



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AZOSPERMİK ve AĞIR OLİGOZOOSPERMİK VAKALARDA
OTOZOMAL RESESİF GEN KUSURLARININ ARAŞTIRILMASI**

GÖZDE GİRGİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd.DOÇ. DR. İLTER GÜNEY

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

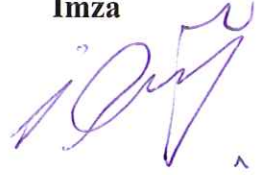
Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi : Gözde GİRĞİN
Tez Başlığı : Azospermik ve Ağır Oligozoospermik Vakalarda Otozomal
Resesif Gen Kusurlarının Araştırılması.
Sınav Yeri : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Sınav Tarihi : 04.01.2013

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. İlter GÜNEY
(Danışman)

M.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

İmza



Prof. Dr. Ayşe ÖZER

M.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD



Doç. Dr. Cem AKBAL

M.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 10.../01/2013. tarih ve 30.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

12.12.2012
Gözde GİRGIN



I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamdaki değerli bilimsel katkıları, öğrenciliğim süresince gösterdiği ilgi, sabır ve anlayıştan dolayı tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. İlter Güney'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi birikimlerinden ve görüşlerinden faydalandığım Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ayşe Özer'e,

Değerli bilgilerinden istifade ettiğim, bana her alanda destek olan sayın hocalarım Doç. Dr. Mustafa Akkiprik ve Yrd. Doç. Dr. Can Erzik'e,

Örneklerimi temin etmemde gösterdikleri yardımlardan, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştıklarından ötürü Doç. Dr. Cem Akbal ve Zeynep Kamil Kadın Ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Bölümü Op.Dr. Abdullah Arman Özdemir'e,

Tez çalışmamdaki emekleri, manevi destekleri ve dostluklarından ötürü sevgili arkadaşlarım İrem Peker, Gökçe Güllü, Pınar Gültepe, Merve Orkun, Tuba Avcılar, Gülşah Koç, Aylar Tafazzoli, Hande Kazan'a,

Tez çalışmam sürecinde yardımlarından ötürü Kenan Delil, Mehmet Ali Söylemez, Serap Sevil Şahin, Melike Avşar, Şebnem Uludoğan, Enise Çavuşoğlu, Zehra Kaya, Ebubekir Dirican, Çiğdem Albayrak, Neslihan Haklıgür ve Zeynep Avar'a,

Tüm çalışmalarımız süresince bize her zaman düzenli ve temiz bir çalışma ortamı sağladığı için Reyhan Baş'a,

Dostluklarını ve manevi desteklerini bana her zaman hissettiren sevgili arkadaşlarım Gülçin Yaşar, Nagihan Aktaş, Özgür Uzun'a,

Tüm bu süreç boyunca her zaman yanımda olan, sevgisini, ilgisini ve desteğini asla esirgemeyen sevgili Toluy Özgümüş'e,

Hayatımın her döneminde bana destek olan, beni cesaretlendiren, sevgi ve emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen biricik anne ve babama, ablam Özge Big ve abim Taylan Big'e sonsuz teşekkürler ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığınca, SAG-C-YLP-040112-0001 nolu proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

I. Teşekkür	i
II. İçindekiler	ii
III. Şekil ve Tablo Listesi	vi
IV. Kısaltma ve Simgeler	viii

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1 İnfertilite	7
4.1.1 Kadın İnfertilitesi ve Başlıca Nedenleri	9
4.1.1.1 Yumurtlama (Ovulasyon) Kusuru	9
4.1.1.2 Fallop Tüplerinin Tıkalı Olması	9
4.1.1.3 Rahim Ağzı Salgısının Sperm Geçişi İçin Uygun Olmaması (Servikal Faktör)	10
4.1.1.4 Endometriyozis	10
4.1.2 Erkek İnfertilitesi	10
4.1.2.1 Erkek Üreme Sistemi ve Erkek Genital Yapılarının Gelişimi	10
4.1.2.2 Spermatogenez	12
4.2 Normal Sperm Hücresi	20
4.2.1 Sperm Bağlantı Parçası (connecting piece)	21
4.2.2 Orta Bölüm (midpiece)	22
4.2.3 Esas Parça (principle piece)	22
4.2.4 Son Parça (terminal piece)	22
4.2.5 Aksonem	23
4.2.6 Fibröz Kılıf (FS)	23
4.2.7 Mitokondrial kılıf	23
4.2.8 Sitoplazmik Damlacık	23

4.2.9 Epididimal Sperm	24
4.3 Spermatogenezin Kontrolü	24
4.3.1 Spermatogenezin Hormonal Kontrolü	24
4.3.1.1 Hipotalamus	25
4.3.1.2 Hipofiz	25
4.3.1.3 Hipotalamik ve Hipofizer Aksın Pubertal Gelişimi	26
4.3.1.4 Testis	27
4.3.1.5 Posttestiküler Transport	29
4.3.2 Spermatogenezin Genetik Kontrolü	31
4.3.3 Spermatogenez Etkileyen Faktörler	33
4.3.3.1 Endokrin Faktörler	33
4.3.3.2 Diğer Faktörler	34
4.4 Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri	35
4.4.1 Erkek İnfertilitesi	35
4.4.1.1 Sperm Bulgularına Göre	37
4.4.1.2 Etiyolojisine Göre	39
4.4.1.3 İdiyopatik İnfertilite	52
4.4.1.4 Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenlerinin Araştırılması İçin Model Olarak Kullanılan Organizmalar	52
4.5 İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi	59
4.5.1 İnfertilite Değerlendirmesinde Erkek Yapılan Araştırmaların Amacı	59
4.5.2 Temel Değerlendirme	60
4.5.3 Medikal ve Üreme Hikayesi	60
4.5.4 Fizik Muayene	61
4.5.5 Semen Analizi	62
4.5.5.1 Semen Toplanması	63
4.5.5.2 Semen Makroskopik Değerlendirilmesi	63
4.5.5.3 Semen Mikroskopik Değerlendirmesi	64
4.5.6 Diğer Tetkikler	68
4.5.7 Erkek İnfertilitesinde Endokrin Değerlendirme	68
4.5.8 Ejakülasyon Sonrası İdrarda Sperm Aranması	70
4.5.9 Radyolojik Değerlendirme	70

4.5.10 Testis Biyopsisi	70
4.5.11 Sperm ve Semene ait Spesifik testler	71
4.5.12 Genetik Araştırma	72
5. GEREÇ VE YÖNTEM	73
5.1 Hasta Grubu	73
5.1.1 Çalışmaya Dahil Etme Kriterleri	73
5.1.2 Çalışma Dışı Bırakma Kriterleri	73
5.2 Gereçler	74
5.2.1 Kullanılan Aletler	74
5.2.2 Kullanılan Kimyasallar	75
5.2.3 Kullanılan Sarf Malzemeleri	76
5.3 Yöntemler	77
5.3.1 Periferik Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	77
5.3.2 Genomik DNA'nın Niceliksel ve Niteliksel Analizi	78
5.3.3 Genomik DNA Enzimatik Etiketleme Kiti ile Restriksiyon Kesimi	78
5.3.4 Genomik DNA'nın Floresan İşaretlemesi	80
5.3.5 Etiketlenmiş gDNA'nın Temizlenmesi	82
5.3.6 Ürün Miktarı ve Spesifik Aktivite Hesaplanması	82
5.3.7 Etiketlenmiş gDNA'nın Hibridizasyona Hazırlanması	84
5.3.8 Mikroarray Hibridizasyonu	85
5.3.9 Hibridizasyon Sonrası Yıkama	85
5.3.10 Mikroarray Taratılması	86
5.3.11 İmaj Dosyalarının Analizi	87
6. Bulgular	91
6.1 DNA Konsantrasyon Sonuçları	91
6.2 Mikroarray Sonuçları	92
7. Tartışma ve Sonuçlar	110
8. Kaynaklar	117
9. Özgeçmiş	139

III. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

Şekil 1. Spermatogenez	15
Şekil 2. Spermatogenezde birinci ve ikinci mayotik bölünme	19
Şekil 3. Spermatozoa yapısı	21
Şekil 4. Hipotalamus-Hipofiz-Testis aksı	27
Şekil 5. İnsan tetisininde seminifer tübüller, epididimler ve duktus deferens	29
Şekil 6. Testis, epididim, duktus deferensin şematik gösterimi	31
Şekil 7. Y Kromozomunun fonksiyonel haritası	45
Şekil 8. Y Kromozomunun yüksek rezolüsyon bandlanması ve haritalanması	48
Şekil 9. Mikroarray lamının lam tutucuya yerleştirilmesi ve ozon-bariyer lam kapağının kapatılması işlemi	86
Şekil 10. Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımının standart ayarları	87
Şekil 11. Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımının verdiği CGH kalite kontrol raporu örneği - 1	89
Şekil 12. Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımının verdiği CGH kalite kontrol raporu örneği – 2	89
Şekil 13. Hibridizasyon işleminin doğru yapıp yapılmadığını kontrol edebildiğimiz rapor.	92
Şekil 14. Kırmızı ve yeşil sinyallerin dağılımı	93
Şekil 15. Kırmızı ve yeşil sinyallerin dağılımı	94
Şekil 16. 2 Renk Microarray sonucu	95
Şekil 17. İkiz kardeş azoospermik örneklerin gen kusurlarının kromozomlar üzerinde bir arada görüntülenmesi	108
Şekil 18. İkiz kardeş azoospermik örneklerin aynı kromozomun ayı bölgesinde bulunan gen kusurlarının bir arada görüntülenmesi	108
Şekil 19. Tüm örneklerin amp/del/LOH bölgelerinin bir arada görüntülenmesi	109

Tablo 1. Sperm miktar değerlendirmesi	38
Tablo 2. Erkek faktör infertilitesi etiyolojik nedenleri ve sıklığı	39
Tablo 3. İnfertil erkeğin sorgulanmasında öykü	60
Tablo 4. İnfertil erkeğin sorgulanmasında fizik muayene	62
Tablo 5. Semen analizinin referans değerleri	63
Tablo 6. Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi	67
Tablo 7. Serum hormonları ile erkekte klinik bulgular arasındaki ilişki	69
Tablo 8. Erkek infertilitesi ile birlikte görülebilecek durumlar	71
Tablo 9.1 Mikroarray başına gerekli başlangıç gDNA miktarı	79
Tablo 9.2. Ana kesim karışımının hazırlanışı	79
Tablo 9.3. Uygulanan ısı döngüleyici programı	80
Tablo 9.4. DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu için uygulanan ısı döngüleyici programı	81
Tablo 9.5. Etiketleme ana karışımı hazırlanışı	81
Tablo 9.6. DNA etiketlemesi için uygulanan ısı döngüleyici programı	82
Tablo 9.7. Beklenen spesifik aktivite ve ürün miktar değerleri	83
Tablo 9.8. Hibridizasyon ana karışımı hazırlanması	84
Tablo 9.9. Uygulanan ısı döngüleyici programı	84
Tablo 9.10. Enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri	88
Tablo 10. Hasta numaraları ve sperm sayı ve miktarına göre tanıları	90
Tablo 11. DNA absorbans ölçümleri	91
Tablo 12. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları	96
Tablo 13. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları	97
Tablo 14. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları	98
Tablo 15. Hastalarda gözlenen heterozigosite kayıplarının olduğu bölgeler	99
Tablo 16. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları	100
Tablo 17. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları	101
Tablo 18. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları	102

Tablo 19. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları	103
Tablo 20. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları	104
Tablo 21. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları	105
Tablo 22. Örneklerde gözlenen gen kusurlarının bulunduğu kromozom bölgeleri	106

IV. KISALTMALAR ve SİMGELER

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein

AMH: Antimüllerian Hormonu

AR: Androjen Reseptör

Array CGH: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

ASA: Anti Sperm Antikoru

ASA: Antisperm Antikorlar

ATP: Adenozin Tri Fosfat

ATP: Adenozin Trifosfat

AZF: Azoospermi Faktörü

cAMP: Siklik Adenozin Mono Fosfat

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

CBAVD: Konjenital Bilateral Vaz Deferens Yokluğu

CF : Kistik fibrozis

CFTR : Kistik fibrozis transmembran taşıma regülatörü

CLIA: Clinical Laboratory Improvement Amendmends

CPE: Korona Penetran Enzim

Dax-1: orphan nuclear receptor

DAZ: Deleted in Azoospermia

DAZLA: DAZ like Autozomal

DBY: Dead Box Polypeptide Y

DHT: Dihidrotestosteron

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DYS1: Y kromozomu proximal uzun kol üzerinde bulunan ökromatik bölge

DYZ: Y kromozomu distal uzun kol üzerinde bulunan heterokromatik bölge

E2: Östradiol

FISH: Floresan in situ hibridizasyon analizi

FS: Fibröz Kılıf

FSH : Folikül stümüle edici hormon

gDNA: Genomik DNA

GER: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GH: Büyüme Hormonu
GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCC: Hepatocellüler carcinoma
hCG: İnsan Koryonik Gonadotropin
hMG: İnsan Menopozal Gonadotropin
ODF: Outer dense fibers
PABY1: Y kromozomu kısa kolu üzerinde yer alan psodootozomal sınır
(Pseudootozomal Boundry region on Y chromosome)
PABY2: Y kromozomu uzun kolu üzerinde yer alan psodootozomal sınır
(Pseudootozomal Boundry region on Y chromosome)
PI-3 K: Fosfoinositid 3 Kinaz
PKA: Protein Kinaz
PSA: Prostat Spesifik Antijen
PTH: Paratiroid Hormon
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBM : RNA bağlayıcı motif
RBMV: Y Kromozomu Uzerinde Yer Alan RNA Bağlayıcı Motif
RNA: Ribo Nükleik Asit
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
RSA: Rekürren spontan abortus
SCOS : Sertoli Cell Only Sendromu
SDI: Sperm Deformite İndeksi
SHBG: Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin
SNP: Tek nükleotid polimorfizmi
SOX9: SRY-box containing gene 9
SRVX : X'e Bağlı Cinsiyet Donusturucu Lokus
SRY: Y-kromozomu Seks Belirleyici Bölgesi
TDF: Testis Determining Factor (testis belirleyici faktör)
TESE: Testikuler Sperm Ekstraksiyonu
TRUS: Trans Rektal Ultrasonografi
TZI: Teratozoospermi İndeksi

USG: Ultrasonografi

UVY: Vaz deferensin konjenital unilateral yokluğu

ÜYTY: Üremeye Yardımcı Tedavi Yöntemleri

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

Yp: Y kromozomu kısa kolu

Yq: Y kromozomu uzun kolu

ZFY: Zinc Finger Protein (Y'ye bağlı)

SİMGELER

μ: Mikron

μl: Mikrolitre

μm: Mikro Metre

cm: Santimetre

α: Alfa

β: Beta

μg: Mikrogram

1. ÖZET

İnfertilite toplum sağlığı açısından önemli bir sorun teşkil etmektedir ve yapılan çalışmalar her 100 çiftten yaklaşık 15 tanesinin infertil olduğunu ve bu infertil olan %15'lik kesimin %50 sinin de erkek infertilitesi olduğunu göstermektedir. Bugüne kadar, spermin yapısını ve fonksiyonunu etkileyen çevresel faktörler de dahil birçok faktör üzerinde durulmuş ancak buna rağmen birçok vakada infertiliteye neden olan faktör (ler) aydınlatılamamıştır. Erkek infertilitesi genetik açıdan ele alındığında; kromozomal düzensizlikler ve gen mutasyonlarının önemli etkenler olabileceği bilinmektedir. Bu çalışmada da azospermik ve ağır oligozoospermik vakalarda erkek infertilitesine neden olan ve otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren gen mutasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada özel hazırlanmış anket formları doldurularak ve özellikle çevresel faktörlerden arındırılmış, kan bağı evliliklerin bulunduğu, 2'den fazla infertil bireyin yer aldığı ailelerden alınan örneklerin çalışılmasına dikkat edilmiştir. Çalışmamızda 14 ağır oligozoospermili, 6 azospermili toplam 20, Türk, erkek hastaya ait kan örnekleri array teknolojisi ile incelenmiştir. Bu teknoloji bir genomdaki gen kopyalarının tanımlanmasında, mutasyon ve tek nükleotid polimorfizminin belirlenmesinde, yeni ilaçların bulunmasında ve geliştirilmesinde geleneksel moleküler yaklaşımlara üstünlük sağlamaktadır. Erkek infertilitesine neden olan otozomal gen kusurlarının bildirildiği az sayıda çalışma literatürde bulunmaktadır. Çalışmamızda "Spermatogenesis-associated protein" SPATA gen ailesinin üyeleri ve spermatogenezde görevli olduğu bilinen bazı otozomal genlerin kusuru gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarla, hem kişiye hem de ailesine uygun genetik danışma verilebilecek ve böylelikle hem birey hem de aile fertleri geleceğe yönelik kararlar alabilecektir. Ayrıca bu sonuçlar yardımcı üreme tekniklerinden doğru olanının seçilmesinde bireye yardımcı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Azospermi, oligozoospermi, infertilite, microarray, Sertoli cell only sendromu

2. SUMMARY

Investigating Autosomal Recessive Gene Defects In Severe Oligospermic and Azoospermic Men

Infertility is a serious public health issue and studies show out of every 100 couples, 15 are infertile. Furthermore; 50% of these couples suffer from male factor infertility. Although many studies on sperm structure and functions have investigated many factors effecting these including environmental factors, ethiologies of many infertility cases are yet to be enlightened. From a genetic perspective, chromosome irregularities and genetic mutations are important causes of male infertility. The aim of this study is uncovering autosomal recessive genetic mutations in oligospermic and azoospermic infertile men. Patients included in the study were required to fill special survey forms to exclude environmental factors, and to choose patients with consanguinous marriages and patients with at least 2 infertile people on thier family. Blood samples of 20 Turkish men; 6 of whom were azospermic, and 14 severe oligospermic, were evaluated using array technology. Array technology is superior to traditional molecular methods in defining genes in the genome, discovering single nucleotide polimorphisms, and new treatment methods. Very few studies have investigated otosomal recessive defects causing male infertility. In this study, several genes in the “Spermatogenesis-associated protein” SPATA family, as well as a few genes known to play roles in spermatogenesis were found defective. These results will guide physicians in genetic consultation for both the patients and their families, and also guide them in choosing the best assisted reproductive therapy.

Key words: Azoospermia, oligozoospermia, infertility, microarray, Sertoli cell only syndrome

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite; iki yıllık bir süre içerisinde düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin meydana gelmemesi durumu olarak tanımlanır (Poongothai et al. 2009). Dünya genelinde üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık olarak %15'i infertildir, ve bunların da %50'si erkek infertilitesi kaynaklıdır (Poongothai et al. 2009, Lipshultz & Howards 1997).

Erkek infertilitesi çok çeşitli nedenlerden kaynaklanabilen multifaktöryel bir sendromdur ve infertil erkeklerin %50'sinin infertilitesinin nedeni bilinmemektedir yani idiopattiktir ve konjenital veya edinilmiştir (Poongothai et al. 2009, Rucker 1998). Erkek infertilitesine neden olan pek çok etmenden bazıları moleküler ve sitogenetik yöntemlerle incelenen kromozomal düzensizlikler ve gen mutasyonları olabilir (Layman 2002). Bunlardan özellikle Y kromozomunun uzun kolu üzerinde yer alan AZFa, AZFb, AZFc mikrolelesyonları erkek infertilitesinin önemli sebeplerindendir (Vogt et al. 1996). Spermsiz ejakulatı olan erkeklerin %10-20 kadarı da Y kromozom delesyonu taşımaktadır.

Erkek infertilitesi semen analizi ile teşhis edilebilir. İnfertil erkeklerin seminogramı birçok anormal durum ortaya koyabilir; azoospermi, oligozoospermi, teratozoospermi, astenozoospermi gibi. İnfertil çiftlere yaklaşımda ilk olarak uygulanması gereken ayrıntılı bir sperm analizidir çünkü erkeğe ait sorun çoğunlukla sperm parametrelerinde bozulma ile ortaya çıkmaktadır (Johnson 1986). Ayrıntılı semen analizlerinde, semen kalitesi, ejakulat içerisindeki sperm sayısı, spermin motilitesi ve morfolojisi değerlendirilir. Ejakulat içerisindeki sperm sayısı az ise oligospermi, sperm hiç yok ise azoospermi, sperm hareketsiz ise astenozoospermi, hareketliliğin az olmasının yanı sıra spermin morfolojisi de bozuk ise astenoteratozoospermi olarak adlandırılır. Globozoospermi ise; infertil hastaların yaklaşık %1 kadar kısmını kapsayan ender bir durumdur ve akrozomsuz, yuvarlak başlı spermatozoa ile karakterizedir (Schirren et al.1971). Akrozomunun olmaması nedeniyle globozoospermik spermatozoa zona pelusidaya bağlanamaz (Aitken et al. 1990) ve oosit oolemması ile birleşemez (Dale et al. 1994) ve böylece döllenme meydana gelmez. Globozoospermik erkekler infertil olmalarına rağmen

intrasisitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) tedavi yöntemiyle çeşitli fertilizasyon başarıları elde edilmiştir (Lundin et al. 1994, Stone et al. 2000 Zeyneloglu ve ark. 2002).

Azospermi usulüne uygun alınan en az iki semen örneğinin ayrıntılı incelemesinde sperm hücrelerinin bulunmamasıdır. Azospermi obstruktif ve non-obstruktif olarak iki sınıfa ayrılır. testiküler patoloji non-obstruktif azospermi (NOA) ile ilişkili bir durumdur (Vicdan A ve ark. 2004).

Sperm morfolojisi bir erkeğin fertilitatesini belirleyen en önemli özelliktir (Nikolettos et al. 1999). Açıklanamayan oligozoospermi ve azospermiler sayısal ve yapısal kromozom anomalilerine sahiptirler (Chandley 1998).

Erkek infertilitesindeki çevresel faktörler kromozomal düzensizlikler, mitokondrial DNA (mtDNA) mutasyonları, tek gen mutasyonları, multifaktöriyel bozukluklar, ve endokrin bozukluklar olarak genellenebilir. Ayrıca çevresel etmenlerin de erkek infertilitesinde çok büyük rolü vardır. İdiopatik erkek infertilitesinin üreme hormonlarını, spermatogenezi ve sperm fonksiyonlarını etkileyen toksik maddeler ile ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle yapılan araştırmalarda çevresel faktörlerin de göz önüne alınmasının önemi vardır. Yaşam stili ve çevresel etmenler (sigara kullanmak gibi) gamet oluşumunu etkileyerek subfertilite/infertiliteye neden olabilir (Benoff 2000). En iyi bilinen ve en sık rastlanan erkek infertilitesinin nedenleri; kromozomal anomaliler, kistik fibroz transmembran reseptör geninde (CFTR) mutasyonlar ve Y kromozom mikrolelesyonlarıdır. Ayrıca son yapılan çalışmalarla, erkek üreme fonksiyonları ve spermatogenezde rol oynayan çeşitli genlerin mutasyon ve polimorfizmleri de erkek infertilitesiyle ilişkili bulunmuştur (ör: SPATA 16, AUKRC). İnfertil hastaların aileleriyle yapılan çalışmalar, ailesel erkek infertilitesinde otozomal resesif kalıtım mekanizmasının önemli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle akraba evliliklerinde infertil erkek vakaların görülme sıklığı artmaktadır.

