

CİDDİ OLIGOZOOSPERMİK VE AZOOSPERMİK İDİYOPATİK İNFERTİL ERKEKLERDE Y KROMOZOMU MİKRODELESYONU ANALİZ SONUÇLARI**THE ANALYSES RESULTS OF Y CHROMOSOME MICRODELETIONS IN IDIOPATHIC SEVERE OLIGOZOOSPERMIC AND AZOOSPERMIC INFERTILE MALES**

Hasan SOYDAN*, Ali AVCI*, Yaşar ÖZGÖK*, Funda ORKUNUOĞLU**, Selahattin BEDİR*, Nejat İMİRZALIOĞLU**

* Gülhane Askeri Tıp Akademisi Üroloji Anabilim Dalı, ANKARA

** Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Genetik Bilim Dalı, ANKARA

ABSTRACT

Introduction: We studied the analyses results of Y chromosome microdeletions in idiopathic severe oligozoospermic and azoospermic infertile males in Turkish population.

Materials and Methods: 28 infertile patients who admitted to Department of Urology of Gülhane Military Medical Academy were divided into 4 groups as azoospermia, severe oligozoospermia, oligozoospermia and normozoospermia according to their semen parameters. Testis biopsies were performed in azoospermic patients. Serum FSH, LH, prolactin and testosterone levels were measured. After these examinations, patients without varicocele, ejaculatory dysfunction, endocrinopathies, gonadotoxin related dysfunction, infection were classified as 'idiopathic infertile'. Y chromosomal microdeletions were studied by YDDS (Y Deletions Detection System) in patients having idiopathic severe oligozoospermic and azoospermic patients.

Results: Microdeletions were found in 7 of 29 patients. 5 of which were azoospermic and 2 were severe oligozoospermic. There were no statistical difference in FSH levels between patients with or without deletions ($p=0.183$; $p=0.602$). All patients had deletions on AZFc region and none of them had on AZFb region. Two patients the same deletions, but their testicular phenotype was different from each other. One patient having deletion on AZFc+AZFd+AZFb region had a testicular phenotype of hypospermatogenesis. However, one patient having deletion only on one STS had a testicular phenotype of Sertoli cell only and spermatositik arrest.

Conclusion: Most of idiopathic infertile men had Y chromosome microdeletion. As there wasn't a relation between testicular phenotype and microdeletion, no data could be obtained about treatment options.

Key Words: Idiopathic Infertility, Oligozoospermia, Azoospermia, Y chromosome microdeletions

ÖZET

Ciddi oligozoospermi veya azoospermisi olan idiyopatik infertil erkeklerde Y kromozomu mikrolelesyonu varlığını ve diğer parametrelerle ilişkisini araştırdık.

Haziran 1998 ve Mart 2001 tarihleri arasında GATA Üroloji Polikliniğine başvuran 28 infertil erkek hasta, semen parametrelerine göre; azoospermik, ciddi oligozoospermi, oligozoospermi ve normospermi olarak ayrıldı. Azoospermik hastalara testis biyopsisi yapıldı. Tüm hastaların serum FSH, LH, Prolaktin ve testosteron seviyeleri ölçüldü. Değerlendirme sonrasında; varikosel, ejakülatuar disfonksiyon, endokrinopati, gonadotoksinlere bağlı disfonksiyon ve enfeksiyon gibi infertilite sebeplerinden birisi saptanamayan hastalar idiyopatik infertil olarak kabul edildi. Ciddi oligozoospermik ve azoospermik olanlarda YDDS (Y Deletion Detection System, V1.1, Promega, USA) ile kromozom mikrolelesyonları araştırıldı.

Mikrolelesyon araştırılan 28 hastanın 7'sinde mikrolelesyon saptandı. Delesyon saptanan hastaların 5'i azoospermik, 2'si ciddi oligozoospermik idi. Delesyon saptanan hastalar ile saptanmayanların serum FSH değerleri arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p=0.183$, $p=0.602$). Tüm hastalarda AZFc bölgesinde delesyon saptanırken, hiçbirisinde AZFa bölgesinde delesyon yoktu. İki hastada birbiri ile eş delesyonlar olmasına rağmen testiküler fenotipleri farklı idi. AZFc+AZFd+AZFb bölgelerinde delesyonu olan bir hastada testiküler fenotip hipospermatogenezis idi. Tek bir STS'de delesyonu olan diğer bir hastada testiküler fenotip sertoli cell only ve spermatositik arrest idi.

İdiyopatik infertil erkeklerin önemli bir kısmında Y kromozom mikrolelesyonu bulunmaktadır. Ancak hastaların testiküler fenotipleri ile delesyonları arasında kesin bir ilişki kurulamadığı için, tedaviye yönelik kesin veriler elde edilememektedir.

Anahtar Kelimeler: İdiyopatik İnfertilite, Oligozoospermi, Azoospermi, Y kromozom mikrolelesyonu

Dergiye Geliş Tarihi: 07.01.2003

Yayına Kabul Tarihi: 05.11.2003 (Düzeltilmiş hali ile)

GİRİŞ

Fertil çiftlerde yapılan çalışmalarda, çiftlerin %50'sinde ilk 6 ayda, %90'ında ilk bir yıl içerisinde gebelik olduğu ve %10 çiftte ise bu sürenin daha da uzun olduğu saptanmıştır¹. Fertilitenin değerlendirildiği istatistiksel çalışmalar, çiftlerin yaklaşık %2-7'sinin infertil olduğunu ortaya koymuştur². 1962-1983 yılları arasında 3956 infertil çiftin değerlendirildiği çalışmalarda erkeklerin infertilite vakalarının yaklaşık %40'ından sorumlu olduğunu göstermiştir². Niesclag ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada infertil erkeklerin %30'unun hormon bozukluğu ve diğer bilinen infertilite sebepleri olmamasına rağmen oligozoospermik veya azospermik olduğunu yayınlamışlardır³. 2000 yılında Ma ve arkadaşları 25 ülke ve 33 merkezde yapılan çalışmaları değerlendirmişler, 6682 bireyden 717 (%10.2)'sinin azospermik veya oligozoospermik (<5x10 ml/ml) olduğunu saptamışlardır⁴.

