağılımı [46]

İlk insanların göç yolları: ‘’M’’ harfi ile gösterilen genetik işaretleyiciler, farklı Y kromozomu soylarının dünya üzerinde ne zaman ve nasıl yayıldığını anlamamızı

sağlamaktadır. Y kromozomu haplogruplarının dünya üzerindeki dağılımları şekil 17'de gösterilmiştir [43, 47].



Şekil 17. Dünyadaki Y kromozomu haplogruplarının dağılımı [47]

İnsan gen havuzunun tek belirleyicisinin doğal seçilimin olmadığı, tarihsel olayların da azımsanmayacak düzeyde etkilerinin olduğu belirtilmektedir [43].

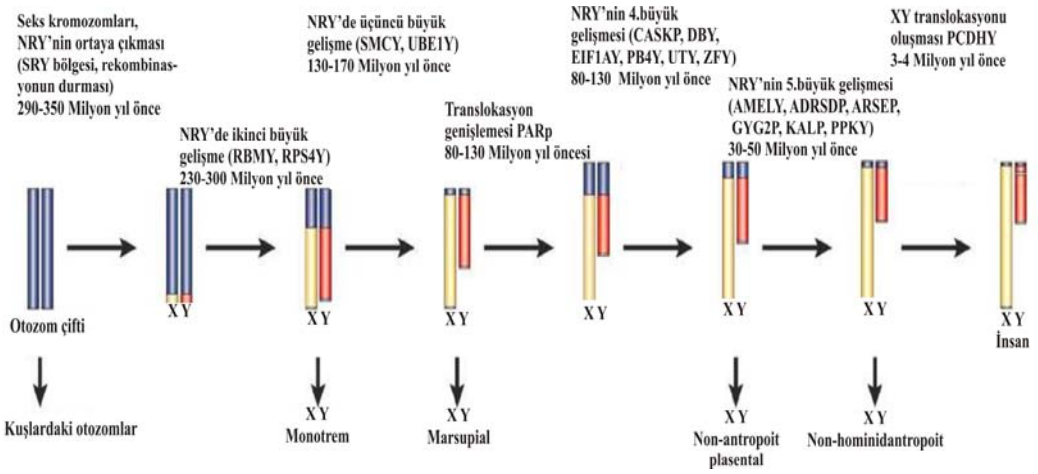
Nazidze ve ark. Kürt gruplar arasında mtDNA ve Y kromozom varyasyonlarını çalışmışlar; mtDNA yönünden Avrupalı gruplara Kafkaslı gruplardan daha yakın oldukları, Y kromozomu yönünden zıt bir farklılık olduğunu ortaya koymuşlardır. Gürcistan grubunun göç zamanında etrafındaki komşularından farklı olduğu, İran'daki

Zazaki Kürtleri'nin bilinenin aksine, diğer kürt grupları ile genetik yönden çok benzer olmadıkları ortaya konulmuştur [48].

Cinnioğlu ve ark. Türkiye'nin farklı bölgelerinden 523 kişide Y kromozom haplotipi çalışmışlar, haplogrupların alt tipi olan 52 farklı haplotip tanımlamışlardır. Majör haplogrupların (E3B, G, J, I, L, N, K2 ve R1; %94,1) Avrupa ve Yakın Doğu populasyonu ile büyük benzerlik taşıdıklarını ortaya koymuşlar ve Türk haplotiplerinin gen akımında önemli bir kaynak olduğunu belirtmişlerdir [49].

2.6.3. Y Kromozomunun Tarihçesi

Y kromozomu 300 milyon yıllık bir süreçte, erkekliği devam ettirmek açısından önemli olan çok az sayıda geni korumayı başarırken; dölleyebilme yeteneği için gerek duyulan başka genleri de kazanmıştır. 1900'lü yılların başlarında araştırıcılar, belirli türlerde cinsiyetin kromozomlar tarafından belirlendiğinin farkına varmışlar ve yaklaşık 20 yıl sonra, memelilerde de, cinsiyetin embriyonik gelişim sırasında kromozomlar tarafından belirlendiği gösterilmiştir. Yine bu yıllarda X ve Y'nin, geçmişteki tek bir atadan köken alan ve birbirleriyle uyumlu olan bir çift otozomdan evrimleştikleri ileri sürülmüştür (şekil 18). X ve Y kromozomlarının geçmişte benzer olduklarıyla ilgili diğer bir kanıt da, Y kromozomunun X ile rekombine olmayan bölgesine (NRY: non recombining region on Y) saçılmış pek çok genin, X kromozomu üzerindeki eşlerinin hala bulunuyor olmasıdır. Rekombine olmayan bölgeler Y kromozomunun % 95'lik bir kısmını oluşturmaktadır [43- 45] .



Şekil 18. Y kromozomunun evrimleşme süreci [50]

Genetik uzmanları, 1990 yılında Y kromozomu üzerindeki seks karakterini belirleyen SRY bölgesi tarafından kodlanan proteinlerin, çeşitli kromozomlar üzerindeki genleri etkinleştirerek testislerin oluşması yönünde gelişimi sağladıklarını ortaya koymuşlardır [8,44,45].

Bu konuda merak edilen en önemli sorulardan biri fertilite genlerinin, rekombinasyonun yokluğunda nasıl iyi korunabildikleri idi. Çünkü rekombine olmayan bölgedeki diğer Y genlerinin çoğu, değişikliğe uğramış durumdadırlar. Bu sorunun yanıtı, Y kromozomundaki tüm fertilite genlerinin çok sayıda kopyasının bulunmasıyla ilgilidir. Bu genlerin çoğul kopyalar halinde bulunmaları, her seferinde yalnızca bir genin bir kopyasını etkileyecek yıkıcı mutasyonlara karşı tampon durumunun oluşmasına neden olmuş olabilir [43].

Bu veriler, farklılaşma, X ve Y kromozomları arasındaki rekombinasyonu tümüyle sona erdirecek şekilde devam edebilecek ve binlerce ya da milyonlarca yıl sonra Y tamamen ortadan kalkacak mı? Sorusunu gündeme getirmektedir [43].

2.6.4. Y Kromozomunun Özellikleri

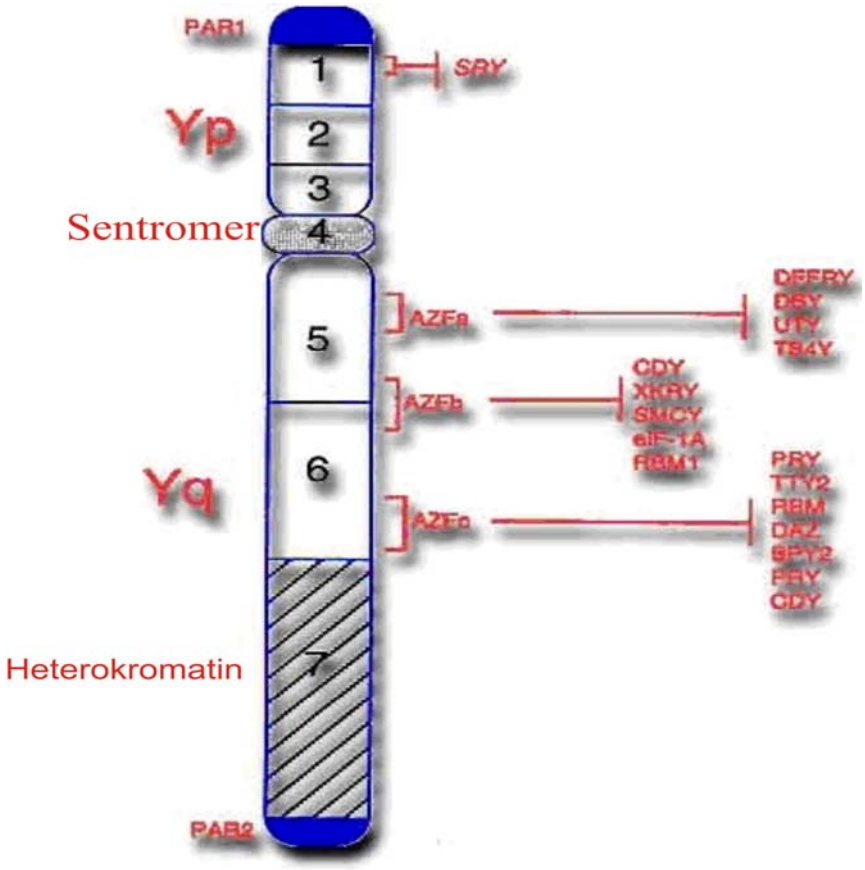
X kromozomu yaklaşık 165 Mb'lik DNA içeren submetasentrik bir kromozom iken Y kromozomu X'e göre daha küçük, yaklaşık 60 Mb'lık DNA içeren akrosentrik bir kromozomdur. Y kromozomu 60 milyon nükleotid içermesine rağmen diğer kromozomlara göre gen sayısı en az olandır. Yaklaşık %2-3 oranında haploid genom içerir [6,11-13,18].

Y kromozomu ilginç biyolojik özelliklere sahiptir. Sınırlı sayıda işlevsel gen taşımasına karşılık sık tekrarlayan diziler içerirler. Bu tekrarlayan bölgelerin fonksiyonu tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Y kromozomu üzerindeki genlerin büyük bir kısmının inert formda olması bu kromozomu daha da ilginç hale getirmektedir. Y kromozomu üzerinde bulunan genlerin bir kısmının X kromozomu üzerinde homoloğu yoktur. Bu nedenle paternal geçişe izin verir. Y kromozomu, polimorfizm çalışmaları, populasyonların tarihi, coğrafik dağılım ve ırkların köken araştırmasında, babalık tayininde, yabancı DNA ayrımında, soy ağacının belirlenmesinde, tarihsel dönemlerde göç yollarının araştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır. Y kromozom haplotip analizi özellikle mikrosatellit çeşitliliği ya da diğer adıyla STR'ler (short tandem repeats)

haplogruplar içindeki varyasyonu (haplotipler) tanımlar ve populasyon ayrımında önemlidir. Yaşayan canlıları ve fosilleri inceleyerek bir türün evrimini izleyen paleontologlar gibi moleküler biyologlar da DNA dizilerini inceleyerek genlerin ve kromozomların evrimini incelemektedirler. Anneden geçen mitokondrial DNA ve Y kromozomunda NRY bölgesi rekombinasyona gitmez ve bu nedenle kalıtımda önemlidirler [44,47].

2.6.5. Y Kromozomunun Anatomik Yapısı

Y kromozomu haploid genomun %2-3'ünü oluşturur. Kısa (Yp) ve uzun (Yq) koldan oluşan akrosentrik bir kromozomdur (şekil 19) [11,44].



Şekil 19. Y kromozomunun delesyon aralıkları [15]

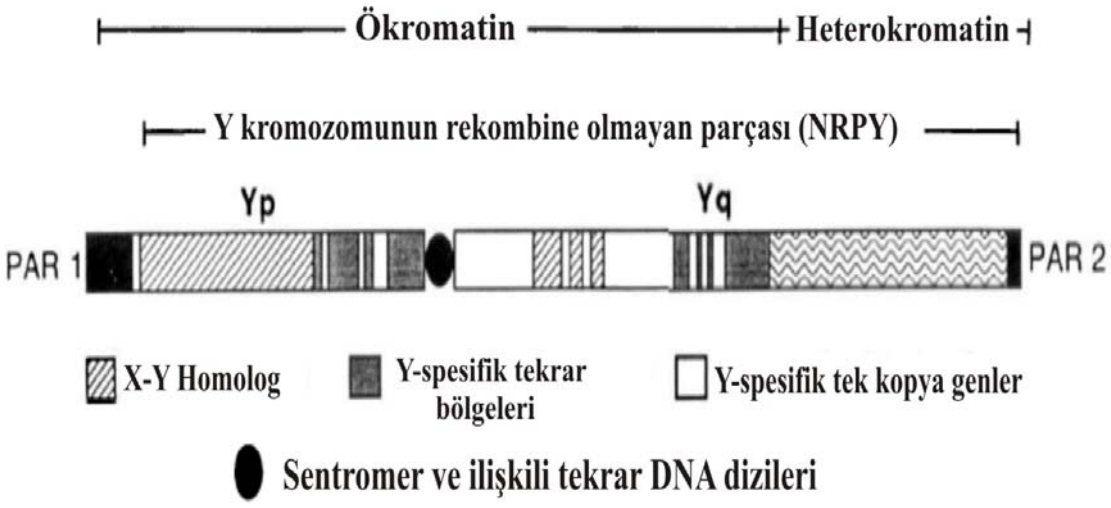
Araştırıcılar, sitogenetik çalışmalar sonucunda Y kromozomunda üç bölge tanımlamışlardır. Bunlar:

• **Pseudootozomal bölgeler (PAR):** Kromozomun kısa kolunun ucuna yerleşen PAR1 ve uzun kolunun ucuna yerleşen PAR2 sırasıyla 2600 ve 320kb DNA içermektedir. X kromozomu üzerinde homologları vardır ve mayoz esnasında rekombinasyona uğrarlar.

• **Ökromatik bölge:** PAR1'in uzağında lokalize olmuştur ve parasentromerik bölgenin kısa kolunu oluşturur.

• **Heterokromatik bölge:**Yq'nun uzağında bulunan bu bölge farklı erkek populasyonlarında polimorfik özellik gösterir [11- 15,18].

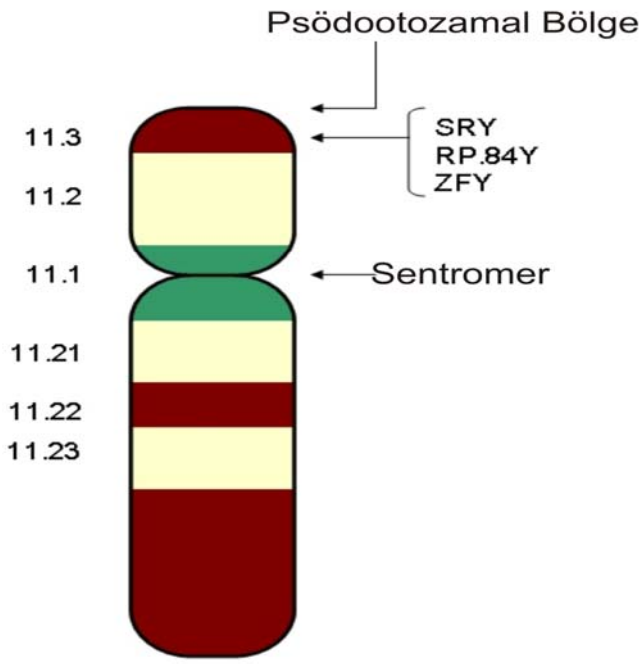
Y kromozomunun büyük bölümü (%95) NRY'den oluşur ve insan genomunun sadece haploid kısmını simgeler (şekil 20). Kromozomun ökromatik ve heterokromatik bölgesini içerirler. Genetik olarak etkisiz kabul edilen heterokromatik bölge fazla oranda tekrar dizilerinden (DYZ1 ve DYZ2) oluşur. Ökromatik bölge ise sayı olarak daha fazla tekrar dizileri olmasına rağmen cinsiyetin belirlenmesi, gonadoblastoma, boy kontrolu, Turner stigmata ve spermatogenez ile ilgili genleri içerir [11- 15,18,44].



Şekil 20. Y kromozomunu oluşturan bölgeler [51]

2.6.6. Y Kromozomu ve SRY Geni

Testis oluşumu, Y kromozomunun kısa kolundaki SRY geninin varlığıyla (şekil 21), daha döllenme sırasında belirlenir. Bununla beraber, gebeliğin altıncı haftasına kadar, gonadlar başkalaşmadan kalır. 6. ve 7. haftalarda SRY geni etkisiyle gonadlar testis yönünde başkalaşır. Sekizinci haftaya kadar Sertoli hücreleri gelişir ve Müller kanalının gerilemesini sağlayan MIS (Müllerian inhibitory substance) salgılar. Leydig hücreleri ise, 9. haftadan başlayarak teşekkül eder ve Wolf kanalı gelişimini uyaran testosteronu salgılamaya başlar. Skrotumun da dahil olduğu erkek dış genital yapıları, gebeliğin 10-15. haftaları arasında oluşur [5,8].



Şekil 21. Y kromozomunda SRY bölgesi [52]

Kadınlarda XX, erkeklerde XY olan cinsiyet kromozomları, çok ender de olsa bazı erkeklerde XX biçiminde de olabilmektedir. Bu durum normalde Y kromozomu üzerinde taşınan SRY geninin, babadan gelen X kromozomu üzerinde kendini göstermesiyle açıklanmaktadır. Anatomik bakımdan eksiksiz olan bu XX erkekleri, testisleri de işlevsel olduğu halde Y kromozomu yokluğuna bağlı olarak infertil olmaktadırlar. SRY geni, bu

nedenle uzun süredir "erkekliği tanımlayan gen'' konumundaydı. İtalyan araştırmacılar bu süreçte aynı derecede önemli olan bir gen daha buldular. Tümünün de cinsiyet kromozomları XX olan dört erkek kardeşi inceleyen araştırmacılar tarafından, hiç birinde SRY bulunmadığı, RSPO1(R-sponding homolog) adlı başka bir genin de mutasyona uğramış olduğu saptandı. Bu aşamada önemli rol oynayan üçüncü bir gen de SOX9 (SRY-box containing gene 9)'dur. Bu gen erkeklerde SYR tarafından etkinleştirilerek testis gelişimini sağlamaktadır. Bulgular ışığında RSPO1'in temel görevi de kadınlarda SOX9'u baskılayarak, başka genlerin de katılımıyla yumurtalıkların gelişimine yol açmaktır. İncelenen erkek kardeşlerde ise mutant RSPO1 geninin bu ''kapatma'' işini başaramayarak SOX9'u kendi haline bıraktığı ve bu sürecin erkek gelişimiyle sonuçlandığı görülmüştür [7,8,45,53].

2.6.7. Y Kromozom Mikrodelesyon Tayininin Tarihçesi

Yakın zamana kadar Y kromozomunun birçok bölgesi fonksiyonel olarak aktif kabul edilmiyordu. Birbiri ardına yapılan moleküler genetik çalışmaları erkek infertilitesinde genetik faktörlerin de oldukça önemli olduğunu göstermiştir. Y kromozomunun sadece erkek cinsiyet belirlemede rol almadığı bunun yanısıra spermatogenezden de sorumlu olduğu anlaşılmıştır.Y kromozomunun spermatogenezdeki rolü ilk defa Tiepolo ve Zuffardi'nin 1976'da yaptıkları çalışmalarla ortaya konmuştur. 1170 erkekte karyotip analizi yapılmış ve 6 azospermik erkekte geniş delesyonlar saptanmıştır. 1988 yılında Anderson ve arkadaşları Y kromozomunun uzun kolunda (Yq11.22-23), azospermiye neden olan AZF gen ailelerini tanımlamışlardır. 1992 yılında Foresto ve arkadaşları tarafından PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği kullanılarak Y kromozomunun STS'lerle (sekans-hedef-alan) haritalanmasında önemli gelişmeler sağlanmıştır. 1995 yılında Reijo ve arkadaşları AZF bölgesindeki delesyonların maturasyon arrestinden spermatojenik arrestte kadar geniş bir fenotipi oluşturduklarını belirtmişlerdir. 1996 yılında Vogt ve ark. AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerindeki genleri tanımlamışlardır. 1999 yılında Kent-First ve ark. AZFb ve AZFc bölgelerinin arasında yer alan 4. bir bölge AZFd bölgesini tanımlamışlardır. 300'den fazla STS tanımlanmıştır. Delesyon sıklığı %1-55 arasında geniş dağılım göstermektedir. Çalışmalar incelendiğinde Y kromozom delesyon oranlarındaki bu farklılığın nedenleri, seçilen grupların

özelliklerine (azospermik, oligospermik, şiddetli oligospermik vs), olgu sayısındaki faklılıklara, infertilite nedenlerine, kullanılan farklı STS belirteçlerine ve çalışılan farklı etnik kökene bağlanmaktadır [54-57].

2.6.8. Y Kromozom Delesyonlarının Oluşum Mekanizması ve Orijini

Y kromozom delesyonlarının orjini tam olarak bilinmemektedir. Delesyonların bir kısmı babadan oğula geçerken bir kısmı *de novo* mutasyon olarak tanımlanmış ve bu tip mutasyonların daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Y kromozomu spontan genetik materyal kaybından kolay etkilenmektedir. Delesyon oluş mekanizmaları hakkında çeşitli görüşler vardır. Olasılıklardan bir tanesi, X ve Y kromozomları arasında ya da Y kromozomunun kendi içinde homolog ya da tekrar genlerin rekombinasyonunda kardeş kromatidlerin dengesiz dağılımı, Y kromozomunda instabilitesi yüksek oranda tekrar elementlerinin oluşmasına neden olabileceğidir. Neden bazı erkeklerde AZF delesyonlarının olup diğerlerinde olmadığı hala cevaplanamamış bir sorudur. Özellikle Y kromozom sekans organizasyonunun AZF delesyonlarını kolaylaştırıcı etkisinin olabileceği ileri sürülmektedir. Bir Y kromozom haplotipinin, mayoz esnasında X/Y eşleşmesinde, mutasyon oluşmasına yatkın olduğu bulunmuştur [11,13,15,18].

Y kromozom delesyonlarının hücresel oluşum mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Testiküler orjinli delesyonlar muhtemelen fertilize oosit ya da embriyo kaynaklı olmaktadır. Fetüste spermatogonia oluşumunu engellemekte ve yetişkinlikte spermatogenez bozukluğuna neden olmaktadır. Delesyonlar mayotik ve spermatid orjinli olabilmektedir [11, 15,55].

2.6.9. Y Kromozomu Üzerindeki AZF Gen Aileleri

Y kromozomu üzerinde birçok gen ve gen aileleri tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları AZF delesyon aralığında bulunmaktadır. Bu genler tüm hücrelerde ifade olunanlar ya da sadece testis hücrelerinde ifade olunanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Birinci grupta yer alan genler; DFFRY (Drosophila Fats Facets Related Y), DBY (Dead Box Y), TPR (Tetratricopeptide Repeat), eIF-1AY(eukaryotic translation-initiation factor 1AY) izoformunu, SYCY (Selected mouse cDNA on the Y) ve TB4Y (Thymosin B4Y)

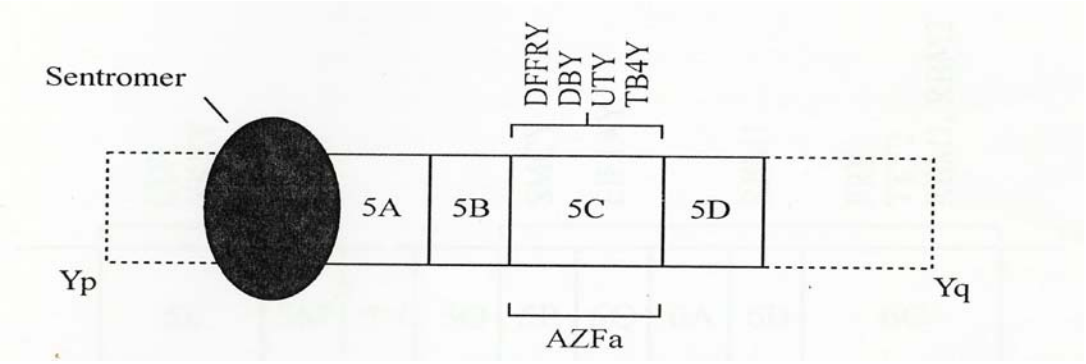
izoformunu içerir. Bu genlerin her birinin Y kromozomu üzerinde kopyası bulunmaktadır ve herbirinin X kromozomu üzerinde homoloğu bulunmaktadır [5,6,8,11-15,18, 54-59] .

İkinci grupta yer alan genler, testise özgül genlerdir. Bu genler RBMY (RNA binding motif), DAZ (Deleted in Azospermia), CDY (Chromodomain Y), XKRY (XK-Related Y), PTBL (Protein-Tyrosine Phosphatase related on Y), PRY (PTP-BL related protein on Y), BPY1 ve BPY2 (basic protein on Y)'dir. Bu genlerin Y kromozomu üzerinde çok sayıda kopyası vardır ve X kromozomu üzerinde homologları yoktur.

Y kromozomunda, AZF bölgesinde sperm üretim ve aktivitesinden sorumlu gen aileleri temel olarak AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd olarak sınıflandırılmaktadır. Y kromozomu mikrodelesyonu tespit edilen vakaların kendi içlerinde ortalama dağılımları AZFa %3, AZFb %9, AZFc %79, AZFb+c %6, AZFa+b+c %3 şeklindedir [4,11-15,18].

2.6.9.1. AZFa Bölgesi

Y kromozomu uzun kolunun proksimalinde (Yq11.21), 5B ile 5O arasında yer alan AZFa bölgesi 792 kb büyüklüğündedir. Bu bölgede tek kopyalı korunmuş genler mevcuttur. Tek kopyalı genler olması nedeniyle bu genlere ait nokta mutasyonlarının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Tekrarlayan diziler içermemesi ve düşük delesyon sıklığı ile AZFb ve AZFc'den farklılık gösterir. Bu bölgede yer alan genler şekil 22'de gösterilmiştir [11-15,18,54-63].



Şekil 22 . AZFa aralığının şematik haritası [13]

1- DFFRY (USP9Y), (Drosophila Fat Facet Related Y-linked),

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

3- UTY (TPR motif Y) (Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on Y),

4- TB4Y (Thymosin B4 isoform),

İlk üç genin X kromozomunda Xp11.3-p11.4 aralığında homoloğu (DFFRYX, DBX ve UTX) vardır ve X inaktivasyonundan kaçarlar [8,11-15,18,44,54-63].

• **DFFRY:** USP9Y olarak da bilinir. AZFa bölgesinde yer alan ilk tanımlanan gendir. Tek kopyalıdır ve 46 ekzonludur. "Drosophila developmental gene fat facets'' ile homoloji gösterdiği için ilk zamanlar da DFFRY olarak adlandırılmıştır. X kromozomu üzerinde homoloğu vardır ve bu X inaktivasyonundan kaçar. Ekspresyonu yaygındır. Ubikitin spesifik hidrolazı kodlar ve ubikitine bağlı protein yıkımından sorumludur. Proteinlerin ubikitin ile birleşmesini engelleyerek yıkımını önlediği belirtilmektedir. Özellikle sinyal iletim kaskadında rol alan üyeleri hedefler. Oosit gelişiminde ve fotoreseptörlerde de rolü vardır. Delesyonunda spermatojenik arrest görülür. USP9Y ile birlikte DBY genlerinin her ikisini kapsayan delesyonlarda bu tablo ağırlaşmakta ve azospermiye neden olmaktadır [5,8,11-15,18,44,45,54-63].

• **DBY (Dead/H box-3, Y-linked):** Subinterval 5C'de yer alan 17 ekzonlu, tek kopyalı "housekeeping'' bir gendir. X kromozomunda homoloğu vardır ve X inaktivasyonundan etkilenmez. Tüm dokularda tek bir transkript okunurken, testiste ifade bulan kısa farklı bir DBY transkripti daha vardır. Farelerdeki testise özel ve sadece germ hücrelerinde sentezlenen PL10 proteini ile homoloji göstermektedir. Bu nedenle Foresto ve ark. DBY'nin spermatojenik aşamalarda anahtar role sahip olduğunu ileri sürmektedir. Bu genin ürünü ATP-bağımlı RNA helikazdır ve bu bir dead-box motif içeren bir proteindir. DBY delesyonlarında sertoli-hücre sendromu veya ağır hipospermatogenez izlenmektedir.

• **UTY (Ubiquitous TPR motif on Y)**: Subinterval 5C'de yer alan 20 ekzonlu bir gendir. TPR (tetratricopeptide repeat) motifli bir protein kodlamaktadır. Bu proteinin, protein-protein etkileşimini düzenlediği düşünülmektedir.

• **TB4Y (Thymosin, beta-4, Y chromosome):** Subinterval 5D'de yer almaktadır. X kromozomu üzerinde yer alan X inaktivasyonundan etkilenmeyen bir homoloğu (TB1X)

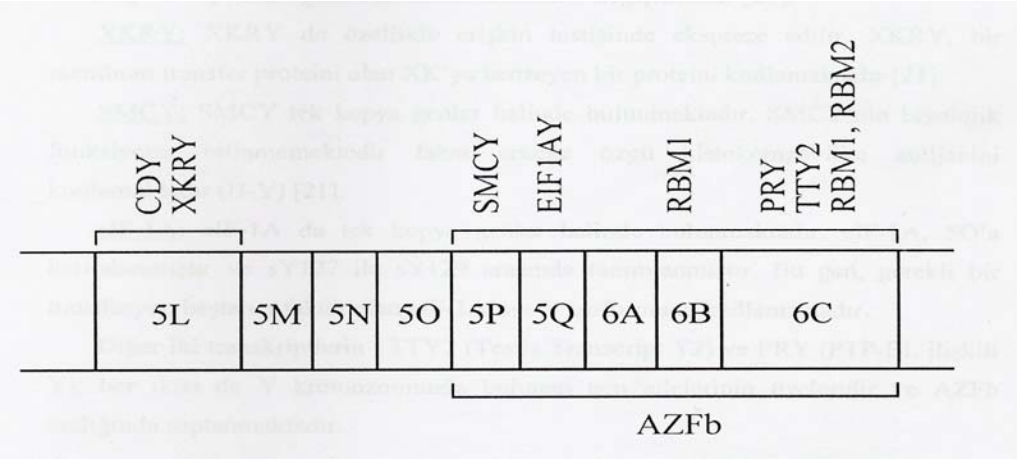
mevcuttur. Testise özel transkriptleri bulunmaktadır. Aktinin salgılanmasında rol alan tymosin B4'ün Y izoformunu kodlar. DBY, UTY ve TB4Y genlerinin hepsi "hücresel housekeeping''e katılırlar [8,11-15,18,,45,54-63].