Fonksiyonel testis gelişiminde ve bunun sonucunda da erkek fenotipinin ekspresyonunda önemli rol oynayan faktörlerden biri de testis yapısında yer alan sertoli hücreleridir. Sertoli hücrelerinin fiziksel ve metabolik desteği olmadan germ hücre farklılaşması, mayoz ve spermatozoa transformasyonu gerçekleşemez (Sharpe 1994).

Yetişkinlerin testislerinde sertoli hücrelerinin sayısı testis büyüklüğü ve günlük sperm üretimini belirler (Orth et al.1988). Sertoli-cell-only sendromu (SCOs) veya germ hücre aplazisi; testis histolojilerinde Seminifer tub llerin sadece Sertoli hücreleri içerdiği, tüm germ hücrelerinin ise komplet bulunmadığı durumdur. İlk defa Del Castillo tarafından 1947'de tanımlanmıştır ve testiküler biyopsi ile belirlenir. SCOs geri dönüşsüz bir infertilite olarak nitelendirilir. Ağır testiküler yetmezlik ve fonksiyon bozuklukları fetal veya erken dönemde sertoli hücrelerinin anormal gelişimi veya proliferasyonu sonucu oluşabilir.

Son yıllarda erkek infertilitesine neden olan mutasyonları tanımlamak için DNA mikroarray teknolojileri kullanılmaktadır. DNA mikroarray teknolojisi; hücre ve dokularda gen ekspresyonu profillerindeki global değişikliklerin araştırılmasında kullanılan yeni ve güçlü bir teknolojidir (Schena et al. 1995).

Genomik DNA 'dan transkripsiyona uğrayan genlerin tamamına transkriptom veya gen ekspresyon profili adı verilir ve bir hücrenin fenotipi ve fonksiyonu gen ekspresyon profili tarafından belirlenir. Genom bir organizmadaki tüm hücrelerde aynı olmasına karşın , gen ekspresyon profili hücrenin içinde bulunduğu koşullara göre hızla değişebilen yapıdadır. Farklı koşullardaki genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler incelenerek bu genlerin kodladığı proteinlerin fonksiyonları hakkında bilgi edinilebilir (Sassanfar et al. 2003).

DNA mikroarray teknolojisi, birçok genin aktivitesinin aynı anda izlenebilmesi, hızlı bir yöntem olması, hasta ve sağlıklı hücrelerdeki genlerin aktivitelerinin karşılaştırılmasını sağlaması ve hastalıkları alt gruplar halinde kategorize edebilme gibi yönleriyle çok sayıda avantaj sağlamaktadır. Array teknolojisi bir genomdaki gen kopyalarının tanımlanmasında, mutasyon ve tek nükleotid polimorfizminin belirlenmesinde, yeni ilaçların bulunmasında ve geliştirilmesinde geleneksel moleküler yaklaşımlara üstünlük sağlamaktadır (Kumar et al. 2005). DNA mikroarray çeşitlerinden biri olan SNP mikroarray'ler de, bireylerde ve popülasyonlarda genetik varyasyonu belirlemek için kullanılan özel bir çeşit array tipidir. Genetik çeşitlilikten ve genetik hastalıklara yatkınlıktan sorumlu olduğu düşünülen tek nükleotid polimorfizmlerini (single nucleotide polymorphisms–SNP) belirlemede kullanılmaktadır. Genel olarak genotip belirleme olarak adlandırılan bu tip mikroarray uygulamaları adli tıp çalışmalarında,

hastalıklara genetik yatkınlığın hızlı bir şekilde bulunmasında ya da DNA temelli ilaç adaylarının tanımlanmasında kullanılabilir. SNP mikroarray'leri ayrıca kansere neden olan somatik mutasyonların, özellikle de heterozigote kaybının ya da DNA bölgelerinin artan ya da kaybedilen (delesyon) profillerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Alan & Wright 2005).

Bu çalışmada özellikle azospermik ve ağır oligozoospermik vakalarda erkek infertilitesine neden olan ve otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren gen mutasyonlarının belirlenmesi amacıyla; çevresel faktörlerden arındırılmış, özellikle akraba evliliklerinin bulunduğu ve en az 3 infertil bireyin yer aldığı aileler hasta grubu olarak seçilmiştir. Akraba evliliği, genetik hastalıkların epidemolojisini etkileyen önemli etmenlerden biridir. Bilindiği gibi ülkemiz akraba evliliklerinin sık görüldüğü ülkelerdendir (~ %21.2). Akraba evlilikleri, kişilerin ortak bir atadan gelmeleri ve aynı mutant geni taşıma risklerinin artması nedeniyle resesif genlerin birbirleriyle karşılaşma olasılığını artırır ve genetik hastalıkların görülme sıklığı da artar. Bu nedenle özellikle ülkemizde doğum öncesi genetik testlerin yapılması ve sonrasında genetik danışma verilerek hasta ve ailesinin bilgilendirilmesi çok önemlidir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 İnfertilite

Çiftlerin çocuk sahibi olma isteklerine ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen, bir yıl içerisinde gebelik elde edilememesine infertilite (kısırlık) adı verilmektedir. Korunmasız cinsel ilişkide bulunan çiftlerin %80'inde 1 yıl içerisinde gebelik oluşmaktadır. Yaklaşık %10'luk bir dilimde ise iki yıl içerisinde gebelik oluşur. Toplumda yaklaşık %10-15 oranında infertil çift vardır (Feng 2003).

İnfertilite yaklaşık %50 oranında kadına, %50 oranında erkeğe ait nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Çiftlerin %25'inde erkek ve kadın faktörü birlikte bulunurken, %10-15'inde tüm araştırmalara karşılık infertiliteyi açıklayabilecek bir neden belirlenmemektedir. Erkek infertilitesinin açıklanamayan idiyopatik formlarında (~%40), kronik stres, çevresel şartlara bağlı endokrin sistem bozuklukları, reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres ile bazı genetik anomaliler etkili olabilirler (Oehninger 2001).

İnfertilitede eğer erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bir bozulma ile ortaya çıkar. Oysa sperm değerleri normal olsa da cinsel fonksiyon bozuklukları ya da penil deformiteler gibi sorunlarda infertilite nedeni olabilir. Ayrıca, spermin kalitatif bozuklukları da her zaman standart testlerle ortaya çıkarılamayabilir. Özellikle kromatin hasarları, fertilizasyon ve embriyo gelişim bozukluğu durumları da son yıllarda üzerinde sık durulan konular arasındadır. Ortadan kaldırılması ile sağlıklı gebeliklerin elde edilebileceği birçok çevresel faktör, değişik mekanizmalarla spermatozoanın kapasitasyonunu ve neticede oosit ile etkileşimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Tedaviden yeterli sonuç alınabilmesi için, tanının iyi konması gerekir. Örneğin obstrüksiyon ve hipogonadotropik hipogonadizm tedavi edilebilir patolojiler arasında sayılırken, viral orşite bağlı sekonder bilateral testis atrofisi geri döndürülemez hasardır. Ayrıca, bazı azospermik erkeklerin testislerinde aktif spermatogenez odakları mevcut olup, tedavi ile sperm yapımı uyarılabilir. Eğer semen analizindeki bozulmanın nedeni ortaya konulamaz ise "idiyopatik infertilite" olarak tanımlanır. Tam değerlendirilmesi neticesinde, düzeltilemeyecek bir patolojiye sahip olduğunun anlaşılması, erkeğin

gereksiz ve stres yaratacak uzun tedavi protokolleri içerisinde girmesini önler. Böyle çiftler ejakülat spermi ya da epididim veya testislerden elde edilecek spermlerin, in vitro fertilizasyon (IVF) / intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI)'nda kullanılması ile çocuk sahibi olabilirler. Bütün bunlara ek olarak, altta yatan nedenin genetik olduğunun bilinmesi, doğacak çocuğun maruz kalabileceği anomaliler hakkında ailenin önceden bilgilendirilmesi bakımından son derece önem taşır. Bütün bu nedenler sonucunda, infertilite olgularında erkeğin ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi çok önemlidir. Diğer yandan, sağlıklı bir gebeliğin başarılabilmesi için optimal değerlendirme protokolü içerisinde erkek faktörünün normal bulunmasının yanı sıra kadında ovulasyon, tubaların açıklığı ve fonksiyonel durumu, uterus kavitesinin durumu ile servikal faktörlerin de ortaya konmuş olması gerekir (Kadioğlu ve ark. 2004).

İnfertil çiftlerin %50-60'ı IVF (In Vitro Fertilizasyon), ICSI (İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu) gibi ileri yardımcı üreme teknikleri haricindeki yöntemler ile (hormon tedavisi, cerrahi müdahaleler ya da yapay dölleme) çocuk sahibi olabilmektedir. İnfertilite tanısı alan çiftlerin %15-20'sinde de hiçbir tedavi yapılmadan kendiliğinden gebelik oluşmaktadır. Bazı çiftlerde ise yumurta ve/veya sperm sayısının artırılması ya da yumurtalarla spermin bir araya getirilmesi için düzenlenen daha ileri, özel tıbbi tekniklere başvurulması gerekir. Bunlar "yardımlı üreme teknikleri" olarak adlandırılır.

Doğal yollarla gebeliğin oluşması için eşlerin fizyolojik işlevlerinin normal olması gerekir. Üreme potansiyeline sahip, sağlıklı bir kadının yumurtalıklarında (ovaryum) her ay bir yumurta gelişmeye başlar ve yaklaşık 2 hafta sonra, olgunlaşan bu yumurta (ovum), içinde bulunduğu sıvı dolu keseciğin (folikül) çatlamasıyla atılır (ovulasyon). Atılan bu yumurta rahim (uterus) ile yumurtalıkları birbirine bağlayan fallop tüplerinin parmak şeklinde çıkıntılar içeren uç kısmı (fimbria) tarafından tüp içine alınarak ritmik hareketler yardımıyla uterusu doğru ilerler. Yumurtlama (ovulasyon) döneminde uterus ağzındaki salgının, cinsel temas sonrası hareketli spermlerin uterusu geçişine izin verecek özellikte olması gerekir. Uterus içine ulaşan spermlerin hareketli, normal görünümlü ve sayıca yeterli olmaları önemlidir. Uterus içerisinden geçip fallop tüplerine ulaşan spermlerden dölleme yeteneğine sahip olan bir tanesi yumurtanın etrafındaki zarı (zona pelusida) delerek yumurta içine girer ve

böylece döllenme (fertilizasyon) işlemi tamamlanmış olur. Döllenmiş ovum, tüp içerisinde uterus doğru ilerlerken bir yandan da bölünmeye başlar ve embriyo oluşur. Embriyo uterus ulaştığında, ovaryumdan salgılanan hormonlarla uterus iç tabakasına (endometrium) tutunarak (implantasyon) gebeliği başlatır (Murathanoglu 2001, Rainsbury 2006). Gerek kadın gerekse erkeğe ait çeşitli sorunlar bu normal olayların oluşumunu engelleyerek gebeliğin gerçekleşmemesine neden olabilir.

4.1.1 Kadın infertilitesi ve başlıca nedenleri

Gebeliğin oluşumunu engelleyen kadına ait faktörler, infertilite nedenlerinin yaklaşık %50'sini oluşturur. Bunlar, ovulasyonun olmaması veya düzensiz olması, fallop tüplerinin anormal veya kapalı olması, endometriyosiz, uterus içindeki bazı sorunlar ve rahim ağzı salgısının sperm geçişi için uygun olmaması gibi nedenlerdir.

4.1.1.1 Yumurtlama (ovulasyon) kusuru

Genel olarak bakıldığında, yumurtlamaya ait sorunlar, en sık görülen infertilite nedenleridir ve genelde hormonal bir dengesizliğin sonucu olarak ortaya çıkarlar. Bu dengesizlik beyinde bulunan ve yumurtlamayı sağlayan hormonları salgılayan hipotalamustan, hipofiz bezinden veya yumurtalığın kendisine ait nedenlerden kaynaklanabilir. Sık görülen nedenleri arasında, polikistik over hastalığı, prolaktin hormonunun aşırı salgılanması, tiroid bezi ile ilgili problemler, genetik düzensizlikler, cerrahi müdahaleler, kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları ve stres bulunmaktadır (Rainsbury 2006).

4.1.1.2. Fallop tüplerinin tıkalı olması

Fallop tüplerinin çok hassas ve detaylı bir içyapısı vardır. Bu yapıdaki bir bozulma yumurtanın taşınmasını ve dolayısıyla döllenme olayını engelleyebilir. Eğer yumurtalığa yakın olan uç etkilenmişse yumurtanın yakalanıp tüp içine alınması bozulabilir. En ağır durum tüpün tamamen tıkalı olduğu durumdur. Tüpteki tıkanıklık diğer genital organlardan tüpe ulaşan enfeksiyonlardan kaynaklanabileceği gibi batin içindeki enfeksiyonlar nedeniyle de fallop tüpü hasar görebilir (örneğin apandisit). Bu tıkanıklık daha önce tüplerin bağlanma operasyonu veya batin içi cerrahi sonrasında da gelişmiş olabilir. Bunun yanı sıra dış gebelik sonucunda hasta

tüplerinden birini veya her ikisini de kaybetmiş olabilir (Rainsbury 2006). Tüp tikanıklıklarının hafif olanları, mikro cerrahiden yarar görebilir ama diğer hastalarda gebelik şansı ancak yardımcı üreme teknikleri ile elde edilebilir.

4.1.1.3. Rahim ağzı salgısının sperm geçişi için uygun olmaması (servikal faktör)

Rahim ağzı salgısı sadece yumurtlama döneminde spermilerin serbestçe geçişine izin verir. Diğer tüm zamanlarda hormonal uyarılara bağlı değişiklikler nedeniyle rahim ağzı salgısının yapısı ve kıvamı sperm için serbest geçişine uygun değildir. Bazı kadınlarda bu salgı içinde sperme karşı antikorlar bulunur ve bu kadınlarda sperm, yumurtlama zamanında bile rahim ağzı kanalından geçerek uterusu ulaşamayabilir. Antikorlar, sperm hücresine karşı bağışıklık sistemince geliştirilir ve sperm hücre fonksiyonlarını bozarlar. Bu olumsuz salgı ortamı ancak suni dölleme yöntemi veya üremeye yardımcı tekniklerden birisi kullanılarak aşılabılır (Rainsbury2006).

4.1.1.4. Endometriyozis

Endometriyozis, rahim içini döşeyen dokunun (endometriyum) başka bir bölgede (yumurtalıklar, karın içi gibi) bulunması halidir (Audebert 2005, Rainsbury 2006). Çeşitli tedavi yöntemleriyle hastalığın gelişimi durdurulabilmekte veya geriletebilmekte ise de gebelik oluşmayabilir. Bu durumda çocuk sahibi olabilme şansı yardımcı üreme teknikleri kullanılarak yakalanabilir (Rainsbury 2006).

4.1.2. Erkek infertilitesi

4.1.2.1. Erkek üreme sistemi ve erkek genital yapılarının gelişimi

Erkek üreme sisteminin organları; bir çift testis, taşıyıcı kanallar, bu kanallara açılan yardımcı üreme bezleri ve penistir. Sistemin çift fonksiyonlu organları olan testisler, hem erkek üreme hücrelerini (sperm), hem de erkek eşey hormonunu (testosteron) üretirler. Sperm üretimini seminifer tübüller, hormon üretimini ise bu tübüller arasında yer alan Leydig hücreleri üstlenmişlerdir.

Seminifer tübüller, yapıca iki esas unsurdan oluşur. Bunlardan birisi, tübülün iç kısmında yer alan ve seminifer epitel olarak adlandırılan unsurdur. İkincisi, tübülün çevresinde yer alır. Buna da peritübüler doku denilir. Seminifer epitel

hücreleri, esas olarak iki grup altında toplanırlar. Bunlar, spermatogenik hücreler ve destekleyici hücreler (Sertoli hücreleri) dir. Sertoli hücreleri, spermatogenik hücreleri destekler, korur ve gelişmekte olan spermleri besler. Seminifer tübülün içerdiği ikinci grup hücreler olan spermatogenik hücreler, tübülün çevresinden lümenine kadar olan bölgeyi tamamıyla doldururlar. Tübülde, erken gelişme evresindeki hücreler çevrede, ileri evredeki daha içte konumlanmışlardır. En dışta yer alan sperm ana hücrelerinden (spermatogonyum) çoğalma, kromozom sayısını yarıya indirme, farklılaşma gibi birbirini izleyen bir seri olaylar dizisi sonucu, spermler meydana gelir. Bu olaya spermatogenez denir. Spermatogenez sonucu oluşan spermler, spermatogenik hücrelerden ayrılır ve seminifer tübülün lümeninde birikirler (Murathanoglu 2001).

SRY (Y kromozomunun seks belirleyici bölgesi)'nin etkisiyle primitif seks kordlarının medüller bölgesindeki hücreler Sertoli hücrelerine farklılaşmaya başlarken kortikal bölgedeki hücreler dejenere olurlar. Seks kord hücreleri sadece SRY proteini varlığında Sertoli hücrelerine farklılaşırlar; aksi taktirde seks kordları ovaryan foliküllere farklılaşırlar. Yedinci haftada, farklılaşan Sertoli hücreleri testis kordlarını oluşturmak üzere organize olurlar. Germ hücreleri ile ilişki içindeki bu kordlar pubertede seminifer tübülleri oluşturacaklardır. Seminifer tübüllerin distalindeki testis kordları da bir lümen geliştirerek bir takım ince duvarlı kanallara dönüşerek rete testisi oluştururlar. Gelişen gonadın medialinde, rete testisin tübülleri mezonefrik kanaldan gelişen 5-12 adet duktuli efferentes ile birleşirler. Vaz deferens de mezonefrik kanaldan gelişir. Bu esnada, testis yuvarlak hale gelmeye başlar ve etrafındaki mezonefroza ilişkisi azalır. Testis geliştikçe, dejenere olan kortikal seks kordları tunika albuginea adını alan ve giderek kalınlaşan bir bağ dokusu tabakası kölomik (periton) epitelyumdan ayrılır. Tunika albugineanın gelişmesi fetustaki testiküler gelişmenin karakteristik ve tanısal bir özelliğidir. Giderek büyüyen testis, mezorşium adı verilen kendi mezenterine asılı hale gelir. SRY nin etkisiyle farklılaşıp, gelişen Sertoli hücreleri MIF (Müllerian- Inhibiting Factor) adı verilen bir glikoprotein hormon salgılamaya başlar. MIF, 8 ila 10 haftalar arasında paramezonefrik (Müller) kanalların hızla gerilemesine yol açar. Erişkin erkekte Müller kanalı artıkları appendiks testis ve prostatik utrikul olarak görülebilir. Dişi embriyolarda MIF olmadığı için Müller kanalları gerileme göstermez (Park 2005).

Genital kabartının mezenşimal hücrelerinden 9. ve 10. haftalarda SRY proteinine yanıt olarak Leydig hücreleri gelişir. Bu endokrin hücreler testosteron üretirler. Gelişimin erken evrelerinde testosteron üretimi plasental koryonik gonadotropin tarafından kontrol edilirken, ilerleyen aşamada pitüiter gonadotropinler kontrolü ele alır. Leydig hücrelerinin testosteron salgılaması mezonefrik kanalların vaz deferense dönüşmesini uyarır. Duktuli efferenteslerin rete testisle birleşmesi 9. haftada başlayıp 3. aya kadar sürer (Sarıkaya 2007).

Seminal veziküller distal mezonefrik kanallardan gelişirken, prostat ve bulboüretal glandlar ürogenital sinüsten gelişir. Vezikula seminalisler 10. Haftada filizlenme gösterirler. Prostat da aynı esnada pelvik üretradan endodermal tomucuklanmalar şeklinde gelişmeye başlar. Prostatın gelişimi testosteronun 5 α -redüktaz tarafından dihidrotestosterona dönüştürülmesine bağlı olarak etrafındaki mezenşim tarafından uyarılır. Prostatik tomurcuklanmalar başlangıçta 5 bağımsız solid prostatik kordlar şeklindedir. Bu kordlarda 11. haftada lümen ve glandüler asini gelişir; 13. haftada ise testosteron seviyesinin artması ile birlikte sekretuar aktivitesi başlar. Prostatın gelişimi, androjenlerin etkisi altında, mezenşim-epitel etkileşimine bağlıdır (Chung et al. 1983, Cunha et al. 1981).

4.1.2.2 Spermatogenez

İnsan vücudundaki en karışık farklılaşma olaylarından biri olan spermatogenez, spermatogoniumdan olgun spermiyumun geliştiği süreçtir (Ross et al 2003, Barratt 1995, Cooke et al 1998, Parks et al 2003). İnsanlarda tüm spermatojenik süreç yaklaşık olarak 64 gün sürer (Clermont 1972). Olgun spermatozoanın ejakülatta görülmesi ise 74 gün alır.

Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerinde meydana gelir. Bu bölgede Sertoli Hücreleri ve spermatogoniumlar olmak üzere 2 tip hücre vardır (Parks et al. 2003, Moore et al. 1998, Gartner et al. 1997). Vitellus kesesinin duvarında gelişen endodermal kökenli germ hücreleri, embriyonik hayatta testise göç ederek seminifer tübüllere yerleşir ve spermatogonium adını alırlar (Trainer 1997). Puberte öncesinde seminifer epitelin çok büyük bir kısmını Sertoli Hücreleri oluşturur (Moore et al. 1998). Spermatogoniumların gelişimi hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle puberteden hemen önce başlar, yaşam boyu devam eder ve seminifer

epiteldeki çoğunluğu ele geçirir (Moore & Persaud 1998, Parks et al. 2003, Ross & Kaye 2003).

Yetişkinde spermatogoniumların sertoli hücresine oranı yaklaşık 13:1'dir (Trainer 1997). Spermatogoniumlar, sertoli hücreleri tarafından oluşturulan bazal kompartmanda; primer ve sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiyumlar ise abdominal kompartmanda yer alır (Gartner & Hiatt 1997). Spermatogenez; spermatogonial faz, spermatosit fazı ve spermatid fazı olmak üzere 3 ayrı fazda incelenir.