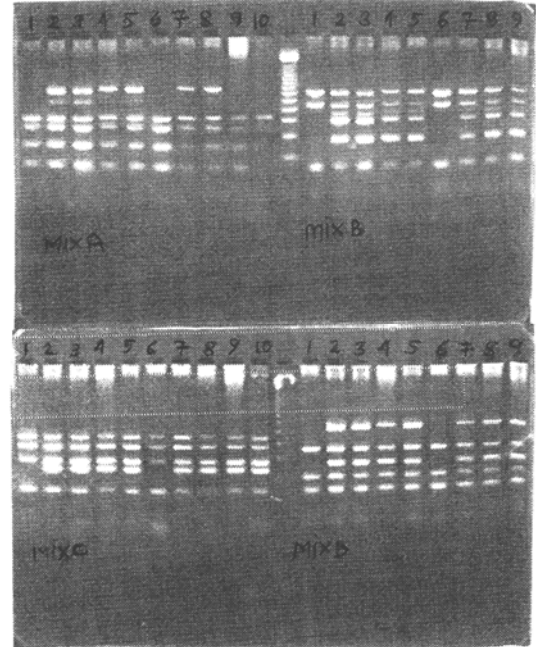
İdiyopatik erkek infertilitesinin nedeni halen bilinmemekle birlikte artık vakaların önemli bir kısmında genetik bir defektin varlığı düşünülmektedir. Toplam 7277 erkek infertil hastayı içeren 4 çalışmada: %4.2 (305) seks kromozom ve %1.1 (84) otozomal, toplam %5.3 (389) oranında kromozomal anomali saptanmıştır⁵. İnfertil erkeklerdeki seks kromozomu ve otozomal düzensizliklerin genel popülasyondan sırasıyla 15 ile 6 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur⁵. Son 20 yılda yapılan çalışmalar; Y kromozomunun seksüel gelişim ve spermatogenez için gerekli olduğunu ortaya koymuştur.

Biz çalışmamızda idiyopatik azospermisi veya oligozoospermisi olan seçilmiş bir hasta grubunda, Y kromozom düzensizlikleri ve özellikle de Y kromozomunda oluşan mikrolezyonları araştırarak, diğer klinik ve laboratuvar parametreler arasındaki ilişkiyi saptamayı ve de sonuçlarımızın tedavi seçenekleri üzerine etkilerini ortaya koymayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Haziran 1998-Mart 2001 tarihleri arasında hastanemize başvuran hastalar üzerinde yapılan çalışmamıza alınan tüm çiftlerde en az bir yıllık korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik oluşmama şartı arandı. Tüm erkeklerden yaşam tarzlarını (sigara, alkol kullanımı, ilaç kullanımı), gonadotoksinlere maruz kalma durumu

(kanser tedavisi, etc.), cinsel hikaye, aile öyküsü ve daha önceki cerrahi işlemleri sorgulayan detaylı bir anamnez alındı. Hastaların sekonder seks karakterleri, penis boyutu, testis, epididim ve vas deferenslerinin durumu ayrıntılı bir fizik muayene ile incelendi. Tüm hastalara 2-5 günlük cinsel perhiz sonrasında en az iki kere iki ay ara ile semen analizi yapıldı. Semen analizleri Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre değerlendirildi. İnfertil hastalar semen analiz sonuçlarına göre; azospermik, ciddi oligozoospermik (<2 ml/ml), oligozoospermik (<20 ml/ml) ve normozoospermik olmak üzere dört gruba ayrıldı. Azospermik hastaların hepsine tanısal bilateral testis biyopsisi yapıldı. Ciddi oligozoospermik hasta grubunda tüm hastalara testis biyopsisi uygulanmadı, non-obstrüktif azospermili testis biyopsisi; hipospermatogenezis, maturasyon arresti, sertoli cell only gibi spermatogenetik defektlerin varlığında düşünüldü. Hastaların tümünden DNA ekstraksiyonu ve serum FSH (Folikül stimüle edici hormon), LH (Luteinize edici hormon), prolaktin ve testosteron seviyelerini saptamak amacıyla kan örnekleri alındı. Tüm hastalara varikosel varlığı ve testiküler patolojileri tespit etmek için scrotal Doppler ultrasonografi yapıldı.



Şekil 1. Oligozoospermik hastaların multipleks PCR çalışması

Tüm laboratuvar değerlendirilmelerinden sonra; varikosel, ejakülatuar disfonksiyon, endokrinopati (hipogonadotropik hipogonadizm, hiperprolaktinemi), ejakülatuar kanal obstrüksiyonu, gonadotoksinlere bağlı disfonksiyon (kanser kemoterapisi) ve enfeksiyon (üretit, prostatit) gibi infertilite nedenleri arasında olan nedenlerden birisi saptanamayan 28 hasta idiyopatik infertil olarak kabul edildi. Çalışmamıza ciddi oligozoospermik veya azoospermik idiyopatik infertilitesi olan erkek hastalar dahil edildi.

Hastaların rutin karyotip analizleri yapıldı. DNA ekstraksiyonu hasta ve sağlıklı kontrolden alınan taze EDTA'lı kan örneklerinden klasik fenol-kloroform-proteinaz K yöntemi ile yapıldı. DNA örnekleri çalışılincaya kadar -80 derecede derin dondurucuda saklandı.