Birçok çalışmada AZFa bölgesinin delesyon oranı AZFb ve AZFc bölgelerinin delesyon oranından daha düşük bulunmuştur. AZFa delesyonu görülen olgularda SCOS ile uyumlu komple germ hücre kaybı ve maturasyon arresti görülmektedir. DBX ve DBY proteinlerinin her ikisi de translasyonun başlaması için gereklidir. Bunun yanında nükleer fonksiyonları da vardır. DBX proteini eksik olan bir farede hücre siklusunun G1 fazında duraklama söz konusudur. USP9X'in de spermatogenezde fonksiyonel olabileceği düşünülmektedir. DBY proteini pre-mayotik fazda yani spermatogoniumlarda fonksiyonel iken DBX proteinleri mayozdan sonraki spermatid aşamasında etkilidir. DBX proteini erkek beyninde, böbrekte ve dişi over dokusunda mevcut iken DBY proteini sadece testis dokusunda görülmektedir [5,8,11-15,44,45,54-63] .

2.6.9.2. AZFb Bölgesi

• AZFb bölgesi subinterval 5O-6B arasında kalan bölgedir. Bu bölgenin delesyonları sonucunda testiküler sperm yokluğu görülmektedir. Bu aralıkta, IF-1AY, RBMY, CDY1, XKRY ve SMYC olarak adlandırılan 5 gen tanımlanmıştır (şekil 23)[8,11-15,18,44,54-63].

.



Şekil 23. AZFb aralığının şematik haritası [13]

• **IF-1AY (Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y isoform):** Translasyon başlatıcı bir faktörü kodlamaktadır. Homoloğu X kromozomu üzerinde yer alan eIF-1A'nın Y izoformunu kodlar. Spermatogenezdeki rolü henüz belirlenememiştir. IF1AY geninin her dokuda yer alan transkriptlerine ek olarak testise özel transkriptlerinin olması AZFb fenotipinin oluşmasında önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir [11-15,18,44,54-63].

• **RBMY(RNA binding motif protein):** RBMY gen ailesi Yq11.23'de, interval 6 aralığında yerleşmiştir. Yaklaşık 200 kb'lık bir bölgeye yayılan bu genlerin delesyona uğradığında azospermi ve oligospermiye yol açtığı belirtilmektedir. RBM1 ve RBM2 formlarının yaklaşık 15-30 kopyası Y kromozomunun kısa ve uzun kollarına dağılmış halde bulunmaktadır. İnsan testisinde mevcuttur ve testise özeldir. Özellikle spermatogonyumlar ve erken spermatositlerin nükleusuna lokalize olmuştur. Ekspresyonunun daima erkek germ hücrelerine özgün olduğu ve bozukluğunda hücrelerin mayotik arreste uğradığı görülmüştür[11-15,18,44,54-63] .

RBMY genleri 12 ekzona sahiptir ve ekzon 7'den ekzon 11'e kadar olan her ekzon 37aa'lik bir tekrarı kodlamaktadır. Bu tekrarların nükleotid dizilimleri birbiriyle %85 homoloji gösterir. RBMY genlerinin ürünü RNA'ya bağlanan proteinlerdir. Proteinler RNA bağlanma motifine sahip bir N terminaline ve 37 aa'lik 4 adet glisin, serin, arginin rezidüleri içeren tekrarlayan segmenti olan bir C terminaline sahiptir. Bu proteinler hetero nükleer ribonükleoprotein (hnRNPG) ailesindendir. Nükleer poliadenile RNA'lar ile birleşerek RNA paketlenmesinde, mRNA'nın sitoplazmaya geçişinde ve "alternative splicing"de rol aldıkları düşünülmektedir [11-15,18,44,54-63].

• **CDY1 (Chromodomain protein on Y):** Erişkin testisinde mevcuttur. Kromodomain bağlı yeni bir protein kodlar. Bu protein muhtemelen heterokromatin ile etkileşerek DNA ya da kromozomal proteinleri değiştirmektedir [11-15,18,44,54-63].

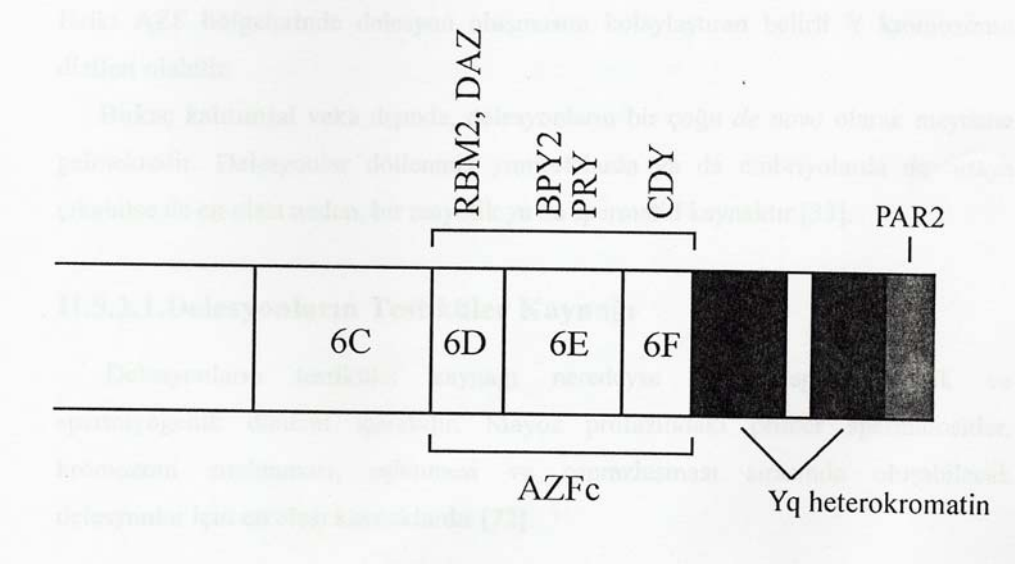
• **XKRY (XK-related Y):** Erişkin testisinde mevcuttur. Bir membran transport proteini olan XK'ya benzer bir proteini kodlamaktadır [11-15,18,44,54-63].

• **SMYC (Selected Mouse cDNA on the Y):** Biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir. SMYC ve eIFY-1AY 'nin her ikisi de tek kopya genler halinde bulunmaktadır.

TTY2 (Testis Transcript Y2) ve PRY (PTP-BL ilişkili Y)'nin her ikisi de AZFb aralığında bulunan gen aileleridir [5,6,8,11-15,18,44,45,54-63].

2.6.9.3. AZFc Bölgesi

Heterokromatine yakın proksimalde yer alan AZFc bölgesi 3 Mb'lık bir alana yayılır. En sık delesyona uğrayan ve üzerinde en fazla çalışılan bölgelerden biridir.Bu bölge dizilim benzerliği gösteren palindromik dizilimlere (ters dönmüş tekrarlayan dizilimler) ve amplikon adı verilen direk tekrarlayan dizilimlere sahip geniş alanlardan oluşmaktadır. Bu bölgede tümü testise özel 19 transkripsiyon ünitesine sahip 7 ayrı gen ailesi bulunmaktadır. DAZ gen grubunu, PRY, BPY2, TTY2, CDY ve RBM'nin kopyalarını içerir (şekil 24) [11-15,18,44,54-63].



Şekil 24. AZFc aralığının şematik haritası [13]

• **DAZ geni**: İlk defa Rejio ve ark tarafından klonlanmıştır ve azospermik erkeklerde kayıp olduğu gösterilmiştir. 3 nolu kromozomun p kolunda yer alan otozomal bir homoloğu (DAZL) mevcuttur. DAZ genleri 42 kb'lık bir bölgeye yayılan 12 ekzonlu genlerdir. Ekzon2→ekzon5 RNA'ya bağlanma bölgesini kodlarken, ekzon 7a'dan 7g'ye kadar ekzonlardan her biri bir DAZ tekrarını kodlar. Genin ürünü karboksi ve aminoterminallerinde bu 24aa'lik tekrarlara (DAZ) sahiptir. DNA transkriptlerinin sayısı bilinmemektedir. Transkriptler arasında DAZ tekrarlarının sayısı ve sırası yönünden

farklılıklar mevcuttur. Bu farklılıklar "alternative splicing" ya da farklı DAZ genleri ile açıklanabilir. DAZ genlerinin ürünü olan DAZ proteinleri sitoplazmik proteinlerdir. DAZ proteinlerinin germ hücre epitelinde geç spermatid döneminde testise özgü mRNA'ların depolanması ve taşınmasını kontrol eden bir role sahip oldukları ileri sürülmektedir. Delesyonların en sık görüldüğü bölgedir[11-15,18,44,45,54-63] .

Bu bölgenin mutasyonları sonucu pakiten 1 safhasında mayotik arrest ve delesyonu sonucu azospermi ya da %6 oranında oligospermi de görülebilmektedir. Oligospermik olgularda, lökositlerde bulunan delesyonlar spermatozoada da bulunabilmekte ve erkek çocuğa geçebilmektedir. Otozomal kromozom 3'de DAZL1 diye adlandırılan homoloğu mevcuttur. Bir hipotez ise, Y kromozomu üzerinde bulunan DAZ geninin orijnini bu otozomal ata genden translokasyon ve amplifikasyon yoluyla aldığı yönündedir. DAZL1 özellikle testislerde ifade edilir. Mutasyonu sonucu otozomal resesif erkek infertilitesine neden olabileceği bildirilmiştir. DAZL1 germ hücre üretimi ve yaşamsal süreci için gereklidir [11-15,18,44,45,54-63].

- **BPY2 (basic protein on Y): AZFc** subinterval 6E bölgesinde lokalize olan çok kopyalı bir gendir. Testis dokusuna özgü 106 aa'lik bir protein ürününe sahiptir. Bu fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bir proteindir [11-15,18,44,45,54-63].

- **PRY (PTP-BL related protein on Y) ve TTY2(Testis transcript on Y):** PRY genleri sadece testiste ifade edilmektedir. PRY1 geni subinterval 6E ve PRY2 geni 6C bölgesinde haritalanmıştır. Üç ayrı PRY geninin TTY2 genine oldukça yakın bir bölgede interval 6'nın proksimal kısmında yerleştiği gösterilmiştir. PRY1 ve PRY2 genlerinin yer aldığı Yq bölgesi palindromik bir yapıya sahiptir. PRY ve TTY2, aynı gen ailesindendir ve tirozin fosfatazın kodlanmasından sorumludurlar [11-15,18,44,45,54-63].

- **CDY1 (Chrodomain protein, Y chromosome,1):** CDY1 geni 6F ve CDY2 geni 5 L bölgesinde haritalanmıştır. CDY1 ve CDY2 proteinlerinin %98 benzer olduğu gösterilmiştir. CDY1 geninin majör transkripti intron içermemektedir. Bununla birlikte "alternative splicing" ile CDY1 proteininin bir izoformunun ortaya çıktığı bilinmektedir. Genin ürünü 554 aa'lik bir proteindir ve bir kromodomain ile bir katalitik domaine sahiptir[11-15,18,44,45,54-63].

2.6.9.4. AZFd Bölgesi

AZFd bölgesinde delesyon bulunan olgular, hafif oligospermi ya da normal sperm sayısına rağmen anormal sperm morfolojisi ile ortaya çıkabilmektedir [57].

2.6.10. Genotip-Fenotip Korelasyonu

AZF bölgelerindeki delesyonlar farklı mekanizmaları etkilemektedir. AZFa bölgesinin delesyonları en çok SCOS'da gözlenen azospermi ile ve daha az olarak da oligospermi ile ilişkilidir. İki SCOS fenotipi tanımlanmıştır. SCOSI, histolojik kesitlerde hiçbir tübülüs germ hücresi içermez. SCOSII ise, bazı tübüller germ hücrelerinden yoksunken diğerleri azalmış miktarda germ hücresi içermektedir. AZFb bölgesinin delesyonları, spermatosit aşamasında spermatojenik arrest ile sonuçlanırken, AZFc delesyonları tip II SCOS ya da hipospermatogenezise neden olmaktadır. AZFd bölgesi delesyonları, azospermiden anormal sperm morfolojili normal sperm sayılarına kadar olan fenotiplerle ilişkilidir. Bütün bunlara rağmen kesin bir genotip/fenotip korelasyonu yoktur. Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda literatürlerde gözlenen bazı genotip/fenotip ilişkileri şunlardır:

- Mikrodelesyonlar daha çok azospermik ya da şiddetli oligospermik infertil erkeklerde ve anormal sperm morfolojili olgularda görülmektedir.
- Yüksek Yq mikrodelesyon sıklığı azospermik olgularda, oligospermiklere göre daha fazladır.
- Delesyonlar, idiopatik infertilitelerde etiyolojisi bilinen infertilite olgularına göre daha iyi tanımlanmışlardır.
- Geniş delesyonlar, genellikle ciddi spermatogenetik defektlere neden olurlar.
- AZFa delesyonları en az sıklıkta görülür (%1-5) ve genellikle SCOSI ile ilişkilidir.
- AZFc ve AZFc+b en sık görülen delesyonlardır ve değişik spermatogenetik defektler ile sonuçlanır.
- Nadir de olsa fertil erkeklerde de küçük mikrodelesyonlar görülebildiği, bunun da nadir polimorfik varyantlar olabileceği belirtilmektedir.

- Bazı olgularda hem periferik kan lökositlerinden hem de TESE dokusundan elde edilen hücrelerde aynı Y kromozom delesyonları tanımlanabilirken, bazı olgularda sadece ya lökosit DNA'larında ya da TESE dokularında delesyona rastlanmaktadır[11-15,18,44,45,54-63].

2.6.11. PCR Tekniği ile Y Kromozom Mikrodelesyonlarının Saptanması

Y kromozomunun uzun kolu üzerinde bulunan sekans hedef alanlar (STSs:sequence tagget sites) 50 ya da birkaç yüz baz çiftlik küçük diziler PCR ile amplifiye edilebilmektedir. Son yıllarda artan sitogenetik ve moleküler DNA analizleri sonucunda şiddetli oligospermik ve azospermik erkeklerin %3-18'inde Y kromozomu mikrodelesyonuna rastlanmıştır. Delesyonlar ya babadan oğula geçmekte ya da *de novo* olarak kişi de ortaya çıkmaktadır. Kendiliğinden oluşan delesyonların sık görülmesi, Y kromozomunun stabil olmaması ve tekrar dizilerinde kopya sayısının artmasına bağlanmaktadır. Anormal rekombinasyon bölgesinde özgül Y kromozom dizileri, AZF bölgelerinin delesyonunu yönlendirebilmektedir. Bazı bireyler diğerlerine göre daha fazla rastlantısal delesyonlardan etkilenmektedir [11-15,18, 54, 63].

Tek bir spermatozoonun ya da spermatidin bir oositin sitoplazmasının içine enjeksiyonu ICSI tekniğinin gelişmesi ile erkek infertilitesinde çok önemli yol kat edilmiştir. ICSI ile birlikte erkek infertilitesinde alta yatan neden atlandığı için genetik kökenli olgularda babadan oğula genetik geçiş gündeme gelmiştir. Bu amaçla bu tür olgularda Y kromozomu delesyonu varlığı araştırılıp gerekirse preimplantasyon genetiği yönünden değerlendirilmesi uygun görülmektedir. Y kromozom mikrodelesyonlarının tanısı spermatogenetik kusurun etiyolojisi açısından önemlidir. Gereksiz medikal ve cerrahi uygulamalardan kaçınma imkanı sağlar [13,15,18,19].

2.6.12. Y Kromozomu ve Testiküler Kanser ile İlişkisi

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, AZF mikrodelesyonları ile testiküler germ hücre tümörleri arasında pozitif bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir. AZF mikrodelesyonlarının büyük çoğunluğunun *de novo* oluştuğu belirtilmektedir. Ailelerinde Y kromozomu mikrodelesyonu olmamasına rağmen Y kromozomu delesyonu olan kişilerde, Y kromozom instabilitesinde ve hatta testiküler kanser oluşumunda genetik etiyolojideki farklılıkların rol aldığı düşünülmektedir. Bu süreçte rol alan mekanizmalar şu şekilde sıralanabilir [64,65]:

a) Genetik olarak normal bir ovum, normal bir sperm ile fertilize olur ve normal fetus gelişir.
b) Genetik olarak normal bir ovum Y kromozom mikrodelesyonu taşıyan bir sperm ile döllendiğinde somatik ve germ hücrelerinde Y kromozom mikrodelesyonu yönünden mozaizm görülür.

c) Açıklanamayan bazı faktörler erken embriyo aşamasında Y kromozom instabilitesine yol açarlar ve bu da embriyoda AZF delesyonlarının oluşumuna neden olur. Bu delesyon mozaizmi tümör oluşturmayan hücrelerin yanında primordial germ hücrelerine de gecer. Y kromozom delesyonu taşıyan primordial germ hücreleri ya hiç bir değişime uğramadan yetişkin germ hücrelerine dönüşür ya da hipertriploid premalignant karsinoma yönünde farklılaşır. Bu farklılaşma sonucunda embriyonal karsinomlar, seminoma ya da nonseminomalar: ‘’Yolk sac’’ tümörleri, koriokarsinoma ve teratoma gelişebilir [63,64].

Genetik faktörlerin örn. DNA tamir genleri, Y- ya da X- bağımlı genlerdeki bozukluklar ya da diğer anormal metabolik genlerin AZF delesyonlarının oluşmasına neden olabileceği belirtilmektedir [64].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, AZFc bölgesinin proksimal yarısında gr/gr, b1/b3 ve b2/b3 olarak adlandırılan kısmi AZFc delesyon bölgeleri tespit edilmiştir. Bu delesyonların azospermiye, orta düzeyde oligospermiye neden olduğu ve hatta normal fertil bireylerde bile %1,2-1,9 oranında görüldüğü bildirilmiştir. gr/gr ve b1/b3 delesyonlarının testiküler kanser riskini arttırdığı yönünde bazı çalışmalar mevcuttur [65,66] .

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gerekli Aletler

Santrifüj	Heraeus Spatech
Mikrosantrifüj	Heraeus Biofuge pico,
Hassas terazi	Mettler AJ100
Laminar Flow	K-System
Derin dondurucu	Uğur, Arçelik
Buzdolabı	Arçelik
Mikrodalga fırın	Arçelik
Etüv	Nüve-EN 500
Spekrofotometre	UV-260 Shimadzu
Isı döngü cihazı (Thermal Cycler)	Eppendorf
Yatay elektroforez tankı ve düzeneği	Gelman, Bio-Rad
UV kaynağı	Cole-Parmer 9814
Polaroid kamera	Polaroid MP4 Land Camera
Vorteks	Nüve
Faz-kontras mikroskobu	Pleuger XSZ 107
pH metre	Beckman, Century SS-1
Sperm sayma kamarası	Makler
Otomatik pipetörler	Self-Medical Instruments
Otomatik steril pipet uçları	Eppendorf ve Gilson
Eppendorf tüpler (2 ml, 0,5 ml, 1 ml)	Eppendorf

3.2. Gerekli Kimyasallar

Tris Baz	Sigma (T- 6066)
Borik asit	Sigma (B-0252)
Amonyum klorür	Sigma (A-5666)
Amonyum bikarbonat	Merck (A-530345)
Proteinaz K (10 mg/ml)	Sigma (P-6556)
Sodyum klorür	Merck (847)
Sodyum EDTA	Merck (347)
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma (L-5750)
Fenol çözeltisi	Qbiogene (AQUAPH01)
Kloroform	Merck (711)
Asetik asit	Merck (738)
Etidyum Bromür	Sigma (E-8751)
NuiSieve agaroz	Sigma (50090)
Y kromozom delesyon tayin kiti ver.2.0	Promega

3.3. Örneklerin Temini ve Gruplandırılması

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'na 2005 yılında infertilite şikayeti ile başvuran erkek olgular, Ç.Ü.T.F. Etik Kurulu kararı doğrultusunda çalışmaya alınmıştır. Ç.Ü.T. F. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı-Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi Androloji Laboratuvarı'nda spermiyogram analizleri yapılmış ve uygun vakalardan olur alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Azospermik ve şiddetli oligospermik olgulardan herhangi bir kriter göz önüne alınmadan rastgele seçim yapılmıştır. Çalışmada, şiddetli oligospermik ve azospermik olgularda Y kromozom mikrodelesyonlarının araştırılması ve hormon değerlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Alınan periferik kandan FSH, LH, testosteron, prolaktin ve leptin düzeyleri için plazmaları ayrılmış ve -20°C'de saklanmıştır. Lökositlerden de DNA izolasyonu yapılmış; DNA verimi ve konsantrasyonu ölçülerek -20°C'de saklanmıştır. Genel olarak çalışma dört kısımdan oluşmaktadır;

1-Mikroskopik olarak semen analizi,
2-Lökositlerinden DNA izolasyonu,
3-PCR yöntemi ile Y kromozom delesyon tayini,
4-Plazma FSH, LH, testosteron, prolaktin ve leptin düzeylerinin ''radioimmünoassay'' yöntemi ile ölçülmesi.

Çalışmaya, yaşları 23 ile 53 arasında olan 25 şiddetli oligospermik ve 38 azospermik olmak üzere toplam 63 olgu alınmıştır. Her bir spermiyogram analiz sonucu, makler sperm sayma kamarası ile semenin en az iki kez incelenmesi sonucunda verilmiştir. Bu şekilde 15 gün ara ile en az 3 kere spermiyogram yapılan olgular spermiyogram sonucuna göre şiddetli oligospermik veya azospermik olarak gruplandırılmıştır. Ejakulatta sperm görülmeyen olgular 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek santrifüj sonu pellet incelenmiş ve bazı olgularda santrifüj sonu sperm görülmüştür. Bu olgular şiddetli oligospermik gruba dahil edilmiştir. Azospermik örneklere de bu şekilde karar verilmiştir. Kontrol grubu evli ve çocuklu, fertil olduğu bilinen olgulardan oluşturulmuştur. Kontrol grubunun semen özelliği normospermiktir.

3.4. Lökositten DNA İzolasyonu (Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol Yöntemi)

Prensip: EDTA'lı tüplere alınan kanın, plazması uzaklaştırılarak şekilli elemanlar hipotonik bir çözelti ile patlatıldıktan sonra santrifüj edilerek lökositleri ayrıştırılmıştır. Lökositler Sodyum Klorür-Tris-EDTA (STE) solüsyonu ile süspanse edilerek sodyum dodesilsülfat (SDS) ve proteinaz K eklenmesi ile hücre zarları ve proteinler parçalanır. Fenol-kloroform ekstraksiyonu ile pürifiye edildikten sonra sulu fazda bulunan DNA saf etanolde çöktürülerek genomik DNA elde edilir. Yöntem, Ç.Ü.Tıp Fakültesi Biyokimya AD'da koriyonik villüs örneklerinden DNA izolasyonu için geliştirilen tekniğin lökositlerden DNA izolasyonuna modifiye edilmiş şekli ile uygulanmıştır [67,68] .

Ayıraçlar

a-Parçalayıcı (Lizis çözeltisi) : Günlük hazırlanır.

Amonyum klorür	131,0 mM
Amonyum bikarbonat	0,9 mM

b-Proteinaz K (1 mg/ml)

10 mg/ml proteinaz K'dan 1ml alınır, 9 ml saf su ile 10 ml'ye tamamlanır (1mg/ml). Eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek -20 C'de saklanır.

c- Tampon A hazırlanması

NaCl (4,0 M)	3,75 ml,
EDTA Na_2 (0,5 M, pH:7,5)	5 ml,
Proteinaz K (1 mg/ml)	1 ml

100 mg SDS bir miktar distile suda çözülür, eklenir, hepsi karıştırılarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. Eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek - 20 °C'de saklanır.

d- Fenol

e- Kloroform

f- %70'lik etil alkol

g- Saf etil alkol

Not: DNA izolasyonunda kullanılan çözeltilerin buzdolabında bekletilmesi tercih edilir.

3.4.1. Yöntem

1- EDTA'lı tam kan 2500 g'de 15 dakika santrifüj edilip, plazması ayrıştırılır.

2- Elde edilen çökeltiye 3 hacim parçalayıcı çözelti ilave edilir (1 ml tam kan için 3 ml parçalayıcı), iyice çalkalanır ve buz içinde 10 dk bekletilir.

3- Tüpler 5000 g'de 5 dk santrifüj edilir ve süpernatan atılır. Aynı oranda lizis solüsyonu eklenerek 5 dk buzda bekletilerek santrifüj edilir ve süpernatan atılır. Bu işlem toplam üç kez tekrarlanır.

4- Daha sonra eritrositleri parçalanmış ve eritrositlerden arınmış lökosit pelletinin üzerine 1 ml tampon A ilave edilip hafifçe karıştırılarak bir gece 37 °C bekletilir.

5- Süre sonunda tüplere 400 µl fenol konur (sıvı fenolün alt kısmından) ve vortekste karıştırılır. Sonra üzerine 400 µl kloroform eklenir.

6- Tüpler 5000 g'de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda tüpün alt fazı pipetle çekilerek atılır. Bu işlem (fenol-kloroform-santrifüj) 3 kez tekrarlanır.

7- Tüplere 400 µl kloroform eklenir ve 5000 g'de 2 dk santrifüj edilir. Süpernatan pipetle alınarak içinde %95'lik soğuk etanol olan cam şişelere konur. Şişe hafifçe çalkalanarak içindeki DNA'nın şekillenmesi ipliksi bir görünüm alması sağlanır.

8- Oluşan DNA yaklaşık 400 µl % 70'lik etil alkol ile küçük eppendorf tüplere aktarılır ve 5000 g'de 2 dk santrifüj edilerek DNA'nın dibe yapışması sağlanır.

9- Tüpler kağıt havlu üzerine hafifçe ters çevrilerek içindeki alkolün uçması sağlanır.

10- Oluşan DNA pelletinin büyüklüğüne göre üzerine yaklaşık 20- 100 µl steril distile su eklenir. DNA'nın çözülmesi için bir gece 37 °C'de bekletilir.

11- Ertesi gün DNA verimi ölçülür.

3.4.2. DNA'nın Konsantrasyon ve Verim Hesabı

5 µl DNA çözeltisi 595 µl steril saf su ile karıştırılarak dilüe edilir. Spektrofotometrede 260 ve 280 nm'deki optik dansitesi okunarak DNA'nın derişimi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır [68].

DNA derişimi(µg/ml) : OD_{260} x seyreltme faktörü x 50*

µg/ml : OD_{260} x 120 x 50*

DNA verimi: $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ İdeal verim 1,5-1,8 arasıdır.

* 1 cm ışık yollu küvette 1 OD'ye karşılık gelen µg/ml biriminden DNA miktarı

3.5. Y Kromozom Mikrodelesyon Tayin Yöntemi

PCR, izole edilen genomik DNA dizisinin istenilen bölgesinin, ilgili gene özgü bir çift primer yardımıyla *in vitro* koşullarda çoğaltılması işlemidir. İşlem üç ana basamakta gerçekleşir. Bunlar:

a- **Denatürasyon:** Çift iplikli kalıp DNA'ya ait baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları yüksek ısıda (94 °C ve civarı) koparak tek iplikli DNA halinde ayrılır.

b- **Eşleşme:** Isı düşürülerek (55-65 °C) spesifik primerlerin komplementer dizilerine yapışması (annealing) sağlanır.

c- **Uzama:** Primerlerin uzatılması aşamasında, taq DNA polimeraz enzimi ve deoksinükleozid trifosfat (dNTP) primerlerin 3' ucuna eklenerek yeni zincir 5'→3' yönünde sentezlenmektedir. Bu üç basamaktan meydana gelen ısı değişiminin her tekrarında (döngü) sentezlenen zincir sayısı iki katına çıkar. Isı döngü cihazı ile sağlanan bu döngü 30-35 kez tekrarlanarak gen amplifikasyonu sağlanır [68].

Çalışmada Promega Ver 2.0 Y Kromozom delesyon tayin kiti kullanılmıştır [69] Bir kit içinde bulunanlar (25 reaksiyonluk):

1- 50 bp'lik kontrol DNA (klavuz DNA) (340 ng/ µl),
2- 5 ayrı PCR karışımı (karışım A, B, C, D, E),
3- Delesyon taşımayan erkek genomik DNA (50 ng/ µl),
4- Taq DNA polimeraz,
5- Nükleaz'dan yoksun distile su,
6- Blue/orange 6x yükleme boyası.

Yapılan ön çalışmada, Promega'nın önerdiği Multipleks PCR yönteminde kullanılan miktar yarı yarıya düşürülerek yeni uyarlama yapılmıştır. Kullanılan miktarlar çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Yöntemin uyarlanması

	Promega kiti	**Uyarlanan**
İçerik	Volüm/her reaksiyon	Volüm/her reaksiyon
Çoklu karışım	20 µl	10 µl
Taq DNA polimeraz (5 ü/ µl)	0,2 µl	0,11 µl
DNA (≈250 ng)	≈250 ng	≈250 ng
Nükleaz içermeyen su	Final volümü tamamlayacak	Final volümü tamamlayacak
Total hacim	25 µl	13,75 µl

Her bir karışım Y kromozomu üzerindeki 4 ya da 5 bölgeyi tarayabilecek primerlerden oluşmaktadır. Ayrıca her bir primer karışımı içinde kontrol primeri de mevcuttur. Bu karışım grupları ve özellikleri aşağıda verilmiştir (çizelge 2). Kitin içinde, her biri farklı bölgelerdeki delesyon gruplarını (AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd) tayin eden primerler içeren (çizelge 3) 5 farklı karışım mevcuttur [69].