Spermatogenezin evreleri spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatositler, spermatidler ve olgun spermatozoayı içerir. Öncelikle tekrarlanan hücre bölünmeleri sonucu diploid spermatogonyumlar oluşur. Ergenlikle birlikte, hücrelerden bazıları primer spermatositlere farklılaşmaya başlar. İlk mayotik hücre bölünmesi bu hücrelerde meydana gelir. Mayoz I tamamlandığında, bir primer spermatositten, her biri haploid sayıda kromozoma sahip iki tane sekonder spermatosit oluşur. Mayoz II' de, sekonder spermatositlerin her biri iki spermatit oluşturmak üzere bölünür. Böylece bir spermatosit, her biri haploid kromozom sayısına sahip dört spermatit oluşturur. Daha sonra spermatitler olgun spermatozoaya farklılaşır.

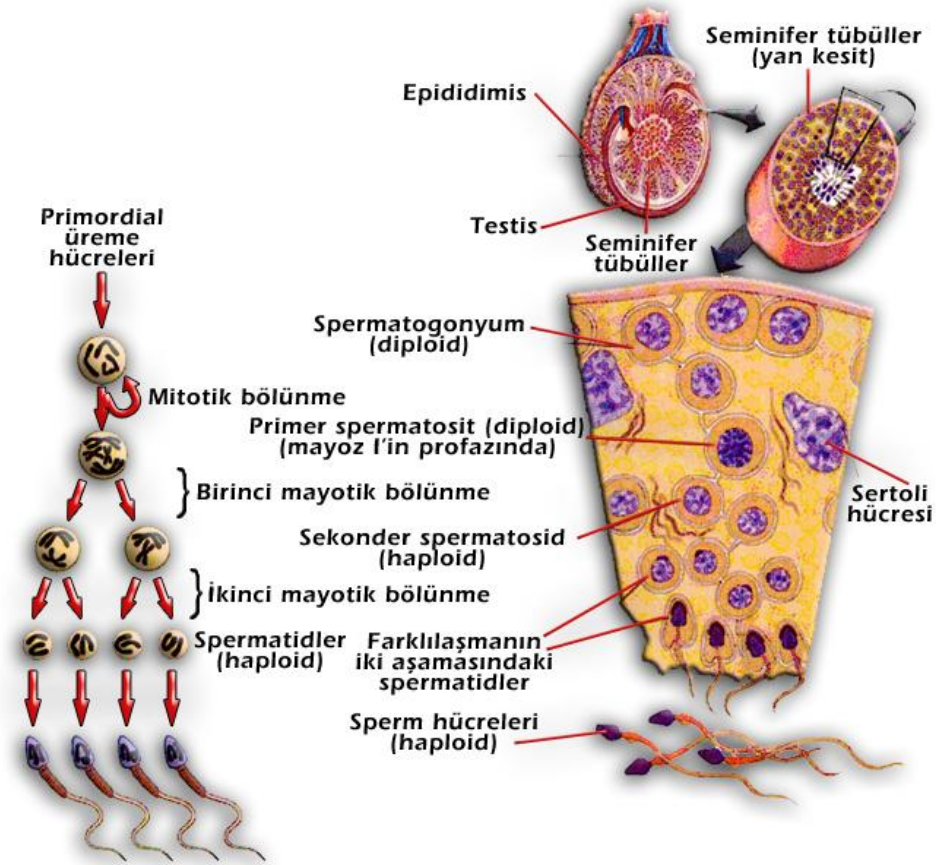
Farklılaşma ve gelişimlerini tamamlayan spermiler, Sertoli hücreleri ile olan ilişkilerini kaybederler ve tübülün lümeninde birikirler. Bunlar, morfolojik açıdan gelişmiş, ancak fonksiyonel açıdan olgunlaşmamış olan hücrelerdir. Çünkü aktif hareket yeteneklerini henüz kazanmamışlardır. Fonksiyonel olarak tam olgunlaşmaları, erkek taşıyıcı kanallarda ve ejakülasyon sonrası dişi bireyin vajinasında tamamlanır (Murathanoglu 2001).

Spermatogonyal kök hücrelerden olgun spermatozoaya kadar olan gelişim yaklaşık 65 gün sürer. Spermatogenez ergenlikte başlar ve yaşam boyunca devam eder. Bir erkek bütün yaşamı boyunca yaklaşık 10^{12} gamet üretebilir.

Normal spermatogenez; testis, ön hipofiz gonadotropinleri ve hipotalamusun uygun etkileşimine bağlıdır. Luteinleştirici hormon (LH), spermatogenez için gerekli olan testosteronun Leydig hücrelerinde yapımını uyarır. Folikül uyarıcı hormon (FSH) ise optimal Sertoli hücre fonksiyonu için gereklidir. Sertoli hücreleri

intratübüler ortamın korunmasında ve üreme hücreleri ile hormon etkileşimleri yoluyla spermatogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Rainsbury 2006).

Her bir testisi, fibrilleri arasında düz kas hücreleri bulunan düzensiz sıkı bağ dokusundan yapılı, tunika albuginea denilen bir kılıf kuşatır. İçerdiği fibriller ve düz kas hücrelerinin kasılmaları sonucu, testis üzerine yapılan basınçla, seminifer tübüllerinde oluşan spermier, taşıyıcı kanallara doğru yönelirler (Murathanoglu 2001). Düz kas hücrelerinin kasılması sonucu, ekstratestiküler taşıyıcı kanallardan biri olan epididimis kanalı da kasılır ve bu yolla, henüz aktif hareket yeteneklerini kazanmamış olan spermier, pasif olarak epididimiste ilerlemiş olurlar. Spermier gelişimlerini tamamladıktan sonra epididimise taşınırlar ve bu kanaldan geçerken, hareketlilik ve yumurtayı tanıyıp ona tutunabilme yeteneklerini kazanırlar. Bu, yaklaşık 4-10 günlük bir süreçtir. Bu değişiklikler sperm olgunlaşması olarak tanımlanır ve fertilizasyonun oluşması için hayati öneme sahiptir. Ancak bu süreçteki olayların ayrıntıları henüz açığa kavuşturulamamıştır. Sperm epididimisten ayrıldığında, olgun olarak kabul edilir ve yumurtayı dölleyebilme (fertilizasyon) yeteneğine sahiptir.



Şekil 1. Spermatogenez [Carlson, B.M.: "Patten's Foundations of Embryology", 6th Ed.; McGraw-Hill, Inc., New York, USA, (1996)].

Spermiler epididimisin sonundaki terminal (uç) bölgede saklanırlar. Ejekülasyon sırasında, kas kasılmalarının etkisiyle bir miktar sperm, epididimisten vaz deferense taşınır. Daha sonra spermiler ejakülasyon kanalına giderler. Spermiler bu şekilde farklı tüplerden geçerken, bir miktar sıvı içerisinde bulunurlar. Seminal veziküllerden ve prostat bezinden salgılanan sıvılar da spermilerle karışır ve oluşan karışım semen olarak adlandırılır. Ejekülatın %90'ından fazlası prostat ve seminal veziküller tarafından üretilir (Glover & Barratt 2002, Murathanoglu 2001).

Sağlıklı bir erkekte, semende 1 mililitrede (ml) en az 20×10^6 spermatozoa bulunmalıdır. Ejekülatta, bu sayının altında (oligozoospermi-sperm konsantrasyonu $<20 \times 10^6$ spermatozoa/ml) veya hiç sperm bulunmaması (azoospermi) spermin

sayısal anomalileri olarak bilinir. Sperm hücreleri, Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) ve Kruger Strict Morfoloji Kriterlerinin ölçütlerine uygun olmalıdır. Sperm anomalilerine daha ilerdeki bölümlerde ayrıntılı olarak değinilecektir.

4.1.2.2.A. Spermatogonial faz (spermatogenez)

Seminifer tübül bazal membranı üzerinde oturan spermatogoniumlar, küçük diploid germ hücreleridir, puberteye kadar bölünmezler (Barratt 1995, Gartner & Hiatt 1997). Pubertede spermatogenez başlar, spermatogoniumlar mitoz bölünme ile çoğalarak, yerlerine yeni gelecek spermatogoniumları ve en nihayetinde primer spermatositleri oluşturur (Ross et al. 2003, Barratt et al. 1995, Parks et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997).

Spermatogoniumlar ışık mikroskobu altında incelendiklerinde nukleuslarının belirgin koyu görünümüleriyle ayırt edilir. İnsan spermatogoniumları rutin histolojik preparatlardaki görünimleri temel alınarak 3 tipe ayrılmıştır:

- 1) Koyu tip A Spermatogoniumlar
- 2) Açık tip A Spermatogoniumlar
- 3) Tip B Spermatogoniumlar

1-Koyu Tip A spermatogoniumlar: Seminifer epitelin kök ya da rezerv hücreleri olarak değerlendirilirler (Ross et al.2003, Parks et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997). Düzensiz aralıklarla bölünerek, hem yeni koyu Tip A spermatogoniumları, hem de açık Tip A hücreleri meydana getirirler (Syed et al. 2002).

2-Açık Tip A spermatogoniumlar: Koyu Tip A hücrelerle aynı özelliklere sahiptirler. Testosteronun etkisiyle mitoz bölünmeyle çoğalırlar ve yeni açık Tip A hücreleri ve Tip B hücreleri meydana getirirler (Ross et al.2003, Parks et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997).

3-Tip B spermatogoniumlar: Açık Tip A spermatogoniumlara benzerler (Ross et al.2003, Gartner & Hiatt 1997). Mitozla bölünerek primer spermatositleri meydana getirirler (Ross et al.2003).

Bir koyu Tip A spermatogoniumun bölünmesi ile oluşan yeni hücreler ince stoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı olarak kalırlar, yani nükleusları tam olarak bölünse de, sitoplazmaları tam anlamıyla ayrılmaz (Ross et al.2003, Barrat 1995, Gartner & Hiatt 1997, Syed 2002, Niederberger & Lamb 1997). Bu yüzden meydana gelen hücreler, inci dizileri gibi birbirine bağlıdırlar (Ross et al. 2003, Martins 2001). Bu sitoplazmik bağlantılar, spermatid olgunlaşmasının son dönemlerine kadar devam eder ve bir orjinal koyu Tip A hücreden her bir klonun senkronize gelişimi ve hücrelerin birbirleriyle iletişimi için yaşamsal önem taşır (Ross et al. 2003, Martins 2001). Ayrıca bu köprülerin hücreler arasında RNA ve protein değişimini kolaylaştırdığı da düşünülmektedir (Syed 2002).Seminomlarda ve intratübüler germ hücre neoplazmlarında bu bağlantıların bulunmadığı görülür (Trainer 1997).

4.1.2.2.B. Spermatosit fazı (mayoz)

Seminifer epitelinin en büyük hücresi olan primer spermatositin, değişik yoğunlaşma aşamalarındaki kromozomları içeren büyük bir nukleusu vardır (Ross et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997). Nukleusunun bu özel görünümüyle ışık mikroskobunda kolayca ayırt edilir (Trainer 1997). Primer spermatositler oluştuktan kısa süre sonra (preleptoten aşamasında) bazal kompartmandan abdominal kompartmana göç ederler. Bu hücreler mayoz başlamadan önce DNAlarını replike ederler (Barratt 1995, Gartner & Hiatt 1997).

Böylece herbir primer spermatosit diploid kromozoma ve $4n$ miktarda DNA'ya sahip olur. Ard arda gelen 2 mayoz bölünme, hem kromozom sayısında, hem de DNA miktarında azalma ile sonuçlanır (Ross et al. 2003, Moore 1998, Gartner & Hiatt 1997). Birinci mayoz bölünme sonunda $2n$ miktarda DNA'ya ve haploid kromozom sayısına sahip 2 adet sekonder spermatosit oluşur. 2. Mayoz bölünme ile herbir sekonder spermatositten, n (haploid) miktarda DNA'ya ve aynı miktarda kromozoma sahip 2 adet spermatid oluşur. Dolayısıyla 2 mayoz sonunda, 4 adet haploid spermatid meydana gelir (Ross et al. 2003, Barratt 1995, Parks et al. 2003, Moore & Persaud 1998, Gartner & Hiatt 1997).

Birinci mayoz bölünmenin, yaklaşık 22-24 gün süren profaz aşaması (profaz1), preleptoten, leptoten, zigoten, pakiten, diploten olmak üzere 5 aşamadan

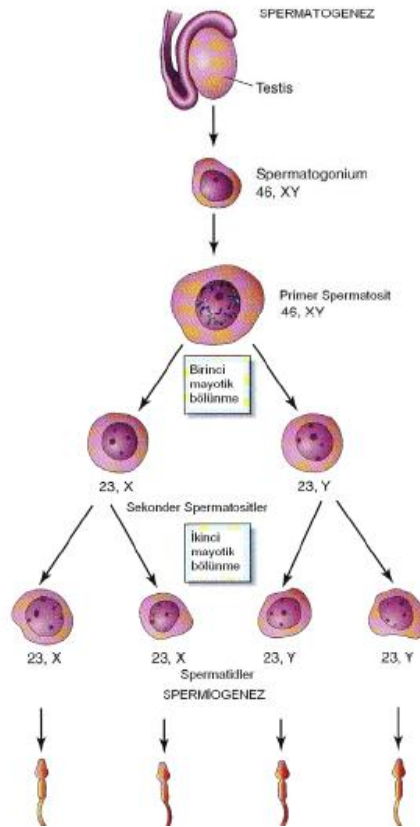
oluşur (Ross et al. 2003, Barratt 1995, Gartner & Hiatt 1997, Trainer 1997, Niederberger 1997). Primer spermatositteki kromozomlar, leptotende yoğunlaşmaya başlayarak kısa ve kalın zincirler oluştururlar. Zigotende homologlarıyla çift halini alırlar (Gartner & Hiatt 1997, Trainer 1997). Mayozun en uzun aşaması olan pakitende, kromozomlar homologlarıyla birlikte tetrad yapısını oluştururlar (Barratt 1995, Gartner & Hiatt 1997, Martins 2001). Homolog kromozomların karşılıklı segment değişimiyle “crossing-over” olarak adlandırılan, ve her bir hücrenin eşsiz genomu sahip olmasına ve genetik çeşitliliğin oluşmasına neden olan olay gerçekleşir (Gartner & Hiatt 1997).

Genetik değişim sayesinde, herbir spermatositte meydana gelecek olan 4 spermatid, birbirlerinden ve diğer bütün spermatidlerden farklı olacaktır. Profazın sonunda, herbiri 2 kromatin zinciri (kromatid) içeren 44 otozomal kromozomla, bir X ve bir Y kromozomu bulunur (Ross et al. 2003). Metafaz 1 de homolog kromozomlar metafaz plağı üzerinde yer alırlar (Ross et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997). Daha sonra meydana gelene anafaz 1 aşamasında, birbirlerinden rastgele ayrılarak zıt kutuplara doğru hareket ederler (Ross et al. 2003, Barratt 1995, Gartner & Hiatt 1997). Böylece crossing-over ile modifiye olan tetratlar birbirinden ayrılır ve yeniden diyard halini alır, ancak herbir orijinal kromozomun 2 kromatidi bir aradadır (Ross et al. 2003). Telofaz1 de ise iki sekonder spermatosit meydana gelir (Gartner & Hiatt 1997). Oldukça kısa süre yaşayan sekonder spermatositler, seminifer epitelde kolayca izlenemezler (Gartner & Hiatt 1997, Trainer 1997). Primer spermatositin yarısı büyüklüğündeki bu hücreler $2n$ miktarda DNA'ya sahiptir, Kromozomlarını replike etmeden hemen 2.mayoz bölünmeye girerler (Ross et al. 2003, Barratt 1995, Moore & Persaud 1998, Gartner & Hiatt 1997, Trainer 1997, Martins 2001).

Her bir sekonder spermatosit, her biri 2 kromatide sahip 22 otozomal kromozom ile bir adet X veya Y kromozomuna sahiptir (Ross et al. 2003, Moore & Persaud 1998). İkinci mayoz bölünme tamamlandığında, nuklear membranlar yeniden oluşur; bir sekonder spermatositte, her biri 22 adet tek zincirli kromozoma ve n DNA miktarına sahip 2 haploid spermatid meydana gelir (Ross et al. 2003).

4.1.2.2.C. Spermatid fazı (spermiyogenez)

Spermatidler 8 μ çapında, küçük, yuvarlak, haploid hücrelerdir. Tek bir açık tip A spermatogoniumdan meydana gelen bütün spermatidler, hücreler arası sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlıdır (Gartner & Hiatt 1997). Bir spermatid oluşuktan sonra, bir daha bölünme olmaz (Ross et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997). Haploid spermatidler, olgun spermiumu meydana getirecek olan ve spermiyogenez olarak adlandırılan bir farklılaşma sürecine girerler (Ross et al. 2003). Yoğun bir transformasyonun gerçekleştiği bu süreçte, nukleus karakteristik şeklini alır, artık sitoplazma elimine edilir, akrozom ve kuyruk gelişir (Ross et al. 2003, Barratt 1995, Parks et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997, Niederberger 1997). İnsanlarda bu aşama yaklaşık 16-22 gün sürer (Barratt 1995, Adler 2000). Yoğun bir yeniden yapılanma süreci olan spermiyogenez 4 dönemden oluşur (Ross et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997). Bu aşamalar spermatidler sertoli hücresinin plazma membranına özelleşmiş bağlantılarla bağliken gerçekleşir (Ross et al. 2003).



Şekil 2. Spermatogenezde birinci ve ikinci mayotik bölünme

Spermiyogenez evreleri

Spermiyogenez 4 evreden meydana gelir. Bunlar;

1. Golgi evresi
2. Cap (kep-şapka) evresi
3. Akrozom evresi
4. Olgunlaşma evresi

Seminifel epitel siklus:

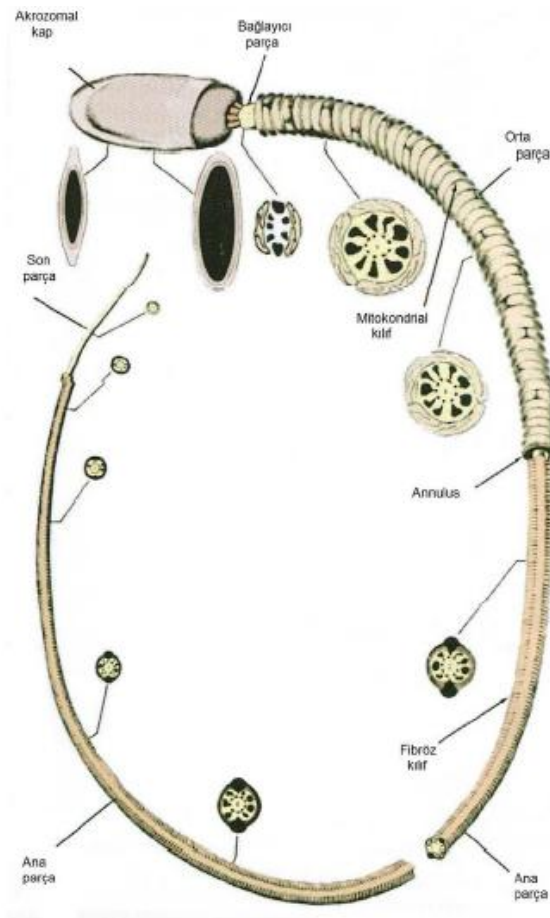
Farklılaşan spermatogik hücreler seminifel epitel içinde rastgele dağılmazlar, belli hücre tipleri bir arada bulunurlar (Ross et al. 2003, Niederberger 1997). Bu gruplaşmalar, hücreler arasındaki köprüler nedeniyle oluşur (Ross et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997). Bütün farklılaşma aşamaları, seminifel tübülde belirli bir zamanda meydana gelir (Ross et al. 2003, Niederberger 1997). İnsanda spermatogenezin 6 aşamada gerçekleştiği ve yaklaşık 74 gün sürdüğü görülür (Ross et al. 2003, Gartner & Hiatt 1997). Spermiyumun epididime geçmesi ise yaklaşık 12-16 gün alır (Ross et al. 2003, Adler 2000). Sıçanlarda herbir tübülün uzunluğu boyunca farklı aşamalar bir düzen içerisinde ard arda izlenebilir, yani tübül duvarından geçecek transvers bir kesitte sadece tek bir aşamaya ait hücreler izlenir. Ancak insanlarda böyle bir durum söz konusu değildir (Ross et al. 2003, Barratt 1995, Niederberger 1997). Tübül duvarı boyunca herbir bölge farklı aşamalarda olabilir, yani alınacak enine bir kesitte aynı tübül içinde değişik aşamalara rastlamak mümkündür (Ross et al. 2003, Niederberger 1997).

4.2. Normal Sperm Hücresi

İnsanda sperm ortalama 60µm uzunluğunda olup baş, boyun, orta parça ve kuyruk kısımlarından oluşur. Oval ve yassı olan baş kısmı 4,5x3µm boyutundadır. Başın büyük kısmını nükleus kaplar. Başın 2/3 ön kısmı akrozom denen bir kılıf ile örtülmüştür. Akrozomun dış ve iç olmak üzere iki tabakası vardır. En dışta plazma membranı bulunur. Spermatozoa ovuma yaklaştığında plazma membranı ile dış akrozom kılıfı birleşir ve dışarı açılarak içindeki enzimleri ortama salar (akrozom reaksiyonu). Bu enzimler ovumun etrafını saran hücre tabakalarını ve zarları eritmeye yarar. Kumulus ooforusu eriten hyaluronidaz, korona radiatayı eriten

“corona penetrating enzyme” (CPE) ve zona pellüsidayı eriten ise akrozin enzimidir. Sperm başının ovum sitoplazması içine girmesini takiben zonadaki açıklığın tekrar onarılması için gerekli nöriminidaz enzimi de akrozomdan salgılanır (Aydos ve ark. 2007). Sperm kuyruğu ise dört parçadan oluşur (Fawcett 1965):

- a) Sperm bağlantı parçası (Connecting piece)
- b) Orta bölüm (Middle piece)
- c) Esas parça (Principal piece)
- d) Son parça (Terminal piece)



Şekil 3. Spermatozoa yapısı

4.2.1. Sperm bağlantı parçası (connecting piece)

Sperm başı ile kuyruğu arasındaki kısa parçayı oluşturur. Bölünmüş kolonlar ve yoğun fibröz yapıdan oluşmaktadır. Kapitulum ve sperm başının kaudalindeki bazal tabaka sperm başı ile kuyruğu arasında yer alır. Kapitulum distalinde çizgili

yapı (“striated collar”) ile devam eder ve daha sonra orta parçada dış yoğun lifler “outer dense fibers” (ODF) ile sürer. Aynı yapı aksonemi de sarar. Sperm başı ile kuyruğu arasında devamlılığı bağlantı parçası denen yapı sağlar. Kapitulumdan geriye doğru uzanan 9 adet parçalı kolon, flagelluma yoğun lif yapılar ile bağlanmaktadır. Böylece bağlantı parçası da dış lifler sayesinde devamlılık göstermektedir.