YDDS (Y Deletion Detection Systems, V 1.1 Promega, USA) kullanılarak, Y kromozomu üzerinde daha önceden haritalanan ve aradığımız mikrolelesyonları içeren genetik bölgeler STS (Sequence Taq Sites), PCR (Polimerase Chain Reaction) ile çoğaltıldı. %4 Nusieve-agar 3:1 TBE elektroforezinde PCR ürünlerinin varlığı yada yokluğuna göre mikrolelesyonlar belirlendi. PCR reaksiyonu Y kromozomunda yer alan nonpolimorfik kısa DNA segmentlerinden seçilen 18 ayrı primer dizisi ile üretici firma tarafından hazırlanan 4 ayrı PCR reaksiyonu karışımını içeren 'multiplex PCR' tekniği ile yapıldı. Multiplex PCR'da kullanılan primer karışımlar şunlardır; Mix A: SY254, SY157, SY81, SY130, SY182, Mix B: SYPR3, SY127, SY242, SY239, SY208, Mix C: SY128, SY121, SY145, SY255, Mix D: SY152, SY133, SY153, SY124. Her bir multiplex primer seti aynı zamanda, çoğaltma reaksiyonunun çalışıp çalışmadığının kontrol amacı ile X'e bağlı SMCX lokusunu çoğaltmak için hazırlanan kontrol primer dizisini de içermekte idi. Hasta örnekleri ile beraber negatif kontrol olarak (genomik DNA içermeyen) ddH2O ve pozitif kontrol olarak erkek genomik DNA'sı 4 PCR miksi ile çalışılmıştır. PCR karışımını 250 ng hasta/kontrol genomik DNA'sı, 0.2 µl. Taq polimeraz ve 20 µl Multiplex master miksten oluşmaktaydı. PCR termal cykler cihazında 35 kez siklus tekrarlandı. Denaturasyon 94 derecede bir dakika, primer bağlanması 57 derecede 30 sn, 72 derecede bir dk DNA sentezi yapıldı. PCR

ürünleri Nusieve agarda 1X TBE tamponu içerisinde 2 µl 6X Blue-orange yükleme boyası ilave edilerek 50 bp marker ile beraber yürütüldü. Transilluminometre cihazında 320 nm'de jeller polaroid kamera ile görüntülendi. Her bir örnek deneyin doğrulanması için iki kez çalışıldı. (Şekil 1).

SHOX CSF2RA IL3RA ANT3 ASMT XE7 MIC2 XGPY		Pseudootozoma I Bölge (PAR 1)		
.....PAR1				
SRY (=TDF) RP4Y ZFY		Interval 1		
TSPY-A PRKY AMELY TSPY-B	} GBY	Interval 2		
.....(Ycen (DYZ3))		Interval 3		
GCY		4B	Interval 4	Yc
DDFRY (USP9Y) DBY UTY TB4Y	} [AZFa]	5A 5C 5D 5E 5G 5I 5K	Interval 5	
GCY KALY BYP1 STSP YRRM1 YRRM2	} RBM genleri	5L 5O 5Q 6A 6B		
CDY XKRY SMCY		6C 6E 6F	Interval 6	
EIF1AY RBM1 RBM2 PRY TTY2 SY153 [AZFd]	} [AZFb]			
DAZ1 DAZ2 (SPGY) BPY2 PRY CDY	} [AZFc]			
HETEROKROMATİK BÖLGE (DYZ1)				
.....PAR2				
SYBK1 IL9R			Interval 7	Yph

Tablo 1. Y Kromozomu Genleri

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS paket programı (yüzdelik ve Mann Whitney-U testi) kullanıldı.

BULGULAR

Haziran 1998 ve Mart 2001 tarihleri arasında hastanemize başvuran ciddi oligozoospermik ve azospermik hastaların 28 tanesi idiyopatik

infertilite tanısı aldı. Hastaların yaşları 23-39 arasında değişmekteydi. Yaşların ortalaması 29.5 olarak saptandı. Hastaların infertilite süreleri, 1-18 yıl arasında olup, ortalaması 5.3 yıl olarak saptandı.

Tüm hastaların karyotip analizleri normal olarak saptandı (Tablo 2).

	İnfer- tilite Süresi (Yıl)	Semen Analizi	Hormon Profili FSH	LH	Total Testes- teron	Serbest Testes- teron	Karyotip	Biyopsi	Deles- yon
1	1	Azospermi	15.9	12.1	1012	3.1	46 XY	Sertoli cell only	+
2	4	Azospermi	13.3	3.2	536	16.2	46 XY	Sağ Sertoli cell only Sol Spermatositik arrest	+
3	3	Azospermi	13.7	7.8	635	14.5	46 XY	Sertoli cell only %80 Spermatositik arrest %20	+
4	1	Azospermi	9.1	4.2	741	16.3	46 XY	Sertoli cell only	+
5	12	Azospermi	12	13.4	415	15.7	46 XY	Sertoli cell only	+
6	3	Azospermi	33.6	11	789	31.6	46 XY	Sertoli cell only %95 Fokal spermatogenezis %5	-
7	14	Azospermi	22.2	9.6	673	8.9	46 XY	İnkomplet spermatositik arrest	-
8	1.5	Azospermi	27.7	10.3	540	3.6	46 XY	Sertoli cell only	-
9	5	Azospermi	10.7	6.7	436	11.3	46 XY	Sertoli cell only	-
10	3	Azospermi	11.6	4.7	432	14.8	46 XY	Sertoli cell only %80 Hipospermatogenezis %20	-
11	3	Azospermi	44.8	10.8	531	21	46 XY	Sertoli cell only %90 Hipospermatogenezis %10	-
12	4	Azospermi	10.9	8.4	477	19	46 XY	Sertoli cell only %90 Hipospermatogenezis %10	-
13	2	Azospermi	20.9	7.5	342	18	46 XY	Hipospermatogenezis	-
14	6	Azospermi	19.9	13.8	673	8.5	46 XY	Sertoli cell only	-
15	4	Azospermi	20.6	5.6	341	11.6	46 XY	Hipospermatogenezis	-
16	2	Azospermi	16.8	2.3	432	14.1	46 XY	Hipospermatogenezis	-
17	18	Azospermi	13.1	5.1	423	13.6	46 XY	Hipospermatogenezis	-
18	2	Azospermi	15.2	3.2	927	43.6	46 XY	Sertoli cell only %20 Maturasyon arresti %90	-
19	4	1 mil/ml	7.7	4.1	724	20.9	46 XY	Hipospermatogenezis	+
20	6	1 mil/ml	13.1	6.1	522	4.3	46 XY	-	-
21	4	<1 mil/ml	6.8	8.6	285	16.1	46 XY	Spermatositik arrest	-
22	7	1 mil/ml	8.7	5.6	1359	25.6	46 XY	-	-
23	5	<1 mil/ml	7.9	5.6	445	8.9	46 XY	Maturasyon arresti	+
24	10	1 mil/ml	7.1	3.6	358	17.3	46 XY	Sertoli cell only	-
25	2	<1 mil/ml	2.8	3	413	10.2	46 XY	-	-
26	3	2 mil/ml	3.3	1.3	122	17	46 XY	-	-
27	5	1 mil/ml	26.7	7.3	543	7.1	46 XY	-	-
28	14	1 mil/ml	4.9	6.9	231	17	46 XY	Hipospermatogenezis	-