Çizelge 2. Y kromozom delesyon tayininde kullanılan primer setleri [69]

Karışım	STS	Lokus	Bp uzunluğu	Haritadaki yeri	Tanımladığı bölge
	SY 254	DAZ	380	18	AZFc
	SY 157	DYS 240	290	20	AZFc
Karışım A	SY 81	DYS 271	209	2	AZFa
	SY 130	DYS 221	173	11	AZFb
	SY 182	KAL-Y	125	5	AZFa
		SMCX	83	kontrol	
	SYPR3	SMCY	362	7	AZFb
	SY 127	DYS 218	274	9	AZFb
Karışım B	SY 242	DAZ	233	16	AZFc
	SY 208	DAZ	140	17	AZFc
		SMCX	83	kontrol	
	SY 128	DYS 219	228	10	AZFb
	SY 121	DYS 212	190	6	AZFb
Karışım C	SY 145	DYF51S1	143	14	Proks.AZFc/d
	SY 255	DAZ	124	19	AZFc
		SMCX	83	kontrol	
	SY 133	DYS 223	177	12	AZFb
Karışım D	SY 152	DYS 236	125	15	Proks.AZFc/d
	SY 124	DYS 215	109	8	AZFb
		SMCX	83	kontrol	
		ZFX/ZFY	496	kontrol	
	SY 14	SRY	400	1	
Karışım E	SY 134	DYS 224	303	13	AZFb
	SY 86	DYS 148	232	3	AZFa
	SY 84	DYS 273	177	4	AZFa

Çizelge 3. Kullanılan primer dizileri [55,62,70]

STS	Sol primer	Sağ primer
SY14	GAATATTCCCGCTCTCCGGA	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
SY81	AGGCACTGGTCAGAATGAAG	AATGGAAAATACAGCTCCCC
SY84	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	GCCTACTACCTGGAGGCTTC
SY86	GTGACACACAGACTATGCTTC	ACACACAGAGGGACAACCCT
SY121	AGTTCACAGAATGGAGCCTG	CCTGTGACTCCAGTTTGGTC
SY124	CAGGCAGGACAGCTTAAAAG	ACTGTGGCAAAGTTGCTTTC
SY127	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA
SY128	GGATGAGACATTTTTGTGGG	AGCCCAATGTAAACTGGACA
SY130	AGAGAGTTTTCTAACAGGGCG	TGGGAATCACTTTTGCAACT
SY133	ATTTCTCTGCCCTTCACCAG	TGATGATTGCCTAAAGGGAA
SY134	GTCTGCCTCACCATAAAACG	ACCACTGCCAAAACTTTCAA
SY145	CAACACAAAAACACTCATATACTCG	TTGAGAATAATTGTATGTTACGGG
SY152	AAGACAGTCTGCCATGTTTCA	ACAGGAGGGTACTTAGCAGT
SY157	CTTAGGAAAAAGTGAAGCCG	CCTGCTGTCAGCAAGATACA
SY182	TCAGAAGTGAAACCCTGTATG	GCATGTGACTCAAAGTATAAGC
SY208	GGACATAGTCCTGCTTAAGAAAAAGTGG	ACGTGGTTCAGGAGGTCTACTATTCTA
SY242	ACACAGTAGCAGCGGGAGTT	TCTGCCACTAAACTGTAAGCTCC
SY254	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
SY255	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	CTCGTGGTTTGTAGCGGGTA
SYPR3	GCTGGCAAGACACTTCTGAG	AATATGTTCCTGACACCTTCC

A, B, C ve D karışım grupları, internal kontrol olarak Y kromozomu ile homoloji gösteren, X kromozomu üzerindeki SMCX (selected mouse cDNA homolog, X chromosome) bölgesini amplifiye eden primer çiftini içermektedir. E karışımı ise kontrol olarak ZFX/ZFY primerini içermektedir. Pozitif kontrol olarak kit içinden çıkan delesyon taşımayan erkek DNA'sı kullanılmıştır [69].

3.5.1. Yöntem

Aynı anda 2 farklı örnek çalışabilmek için;

1. İlk önce steril 0,2 ml'lik amplifikasyon tüpleri hazırlanır,
2. 15 örnek amplifikasyon tüpü ve 3 stok tüp hazırlanır ve etiketlenir,
3. Taq polimeraz hariç, primer karışımları, erkek DNA ve nükleaz'sız su derin dondurucudan çıkarılır, karıştırılır ve 10 sn santrifüj edilir. Taq polimeraz en son çıkarılarak ilave edilir.
4. Stok tüplerde hazırlanan örnekler diğer tüplerine dağıtılır.

İlk önce steril, ısıya dayanıklı amplifikasyon tüpleri şekil 25'de gösterildiği gibi etiketlenir. Etiketleme sırasıyla aşağıdaki gibi yapılır.

A karışımı için, A+, A1 ve A2

A+, Karışım A için pozitif kontrol

A1, Birinci vakaya ait A karışımı

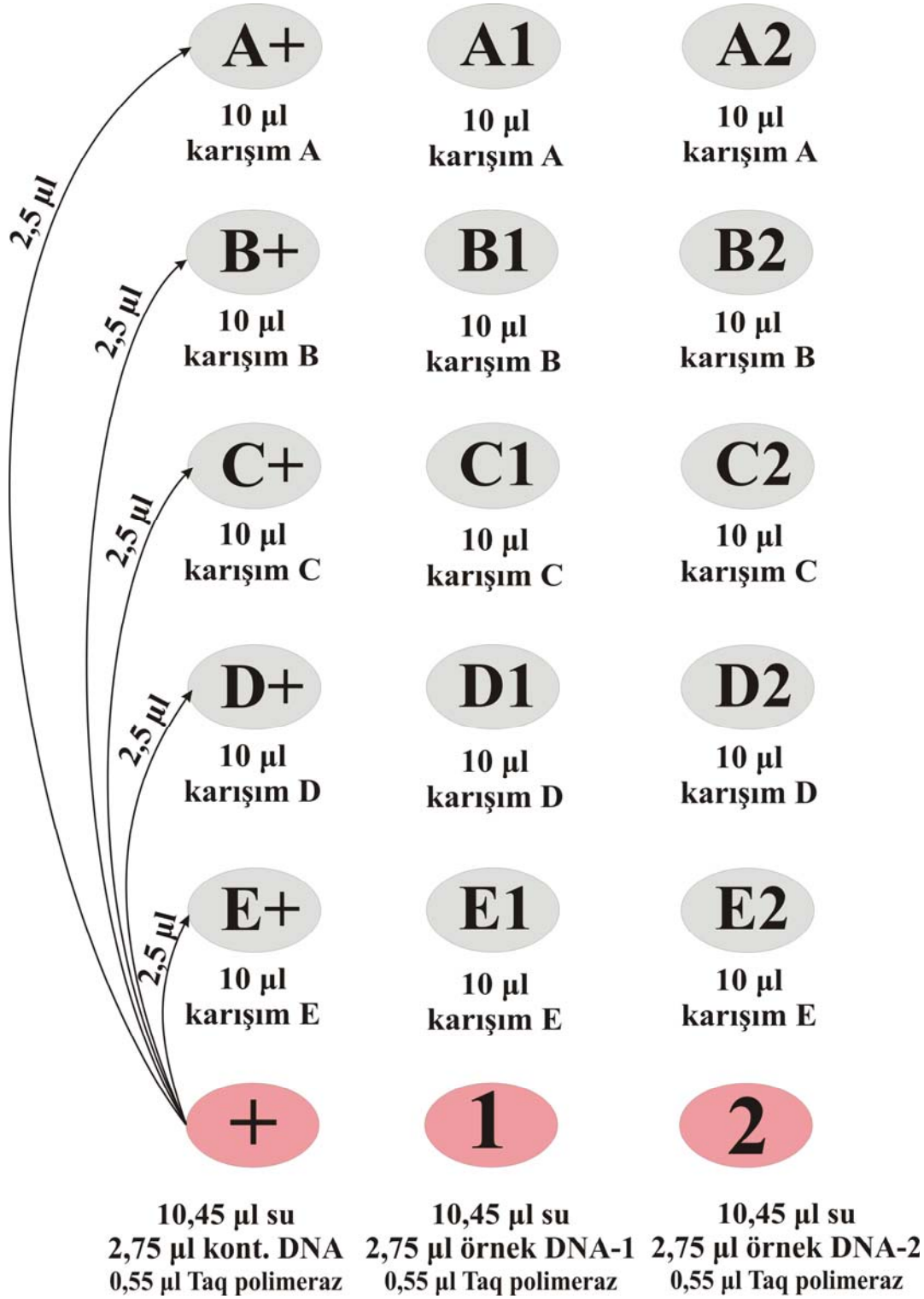
A2, İkinci vakaya ait A karışımı

B, C, D ve E karışımları da aynı şekilde etiketlenir. Belirlenen protokole ve uyarlanan miktara göre (çizelge 1) reaksiyon sayısı kadar kontrollerle birlikte, eppendorf tüplere stok karışımlar hazırlanır. Kontaminasyon olmamasına çok dikkat edilir. Sonra her bir tüpe bu karışım eşit şekilde dağıtılır (şekil 25). Tüpler, tekrar karıştırılır ve birkaç saniye santrifüj edilerek ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıda verilen protokolde amplifikasyon işlemine başlanır [69].

1. 94 °C'de 2 dk (ön denatürasyon)
2. 94 °C'de 1 dk (denatürasyon)
3. 58 °C'de 30 sn (bağlanma)
4. 72 °C'de 1 dk (sentez)

2, 3 ve 4. basamak 35 döngü

5. 72 °C'de 5 dk (final uzaması)
6. Program bittikten sonra tüpler +4 °C'ye alınır.



Şekil 25. Y kromozom delesyon tayini için PCR karışımlarının hazırlanması

3.5.2. Agaroz Jel Elekroforezi

Prensip: DNA parçalarının ayrılması ve tanımlanması için agaroz jel elekroforezi kullanılmaktadır. Bu yöntem ile jele uygulanan elekriksel akım sonucu 20 kb ile birkaç yüz kb uzunluğunda DNA parçaları ayrılabilmektedir. Agaroz jel boyunca DNA parçalarının elektroforetik göç hızları temel olarak dört parametreye bağlıdır. Bunlar; DNA'nın moleküler büyüklüğü, agaroz derişimi, DNA'nın konformasyonu ve uygulanan akımlardır. Jeldeki DNA bantları floresans bir boya olan etidyum bromür ile jelin boyanması ve ultraviyole (UV) ışık altında incelenmesi ile görünür hale getirilir [71].

Ayıraçlar

- 5X Tris-Borat EDTA Tamponu (TBE) (pH: 8,3)

  Tris-Baz 54,0 g

  Borik Asit 27,5 g

  EDTA (0,5 pH:8,0) 20 ml

  1000 ml'ye distile su ile tamamlanarak pH'sı ayarlanır.

Çalışmada, PCR ile çoğaltılan ürünlerin tanımlanmasında %4'lük NuSieve 3:1(agaroz), agaroz jel elektroforezi kullanıldı . Bunun için 6 g NuSieve 3:1'lik agaroz tartılır ve 500 ml'lik erlen içine konur. Üzerine 150 ml, 1X TBE tampon konur ve berraklaşıncaya kadar mikrodalga fırında eritilir. Biraz soğutulduktan sonra önceden tarakları yerleştirilen düzeneğe dökülür. Oda ısısında 40-45 dk polimerleşmesi için bırakılır. Jel donduktan sonra içine 1X TBE tamponu konan tank içine yerleştirilir ve taraklar çıkarılır. Amplifiye edilen ürün ile 1 µl yükleme boyası karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklenir. Elde edilen ürünlerin doğru amplifikasyon olup olmadığını kontrol etmek için örneklerin başına ve sonuna 50 bp'lik DNA belirteci (marker) yüklenir. 110 voltta 1,5 saat yürütüldükten sonra jel etidiyum bromür (5 µg/ml distile su) olan kapta birkaç sn bırakılarak bantların boyayı alması sağlanır. Daha sonra distile su olan diğer bir kapta bekletilerek fazla boyanın atılması sağlanır ve UV altında bantlar polaroid film ile görüntülenir. Eğer, elekroforez sonunda pozitif kontrol amaçlı kullanılmış olan erkek genomik DNA'sına ait lokusların ve internal kontrol olarak kullanılan SMCX ve ZFX/ZFY lokuslarının amplifikasyonunun gerçekleşmiş ise, amplifikasyonu olmayan lokusların delesyona uğradığına karar verilir [69]. Delesyon bulunan her olgunun, hataya yer vermemek amacıyla iki kez çalışma sonucunda delesyon bölgeleri tanımlanmıştır.

3.6. Folikül Stimüle Edici Hormon Tayini [72]

Prensip

İmmünoradiometrik yöntem (IRMA) prensibine dayanmaktadır. IRMA iki antikor arasında (sandwiched) ölçüm yapan, yarışçı olmayan bir yöntemdir. İlk antikor tüplerin iç duvar çeperine yerleşmiştir. Diğer antikor, tayin için radioetiketleme yapılmıştır. Analizde bulunan bilinmeyenler, standartlar ve kontroller her iki antikora bağlanarak bir ‘’sandwich’’ kompleks oluştururlar. Bağlanmayanlar tüplerin yıkanması ile uzaklaştırılır.

Ayıraçlar

- FSH standartları (A, B, C, D, E, F, G)
  Sırasıyla 0 1,5 4,5 15,0 45,0 150,0 ve 450,0 mIU/ml
- Anti- FSH ayıracı
- FSH kontrolleri
- Yıkama solüsyonu (distile su ile 10 kat dilue edilir)
- Anti-FSH kaplı tüpler

Yöntem

1. İki tüp total sayım için ayrılır.
2. Anti-LH kaplı tüpler standartlar, kontroller ve örnekler olarak etiketlenir.
3. Standart, kontrol ve örneklerden 100 µl tüplere pipetlenir.
4. Tüm tüplere hemen 100 µl Anti-FSH (I-125) ayıracı eklenir.
5. Tüpler hafifçe 1-2 sn sallanır.
6. Tüpler 180 rpm’deki bir sallayıcının üzerinde, oda ısısında 2 saat bekletilir.
7. Total sayım tüpleri dışında bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
8. Total sayım tüpleri hariç bütün tüplere 2 ml yıkama solüsyonu eklenir.
9. Total sayım tüpleri hariç bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
10. 7. ve 8. basamaklar iki kez tekrarlanır.
11. Gama sayacında bir dakika okuma yapılır.
12. Sonuçlar standart eğriden değerlendirilir.

Yöntemin yetişkin sağlıklı erkek FSH referans aralığı 1,5-5,8 mIU/ml’dir.

3.7. Luteinize Edici Hormon Tayini [73]

Prensip

İmmünoradiometrik yöntem (IRMA) prensibine dayanmaktadır. IRMA iki antikor arasında (sandwiched) ölçüm yapan, yarışçı olmayan bir yöntemdir. İlk antikor tüplerin iç duvar çeperine yerleşmiştir. Diğer antikor, tayin için radioetiketleme yapılmıştır. Analizde bulunan bilinmeyenler, standartlar ve kontroller her iki antikora bağlanarak bir ‘’sandwich’’ kopmleks oluştururlar. Bağlanmayanlar tüplerin yıkanması ile uzaklaştırılır.

Ayıraçlar

- LH standartları (A, B, C, D, E, F, G)
  Sırasıyla 0 1,0 3,0 10,0 30,0 100,0 ve 300,0 mIU/ml
- Anti-LH ayıracı
- LH kontrolleri
- Yıkama solüsyonu (distile su ile 10 kat dilue edilir)
- Anti-LH kaplı tüpler

Yöntem

1. İki tüp total sayım için ayrılır.
2. Anti-LH kaplı tüpler standartlar, kontroller ve örnekler olarak etiketlenir.
3. Standart, kontrol ve örneklerden 100 µl tüplere pipetlenir.
4. Tüm tüplere hemen 100 µl Anti-LH (I-125) ayıracı eklenir.
5. Tüpler hafifçe 1-2 sn sallanır.
6. Tüpler 180 rpm’deki bir sallayıcının üzerinde, oda ısısında 2 saat bekletilir.
7. Total sayım tüpleri dışında bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
8. Total sayım tüpleri hariç bütün tüplere 2,5 ml yıkama solüsyonu eklenir.
9. Total sayım tüpleri hariç bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
10. 7. ve 8. basamaklar iki kez tekrarlanır.
11. Gama sayacında bir dakika okuma yapılır.
12. Sonuçlar standart eğriden değerlendirilir.

Yöntemin yetişkin sağlıklı erkek LH referans aralığı 1,1-8,3 mIU/ml’dir.

3.8. Testosteron Tayini [74]

Prensip

Yöntem, "radioimmünoassay"in temel prensibine dayanır. Radyoaktif ve radyoaktif olmayan antijenler, antikor bağlı bölgelere bağlanmak için yarışmacı bir şekilde davranırlar. Antikora bağlı I-125-işaretli testosteron miktarı, işaretlenmemiş mevcut testosteron miktarı ile ters orantılıdır. Serbest ve bağlı antijenin ayrımı antikor bağlı tüplerin aspire edilerek yıkanması ile sağlanır.

Ayıraçlar

- Testosteron standartları (A, B, C, D, E, F)
  Sırasıyla 0 0,1 0,5 2,5 10,0 25,0 ng/ml (Liyofilize, distile su ile sulandırılır)
- Testosteron (I-125) ayıracı
- Anti-Testosteron kaplı tüpler
- Testosteron kontrolleri (Liyofilize, distile su ile sulandırılır)

Yöntem

Bütün çözeltiler oda ısısında bekletilmeli ve hafifçe karıştırılmalıdır.

1. İki tüp total sayım için ayrılır.
2. Anti-Testosteron kaplı tüpler standartlar, kontroller ve örnekler olarak etiketlenir.
3. Standart, kontrol ve örneklerden 50 µl tüplere pipetlenir.
4. Tüm tüplere hemen 500 µl testosteron (I-125) ayıracı pipetlenir.
5. Tüpler elde hafifçe karıştırılır.
6. Tüpler 37 °C 'lik su banyosunda 60-70 dk bekletilir.
7. Total sayım tüpleri hariç diğer tüplerin içeriği aspire edilir.
8. Kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek iyice drenaj sağlanır.
9. Tüm tüpler gama sayacında bir dakika okunur.
10. Standart eğriden değerlendirilir.

Yöntemin yetişkin sağlıklı erkek testosteron referans aralığı 2,8-8,8 ng/ml'dir.

3.9. Prolaktin Tayini [75]

Prensip

İmmünoradiometrik yöntem (IRMA) prensibine dayanmaktadır. IRMA iki antikor arasında (sandwiched) ölçüm yapan, yarışçı olmayan bir yöntemdir. İlk antikor tüplerin iç duvar çeperine yerleşmiştir. Diğer antikor, tayin için I-125 ile radioetiketleme yapılmıştır. Analizde bulunan bilinmeyenler, standartlar ve kontroller her iki antikora bağlanarak bir ‘’sandwich’’ kompleks oluştururlar. Bağlanmayanlar tüplerin yıkanması ile uzaklaştırılır.

Ayıraçlar

- Prolaktin standartları (A, B, C, D, E, F)
  Sırasıyla 0 2,0 6,0 20,0 60,0 180,0 ng/ml (Liyofilize, distile su ile sulandırılır)
- Anti-Prolaktin ayıracı
- Prolaktin kontrolleri (Liyofilize, distile su ile sulandırılır)
- Yıkama solüsyonu (distile su ile 10 kat dilue edilir)
- Anti-Prolaktin kaplı tüpler

Yöntem

1. İki tüp total sayım için ayrılır.
2. Anti-Prolaktin kaplı tüpler standartlar, kontroller ve örnekler olarak etiketlenir.
3. Standart, kontrol ve örneklerden 25 µl tüplere pipetlenir.
4. Tüm tüplere hemen 200 µl Anti-Prolaktin (I-125) ayıracı eklenir.
5. Tüpler hafifçe sallanır.
6. Tüpler 180 rpm’deki bir sallayıcının üzerinde, oda ısısında 90 dakika bekletilir.
7. Total sayım tüpleri dışında bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
8. Total sayım tüpleri hariç bütün tüplere 2.5 ml yıkama solüsyonu eklenir.
9. Total sayım tüpleri hariç bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
10. 7. ve 8. basamaklar iki kez tekrarlanır.
11. Tüm tüplere gama sayacında bir dakika okuma yapılır.
12. Sonuçlar standart eğriden değerlendirilir.

Yöntemin yetişkin sağlıklı erkek prolaktin referans aralığı 2,9-17,1 ng/ml’dir.

3.10. Leptin Tayini [76]

Prensip

İmmünoradiometrik yöntem (IRMA) prensibine dayanmaktadır. IRMA iki antikor arasında (sandwiched) ölçüm yapan, yarışçı olmayan bir yöntemdir. İlk antikor tüplerin iç duvar çeperine yerleşmiştir. Diğer antikora, tayin için I-125 ile radioetiketleme yapılmıştır. Analizde bulunan bilinmeyenler, standartlar ve kontroller her iki antikora bağlanarak bir ‘’sandwich’’ kompleks oluştururlar. Bağlanmayanlar tüplerin yıkanması ile uzaklaştırılır.

Ayıraçlar

- İnsan Leptin standartları (A, B, C, D, E, F, G)
  Sırasıyla 0 0,25 0,5 2,5 10,0 30,0 120,0 ng/ml
- Anti-Leptin (I-125) ayıracı
- Yıkama solüsyonu
- Anti-Leptin kaplı tüpler
- İnsan leptin kontrolleri

Yöntem

Çalışmaya başlamadan önce bütün çözeltiler oda ısısında bekletilmeli ve hafifçe karıştırılmalıdır.

1. Antikor kaplanmamış iki tüp total sayım için ayrılır.
2. Anti-Leptin kaplı tüpler standartlar, kontroller ve bilinmeyenler olarak etiketlenir.
3. Standart, kontrol ve örneklerden 100 µl tüplere pipetlenir.
4. Her bir tüpe 200 µl Anti-Leptin (I-125) ayıracı eklenir. 1-2 sn hafifçe karıştırılır.
5. Bütün tüpler oda ısısında (≈ 25 °C) 18-24 saat bekletilir.
6. Total sayım tüpleri dışında bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
7. Total sayım tüpleri hariç bütün tüplere 3 ml yıkama solüsyonu eklenir.
8. Total sayım tüpleri hariç bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
9. 7. ve 8. basamaklar iki kez tekrarlanır.
10. Tüm tüplere gama sayacında bir dakika okuma yapılır. Sonuçlar standart eğriden değerlendirilir.

Plazma leptin düzeyi vücut kitle indeksi ve yaşa göre büyük değişiklik gösterdiği için çalışılan kontrol grubunun değerleri referans alınmıştır.

3.11.İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizinde ve grafiklendirilmesinde SPSS (12.0) ve Excel paket programlarından yararlanılmıştır. Grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na infertilite şikayeti ile başvuran erkek olguların spermiyogram analizleri Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi Androloji laboratuvarında yapılmıştır. Olgulara, semen analizi 15 gün ara ile en az üç kere yapılarak karar verilmiştir. Bir analiz sonucu verilmeden önce, gelen her spermiyogram örneğine en az üç kere sayım yapılmıştır. Y kromozomu delesyon tarama çalışmasına azospermik ve şiddetli oligospermik olgular dahil edilmiştir. Bu özellikleri taşıyan olgulardan rastgele seçim yapılmıştır. Hormonal analizler ise kontrol grubu, azospermik ve şiddetli oligospermik olgulara uygulanmıştır. Kontrol grubuna infertilite problemi olmayan doğal yolla çocuk sahibi olan benzer yaş gruplarındaki fertil bireyler dahil edilmiştir. İnfertiliteye neden olabileceği düşünülen faktörler için olguların tanıya yardımcı öyküleri de kaydedilmiştir. Çalışmaya alınan olgularda kabakulak, varikosel operasyonu, sigara ve alkol alışkanlığı, kronik hastalık durumu ve yakın akrabada başka infertilite problemi olanların sorgulanması yapılmış ve bu veriler çizelge 4, 5 ve 6'da sunulmuştur.

Kontrol grubu ile azospermik ve şiddetli oligospermik grupların plazma leptin, prolaktin, testosteron, FSH ve LH değerleri "radioimmünoassay" yöntemi ile çalışılmış ve sonuçlar çizelge 7, 8 ve 9'da verilmiştir. Gruplar arası hormon düzeylerinin karşılaştırılmış ortalama değerleri çizelge 10'da ve gruplar arasındaki farklılıkların analizi çizelge 11'de verilmiştir.

Azospermik ve şiddetli oligospermik olgular kendi içinde ayrıca varikoseli olan ve olmayan şeklinde gruplandırılıp hormon düzeylerine bakılmış ve ortalama değerleri çizelge 12'de sunulmuştur. Y kromozom delesyonu saptanan 4 hastanın kişisel özellikleri, hormon değerleri ve delesyona uğrayan bölgeleri sırasıyla çizelge 13, 14 ve 15'de verilmiştir.

Çizelge 4: Kontrol grubun özellikleri

No	Ad	Yaş	Kaba-Kulak	Varikosel	Sigara	Alkol	Kronik Hastalık	Ailede infertilite
1	MN	35	-	-	-	-	-	-
2	İÜ	45	-	-	-	-	-	-
3	EÖ	40	-	-	-	-	-	-
4	HT	29	-	-	-	-	-	-
5	MK	44	-	-	+	-	-	-
6	Nİ	52	-	-	-	-	-	-
7	MS	40	-	-	+	-	-	-
8	AK	48	-	-	-	-	-	-
9	HA	45	-	-	-	-	-	-
10	Aİ	33	-	-	-	-	-	-

Çizelge 5. Şiddetli oligospermik grup olgularının özellikleri

No	Ad	Yaş	Kaba-Kulak	Varikosel	Sigara	Alkol	Kronik Hastalık	Ailede infertilite
1	ÇE	23	-	-	-	-	-	-
2	HMÜ	35	-	-	-	-	-	-
3	AÖ	32	-	-	-	-	-	-
4	İÇ	29	+	-	+			
5	MB	38	-	-	-	-	-	-
6	NÖ	34	-	-	-	-	-	-
7	MŞ	40	-	-	+	-	-	Teyzesinin oğlu
8	ST	32	-	-	+	-	-	Erkek kardeşi
9	AS	28	-	-	-	-	Testis CA	-
10	MKR	28	-	-	-	-	-	-
11	HT	40	-	-	-	-	-	-
12	FÖ	27	-	-	-	-	-	-
13	MK	31	-	-	-	-	-	İki erkek kardeşi
14	AD	45	-	-	-	-	-	-
15	HA	30	-	-	+	-	-	Amcası
16	FB	27	-	-	-	-	-	-
17	YP	30	-	-	-	-	-	-
18	AÖ	32	-	-	-	-	-	-
19	HG	35	-	+	+	-	-	-
20	HK	28	-	+	+	-	-	-
21	ARE	30	-	+	+	-	-	-
22	TR	42	+	+	+	-	-	Erkek kardeşi
23	NÖ	32	+	+	-	-	-	-
24	RÖ	34	-	+	-	-	-	İki erkek kardeşi
25	MKT	40	-	+	+	-	-	erkek kardeşi

Çizelge 6. Azospermik grup olgularının özellikleri

No	Ad	Yaş	Kaba-kulak	Varikosel	sigara	Alkol	Kronik hastalık	Ailede infertilite
1	BS	39	-	+	-	-	-	-
2	KA	31	-	+	-	-	-	-
3	FE	33	-	+	-	-	-	Erkek kardeşi
4	SS	37	-	+	-	-	Sifilis-Gonore	-
5	HP	32	-	+	+	-	Sifilis-Gonore	-
6	NB	31	-	+	-	-	-	İki erkek kardeşi
7	HK	28	-	+	-	-	-	-
8	ÖŞ	53	-	+	-	-	-	-
9	İU	23	-	+	+	-	-	-
10	ÖT	40	-	+	-	-	-	-
11	HA	32	-	+	-	-	-	-
12	AK	40	-	+	-	-	-	-
13	SD	37	-	+	-	-	-	-
14	AÇ	26	+	+	-	-	-	-
15	HÖ	29	-	-	-	-	-	-
16	AG	41	-	-	-	-	-	-
17	HS	28	-	-	+	-	-	-
18	AV	30	-	-	-	-	-	-
19	RA	42	-	-	-	-	Küçük testis	-
20	BU	40	-	-	-	-	-	-
21	İT	27	-	-	-			
22	MÖ	34	-	-	+	-	-	-
23	ÜB	26	-	-	-	-	-	-
24	MEŞ	34	-	-	-	-	-	-
25	SM	34	-	-	+	-	-	-
26	İÇ	37	-	-	-	-	-	-
27	İZ	32	-	-	-	-	-	-
28	İA	31	-	-	+	-	Epididim kisti	
29	AK	40	-	-	-	-	-	-
30	AZ	38	+	-	-	-	-	-
31	AÜ	26	-	-	+	-	Sağ orşektomi	-
32	NA	40	-	-	-	-	-	-
33	HMÖ	35	-	-	-	-	-	-
34	CA	30	-	-	-	-	-	-
35	İY	49	-	-	+	-	-	-
36	MKS	31	-	-	-	-	-	İki erkek kardeşi
37	YD	26	-	-	-	-	-	-
38	HCP	32	-	-	-	-	-	-

Çizelge 7. Kontrol grubu plazma hormon değerleri

No	Ad	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testosteron (ng/ml)	Prolaktin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
1	MN	5,2	8,8	3,5	7,5	7,3
2	İÜ	3,8	4,8	3,2	3,6	7,5
3	EÖ	2,9	6,8	5,6	11,2	4,4
4	HT	3,8	3,8	3,3	10,0	4,6
5	MK	2,8	8,4	2,4	9,3	3,5
6	Nİ	5,7	8,5	4,0	6,3	2,2
7	MS	0,8	2,5	2,8	7,6	7,9
8	AK	5,0	5,4	3,6	7,2	3,9
9	HA	3,4	8,8	4,4	5,6	1,5
10	Aİ	2,0	8,0	2,3	6,6	9,5