4.2.2. Orta bölüm (midpiece)

Aksonem boyunca yer alan 9 adet ODF’nin her biri, mikrotübüler “doublet” ile ilişkilidir. Bu bölümdeki mitokondriyal yapı helikal düzenlenmiştir ve enerji için gerekli yapılardır. İç mitokondrial membran enerji üretiminden sorumludur ve flagella ise motiliteden sorumludur. Bu yapının proksimalden distale doğru gittikçe çapı azalır. Distalde orta parça ile esas parçayı birleştiren annulus ile sonlanır.

4.2.3. Esas parça (principle piece)

Aksonem ve fibroz kılıftan oluşur. Annulus ile terminal yapı arasında kalan kısımdır. Fibröz kılıf, aksonem, ve ODF’yi sarar. Fibröz kılıf yapısı disülfid bağları nedeniyle oldukça stabildir ve sperm motilitesine yardımcı olur.

4.2.4. Son parça (terminal piece)

ODF ve fibröz kılıf yoktur, sadece 9+2 aksonemal yapı mevcuttur. Aksonemal yapı distale doğru:

1. Dynein kolların kaybı
2. Santral mikrotübüllerin kaybı
3. Mikrotübüler doubletlerin ayrılması
4. B mikrotübül subünitlerin kaybolmasıyla şekillenir (Koehler 1983).

4.2.5. Aksonem

Flagellada hareketin oluşumunu sağlayan temel yapı aksonemdir ve 9+2 düzeninde mikrotübüler ikililerden oluşur. Dışta 9 adet tubulin dimerlerinden oluşan A ve B alt tipler harekette rol oynar. Dıştaki 9 ikilinin her biri radyal uzantılarla santral mikrotübüle bağlanır. Santral mikrotübül doublet iki adet A alt lifinden oluşmaktadır ve birbiri ile çapraz köprüler ile bağlanmaktadır. Santral mikrotübül ikilisinden aynı zamanda iç kılıf uzantıları çıkmaktadır (Mortimer 1997).

4.2.6. Fibröz kilif(FS)

3 adet protein (AKAP 3-4, TAKAP-80), cAMP bağımlı protein kinaz (PKA) enzim aracılığıyla hücre sinyalizasyonunda rol oynar. İki enzim (gliseraldehit3-fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz) fibröz kılıfta yer alır, ve glikolitik yolda görev alırlar. FS, flagellar hareketin planında ve kıvrılma hareketinde yer alır. PKA, serin ve tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonunu sağlar ve kuyrukta lokalize proteinleri hedefler. Tirozin kinazda ise fosforilasyon için glikolitik yol önemlidir. PKA, cAMP için hedef ve ATP'den adenin siklaz yoluyla sentezlenen sekonder mesajcıdır (Eddy E et al. 2003).

4.2.7. Mitokondrial kilif

Mitokondriden zengin kısım orta parçadadır. Helikal ve sıkı şekilde yerleşen mitokondrilerib etrafındaki kılıf yapısıdır. Spermatozoadaki mitokondri:

1. Hipotonik ortama
2. Yetersiz kalsiyum iyonu girişi direncine
3. Laktatı oksidatif substrat olarak kullanabilme yeteneğiyle diğer mitokondrilerden ayrılır.

4.2.8. Sitoplazmik damlacık

Seminifer tübülü tarafından salgılanan spermatozoa içinde bulunan küçük sitoplazmik kitledir. Lizozomal enzimlerden zengindir. Epididim boyunca sperm hareketi sırasında esas yerinden hareket ederek bağlantı parçasından orta parçanın sonuna doğru ilerler. Ejakülatta damlacıkların varlığı, ODF ve FS gibi yapıların

eliminasyonuna bağlı epididimal fonksiyon bozukluğu ve fertilizasyonun azalmasıyla birliktelik gösterir.

4.2.9. Epididimal sperm

Aksonemin gelişimi testiste gerçekleşmekle beraber, ileri olgunlaşma evreleri epididimde gerçekleşir. Epididim boyunca hareket, muskuler kasılma ve hidrostatik basınç yoluyla gerçekleşir. Doğrusal hareket, epididimden salgılanan “forward motility protein”e bağlıdır. Epididimde sperm plazma membranı disülfid bağları oluşturarak kuyruk hareketlerinin daha güçlü olmasını sağlar (Elzanaty et al. 2002).

4.3. Spermatogenezin Kontrolü

4.3.1. Spermatogenezin hormonal kontrolü (hipotalamo-hipofizer-gonadal yol)

Erkek üreme fonksiyonu, hipotalamus, hipofiz ve testisler tarafından kontrol edilmektedir. Kısaca değerlendirilecek olursak, hipotalamo-hipofizer şant ile hipofiz kan damarlarının yaptığı portal sistem içine hipotalamustan Gonadotropin Uyarıcı Hormon (GnRH) salınır. Ön hipofiz bezi gonadotropin salınımı için özelleşmiş olan ve GnRH tarafından uyarılan gonadotroplar içermektedir. Bu hücreler tarafından salınan LH ve FSH, kan dolaşımı ile testise iletilir. GnRH’a ilave olarak, Aktivinin hipofizdeki lokal üretimi ile de FSH sekresyonu stimüle edilir (de Krester et al. 2000). FSH Sertoli hücrelerini uyararak seminifer tübül epitelinde spermatogenez başlatırken, LH intertisyumdaki Leydig hücrelerini uyararak testosteron üretimini sağlar. Testosteron sekresyonu ve sperm üretim hızı testis ile üst reproduktif aks arasında negatif feed-back ilişkiyi sağlayan bir aę tarafından çok iyi bir şekilde düzenlenmiştir. Testosteron ve metaboliti olan östradiol GnRH ve Gonadotropin salınımını baskılayıcı rol oynarlar. Ayrıca esas olarak Sertoli hücrelerinden sekrete edilen İnhibin de gonadotroplarda FSH salınımını baskılar. Primer olarak Sertoli hücrelerinden salınan bir glikoprotein olan inhibin formu, inhibin B olarak adlandırılır (de Krester et al. 2000). İnhibin, FSH’ın β subünitini kodlayan genlerin transkripsiyonunu inhibe ederek, gonadotroplarda FSH sekresyonunu engeller (Clarke et al. 1993). Bozulmuş testiküler fonksiyonun değerlendirilmesinde bir belirleyici olarak İnhibin B’nin klinik kullanımı tartışmalıdır (Kolb et al. 2000).

4.3.1.1. Hipotalamus

GnRH nöronları amigdala ile her iki olfaktör ve vizüel korteksi içeren beynin diğer bölgelerindeki nöronlardan gelen uyarıları alırlar. GnRH salınımı üç tip ritmisite göstermektedir. Birincisi mevsimsel olup, Haziran-Temmuz aylarında pik yapar ve kış-erken ilkbahar aylarında en düşük düzeye inmektedir. Buradaki olası etkinin güneş ışığından çok ısı artışına bağlı olduğu kabul edilmektedir (Andersson et al. 2003). İkincisi sirkadiyen ritmdir ve sabahın erken saatlerinde testosteronun en yüksek serum düzeylerine ulaşmasından sorumludur. Bu mekanizmadan pineal glanddan salınan melatonin hormonunun sorumlu olduğu sanılmaktadır. Üçüncüsü ise pulsatil salınım olup, GnRH'un her 90-120 dakikada bir pik yapmasıdır (Schlegel et al. 2002). Pulsatil salınımın mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır, ancak nitrik oksit (NO) gibi noradrenerjik uyarıların rolü olabileceği düşünülmektedir (Lopez et al. 1998).

GnRH salgılayan nöronlarının prekürsörleri, embriyonel gelişim sırasında olfaktör kabartıdan hipotalamustaki pozisyonlarına göç ederler. Konjenital hipogonadotropik hipogonadizm yaratan bir durum olan Kallman sendromunda, GnRH salgılayan nöronların prekürsörleri normal olarak migrasyonlarını gerçekleştiremezler ve GnRH'un hipotalamik sekresyon kapasitesi gelişmez. Hipogonadotropik fonksiyon ile birlikte olfaktör defekt (anosmi) ya da diğer orta hat defektleri Kalman sendromu için tipiktir (Schlegel et al. 2005).

4.3.1.2. Hipofiz

Hipofiz bezi anterior ve posterior olmak üzere iki lobdan oluşur. Posterior lob ya da nörohipofiz, hipotalamusun bir ventral dış cep uzantısı olarak gelişimi sırasında oluşur. İki nörohipofizer hormon olan oksitosin ve vazopressin salınımı, nöral stimülasyon altında yönlendirilir. Anterior lob ya da adenohipofiz kan kaynaklı faktörler tarafından düzenlenen bir yapıdır. LH ve FSH adenohipofizdeki gonadotropolar tarafından salınır. Gonadotropolara ilave olarak adenohipofiz diğer glikoprotein yapıdaki hormonları sekrete etmek için özelleşmiş hücreleri içerir. Kortikotoplar; adrenokortikotropik hormon, laktotoplar; prolaktin, somatotoplar; büyüme hormonu ve tirotoplar; tiroid uyarıcı hormon sekrete ederler. Bu diğer dört

grup hormon, erkek reproduktif sistemi üzerine önemli etkilere sahiptirler. Bu durum spermatogenezi baskılayan, prolaktinin kronik aşırı sekresyonu ile sonuçlanan hipofiz adenomu örneğinde görülebilir (Mazzi C et al. 1996).

Normal erkeklerde LH, her bir atımda 6 IU/L olacak şekilde, ortalama 2 saatlik sıklıklarla salınır (Hayes et al. 1988). Testosteron düzeyini 5 ng/ml düzeyinde devam ettirebilmek için, LH'un etkili kan düzeyi 10 IU/L olmalıdır (Hayes et al. 2001).

4.3.1.3. Hipotalamik ve hipofizer aksın pubertal gelişimi

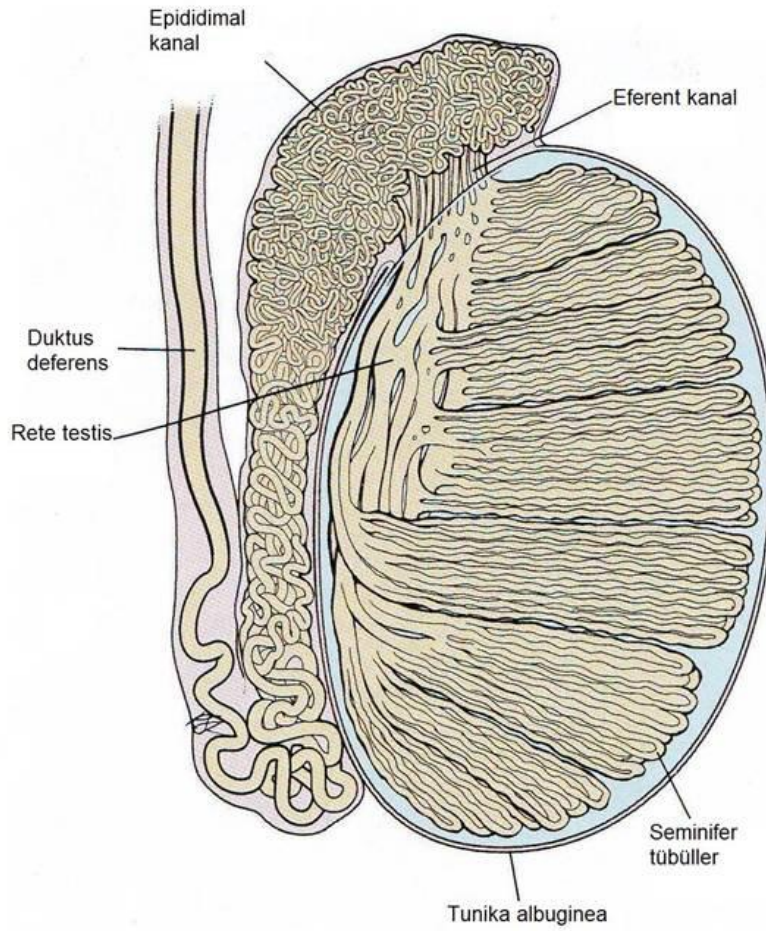
Leydig hücreleri intrauterin gelişim sırasında seminifer tübüller arasında yerleşmiş olan mezenkimal öncü hücrelerden gelişir. Leydig hücrelerinin steroidogeneze başlaması ile androjen bağımlı erkek üreme sistemi de farklılaşmaya başlar. Erken gebelik döneminde fetal hipofiz FSH ve LH sentezleme, depolama ve yüksek konsantrasyonlarda sekrete etme yeteneğine sahiptir. Gebeliğin ortalarında FSH ve LH pik yapar. Gebeliğin son dönemlerinde FSH ve LH düzeylerinin düşmesi, gonadal steroidlerin negatif “feedback” etkisine bağlıdır (Weinbauer et al. 2000).

hücreleri ve germ hücreleridir. Sertoli hücreleri seminifer tübül bazal membranı üzerine oturmuş ve lümenine doğru uzanan kompleks sitoplazmalı hücrelerdir. Vücudun en kuvvetli hücreler arası bariyeri ile kendi aralarında bağlantılı olan Sertoli hücreleri seminifer tübülü, bazal ve luminal olarak iki kısma ayırmaktadır. Bu anatomik özellik spermatogenezin kan dolaşımından ayrılmasını sağlayan kan-testis bariyerini oluşturmaktadır. FSH'a afinitesi fazla olan Sertoli hücreleri, FSH etkisi ile androjen bağlayıcı protein (ABP) sentez ederek, seminifer tübül lümenine bu proteini salgılar. ABP, seminifer tübülde testosteronu bağlayarak, kan testosteronundan 20-50 kat daha fazla intratestiküler testosteron seviyesi sağlamaktadır. Ayrıca FSH etkisiyle Sertoli hücreleri, transferin, serüloplazmin, laktat ve bir dizi büyüme hormonu ile spermatogenezde rol oynamaktadır. Spermatidlerden spermatozoa oluşumu sırasında ise golgi apparatusundan akrozom, sentriollerden flagellum oluşumu gibi bazı süreçler meydana gelmektedir (Orhan 2006).

Endokrin fonksiyon

Testisin endokrin fonksiyonu LH etkisiyle Leydig hücrelerinde, pregnanolondan testosteron sentez edilmesidir. Günde yaklaşık olarak 5 gram sentez edilen testosteron pulsatil olarak salgılanmaktadır. Sentez edilen testosteronun %98'i seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) ve albümine bağlı geriye kalan %2'lik kısmı serbest olarak bulunur

Sertoli hücrelerinde sentezlenen inhibin negatif feed-back yoluyla FSH salınımını baskılamaktadır. Aktivin, FSH salınımını aktive etmektedir. Testis dışında başka dokularda da salgılandığı belirlenmiş olan aktivinin vücuttaki pek çok büyüme olayında regülatör olduğu bildirilmektedir (Orhan 2006).



Şekil 5. İnsan tetisininde seminifer tübüller, epididimler ve duktus defferens.

4.3.1.5. Posttestiküler Transport

Hipotalamo-hipofizo-gonadal aks yoluyla kontrol edilen testiküler ekzokrin fonksiyon sonucu gelişen testiküler spermatozoa, halen daha motilite ve fertilizasyon matürasyonunu tamamlamamıştır. Erkek üreme sisteminde, testisten sonra sperm transportunda rol oynayan epididim, vaz deferens, veziküla semanialis ve diğer aksesuar seks glandları spermatozoanın hem motilite hem de fertilizasyon maturasyonunu sağlamaktadırlar (Orhan 2006).

Epididim

Tübüler yapıda olan epididimler, yaklaşık 3-4 metre uzunluğunda, farklı çaptaki tübüllerden oluşmaktadır (Turner et al. 1978). Testisle, duktuli eferentis ve rete testislerle devamlılık göstern epididim, kaudal kısımda farklılaşarak vas deferens

olarak devam etmektedir. Histolojik özellikleri farklı kaput, korpus ve kauda olarak üç ayrı segmentten oluşan epididimler, özellikle sperm motilite maturasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Epididim korpus ve kaudasına doğru kontraktıl özelliği olan hücreler ve kauda epididimde artık belirgin olarak saptanan düz kas tabakası, bu seviyede sperm transportunda etkin olmaktadır. Sperm hücresinin, epididimdeki yaklaşık olarak 2-12 günlük transport süresinde motilite ve fertilite matürasyonu gerçekleşmektedir (Rowley et al. 1970, Aman et al. 1981, Johnson et al. 1988).

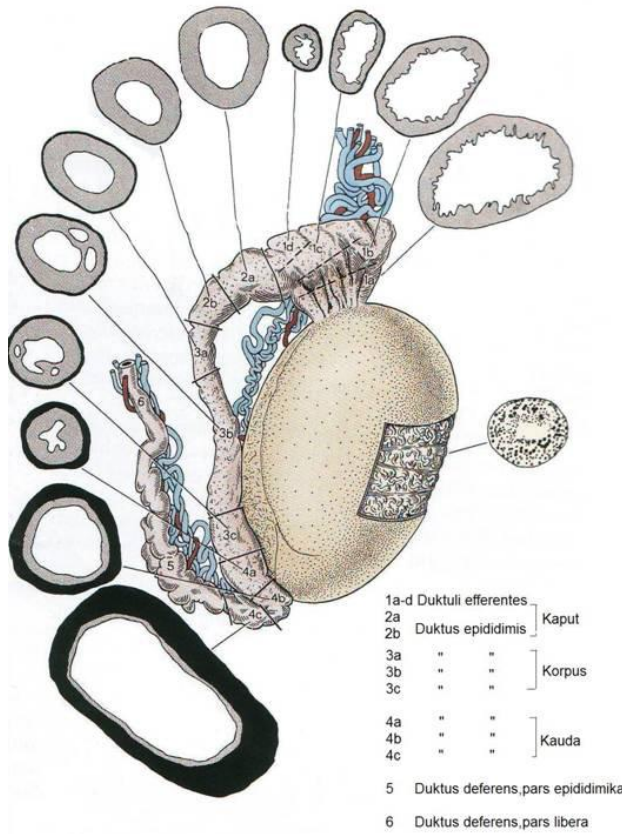
Vaz Deferens

Kauda epididimden, ejakülatör kanallara kadar sperm transportunu sağlayan ve yaklaşık 30-35 cm uzunluğunda olan vaz deferens epididimal, skrotal, inguinal, retroperitoneal ve ampullar olarak beş segmentten oluşmaktadır. Vaz deferensler, kompleks kas tabakası ve lümenini örten bazal hücreler ve sterosilia içeren hücreler ile sperm transportunu sağlamaktadır.

Emisyondan hemen önce distal epididim ve proksimal vaz deferenste sempatik kompleks innervasyon ile sperm transportunun olduğu saptanmakla birlikte vaz deferenslerde yaklaşık olarak 130 milyon sperm rezervinin bulunduğu bildirilmiştir (Orhan 2006).

Veziküla Seminalis

Tübüler yapıda olan ve duvar yapısının %80'ini kas yapısı oluşturan veziküla seminalisler ejakülasyon sırasındaki 50cm su basıncına çıkan kontraksiyonları ile sperm transportunda etkili olmaları yanında, fruktoz gibi sperm enerji kaynağını oluşturan salgıları ile üreme fizyolojisinde etkin olan organlardır (Orhan 20062).



Şekil 6. Testis, epididim, duktus deferensin şematik gösterimi

4.3.2. Spermatogenezin genetik kontrolü

Sağlıklı erkeklerin yaklaşık %8-10'unda subfertilite görülmektedir (Bhasin et al. 1994, Skakkebaek et al 1994, De Kretser et al. 1997). Yakın bir tarihe kadar çevresel etmenler veya bulaşıcı hastalıklar subfertilitenin ana nedeni olarak kabul edilmekte idi. Ancak genetik problemlerin erkek subfertilitesinin ana nedeni olabileceği yönünde önemli bulgular elde edilmeye başlanmıştır. Subfertil erkeklerin yaklaşık %10'unun anormal bir karyotipe sahip olduğu ve bu erkeklerin yarısının da 47,XXY karyotip nedeni ile Klinefelter Sendromu olduğu bilinmektedir (De Baraekerleer 1991, Van Assche et al. 1996). Bunun yanı sıra, translokasyonlar da erkek taşıyıcılarında subfertiliteye neden olabilmektedir. Günümüze daha yakın tarihlerde yapılan çalışmalarda ise Y kromozomu üzerinde yer alan q11.23 bölgesindeki delesyonlar infertil erkeklerin %18'inde saptanmıştır (Reijo et al. 1995, Vogt et al. 1996, Pryor et al. 1997). Fötal dönemde gonadal dokuların farklılaşması ve çoğalmaları tamamen Y kromozomu tarafından organize edilir. Y kromozomunda

SRY geni bulunur. Bu gen TDF (testis determining factor) olarak adlandırılan özel bir plazma proteini sentezine sebep olur. Testislerin morfogenezi TDF tarafından sağlanır. TDF proteininde oluşacak genetik defektler fenotipte ve fertilizasyonda değişik tablolarla kendini belli eder.

Y kromozomunun uzun kolu (Yq) üzerinde spermatogenezden sorumlu 3 adet bölge vardır: Azoospermia Factor (AZF) olarak adlandırılan AZFa, AZFb ve AZFc (DAZ) bölgeleri. Bu bölgelerde spermatogenezi sağlayan çok sayıda gen yer alır. AZFa bölgesindeki genlerin kaybının Sertoli cell only sendromundan (SCOs), AZFb matürasyon arrestinden, AZFc ise değişik derecede oligo-azoospermiden sorumludur. Her ne kadar, genotip/fenotip arasında kesin bir ilişki kurulamamış olsa da, çoğu çalışmalar bu görüşü desteklemektedir. Son olarak online veri tabanlarında (OMIM) mendelyan tipi kalıtım ve erkek subfertilitesi ile ilişkilendirilen 60 ya da daha fazla tanımlanmış kalıtsal bozukluk yer almaktadır.