Tablo 2. Ciddi Azoospermik Hastaların Verileri (1-18) ve Ciddi Oligozoospermik Hastaların Verileri (19-28).

Hasta Numarası	Histopatoloji	Eksik STS'ler	Delesyon Bölgesi
1	Sertoli cell only	SY121, SY127, SY128, SY242, SY254, SY157, SYPR3	AZFb,AZFc
2	Sertoli cell only + spermatositik arrest	SY242	AZFc
3	Sertoli cell only	SY157, SY254, SY255	AZFc
4	Sertoli cell only	SY255, SY157, SY208, SY239, SY242, SY254	AZFc
5	Sertoli cell only	SY152, SY153, SY157, SY208, SY239, SY242, SY254, SY255	AZFc, AZFd

Tablo 3. Azoospermik hastalardaki testiküler fenotipler ve delesyon bölgeleri.

Hasta Numarası	Histopatoloji	Eksik STS'ler	Delesyon Bölgesi
19	Hipospermatogenezis	SY152, SY153, SY157, SY208, SY239, SY242, SY254, SY255, SY124	AZFc, AZFd, AZFb
23	Maturasyon arresti	SY152, SY153, SY157, SY208, SY239, SY242, SY254, SY255	AZFc, AZFd

Tablo 4. Oligozoospermik hastalardaki testiküler fenotipler ve delesyon bölgeleri.

Azoospermik hastaların testiküler histopatolojileri ise; 6 hastada sertoli cell only (%33), 4 hastada hipospermatogenezis (%22), 3 hastada sertoli cell only+hipospermatogenezis (%16), 1 hastada sertoli cell only+maturasyon arresti (% 5), 2 hastada sertoli cell only+spermatositik arrest (%5), 1 hastada inkomplet spermatositik arrest (%5) ve 1 hastada sertoli cell only+fokal spermatogenezis (%5), olarak rapor edildi.

Oligozoospermik hastaların 5 (%50)'ine testis biyopsisi uygulandı. Bu hastaların testiküler histopatolojileri ise; 2 hastada hipospermatogenezis, 1 hastada maturasyon arresti, 1 hastada sertoli cell only, 1 hastada spermatositik arrest. Mikrodelesyon saptanan 2 hastanın birisinde testiküler fenotipi hipospermatogenezis, diğerinde ise maturasyon arresti şeklinde saptandı.

Hastaların 7'sinde mikrodelesyon saptandı (7/28, %25). 5 azoospermik hastada mikrodelesyon saptanırken (5/18, %28), 2 ciddi oligozoospermik hastada mikrodelesyon saptandı (2/10, % 20). Delesyon saptanan azoospermik hastaların beşinde serum FSH değerleri normalden yüksek, serum testesteron değerleri normal olarak bulundu. Delesyon saptanmayan azoospermik hastaların serum FSH değerleri ortalamaları 20.613 ± 9.919 iken, delesyon saptananların ki ise 13.580 ± 1.441 olarak bulundu. Delesyon saptanan ve saptanmayan azoospermik erkeklerin serum FSH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.813$).

Delesyon saptanan ciddi oligozoospermik hastaların serum FSH düzeyleri normal sınırlarda ve ortalamaları 7.8 ± 0.141 iken, saptanmayan hastaların serum FSH düzeyleri ortalaması 9.175 ± 2.802 olarak bulundu. Delesyon saptanan ve saptanmayan ciddi oligozoospermik hastaların serum FSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.053$).

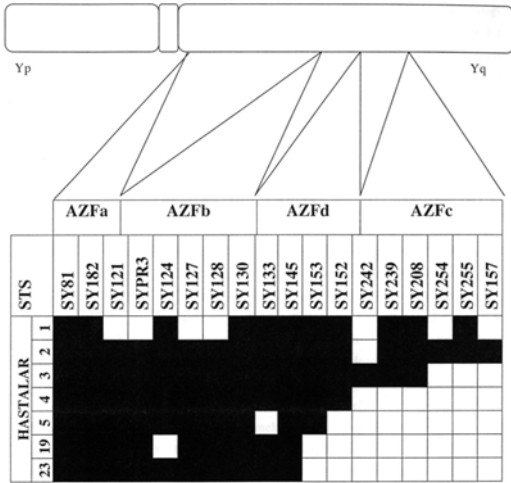
Delesyon saptanan ciddi oligozoospermik hastaların serum FSH değerleri ile delesyon saptanan azoospermik hastaların serum FSH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.053$).

Testis biyopsi sonuçları ile delesyon bölgeleri karşılaştırıldığında; 5 ve 23 numaralı hastalarda aynı delesyon bölgeleri (SY152, SY153, SY242, SY239, SY208, SY254, SY255, SY157, -AZFc, +AZFd) etkilenmiş olsa da farklı testiküler fenotipler olduğu görüldü. 2, 3 ve 4 numaralı hastalarda AZFc bölgesinde değişik büyüklüklerde delesyon oluşmuş olmakla birlikte, karşılaşılan testiküler fenotip sertoli cell only ve sertoli cell only+spermatositik arrest olarak tespit edildi. İki numaralı hastada sadece SY242'de delesyon saptanmış olmasına rağmen hastanın testiküler fenotipi sertoli cell only+spermatositik arrest olarak saptandı. AZFc+AZFd+AZFb bölgelerinde delesyon saptanan 19 numaralı hastada testiküler fenotipin hipospermatogenezis olduğu görüldü (Tablo 1, 3, 4).