Çizelge 8. Şiddetli oligospermik grup plazma hormon değerleri

No	Ad	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testos-teron (ng/ml)	Prolaktin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
1	ÇE	5,1	5,5	5,0	9,9	0,9
2	HMÜ	4,1	12,0	1,7	15,1	0,9
3	AO	2,9	3,7	3,1	4,9	4,0
4	İÇ	19,9	15,7	1,7	18,5	5,7
5	MB	1,3	1,8	1,4	8,3	8,1
6	NÖ	2,8	3,2	2,8	13,2	1,2
7	MŞ	26	9,0	3,5	10,5	6,7
8	ST	1,5	8,2	2,8	6,0	1,9
9	AS	2,5	2,8	2,5	11,4	2,7
10	MKR	9,0	9,1	3,6	15,2	13,2
11	HT	2,6	2,9	2,7	9,6	3,1
12	FÖ	4,7	9,7	3,1	59,4	5,5
13	MK	6,8	6,7	2,7	10,5	5,5
14	AD	7,6	4,3	3,1	12,8	2,2
15	HA	5,0	8,0	3,6	12,5	8,0
16	FB	3,0	6,4	3,9	7,1	6,7
17	YP	3,5	3,85	3,1	8,0	5,0
18	AÖ	6,1	5,23	3,7	5,2	5,7
19	HG	16,2	6,8	3,2	35,8	6,6
20	HK	1,6	2,0	2,7	8,8	0,1
21	ARE	22,7	12,64	2,8	14,5	3,3
22	TR	33,5	18,77	2,5	11,8	5,4
23	NÖ	2,6	4,42	4,8	8,2	3,6
24	RÖ	1,1	2,36	2,1	6	2,0
25	MKT	1,9	1,9	2,4	3,5	7,5

Çizelge 9. Azospermik grup plazma hormon değerleri

No	Ad	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testosteron (ng/ml)	Prolaktin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
1	BS	10,6	16,2	2,2	9,9	1,3
2	KA	1,5	7,4	3,0	12,7	2,7
3	FE	5,6	14,6	2,5	18,8	6,0
4	SS	7,4	11,0	1,3	10,6	27.2
5	HP	36.8	13,8	2,4	11,8	8.2
6	N.B	10,0	15,5	2,8	24,8	4,5
7	HK	12,4	19,5	4,3	8,8	14,0
8	ÖŞ	3,2	7,8	2,0	13,3	12,2
9	İU	3,7	10,0	2,4	9,5	8,5
10	ÖT	22,0	23,4	1,3	7,3	10,5
11	HA	9,7	19,7	1,2	11,0	3,4
12	AK	20,8	18,7	2,4	13,7	1,9
13	SD	7,4	17,6	1,9	13,3	8,0
14	AÇ	3,8	12,6	3,2	6,2	0,2
15	HÖ	38,5	25,0	1,8	13,8	5,6
16	AG	21,5	16,2	2,4	13,3	4,2
17	HS	2,0	6,5	1,6	14,9	7,0
18	AV	2,9	7,4	3,3	12,9	0,9
19	RA	28,0	25,4	1,7	8,9	9,9
20	BU	59,0	50,0	1,9	5,5	5,3
21	İT	2,0	4,0	1,7	8,8	4,8
22	MÖ	9,4	12,4	1,8	6,6	9,5
23	Ü,B	6,5	12,6	2,2	20,4	9,0
24	MEŞ	0,1	0,01	19,7	22,6	2,8
25	SM	7,5	7,2	2,0	9,1	5,3
26	İÇ	3,0	7,5	4,0	23,8	1,2
27	İZ	2,9	4,6	2,8	16,7	3,5
28	İA	2,6	9,7	2,7	15,4	6,3
29	AK	33,3	34,0	1,7	5,4	17,5
30	AZ	19,0	18,2	2,7	11,5	7,6
31	AÜ	41,5	30,0	1,9	10,1	1,6
32	NA	19,3	27,2	1,0	15,2	7,1
33	HMÖ	7,9	13,4	2,3	4,2	8,6
34	CA	22,8	34,0	1,9	7,2	5,3
35	İY	8,0	5,4	2,0	26,8	0,9
36	MKS	23,8	22,2	2,8	8,5	3,3
37	YD	22,2	27,0	1,8	14,1	3,4
38	HCP	28,6	43,9	2,5	9,3	1,8

Çizelge 10. Grupların hormon düzeylerinin ortalama değerleri

Gruplar	İstatistiksel veriler	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testosteron (ng/ml)	Prolaktin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
Kontrol (n:10)	**Orta.±SD**	3,54±1,51	6,58±2,30	3,51±0,98	7,49±2,21	5,23±2,66
	Ortanca	3,60	7,40	3,40	7,35	4,50
	(min-maks)	0,80-5,70	2,50-8,80	2,30-5,60	3,60-11,20	1,5-9,5
Azospermik (n:38)	**Orta.±SD**	14,92±13,72	17,15±11,06	2,72±2,92	12,54±5,54	6,34±5,21
	Ortanca	9,55	15,05	2,20	11,65	5,30
	(min-maks)	0,10-59,0	0,01-50,0	1,00-19,70	4,20-26,80	0,20-27,20
Oligo-spermik (n:25)	**Orta.±SD**	7,78±8,75	6,67±4,45	3,06±0,94	12,82±11,68	4,75±3,09
	Ortanca	4,20	5,50	2,90	10,50	5,40
	(min-maks)	1,10-35,50	1,80-18,77	1,40-5,20	2,70-59,40	0,10-13,20

Çizelge 11. Grupların hormon değerleri yönünden karşılaştırılması (‘’P ‘’değerleri)

	‘’P’’ değerleri				
Gruplar	**FSH**	**LH**	**Testos-teron**	**Prolaktin**	**Leptin**
Kontrol-Azospermik	*0.000	*0.000	0.440	*0.000	0.736
Kontrol-Oligospermik	0.078	1.000	0.567	0.108	0.959
Azospermik-Oligospermik	*0.043	*0.000	0.882	0.999	0.351

*Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında $p< 0.05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 12. Varikosel durumlarına göre grupların ortalama hormon değerleri

Gruplar	İstatistiksel Veriler	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testos-teron (ng/ml)	Prolaktin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
Azospermik (n:14) Varikosel (+)	**Orta.±SD**	11,06±9,60	14,83±4,73	2,35±0,83	12,26±4,76	7,75±6,99
	Ortanca	8,55	15,05	2,40	11,40	7,00
	(min-maks)	1,50-36,80	7,40-23-40	1,20-4,30	6,20-24,80	0,20-27,20
Azosppermik (n:24) Varikosel (-)	**Orta.±SD**	17,21±15,34	18,49±13,37	2,92±3,62	12,70±6,05	5,51±3,75
	Ortanca	14,20	14,80	2,00	12,20	5,30
	(min-maks)	0,10-59	0,01-50,0	1,00-19,70	4,20-26,80	0,90-17,50
Oligospermik (n:7) Varikosel (+)	**Orta.±SD**	11,37±12,96	6,98±6,44	2,92±0,89	12,65±10,82	4,07±2,60
	Ortanca	2,60	4,42	2,70	8,80	3,60
	(min-maks)	1,10-33,50	1,90-18,77	2,10-4,80	3,5-35,80	0,10-7,50
Oligospermik (n:18) Varikosel (-)	**Orta.±SD**	6,35±6,46	6,56±3,63	3,0±0,86	13,22±12,09	4,83±3,14
	Ortanca	4,40	5,95	3,10	10,50	5,25
	(min-maks)	1,30-26,00	1,80-15,70	1,40-5,0	4,90-59,40	0,90-13,20
Kontrol (n:10)	**Orta.±SD**	3,54±1,51	6,58±2,30	3,51±0,98	7,49±2,21	5,23±2,66
	Ortanca	3,60	7,40	3,40	7,35	4,50
	(min-maks)	0,80-5,70	2,50-8,80	2,30-5,60	3,60-11,20	1,5-9,5

Azospermik ve şiddetli oligospermik gruplar kendi içinde varikosel operasyonu geçirenler ile varikosel problemi olmayanlar şeklinde ikiye ayrılmıştır. Bu gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında azospermik ve şiddetli oligospermik gruplarda varikoseli olan ve olmayan gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir.

Çizelge 13. Delesyon görülen olguların özellikleri

No	Ad	Yaş	Tanı	Kaba-kulak	Varikosel	sigara	Alkol	Kronik hastalık	Ailede infertilite
10	MKR	28	Şid.oligosp.	-	-	-	-	-	-
22	MÖ	34	Azosp.	-	-	+	-	-	-
25	SM	34	Azosp.	-	-	-	-	-	-
35	İY	49	Azosp.	-	-	+	-	-	-

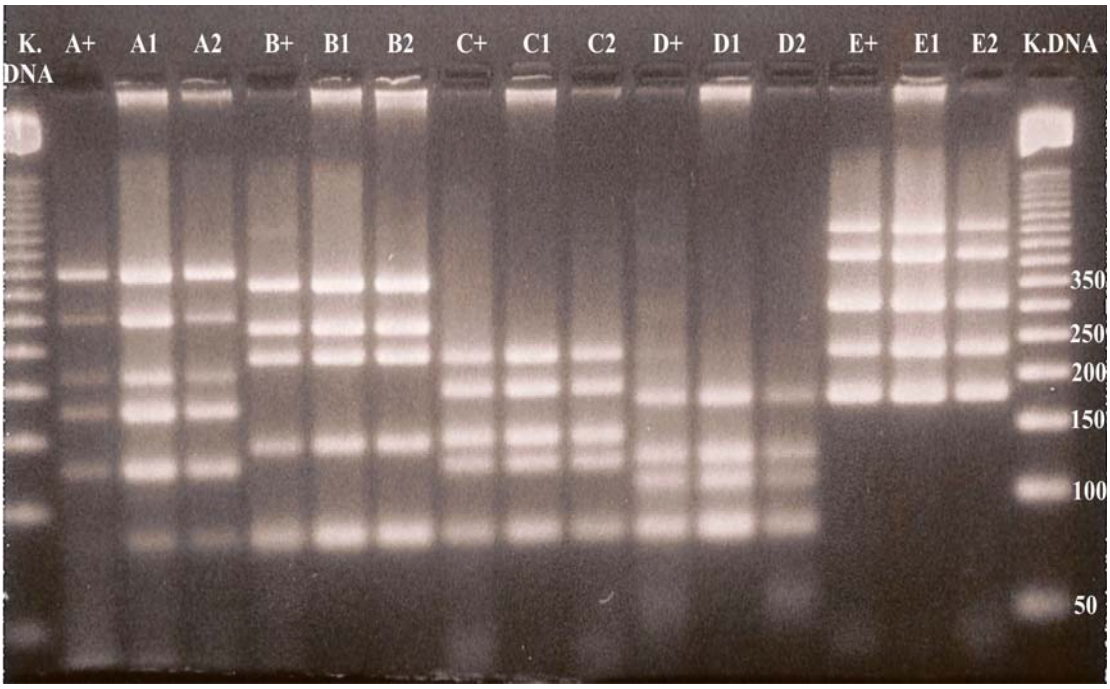
Çizelge 14. Y kromozomu delesyonu (+) olguların serum hormon düzeyleri

No	Ad	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testosteron (ng/ml)	Prolaktin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
10	MKR	9,0	9,1	3,6	15,2	13,2
22	MÖ	9,4	12,4	1,8	6,6	9,5
25	SM	7,5	7,2	2,0	9,1	5,3
35	İY	8,0	5,4	2,0	26,8	0,9

Çizelge 15. Y kromozomu delesyon (+) olguların delesyon görülen bölgeleri

No	Ad	AZFa	AZFb	AZFc	Proksimal AZFc/d'nin kısmi yok.	Proksimal AZFc/d'nin tamamı yok.
10	MKR	-	-	+	+	-
22	MÖ	-	+	+	+	-
25	SM	-	-	+	+	-
35	İY	-	+ (DYS 221 bölgesi hariç)	+	-	+

PCR ile Y Kromozom mikrodelesyon tayini için yapılan çalışmada, agaroz jel elektroforezinde bantların iyi ayrışması için, gereç ve yöntemde belirtilen şekilde farklı süreler uygulanmış ve bantların ayrışmalarına göre uygun süre seçilmiştir. Şekil 26'da agaroz jelde uzun yürütme (2 saat) süresi uygulanmış, delesyon taşımayan iki normal olgu görülmektedir.

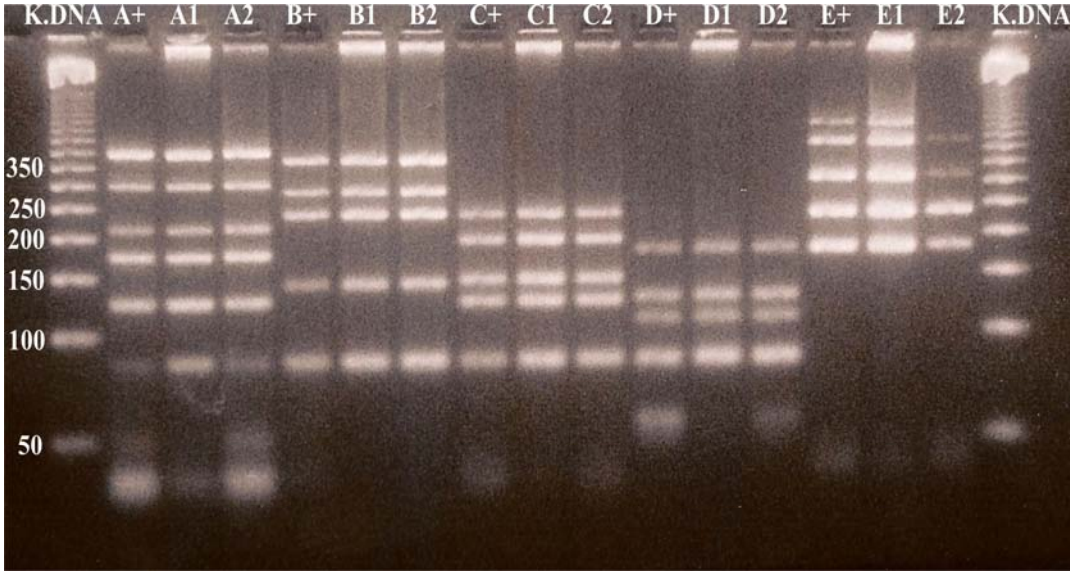


Şekil 26. Agaroz jelde 2 saat yürütülen örneklerin görüntüleri

Soldan sağa;

1. : 50bp'lik klavuz DNA (K.DNA)
2. : A+ (A karışımına ait pozitif kontrol)
3. : A1 (Birinci vaka)
4. : A2 (İkinci vaka)
5. : B+ (B karışımına ait pozitif kontrol)
6. : B1 (Birinci vaka)
7. : B 2 (İkinci vaka)
8. : C+ (C karışımına ait pozitif kontrol)
9. : C1 (Birinci vaka)
10. : C 2 (İkinci vaka)
11. : D+ (D karışımına ait pozitif kontrol)
12. : D1 (Birinci vaka)
13. : D 2 (İkinci vaka)
14 : E+ (E karışımına ait pozitif kontrol)
14. : E1 (Birinci vaka)
15. : E 2 (İkinci vaka)
16. : 50bp'lik klavuz DNA

Daha kısa yürütme süresi (1,5 saat) uygulanan delesyon taşımayan iki olgu şekil 27'de görülmektedir.



Şekil 27. Agaroz jelde 1,5 saat yürütülen örneklerin görüntüsü

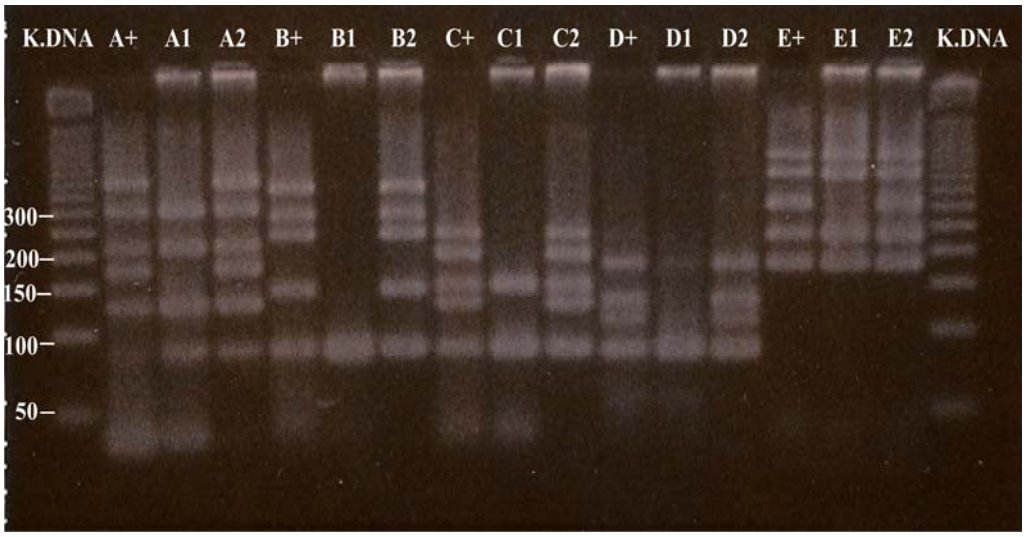
Soldan sağa;

17. : 50bp'lik klavuz DNA (K.DNA)
18. : A+ (A karışımına ait pozitif kontrol)
19. : A1 (Birinci vaka)
20. : A2 (İkinci vaka)
21. : B+ (B karışımına ait pozitif kontrol)
22. : B1 (Birinci vaka)
23. : B 2 (İkinci vaka)
24. : C+ (C karışımına ait pozitif kontrol)
25. : C1 (Birinci vaka)
26. : C 2 (İkinci vaka)
27. : D+ (D karışımına ait pozitif kontrol)
28. : D1 (Birinci vaka)
29. : D 2 (İkinci vaka)
14 : E+ (E karışımına ait pozitif kontrol)
30. : E1 (Birinci vaka)
31. : E 2 (İkinci vaka)
32. : 50bp'lik klavuz DNA

Multipleks PCR yöntemi ile 63 örnekte Y kromozom delesyonları çalışılmıştır. Azospermik olan 38 olgu ve şiddetli oligospermik olan 25 olgu çalışmaya alınmıştır. Her bir fotoğraf iki örneğe aittir. Y kromozomunun farklı bölgelerinde oluşan delesyonlar 4 olguda saptanmıştır. Her bir örneğin delesyona uğrayan bölgeleri tek tek tanımlanmış ve Y kromozom haritasında gösterilmiştir.

MÖ adındaki 1 nolu olgunun delesyon bölgelerinin agaroz jeldeki görüntüsü şekil 28'de, delesyon bölgelerinin tanımı çizelge 16'da sunulmuştur.

1-Adı soyadı:M.Ö **Olgu sıra no (resimde):** 1 **Grup:** Azospermik



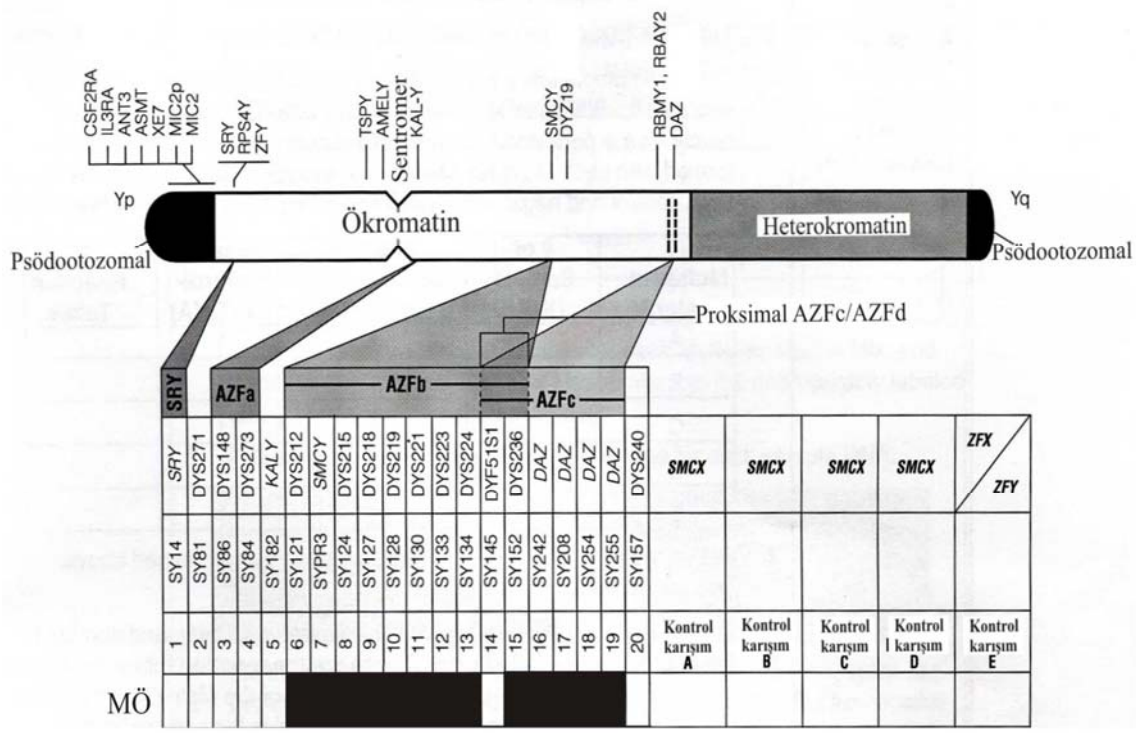
Şekil 28. Y kromozomu delesyonu görülen MÖ adlı olgu (resimde olgu sıra no:1)

Çizelge 16. Y kromozom delesyonu görülen bölgelerin özellikleri (MÖ)

STS(karışım A)	**Lokus**	**Baz uzunluğu(bp)**	**Haritadaki yeri**	**Yer aldığı Bölge**
SY254	DAZ	380	18	AZFc
SY130	DYS221	173	11	AZFb
STS (karışım B)				
SYPR3	SMYC	362	7	AZFb
SY127	DYS218	274	9	AZFb
SY242	DAZ	233	16	AZFc
SY208	DAZ	140	17	AZFc
STS (karışım C)				
SY128	DYS219	228	10	AZFb
SY121	DYS212	190	6	AZFb
SY255	DAZ	124	19	AZFc
STS (karışım D)				
SY133	DYS223	177	12	AZFb
SY152	DYS236	125	15	ProksimalAZFc/d
SY124	DYS215	109	8	AZFb
STS (karışım E)				
SY134	DYS224	303	13	AZFb

Delesyon bölgelerinin tanımı: AZFb ve AZFc bölgelerinin tamamı ve proksimal AZFc/d bölgesinin kısmi yokluğu.

Azospermik olan 1 nolu (MÖ) olgunun delesyona uğrayan bölgeleri, Y kromozom haritasında işaretlenmiştir (şekil 29).



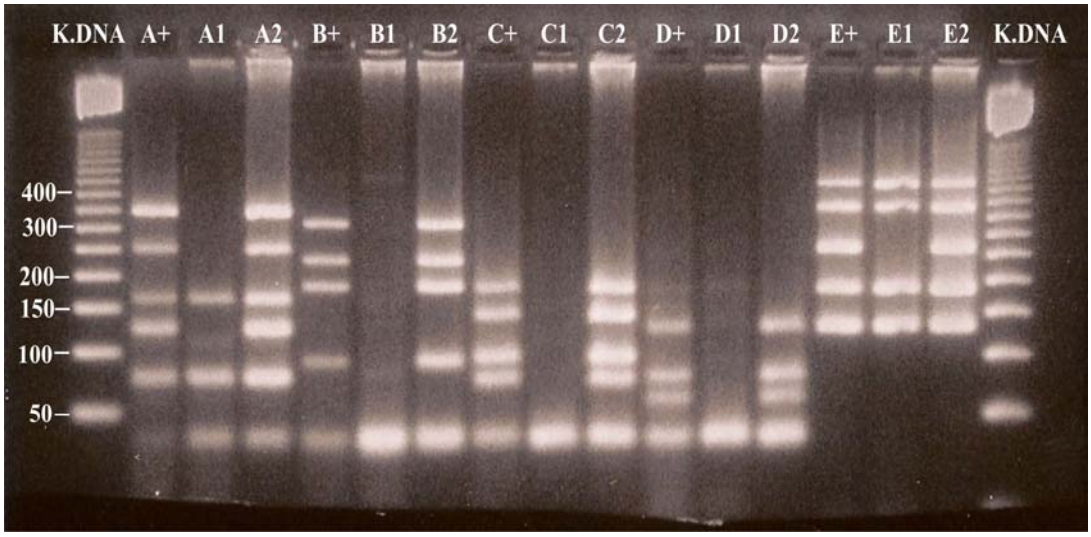
Şekil 29. Delesyon görülen bölgelerin Y kromozom haritasında gösterilmesi (MÖ)

-İY adlı 2 nolu olgunun Y kromozom delesyon bölgelerinin agaroz jeldeki görüntüsü şekil 30'da, delesyon bölgelerinin tanımlanması çizelge 17'de sunulmuştur.

-SM adlı 3 nolu olgunun delesyon bölgelerinin agaroz jeldeki görüntüsü şekil 32'de, delesyon bölgelerinin tanımlanması çizelge 18'de sunulmuştur.

-MKR adlı 4 nolu olgunun delesyon bölgelerinin agaroz jeldeki görüntüsü şekil 34'de, delesyon bölgelerinin tanımlanması çizelge 19'da sunulmuştur.

2-Adı soyadı: İY **Olgu sıra no (resimde):** 1 **Grup:** Azospermik



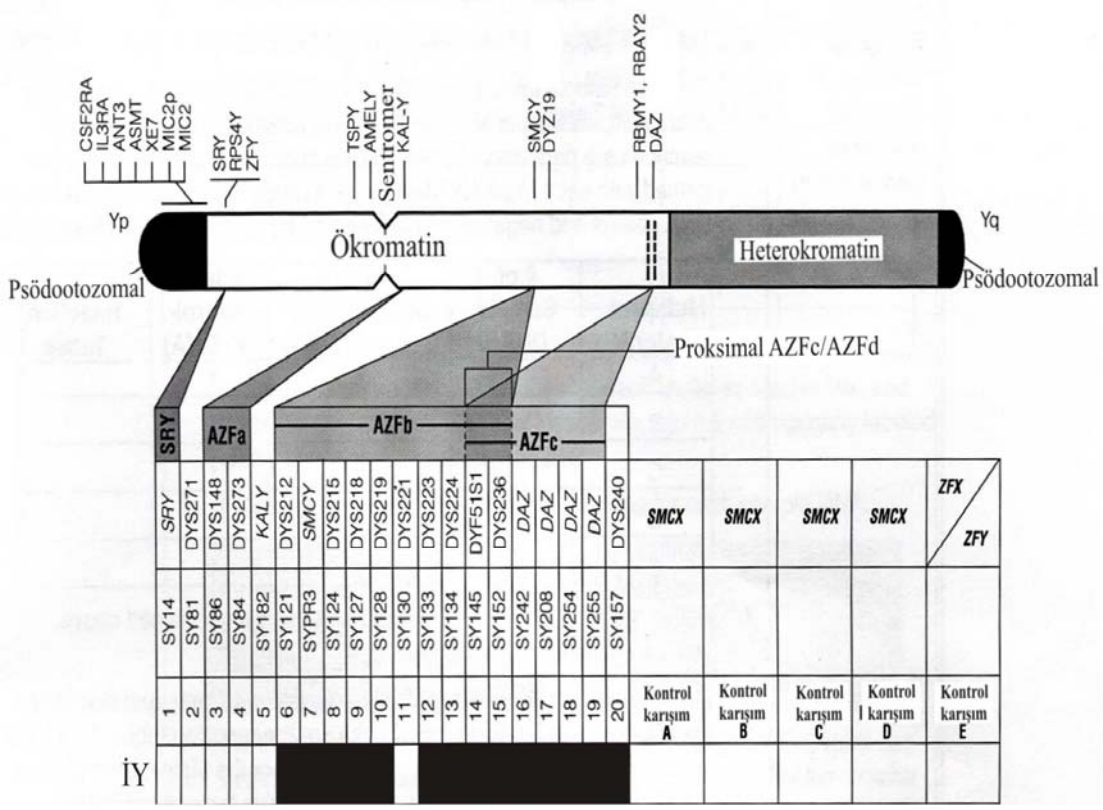
Şekil 30. Y kromozomu delesyonu görülen İY adlı olgu (resim olgu sıra no:1)

Çizelge 17. Y kromozom delesyonu görülen bölgelerin özellikleri (İY)

STS (karışım A)	Lokus	Baz uzunluğu(bp)	Haritadaki yeri	Yer aldığı Bölge
SY254	DAZ	380	18	AZFc
SY157	DYS240	290	20	AZFc
STS (karışım B)				
SYPR3	SMYC	362	7	AZFb
SY127	DYS218	274	9	AZFb
SY242	DAZ	233	16	AZFc
SY208	DAZ	140	17	AZFc
STS (karışım C)				
SY128	DYS219	228	10	AZFb
SY121	DYS212	190	6	AZFb
SY145	DYF51S1	143	14	ProksimalAZFc/d
SY255	DAZ	124	19	AZFc
STS (karışım D)				
SY133	DYS223	177	12	AZFb
SY152	DYS236	125	15	ProksimalAZFc/d
SY124	DYS215	109	8	AZFb
STS (karışımE)				
SY134	DYS224	303	13	AZFb

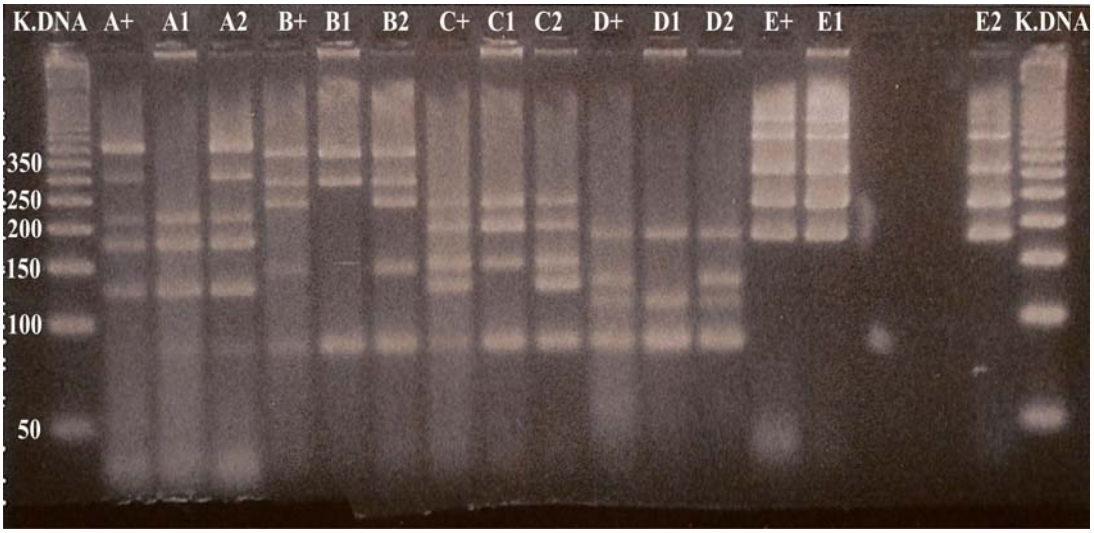
Delesyon bölgelerinin tanımı: DYS221 hariç AZFb bölgesi yokluğu ve AZFc bölgesi ve proksimal AZFc/d bölgesinin tamamının yokluğu.