Spermatogenezin bozulmasının veya azalmasının nedenleri erkek infertilite kliniklerine giden hastaların %40'ında hala belirsizdir (Bhasin et al. 1994, Skakkebaek et al. 1994, De Kretser et al. 1997, Aitken et al. 1995). Bu tür hastalar normospermik, oligospermik, veya azospermik olabilir, immotil veya anormal morfolojili spermere sahip olabilirler. Hatta bazı hastalarda germ hücreleri hiç olmayabilir. Bu hastalar normal karyotipe, normal seviyelerde testosterona ve gonadotropinlere sahip olabildikleri gibi, sperm otoimmunitesi veya genital sistem anomalileri gibi problemlere de sahip olmayabilirler. Bu kişilerde genital sistemlerine ait cerrahi öyküsü, testis kanseri, genital infeksiyon, ilaç kullanımı ya da radyasyona maruz kalma öyküsü sıklıkla bulunamamaktadır. Buna benzer açıklanamayan obstrüktif olmayan erkek infertilite biçimlerinin nedenlerinin çevresel faktörler değil, kalıtsal nedenler olabileceği yönünde kanıtlar mevcuttur. Czgyllik ve arkadaşları subfertil erkeklerin kardeşlerinde de düşük sperm sayısı ve azalmış sperm motilitesi olduğunu gözlemlemiştir (Czyglik et al. 1986). İsteddiği halde çocuğu olmayan erkekler üzerinde yapılan kontrollü bir araştırmada, Lilford ve arkadaşları olguların yarısından fazlasında, erkek subfertilitesinin ailesel komponentinin otozomal resesif kalıtım gösterdiğini tespit etmiştir (Lilford et al. 1994). Ancak bu durumla ilgisi olan genler hala tanımlanamadığı gibi, insan genomunda kaç tane genin, erkekte nasıl steril allele dönüştüğüne dair hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Buna

ek olarak, erkek infertilitesine neden olan otozomal resesif mutasyonlar nedeniyle oluşan genetik yüke ait bilgi de bulunmamaktadır.

4.3.3. Spermatogenezi etkileyen faktörler

Spermatogenik hücreler, özellikle spermatositler toksik ajanlara karşı çok duyarlıdır (Ross et al. 2003, Barratt 1995, Syed et al. 2002). Beslenme bozuklukları, sistemik hastalıklar, yaygın ya da lokal enfeksiyonlar, genetik bozukluklar, testiküler ısıнын yükselmesi, steroid hormonlar ve onlara benzer ilaçlar, kemoterapötik ilaçlar, antimetabolitler, kadmium tuzları, kurşun ve pestisitler gibi toksik ajanlar, mutajenler ve radyasyon spermatogenezi etkileyen faktörler arasında sayılabilir. Bu ajanlar sperm üretimini azaltırlar, kromozomal ve morfolojik anormalliklere yol açarlar (Ross 2003, Barratt 1995, Cooke et al. 1998, Parks et al. 2003, Syed et al. 2002, Adler 2000, Gazvani et al. 2000, Meistrich et al. 2003).

4.3.3.1. Endokrin faktörler

Hipofizden salgılanan gonadotropinler olan FSH ve LH spermatogenezin esas düzenleyicileridir (Barratt 1995, Parks et al. 2003, Syed et al. 2002, Sairam et al. 2001, Hedger & Meinhardt 2003). LH Leydig hücrelerini testosteron sentezlemesi için uyarır (Ross et al. 2003, Barratt 1995, Parks et al. 2003, Sairam et al. 2001). Testosteronun testiste dolaşımdakinin en az 200 katı konsantrasyonda bulunması, spermatogenik hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için gereklidir (Ross et al. 2003). FSH ve Testosteron normal spermatogenez için yaşamsal önem taşır (Ross et al. 2003, Parks et al. 2003, Sairam et al. 2001). Germ hücreleri FSH ve testosteron reseptörü içermediklerinden, bunların esas etki alanı Sertoli hücreleridir (Ross et al. 2003, Barratt 1995, Hedger et al. 2003). FSH'ın spermatogonial proliferasyonu uyarıcı etkisi sayesinde sertoli hücreleri spermatogenezde primer düzenleyici olarak rol alırlar (Ross et al. 2003, Parks et al. 2003). Testosteron, Sertoli hücrelerinin spermatidlere yapışmasını, dolayısıyla spermiyogenezi indükler, ayrıca peritübüler hücreleri de etkiler (Parks et al. 2003, Hedger & 2003, Carreau et al. 2001). Hem FSH, hem de testosteronun, germ hücre apoptosisini Sertoli hücreleri aracılığıyla indirekt olarak baskıladığı gösterilmiştir (Parks et al. 2003, Print CG, Lakoski et al.

2000). Seminifer epitelin hormonal uyarıya yanıtı lokal testiküler faktörlerin etkisiyle düzenlenir (Barratt 1995).

Primer spermatositler ve spermatidler hem α hem de β östrojen reseptörü içermektedirler (Parks et al. 2003, Hedger & Meinhardt 2003, Carreau et al. 2001). Östrojen reseptör fonksiyonu, normal spermatogenezin gerçekleşmesi için gereklidir, tiroid hormonlarının da sertoli hücreleri aracılığıyla indirekt olarak spermatogenez etkilediği bilinmektedir (Niederberger 1997).

4.3.3.2. Diğer faktörler

Endokrin kontrolün yanı sıra, birçok parakrin sinyalinin germ hücresinin kaderinin belirlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (Niederberger 1997, Hedger 2003, Print et al. 2000). Spermatogenezin kontrolünde, hücreler arası ilişkiler (sertoli hücresi, leydig hücresi, germ hücresi, peritübüler miyoid hücreler), sitokinler, büyüme faktörleri, enzimler, transport proteinleri ve adhezyon molekülleri etkilidir (Parks et al. 2003, Niederberger & Lamb 1997).

Büyüme faktörleri; embriyonik gelişim sırasında germ hücre göçünde, germ hücrelerinin yenilenmesi ve çoğalmasında, mayozun ve farklılaşma aşamalarının düzenlenmesinde rol oynarlar (Niederberger & Lamb 1997). Spermatogenezde rol oynayan büyüme faktörleri arasında epidermal büyüme faktörü, transformik büyüme faktörü β , bazik fibroblast büyüme faktörü, testiküler nöropeptitler, sinir büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü sayılabilir (Niederberger & Lamb 1997, Print et al. 2000).

Ayrıca interlökinler (IL1, IL-2, IL-4), kök hücre faktörü, lösemi inhibitör faktör (LIF), kemik morfogenetik proteini-4 de spermatogenezde etkilidir (Hedger 2003, Print et al. 2000). Bunlardan başka peritübüler hücrelerin germ hücrelerinin çoğalmasını uyardığı ve germ hücreleri farklılaşması için gerekli olan retinolün seminifer tübüle ulaşmasına aracılık ettiği gösterilmiştir.

İnsan sperm membran proteini-1(hSMP-1), insan sperm başının akrozom bölgesinin yüzeyinde lokalize olan bir proteindir. Testiste, spermatogenezin her aşamasında, hemen hemen bütün germ hücrelerinden salınır. Bu proteinin germ hücre farklılaşmasının erken dönemlerinde rolü olduğuna inanılmaktadır (Zhang et al. 2000).

Kalsiyum, magnezyum, bakır ve çinkonun spermatogenez için önemli olduğu bilinmektedir. Çinko, spermium nükleusunun kromatin yoğunlaşmasında işlev görür (Wong et al. 2001).

RhoGTPase'lar hücre hareketi, aktin reorganizasyonu, bağlantı dinamikleri, hücre siklusu ve adhezyonu da dahil olmak üzere GTP aracılığıyla gerçekleşen pek çok hücrel olayda görev alan, 20-40 kDa moleküler ağırlığa sahip bir monomerik G proteini ailesidir. Bunlarda RhoB, Rac2 ve Cdc42'nin hem sertoli hücresi hem de germ hücresi tarafından salındığı ve spermatogenez için önemli olduğu bilinmektedir (Lui et al. 2003).

Testiküler makrofajlar, direkt ve indirekt yoldan sertoli hücresi aktivasyonunu ve germ hücrelerinin yaşamını etkiler. Spermatogenezin hasarlandığı olgularda, testisteki makrofaj sayısının arttığı bildirilmiştir (Frungieri et al. 2002). Artan yaş ile birlikte spermatogenezde bazı değişiklikler meydana gelir (Plas et al. 2000). Koyu ve açık tip A spermatogoniumlarının sayısında azalma, genetik bozukluklar ve spermatidlerde görülen malformasyonların yanı sıra, yaşla birlikte sertoli hücrelerinin sayısında da azalma görülür (Barratt 1995, Plas et al. 2000). Spermatozitler, spermatidler ve spermiumlar spesifik antijenler salarlar. Bu antijenler puberteye kadar oluşmazlar, dolayısıyla immün tolerans gelişmez. Daha sonra oto antikörlerin gelişimini ise kan- testis bariyeri engeller (Barratt 1995).

4.4. Erkek infertilitesi ve nedenleri

4.4.1. Erkek infertilitesi

- Total spermin 1 ml semende 5 milyondan daha az olması durumunda,
- %50'den fazla anormal morfolojiye sahip sperm bulunduğunda,
- Spermin, yumurtayı delme yeteneğinin bulunmaması durumunda infertilite tanısı konabilir.

Erkek infertilitesi nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

1) Pretestiküler nedenler

a- Hipotalamik hastalıklar:

- İzole gonadotropin yetmezliği (Kallmann sendromu)
- İzole LH yetmezliği

- İzole FSH yetmezliği
- Doğumsal hipogonadotropik sendromlar

b- Hipofizer hastalıklar

- Hipofiz yetmezliği (Tümörler, infiltratif süreçler, operasyon, ışınlama)
- Hiperprolaktinemi
- Hemokromatoz
- Eksojen hormonlar (östrojen-androjen fazlalığı, glikokortikoid fazlalığı, hiper/hipotiroidizm)

2) Testiküler nedenler:

- a- Kromozom anomalileri (Klinefelter sendromu, vs)
- b- Noonan sendromu (Erkek Turner sendromu)
- c- İzole Sertoli hücre sendromu (SCOS)
- d- Gonadotoksinler (ilaçlar, ışınlama)
- e- Orşit
- f- Travma
- g- Sistemik hastalıklar (böbrek yetmezliği, orak hücre hastalığı, vs)
- h- Defektif androjen sentezi veya aktivitesi
- ı- Kriptorşidizm
- i- Varikosel

3) Posttestiküler nedenler:

- a- Sperm iletim bozuklukları
 - Doğumsal bozukluklar
 - Edinsel bozukluklar
 - Fonksiyonel bozukluklar
- b- Sperm motilite veya fonksiyonu bozuklukları
 - Sperm kuyruğunun doğumsal defektleri
 - Olgunlaşma defektleri
 - İmmunolojik defektler
 - Cinsel disfonksiyon
 - Enfeksiyon (Tanagho 1995).

4.4.1.1. Sperm bulgularına göre

Aspermi

Psikojenik bozukluklar, retrograd ejakulasyon, emisyon yetersizliği, vasküler, hormonal ve ereksiyon bozuklukları nedeniyle seminal sıvının olmamasıdır (Anafarta ve ark. 1998).

Hiposperti

Prostat, seminal veziküller ve vaz deferens enfeksiyonları, travma ve tümörler, androjen eksikliği, kanal tıkanıklıkları, emisyon bozukluğu ve retrograd ejakulasyon nedeniyle toplam ejakulat hacminin 2 ml' den az olması durumudur (Anafarta ve ark. 1998).

Hiperspermi

Prostat ve seminal veziküllerin enfeksiyonu ile ejakulat volümünün 8 ml' den fazla olmasıdır (Anafarta ve ark. 1998).

Azoospermi

Genetik, hormonal nedenler, ilaçlar, radyasyon, kanalların tıkanıklığı, germinal aplazi, enfeksiyon ve geçirilmiş operasyonlar sonucu ejakulat içinde hiç germinal hücre bulunmamasıdır (Anafarta ve ark. 1998).

Oligozoospermi

Kromozomal nedenler, idiyopatik, inmemiş testisler, bazı ilaçlar, genital enfeksiyonlar, koit sıklığı, stres, beslenme, ısı vb. Faktörlere bağlı olarak sperm sayısının 20 milyon / ml' den az olması halidir (Anafarta ve ark. 1998).

Astenoospermi

Genital enfeksiyonlar, antisperm antikorların varlığı, varikosel, Kartagener sendromu, toksik maddelerle temas, ısı, genetik anomaliler, ilaçlar, androjen yetersizlik, epididim fonksiyon bozuklukları, koit sıklığında azalma, ejakulat viskozite bozuklukları, prostat ve seminal vezikül fonksiyon bozuklukları nedeniyle

normal motilitedeki sperm sayısının yarısından fazlasının azalmasıdır (Anafarta ve ark. 1998).

Teratozoospermi

Kromozomal nedenler, toksik maddelerle temas, seminal kanallarda deformasyon, emisyon bozukluğu ve epididim enfeksiyonu nedenleriyle WHO kriterlerine göre morfolojisi bozuk sperm sayısının % 40'tan fazla olması durumudur (Anafarta ve ark. 1998).

Oligoastenoteratozoospermi (OAT)

Varikosel, inmemiş testis, ısı, ilaçlar veya çevresel toksinler nedenleriyle sperm dansite, motilite ve morfoloji bozukluklarının bir arada görülmesi durumudur.

Nekrozoospermi

Kadına ait faktörler, immünolojik nedenler, genital enfeksiyonlar, travma, seminal kanallarda obstrüksiyon, varikosel, geçirilmiş operasyonlar ve yetersiz cinsel eğitim nedenleri ile WHO'ya göre sperm parametreleri normal değerde olmasına rağmen tüm spermlerin ölmesi halidir (Anafarta ve ark. 1998).

Sperm konsantrasyonuna göre sınıflama:

Sperm Oranına Göre İsimlendirme	Sperm Miktarı milyon/mL
Azoospermi	0
Şiddetli Oligoospermi	<1
Orta Düzey Oligoospermi	1-5
Hafif Oligoospermi	5-20
Normal	>20

Tablo 1. Sperm Miktar Değerlendirmesi

Sperm kalitesini düşüren bir çok neden olduğu için tek başına semen analizi yeterli değildir. Ancak, çiftlerin doğru değerlendirilmesi için gerekli parametrelerden biridir.

4.4.1.2. Etiyolojisine göre

Tüm infertilite olgularının %30-50'sinde erkek faktörü bulunduğu ve erkeklerin %30-40'ında anormal sperm üretim nedeni tam olarak ortaya konamadığından, genetik değişkenlerin ağır infertilite olgularının büyük kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Rucker et al. 1998).

Spermatogenez hücre proliferasyonu, mayoz ve farklılaşmasını kapsayan uzun ve karmaşık bir işlemdir. Erkek germ hücre üretimi işlevinde yer alan çok sıkı kontrol altındaki sinyal akışını etkileyen genetik değişiklikler bazen olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. İnsanlarda erkek infertilitesine neden olan pek çok genetik etiyoloji tanımlanmıştır.

1. Kromozomal bozukluklar,
2. Y kromozom mikrodelsiyonları,
3. Hipotalamik-hipofizer-gonadal aks bozuklukları,
4. Steroid ve reseptör defektleri,
5. Ekstratestiküler duktal ve ejakulatör sistem anomalileri,
6. Sperm üretim ve fonksiyon bozuklukları olarak sıralanabilir.

Neden	Sıklık
İdiyopatik erkek faktör	%31
Varikosel	%15.6
Hipogonadizm	%8.9
Ürogenital enfeksiyonlar	%8
İnmemiş Testis	%7.8
Koitus ve ejakülasyon bozukluğu	%5.9
İmmünolojik Faktörler	%4.5
Sistemik Hastalıklar	%3.1
Obstrüksiyon	%1.7
Diğer	%5.5

Tablo 2. Erkek Faktör İnfertilitesi Etiyolojik Nedenleri ve Sıklığı

Kromozomal bozukluklar

İnfertil ve subfertil erkeklerde kromozomal bozukluklar sık olarak bulunabilmektedir. Normal popülasyonda %0.5 civarında bulunan bu durum 9766 infertil erkeğin değerlendirildiği bir analizde %5.8 civarında bu tip bir anomalinin bulunabileceği bildirilmiştir. Bu erkeklerin %4.2'sinde seks kromozom anomalileri, %1.5'inde otozomal kromozomal anomaliler saptanmıştır (Johnson 1998). Öte yandan 94465 erkek yeni doğanda yapılan benzer bir analizde kromozomal anomali oranı %0.38, seks kromozomal anomali oranı %0.14, otozomal kromozomal anomali oranı ise %0.25 olarak bulunmuştur (Van Assche et al. 1996). Kromozomal anomaliler seks kromozomu anomalileri veya otozomal kromozomal anomaliler yanında sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler olarak da alt gruplarda değerlendirilebilir.

Sayısal anomaliler hücre başına düşen kromozom sayısında görülen deviasyonlardır. Poliploidi, kromozom sayısının katlı oranda arttığını ifade eder ve anöploidi ise bir veya daha fazla kromozomun kaybı veya fazlalığını ifade eder. Poliploidi genellikle yaşamla bağdaşmaz veya belli tip kanserlerde karakteristik olarak görülür. Anöploidi ise yaşamla bağdaşır, ancak klinik olarak şiddeti hangi kromozomun etkilendiğine göre değişmektedir.

Yapısal kromozomal anomaliler bir veya daha fazla kromozomun delesyonunu veya duplikasyonunu içermektedir. Aynı zamanda kromozomal yeniden düzenlenme ve translokasyonları da içermektedir. Otozomal ve seks kromozomları bu tip düzensizliklerden etkilenmektedirler ve her iki durumda da erkek infertilitesiyle ilişkisi bulunabilmektedir. İnfertil ve subfertil erkeklerde kromozomal bozukluklar sık olarak bulunmaktadır. Normal popülasyonda % 0,5 olarak bulunan kromozomal anomali oranı, infertil erkeklerde yaklaşık % 5 civarına yükselmektedir (Vegetti et al. 2000). Kromozomal anomaliler, sayısal ve yapısal anomaliler şeklinde değerlendirilmektedir. Sayısal anomaliler, hücre başına düşen kromozom sayısında görülen değişikliklerdir. Yapısal kromozom bozuklukları ise bir veya daha fazla kromozom segmentinin delesyonu veya duplikasyonunu içermektedir.

İnfertiliteye neden olan sayısal ve yapısal kromozom bozuklukları aşağıdaki gibi sınıflandırılır (P.May-Paloup et al. 2003).

Sayısal kromozom bozuklukları:

- a. Klinefelter sendromu
- b. XYY erkek
- c. Miks gonadal disgenezi
- d. Otozomal anöploidiler

Yapısal kromozom bozuklukları:

- a. Robertsonian translokasyon
- b. Resiprokal translokasyon
- c. Otozomal İnversiyon
- d. XX erkek sendromu

Sayısal kromozom anomalileri

Bazı infertil erkeklerin normal fertil popülasyon ile karşılaştırıldığında düşük kalitedeki spermatozoalarında kromozomal “nondisjunction” (mayozun birinci anafaz aşamasında çift değerlikli kromozomların anormal hareketleri sonucu oluşan anomali) sıklığının yüksek olması da bu spermlemlerle oluşacak çocuklarda önemli problemlere yol açabilir (Finkelstein et al. 1998). Ancak bu erkeklerin somatik dokularında “nondisjunction” göstermemeleri somatik ve non-somatik dokularda mozaizmin olabileceğini düşündürmektedir. Bu görüş periferik kan örneğinden elde edilen karyotip analiz sonucunun gametten farklı olabileceği fikrini uyandırmaktadır. Ayrıca sperm morfolojisi de normal kromozomal yapıdaki spermatozoayı da ayırt etmekte kullanılamamaktadır. İnfertil erkeklerin ejakülatından elde edilen morfolojik olarak normal spermlemlerde multikolor flöresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile mitotik ve mayotik nondisjunction gösteren spermlemlerin seviyelerinde artış saptanmıştır (Huang WJ, Lamb DJ 1999). Ek olarak TESE-ICSI adayı azospermik erkeklerin testis biyopsi materyaline uygulanan FISH analizinde, germ hücrelerinde seks kromozom anöploidisi artmış sıklıkta saptanmıştır (Levron et al. 2001). ICSI sonrası oluşan gebeliklerde otozomal trizomiler ve seks kromozom anöploidileri daha yüksek oranda bulunmuştur (Martin RH 1996). Klinefelter sendromu, XYY erkek, miks gonadal disgenezi, otozomal aneuploidiler erkek infertilitesine neden olan sayısal kromozom anomalileri arasında yer alırlar.

Yapısal kromozomal bozukluklar

Erkek infertilitesinin şiddetli şekilde görüldüğü azospermi ve ciddi oligospermili hastalarda otozomal ve seks kromozomlarında veya her ikisinde kromozomal yeniden düzenlenmeler görülür. Özellikle Robertsonian ve resiprokal translokasyonlar rastgele seçilmiş erkek yenidoğanlara göre infertil erkeklerde 8.5 kat daha fazladır (Van Asche et al. 1996). Benzer şekilde, otozomal inversiyonlar da genel popülasyona göre infertil erkeklerde 8 kat daha fazladır. Tutulan kromozomlara bakılmaksızın, Robertsonian translokasyonları olan hastaların çoğu anormal seminal parametreler göstermektedir. Resiprokal translokasyon taşıyan erkekler normalden azospermiğe kadar değişen semen özelliklerine sahip olabilir. Normal bir fenotipe karşın, 46,XX karyotipli bir erkek (XX erkek sendromu) infertildir. Bu nadir durum yaklaşık 20.000 canlı doğumda bir görülür. Daha önce tanımlandığı gibi, bu sendrom için en olası açıklama, çok az hastada olmasa da, testisin Y kromozomu uzun kolunda bulunan seks belirleyici bölge yani SRY'nin X kromozomuna translokasyonudur. Bu XX erkek hastalar testis biyopsilerinde Sertoli cell-only patolojisiyle birlikte azospermiktir (Antonelli et al. 2000). Fenotipik özellikleri arasında jinekomasti, dışı kıllanma modeli ve küçük testisler bulunur. XX erkeklerin yaklaşık %10'unda (SRY-negatif) ambigius genitalia veya hipospadias bulunmaktadır (Antonelli et al. 2000). Robertsonian ve resiprokal translokasyonlar, otozomal inversiyon, XX erkek sendromu erkek infertilitesine neden olan yapısal kromozom anomalileri arasında yer alırlar.