	AZFc	AZFb+AZFc	AZFc+AZFd	AZFb+AZFc+AZFd	Toplam
Sertoli Cell Only	2	1		1	4
Sertoli Cell Only+ Spermatositik Arresti	1				1
Matürasyon Arresti			1		1
Hipospermatogenezis				1	1
Toplam	3	1	1	1	7

Tablo 5. Testiküler fenotiplere göre delesyon bölgelerinin dağılımı

Saptanan delesyonlara bakıldığında tüm hastalarda AZFc bölgesinde delesyon olduğu, ancak büyüklüğünün farklı olduğu ve başka bölgelere de taşabildiği saptandı. Üç hastada sadece AZFc bölgesine sınırlı delesyon saptanırken, iki hastada AZFc+AZFd bölgelerinde, bir hastada ise AZFb+AZFc bölgelerinde, bir hastada da AZFb+AZFc+AZFd bölgelerinde delesyon saptandı. Hiçbir hastada AZFa bölgesinde delesyon saptanmadı. Altı hastada SY242, SY157 ve SY254'ün delesyona uğradığı görüldü. Delesyon saptanan tüm hastalarda testis biyopsisi uygulandı. Azoospermik olup delesyon saptanan hastaların 4'ünün testiküler fenotipi sertoli cell only, birinin sertoli cell only+spermatositik arrest olduğu saptandı. Delesyon saptanan iki oligozoospermik hastanın testiküler fenotipi sırasıyla matürasyon arresti ve hipospermatogenezis olarak bulundu (Tablo 5).



Şekil 2. Delesyonu olan hastaların Y kromozomu haritaları.

Yedisi oligozoospermik, dokuzu azoospermik olmak üzere toplam 16 hastaya ICSI (Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu) uygulandı. Ciddi oligozoospermik hastalarda iki gebelik oluştu. Gebelik oluşan hastalardan birinde (9 nolu hasta)

AZFc bölgesinin tamamını ve AZFd bölgesinin bir kısmını etkileyen mikrodelesyon vardı.

Dokuz azoospermik hastanın dördüne ICSI uygulandı. Ancak hiç gebelik olmadı. Beş hastaya ise TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu)'de sperm bulunamadığından ICSI uygulanamadı. ICSI denenen hastaların sadece birinde (4 numaralı hasta) Y kromozomu mikrodelesyonu vardı. Bu hastada da TESE ile sperm ekstrakte edilemedi.

TARTIŞMA

Çeşitli çalışmalarda primer setler ile çoğaltılan bölgelerdeki Y kromozom delesyonlarının erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁶⁻¹⁰. İdiyopatik infertilite terimini tanımlama şekline göre insidansının %66'lara kadar çıktığı saptanmıştır⁸. Seks kromozomu veya otozomal kromozomları ilgilendiren genetik bozukluklarda infertilitenin tespit edilebildiği rapor edilmiştir⁵. Y kromozomunun spermatogenezis ve testis farklılaşmasındaki rollerinin anlaşılmasından sonra, ilk defa 1976'da azoospermik erkeklerde Y kromozomunun uzun kolunda sitogenetik olarak tespit edilebilen geniş delesyonlar saptanmıştır ve bu delesyona uğrayan bölgelerin spermatogenezise spesifik olduğu düşünülmüş, 'Azoospermia Faktör' olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda Y kromozomunun 7 ve 43 intervallı haritası çıkarılmıştır^{10,11}. AZF bölgesi, oluşan delesyonların meydana getirdiği fenotiplere göre AZFa, AZFb, AZFc bölgeleri olmak üzere 3 bölgeye ayrılmıştır¹². 1999 yılında Kent-First AZFc bölgesinin proksimalinde AZFd bölgesini tanımlamış ve testiküler fenotip ile delesyonlar arası ilişkiyi saptamak daha karmaşık hale gelmiştir⁶. Y kromozomu delesyonları 6000'den fazla hastada çalışılmıştır^{4,7,12-14}. Saptanan delesyon sıklığı %0.4-55.5 arasında rapor edilmiştir. İnsidansın bu kadar farklı olmasının nedeni olarak; çalışma metodolojisi, hasta seçim kriterleri

ve kullanılan STS'lerin farklılığından ileri geldiği düşünülmüştür. Yapılan bir metaanalizde azoospermik hastalarda delesyon sıklığının %12, oligozoospermik hastalarda ise bu oranın %3.4 civarında olduğu rapor edilmiştir¹⁵. Başka bir çalışmada hastalar 4 gruba ayrılarak delesyon oranları değerlendirilmiş, ciddi infertilitesi olan azoospermik veya oligozoospermik, hipogonadizm veya spermatositik arrestli, veya normal sperm sayısı olup sperm morfolojisi bozuk, 5 yıldan fazla infertilitesi olan çiftlerde Y kromozom mikrodelesyon oranı %21 civarında saptanmıştır. Seçilmemiş infertil hastalarda %7 oranında, daha önce tespit edilmiş kromozom anomalisi olanlarda (anaploidi, translokasyon, sitogenetik delesyonlar) ve ciddi fenotipik bozukluğu olanlarda %58, seçilmemiş babalar ve ICSI sonrası doğmuş erkek çocuklarında %10 ve kontrol grubu fertil hastalarda %0.4 olarak rapor edilmiştir¹³. Fertil erkeklerdeki delesyonlar polimorfik olarak saptanmıştır. Mikrodelesyon saptanan hastaların 2/3'ü azoospermik, 1/3'ü oligozoospermiktir.

Biz 28 (18 hasta azoospermik, 10 hasta oligozoospermik) hastalık çalışma grubumuzda %25 oranında Y kromozom mikrodelesyonu saptadık. 18 azoospermik hastanın 5'inde (%28), oligozoospermik 10 hastanın 2'sinde (%20) mikrodelesyon saptadık.