Azospermik olan olgunun (İY) delesyona uğrayan bölgeleri Y kromozom haritasında işaretlenmiştir (şekil 31).



Şekil 31 . Delesyon görülen bölgelerin Y kromozom haritasında gösterilmesi (İY)

3-Adı soyadı: SM **Olgu sıra no (resimde):** 1 **Grup:** Azospermik



Şekil 32. Y Kromozomu delesyonu görülen SM adlı olgu (resim olgu sıra no:1)

Çizelge 18. Y kromozomu delesyonu görülen bölgelerin özellikleri (SM)

STS (karışım A)	**Lokus**	**Baz uzunluğu(bp)**	**Haritadaki Yeri**	**Yer aldığı bölge**
SY254	DAZ	380	18	AZFc
SY157	DYS240	290	20	AZFc

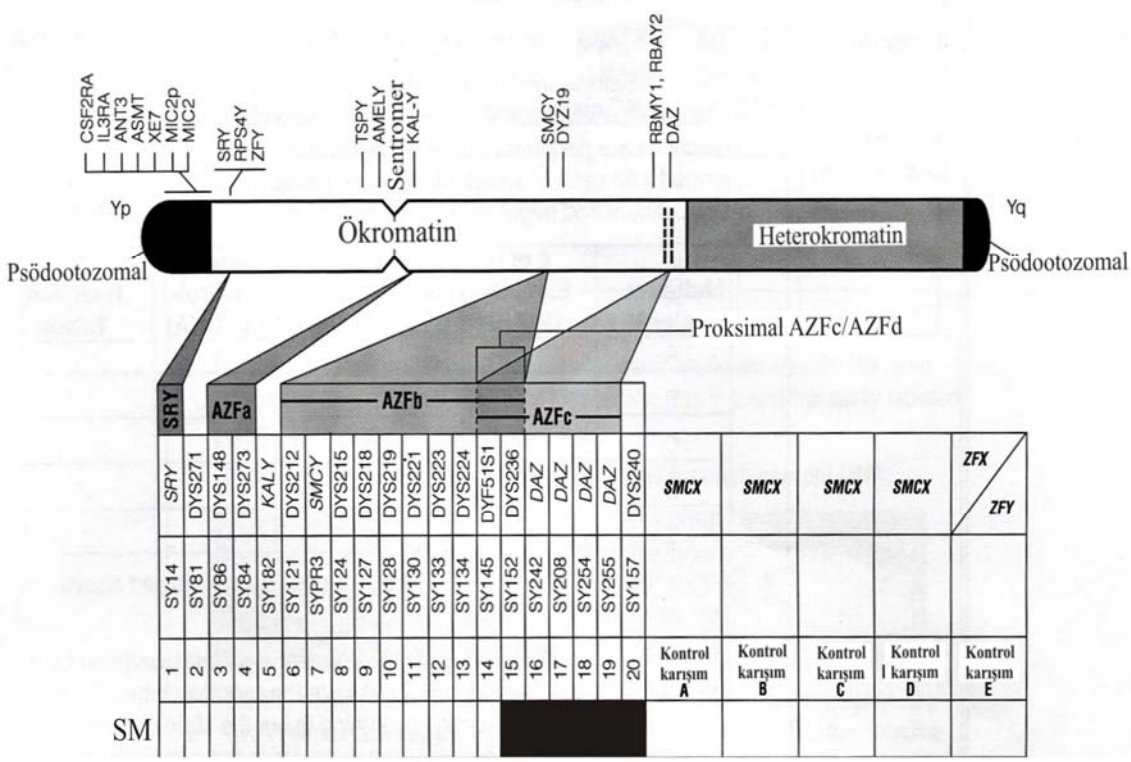
STS (karışım B)				
SY242	DAZ	233	16	AZFc
SY208	DAZ	140	17	AZFc

STS (karışım C)				
SY255	DAZ	124	19	AZFc

STS (karışım D)				
SY152	DYS236	125	15	ProksimalAZFc/d

Delesyon bölgelerinin tanımı: AZFc bölgesinin tamamı ve proksimal AZFc/d bölgesinin kısmi yokluğu.

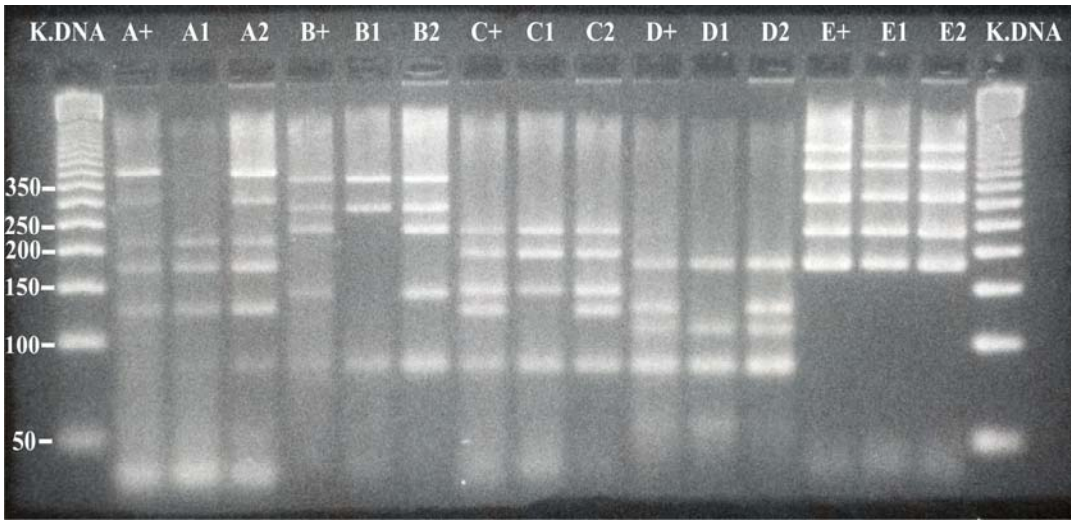
Azospermik olan olgunun (SM) delesyona uğrayan bölgeleri Y kromozom haritasında işaretlenmiştir (şekil 33).



Şekil 33. Delesyon görülen bölgelerin Y kromozom haritasında gösterilmesi (SM)

.

4. Adı soyadı: MKR **Olgu sıra no (resimde):** 1 **Grup:** Şiddetli oligospermik



Şekil 34. Y kromozomu delesyonu görülen MKR adlı olgu (resim olgu sıra no:1)

Çizelge 19. Y kromozomu delesyonu görülen bölgelerin özellikleri (MKR)

STS (karışım A)	**Lokus**	**Baz uzunluğu(bp)**	**Haritadaki Yeri**	**Yer aldığı Bölge**
SY254	DAZ	380	18	AZFc
SY157	DYS240	290	20	AZFc

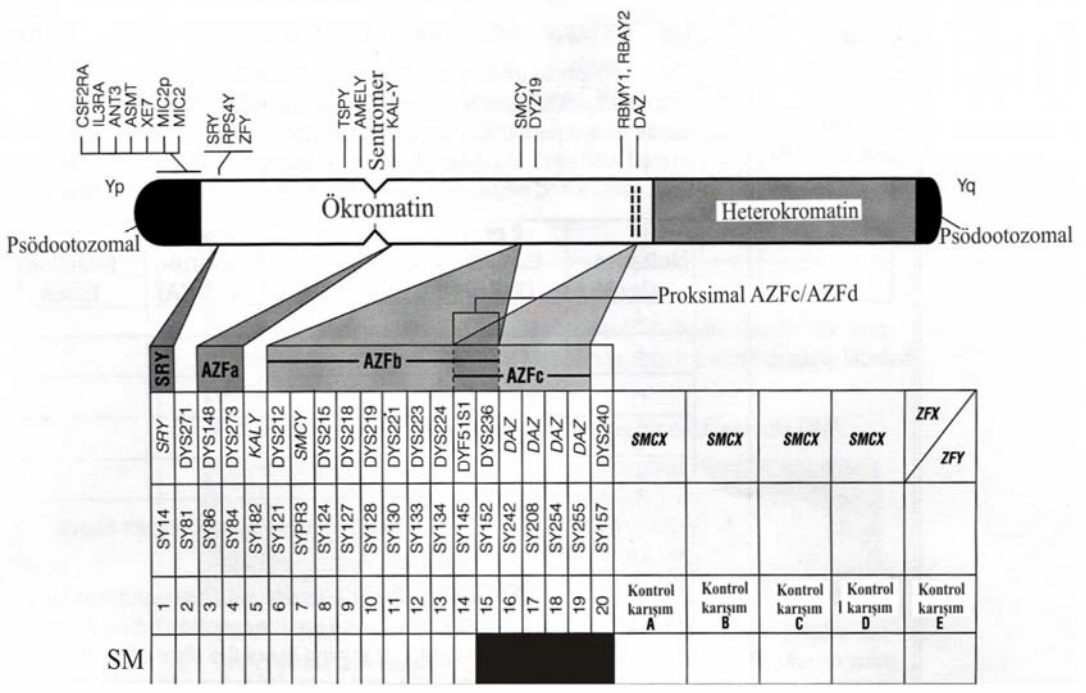
STS (karışım B)				
SY242	DAZ	233	16	AZFc
SY208	DAZ	140	17	AZFc

STS (karışım C)				
SY255	DAZ	124	19	AZFc

STS (karışım D)				
SY152	DYS236	125	15	ProksimalAZFc/d

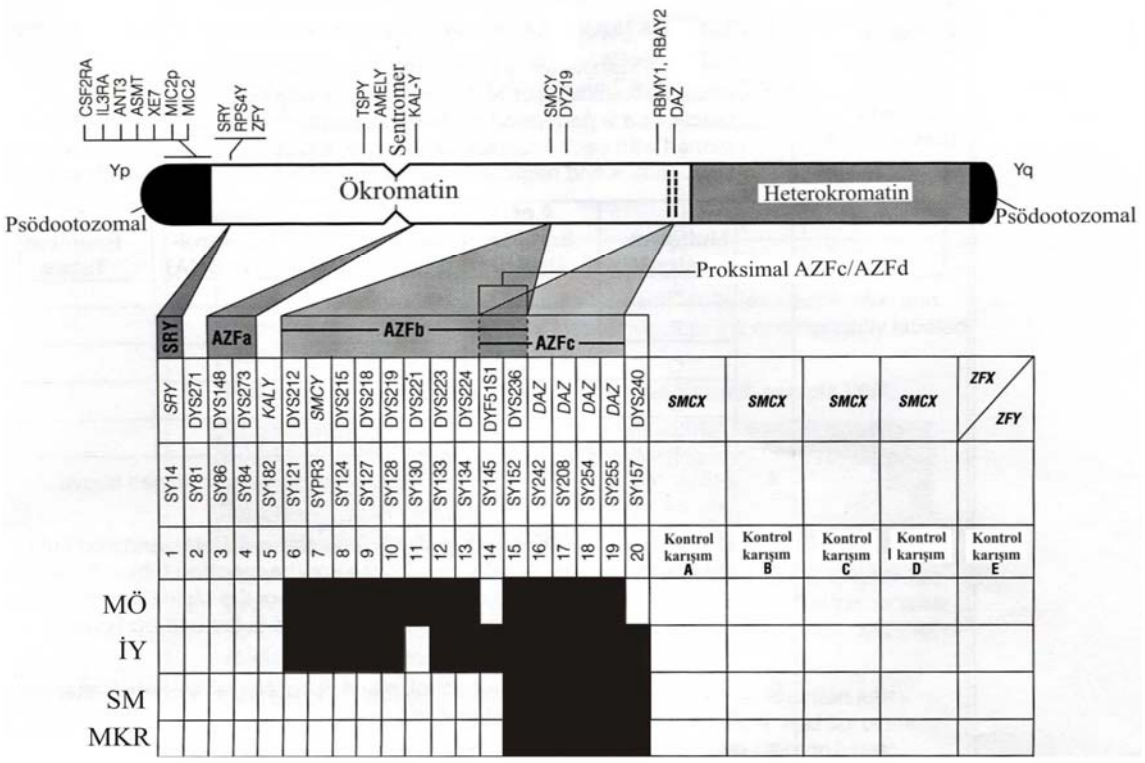
Delesyon bölgelerinin tanımı: AZFc bölgesinin tamamı ve proksimal AZFc/d bölgesinin kısmi yokluğu.

Şiddetlioligospermik olan olgunun (MKR) delesyona uğrayan bölgeleri Y kromozom haritasında işaretlenmiştir (şekil 35).



Şekil 35. Delesyon görülen bölgelerin Y kromozom haritasında gösterilmesi (MKR)

Y kromozomu delesyonu dörülen dört olgunun delesyon bölgeleri Y kromozom haritası üzerinde toplu olarak gösterilmiştir (şekil 36).



Şekil 36. Y kromozom delesyonu görülen olguların delesyon bölgelerinin haritalanması

5. TARTIŞMA

İnfertilite problemi ile başvuran çiftlerin yaklaşık %50'sinde erkeğe bağlı faktörün olması, erkek üreme sağlığının araştırılmasında moleküler düzeyde yapılan çalışmaların önemini ortaya koymaktadır. Erkek infertilitesi; genetik defektler, gonodotropin salıcı hormon yetmezliğinden spermatojenik defektlere ve kromozomal anomalilere kadar geniş bir spektrumda yer almaktadır. İnfertilitede erkek faktörünün ortaya konması için; öykü, fizik muayene, semen analizi, hormonal tetkikler, spesifik testler ve gerekirse testis biyopsisi ile tanıya yardımcı olunmaktadır. Oligospermik ve azospermik erkeklerde son yıllarda moleküler çalışmaların hız kazanması ile etiyolojiye yönelik sonuçlar elde edilmiştir. Azospermi ve şiddetli oligospermi durumu, epididimal kanallarda bir tıkanıklığa bağlı değil ve kişinin hormonal düzeyi de normal ise bu süreçte etkili olabilecek genetik faktörlerin araştırılması önem kazanmaktadır [2,16,18].

Spermatogenez, bir dizi hücresel değişimleri içeren kompleks bir süreçtir. Spermatogenetik sürecin tüm aşamaları ve hormonal düzenlemesi iyi bir şekilde bilinmesine rağmen spermatogenezin genetik kontrol mekanizması hakkındaki bilinenler kısıtlıdır. Günümüzde, sayısal ve yapısal kromozomal anomalilerin cinsiyet karakteristik özelliklerinin gelişiminde ve buna bağlı olarak spermatogenezdeki önemi anlaşılmıştır. İnfertil erkeklerde Klinefelter sendromundan sonra spermatojenik bozukluğa yol açan genetik nedenler arasında ikinci sırayı Y kromozomu mikrodelesyonları almaktadır[18,19,63].

In Vitro Fertilizasyon yönteminin gelişmesi ile birlikte intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulanarak tek bir sperm ile yumurtanın döllenebilmesi sağlanmıştır. Bu aşama erkek infertilitesinin sonuca yönelik çözümünde büyük bir çığır açmıştır. Varikosel, hormonal yetmezlik ya da epididimal kanallarda tıkanıklığa bağlı azospermik ve oligospermik olgularda tedaviyi takiben kısıtlı bir kısmında geriye dönüşüm olabilse de bu tür olguların büyük çoğunluğunda etiyoloji bilinmemekte ve geriye dönüşüm (normal spermatogenez) olmamaktadır. Bu aşamada önem kazanan ICSI yöntemi ile oligospermik olguların seminal sıvısından ve azospermik olguların testis dokularından elde edilen sperm ile çiftler çocuk sahibi olabilmektedir. Bu alanda ardı ardına yapılan moleküler çalışmalar ile Y kromozomu üzerinde bulunan gen dizilerinin erkek infertilitesinde sperm oluşum aşamalarında önemli işlevleri olduğu anlaşılmıştır[18,19.]

5.1. Y Kromozomu Mikrodelesyonlarının Tayini İçin Yapılan Çalışmalar

5.1.1. Dünya Literatürlerinde Yer Alan Çalışmalar

Y kromozomu mikrodelesyon oranlarının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda delesyon bulunan olguların oranının %1 ile %55 gibi geniş bir aralıkta olduğu görülmektedir. Bunu kısaca özetleyen, 1999-2000 yılları arasındaki yapılan çalışmalar ve delesyon oranları çizelge 20'de sunulmuştur [77] .

Y kromozomu delesyonlarında genotip-fenotip ilişkisini kurmak tamamen mümkün olmasa da bu konuda yapılan bir dizi çalışma genel eğilimi desteklemektedir.

Bu konuda yapılan çalışmalara ek olarak yakın zamanda, Foresto ve arkadaşları (1997, İtalya) 38 idiopatik infertil olguda (16 azospermik + 22 şiddetli oligospermik) Y kromozom delesyonunu incelemişler ve azospermik grupta %37,5, oligospermik grupta ise %22,7 bulmuşlardır. Bu olguların çok iyi seçildiği, azospermik olguların SCOS ile uyumlu olduğu belirtilmiştir [78].

Van der Ven ve arkadaşları (1997, Almanya), 28 STS kullanarak yaptıkları çalışmada, ICSI programına alınan 204 azospermik ve oligospermik olgudan sadece 2'sinin Y kromozom delesyonu taşıdığını (%0,98) belirtmişler ve oligospermik olgularda nadir görüldüğü sonucuna varmışlardır. Delesyon noktasının daha proksimalda olmasının distal bölgedeki bir delesyondan daha ciddi spermatogenez bozukluğuna yol açacağı ileri sürülmektedir [79].

Kremer ve arkadaşları (1997, Hollanda), toplam 164 vaka (19 azospermik, 111 oligospermik ve 34 normospermik) çalışmışlar ve 111 olgunun 7'sinde AZFc delesyonu (%6,3) saptamışlardır. AZFa, b ve c bölgeleri için 22 STS kullanılmış ve azospermik ve normal grupta delesyona rastlanmamıştır. Açıklanamayan şiddetli oligospermik olgularda AZFc delesyonunun daha fazla görüldüğü sonucuna varmışlardır [80].

Najmabadı ve arkadaşları (1996, Amerika), 60 infertil hastada (50 azospermik+10 şiddetli oligospermik) 26 STS kullanarak Y kromozom delesyonunu incelemişler ve azospermik grupta 10, oligospermik grupta 1 olmak üzere toplam 11 olguda (%18) delesyon bulmuşlardır. İdiopatik azospermi ve şiddetli oligospermi vakalarında delesyon oranının yüksek olduğunu ve bu olgularda Yq bölgesindeki 6. aralığın infertilitede çok önemli olduğunu belirtmişlerdir [81] .

Çizelge 20. Literatürde geçen Y kromozom mikrodelesyonlarının özeti (1995-2000) [77]

Çalışılan hasta ayısı	Delesyon oranı	Çalışma yapılan ülke	Referans
65	10 (%15,3)	Japonya	Kobayashi K et al. 1995
89	12 (%13,4)	ABD	Reijo R et al. 1996
60	11 (%18)	ABD	Najmabadi H et al. 1996
112	8 (%7.14)	İngiltere	Qureshi SJ et al. 1996
35	2 (%5,7)	ABD	Reijo R et al. 1996
370	12 (3,2)	Almanya	Vogt PH et al. 1996
160	10 (%6,25)	ABD	Girardi SK et al. 1997
200	18 (%9)	ABD	Pyror JL et al. 1997
168	5 (%3)	İtalya	Simoni M et al. 1997
18	10 (%55,5)	Fransa	Foresta C et al. 1998
186	10 (%5,4)	İspanya	Oliva et al. 1998
126	14 (%11,1)	İtalya	Stuppia L et al. 1998
165	8 (%4.8)	İsrail	Kleiman SE et al. 1999
134	3 (%2,2)	Fransa	Krausz C et al. 1999
53	5 (%9,4)	Fransa	Seifer S et al. 1999
97	2 (%2,07)	Japonya	Yano M et al. 1999
181	10 (%6)	ABD	Chan PTK et al. 2000
29	2 (%6,9)	Avustralya	Cram DS et al. 2000
331	6 (%1,8)	Danimarka	Krausz C et al. 2000
402	8 (%2,2)	Belçika	Van Landuyt L et al. 2000
163	9 (%5,5)	Fransa	Le Bourhis C et al. 2000
94	11 (%11,7)	Tayvan	Lin YM et al. 2000
120	7 (%5,8)	İtalya	Moro E et al. 2000
192	4 (%2)	İsviçre	Osterlund et al
104	4 (%3,8)	Çin	Tse JYM et al. 2000

Girardi ve arkadaşları (1997, Amerika), infertil 160 erkeği sperm konsantrasyonlarına göre sınıflandırmışlar ve 35 STS kullanarak Y kromozom delesyonlarının varlığını araştırmışlardır. Sperm konsantrasyonu 0-1 milyon/ml olan grupta %10, azospermik grupta %7, sperm konsantrasyonu 1-5 milyon/ml olan grupta %8 olarak bulunmuştur. Orta oligospermik (5-20 milyon/ml) ve normospermik gruplarda delesyon görülmemiştir. AZFa bölgesinde delesyona rastlanmazken, AZFb ve AZFc bölgelerinde tanımlanmıştır. AZFc delesyonu olan oligospermik olguların zamanla sperm

sayıları azalmakta ve azospermiye kadar gidebilmektedir. Oligospermik erkeklerin, eşlerinin de fertilite yeteneği en iyi olduğu dönemde çocuk sahibi olabildiği ve bu şekilde babadan oğula doğal yoldan delesyonların geçebildiği öne sürülmektedir [82] .

Foresta ve arkadaşları (1998, Fransa), kontrol olarak 20 fertil bireyi ve bilateral idiopatik SCOS olan 18 olguyu, 30 STS kullanarak Y kromozom delesyonu yönünden incelemişler ve 10'nda delesyon bulmuşlardır (%55,5). Kontrol grupta delesyona rastlanmamıştır. İdiopatik SCOS olan olguların büyük bir bölümünün genetik kökenli olduğu ve Y kromozom delesyonları ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır [83].

Brandell ve arkadaşları (1998, Amerika) çalışmalarında, nonobstruktif azospermik olan 80 olguyu 35 STS kullanarak Y kromozom delesyonu yönünden incelemişler ve %9 oranında AZF delesyonu saptamışlardır. AZFc delesyonu taşıyanlarda TESE'den sperm elde ederken AZFb delesyonu taşıyan 7 olgunun 5'inden sperm elde edememişler, 2'sinden ise yuvarlak baş sperm (round spermatid) elde etmişler fakat fertilizasyon olmamıştır [84].

Olivia ve arkadaşları (1998, Amerika), ICSI yapılan 186 hastada (50 azospermik + 136 oligospermik) 12 STS kullanarak Y kromozom delesyonunu araştırmışlar ve %5,4 olarak bulmuşlardır. Azospermik grupta daha yüksek bulunan delesyonlar AZFc bölgesinde görülmüş, AZFa delesyonuna rastlanmamıştır [85].

Silber ve arkadaşları (1998, Amerika) tarafından, 51 azospermik ve 30 şiddetli oligospermik olgu Y kromozom delesyonu yönünden değerlendirilmiş ve ICSI'ye alınmıştır. 51 azospermik olgunun 10'nda (%20), 30 şiddetli oligospermik olgunun 4'ünde (%13) Y kromozomu AZFc bölgesi delesyonu bulunmuştur. İnterval 6D-6F arasında (AZFc) görülen delesyonlarda testis dokusunda sperm bulunurken, daha proksimal ya da distalde bulunan geniş delesyonlarda sperm bulunamadığı bildirilmiştir. Azospermik, oligospermik, Y delesyonu olan ve olmayan gruplar arasında embriyo implantasyon oranı açısından anlamlı fark görülmemiştir [86].

Ferlin ve arkadaşları (1999, İtalya) tarafından, idiopatik ciddi hipospermatogenez (n:4), obstruktif azospermik (n:10) ve SCOS'lu (n:10) olguların testiküler hücrelerinde DAZ, RBM ve SRY genlerinin ekspresyonu ölçülmüş; obstruktif azospermik olgularda DAZ, RBM ve SRY için normal mRNA mevcut iken SCOS'lu olguda sadece SRY transkriptlerinin olduğu görülmüştür. İdiyopatik ciddi hipospermatogenezi olan 10

hastanın 9'unda SRY, RBM ve DAZ ekspresyonu normal iken, birinde DAZ transkriptine rastlanmamıştır [87].

Ferlin ve arkadaşları (1999, İtalya) tarafından, idiopatik SCOS olan ve farklı derecelerde hipospermatogenezi olan 180 olgu (testiküler değişim nedeni bilinen 50 infertil olgu, 30 obstruktif azospermik ve 100 fertil erkek 38 STS kullanılarak Y kromozomu delesyonu yönünden karşılaştırılmış ve idiopatik ciddi testikülopatisi olan (SCOS) grupta (%34,5), idiopatik ciddi hipospermatogenezi bulunan gruptan (%24,7) daha yüksek bulunmuştur. Testikülopati nedeni bilinen grupta, obstruktif azospermik grup ve fertil kontrol gruplarda delesyona rastlanmamıştır. AZFc delesyon oranı ciddi hipospermatogenezi olan grupta SCOS'lu gruptan daha fazla bulunmuştur. Delesyon görülen tüm olgularda (n:40) AZFc delesyon oranı (%42,5) en sık rastlanan delesyon olarak tanımlanmıştır. Sadece bir olguda DFFRY (AZFa) delesyonuna rastlanmıştır. Y kromozom delesyonu olan 25 olgunun erkek kardeşleri ve babaları delesyon yönünden araştırılmış ve Y kromozom delesyonuna rastlanmamıştır [61] .

Foresto ve arkadaşları (2000, İtalya) tarafından, iyi tanımlanmış, etiyolojisi bilinmeyen azospermik ya da oligospermik 173 olgu (testiküler histolojik incelemesi SCOS ya da hipospermatogenez ile uyumludur) ve kontrol olarak 100 fertil erkek ile infertilite nedeni bilinen 80 erkeğin AZFa bölgeleri incelenmiştir. AZFa delesyonu nedeni bilinmeyen şiddeti oligospermik grupta %5,4, ciddi testikülopatilerde (SCOS) %9,7 saptanmıştır. Bir hastada USP9Y delesyonu, diğer 8 hastada DBY delesyonu bulunmuştur. AZFa bölgesindeki (USP9Y, DBY ve UTY) delesyonlar ciddi testiküler fenotip ve daima germ hücre yokluğu ile karakterizedir. DBY geninin AZFa bölgesi için majör belirleyici gen olduğu sonucuna varılmıştır. X kromozomu üzerinde homoloğu olan DBY proteininin hem ''housekeeping'' bir özellik taşıdığı hem de spermatogenezde önemli olduğu belirtilmektedir [88].

Siffroi ve arkadaşları (2000, Fransa), çalışmalarında hem periferik kandan hem de germ hücrelerdeki 45XO hücre populasyonu ile Y kromozom mikrodelesyonları arasındaki korelasyonu araştırmışlar ve pozitif korelasyon bulmuşlardır [89].

Martinez ve arkadaşları (2000, İspanya), 128 infertil erkekte (57 non-obstruktif azospermik +71 şiddetli oligospermik) 6 STS kullanarak Y kromozom delesyon oranını araştırmışlar ve %7 olarak bulmuşlardır. Azospermik grupta daha fazla delesyona rastlanmıştır (%14). Delesyon bulunan 9 olgunun 4'nde AZFc, 4'ünde AZFb+c, 1'nde

AZFb delesyonu görülmüştür. AZFb delesyonunda spermatojenik arrest, 6 olguda SCOS, 1 olguda matür spermatozoa+ sertoli hücresi görülmüştür [90].

Van Golde ve arkadaşları (2001, Hollanda) tarafından Y kromozomu (AZFc bölgesi) delesyonu taşıyan ve taşımayan olguların mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon oranı, embriyo kalitesi, implantasyon ve eve giden bebek oranı karşılaştırılmış ve Y kromozomu delesyonu taşıyan olgularda bu parametreler anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur [91].

Lian Liow ve arkadaşları (2001, Singapur), DAZ delesyonu olan erkeklerde her zaman azospermi olmadığı, DAZ bölgesinde bulunan tekrar dizileri olan genlerin tamamı ya da bir kısmı delesyona uğramışsa ona göre sperm üretiminin ya çok az ya da hiç olmadığı sonucuna varmışlardır [58].

Kamp ve arkadaşları (2002, Almanya), SCOS grupta AZFa delesyon oranını %9 oranında bulmuşlardır. AZFa delesyonunun tek başına SCOS'u tanımlayamayacağını fakat AZFa bölgesini tanımlayan DFFRY/USP9Y ve DBY geninin her ikisi de yoksa SCOS olma ihtimalinin yüksek olabileceği sonucuna varmışlardır [92].