Y kromozomu ve mikrolelesyonları

1976 yılında Tiepolo ve Zuffardi, karyotip analiz çalışmaları sırasında Y kromozomun sperm üretiminde rol oynadığını belirlemişlerdir. Daha sonra 6 azospermili hastada karyotip analizi ile Y kromozomunun uzun kolunda geniş bir terminal delesyon bulmuşlar ve bu bölgenin tamamen spermatogenezden sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir. Azospermi Faktör (AZF) olarak adlandırılan bu bölgedeki delesyonlar fenotipik bozukluk meydana getirmeden oligozoospermi ya da azospermiye neden olmaktadır (Tiepolo & Zuffardi 1976, Uluğ ve ark. 2006). Günümüzde Y kromozomunun uzun kolunun spermatogenez için gerekli olduğu bilinmektedir. Yq üzerinde 3 adet birbiri ile örtüşmeyen lokus veya bölge

haritalanmıştır. Bu bölgeler AZFa (proksimal), AZFb (santral), ve AZFc (distal) olarak isimlendirilmektedir (Foresta et al. 2001). Kent-First ve arkadaşları AZFd olarak isimlendirilen yeni bir delesyon bölgesi tanımlamıştır (Kent-First et al. 1999). Bu çalışmada AZFd bölgesindeki mikrodelesyonların oligospermi veya normal sperm sayıları ile birlikte anormal morfoloji görüldüğünü bildirmişlerdir. Dördüncü bölge olan AZFd AZFc ile üst üste binmekte ve bu bölgenin farklı bir bölge olduğu düşünülmektedir (Kent-First et al. 1999, Muslumanoglu ve ark. 2005). Bu bölgeler olasılıkla spermatogenezin değişik safhaları için gerekli olan multipl genleri saptamaktadır. AZFa lokusu için aday genler USP9Y (ubiquitin spesifik proteaz-9) ve DBY (deadbox), AZFb için RBMY (RNA-binding motif) ve AZFc için DAZ (Deleted in Azospermia) genidir (Foresta et al 2001, Kent-First M et al. 1999, Vogt et al. 1997, Lahn & Page 1997, Reijo et al. 1995). Bu bölgelerin delesyonu ağır oligospermi ile birlikte özellikle şiddetli azospermi ile ilgilidir ve sıklıklar DAZ genini de kapsamaktadır. Obstrüktik olmayan azospermik erkeklerdeki Y mikrodelesyon insidansı %8-18 arasında bildirilmektedir (Foresta et al. 2001). Bu bölgede otuzdan fazla gen ve gen ailesi tanımlanmıştır (Foresta et al. 2001). Birkaç genin spermatogenezde defekt ile ilişkisi ortaya konduysa da çoğu genin fonksiyonu bilinmemektedir. Mikrodelesyonlar fertil erkeklerde de bulunmasına rağmen, infertil erkeklerde daha sık bulunmaktadır (Pryor et al. 1997). Mikrodelesyonlar yaygın olarak, DAZ genini çevreleyen AZFc bölgesinde bulunmaktadır. Bununla birlikte, DAZ geni delesyonu ve spermatogenez ya da AZFc mikrodelesyonları arasında zayıf bir korelasyon vardır (Hsu et al. 2006, Pryor et al. 1997). Azospermi ayrıca daha büyük AZFb Y mikrodelesyonlu erkeklerde de meydana gelmektedir (Hopps et al. 2003). Genellikle, Y kromozomundaki genler hayati aşamalar için gerekli değildir fakat erkek karakteristiklerini şifrelemektedir. Y mikrodelesyonları, farklı derecelerde spermatogenezin bozulması ile ilişkilidir (Foresta et al. 2000, Hsu et al. 2006, Kent-First et al. 1999, Reijo et al. 1995, Vogt et al. 1996). AZFc mikrodelesyonların sıklığı fazla olan bireylerin eşlerinde yinelenen düşüklerin olduğu bildirilmektedir (Dewan et al. 2006).

Y Kromozom mikrodelesyonları spermatogenetik yetmezliğin en sık sebeplerinden biridir (Steirdeghem et al. 1996). İdiyopatik azospermide %15-20, idiyopatik oligospermide %7-10 oranında rastlanmaktadır. Y kromozom

mikrodelesyon insidansı çalışılan grupların heterojnitesi, topluluklar arasındaki varyasyon nedeniyle farklı oranlarda tespit edilmektedir.

Genotip-fenotip ilişkisini kurmak tamamıyla mümkün olmasa da bir dizi çalışma genel eğilimi desteklemektedir (Girardi et al. 1997). Vogt ve arkadaşları 1996'da Y kromozom mikrodelesyonlarının birbiriyle çakışmayan belirli delesyon şekilleri izlediğini ve herbir bölgenin de belirli histopatolojik yapı ile uyumlu olduğunu ileri sürdüler (Vogt et al. 1996). AZFa'nın diğerlerine göre seyrek tespit edildiğini ve tip1 SCOS ile ilişkili olduğunu, ancak ağır oligospermi de gösterebildiğini bildirdiler. Bu bilgiyi Krausz ile Mc Elreavey ve Quereshi ağır oligospermik, AZFa delesyonu olan bir hasta bildirerek doğruladılar (Krausz & McElreavey 1999, Quereshi et al. 1996). Krausz ve Elreavey ayrıca AZFc'nin hipospermatogenez veya tip2 SCOS ile ilişkili görüldüğünü, bu nedenle bu delesyonun tespit edildiği hastalara TESE/ICSI yerine kriyo-TESE önerilmesinin uygun olduğunu ileri sürdüler. AZFb delesyonlarında ise (sY113-sY143 sınırları arası tüm delesyonlar) spermatositik arrest tanımladılar (Krausz & McElreavey 1999).

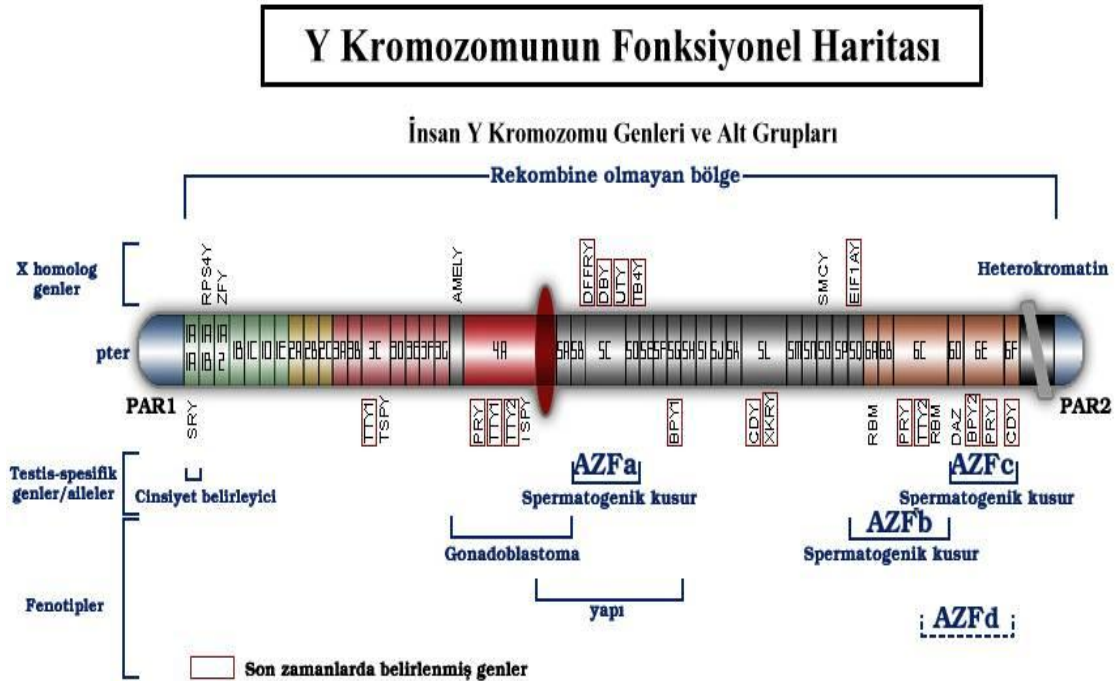
Kent-First 1996'da AZFb ve AZFb-c arası delesyonlara daha sık rastladığını, AZFb'nin matürasyon arresti, AZFb ve AZFa ve/veya AZFc delesyonlarında SCOS matürasyon arresti histopatolojilerinin sıklıkla izlendiğini bildirdi (Kent-First et al. 1996). Girardi ve arkadaşları 1997'de ve Brande ve arkadaşları 1998'de AZFb'nin spermatositik arrest ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Girardi et al. 1997, Brandel et al. 1998). Pryor ve arkadaşları 1997'de AZFb delesyonu olan bir oligozoospermik infertil bir erkek hasta bildirmiştir (Pryor et al. 1997).

Özet olarak genotip/fenotip bağlantısı şu doğrultuda kabul görmektedir:

1. Delesyonlar azospermi veya ağır oligospermide belirgin olarak bulunmaktadır,
2. Anormal androlojik bulgusu olan hastalarda daha sık delesyon bulunmaktadır,
3. Azospermiklerde oligospermiklerden fazla, idiyopatik infertilitede etiyolojisi bilinenlere göre Yq delesyon frekansı daha fazladır,
4. Büyük delesyonlar genellikle ağır spermatogenetik defekt ile ilişkilidir,

5. AZFa delesyonları daha seyrek (%1-5) görülmekte ve genellikle tip1 SCOS ile ilişkilidir,
6. AZFc ve AZF b+AZFc en sık rastlanan delesyonlardır.

AZFc delesyonları ve parsiyel AZFb delesyonu olan hastaların %50'sinden TESE/ICSI ile sperm elde edilebilirken, komplet AZFb delesyonunda matür spermatozoa bulunma şansı neredeyse yok kabul edilmektedir. Bu nedenle Y mikrolelesyonunun pozisyonu ve büyüklüğü önem taşımaktadır. AZFc bölgesini içeren veya bu bölgeye uzanan delesyonlarda (AZFb+AZFc ve AZFa+AZFb+AZFc) testiküler spermatozoanın total yokluğu ile ilişkili bulunmuştur (Silber et al. 1998). Fertil bireylerde de Y kromozom mikrolelesyonları araştırılmıştır. Kent-First ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada ilk grupta 200 fertil bireyde hiç delesyon saptamamıştır (Kent-First et al. 1996). Sonraki 700 fertil bireyde yapılan çalışmada 2 bireyde sY272, 3 bireyde sY207 saptanmıştır (%0.7). Pryor ve arkadaşları 200 fertil erkeğin 4'ünde distal AZFb kısmında delesyon saptamıştır (Pryor et al. 1997). Kent-First ve arkadaşları 920 fertilde yapılan çalışmada 8 kişide delesyon tespit etmiştir (Kent-First et al. 1999).



Şekil 7. Y Kromozomunun Fonksiyonel Haritası

Pseudo otozomal bölgeler (PABY1, PABY2)

Pseudootozomal (PABYI ve PABYII) bölgeler Y kromozomunun uç kısımlarında bulunmaktadır ve eşleşme sırasında X kromozomu ile tutunma bu bölgelerde gerçekleşmektedir. Haritalandırılmış birçok gen, Yp'nin 2.7 milyon baz çifti uzunluğundaki pseudootozomal bölümünde bulunur. PABY1 (pseudootozomal boundry region on Y chromosome) ve PABY2 bölgelerinin X kromozomu üzerinde aynı sırada homologları mevcuttur. Y kromozomu üzerinde sadece bu iki bölge mayotik bölünmeye katılır. Mayotik bölünmeye katılmayan bölge Y kromozomunun %95'ini oluşturur. Bu bölgeler erkeğe spesifik özellikleri belirleyen bölge (MSY) ismini alır. Bu bölgeler üç farklı ökromatik (X transposed, X degeneratif ve amflikonik sekanslar) ve heterokromatik bölgeden oluşur. Pseudootozomal bölgeler toplam 156 transkripsiyon üniti ve 78 proteini kodlayan bir bölgedir. Günümüze kadar bu bölgelerle ilgili 27 ayrı protein tanımlanmıştır (Sun et al. 1999, Prasanth & Ali 2003).

Cinsiyet belirleyici bölge Y (SRY)

Bu gen testis belirlenmesinde görev almaktadır (Kent-First et al. 1999, Reijo et al. 1995, Vogt et al. 1996). Testis gelişimini belirleyen faktör ya da faktörlerin araştırılması sırasında birçok gen incelenmiştir. Bunlar arasında H-Y antijeni ve ZFY geni de vardır. Ancak bugün için bu faktörlerin testis belirlenmesinde rolleri olmadığı kabul edilmiştir. Bipotansiyel gonadın testis yönüne farklılaşması için gerekli gen, "Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen bölgesindeki SRY genidir (Vogt et al. 1996, Tiepolo et al. 1976). Bu gen farklılaşma için gerekli olmakla beraber yeterli değildir.

Yp 11.3 bandında tanımlanan ve intronsuz olan SRY'nin tek ekzonunun oluşturduğu 1.1 kb boyutundaki transkriplerin ürettiği proteinler, 204 aminoasit uzunluğundadır. HMG-BOX (High mobility group) homolog dizi içerir. HMG-BOX ileri düzeyde korunan 79 aminoasitlik DNA bağlayıcı bir motiftir. DNA'nın kıvrılmasına yardımcı olarak, hedef genin aktivasyonu veya baskılanmasını ve gendeki transkripsiyonun hızlanması veya yavaşlamasını sağlar. 46, XY kadınlarda yapılan çalışmalarda X kromozomunun kısa kolu üzerinde (xp21.2 – p22.11) SRVX (X – linked sex reversed locus: cinsiyet dönüştürücü gen) adlı bir gen haritalanmıştır.

Ogata ve Matsuo SRY geni ile SRVX ve testis oluşturan otozomal genlerin ilişkisi hakkında bir hipotez öne sürmüşlerdir. Buna göre SRY, SRVX'i baskılamak üzere işlev görmekte, SRVX ise otozomal genlerin baskılanmasında rol oynamaktadır. 46 XY dişilere seks reserved dişiler denir ve bu dişilerde yetersiz SRY veya SRY yokluğu bulunmaktadır (Berta et al. 1990). XY seks reserved dişilerde SRVX duplikasyonundan bahsedilmektedir (Pao et al. 1993).

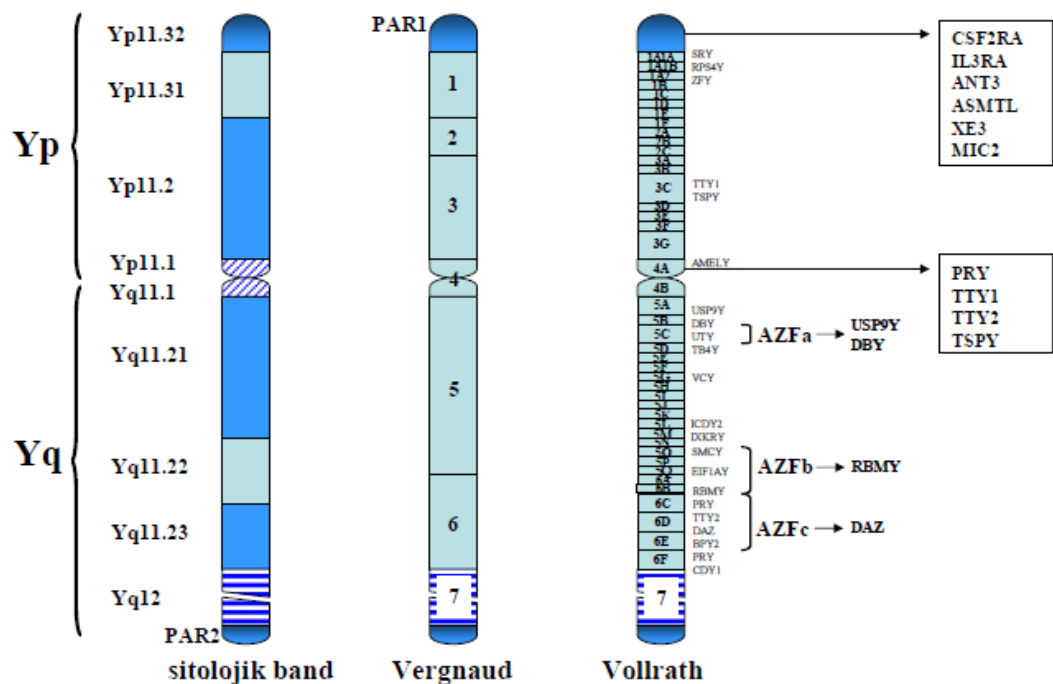
Normal 46, XY erkekler ve bir kısım 47, XXY Klinefelter erkeklerde SRY geni, SRVX'in aktif tek kopyasını baskılayabilir. Böylece serbest kalan otozomal lokus testis formasyonunu gerçekleştirebilir. 46, XX dişilerde SRVX aktiftir ve otozomal genleri baskılayarak, bipotansiyel gonadın over yönünde farklılaşmasını sağlar. Eğer SRVX iki kopya halinde ise ve aktif durumdaysa SRY geni SRVX'in fonksiyonlarını yeterince azaltmayacak ve testis oluşumu engellenecektir. Bu model gonadal farklılaşmada X ve Y kromozomları ile otozomal genlerin birlikte çalıştığını açıklamaktadır.

DAZ geni (deleted in azospermia)

DAZ geni 1995'te Y kromozomu üzerinde tanımlandı (Reijo et al. 1995). Bu gen normal spermatogenezin tamamlanması için gerekli bir gendir. Bu geni içeren bölge azospermik ve oligospermiklerde delesyona uğramış olarak bulunabilmektedir. Bu gen grupları Y kromozomunun 6. bölgesindeki AZFc'nin distalinde yer alırlar ve ardışık tekrarlanan 24 aminoasitlik 7-11 kopyadan oluşan bir proteini kodlarlar. DAZ geni 10 exon içerir ve spermatozoada ifade edilir. DAZ geni en erken germ hücrelerinin spermatogonial çizgi boyunca farklılaşmasına yardım eder ya da onların farklılanıp farklılanmayacağını ya da yenilenip yenilenmeyeceklerini belirler. DAZ genlerinin özellikle spermatogonia ve spermatositlerde transkribe olduğu gösterilmiştir. DAZ geninin tüm kopyaları AZFc bölgesinde bulunduğundan, bu bölgenin delesyonu tüm kopyalarının kaybına neden olabilmektedir. Y kromozomu üzerinde dağınık olarak bulunan ve çok sayıda fonksiyonel kopyası olan genlerin bir veya bir kaçının delesyonu fenotipte ortaya çıkmayabilir. DAZ geninin tüm kopyalarının kaybı, ağır klinik belirtilerle ortaya çıkabilir.

Farenin Y kromozomu üzerindeki AZF bölgesinde DAZ veya DAZ benzeri bir gene rastlanmamıştır. 17. kromozomun uzun kolu üzerinde DAZ'a benzer DAZL

Y kromozom sitolojik bandları



RBM (RNA bağlayıcı motif) gen ailesi

48

azından bir fonksiyonel kopyasının bulunduğu gösterilmiştir. AZFb delesyonlu erkeklerde RBM 1 gen kaybının kesin olarak infertiliteye neden olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Japon infertil erkekler üzerinde yapılan moleküler analizler sonrasında RBM2 geninin polimorfik olduğu gösterilmiş ve bu genin infertil erkeklerin babalarında da delesyona uğramış olduğu saptanmıştır. Bu durum oğuldaki infertilitenin RBM2 gen delesyonuna bağılı olmadığını göstermiştir (Arn et al. 1994). Özetlenecek olursa Y kromozomunun diğerk bölgeleri korunmuş olmakla birlikte DAZ bölgesinin korunmadığı ve bu bölgede delesyonlara sıkça rastlandığı dikkat çekmektedir. RBM 2 geninin infertil erkeklerde delesyona uğradığı gösterilmekle birlikte babalarında da aynı delesyona rastlanması bunun infertiliteye yol açan bir mutasyondan çok fenotipe yansımayan bir polimorfizm olduğunu düşündürmektedir (Kadıoğlu ve ark. 2004).

Bazı infertil erkeklerde RBM 1 geni delesyonu gösterilmiş olsa da DAZ bölgesinin bu tür hastalarda daha büyük sıklıkla delesyona uğradığının gösterilmesi ve aynı zamanda sağlıklı fertil erkeklerde de RBM 1 geni delesyonuna rastlanmış olması, AZF'ye en güçlü aday genin AZFc bölgesindeki DAZ geni olduğunu ortaya koymaktadır.

Y kromozomunda mikrolelesyon saptanan hastaların ejakülatlarında veya testislerinde birkaç sperm bulunabilir, bu spermler bu hastaların TESE-ICSI için aday olmalarına neden olabilir. Bu spermlerle elde edilen gebeliklerde Y mikrolelesyon taşıyıcılığı bulunması ve sonraki jenerasyona aktarımı mümkündür.

Hipotalamik hipofizer gonadal aks bozuklukları

Hipotalamo-hipofizer gonadal aksta erkek fertilitisini etkileyen genetik düzenleyici faktörler bulunmakta ve bunların anormallikleri infertiliteye neden olabilmektedir (Lahn & Page 1997). Bu nadir bozukluklar seksüel gelişimi, fonksiyonu etkileyen veya genetik regülatuar elemanlara ait mutasyon, delesyon veya polimorfik genişlemeler ile ortaya çıkmaktadır. Genel olarak mutasyonlar hormon veya büyüme faktörlerinin, veya reseptör ve bununla ilgili sinyal iletim yollarının biyosentezini etkilemektedir (Lahn & Page 1997).

Hipogonadotropik hipogonadizm, Kallmann sendromu, Prader-willi sendromu bu grupta yer alan ve erkek infertilitesine neden olan sendromlardır.

Gonadotropinler

LH ve FSH reseptörlerinin bütünlüğü hipotalamo-hipofizer-gonadal aks fonksiyonu için önemlidir. FSH spermatogenez için gerekli bir hormon olarak kabul edilmektedir. Etkisini sertoli hücreleri üzerine G protein reseptör ailesinden bir FSH reseptörü aracılığıyla yapmaktadır (Minegishi et al 1991). FSH-RS aktivasyonu erkekte spermatogenezi, kadında folikülogenezi aktive etmektedir.

Steroid hormon ve reseptör bozuklukları

Steroid hormon ve reseptör kusurları nedeniyle oluşan infertiliterler ya steroid biyosentezi ve metabolizmasındaki düzensizliklere ya da androjenlere karşı uç organlarda gelişen dirençle bağlıdır. Kortikosteroid ve androjenik steroid sentezindeki bozukluklarda konjenital adrenal hiperplazi gibi sendromlar gelişmektedir. Ayrıca testosteronun dihidrotestosterona dönüşmesinde rol oynayan 5 α redüktaz enziminin eksikliğinde gelişmemiş, anormal dış genital organ ve sperm iletim sorunları ortaya çıkmaktadır (Griffin & Wilson 1992). Androjen insensitivite sendromları ve östrojen insensitivite sendromları erkek infertilitesine neden olan başlıca steroid hormon ve reseptör bozukluklarıdır.