AZFc bölgesi en sık delesyona uğrayan bölgedir^{7,14-17}. AZFb ve AZFd bölgelerindeki delesyonlar benzer oranlarda olup, AZFa bölgesindeki delesyon sıklığı %10'dan daha az rapor edilmiştir^{13,18,19}. Şimdiye kadar AZFc bölgesini etkileyen 170, AZFb bölgesini etkileyen 41 mikrodelesyon saptanmıştır¹⁴. Kent-First çalışmasında, AZF bölgesinde AZFa, AZFb, AZFc, AZFd olmak üzere alt bölgelerin olduğu, bu bölgelere spesifik testiküler fenotiplerin olmadığı, değişik bölge delesyonlarında aynı testiküler fenotip ile karşılaşılabileceği, bununda AZF bölgesinde birden fazla gen veya gen ailesi olmasına bağlı olabileceği sonucu yayınlamıştır¹³. Delesyonlar bir bölgeyi etkileyebileceği gibi birden fazla bölgeyi de etkileyebilir. Özellikle patolojik delesyonların birden çok bölgede bulunma eğilimi vardır¹³. Çalışmalarda DAZ ve RBM gen bölgelerine odaklanılmışsa da, AZF bölgesinde spermatogenezisten sorumlu en az bir düzine gen olduğu düşünül-

mektedir¹³. Bunlardan birkaçı tanımlanmıştır (CDY, DFFRY, DBY, VCY gibi).

Çalışmamızda 18 STS kullanarak tasarlanmış YDDS sistemini kullanarak azoospermik hastaların %28 (5/18)'inde mikrodelesyon saptadık. Beş hastanın hepsinde AZFc bölgesinde, birer hastada ise AZFb ve AZFd bölgelerinde delesyon saptadık. AZFb ve AZFd bölgelerindeki delesyonlar bu bölgelere sınırlı değildi, AZFc bölgesini de etkilemekteydi. Üç hastada ise delesyonlar AZFc bölgesine sınırlıydı. Ciddi oligozoospermik hastalarda 10 hastanın 2'sinde (%20) delesyon saptadık. Bu iki hastadaki delesyonlar AZFc bölgesinin tamamını kapsamakta, bir hastada AZFd bölgesine, diğesinde ise AZFb ve AZFd bölgelerine taşmaktaydı. Çalışmamızda en sık delesyona uğrayan bölge AZFc bölgesiydi. Tüm delesyon saptanan hastalarda AZFc bölgesinde de delesyon vardı. Bu delesyonların 3'ü (%42) AZFc bölgesine sınırlı iken 4 (%58) hastada delesyon diğer bölgeleri de etkilemişti. Literatürde %7-10 delesyon saptanan AZFa bölgesinde biz delesyon saptamadık.

Vogt tarafından 1996'da AZFa, AZFb, AZFc bölgelerinin sırasıyla sertoli cell only, spermatogenezik arrest ve çeşitli fenotiplerle (oligozoospermi/azoospermi) ilişkili olduğunu rapor etmiştir¹². Ancak daha sonraki çalışmalar da böylesine kesin fenotip-genotip ilişkisi kurulamamıştır^{4,7,13,15}. Birden fazla bölgeyi içine alan veya sadece AZFa bölgesine sınırlı lezyonların sertoli cell only veya oligozoospermi/azoospermi ile birlikte görülen spermatogenezik arrest gibi daha ciddi fenotiplere neden olduğu görülmüştür^{13,20}. AZFa bölgesinde eğer sadece DFFRY geni etkilenmişse ciddi hipospermatogenezis ile birlikte de görülebilir^{18,19}. AZFc, AZFb, AZFd bölgelerindeki delesyonlar sertoli cell only, komplet spermatogenezik arrest/azoospermi, oligozoospermi gibi çeşitli testis histopatolojileri ile birlikte olabilir¹³. Ayrıca AZFd bölgesi delesyonları normal sperm sayısı olup da, spermeleri anormal olan globozoospermi hastalarında da saptanmıştır¹³.

Çalışmamızda; hastaların 4'ünde azoospermi/sertoli cell only, birinde sertoli cell only+ spermatositik arrest ve ikisinde ciddi oligozoospermi/hipospermatogenezis ve matürasyon arresti saptadık.

Daha önceki çalışmalarda kriptositik, varikoseli olan, bilateral vas deferens yokluğu olan hastalarda Y kromozomu mikrolelesyonlarının saptanabileceği bildirilmiştir. Ancak varikosel saptanan hastalarda yapılan cerrahi tedavi ile hastaların fertilitelerinin normale dönmediği ve spermatogenezisteki bozukluğun aslında Y kromozomundaki mikrolelesyonlara bağlı olduğu düşünülmüştür⁸. Bizde çalışmamızda bir varikoseli olan hastamıza varikoselektomi operasyonu uyguladık ve sperm parametrelerinde iyileşme cevabı alamadık.

Her ne kadar serum FSH seviyeleri non-obstrüktif azospermili hastalarda yüksek olarak bulunsun da, serum FSH seviyeleri ile testiküler sperm saptanabilmesi arasında direk bir ilişki saptanamamıştır²¹. Ayrıca serum FSH seviyeleri ile mikrolelesyon varlığı arasında da bir korelasyon saptanamamıştır. Çalışmamızda azospermik olup mikrolelesyon saptanan 5 hastamızın serum FSH değerlerinin ortalaması 13.8 bulunurken, azospermik olup mikrolelesyon saptanmayan 13 hastanın serum FSH seviyelerinin ortalaması 22.2 olarak saptanmıştır. Aynı şekilde mikrolelesyon saptanan oligozoospermik hastalarda serum FSH seviyelerinin ortalaması 7.8, mikrolelesyon olmayanlarda ise 9.1 olarak saptanmıştır.