Gogolevsky ve arkadaşları (2002, Moskova) 192 non-idiopatik infertil erkekte Y kromozom delesyon oranını 10 STS kullanarak incelemişler ve 68 non-obstruktif Azospermik olguda %16,2, 104 ciddi oligospermik olguda %6,7 olarak saptamışlar, 20 motilite ve morfolojisisi bozuk olguda ise delesyona rastlanmamıştır. En fazla oranda (%94,4) AZFc bölgesi delesyonu, %29,4 oranında AZFb delesyonu, sadece bir olguda AZFa delesyonu görülmüştür [93].

Causio F ve arkadaşları (2002, İtalya) tarafından, Y kromozom delesyonu taşıyan 19 şiddetli oligospermik ve non-obstruktif azospermik olan hastaya ICSI işlemi uygulanmış ve bu yöntemle babaları ile aynı delesyonu taşıyan 3 erkek çocuk doğmuştur. Y delesyonu taşıyan erkeklerin babalarında (büyükbaba) bu delesyona rastlanmamıştır. AZFa ve AZFb delesyonu taşıyan olguların testis dokularından sperm elde edilememiştir [94].

Katargiri ve arkadaşları (2002, Amerika), 22 STS kullanarak toplam 52 olgunun 4'nde (%7,7) Y kromozom delesyonu saptamışlardır [95].

Ferras ve arkadaşları (2002, Portekiz), maturasyon arresti olan 60 olguda 24 STS kullanarak Y kromozom mikrodelesyonu araştırmışlar ve %42 oranında delesyon saptamışlardır. Bunlardan 11'i AZFc, 2'si AZFa, 5'i AZFa+b, 2'si AZFa+b+c olarak

tanımlanmıştır. Maturasyon arresti olan olgularda delesyon oranının yüksek olduğu ve AZFb delesyonunun büyük oranda tam maturasyon arrestine, AZFc delesyonunun ise kısmi maturasyon arrestine neden olduğunu belirtmişlerdir [96].

Carvalho ve arkadaşları (2002, Portekiz), 15 STS kullanarak 622 infertil, 114 fertil erkeği Y kromozom delesyonu yönünden değerlendirmişler ve fertil grupta delesyon görülmemiştir. Non-obstruktif azospermik grupta %16,9 (30/177), oligospermik grupta %6,5 (7/108) oranında delesyon saptanmıştır. Obstruktif azospermik (n:28), orta oligospermik (n:151) ve diğer spermiyogram anomalili (n:158) gruplarda delesyona rastlanmamıştır [97] .

Krausz ve arkadaşları (2002, İran), 46 olgunun (43 azospermik+3 kriptozoospermik) 5'nde (%10) Y kromozom delesyonu saptamışlar ve bunun tamamını komple AZFc delesyonu şeklinde tanımlamışlar, AZFa delesyonuna rastlamamışlardır [98].

Peterlin ve arkadaşları (2002, Slovenya), 226 infertil erkekte (92 azospermik +134 şiddetli oligospermik) 42 STS kullanarak Y kromozom delesyonuna bakmışlar ve 10 vakada (%3,9) Y delesyonu (+) bulmuşlardır. Bu olgulara ICSI işlemi uygulandığında fertilizasyon oranı embriyo kalitesi ve gebelik oranında fark görülmemiştir [99].

Ioulianos ve arkadaşları (2002, Kıbrıs), Kıbrıs-Rum populasyonundan olan 80 infertil erkek (32 azospermik+ 48 şiddetli oligospermik) ve 50 fertil erkekte Y kromozom delesyonlarını incelemişler ve sadece azospermik grupta 4 olguda delesyon saptamışlardır. Delesyonlar AZFb, AZFc ya da AZFbc bölgelerinde görülürken, AZFa bölgesi delesyonuna rastlanmamıştır [100].

Chiang ve arkadaşları (2003, Çin) tarafından, 334 infertil erkekte (218 azospermik, 116 şiddetli oligospermik) 10 STS kullanılarak Y kromozom delesyon oranına bakılmış %9 bulunmuştur. Azospermik grupta %8,3, oligospermik grupta %10,3 oranında Y kromozom delesyonu görülmüştür. Delesyon bölgeleri AZFb ve AZFc olarak tanımlanmıştır[101] .

Quilter ve arkadaşları (2003, Amerika) tarafından, toplam 103 olgu (40 azospermik, 27 ciddi oligospermik, 20 orta oligospermik ve 16 asthenazoozpermik) sitogenetik yönden araştırılmış ve 98'inde 12 STS kullanarak Y kromozom mikrodelesyonu çalışılmıştır. Kromozom anomalisi %9,7, Y kromozom mikrodelesyon oranı %3 olarak bulunmuştur [102].

Kunej ve arkadaşları (2003, Slovenya) 16 STS kullanarak kriptoorşidizm olan 71 hastanın 2'sinde (%2,8) Y kromozomu delesyonu bulmuşlar ve kriptoorşidizm ile Y kromozom delesyonu arasında ilişki bulunamamıştır [103].

Hops ve arkadaşları (2003, Amerika), AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerini 30 STS ile çalışmışlar ve AZF delesyonu taşıyan olguların genotip-fenotip değerlendirilmesini yapmışlardır. Semen analizi ve diagnostik TESE ile delesyona uğrayan AZF bölgeleri arasında korelasyon bulunmuştur. Y kromozomu delesyonu taşıyan 78 olguda, 3 AZFa, 11 AZFb, 42 AZFc, 16 AZFb+c ve 6 AZFa+b+c delesyonu saptanmıştır. Komple AZFa delesyonu görülen 7 olguya ve komple AZFb delesyonu taşıyan 23 olguya TESE yapılmış ve hiçbirinde sperm elde edilememiştir. Sonuç olarak AZFa ve AZFb bölgelerinin komple yokluğunda TESE ile sperm elde etme ihtimali çok düşük olmasına rağmen AZFc delesyonlarında sperm bulma ihtimalinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir [104] .

Thangaraj ve arkadaşları (2003, Hindistan), toplam 570 olguda (340 azospermik + 230 normal kontrol) 30 STS kullanarak Y kromozom delesyon oranını araştırmışlar ve 29 olguda (%8,5) delesyon saptamışlardır. En fazla AZFc (%82,5), takiben AZFb (%55,2) ve en az oranda AZFa (%24,1) bölgesinin delesyonları görülmüştür [105] .

Kuo ve arkadaşları (2003, Tayvan), çalışmalarında farklı histopatolojik özelliklere sahip (normal spermatogenez, hipospermatogenez, maturasyon arresti ve SCOS) 38 azospermik erkekte USP9Y, DBY, RBMY1 ve DAZ transkript düzeylerini karşılaştırmışlardır. Histopatolojik gruplar arasında USP9Y ve DBY miktarları arasında fark görülmez iken RBMY1 ve DAZ transkripsiyon miktarları spermatojenik bozukluk olan olgularda düşük bulunmuştur [106] .

Judith ve arkadaşları (2003, Hollanda), 5 infertil erkek kardeşi araştırmaya alımışlar ve AZFc bölgesinde delesyona rastlamamışlar fakat FISH (Fluorescence in situ hybridization) ve aile varyant sekans analizi ile tüm kardeşlerde 4 yerine 2 DAZ geni kopyası olduğunu görmüşlerdir. Beş kardeş normal X kromozomuna sahiptir ve mtDNA'larında mutasyon bulunamamıştır. Bu durum için birkaç olasılığın söz konusu olduğu belirtilmiştir [107] . Bunlar;

1- Bu kardeşlerin üç nesil öncesi incelense aynı DAZ geni sayısına rastlanacak mı? Belki de aynı DAZ genine sahiplerdi fakat bunu kompanse edebilen bir mekanizma mevcuttu. Ya da ekstra bir durum ile bu kardeşlerde DAZ gen sayısı düşmüş olabilir.

2- Tüm erkek kardeşlerde X kromozomundan kalıtsal bir geçişle anneden geçmiş olabilir.
3- Diğer bir ihtimal ise, Y kromozomu üzerindeki diğer çoklu kopyalı genlerin delesyonu sonucu infertiliteye neden olabileceğidir.

Telöken ve arkadaşları (2004, Brezilya), 48 infertil erkekte (23 azospermik+15 şiddetli oligospermik) AZFa, b ve c bölgeleri için 6 STS kullanmışlar ve %12,5 oranında Y delesyonu bulmuşlardır. Delesyon görülen olguların 5'i azospermik, 1'i şiddetli oligospermiktir. Delesyon bölgeleri 4'ünde AZFc, bir olguda AZFc+kısmi AZFb, bir olguda kısmi AZFa delesyonu görülmüştür[108] .

Ning-Hong ve arkadaşları (2005, Çin) tararafından, 143 infertil erkekte (61 idiopatik, 81 non-idiopatik) olgu 6 STS kullanılarak Y kromozom delesyonu yönünden değerlendirilmiş, idiopatik grupta %19,4, nonidiopatik grupta %11,1 olarak bulunmuştur. Her iki grupta da delesyon bölgeleri ve uzunlukları arasında fark görülmemiştir. Komple AZFa ve AZFb delesyonu görülen olguların germ hücre yokluğu (AZFa) ya da post-mayotik hücre gruplarının yokluğu (AZFb) ile sonuçlandığı ve bu nedenle TESE ile sperm elde etme şansının olmadığı belirtilmiştir [109].

Stouffs ve arkadaşları (2005, Belçika), 27 STS kullanılarak tanımlanan Y kromozomu delesyonu taşıyan 38 olgunun 27'si AZFc, 3'ü AZF b, 1'i AZFa, 5'i AZFb+c, 2'si AZFa+b+c olarak gruplandırmıştır. AZFa delesyonu olan olgular SCOS ile AZFb delesyonu olanlar ise maturasyon arresti ile uyumlu bulunmuştur. Sadece AZFc delesyonu olanlarda testislerde sperm bulunabilmiştir. AZFc bölge delesyonu olan 16 hastaya ICSI uygulanmış ve %22 gebelik elde edilmiştir. Cinsiyet ayrımına ve aneploidi taramasına yönelik preimplantasyon genetik tanı uygulanmış ve 8 çifte XX embriyo transfer edilmiş, diğer 5'i bu uygulamayı kabul etmemiştir [110] .

Krausz ve arkadaşlarının (2005, Fransa) yaptıkları çalışmada, 131 infertil erkeğin (46 idiyopatik, 85 nonidiyopatik) XY normal karyotip olmasına rağmen 19'unda AZF delesyonları gösterilmiştir. Nedeni bilinen infertil grupta %7 gibi yüksek bir oranda delesyon görülmesi dikkat çekici bulunmuştur. Delesyonlar AZFb ve AZFc bölgelerinde görülmüş ve AZFb'nin spermatosit aşamasında spermatojenik arrestten sorumlu olduğu (mayoz bölünme aşamasında), AZFc delesyonunun ise daha geniş bir fenotip gösterdiği,

delesyonun uzunluğu ya da lokalizasyonu ile fenotip arasında kesin bir kriter olmadığı belirtilmiştir [111] .

Medica ve arkadaşları (2005, Hırvatistan), 105 rastgele seçilmiş infertil hastada sadece bir olguda Y kromozomu delesyonu bulmuşlardır (%0,95)[112] .

Hellani ve arkadaşları (2006, Suudi Arabistan), idiopatik oligo- ya da azospermik toplam 257 olguda 19 STS kullanmışlar ve 8'nde Y kromozom delesyonu (%3,2) bulmuşlardır. Suudi Arabistan populasyonunda Y kromozom delesyon oranının düşük olduğu sonucuna varılmıştır [113] .

Tse ve arkadaşları (2000, Çin), 58 infertil erkekte (14 obstruktif azospermik + 44 non-obstruktif azospermik ya da şiddetli oligospermik) 6 STS kullanılarak Y kromozom delesyonu çalışmışlar ve 4 olguda sadece AZFc delesyonunu pozitif (%6,9) bulmuşlardır. AZFc delesyonu taşıyan bu 4 olgu non-obstruktif azospermik ya da şiddetli oligospermik gruptadır (%9,1)[114] .

Abdelmoula ve arkadaşları (2006, Tunus), 34 Tunuslu infertil erkekte (12 oligospermik ve 18 azospermik), DAZ (AZFc) bölgesi delesyonunu araştırmışlar ve %8,8 oranında DAZ delesyonu bulmuşlardır [115].

Diğer bir çalışmada, Hadj-Kacem ve arkadaşları (2006, Tunus), 65 normospermik, 53 oligospermik, ve 45 azospermik kişide 6 adet STS kullanarak Y kromozom delesyon oranlarına bakmışlar ve %16 bulmuşlardır. AZFc delesyonu %55 oranında görülürken 3 olguda AZFa+b+c delesyonu görülmüştür. Kontrol grubunda delesyon görülmemiştir [116].

Ferlin ve arkadaşları (2006, İtalya) tarafından, 1996-2005 yılları arası 3073 infertil erkek (625 nonobstruktif azospermik+1372 şiddetli oligospermik) Y kromozomu yönünden incelenmiş ve 99'unda delesyon saptanmıştır. 99 olgunun sadece 2'sinde sperm sayısı 2 milyon/ml'den fazladır. Seçilmemiş infertil grupta delesyon oranı %3,2 iken, nonobstruktif azospermiklerde %8,3, şiddetli oligospermik olgularda %5,5 olarak bulunmuştur. En fazla oranda AZFc delesyonu saptanmış ve bu olguların %72'sinde sperm bulunduğu belirtilmiştir. Komple AZFa ve AZFb delesyonlarının SCOS ve maturasyon arresti ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır[117] .

Fernando ve arkadaşları (2006, Srilanka, Almanya), 96 infertil erkekte (78'i nonobstruktif azospermik) ve 87 kontrol grubunda AZF delesyonlarını incelemişler ve Alman populasyonu ile karşılaştırmışlardır. Kontrol grupta delesyon görülmez iken

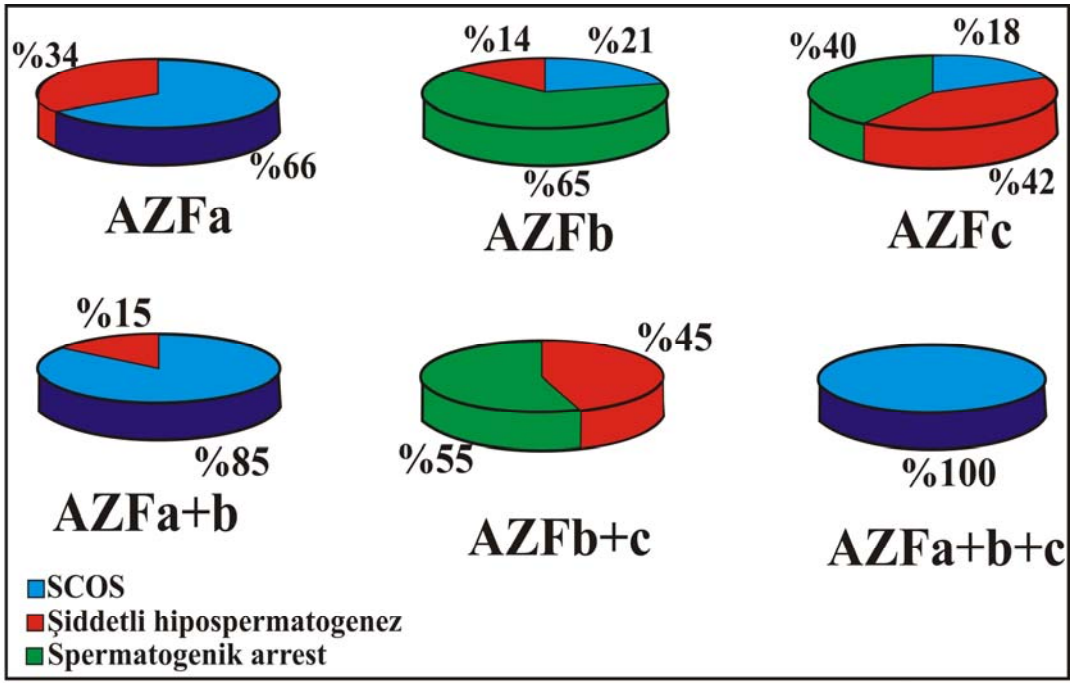
infertil grupta 7 olguda delesyon saptanmıştır (1'AZFa, 2'si AZFc, 2'si AZFbc ve 2 'si AZFabc). İnfertil grupta sadece bir olguda b2/b3 delesyonu görülürken, gr/gr delesyonu hem infertil hem kontrol grupta görülmüştür. gr/gr bölgesinin infertilite ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır. gr/gr ve b2/b3 bölgeleri AZFc bölgesinin proksimal yarısında yer alan küçük gen bölgeleridir. Srilanka ve Alman populasyonunda Y kromozom delesyon oranı yönünden fark görülmemiştir [118].

Devan ve arkadaşları (2006,Amerika), tekrarlayan düşükler ile proksimal AZFc delesyonu arasındaki ilişkiyi incelemişler ve tekrarlayan düşüklerde delesyon oranının oldukça yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun için; 17 tekrarlayan gebelik kaybı olan çift, 18 normal sağlıklı doğum yapan ve ailede düşük öyküsü olmayan çift ve 10 erkek faktörü olan infertil çift çalışmaya alınmıştır. Tekrarlayan gebelik kaybı olan 17 olgunun 14'nde (%82) Y kromozomu proksimal AZFc bölgelerinde delesyon saptanırken canlı doğumu olan grupta delesyon görülmemiştir. Erkek faktörü olan 10 olgunun 2'sinde proksimal AZFc delesyonu bulunmuştur [119].

Imken ve arkadaşları (2007, Fas), 149 infertil ve 76 fertil kontrol grupta Y kromozom delesyonunu incelemişler ve 48 azospermik olgunun 4'nde Y kromozom delesyonu saptamışlardır (%3,15). Delesyon bölgeleri 2 olguda AZFc, 2 olguda AZFb+c şeklindedir.Bu çalışmada da AZF'nin kısmi delesyonu (gr/gr) hem infertil hem kontrol grubunda görüldüğü için infertilite ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir [120.]

Gözden geçirilen literatürlerde Y kromozom delesyon oranlarının geniş bir aralıkta dağılım göstermesinin nedenleri şu şekilde özetlenebilir;

1- Seçilen hasta gruplarının farklı sayıda ve özellikte olması. Bazı çalışmalarda gruplar sadece spermiyogram özelliklerine göre rastgele seçilmiş iken bazılarında infertilite nedenlerine, testiküler histopatolojilerine (SCOS, maturasyon arresti, spermatojenik defek vs) fizik muayenelerine gibi parametreler de göz önüne alınarak seçim yapılmıştır. Örneğin infertilite nedenlerine göre gruplandırıldığında infertilite nedeni bilinmeyen idiopatik azospermik olgularda ve nonobstruktif azospermik gruplarda delesyon oranı daha yüksek bulunmuştur. Azospermik gruplarda şiddetli oligospermik gruplara göre daha yüksek delesyon oranı saptanmıştır. Şekil 37'de olguların histopatolojilerine göre delesyon dağılım oranları verilmiştir. Seçilen gruplardaki olgu sayısı da çalışmalarda önemli farklılıklar göstermektedir.



Şekil 37. AZF delesyonlarının testiküler histopatolojilerine göre dağılımı [121]

2- Çalışmalarda Y kromozomu mikrodelesyonlarının tayini için seçilen STS'lerin sayısının çok farklı olduğu görülmektedir. Y kromozomu haritası yapıldıktan sonra 300'den fazla STS üretilmiştir. Az STS kullanımın delesyon bölgelerini tanımada yetersiz olabileceği, fazla STS kullanımının ise polimorfik bölgeleri delesyon gibi tanımlayabileceği için yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği bildirilmiştir. Kontrol grubuna alınan 2295 olgudan sadece 12'sinde DAZ bölgesi dışında küçük delesyonlar saptanmış ve bunların nadir polimorfik varyantlar olabileceği bildirilmiştir [122]. Bu nedenle Avrupa Androloji Akademisi ve Avrupa Moleküler Genetik Kalite Kontrol Ağı, laboratuvarlar arasındaki Y kromozomu delesyon oranlarındaki farklılığını ortadan kaldırmak için bir standardizasyon getirmiş ve AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerini tanımlayan 6 STS belirlemiştir [123]

3- Çalışılan grupların farklı etnik kökenden olması bir diğer nedendir. Y kromozomu etnik grupların kökeninin araştırılmasında başarı ile kullanılmaktadır. Değişik ülkelerde yapılan çalışmalar sonucunda belirtilen delesyon oranlarındaki farklılığın diğer parametrelerin yanında etnik kökenden de kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Örneğin AZFa delesyonu Amerika'da nadir görülürken, İtalya'da yüksek oranda görülmüştür.

Ayrıca, Simoni Manuela (2001, Almanya) tarafından, Avrupa Androloji Akademisi ve Avrupa Moleküler Genetik kalite kontrol ağı, laboratuvarlar arası ve laboratuvar içi kontrol amaçlı bir çalışma yapılmıştır. I.denemede 20, II. denemede 25, III. denemede 29 laboratuvara Y kromozom delesyon analizi için 6 DNA örneği verilmiştir. Laboratuvarlar arasında homojen olmayan metodlar uygulanmasına rağmen AZFb ve AZFc'deki delesyon sensitivitesi %97, yanlış (+)'lerden dolayı spesifite %91 bulunmuştur. AZFc bölgesinin spesifik tanısının kullanılan primer sayısından bağımsız olduğu gözlenmiştir. 2 yanlış pozitiften birisinin fazla miktarda primer kullanmaktan kaynaklandığı belirtilmektedir. AZFc bölgesi yaklaşık %3-5 oranında yanlış pozitif verebilmektedir. Eğer DAZ bölgesinde delesyon tanımlanmışsa yanlış olma ihtimalinin olmadığı belirtilmektedir. Kullanılan bazı primerler polimorfik olabilmekte ve yanlış sonuç verebilmektedir. Laboratuvarların bazılarında yaygın olarak kullanılan primerlerin kullanılmadığı görülmüştür. Sonuçta, AZFb ve AZFc bölgesi için yaklaşık %5'lik bir yanlış tanı koyma riski ortaya çıkmıştır [123].

Primer sayılarındaki bu farklılığı ortadan kaldırmak ve bu konuda tam bir standardizasyonun sağlanabilmesı için Avrupa Androloji Akademisi ve Avrupa Moleküler Genetik kalite kontrol ağı, AZFa, b ve c bölgesi için 6 adet STS'nin yeterli olacağını bildirmiştir. Bunlar: AZFa bölgesi için SY 84 ve SY86, AZFb bölgesi için SY127 ve SY134, AZFc bölgesi için ise SY254 ve SY255 'dir. Çalışmamızda kullandığımız primer setinde aynı STS'ler mevcuttur. Bundan sonraki yapılacak çalışmalarda sadece 6 STS kullanarak hassas bir çalışma yapılabileceği ve bu şekilde hem daha ekonomik hem de laboratuvarlar arasında doğan delesyon oranlarındaki farklılığın ortadan kaldırılması için önemli olduğu belirtilmektedir[124].

Çalışmalardaki delesyon oranlarındaki bu farklılıkların, etnik kökenden, kullanılan primer sayısı ve bölgesinin farklılığından, seçilen hasta grubunun etiyolojisinden vb. nedenlerden kaynaklandığı ve bunun için belli bir standardizasyonun gerekliliği ortaya konmuştur [125, 126,127].

5.1.2. Türkiye'de Yapılan Çalışmalar

Deniz Sevinç (2002, İstanbul), 34 infertil erkeği sperm morfolojisi ve Y kromozom mikrodelesyonları yönünden (18 STS kullanarak) incelemiş ve 5'inde (%14,7) AZF delesyonu bulmuştur. Delesyonlu 5 hastanın birinde AZF bölgesinin tamamının delesyona uğradığı, diğer 4'ünde ise AZFd bölgesinin bir kısmı ile AZFc bölgesinin tamamının delesyona uğradığı görülmüştür. Delesyon görülen olgularda şiddetli baş ve boyun anomalisi gözlenmiştir. 34 hastanın 12'sinde (%35) tüp bebek uygulaması sağlıklı doğumla sonuçlanmış ancak Y kromozom mikrodelesyon taşıyan olgularda doğum gerçekleşmemiştir [128].

Şamlı ve arkadaşları tarafından (2002, Afyon), AZFa, AZFc, RBM-I, sY153 ve Y6HP52 bölgeleri için toplam 5 adet STS kullanılarak toplam 60 olgu çalışılmıştır. 28 azospermik olgunun 5'nde (%18), 32 şiddetli oligospermik olgunun 7'sinde (%21) Y kromozom delesyonları saptamışlardır. AZFc delesyonu en fazla azospermiklerde tespit edilmesine rağmen AZFa+b+c ve AZFb+c delesyonları da tespit etmişlerdir. AZFa delesyonu azospermiklerde %25 oranında saptanırken oligospermiklerde hiç görülmemiştir. Histopatolojilerinde %80 oranında maturasyon arresti ve germ hücre aplazisi görüldüğü belirtilmektedir. FSH, LH ve total testosteron düzeyleri yönünden iki grup arasında fark görülmemiştir[129].

Arzu Vicdan (2002, Ankara) tarafından, 208 infertil ve 20 fertil erkek kromozom anomalisi ve Y kromozom mikrodelesyonları yönünden incelenmiştir. 24 adet STS kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 119 azospermik olgunun 17'sinde (%14,3), ve oligoastenoteratozoospermi olan 89 hastadan 2'sinde (%2,2) olmak üzere toplam 19 hastada (%9,1) Y kromozom mikrodelesyonu saptanmıştır. Azospermik olan 119 hastanın 5'inde (%4,2) ve oligoastenoteratospermik olan 89 hastanın 2'sinde (%2,2) olmak üzere toplam 7 olguda (%3,4) kromozom anomalisi saptanmıştır. Y kromozom delesyonu görülen 19 olgunun tamamında AZFc bölgesi delesyonu görülmüştür. Sadece bir olguda buna ilave olarak AZFb/c sınırında delesyon görülmüştür. Y kromozomu taşıyan olguların babaları da delesyon yönünden araştırılmış ve Y kromozom mikrodelesyonu taşımadıkları, oğullarda olan delesyonların *de novo* olarak geliştiği

belirtilmiştir. Y kromozomu delesyonu taşıyan olgularda fertilizasyon ve implantasyon oranında delesyon görülmeyenlere göre fark görülmemiştir [130].

Sargın ve arkadaşları (2003, Antalya), toplam 61 olgunun (48 azospermik + 13 oligospermik) karyotip analizini ve Y kromozom delesyonlarını çalışmışlar ve delesyon oranını %3,3 olarak bulmuşlardır. 6 adet STS kullanılmış ve delesyon bölgeleri AZFb ve AZFc olarak tanımlanmıştır. Karyotip analizinde 60 olgu 46 XY, bir olgu XX erkek olarak tanımlanmıştır [131].

Okutman-Emonts ve arkadaşları (2004, İzmir), ICSI işlemine alınacak 71 olguda 18 adet STS kullanarak Y kromozom delesyon oranını araştırmışlar ve %5,6 olarak bulmuşlardır. Toplam 4 delesyonlu vakanın bir tanesi sadece AZFb bölgesi delesyonu taşırken diğerlerinde daha geniş delesyon bölgeleri (AZFa+b+c+d) saptanmıştır [132].

Bozdoğan ve arkadaşları (2006, Zonguldak) AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerine ait 15 adet STS kullanarak varikoseli olan hastalarda Y kromozomu delesyonlarını çalışmışlardır. Üçü azospermik olmak üzere 18 infertil grubun (ortalama sperm sayıları 37,1 milyon/ ml) 4'ünde AZFa ve AZFb bölgesinde mikrodelesyonlar tespit edilmişken fertil grupta (n:14, ortalama sperm sayısı 75,8 milyon/ml) delesyon görülmemiştir. Bu çalışmada, özellikle post-operatif sperm sayısında artış olmayan varikoselli hastalarda infertiliteden Y kromozomu mikrodelesyonlarının sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir [133].

5.1.3. Çalışmanın Y Kromozomu Yönünden Değerlendirilmesi

Çalışmamızda**,** yaşları 23 ile 53 arasında olan 38 azospermik ve 25 şiddetli oligospermik olmak üzere toplam 63 infertil erkek yer almıştır. Azospermik gruptan 3 olguda, şiddetli oligospermik gruptan bir olguda Y kromozom mikrodelesyonu saptanmıştır. Bu çalışma için toplam 20 farklı primer kullanılmıştır. Toplam olguda Y Kromozom mikrodelesyon oranı %6,3'dür. Bu oran azospermik grupta %7,9 iken şiddetli oligospermik grupta %4 bulunmuştur.

Azospermik grupta yer alan 3 olgudan M.Ö. adlı hasta Adana'lı olup fizik muayenesinde testislerin normal olduğu belirtilmiştir. Y kromozomu delesyonu yönünden incelendiğinde, AZFb ve AZFc bölgelerinin tamamı ve proksimal c/d bölgesinin kısmi yokluğu mevcuttur. AZFb bölgesinde RBMY, CDY, XKRY ve SMCY

olmak üzere 5 gen tanımlanmıştır. AZFc bölgesinin yokluğunda ve kısmi AZFb delesyonu olan hastaların yaklaşık %50'sinde sperm elde edilirken komple AZFb bölgesinin delesyonunda matür sperm bulma şansı neredeyse yok kabul edilmektedir [11-15.57,61.] RBMY genlerinin ekspresyonu testise özeldir ve özellikle spermatogonyumlar ve spermatositlerde fazla miktardadır. RBMY genlerinin ürünü RNA'ya bağlanan proteinlerdir. Bu proteinlerin RNA paketlenmesinde, mRNA'nın sitoplazmaya geçişinde ve ''alternative splicing''de rol aldığı düşünülmektedir. AZFb bölgesi ve proksimal AZFc/d delesyonlarında maturasyon arresti görülmektedir. RBMY ve DAZ transkripsiyon oranı spermatojenik yetmezlik olan olgularda düşük bulunmuştur. AZFb bölgesi tam maturasyon arresti olan olgularda dominant olarak etkilenirken AZFc bölgesi delesyonları çoğunlukla kısmi maturasyon arresti olan olgularda görülmektedir [56,61,78,87,88,96].