Ekstraselüler duktal ve ejakülatör sistem anomalileri

Bu bozukluklar içinde, konjenital bilateral vaz deferens agenezisi, persistan Müllerian kanal sendromu, Young sendromu, myelodisplazi ve Prune-Belly sendromu bulunmaktadır (Kadioğlu ve ark. 2004).

Mesane ekstrofisi ve epispadias

Eretil işlev bozukluğu ve ejakülasyon bozuklukları nedeniyle infertilite oluşmaktadır (Woodhouse 1994). Alt abdominal duvarın gelişim esnasında kapanma bozukluklarına bağlı oluşmaktadır. Yaklaşık olarak 1/20000-30000 canlı doğumda görülür.

Sperm üretim ve fonksiyon bozuklukları

Myotonik distrofi, Noonan sendromu, primer silier diskinezi, orak hücreli anemi ve β talasemi, sperm üretim ve fonksiyonlarını bozarak infertiliteye neden olabilmektedir (Fourie et al. 1991).

İnfertiliteye neden olan sistemik hastalıklar

Böbrek yetmezliği, karaciğer sirozu, defektif androjen aktivitesi, orak hücreli anemi infertiliteye neden olan sistemik hastaların başında gelir.

Testiküler infertilite nedenleri

Kriptorşidizm

Yetişkin erkeklerde sık görülen, inmemiş testislerin 2 yaşından sonra deforme olduğu bir gelişme defektidir. Tek taraflı inmemiş testisli erkekler hariç, inmemiş testisin fertilite potansiyeli çok düşüktür. Çünkü çift taraflı kriptorşidizm olgularında semen kalitesi bozuk olmaktadır.

Varikosel

Varikosel, infertil erkeklerde en sık görülen nedensel bulgudur. Spermatik venlerde kapakçıkların olmaması veya yetersiz olması yüzünden kanın reflüsü infertiliteye yol açmaktadır. Varikosel sıklığı, yetişkin erkek populasyonunda % 10 - 15, infertilite nedeniyle değerlendirilen bireylerde % 21 - 41 arasında olmaktadır. Varikoselli erkeklerin yaklaşık yarısında semen kalitesi bozulmuş olmasına rağmen, birçok varikoselli erkek fertil olmaktadır.

Posttestiküler infertilite nedenleri

Genital kanal obstrüksiyonları; enfeksiyon, immünolojik nedenler, cinsel fonksiyon bozuklukları, penisin koite engel olan veya vajen içine ejakulatın bırakılmasını önleyen anatomik deformasyonlarıdır (Hipospadias, retrograd ejakulasyon, penil eğrilikler vb.) (Anafarta ve ark. 1998, Gürkan 1999). Son zamanlarda erkek infertilitesi için kromozomal anormallikler, Ykromozom mikrodelesyonları, translokasyon, kistik fibroz transmembran konduktans regülatör mutasyonları ve diğer genetik faktörlerin, risk faktörleri olarak belirlendiği rapor

edilmiştir (Dohle et al. 2002, Foresta et al. 2001, Anguiano et al. 1992, Lee et al. 2003). Ayrıca DNA metilasyonunun da spermatogenez sürecinde önemli rol oynadığı, metilasyon bloke edildiğinde testislerde kondense spermatid oluşumuna ve spermatozoa sayısını azaltarak, teratozoospermi ve astenozoospermi' ye neden olduğu bildirilmiştir (Benchai et al. 2003, Raman & Narayan 1995).

4.4.1.3. İdiyopatik infertilite

İnfertil erkeklerin yarısını nedeni bilinmeyen idiyopatik infertilite oluşturmaktadır. Erkek üreme fizyolojisi hakkında bilgiler arttıkça tam olarak açıklığa kavuşturulabilecektir (Anafarta ve ark. 1998, Gürkan K. 1999).

4.4.1.4. Erkek infertilitesinin genetik nedenlerinin araştırılması için model olarak kullanılan organizmalar

Mendel genetiği ve erkek subfertilitesi

İnsan Y kromozomu üzerindeki mutasyonlar tanımı gereği bir sonraki nesile geçirilemez, çünkü bunlar spermatozoanın işlevini yerine getirememesine neden olmaktadır. Bununla beraber, Y kromozomal mutasyonların dişi sayesinde aktarımının olanaksız olması bu mutasyonların de novo oluşumunu ortaya çıkarmaktadır. Oysa erkek infertilitesine ait otozomal dominant mutasyonlar, eğer dişi üreme sisteminde bir patoloji yoksa sonraki nesile transfer edilebilir. X kromozomu ile erkek sterilitesine ait mutasyonlar heterozigot dişi taşıyıcılar tarafından taşınabildiği gibi otozomal resesif mutasyonlar, heterozigot erkek ve dişiler tarafından da aktarılabilir. Bu nedenle Y kromozomuna ait erkek steril mutasyonları hariç olmak üzere, erkek fertilitesini azaltan tüm mutasyonlar insan popülasyonlarının genetik yüküne katkıda bulunmaktadır. Ancak kalıtsal yolla geçebilir nitelikte olan erkek steril mutasyonlarının araştırılması ve ortaya konulması büyük ölçüde ailelerdeki subfertil erkek kardeşlerin tanımlanmasına bağlıdır. Bu nedenle erkek infertilitesinin araştırılmasına yönelik sistematik bir yaklaşım olarak meyve sineği ve fare gibi mutasyon indüksiyonuna ve genom görüntülemesine olanak veren model organizmalara dayanmak zorundadır.

Spermatogenez: hücresel farklılaşma

Spermatogenezin genetik olarak incelenmesinde model organizmaların kullanılması ile bu sistemin olağanüstü korunma altında olduğu ortaya konmuştur. Ökaryotların çoğu flagellalı veya silialı hücre oluşturmaktadır. Birkaç istisnası olmakla birlikte tüm erkek hayvanlar yüksek derecede özelleşmiş, flagellalı olan mobil sperm hücreleri üretirler (Baccetti & Afzelius 1976). Erkek germ hücre gelişimi, embriyogenezin başlangıcında, germ hücre dizisinin somatik hücre soyundan ayrıldığında başlar. Primordiyal germ hücreleri ekstragonadal bir lokasyonda ortaya çıkarlar ve daha sonra büyümekte olan gonadlara geçerler (Denis & Lacroix 1993, Kierszenbaum 1994, Foe et al. 1993). Hem sineklerde, hem de memelilerde erkek germ dizisi spermatogonia üreten kök hücreleri barındırır.

Spermatogonia sınırlı sayıda mitotik bölünme ile diploid yapıdaki primer spermatositlerin ortaya çıkmasını sağlar. Bütün primer spermatositler de 4 adet haploid yapıda yuvarlak spermatid oluşumunu sağlayan iki mayotik bölünme yaparlar. Post-mayotik sperm hücre gelişmesi ise spermatidlerin morfolojisinde ve yapısal organizasyonunda önemli ölçüde ortaya çıkan değişimler dizisi şeklindedir. Sperm çekirdeği yoğunlaşır ve şekil değiştirir, haploid DNA sıkı bir şekilde paketlenir, golgi aygıtından akrozomik bir sistem gelişir mitokondria “mitokondriyal türevleri” denilen yapıları oluşturmak için yeniden düzenlenir, aksonem ve diğer kuyruk yapıları birleşir ve sitoplazmanın çoğu matür sperm hücresinden ayrılır. Aksonemin 9+2 mikrotübül yapısını koruyarak oluşması spermatogenezin korunmasına ait bilgilerin oluşmasında önemli yer tutar. Bu nedenle spermatzoa büyüklük ve şekil açısından canlı türleri arasında farklılıklar gösterse de, temelde benzer özelliktedir (Guraya 1987, Hackstein 1991).

Drosophila ve memelilerde spermatogenezde mevcut olan benzerlikler sadece germ gücrelerinin selüler ve sub-selüler olarak diferansiasyonu ile sınırlı değildir. Post-mayotik olarak spermatidler genetik olarak farklılık göstermektedir. Mayoz sadece cinsiyet kromozomlarının dağıtılması değil, aynı zamanda otozomların da ayrışmasına, ve bu farklı allellerin farklı spermatidler arasında dağıtılmasını sağlar. Primer spermatosit safhasındaki yüksek oranlı transkripsiyon ve translasyon seviyesinde regüle edilen ekspresyon hem memelilerde hem de *drosophilada* mayotik bir bölünme ile oluşan tüm yapıların post-mayotik normal gelişim göstermesini

sağlar (Erickson 1995). Buna ek olarak, hem memelilerde hem de drosophilada spermatidler interselüler köprüler ile birbirlerine bağlanarak sinsityum oluştururlar (Guraya 1987, Braun et al. 1989). Memelilerde bu köprüler mRNA gibi sadece mayoz sonrası ortaya çıkan sitoplazmik içeriğin post-mayotik paylaşılmasını sağlar (Braun et al. 1989, Caldwell & Handel 1991). Drosophilada ise bu sistem, post-mayotik 4 no'lu kromozomun (genomun yaklaşık %2'sini temsil eder) fonksiyonel sperm içinde kalmasını sağlayarak spermatidlerin diferansiasyonuna olanak verir (Lindsley & Grell 1969). Erkeklerde ve drosophilada spermatogenez için ortak olan bir başka fenomen ise hücre döngüsü ile düzenlenen histonların daha temel varyantları ve protaminler gibi daha temel non-histon proteinler ile yer değiştirmesidir. Hücre döngüsü ile regüle edilmeyen testis spesifik histon isoformları kodlayan genler hem sıçan hem drosophila testisinde yüksek oranda transkribe olur (Kremer & Hennig 1986, Poccia 1986, Meistrich et al. 1985, Akhmanova et al. 1995, Akhmanova et al. 1996, Akhmanova et al. 1997). Spermatozoon sadece paternal genomu yumurtaya taşıyan bir taşıyıcı değildir. Drosophila ve kemirgen hayvanlar hariç olmak üzere memelilerde sperm hücresi oositin fertilizasyon süresi boyunca mikrotübül yapılan çekirdeğini oluşturan sentrozomu sağlar (Foe et al. 1993, Simerly et al. 1995).

Spermatogenez yüksek düzeyde korunan bir selüler ve sub-selüler diferansiasyon sürecidir. Bu nedenle meyve sineğinde spermatogenez için gerekli olan bir çok gen ve bunların ürünleri memelilerde de korunmuştur. Memelilerin spermalarının dış yoğun fiberlerinde kuyruğa spesifik sistin-glisin-prolin'den zengin protein bulunmaktadır (Burfeind & Hoyer-Fender 1991). Bu fiberlerin sağladığı gerilme gücünün sperm hücrelerini ejakülasyon sırasında zarar görmekten koruduğu düşünülmektedir (Baltz et al. 1990). Drosophilada sperm kuyruğuna spesifik bu proteinler Mst(3)CGP gen ailesi tarafından kodlanmaktadır (Schafer et al. 1995, Schafer et al. 1993). Sıçan ve drosophila homologları karboksi-terminal içindeki yapının %42'si benzerdir, proteinin tamamı için ortak amino asit oranı ise %22'dir (Schafer et al. 1993).

Meyve sineklerinde ve insanlarda erkek sperm hücresi farklılaşmasının karşılaştırmalı genetiği

Drosophiladaki spermatogeneze ait ayrıntılı genetik değerlendirme çok fazla sayıda genin erkek steril allellere dönüşebileceğini ortaya koymuştur. Bu rakama ilişkin olarak yapılan tahminler 600-2400 arasında değişmektedir. Genlerin çoğu otozomal resesif allellerle temsil edilir. Bunların yaklaşık %90'ı dişi fertilitasını etkilemez. Erkek steril mutasyonlarının ışık mikroskobu altında ve moleküler ve genetik yöntemlerle analiz edilmesi bu genlerin çoğunun erkek germ hücrelerinde gerekli olduğunu ve birçok genini pleotropik olduğunu göstermiştir. Tanımlanan mutasyonlar spermatogenezin gelişimsel arrestinin mayoza girişte ortaya çıktığını göstermektedir.

İnsandaki fertilite genleri

İnsanda spermatozoa oluşturmak için gerekli olan gen sayısı drosophilada spermatozoa oluşturmak için gerek gen sayısından daha düşük değildir. Öte yandan insan spermatozoası drosophila ile karşılaştırıldığında daha az karmaşık değildir (Linsley 1980, Fawcett 1975). İnsandaki gonial ve mayotik bölünmenin kontrolü için gerekli olan genler drosophiladaki kontrol için gerekli olandan daha az sayıda değildir. Bunun sebebi hücre siklus kontrollünün evrim boyunca yüksek derecede korunmasıdır (Page & Orr-Weaver 1997). Örneğin D.Melanogaster ve insanlarda mayoz için gerekli olduğu bilinen genler twine/cdc25 fosfataz, cdc2 hücre siklus kinazı, pelota ve boule genleridir (Alpley et al. 1992, Courtot et al. 1992, White-Cooper et al. 1993, Sigrist et al. 1995, Eberhart et al. Wasserman 1995, Eberhart et al. 1996). Bu genlere ait mutasyon taşıyan erkek sineklerde mayotik bölünmeler gerçekleşmez, ancak bu mutant erkekler sınırlı bir ölçüye kadar elongasyon ve diferansiasyon gösteren 4n nükleusu olan anormal spermatidler oluşturabilmektedir. 19 boule geninin ürünü RNA-bağlayıcı proteinin hnRNPG ailesinin üyesidir ve faredeki 17 kromozom üzerindeki dazla geni ile ve insan Y kromozomu üzerinde AZF bölgesinin aday gen ailesi olan DAZ geni ile önemli ölçüde amino asit benzerliği bulunmaktadır (Cooke & Elliott 1997). Azospermik erkek hastaların %13-16'sında bu bölgede delesyonlar bulunmaktadır (Reijo et al 1995, Najmabadi et al. 1996). Birinci mayotik safhada oluşan matürasyon duraklaması azospermik

erkeklerin %10'undan daha fazlasında mevcuttur. Bu nedenle erkek sineklerde mayoza girişı kontrol eden genler insanlarda korunmuş olabilir.

İnsanda sterilite fenotip spektrumu sineklerdekine çok benzemektedir. Ayrıca drosophiladaki spermatogenez tanımı insanlar için de geçerli olabilmektedir (Hackstein 1991, Hackstein et al. 1990). Örneğin Flörke-Gerloff ve arkadaşları akrozomsuz ama normal motilitesi bulunan yuvarlak başlı spermatozoası olan iki infertil kardeş tanımlamıştır (Flörke-Gerloff et al. 1984). Buna ek olarak başsız spermi olan ve yine yüksek derecede motil kuyruğu bulunun bazı steril erkek tanımları da mevcuttur (Zamboni 1987). Bu yapıda sperm hücreleri drosophilada da sperm flagellası sperm nükleusu bulunmadan oluşabilmektedir. Görüldüğü gibi sineklerde ve insanlarda spermatogenezin genetik kontrolünde önemli ölçüde benzerlikler bulunmaktadır. Bu bilgileri göz önünde bulundurarak, meyve sineği için yapılan minimum tahminden insan erkek fertilite genlerinin sayısı için bir tahmine ulaşılabileceği düşünülebilir. Ekstrapolasyon yöntemi kullanılarak, insan genomunun erkek steril allellere dönüşmek için en az 600-2400 arasında genin mutasyona uğraması gerektiği hesaplanabilmektedir. Bu rakamın gerçeğin altında bir tahmin olması yüksek bir ihtimaldir, çünkü insanlarda drosophiladakinin yaklaşık 5-6 katı fazla gen bulunmaktadır. Çeşitli genom sekans projelerinden elde edilen sonuçlar ökaryotik model organizmalar arasındaki farkların nadiren “yeni” genlerin varlığını gösterdiğini ortaya koymuştur. Daha büyük genomların daha yüksek genetik karmaşıklığa sahip olmasının gen duplikasyonlarından kaynaklandığı ve bununda bazı işlevsel çeşitliliğe olanak sağladığı düşünülmektedir (Cooke 1997, Mewes et al. 1997). Bu evrimsel strateji memeliler gibi yüksek düzeyli canlılarda morfogenezi ve organogenezi kontrol eden homeotik genlerin varlığı için bir kanıt olarak düşünülebilir (Carroll 1995).

Memelilerdeki spermatogenez drosophilada olduğundan çok daha karmaşık olması nedeniyle steril allellere dönüşen gen sayısının insanlarda daha fazla olduğu düşünülebilir. Öncelikle insan testisi drosophila testisinden çok daha karmaşıktır. Memelilerin testisinde sertoli hücreleri, leydig hücreleri, miyoid hücreler, fibroblastlar ve kan damarı hücre tipleri gibi çok sayıda somatik hücre çeşidi bulunur (Guraya 1987, Grisswold 1995). Buna ek olarak germ hücrelerine besin ve endokrin faktörleri ileten, germ hücreleri ile sertoli hücreleri arasında fonksiyonel

interaksiyonlar bulunmaktadır (Kierszenbaum 1994, Grisswold 1995). Erkek farelerde RXR-retinoid reseptör geni gibi steriliteye neden olan bazı gen eksiklikleri sertoli hücrelerinde görülmektedir (Elliott & Cooke 1997, Sassone-Corsi 1997). Drosophila testisindeki tüm somatik hücreler kist hücre dizisine aittir. Bu nedenle sertoli hücreleri ile karşılaştırılabilir hücreler bulunmamaktadır (Lindsley & Grell 1969, Gönczy et al. 1992). Özellikle somatik kist hücrelerinde eksprese olan genlerdeki steril mutasyonlar henüz drosophilada tanımlanmamıştır. Öte yandan drosophila ve insanlardaki mayotik olaylar arasında da bazı temel farklılıklar bulunmaktadır. Drosophila erkeklerinde rekombinasyon olmamaktadır (McKee & Handel 1993). Mayotik profaz sırasında pasif bir hale gelmeyen X ve Y kromozomlarının çiftleştirilmesi her iki kromozom üzerinde yer alan ribozomlar içindeki 240 baz çiftinin intergenik spacer tekrarı ile gerçekleşir. Otozomların eşleşmesi ökromatin boyunca dağılmış, ancak halen tam olarak tanımlanamamış olan çiftleşme alanları ile sağlanmaktadır (McKee 1996). Memelilerde en az 8 protein içeren sinaptonemal kompleksler mayoz esnasında oluşmaktadır (Heyting 1996). Memeli mayozu çeşitli proteinler içeren rekombinasyon nodülleri içermektedir (Plug et al. 1998). Örneğin mlh1 geni tarafından kodlanan bir protein, mismatch onarım geni olan E.Coli mutLDNA genine önemli bir benzerlik göstermektedir. Bu gende ve diğer konservasyon genlerinde oluşan mutasyon erkek farelerde kromozom eşleşmesine, kiasma formasyonunu etkilemekte ve mayotik arreste neden olabilmektedir (Sassone-Corsi 1997). Bu tür genlerin de drosophilada karşılığı olmayabilir.

Memelilerde maternal ve paternal kalıtım ile geçen metilasyon şekilleri primordiyal germ hücrelerinde kullanılmamak üzere silinir, ve seks diferansiasyonuna ait spesifik sitozin metilasyon paternleri oogenez ve spermatogenez esnasında yeniden yazılır (Chaillet et al. 1991, Ariel et al. 1994). Oysa drosophilanın DNA'sında sitozinlerin metilasyonunua ilişkin bir bulgu bulunmamakta ve belirli genlerin metilasyon paterninde paternal farklılaşmanın getirdiği imprint işleminin spermatogenez sırasında olduğu yönünde bir bulgu da bulunmamaktadır. Bu nedenle memelilerde bulunan seks spesifik kalıtılan alleller için gereken genler drosophilada eksik olabilir. Sonuç olarak, insan genomunun allellerinin steriltte yönünde mutasyona uğrayan binlerce gen içermesi olasılığı

oldukça yüksektir. Sineklerde olduğu gibi, bu genlerin çoğunluğunu X kromozomu ve otozomlar üzerindeki umtant alleller tarafından presente edilmektedir. Spermatogenez için gerekli olan sadece birkaç gen Y kromozomu üzerinde yer almaktadır. Yaklaşık 10 tane kadar ve tümü testise spesifik gen ailesi, insan Y kromozomu üzerinde rekombine olmayan ökromatik parça üzerinde yer almaktadır (Affara et al. 1996, Lanh & Page 1997). Oligozoospermik ve azospermik hastaların %18'inde Y kromozomunun uzun kolu üzerinde küçük delesyonlar saptandığı için bu genlerin öneminin büyük olduğu bilinmektedir (Reijo et al. 1995, Vogt et al. 1996, Pryor et al. 1997, Najmabadi et al. 1996).

Spermatogeneze katılan genler

İnsanda kalıtsal bozuklukları derleyen OMIM veritabanındaki kayıtların yarısından fazlası erkek subfertilitesi ile ilgilidir. Neden bu kadar çok genin testis içinde tanımlandığı ve neden bu kadar çok mutantın diğer hücre tiplerinde ölüme neden olmadığı halde erkek germ hücrelerinin işlevini yitirmesine neden olduğu bilinmemektedir. Bu soruya ilişkin olarak yapılan spekülatif bir açıklama transkripsiyon ve DNA onarımı arasındaki bağlantıya dayanmaktadır. Kemirgenlerin erkek germ hücrelerinde yüksek RNA polimeraz II ve TATA-bağlayıcı proteinin akümüasyonu ile gösterildiği gibi testis içinde yüksek seviyede premayotik transkripsiyonel aktivite mevcuttur (Buratowski 1993). RNA pol II kompleksi DNA hasarı için transkribe edilmiş bölgeleri taramaktadır (Buratowski 1993). Transkripsiyon ve DNA onarımı arasındaki bağlantının varlığına ait destek noktası TFII H insan transkripsiyon inisiyasyon faktörünün 89kDa'luk alt biriminin ERCC3 geni ile kodlanan bir DNA helikazı olduğu yönündeki bulgulardan gelmektedir (Schafer et al. 1993). ERCC3 geni bir DNA eksizyon onarımı bozukluğu olan kseroderma pigmentosum hastalarında mutasyona uğrar. ERCC3 geni amino asit benzerliği yönünden drosophila haywire genlerinin insan homologudur (Moinkes et al. 1992). Haywire erkek steril allelleri spermatogenez sırasında mayozu etkiler ve olasılıkla β 2-tübülün geni gibi spermatogenez sırasında ortaya çıkan genlerin transkripsiyonuyla etkileşir (Regan & Fuller 1990). Eğer transkripsiyon tek başına onarım amaçlı değil ise, erkek germ hücre gelişimi sırasında meydana gelen transkripsiyonun büyük bir kısmı genom boyunca DNA onarım etkinliğini de

gerçekleştirir. Bu iki özellik D.Melanogaster'in RB97D geninin ve insan Y kromozomu üzerinde yer alan RBM ve DAZ genlerinin ürünleri gibi RNA bağlayıcı proteinleri gerektirir (Cooke & Elliott 1997, Karsch-Misrachi & Haynes 1993). Bu ürünler sadece erkek germ hücrelerinde eksprese edilir. RB97D genine ait mutasyonlar erkek sineklerde steriliteye neden olurken, azospermik erkeklerin yaklaşık %13-16'sında DAZ ve RBM delesyonu mevcuttur (Reijo et al. 1995, Pryor et al. 1997, Najmabadi et al. 1996). Buna ek olarak, spontan mutasyon oranının erkek germ hücrelerinde kadın germ hücrelerine göre daha yüksek olma olasılığı vardı. Bunun nedeni erkek germ hücrelerinin spermatozoa haline gelebilmek için yüksek sayıda bölünme g  irmek zorunda olması olabilir (Vogel & Motulsky 1997).