ICSI'nin geliştirilmesine kadar son 30 yıldır idiyopatik azospermik erkeklerin tedavisinde herhangi bir gelişme olmamıştır. Non-obstrüktif azospermik erkeklerde, testis dokusundan TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu) ile çok az miktarda da olsa sperm elde edildiğinde, bu spermiler ile ICSI yapılarak fertilizasyon sağlanabilir. ICSI ile kadın üreme organlarının seçici bariyer özelliği by-pass edilebilmekte ve yine ICSI'de anormal spermiler kullanılabilir. Bu sonuçlar ICSI ile genetik anormalliklerin aktarılabilmesi konusundaki kaygıları artırmaktadır. Ancak ICSI sonrası doğan 877 çocuğun değerlendirildiği bir çalışmada 23 (%2.6) ciddi doğumsal malformasyon saptanmıştır. Bu oran IVF (Invitro Fertilizasyon) uygulananlarda %2-2.8, genel populasyonda ise %1.9-2.9 arasında rapor edilmiştir²².

ICSI ile Y kromozom mikrolelesyonlarının aktarılabilmesi gösterilmiştir²³⁻²⁶. Bu delesyonlar babadan oğula geçebildiği gibi testiste de oluşabilmektedir²⁷. İlginç olarak, Y kromozom mikro-

delesyonu olmayan iki erkeğin ICSI sonrası doğan erkek çocuklarında Y kromozom mikrolelesyonu saptanmıştır. Bu mikrolelesyonların fertil babanın germ hücrelerinde mutasyon sonrası veya çocuğun erken embriyogenezis evresinde mitotik bir hataya bağlı olabileceği rapor edilmiştir⁶. Bir hastada Y kromozom mikrolelesyonunun tespit edilmesi, idiyopatik infertilitesi olan hastalarda sadece etiyolojinin saptanması anlamına gelmemektedir. Hastalara bu bilgiler ışığında mevcut reproduktif durumları ve bunun uygulanacak tedavi seçenekleri üzerine nasıl etki edeceği konusunda genetik danışmanlık verilmelidir. Yapılan bir çalışmada, hastaların durumları konusunda bilgilendirilmeleri sonrasında kromozomal anomalilerin aktarılma riskine rağmen hastaların %79'u ICSI'yi tedavi seçeneği olarak seçmiştir. Ancak ICSI'yi genetik anomali riski nedeni ile seçmeyen %21'lik hasta popülasyonu göz ardı edilmemelidir²⁸.

Tüm AZFb bölgesinde delesyon varlığının testiste matür sperm bulabilme olasılığını sıfıra indirdiği ileri sürülmüştür^{19,20,29}. Ayrıca tüm AZFc bölgesini kapsayan ve beraberinde diğer bölgelerde taşınan (AZFb+AZFc, AZFb+AZFc+AZFa) delesyonlarında da testiste spermatozoa bulunmadığı rapor edilmiştir¹⁷. Bu bulgulara zıt olarak sadece AZFc bölgesini etkileyen delesyonlarda testiste %50 oranında sperm bulunabileceği rapor edilmiştir³⁰. Başka bir çalışmada AZFc delesyonu olan iki ciddi oligozoospermik hastada zaman içerisinde (1-3 yıl) sperm konsantrasyonunun azaldığı ve azospermi geliştiği saptanmıştır^{31,32}. AZFc delesyonu varlığında ICSI uygulanan hastalarda fertilizasyon oranlarının düştüğü ve embriyo kalitesinin azaldığı rapor edilmiştir³³.

Spermatogenezis sürecindeki değişik evrelerin markerlarının araştırıldığı bir çalışmada, DAZ, RBM, CDY1 genlerinin testislerde ekspresyonu araştırılmış; DAZ mRNA'sının spermatogenetik seride spermatogonia dan spermatositler kadar eksprese olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde RBM geninin spermatogonia ve spermatositlerde eksprese olduğu gösterilmiştir. CDY1'in ekspresyonunun ise matür spermatid veya spermatozoa varlığını gösterdiği sonucuna varılmıştır³⁴. Ancak bu bilgilerin doğrulanması için bu bölgelerde delesyonu olmayan hastalarda da

çalışma yapılması ve ilişkinin gösterilmesi gerekmektedir.