AZFc bölgesi, azospermiden sorumlu DAZ gen grubunu, PRY, BPY2, TTY2, CDY ve RBM'nin kopyalarını içerir. AZFc delesyonu olan olgularda testis histopatolojisi, hipospermatogenezden maturasyon arresti ve SCOS'a kadar farklı özellik gösterirler. DAZ genlerinin ürünü olan DAZ proteinleri germ hücre epitelinde geç spermatid döneminde testise özgü mRNA'ların depolanması ve taşınmasında rol alır. Mutasyonları sonucu pakiten I safhasında mayotik arrest söz konusudur. Delesyonları sonucunda ise oligospermi ya da azospermi görülebilir [56,61,78,87,88,96,111].

AZFd bölgesi delesyonlarında sperm morfolojisi etkilenmektedir. Sperm sayısı normal olsa bile morfolojisi çok bozuk olmaktadır (teratozoospermi)[57] .

Azospermik grupta delesyon saptanan İ.Y. adındaki 20 yıllık infertilite tanısı ile gelen ikinci olgu Diyarbakır'lıdır. Fizik muayenesinde testislerin normal olduğu belirtilmiştir. Y kromozomu delesyon tayininde, sadece bir bölgesi hariç (DYS221) AZFb bölgesinin yokluğu, komple AZFc bölgesi yokluğu ile birlikte komple proksimal AZFc/d yokluğu olarak tanımlanmıştır. Bu veriler azospermiyi doğrulamaktadır.

Azospermik gruptaki 11 yıllık infertil, Siverek doğumlu S.M. adındaki 3. olgunun fizik muayenesinde de testislerin normal olduğu belirtilmiştir. Y kromozom delesyon tayini sonucunda, AZFc bölgesinin tamamı ve proksimal AZFc/d bölgesinin kısmi yokluğu tanımlanmıştır. İlginç olarak, aynı bölgelerin delesyonu şiddetli oligospermik gruptan olan bir olguda (4. olgu) da görülmüştür.

Şiddetli oligospermik gruptaki, 4. olgu 2 yıllık infertil, Tarsus doğumludur. M.K.R adlı hastanın fizik muayenesinde testislerin normal olduğu bildirilmiştir. Y kromozom delesyon tayini sonucunda, AZFc bölgesinin tamamı ve proksimal AZFc/d bölgesinin kısmi yokluğu tanımlanmıştır. 2005 yılında yapılan spermiyogramlar sonucunda "35-40 sahada bir 1 yerinde hareketli motil sperm" şeklinde olan spermiyogram sonucuna göre çift Mayıs 2006 yılında IVF protokolüne alınmıştır. Eşinden yumurta toplama işleminin gerçekleştiği gün erkeğin verdiği ejakulatta sperme rastlanmaması nedeniyle TESE işlemine alınmıştır. Daha önceden ejakulatta çok nadir de olsa sperm olduğu için TESE dokusundan rahatlıkla sperm bulacağımızı düşündük. Sağ ve sol testisten 8 parça testis dokusu alınmasına rağmen sperm bulunamadı ve ICSI işlemi gerçekleştirilemedi. Eşler, bu aşamaya gelene kadar maddi ve manevi çok büyük çabalar sarf etmişlerdi fakat sonunda büyük bir hayal kırıklığı yaşandı. Yapılan çalışmalarda komple AZFc bölge delesyonu taşıyan oligospermik erkeklerde sperm sayısının giderek azaldığı ve ileriki yıllarda azospermik olduğu bildirilmiştir[82]. Sperm sayısı <5 milyon /ml olan oligospermik olgularda Y kromozom mikrodelesyonunun incelenmesi ve eğer AZFc delesyonu pozitif ise mevcut spermin dondurulması işleminin gerçekleştirilmesi bu gibi durumların yaşanmaması için önem arz etmektedir.Bu şekilde, ilerleyen yıllarda çocuk sahibi olabilme şansları tamamen ortadan kalkmayacaktır.

Aynı bölgelerin delesyonu bir olguda azospermiye neden olurken diğer olguda şiddetli oligospermiye neden olmuştur. Bu durum, şiddetli oligospermik olguda spermatogenezi kompanse eden başka faktörlerin devreye girdiğini ancak yaş ilerledikçe bunun kaybolduğunu akla getirmektedir. AZFc bölgesinde birden fazla DAZ kopyalarının olması, ya da X kromozomu üzerinde bulunan DAZL homoloğunun fertilite üzerinde farklı cevapların oluşmasına yol açabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, bulduğumuz Y kromozom delesyon oranı ve delesyon bölgeleri ile çevre ülkelerinde çalışılan delesyon oranları arasında benzerlik ve farklılıkların olup olmadığı birkaç çalışma ile aşağıda özetlenmiştir:

İran'da yapılan bir çalışmada, 46 olgunun (43 azospermik+3 kriptoorşidizm) 5'inde (%3,9) delesyon saptanmıştır. 5 olgunun tamamı AZFc bölgesi delesyonlarını taşırken AZFa delesyonu görülmemiştir[98]. İran populasyonunda delesyon oranı bizim sonuçlarımızdan düşük olmasına rağmen delesyon bölgeleri yönünden benzerlik göstermektedir. Bizde de AZFa delesyonuna rastlanmamıştır.

Hellani ve arkadaşlarının Suudi Arabistan'da yaptıkları çalışmada delesyon oranını %3,9 bulmuşlardır[113]. Delesyon bölgeleri 6 olguda AZFc, 1 olguda AZFb, 1 olguda AZFa+b olarak gruplandırılmıştır[113]. Delesyon oranı yönünden bizim sonucumuzdan daha düşüktür.

Kıbrıs Rumları'nda yapılan bir çalışmada, 80 infertil olguda (32 azospermik +48 şiddetli oligospermik) Y kromozom delesyon oranı %5 olarak verilmiş ve delesyon bölgelerinin sadece AZFb ve AZFc'den oluştuğu belirtilmiştir[100] . Bizim çalışmamızda da AZFa delesyonu bulunmamıştır ve delesyon oranı (%6,3) ve delesyon bölgeleri (AZFb ve AZFc) yönünden Kıbrıs'lılarla benzerlik göstermektedir.

Slovenya'da yapılan iki ayrı çalışmada delesyon oranları %2,8 ve %3,9 olarak bulunmuştur [103.] Bizim çalışmadaki Y kromozom delesyon oranının altındadır.
Hırvatistan'da yapılan diğer bir çalışmada rastgele seçilen 105 infertil hastanın sadece birinde Y kromozom delesyonu saptamışlardır (%0,95)[112]. Delesyon oranı bizim çalışmamıza göre oldukça düşüktür.

Hindistanda yapılan çalışmada %8,5 olarak tespit edilen Y koromozom delesyon oranı en fazla oranda AZFc, daha az olarak AZFb ve en az AZFa delesyonuna rastlanmıştır [105]. Delesyon oranı ve bölgeleri yönünden yönünden çalışmamız ile benzerlik göstermektedir.

Tunus'ta yapılan diğer bir çalışmada delesyon oranını %8,8 bulurken diğer bir çalışmada %16 olarak bulunmuştur [115,116].

Dünya literatürleri tarandığında farklı delesyon oranları karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda bu araştırmaların derlenmesi ile genel ortalamanın yaklaşık %8 olduğu görülmekte ve bizim çalışmamızdaki bulduğumuz delesyon oranı ile örtüşmektedir. Etnik varyasyonun araştırılmasında, daha standardize edilmiş bir yöntemin (STS sayıları ve bölgeleri aynı) ve standardize bir olgu grubunun (sayı ve infertilite etiyolojisi yönünden benzer) seçilmesinin daha aydınlatıcı olabileceği düşünülmektedir.

Türkiye'de ve komşu ülkelerdeki çalışmalara baktığımızda delesyon bölgelerinin batı ve doğu arasında farklı olduğunu görmekteyiz. Bizim çalışmamızda da olduğu gibi Türkiyenin Güneyi ve Güney doğusunda AZFa delesyonuna rastlanmazken batıda (İzmir, İstanbul ve Afyon) AZFa delesyonları görülmekte ve Avrupa'daki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Batıdan güneye doğru geldikçe (Ankara, Antalya, Adana),

AZFb ve AZFc delesyonları görülmekte ve bu yönü ile Orta Doğuda'ki ülkeler ile benzerlik göstermektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, Y kromozomu mikrodelesyonlarının *de novo* olmasına karşın yardımcı üreme teknikleri ile babadan oğula geçebildiği belirlenmiştir. Nonobstruktif azospermik ve şiddetli oligospermik olgularda yardımcı üreme tekniklerine başvurmadan önce Y kromozom delesyon analizi yaptırmaları önerilmektedir. ICSI işlemi ile çocuk sahibi olmak isteyen Y kromozomu delesyonu taşıyan çiftlere preimplantasyon genetik tanı yapılarak ailenin aydınlatılması önem kazanmaktadır.

Tekrarlayan IVF başarısızlığında Y kromozomu delesyon tayininin yol gösterici olacağı açıktır. Delesyon taşıyan olgularda fertilizasyon ve gebelik oranlarının düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca fertil bireylerde nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarında Y kromozomu delesyonunun rol alabileceği düşünülmelidir.

Azospermik erkeklerde Y mikrodelesyon analizi TESE sonucu sperm bulunabilmesi olasılığını belirlemede önemlidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda genotip/fenotip özellikleri arasında çok kesin kriterler olmasa da Y kromozomu delesyon tarama çalışmalarına bakıldığında fenotipik özellikler konusunda oldukça anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. AZFa ve AZFb delesyonlarının SCOS ile uyumlu olduğu ve komple AZFa ve AZFb delesyonu taşıyan olguların testis dokularından sperm elde edilemeyeceği belirtilmiştir. Kısmi AZFb delesyonu taşıyan olgularda nadiren sperm bulunabileceği, AZFc delesyonu taşıyan olgularda ise sperm bulma oranının daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Üremeye yardımcı tedavi merkezlerinde azospermik çiftlere ICSI işlemi için hazırlık birkaç değişik şekilde yapılmaktadır. Bunlar;

a) Azospermik olan erkeğe tanıya yönelik TESE işlemi uygulanır ve doku patolojik incelemeye alınarak spermatojenik hücre var mı bakılır. Varsa matürasyon evrelerinin hangi aşamasında olduğu tespit edilir. SCOS ise hasta hiç ICSI tedavisine başlamaz. Her yapılan TESE işlemi ile bir miktar doku kaybı olduğu ve testislerde fibrötik dokunun oluşması nedeniyle günümüzde bu işlemin ürolog ve kadın doğum arasında bir koordinasyonla IVF protokolü ile birlikte yürütülmesi daha anlamlı görülmektedir. TESE sonucu sperm çıkarsa ICSI yapılması, çıkmaz ise dokunun patolojiye gönderilmesi uygun görülmektedir.

b) Azospermik erkeğe, eşi tedavi protokolüne alınmadan önce TESE yapılarak sperm çıkıp çıkmadığına bakılır ve sperm çıkarsa doku daha sonra kullanılmak üzere dondurulur.

c) Azospermik erkek ve eşi IVF protokolüne alınır. Oosit aspirasyonu günü erkeğe de TESE işlemi uygulanır. Sperm çıkarsa ICSI yapılır, çıkmaz ise işleme son verilir. İşlem günü sperm çıkmama ihtimali konusunda eşler daha önceden bilgilendirilir. Fakat böyle bir olumsuzluk yaşamaları çiftlerin hem maddi hem manevi yıkımına neden olmaktadır. Hastalara uygulanan ve oldukça pahalı olan birden fazla oosit elde etmeye yönelik bu protokol hasta ve doktor açısından her yönüyle oldukça zahmetli bir süreçtir. Tamamı ithal olan bu ilaçların ve malzemelerin kullanımı ile de ülke ekonomisine fazladan bir külfet olmaktadır.

Nonobstruktif azospermik erkeklerde tüm bu işlemlerden önce farklı tanısal testlerle TESE'de sperm çıkıp çıkmayacağı konusunda daha kesin veriler elde edilebilirse, maddi ve manevi kayıpların en aza indirileceği düşünülmekte ve çalışmalar bu yönde yoğunlaşmaktadır. Diğer olasılıklar da göz önünde bulundurularak iyi seçilmiş azospermik-oligospermik olgu gruplarında Y kromozomu mikrodelesyonlarının tayini önem kazanmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerindeki genlerin delesyonu sonucunda histopatolojilerinde farklı fenotipik özellikler görülmektedir. Delesyon bölgelerine göre TESE'de beklenen tablo ile ilgili bilgi daha önceden hasta ile paylaşılarak ona göre yardımcı üreme tekniklerinde tedavi sürecinin devamına ya da kesilmesine karar verilebilmesi her yönü ile hastanın ve ülkenin yararına olacaktır.

Son yapılan çalışmalarda, testiküler kanser ile Y kromozom mikrodelesyonları arasında bir ilişki olabileceği ileri sürülmektedir. Y kromozomu taşıyan olgularda testiküler kanser olma ihtimalinin daha fazla olduğu belirtilmektedir. Y kromozomu delesyon tayininin testiküler kanserlerde erken tanı için de önemli olabileceği düşünülmektedir.

Bugüne kadar Y kromozomu mikrodelesyonlarının araştırmasına yönelik yapılan çalışmalara bakıldığında, erkek infertilitesinde rol alan genetik faktörler konusunda cevaplanması gereken birçok konunun olduğu dikkat çekmektedir. Y kromozomu üzerinde bulunan genlerinin tamamının fonksiyonlarına açıklık getirilebilirse spermatogenezde rol oynayan genetik süreç daha net ortaya konulabilecektir. Erkek

infertilitesinde rol alan genetik faktörlerin X kromozomu ile anneden kalıtım ile de etkilenebileceği, açıklık getirilmesi gereken diğer bir ilginç konudur.

Çalışmamız planlanırken hem kandan elde edilen lökosit DNA'larında hem de aynı kişinin sperminden, azospermik ise testis dokusundan elde edilen DNA'larda Y kromozom mikrodelesyonlarının incelenmesi amaçlanmıştı. Fakat etik kurulun sadece kanda çalışmaya izin vermesi nedeniyle çalışma bu yönde planlanmıştır. Aynı kişinin hem kanından hem de testis dokusundan ya da sperminden çalışılabilmesi ile Y kromozom delesyonlarının *de novo* mu yoksa genetik geçişle mi daha fazla olduğu sorusuna açıklık getirileceğini düşünmekteyiz. Bundan sonra bu yönde yapılabilecek bir çalışma ile bulguların daha ileri düzeyde yorumlanabilmesine olanak sağlayacağına inanmaktayız.

5.2. Olguların Hormonal Yönden Değerlendirilmesi

FSH ve LH gonadları uyaran glikoprotein yapıdaki hormonlardır. FSH, kadında folliküler büyümeyi erkekte ise spermatojenik epiteli uyarır. LH kadında ovulasyon için gerekliyken erkekte testiküler Leydig hücrelerinden androjen salgılanmasını uyarır. Hipofiz bezinden salgılanan FSH, testisteki sertoli hücrelerini uyararak öncü spermatojenik hücrelerden sperm oluşumunu sağlar. LH ise testislerdeki Leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasını uyararak sperm üretim döngüsünün devamlılığını sağlar [16, 19,22].

Çalışmada, kontrol grupta, azospermik grupta ve şiddetli oligospermik plazma FSH düzeyleri incelenmiş ve kontrol grubunda 3,54±1,51mIU/ml, azospermik grupta 14,92±13,72 mIU/ml, şiddetli oligospermik grupta 7,78±8,75 mIU/ml saptanmıştır. Azospermik grupta plazma FSH düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir (p:0.000). Bu da bize, testislerdeki Sertoli hücrelerinde FSH'a yeterli cevabın oluşmadığını göstermektedir. Bazı azospermik olguların testis muayenelerinde testis volümünün çok az olduğu, histopatolojik incelemelerinde ise FSH ve LH'a yanıt verebilecek sağlıklı testiküler dokuya rastlanamadığı, seminifer tübüllerden yoksun fibrötik yapının hakim olduğu gözlenmektedir.

Çalışmada kontrol, azospermik ve şiddetli oligospermik grupların plazma LH düzeyleri incelenmiş ve kontrol grupta 6,58±2,30 mIU/ml, azospermik grupta 17,15±11,06 mIU/ml, şiddetli oligospermik grupta 6,67±4,45 mIU/ml saptanmıştır. Gruplar karşılaştırıldığında azospermik grupta, kontrol grubuna göre LH düzeyinin

oldukça yüksek olduğu saptanmıştır (p: 0.000). Azospermik grup ile oligospermik grup karşılaştırıldığında ise azospermik grupta LH düzeyi anlamlı düzeyde yüksektir. Azospermik grupta, testislerdeki Leydig hücrelerinde LH'a karşı cevap oluşmadığı için geri bildirim ilmeği devre dışı kalmakta ve plazma LH düzeyi yükselmektedir.

Gonadotropin hormonları ile salınımı kontrol edilen testosteron, testisler tarafından üretilen ana hormon olup normal gelişim, erkek cinsiyet organları ve cinsiyet karakterlerinin gelişimi için oldukça önemlidir. Yetişkin erkeklerin yaşamı boyunca sperm üretimi, erektil potansiyel, prostat bezinin fonksiyonu ve diğer reprodüktif yapılar için esansiyeldir. Erkeklerde kan testosteron düzeyinin %95'i testislerdeki Leydig hücreleri tarafından sentezlenir. Daha düşük düzeylerde adrenal kortekste testosteron sentezi gerçekleşmektedir [16,18].

Çalışmada kontrol, azospermik ve şiddetli oligospermik grupların plazma testosteron düzeyleri incelenmiş ve kontrol grupta 3,51±0,98 ng/ml, azospermik grupta 2,72±2,92 ng/ml, şiddetli oligospermik grupta 3,06±0,94 ng/ml saptanmıştır. Her üç grup birbiri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu olgularda lokal olarak testosteron düzeyine (seminal sıvıda) bakılabilseydi plazma testosteron düzeyinden farklı sonuç elde edilebileceği düşünülmektedir. Testis dokusunun harabiyetine bağlı olarak sertoli ve Leydig hücrelerinin verdiği cevap farklı olacaktır. Leventerler H, tez çalışmasında normal sperm sayısına sahip grup ile konsantrasyon ve morfolojisi düşük, motilite normal (B grubu), konsantrasyon ve motilite normal, morfoloji düşük (C grubu), sadece motilite düşük (D grubu) ve azospermik (E grubu) grupları seminal sıvı testosteron düzeyleri yönünden karşılaştırmış ve B ve E gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük, C ve D gruplarında ise anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Ön hipofiz bezinden salgılanan prolaktin primer olarak laktasyonda görev almasının yanında hücre proliferasyonuna, seksüel yaşam ve fertilite üzerine de etkilidir. Artan düzeydeki prolaktinin en önemli etkisi normal düzeydeki seks hormonlarını (kadında estrojen, erkekte testosteron) baskılamasıdır. Bilindiği gibi yüksek plazma prolaktin düzeyi erkeklerde testosteron sentezini baskılayarak sperm oluşum mekanizmasınının bozulmasına neden olur [31].

Çalışmada kontrol, azospermik ve şiddetli oligospermik grupların plazma prolaktin düzeyleri incelenmiş ve kontrol grupta 7,49±2,21 ng/ml, azospermik grupta

12,54±5,54 ng/ml, şiddetli oligospermik grupta 12,82±11,68 ng/ml saptanmıştır. Her üç grup birbiri ile karşılaştırıldığında azospermik grupta kontrol grubuna göre plazma prolaktin düzeyi yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p: 0.000). Kontrol ile oligospermik, azospermik ile şiddetli oligospermik gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir. Şiddetli oligospermik grupta yer alan olguların prolaktin düzeyi geniş varyasyon gösterdiğinde SD aralığı çok büyük olarak saptanmıştır. Bu nedenle kontrol grubu ile arasında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır.

Adiposit kaynaklı bir hormon/sitokin olan leptin ilk olarak enerji dengesindeki önemi ile gündeme gelmiştir. Leptinin etki gösterdiği alanlar arasında obezite, hematopoez, anjiyogenez, büyüme ve gelişme, kemik gelişimi ve üreme sayılabilir. Birçok türde yapılan çalışmalarda leptinin, hipotalamus-hipofiz-gonadal aksisi etkilediği belirtilmiştir. Leptin ön hipofiz bezi üzerine direk etkilidir. LH hormonunu ve daha fazla oranda FSH'ın salınımını uyarır [33].

Çalışmada kontrol, azospermik ve şiddetli oligospermik grupların plazma leptin düzeyleri incelenmiş ve kontrol grupta 5,23±2,66 ng/ml, azospermik grupta 6,34±5,21 ng/ml, şiddetli oligospermik grupta 4,75±3,09 ng/ml saptanmıştır. Her üç grup birbiri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Hormon değerleri tek tek olgu düzeyinde incelendiğinde bize kişinin endokrin yönü ile ilgili önemli ipuçları vermektedir. Çalışmaya alınan olgular sadece azospermik ve oligospermik olmalarına göre sınıflandırılarak hormon düzeylerine bakılmış ve bu nedenle hormonal değerlerde geniş varyasyonlar gözlenmiştir. İnfertilite nedenlerine göre sınıflandırılan daha kesin olgularda (idiyopatik ya da nonidiyopatik infertilite, obstruktif ya da nonobstruktif azospermi, varikosel, hipoganadotropik hipogonadizm vs) ise hormonal değerlerin daha dar sınırlarda olacağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada, kontrol grubunun FSH, LH, testosteron, prolaktin ve leptin için ortalama değerleri hesaplanmış ve ±2 SD standart alınarak yöntemin çalışılan örnekler için referans aralığı belirlenmiştir. FSH için X ±2SD: 1,52-5,56 mIU/ml, LH için 2,0-11,20 mIU/ml, testosteron için 1,55-5,47 ng/ml, prolaktin için 3,07-11,91ng/ml, leptin için 0,09-10,55 ng/ml'dir.

Bu değerler esas alındığında azospermik grupta (n:38) ;

- 26 olguda FSH düzeyi yüksek, 1 olguda düşük,
- 26 olguda LH düzeyi yüksek, 1 olguda düşük,
- 5 olguda testosteron düzeyi düşük, 1 olguda yüksek,
- 18 olguda prolaktin düzeyi yüksek,
- 4 olguda leptin düzeyi yüksek bulunmuştur.

Şiddetli oligospermik grupta;

- 8 olguda FSH düzeyi yüksek, 1 olguda düşük,
- 4 olguda LH düzeyi yüksek,
- Testosteron düzeyleri normal sınırlar içinde,
-7 olguda prolaktin düzeyi yüksek,
-1 olguda leptin düzeyi yüksek bulunmuştur.

Plazma FSH ve LH düzeylerinin yüksek olması testislerdeki sertoli ve Leydig hücrelerinde FSH ve LH'a karşı bir cevapsızlığın söz konusu olduğunu göstermektedir. Yeterli cevap oluşmamakta (sperm üretimi ve testosteron sentezi) ve uyarıyı hipofize ileten geri bildirim mekanizması devre dışı kalmaktadır. 24 nolu olguda ise FSH ve LH düzeyi çok düşük (0,1 mIU/ml) bulunmasına rağmen testosteron düzeyi oldukça yüksek bulunmuştur (19,7 ng/ml). Bu olguda yüksek testosteron nedeniyle FSH ve LH baskılanmıştır.

5.2.1. Y Kromozomu Delesyonu Görülen Olguların Değerlendirilmesi

Delesyon görülen olgularda, olgu bazında hormonal değerlendirme yapıldığında 4 hastanın da FSH düzeyi çalışmanın referans üst sınırından yüksek bulunmuştur. Bir olguda (MÖ) normalden yüksek LH düzeyi (12,7 mIU/ml) saptanmıştır. Bir olguda (İY) ise referans aralığından çok yüksek prolaktin düzeyi (26,8 ng/ml) tespit edilmiştir. Yüksek FSH ve LH düzeyi testiküler harabiyetin, spermatojenik arrestin ve sonuçta hormonal cevabın bozulduğunun işareti olarak değerlendirilmiştir. Yüksek prolaktin düzeyi ise sperm oluşumunu ve seksüel fonksiyonu olumsuz etkilemektedir. Delesyon görülen iki olguda ise serum leptin düzeyi yüksek, bir olguda düşük bulunmuştur.

Her bir bireyin hormonal değerleri kendi içinde bağımsız olarak değerlendirildiğinde çok daha anlamlı sonuçlar verdiği ve kişinin hormonal cevabının daha iyi okunabildiği görülmektedir.

5.2.2. Hormonal Değerlendirme İçin Yapılan Çalışmalar

Foresto ve arkadaşları (1997), çalışmaya dahil ettkileri azospermik grupta testis volumleri düşük, LH ve testosteron düzeyleri normal, FSH değerlerinin yüksek ve histopatolojik bulgularının SCOS olduğunu görmüşlerdir [78].

Kremer ve arkadaşları (1997, Hollanda) tarafından, 34 normospermik, 19 azospermik ve 111 oligospermik toplam 164 olguda Y kromozom delesyonu %6,3 olarak bulunmuştur. FSH, LH, testosteron düzeylerine bakılmış ve delesyon (+) olan olgularda delesyon (-) olanlara göre daha düşük FSH düzeyi, oligospermik ve azospermik olgularda normospermik olgulara göre daha yüksek FSH düzeyi görülmüştür. LH ve testosteron konsantrasyonlarında her üç grupta da fark görülmemiştir [80].

Girardi ve arkadaşları (1997, Amerika), 160 olguyu sperm parametrelerine göre sınıflayarak Y kromozom delesyonu ve hormonal yönden değerlendirmişlerdir. Gruplar arasında hormonal bakımdan fark görülmemiştir [82].

Foresta ve arkadaşları (1998, Fransa), idiopatik SCOS olan 18 olgunun 8'inde Y kromozom delesyonu saptanışlar ve bu olgularda kontrol gruba göre yükselmiş FSH, normal LH ve testosteron düzeyi tespit etmişlerdir. İdiopatik azospermik olgularda yükselmiş FSH ve normal testosteron düzeyi şeklinde tanımlanan SCOS ile uyumlu bulunmuştur [83].

Ferlin ve arkadaşları (1999, İtalya) tarafından, SCOS ve ciddi hipospermatogenezi olan hastalarda plazma FSH düzeyi normal gruba göre düşük bulunurken LH ve testosteron düzeylerinde fark görülmemiştir [61].

Martinez ve arkadaşları (2000, İspanya), 128 infertil erkekte (57 non-obstruktif azospermik+71 şiddetli oligospermik) olguda Y kromozom delesyonu ile birlikte FSH ve LH düzeylerini de incelemişler; gruplar arasında ve Y kromozom delesyonu taşıyan ile taşımayan olgular arasında anlamlı fark görememişlerdir [90].

Maurer ve arkadaşlarının çalışmalarında (2001, Almanya), 1470 olgunun 19'nda Y kromozom delesyonu (%1,3) ve FSH, LH ve testosteron düzeyleri bakılmıştır.

Azospermik ve şiddetli oligospermik vakaların oluşturduğu 139 olguda yapılan çalışmada FSH düzeyleri yüksek bulunmuştur [135.]

Şamlı ve arkadaşları (2002, Türkiye), 28 azospermik olgunun 5'nde (%18), 32 şiddetli oligospermik olgunun 7'sinde (%21) Y kromozom delesyonları saptamışlar ve grupların serum FSH, LH ve testosteron düzeyleri karşılaştırıldığında iki grup arasında fark görülmemiştir [129].

Sargın ve arkadaşları (2003, Türkiye), toplam 61 olguda (48 azospermik + 13 oligospermik) Y kromozom delesyon oranını araştırmışlar ve %3,3 olarak bulmuşlardır. Grupların serum FSH, LH ve testosteron düzeyleri karşılaştırıldığında iki grup arasında fark görülmemiştir [131].

Chiang ve arkadaşları (2003, Çin), 218 azospermik, 116 oligospermik olmak üzere toplam 334 infertil hastada Y kromozom delesyon oranını %9 olarak bulmuşlardır. Bu gruplarda FSH, LH, testosteron ve prolaktin düzeylerine bakılmış ve FSH > 15 mIU/ml ve LH'ı >12 mIU/ml olan olgularda primer testiküler yetmezliğin olduğu belirtilmiştir. Delesyon görülen olgularda FSH düzeyi yüksek bulunmuştur [109]. Bu yönü ile bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir [101].

Ning-Hong ve arkadaşları (2005, Çin), Y kromozomu delesyonu görülen 21 olguda serum testosteron düzeyini normal bulurken, 12 olguda yüksek FSH düzeyi tespit etmişlerdir. Buna rağmen toplam gruplar karşılaştırıldığında delesyon olan ve olmayan gruplar arasında FSH düzeyinde anlamlı fark gözlenmemiştir [109].

Bozdoğan ve arkadaşları (2006, Türkiye) tarafından, 14 fertil, 18 infertil varikoseli olan grupta Y kromozomu ve FSH, LH, prolaktin, testosteron düzeylerine bakılmış ve gruplar arasında fark görülmemiştir [83].

Fernando ve arkadaşları (2006, Srilanka) 96 infertil erkekte (18 ciddi oligospermik+76 azospermik) 7 olguda Y kromozomu delesyonu (%7,3) tanımlamışlardır. Delesyon olan olguların tamamının testosteron düzeyleri normal sınırlarda iken 5 olguda FSH düzeyi yüksek bulunmuştur. Bir olguda serum FSH ve LH düzeyi yüksek, diğerlerinde LH düzeyi normaldir [118].

Vutyavanich ve arkadaşları (2007, Tayland) tarafından, 50 azospermik, 80 oligospermik olguda Y kromozom mikrodelesyonu %3,8 olarak bulunmuştur. Olguların serum FSH, LH, testosteron ve prolaktin düzeylerine bakılmış ve azospermik grupta oligospermik gruba göre yüksek FSH ve LH düzeyleri görülürken, prolaktin ve

testosteron değerlerinde fark görülmemiştir. Delesyon görülen ve görülmeyen gruplar arasında FSH, LH, testosteron ve prolaktin düzeylerinde anlamlı faklılık saptanmamıştır [134].

Olguların hormonal analizlerine bakıldığında değerlerin kişinin tüm hormon değerleri bir arada değerlendirilmesi ile daha anlamlı olduğu görülmüştür. İnfertilite nedenlerine göre çok kesin kriterlere dahil edilmeden rastgele seçilen gruplar olmasından dolayı hormon düzeyleri geniş dağılım göstermektedir. Anlamlı olarak yüksek bulunan plazma FSH ve LH düzeyinin SCOS ve matürasyon arresti olan olguların sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Yapılan çalışmalar sonucunda Y kromozomu mikrodelesyonlarının büyük çoğunluğunun *de novo* oluşmasına karşın yardımcı üreme teknikleri ile babadan oğula geçebildiği belirtilmiştir. Nonobstruktif azospermik ve şiddetli oligospermik olgularda yardımcı üreme tekniklerine başvurmadan önce Y kromozom delesyon analizi yaptırmaları önerilir. ICSI işlemi ile çocuk sahibi olmak isteyen delesyon taşıyan çiftlere preimplantasyon genetik tanı yapılması konusunda ailenin aydınlatılması önem kazanmaktadır.

2. Y kromozomu delesyonu taşıyan oligospermik erkeklerde sperm sayısının giderek azaldığı ve ileriki yıllarda azospermik olabildiği saptanmıştır. Bu olgularda ilerleyen yıllarda ICSI işlemi için önceden sperm dondurulması, sadece testis dokusunda sperm varsa doku dondurulması uygundur.

3. Tekrarlayan IVF başarısızlığında Y kromozomu delesyon tayininin yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

4. Fertil bireylerde nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarında Y kromozomu delesyonunun rol alabileceği göz önüne alınmalıdır.

5. Azospermik erkeklerde Y mikrodelesyon analizi, TESE sonucu sperm bulunabilmesi olasılığını belirlemede önemlidir. Komple AZFa ve AZFb delesyonu taşıyan olguların testis dokularında sperm elde edilemeyeceği belirtilmiştir. Kısmi AZFb delesyonu taşıyan olgularda nadiren sperm bulunabileceği, AZFc delesyonu taşıyan olgularda ise sperm bulma olasılığı düşünülerek çiftlerin IVF planlaması yapılmalıdır.

Nonobstruktif azospermik erkeklerde IVF'e alınmadan önce farklı tanısal testlerle TESE'de sperm çıkıp çıkmayacağı konusunda daha kesin veriler elde edilebilirse, maddi ve manevi kayıpların en aza indirileceği düşünülmekte ve çalışmalar bu yönde yoğunlaşmaktadır. Delesyon bölgelerine göre TESE'de beklenen tablo ile ilgili bilgi daha önceden hasta ile paylaşılarak ona göre yardımcı

üreme tekniklerinde tedavi sürecinin devamına ya da kesilmesine karar verilebilmesi her yönü ile hastanın ve ülkenin yararına olacaktır.

7. Son yapılan çalışmalarda, testiküler kanser ile Y kromozom mikrodelesyonları arasında bir ilişki olabileceği ileri sürülmektedir. Delesyon taşıyan olgularda testiküler kanser olma ihtimalinin daha fazla olduğu belirtilmektedir. Y kromozomu delesyon tayininin, testiküler kanserlerde erken tanı için önemli olabileceği düşünülmektedir.

8. Bugüne kadar Y kromozomu mikrodelesyonlarının araştırmasına yönelik yapılan çalışmalara bakıldığında, erkek infertilitesinde rol alan genetik faktörler konusunda cevaplanması gereken birçok konunun olduğu görülmektedir. Y kromozomu üzerinde bulunan genlerinin tamamının fonksiyonlarına açıklık getirilebilirse spermatogenezde rol oynayan genetik süreç daha net ortaya konulabilecektir. Erkek infertilitesinde rol alan genetik faktörlerin X kromozomu ile anneden kalıtım ile de etkilenebileceği, açıklık getirilmesi gereken diğer bir ilginç konudur.

9. Y kromozom delesyonları aynı olgunun hem kan lökositlerinde hem de sperminde çalışılabilirse etiyolojiye yönelik daha aydınlatıcı bilgilere ulaşılacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Işık AZ, Vicdan K.** İn Vitro Fertilizasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Çağdaş Medikal, Ankara, **1999.**

2. Erkek infertilitesi.
Erişim:http://www.kadinhastaliklarivedogum.com/infertilite/erkek_faktor.asp
Erişim tarihi: 2007

3. **Cemal H, Karatekelioğlu E, Attar E.** Erkek fertilitesini etkileyen beslenme, çevresel faktörler ve diğer nedenler (electronic journal). Erişim: www.androloloji. org.tr. Erişim tarihi: 2006

4. **Çetinkaya M, Özkara H.** Y kromozom mikrodelesyonu ve TESE. Erişim: http://www.androloji.org.tr**.** Erişim tarihi: 2007

5. **Leventerler H, Dikmen N:** Y Kromozomu, *Ç.Ü.Arşiv Dergisi,* **2002**;11:3, 321-334.

6. **Sher A, Hasnain SE.** Molecular dissection of the human Y-chromosome*. Gene,* **2002***; 283:1-10*

7. **Ronfani L, Bianchi ME.** Moleculer mechanism in male determination and germ cell differentiation. *CMLS, Cell Mol. Life Sci*, **2004;** 61:1907-1925.

8. **Marshall Graves JA.** Human Y chromosome, sex determination and spermatogenesis. A feminist view. *Biol Reprod*, **2000**;63: 667-676

9. **Tanaka H, Baba T.** Gene expression in spermiogenesis. *CMLSS, Cell Mol Life Sci*.62: **2005**; 344-354.

10. **Lahn BT , Page D.** Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*, **1997;**278:675-679

11. **Foresta C, Moro E, Ferlin A.** Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. (electronic jounal) *Endocrine Reviews* 22(2):226-239. Erişim: http:// Edrv.endojournals.org. Erişim tarihi: **2005**

12. **Cooke J H.** Y Chromosome and male infertility. *Reviews of Reproduction***. 1999**; 4:5- 10.

13. **Affara NA.** The role of the Y chromosome in male infertility. *Exp reviews in moleculer medicine*. (electronic journal). Erişim: www.ermm.cbcu.cam.ac.uk. Erişim tarihi: .2007.

14. **Ali S, Hasnain SE.** Genomics of the human Y-chromosome 1.Association with male infertility. *Gene***, 2003**;321:25-37.

15. **Krausz C and McEreavey.** Y chromosome and male infertility. *Frontiers in Biosciences*, e1-8, january **1999.**

16. **Seibel MM.** İnfertility. Appleton ve Lange. Amerika, **1989.**

17. **Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Verveld M, Zeilmaker GH.** İvf Lab-Laboratory aspects of in vitro fertilization. N.V. Organon , **1996.**

18. **Revelli A, Tur Kasoa I, Holte JG, Massobrio M.** Biotechnology of Human Reproduction. Parthenon Publishing., **2003.**

19. **Delilbaşı L.** İn vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri. Öncü Basımevi, Ankara, **2007.**

20. Infertility-causes of male infertility.
Erişim: http://infertility.about.com/od/malefactors/a/maleinfertility.htm.
Erişim tarihi: 2007.

21. Causes of male infertility. Erişim: www.urologychannel.com/maleinfertility/causes
Erişim tarihi: 2007.

22. **Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B.** Gametler (sperm/oosit) fertilizasyon ve embriyoner gelişim. Serano yayınları. **2000-01.**

23. Uyar Aytül. Üreme fizyolojisi. Seminer sunusu. Erişim tarihi: 2007.

24. World Health Organization . WHO Laboratory manuel for the examination of human semen and cervikal mucus interaction. **1992**; 3rd Edt. Cambridge University Pres, Cambridge.

25. Makler Counting Chamber. Erişim: www.videotest.ru/en/hardware/makler.htm.
Erişim tarihi:2007

26. Sperm morfolojisi. Erişim: www. dilipraje.com/male infertility/htm. Erişim tarihi: 2007.

27. Spermatogenez, erkekte sperm üretimi. Erişim: www.androloji.info/azoospermi.
Erişim tarihi: 2006.

28. Erişim: http://humangenetik.uniklinik-freiburg.de/zg/261,11,Slayt 11

29. Prolactin. Erişim: http://edrv.endojournals.org/cgi/content/full/19/3/225/F2.
Erişim tarihi: 2007.

30. Prolactin hormone receptor. Erişim. www.biolreprod.org.edrv.endojournals.org.
Erişim tarihi: 2006

31. Prolactin hormone. Erişim: http://en.wikipedia.org/wiki/Prolactin.
Erişim tarihi: 2007.

32. **Prolo P, Wong M, Licinio J**. Molecules in focus leptin. *Int J Biochem Cell Biol*, **1998;** 30: 1285-1290.

33. **Hekimoğlu A.** Leptin ve fizyolojik olaylardaki rolü. *Dicle Tıp Dergisi*. **2006**; 33(4): 259-267.

34. Molecular structure of Leptin. Erişim: www. biochem.org.arizona.edu. Erişim tarihi: 2007.

35. Erişim.http:/www.sigmaaldrich.com/img/assest/21001/leptin-receptor.signaling.jpg. Erişim:2007

36. **Caprio M, Fabrini E, Isidori AM, Aversa A and Fabbri A.** Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol. Metab*, **2001**; 12(2): 65-72.

37. **Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS**. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril*, **2002;** 77(3): 433-444.

38. **Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB and Buchanan CD**. Leptin and reproduction. *Steroids*, **2002**; 67: 95-104.

39. **Murray KR, Granner DK, Mayes PE, Rodwell V. W.** Harper's Biochemistry. 25th. Ed. Appleton &Lange publications, **2000:** 594-609.

40. Testosterone. Erişim: http://en.wikipedia.org/wiki/Testosterone. Erişim tarihi: 7.06.2007.

41 Erişim:www.istanbul.edu/.../Doc_Dr_Aytul_UYAR/Ureme_Fizyolojisi_dersleri_2005_Aytul_Uyar.ppt. Erişim tarihi: 2007.

42. X and Y chromosome. Erişim: www.ncfs.org/bio.evd.html. Erişim tarihi: 2007

43. **Tozar Z**. Y kromozomuyla geçmişin izinde.
Erişim. http/:/biyolojiegitim.yyu.rdu.tr/mk/yk/yk.htm. Erişim tarihi: 2007.

44. **Murci-Quintana L, Krausz C, McElreavey K.** The human y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Sci.Int.* **2001;**118:169-181

45. **Delbridge ML, Marshall Graves JA.** Mammalian Y chromosome evolution and the male-spesific functions of Y chromosome-borne genes. *Reviews of Reproduction,* **1999**;4:101-109.

46. Erişim: www. b12partners.net/mt/images/haplogroups.jpg. Erişim tarihi:2007.

47. **Jobling MA, Tyler-Smith.** The human Y chromosome: An evolutıonary marker comes of age. (Electronic journal). Erişim: www.nature.com/reviews/genetics. August **2003**. vol:4.

48. **Nasidze I, Quinque D, Öztürk M, Bendukidze, Stoneking M.** MtDNA and Y-chromosome Variation in Kurdish Groups. *Ann Hum Genet*, **2005**;69:401-412.

49. **Cinnioğlu C, King R, Kivisild T, Kalfaoğlu, E, Atasoy S, Cavalleri GL, , Lillie AS, Roseman CC, Lin AA, Prince K, Oefner PJ, Shen P, Semino O, LLC Sforza, Underhill PA.** Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolie. *Hum Genet,* **2004**;114: 127-148

50. Erişim: www.bioscience.org. Erişim tarihi: 10.08.2007.

51. **Disteche CM.** Y chromosome infertility. (Electronic journal) Erişim: www. genclinics.org. Erişim tarihi: 31.07**.2007.**

52. Human sex determination and differentiation. Erişim:http://www.answers.com/topic/sex-determination-and-differentiation. Erişim tarihi:2007

53. **Clarkson MJ, Harley VR.** Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development. Review. *Trends Endoc Metab.* **2002;** 13(3):106-111.

54. **Krausz K, Forti G, McElreavey.** The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl,* **2003;** 26: 670-75.

55. **Reijo R, LeeT-Y, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, Chapella A, Silber S, Page DC.** Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet*, **1995**;10: 383-393

56. **Vogt PH, Edelman A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farrah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidi G.** Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet,* **1996**;5 (7): 933-949.

57. **Kent-First M, Muallem a, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, Meısner L, Chadley A, Gouchy G, Jorgensen L, Havıghurst T, J. Grosch.** Defining regions of the Y-Chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF Region (AZFd) by Y-chromosome microdelection detection. *Mol Reprod Develop***, 1999;**53:27-41

58. **Liow SL, Yong EL, Chye Ng S.** Prognostic value of Y deletion analysis. *Hum Reprod*, **2001;** 16(1): 9-12.

59. **Fox MS, Pera RAR.** Male infertility, genetic analysis of DAZ genes on human Y chromosome and genetic analysis of DNA repair.*Mol Cell Endocrinol,***2001;** 184:41-49.

60. **Ditton HJ, J Zimmer, C Kamp, E Rajpert-De Meyts, PH Vogt.** The AZFa gene DBY(DDX3Y) is wiedly transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Hum Mol Gen.* **2004**;13(19);2333-2341

61. **Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C.** Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod*, **1999;** 14(7): 1710-1716.

62. **Kostiner DR, Turek PJ, Rejio RA.** Male infertility: analysis of the markers and genes on human Y chromosome. *Hum Reprod* **1998**;13(11);3032-3038.

63. **Zamani A, Durakbaşı Dursun HG.** Y kromozomu: azospermia factor bölgesi, genler ve infertilite**.** *Selçuk Tıp Derg***, 2006**; 81-87.

64. **Bianchi NO, Richard SM, Pavicic W.** Y chromosome instability in testicular cancer. *Mutation Research*, **2006**;612:172-188.

65. **Holzik MFL, Storm K, Sijmons RH, D'Hollander M, Arts EGJM, Verstraaten ML, Sleijfer T, Hoekstra HJ.** Absence of Y chromosome AZF deletion in patients with testicular germ cell tumors. *Urology,* **2005;**65:196-201.

66. **Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschag E, Simoni M.** Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod*, **2005**;20(1):191-197.

67. **Solowiejzk D, Herpel B,Moty Y, Schwartz SM, Surrey S**. Construction of human gene library from small amounts of peripheral blood. Analysis of β-like globulin genes. *Hemoglobin,* **1986**:27-36.

68. **Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük MA, Atilla G.** Çukurova Üniversitesi Biyokimya Anabilimdalı Tanıda DNA Teknikleri VI.Biyokimya Yaz Okulu. 15-19 Eylül **2003**.

69. Y Chromosome Deletion Detection System, Version 2.0. Technical Manual.Printed in USA. Revised **10/04**.1-24, Promega.

70. **Buch B, Galan JJ, Lara M, Ruiz R, Segura C, Real LM, Martinez-Moya M, Ruiz A.** Scanning of Y-chromosome azoospermia factors loci using real-time polymerase chain reaction and melting curve analsis. *Fertil Steril***, 2003**:80(4)907-913.

71. **Yüreğir GT; Arpacı A, Tuli A.** Temel ve Klinik Biyokimyada İleri Teknoloji Yöntemleri. Adana, Ç.Ü.Tıp Fak Yay, **1995.**

72. FSH kiti-IRMA DSL-4700.

73. LH kiti- IRMA DSL-4600.

74. Testosteron kiti- RIA DSL-4000.

75. Prolaktin kiti-IRMA DSL-4500.

76. Leptin Kiti-IRMA DSL-23100.

77. **Simoni M, Kamischke A, Nieschlag E.** Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the workd-up of male infertility. *Hum Reprod* **1998;**13(7); 1764-1768.

78. **Foresto C, Ferlin A, Andrea G, Rossato M, Barbaux S, Bortoli A**. Y chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies**.** *J Clin Endocrinol Metab***, 1997**; 82(4): 1075-1079.

79. **Van der Ven K, Montag M, Preschka B, Leygraal J, Scwanitz G, Haidi G, Van der Van H.** Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod*, **1997;** 3(8): 699-704.

80. **Kremer JAM, Tuerlings JHAM,Meuleman EJH, Schoute F, Mariman E, Smeets DFCM, Hoefsloot LH, Braat DDM, Merkus HMWM.** Microdeletions fo the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum Reprod,***1997**;12(4):687-691.

81. **Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L, Naseeruddin S, Kretser DM, Baker HWG, McLachlan RI, Loveland KA, Bhasin S.** Substantial prevalence of microdeletions of the Y-Chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a squence-tagged site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab,* **1996**;81(4):1347-1352.

82. **Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN.** Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod,.* **1997;**12(8);1635-1641.

83. **Foresto C, Ferlin A, Garolla A, Moro E,Pistorella M, Barbaux S, Rossato M.** High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod*, **1998;** 13(2):302-307.

84. **Brandel RA, Mielnik A, Liotta D, Ye Z, Veeck LL, Palermo GD, Schlegel PN.** AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test*. Hum Reprod,* **1998**;133(10);2812-2815.

85. **Oliva R, Margarit E, Ballesca JL, Carrio A, Sanchez A, Mila M, Jimenez L, Alvarez-Vijande J-R, Ballesca F.** Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azoospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **1998;**70(3):506-510.

86. **Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC.** Y chromosome deletions in azospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod*, **1998;** 13(12)332-337.

87. **Ferlin A, Moro E, Onisto M, Toscana E, Bettella A, Foresta C.** Absence of testicular DAZ gene expression in idiopathic severe testiculopathies*. Hum Reprod,* **1999;**14(9);2286-2292.

88. **Foresta C, Ferlin A, Moro E.** Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet,* **2000;** 9(8);1161-1169.

89. **Sifforoi, JP, Bourhis CL, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, Rouba H, Bujan L, Bourrouillou G, Seifer I, Boucher D, Fellous M, McElreavey, Dadoune JP**. Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum Reprod*, **2000;** 15(12): 2559-2562.

90. **Martinenz MC, Bernabe MJ, Gomez E, Ballesteros A, Landers J, Glover G, Gil-Salom M, Remoni J,Pellicer A.** Screening for AZF deletion in large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J Androl*, **2000**; 21(5): 651-655.

91. **Van Golde RJT, Wetzels AMM, Graaf R, Tuerlings JHAM, Braat DDM, Kremer JAM.** Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermia factor c region of the Y chromosome. *Hum Reprod*, **2001;**16(2);289-292.

92. **Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, Kleiman S, Yavetz H, Krause W, Küpker W, Johanisson R, Schulze W, Weidner W, Barros A, Vogt PH.** High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod,* **2001**;7(10);987-994.

93. **Gogolevsky PA, Gogolevskaya IC, Kalugina AS, Zdanovsky VM, Togobetsky AS, Pomerantseva EI, Bondarev DA, Litvenenko VA, Kramerov DA.** Prevalence of microdeletions in the AZF region of the Y chromosome in a population of Rusian men undergoing ICSI. **2002,** Abstracts of the 18th Annual Meeting of ESHRE, Vienna, Austria.

94. **Causio F, Sarcina E, Matteo M, Fischetto R.** Defects in spermatogenesis of men with Y deletion and transmission to ICSI offspring. **2002,** Abstracts of the 18th Annual Meeting of ESHRE, Vienna, Austria.

95. **Katagiri Y, Neri QV, Kent-First M, Rosenwaks Z, Palermo GD.** Occurence of the Y chromosome microdeletions in infertile men. **2002,** Abstracts of the 18th Annual Meeting of ESHRE, Vienna, Austria.

96. **Ferras C, CarvalhoF, Marques C, Fernandes S, Silva J, Sousa M, Barros A.** Complete maturation arrest cases do not related to microdeletions in the AZFc region. **2002,** Abstracts of the 18th Annual Meeting of ESHRE, Vienna, Austria.

97. **CarvalhoF, Ferras C, Marques C, Fernandes S, Silva J, Sousa M, Barros A.** Portuguese population screening for Y chromosome microdeletions in 622 infertile malepatients and 114 fertile males. **2002,** Abstracts of the 18th Annual Meeting of ESHRE, Vienna, Austria.

98. **Krausz C, Quintana Murci L, Sayar H, McElreavey K.** AZF gene-spesific screening in highly selected Iranian patients. **2002,** Abstracts of the 18th Annual Meeting of ESHRE, Vienna, Austria.

99. **Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B.** Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod*, **2002**; 17(1): 17-24.

100. **Ioulıanos A, Sısmanı C, Fourouclas N, Patroclou T, Sergıo C, Patsalıs PC.** A nation-based population screening for azoospermia factor deletions in Greek-Cypriot patients with severe spermatogenic failure and normal fertile controls, using a spesific study and experimental design. *Int J Androl*, **2002**;25: 153-158.

101. **Chiang H-S, Yeh S-D, Wu C-C, Huang B-C, Tsai H-J, Fang C-L.** Clinical and pathological correlation of the microdeletion of Y chromosome for the 30 patients with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Asian J Androl*, **2004**;6:369-375.

102. **Quilter CR, Svennevik EC, Serhal P, Ralph D, Bahadur G, Stanhope R, Sütterlin M, Delhanty JDA, Taylor KE.** Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening of a random group of infertile males**.** *Fertil steril*, **2003**; 79(2):301-307.

103. **Kunej T, Zorn B, Peterlin B.** Y chromosome microdeletion in infertile men with cryptorchidism. *Fertil Steril.* **2003**;79:1559-1565.

104. **Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Resenwaks Z, Schlegel PN.** Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod,* **2003;**18(8);1660-1665.

105. **Thangaraj K, Gupta NJ, Pavani K, Reddy AG, Subramaınan S, Rani DS, Ghosh B, Chakravarty , Sıng L.** Y chromosome deletions in azoospermic men in India. *J Androl,* **2003**; 24(4):588-597.

106. **Kuo PL, Lın YH, Teng YN, Hsu CC, Lın JSN, Lın YM.** Transcriptional levels of four Y chromosome-linked AZF genes in azoospermic men and their association with succesful sperm retrieval. *Urology* **2004**; 63:131-136.

107. **Gianotten J, Hoffer JVM, De Vries JWA, Leschot NJ, Gerris J and Van der Veen F.** Partial DAZ deletion in a family with five infertile brothers. *Fertil Steril* **2003;** 79:1652-1655.

108. **Telöken C, Arent A, Chammas M, Bertaiolli V, Marques DS, Badalotti M.** Microdeletions of Y chromosome genes in infertile men*. Elsevier İnternational Congress Series 1271*. **2004**;173-176.

109. **Ning-hong S, Hong-fei W, Zuo-min Z, Li-xing Q, Li-xing H, Lin G, Ning-han F**. Screening for Y chromosome microdeletions in idiopathic and nonidiopathic infertile men with varicocele and cryptorchidism. *Chin med J*, **2005**;118(17)1462-1467.

110. **Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Steirteghem AV, Liebaers I.** The choice and outcome of the fertility tratment of 38 couples in whom the male partner has a Yq microdeletion. *Hum Reprod,* **2005**;20(7);1887-1896.

111. **Krausz C, Quintana-Murci L, Barbaux S, Siffroi JP, Rouba H, Delafontaine D, Souleyreau-Therville N, Arvis G, Antonie AJM, Erdei E, Taar JP, Tar A, Jeandidier E, Plessis G, T Bourgeron, JP Dadoune, M.Fellous, K Mcelreavey.** A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility. *J Clin EndocrinolMetab,* **1999;**84-10.

112. **Medika I, Gligorievska N, Prenc M, Peterlin B.** Y microdeletions in the Istria county, Croatia**.** *Asian J Androl,* **2005;** 7(2):213-216.

113. **Hellani A, Al-Hassan S, Iqbal MA, Coşkun S.** Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo/or azospermia. *J Exp Clin Assist Reprod***, 2006;** 3(1): 1743-1050.

114. **Tse JYM, Yeung WSB, Lau EYL, Ng EHY, So WWK, Ho PC.** Deletions withhin the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in Hong Kong Chinese men with severe male-factör infertility: controlled clinical study**.***HKMJ,* **2000;** 6(2):143-146.

115. **Abdelmoula NB, Sallami A, Chackroun N, Keskes L, Amouri A.** Evaluation of DAZ microdeletions in 34 infertile men. *Archives of Andrology***, 2006;**52:175-178.

116. **Hadj-Kacem L, Hadj-Kacem H, Ayadi H.** Screening of the Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile men. *Archives of Andrology***, 2006;**52:169-174.

117. **Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresto C.** Molecular and clinical characterization of Y Chromosome Microdeletions in infertile Men: A 10-year experience in İtaly. *J Clin Endocrinol Metab***, 2006**;92(3):762-770.

118. **Fernando L, Gromol J, Weerasooriya TR, Nieschlag E, Simoni M.** Y-chromosomal microdeletions and partial deletions of theAzospermia Factor c (AZFc) region in normospermic, severe oligospermic and azoospermic men in Sri Lanka. *Asian J Androl*, **2006**; 8(1):39-44.

119. **Devan S, Puscheek EE; Coulam CB, Wilcox AJ, Jevendrans RS.** Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, **2006;** 85(2): 441-445.

120. **Imken L, El Houate B, Chafik A, Nahili H, Boulouiz R, Abidi O, Chadli E, Louanili N, Elfa A, Hassar M, McElreavey K, Barakat A, Rouba H**.AZF microdeletions and partial deletions of AZFc region on the Y chromosome Moroccan men. *Asian J Androl*, **2007;** 9(5): 674-678.

121. **Memmedov F.** Erkek infertilitesinde güncel genetik değerlendirme. Erişim: http://www.uroturk.org.tr/ppt/14-03-2007-toplanti/fmemmedov.ppt İstanbul Tıp Fakültesi Androloji Bilim Dalı. Erişim tarihi: **2007**

122. **McElreavey K, Ravel C, Chantot-Bastaraud S, Siffroi J-P.** Y chromosome variants and male reproductive function .*Int J Androl.* **2006**;29:298-303.

123. **Simoni M.** Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europa: state-of-the-art and quality control. *Human Reprod*, **2001**;16(3): 402-409.

124. **Simoni M, Bakker E, Krausz C.** EAA/EMQN best practice gudelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl*, **2004;**27: 240-249.

125. **Seifer LEA, Touraine RL, Lejeune H, Laurent JL, Lauras B, Levy R.** A simple, low cost and non-invasive method for screening Y-chromosome microdeletion in infertile men. *Hum Reprod,* **2003;** 18(2):257-261.

126. **Foresto C, Moro E, Ferlin A.** Prognostic value of the Y deletion analysis. The role of current methods. *Hum Reprod*, **2001**:16(8):1543-1547.

127. **Calogero AE, Garofalo MR, D'Agata R.** Current status of the molecular diagnosis of y chromosome microdeletions in the work-up of male infertility. *Hum Reprod*, **1999**: 14(2)175.

128. **Sevinç D**. **Zehir A, Biricik A, Sertyel S, Kahraman S, Güney İ.** Relation beetween human Y chromosome microdeletions and sperm morphology. *Marmara Medical Journal,* **2002;**15(4)227-232.

129. **Şamlı MM, Yılmaz E, Şamlı H, İmirzalıoğlu N.** İnfertil erkeklerde genetik değerlendirme:Y Kromozom mikrodelesyonları. *Türk Üroloji Dergisi*, **2002;**28(1): 53-59.

130. **Vicdan A, Vicdan K, Günalp S, Kence A, Akarsu C, Işık AZ, Sözen E.** Genetic aspects of human male infertility: the freguency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male actor infertility. *Obstetrics and Gynecology,* **2003**;1-6.

131. **Sargın CF, Berker-Karaüzüm S, Manguoğlu E, Erdoğdu T, Karaveli Ş, Gülkesen K H, Baykara M, Lüleci G.** AZF Microdeletion on Y chromosome of infertile men from Turkey. *Annales de genetique*. Article in press, **2003.**

132. **Okutman-Emonts O, Pehlivan S, Tavmergen E, Tavmergen-Göker EN, Ozkinay F.** Screening of Y chromosome microdeletion which contains AZF regions in 71 Turkish azoospermic men. *Genet Couns*. **2004;**15 (2)199-205.

133. **Bozdoğan S, Dursun A, Yeşilli Ç, Seçkiner İ, Çabuk F, Altan Kbozdoğan G**. Varikoseli olan hastalarda Y kromozomu mikrodelesyonu-infertilite ilişkisi. *S.D.Ü. Tıp Fak Derg*.**2006;**14(1)15-19.

134. **Vutyavanich T, Piromlertamorn Waraporn, Sirirungsi W, Sirisukkasem**. Frequency of Y chromosome microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile Thai men with oligozoospermia and azoospermia. *Asian J Androl*, **2007**;9: 68-75.

8. ÖZGEÇMİŞ

1970 yılı, Adana doğumlu Safiye TAĞA, 1988 yılında Ç. Ü.Tıp Fakültesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu'ndan mezun olmuştur. Aynı yıl Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü kazanmış ve Ç.Ü.Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'nde göreve başlamıştır. 1992 yılında mezun olduktan sonra Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Ç.Ü.Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimini tamamlamıştır. Daha sonra aynı bölümde doktora çalışmasına başlamıştır. Halen Ç.Ü.Tıp. Fak. Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nde çalışmaya devam eden Safiye TAĞA, evli ve iki çocuk annesidir.