Prognostik değeri olduğu düşünülen bu sonuçlara rağmen, RBM, DAZ, DFFRY, CDY ve diğer testis spesifik genlerin rolleri anlaşılincaya kadar muhtemel tedavi seçeneklerini düşünmek imkansız gibi görünmektedir. Bu genlerin yapısı ve etkilerinin anlaşılması muhtemel tedavi seçeneklerinin yapısını belirleyecektir. Günümüzde Y kromozom mikrodelsiyonlarının tespit edilmesi, sadece hastalığın tanısının konulmasını ve hastalara genetik danışmanlık yapılabilmesini sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- **Jarow JP, Sigman M:** Office evaluation of the subfertile male. AUA Update Series, Vol XVIII, Lesson 23, 1999.
- 2- **Spira A:** Epidemiology of human reproduction. Human Reproduction, 1; 111, 1986.
- 3- **Nieschlag E, Leifke E:** Empirical Therapies for idiopathic male infertility. Andrology: Male reproductive health and dysfunction. Berlin, Springer Verlag, 313, 1997.
- 4- **Ma K, Mallidis C, Bhasin S:** The role of Y chromosome deletions in male infertility. European Journal of Endocrinology, 142; 418, 2000.
- 5- **Bhasin S, Ma K, Sinha I, Limbo M, Taylor WE, Salehian B:** Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 27(4); 783, 1998.
- 6- **Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W:** Defining regions of the Y chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome detection system. Molecular Reproduction and Development, 53; 27, 1999.
- 7- **Kostiner DR, Turek PJ, Reijo RA:** Male infertility: Analysis of the markers and genes on the Y chromosome. Human Reproduction, 13: 3032, 1998.
- 8- **Pryor JL, Kent-First M, Muallem A:** Prospective analysis of Y chromosome microdeletions in 200 consecutive male infertility patients. New England Journal of Medicine, 336; 534, 1997.
- 9- **Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M:** Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nature Genetic, 10; 383, 1995.
- 10- **Vollrath D, Foote S, Hiltin A:** The human Y chromosome: A 43 interval map based on naturally occurring deletions. Science, 258; 52, 1992.
- 11- **Stuppia L, Mastropianino G, Calabrese G, Peila R, Tenaglia R, Palka G:** Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- or azoospermia. Cytogenetic Cell Genetics, 72; 155, 1996.
- 12- **Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegario O, Hirschmann P, Kieseewetter F:** Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Human Molecular Genetics, 5; 933, 1996.
- 13- **Kent-First M:** The critical and expanding role of genetics in assisted reproduction. Prenatal Diagnosis, 20; 536, 2000.
- 14- **Mauer B, Simoni M:** Y chromosome microdeletion screening in infertile men. Journal of Endocrinology and Investigation, 23; 664, 2000.
- 15- **Simoni M, Kamischke A, Nieschlag E:** Current status of the molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions in the work up of male infertility. Initiative for international quality control. Human Reproduction, 13; 1764, 1998.
- 16- **Reijo R, Raaai KA, Pascuale P, Page DC:** Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet, 347; 1297, 1996.
- 17- **Silber SJ, Alagappan R, Brown LJ:** Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. Human Reproduction, 13; 3332, 1998.
- 18- **Kleiman SE, Mauman BB, Yogev L, Paz G, Yavetz H:** Prognostic value of the Y deletion analysis. Human Reproduction, 16(3); 399, 2001.
- 19- **Kleiman SE, Mayman B, Yogev L, Paz G, Yavetz H:** Prognostic value of Y deletion analysis. Human Reproduction, 16(3); 311, 2001.
- 20- **Krausz C, Quintana-Murci S, McElreavy K:** Prognostic value of Y deletion analysis: What is the clinical prognostic value Y chromosome microdeletion analysis? Human Reproduction, 15; 1431, 2000.
- 21- **Sasagawa I, Yazawa H, Suzuki Y, Taneto T, Ichiyanagi O, Kobayashi T, Matsuki S, Nkada T:** Archives of Andrology, 46; 79, 2001.
- 22- **Persson JW, Peter GB, Saunders DM:** Is ICSI associated with risks of genetic disease? Implications for counseling, practice and research, Human Reproduction, 11; 921, 1996.
- 23- **Jiang M, Lien Y, Chen S, Ko T, Ho H, Yang Y:** Transmission of denovo mutations of the deleted in azoospermia genes from a severely oligozoospermic male to a son via intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility, 71; 1029, 1999.
- 24- **Kaminske A, Gromoll J, Simoni M, Behre HM, Nieschlag E:** Transmission of a Y chromosomal deletion involving the deleted in azoosper-

- mia (DAZ) and chromodomain Y (CDY1) genes from father to son through intracytoplasmic sperm injection. Human Reproduction, 14; 2330, 1999.
- 25- **Kleiman S, Yogev L, Gamzu R, Hauser H, Botchan A, Paz G, Lessing J, Yavetz Y, Yavetz H:** Three generation evaluation of Y chromosome deletion. Journal of Andrology, 20; 394, 1999.
- 26- **Page DC, Silber S, Brown LG:** Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic injection, but are likely to transmit the deletion and infertility, Human Reproduction, 14; 1722, 1999.
- 27- **Hargraeve T:** Genetically determined male infertility and assisted reproduction techniques. Journal of Endocrinology Investigation, 23; 697, 2000.
- 28- **Nap AW, Van Golde RJ, Tuerlings JH:** Reproductive decisions of men with microdeletions of the Y chromosome: the role of genetic counseling. Human Reproduction, 14; 2166, 1999.
- 29- **Brandell RA, Mielnik A, Liotta D, Ye Z, Veeck LL, Palermo GD, Schelegel PN:** AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: Preliminary report of a prognostic genetic test. Human Reproduction, 13(10); 2812, 1998.
- 30- **Mulhall JP, Reijo R, Alapaggan R:** Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster are capable of completing spermatogenesis: Fertilization, normal embryogenic development and pregnancy occur when retrieved testicular spermatozoa is used for intracytoplasmic sperm injection. Human Reproduction, 12; 503, 1997.
- 31- **Girardi SK, Meilnik A, Schelegel PN:** Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. Human Reproduction, 12; 1635, 1997.
- 32- **Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B:** Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. Fertility and Sterility, 67; 542, 1997.
- 33- **Van Golde RJ, Wetzels AM, Graaf R, Tuerlings J:** Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor region of the Y chromosome. Human Reproduction, 16; 289, 2001.
- 34- **Kleiman SE, Lagziel A, Yogev L, Botchan A, Paz G, Yavets H:** Expression of CDY1 may identify complete spermatogenesis. Fertility and Sterility, 75(1); 166, 2001.

YORUM:

Y kromozomu delesyonları ilk kez Tiepolo ve Zuffardi tarafından infertil erkeğin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Yazarlar 28 vakalık AZFa, AZFb, AZFc delesyonlarını YDDS (Y Deletion Detecting Systems, V 1.1 Promega, USA) yöntemleri ile değerlendirmiş, azoospermik grupta %27.7, oligozoospermik grupta (yazarlar ciddi oligozoospermiiyi 5 milyon/cc altında kabul etmelerine rağmen) %20 oranında delesyon bulmuşlardır.

Literatürde AZFa'nın sertoli cell only, AZFb'nin spermatogenik arrest, AZFc'nin hipospermatogenez ile ilişkili olduğu bilinirken yazarlar belki de vaka azlığı nedeniyle kromozom delesyonları ve testis biyopsileri arasında bir korelasyon bulamamıştır.

Güncel bilgi olarak periferik lökositlerdeki delesyon oranları testisten alınan örneklerden düşük olabilir.

Y kromozom delesyonlarının araştırılması, TESE-ICSI yöntemleri uygulanacak hastalarda testiste sperm varlığı için prognostik faktör olarak kullanılabilir.

Prof. Dr. Ateş Kadioğlu
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı, İstanbul