4.5. İnfertil Erke in Değerlendirilmesi

4.5.1. İnfertilite değerlendirmesinde erkekte yapılan araştırmaların amacı

1. Potansiyel olarak düzeltilebilecek nedenlerin ortaya çıkarılması,
2. Tedavi ile düzeltilemeyecek ve  remeye yardımcı tedavi yöntemleri ( YTY)'nin kullanılmasını gerektirecek bir durumun varlığının belirlenmesi,
3.  YTY'den de fayda görmeyerek donör inseminasyonu ya da evlat edinmenin dışında bir     m kalmadığının saptanması,
4.  YTY kullanılacaksa, çocuğun sağlığına etki edebilecek genetik faktörlerin saptanması (Jarow et al. 2002). Eğer düzeltilebilir bir durum saptanır ve tedavi edilirse fertilizasyon mümkün olabilir ve doğal yolla gebelik sağlanabilir. Fakat tedavi edilemeyecek bir durumun varlığı kanıtlanabilirse, etkinliği olmadığı gibi olası yan etkilerin de bulunabileceği gereksiz tedavi yöntemlerinin vereceği stre ten çiftler korunmuş olur. Eğer infertilite nedeni genetik ise, çocukta ortaya çıkabilecek olası anomaliler konusunda çiftlerin bilgilendirilmesi sağlanabilir.
5. İnfertilite ile birlikte görülen ve tedaviyi gerektiren hayatı tehdit eden durumların belirlenmesi: infertilite erkekte testis kanseri ya da hipofiz tümörü gibi altta yatan ve hayatı tehdit eden bir hastalığın tek göstergesi olarak ortaya çıkmış ta olabilir (Jarow 1994). Bunların atlanması ölüm ile neticelenebilecek ya da doğabilecek çocukta problem çıkarabilecek çok önemli sonuçlar doğurabilir.

4.5.2. Temel değerlendirme

Erkek faktörlü infertilitenin araştırılmasına genel üreme hikayesi alınarak ve peş peşe iki semen analizi yapılarak başlanılır. İki semen analizi arasında en az bir ay süre bulunmalıdır. Üreme hikayesinde

Tablo 3. İnfertil Erkeğin Sorgulanmasında Öykü

İnfertilite Öyküsü: Süresi Önceki Gebelikler Önceki Tedaviler Eşin Durumu ve Aldığı Tedaviler Kontrasepsiyon (Vazektomi)	Cerrahi Öykü: Orşiyektomi (Testis Kanseri, Torsiyon) Retroperitoneal yaralanma Pelvik Yaralanma Pelvik, İnguinal, Skrotal Cerrahi Mesane boyunu Operasyonları Prostatektomi
Seksüel Öykü: Potans Kayganlaştırıcılar Seksüel İlişki Zamanlaması İlişki Sıklığı Masturbasyon Sıklığı	Enfeksiyonlar: Viral- Febril Mumps Orşiti Veneral Tüberküloz
Çocukluk Çağı: Genitoüriner Anomaliler İnmemiş Testis ve Orşiopeksi Herniorafi Mesane Boyun Y-V Plasti Testiküler Torsiyon Testiküler Travma Puberte Başlangıcı	Gonadotoksinler: Kimyasallar (Pestisitler) İlaçlar Termal Radyasyon Sigara Keyif Vericiler
Tıbbi Öykü: Sistemik Hastalıklar Diyabetes Mellitus Multipl Skleroz Hipo-Hipertiroidi Tedaviler	Aile Öyküsü: Kistik Fibrozis Androjen Reseptör Eksikliği Birinci Derece Yakınlarda İnfertilite
Sistemlerin Gözden Geçirilmesi: Solunum Yolu Enfeksiyonları Anosmi Galaktore Görme Alanı Bozukluğu	

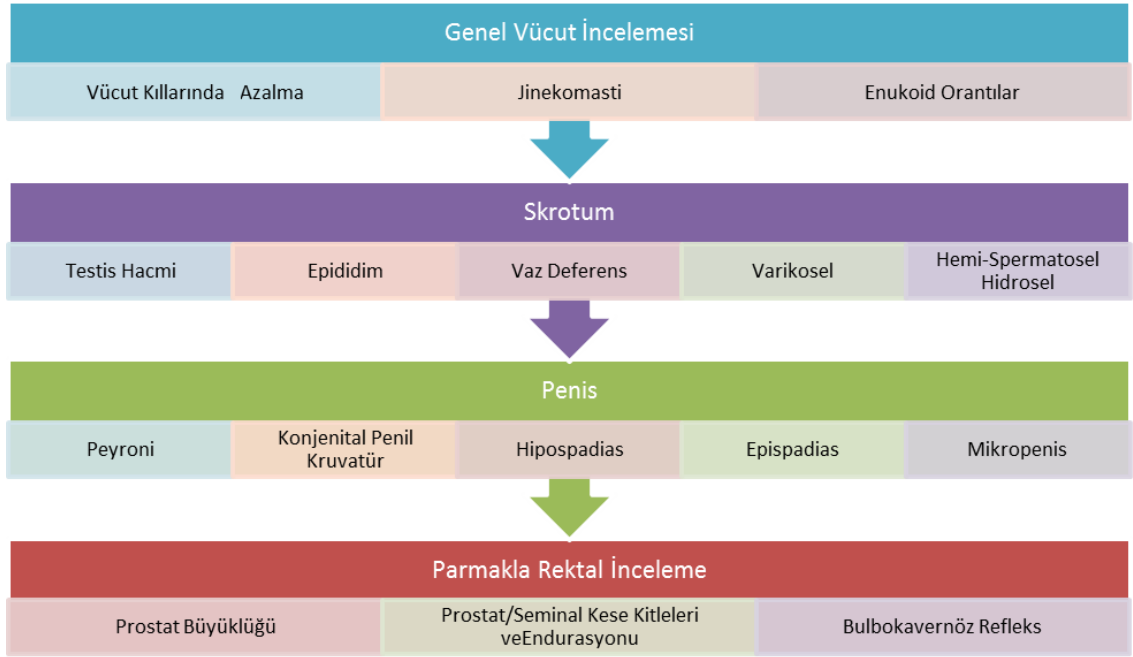
4.5.3. Medikal ve üreme hikayesi

Pubertenin başlangıcı, ses değişiklikleri, sakal çıkması kaydedilmelidir. İnmemiş testis hikayesi ve bunun tedavisinde ilaç kullanımı (hCG, GnRH) veya ameliyat (orşiopeksi) yaşı önemlidir. Sonradan testislerde dejenerasyon yapabilecek fitik ameliyatı sorgulanmalıdır. Diyabet, karaciğer ve böbrek hastalıkları gibi sistemik hastalıklarda hipogonadizm ve/veya infertilite nedeni olabileceklerinden, ilgili semptomlar kaydedilmelidir. Sık tekrarlayan bronşit ve sinüzit atakları; Kartagener sendromu, Young sendromu, ya da kistik fibrozis gibi infertiliteye eşlik edebilen solunum sistemi hastalıklarına işaret edebilir. Orşit veya epididimit, androjen yetmezliğine ve neticede infertiliteye yol açabilir. Cinsel yolla bulaşan hastalıklar (sifiliz, gonore, AIDS, vb.) ve tedavileri öğrenilmelidir. Diğer aile bireylerinde hipogonadizm ve infertilite nedeni olabilecek genetik hastalıkların varlığı sorgulanmalıdır.

Kişinin kullandığı ilaçlar (sülfosalazin, antihipertansifler, antibiyotikler, sitostatikler, anabolik hormonlar, vb.) infertilite nedeni olabilir. Çalışma ortamında aşırı ısıya ya da kimyasal maddelere maruz kalınması infertiliteye yol açabilir. Atletik aktiviteleri, özel alışkanlıkları, sigara ve alkol alışkanlıkları sorgulanmalıdır.

4.5.4. Fizik muayene

Genel fizik muayeneye ek olarak, özellikle penis, üretra ağzı, testislerin yerleşimi ve boyutları, vas deferenslerin varlığı, ve epididimlerin kıvamı, varikosel ve sekonder seks karakterleri (vücut durumu, saç-kıl dağılımı, meme gelişimi, rektal tuşe) muayene edilir. Vücut oranları, iskelet yapısı, ve yağ dağılımı, ses, koku algılaması, saç, deri değişiklikleri, jinekomasti, testisler, epididimler, pampiniform pleksus, vas deferensler, penis, prostat ve seminal veziküllerin muayenesi yapılır.



Tablo 4. İnfertil Erkeğin Sorgulanmasında Fizik Muayene

4.5.5. Semen analizi

Hikaye ve fizik muayeneden sonra, erkeğe ait laboratuvar testleri yapılmalıdır. Her hastanın iki ay aralıklarla yapılan, en az iki ya da üç semen analizi bulunmalıdır. İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde semen analizi çok önemli bir yer tutar. Azoospermi dışında semen analizi, hastaların steril ve fertil gruplar şeklinde kesin ayırımının yapılmasını sağlamaz. Semen parametrelerinin kalitesi azaldıkça istatistiksel olarak gebelik şansı da azalır ama sıfıra inmez. Buna rağmen doğru şekilde yapılmış bir semen analizi infertil erkeğin değerlendirilmesinde önemli bir araçtır (Sigman et al. 2005).

Hacim	1.5-5.0 ml.
Sperm aglütinasyonu	<2 (Skala 0-3)
Vizkozite	<3 (Skala 0-4)
pH	>7.2
Konsantrasyon	>20x10 ⁶ /ml
Total sperm sayısı	>40x10 ⁶ /ejakülat
İleri-hızlı motilite (a+b)	>%50
Normal morfoloji	>%14

Tablo 5. Semen analizinin referans değerleri

Normal sperm morfolojisi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın tanımladığı değerler, Kruger (Tygerberg) kesin kriterleri ile aynıdır (Kruger et al. 1998). Sperm morfolojisinin kesin kriterlere göre değerlendirilmesi standart IVF ile fertilizasyon şansının düşük ya da ICSI ile daha iyi fertilizasyon şansına sahip erkeklerin seçilmesi amacıyla yöneliktir (Pisarska et al. 1999). Kesin kriterlere göre normal morfolojinin <%4 olduğu ve bunun daha büyük kısmını baş anomalisinin oluşturduğu olgularda, ICSI başarısı daha düşük kalmaktadır (Osawa et al. 1999). Böyle olgularda sperme ait kromozom anomalilerinin fertilizasyon bozukluğundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Özellikle amorf ve uzamış baş anomali taşıyan spermelerde yapısal kromozom anomali sıklığı da artmaktadır (Lee et al 1996).

4.5.5.1. Semen toplanması

Semen en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrası toplanmalı ve bu süre 7 günü geçmemelidir. Semen laboratuvar yanında özel olarak hazırlanmış bir odada görsel cinsel uyarı ve masturbasyon yöntemi ile toplanmalıdır (Kandırallı ve ark. 2004, Emir 2008).

4.5.5.2. Semen makroskopik değerlendirmesi

Semen toplandığında koagülum halindedir ve 5-25 dakika arasında PSA ve plazminojen aktivatör gibi prostat kökenli proteazlar nedeniyle likefiye olur. Koagulasyondan seminal veziküllerden salgılanan bir madde sorumludur. CBAVD'li

hastalarda seminal veziküller ya yoktur ya da hipoplaziktir. Böyle hastalarda semen koagüle olmaz, asidik ve düşük hacimlidir.

Semen örneğinde likefaksiyon bozukluğu var ise bunun, likefaksiyondan sonra hipervizköz kalan semenden ayırt edilmesi gerekir. Likefiye olmamış semen koagülum halinde kalırken, hipervizköz semenin koaguüm hali azalır fakat kıvamı normalden daha koyu kalır (Sigman & Jonathan 2005).

Semen volümü WHO' ya göre 2 ml.' nin üzerinde olmalıdır (Kandırallı 2004).

4.5.5.3. Spermin mikroskopik değerlendirmesi

Sperm sayısı

Fertil popülasyonda bildirilen ortalama sperm sayısı mililitrede 70-100 milyondur. WHO'nun referanslarına göre olması gereken en az sperm sayısı 20 milyon/ml'dir. Bu değerin altı oligospermi olarak adlandırılmaktadır. İzole oligospermi nadirdir, çoğu zaman sebebi bilinmez ve bazen androjen eksikliğine bağlı olabilir. Sayı 10 milyon/ml'den az olursa testosteron ve FSH düzeylerinin bakılması önerilmektedir. Sadece FSH yüksekliği spermatogenezdeki sıkıntıyı gösterir ve tam bir endokrinolojik değerlendirmeye gerek yoktur. Oligospermiye neden olabilecek saptanabilir en sık neden varikoseldir, bunda da seminal parametrelerde multipl defekt vardır. Ejakülatta spermatozoa hücresinin hiç görülmemesi azospermi olarak adlandırılır. Azospermi; yetersiz hormonal stimülasyon (hipogonadotropik hipogonadizm), spermatogenez anormallikleri ya da obstrüksiyon nedeniyle meydana gelebilir. Azoospermik hastanın değerlendirilmesi, azosperminin spermatogenez eksikliğinden mi yoksa duktal obstrüksiyondan mı kaynaklandığını saptamaya yönelik olmalıdır.

Santrifüj edilmiş semen örneğinde sperm saptanması bilateral duktal obstrüksiyonu ekarte ettirir. Fizik muayenede testisin büyüklüğü ve kıvamı, epididimin dolgunluğu ve vazların varlığı veya yokluğu yol göstericidir. Obstrükte testisler genellikle normalden büyük, epididimler belirgin olmaktadır. Genel bir kaide olmamakla birlikte, testiküler yetmezliği olan hastalarda testisler normalden küçüktür. Hipogonadotropik hipogonadizimli olgularda virilizasyon ve sekonder seks karakterleri azalmıştır, testisler oldukça küçüktür. Bu olgularda serumda LH, PRL ve testosteron düzeyi mutlaka bakılmalıdır (Emir 2008).

Sperm motilitesi

Motilite kuyruk hareketi gösteren sperm yüzdesidir. Motilitenin değerlendirilmesi likefaksiyondan sonra 1 saat içinde yapılmalıdır. Bu süre içerisinde semen oda sıcaklığında saklanmalıdır. Spermin ileri hareketinin kalitesi değerlendirilerek kaydedilmelidir. Sık kullanılan bir metoda göre sperm hareketleri 5 skalaya ayrılır. 0 hiç motilitenin olmadığını gösterir; 1 ileri progresyon göstermeyen, tembel hareketi; 2 yavaş, doğrusal olmayan, dolambaçlı ileri hareketi; 3 oldukça doğrusal ama orta hızda hareket eden spermi; 4 ise doğrusal ve hızlı hareketi belirtir (Amelar et al. 1973). Spermde en fazla görülen hareket kategorisi değerlendirmeye alınır. Alternatif bir sistem spermi 4 kategoride ele alır: A ileri hızlı hareketi; B yavaş ya da tembel ileri hareketi; C ileri olmayan hareketi ve D hareketin bulunmadığını belirtir. Bu sistemde, her bir kategoriye giren sperm yüzdesi değerlendirmeye alınır. WHO 'a+b' motilitenin %50'nin, sadece 'a' kalite motilitenin ise %25'in üzerinde olması gerektiğini belirtmiştir (WHO 1999).

Sperm hareket bozukluğu (astenospermi) motilitede ya da ileri harekette veya her ikisinde birden azalmayı ifade eder. Bu olgularda spermatozoanın yapısal defektlerinden, uzamış cinsel perhiz süresi, genital sistem enfeksiyonları, antisperm antikorlar, parsiyel duktal obstrüksiyon, varikozel ve idiyopatik faktörler sorumlu olabilir.

Astenospermi bulgusu ya da şiddetli sperm aglütinasyonu immunolojik infertilite olasılığını akla getirir. Bu durumda antisperm antikor testi yapılmalıdır. Semen analizinde lökosit sayısı artmışsa enfeksiyondan şüphe edilmelidir ve bu durumda gerekli ileri tetkikler yapılmalıdır. Varikozel, infertil erkeklerde cerrahi olarak düzeltilebilen en sık anomali olup, sperm sayı ve şekil bozukluklarının yanı sıra sperm motilite bozukluğundan da sorumlu olabilir. Astenospermik hastalarda, özellikle ejakulat volümü düşük ve sperm canlılığı azalmış olgularda, parsiyel ejakulatör kanal tıkanıklığı düşünülebilir. Bu hastalarda TRUS yapılabilir.

Sperm motilitesinin hiç bulunmadığı ya da motilitenin %5' in altında olduğu olgular sperm canlılık testleri ile değerlendirilmelidir. Motilitenin hiç olmadığı ya da azaldığı durumlarda yüksek fraksiyonda canlı sperm bulunması, immotil silia sendromu ve Kartagener sendromunda olduğu gibi ultrastrüktürel bir anomaliye işaret eder. Spermatozoanın elektron mikroskopik tetkiki böyle olguları ayırt eder.

Bazen cinsel perhiz süresinin fazla uzaması da motilitede ciddi azalmayla sonuçlanabilir. Son olarak, sperm toplama kaplarındaki toksik kalıntılar ya da sıcak veya soğuk ortam azalmış motiliteden sorumlu olabilir.

Yuvarlak hücre sayısı

Semendeki yuvarlak hücreler immatür spermatozoalar, genitoüriner sistem epitel hücreleri, prostatik hücreler ve lökositlerden oluşur. Normal semende yuvarlak hücre sayısı < 5 milyon/ml olmalıdır. Yuvarlak hücrelerden klinik olarak önemli olan lökositlerdir. Yuvarlak hücre sayısı >1 milyon/ml. olduğunda lökosit sayısını değerlendirmek için myeloperoksidaz testi (Endtz testi) yapılmalıdır. Normal semende lökosit sayısı <1 milyon/ml olmalıdır (Kandıralı ve ark. 2004).

Artmış yuvarlak hücre sayısı olanların ancak $1/3$ 'ünde gerçekten pyospermi vardır ve semende bakteri bulunan olgularda her zaman pyospermi saptanmamaktadır. Bu nedenle pyospermili birçok hastada genital trakt enfeksiyonu yoktur (Emir 2008). Semende lökosit enfeksiyon haricinde, anormal spermatogenez, çevresel faktörler, seks alışkanlıkları ve cinsel perhiz süresi ile ilgili olabilir (Kandıralı ve ark. 2004).

Sperm morfolojisi

Sperm morfolojisi değerlendirmesi, taze semende elektron mikroskop ile, taze semende faz kontrast mikroskop ile ve spermleri çeşitli yöntemlerle boyayarak yapılabilir. Post-koital mukustan ya da zona pellusida yüzeyinden elde edilen spermler normal kabul edilir.

Doğru bir morfolojik değerlendirme için spermin boyanması gereklidir. Bunun için en fazla kullanılan boyama yöntemleri “Papanicolau” yöntemi ve “Diff-Quick” yöntemidir. Değerlendirmede birçok kriter kullanılmasına karşın en fazla kullanılanlar WHO kriterleri ve Kruger’in kesin kriterleridir (Ombelet et al. 1997).

Bir spermin normal kabul edilebilmesi için baş, boyun, orta kısım ve kuyruğun normal olması gereklidir. Normal sperm başı, oval, boyu $5-6\mu$, eni $2.5-3.5\mu$, boyunun genişliğine oranı $1.5-1.75$ olmalıdır. Baş bölgesinin $\%40-70$ 'ini kapsayan akrozomal bölge olmalıdır. Orta kısım ince uzun ve genişliği $<1\mu$, boyu başın 1.5 katı ve başa aksiel olarak bağlanmış olmalıdır. Sitoplazmik artıklar normal

baş alanının yarısından az olmalıdır. Kuyruk düz, orta kısımdan ince ve yaklaşık 45µ uzunluğunda olmalıdır. WHO kriterlerine göre ara formlar normal, Kruger'in kesin kriterlerine göre anormal kabul edilir (Tablo 6).

Baş Uzunluk: 5-6 mikron Genişlik: 2.5-3.5 mikron
Akrozom Başın % 40-70'ini oluşturmali
Orta parça Genişlik 1 mikron Uzunluk 1.5 x baş uzunluğu
Kuyruk Boyuyaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış Kırık içermeyen
Sitoplazmik artık Baş alanının % 30-70'inden az Sadece orta parçada lokalize

Tablo 6. Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi.

Spermde yaygın görülen defektler

Baş defektleri: Büyük, küçük, yassı filiform, yuvarlak, amorf, vakuollü, küçük akrozomlu, çift baş ve bunların kombinasyonları.

Boyun ve orta kısım defektleri: Bükük boyun, başa düzensiz bağlanma, kalın boyun, ince boyun ve bunların kombinasyonları.

Kuyruk defektleri: Kısa, birden fazla, ince, kırık, kıvrık, düzensiz genişlikte ve bunların kombinasyonları şeklindedir.

Spermde normal morfolojiye sahip sperm oranı WHO'ya göre > %30, Kruger' in kesin kriterlerine göre $\geq$ %14 olmalıdır (WHO 1999). Kruger'in kesin kriterleri kullanılarak yapılan çalışmada, sperm konsantrasyonu 20 milyon/ml.

üzerinde ve hareket % 30'un üzerinde olan popülasyonda, normal morfolojili sperm oranı % 14'ün üzerinde olanlarda IVF'de % 91, % 14'ün altında olanlarda ise % 37 oranında fertilizasyon saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise % 4'ün altında % 7.6, % 4-14 arasında % 63 fertilizasyon oranları bildirilmiştir (Kruger et al. 1986).

Rutin semen analizlerinde genelde bakılmayan fakat klinik olarak kullanılabilen çoğul sperm defekti indeksleri de vardır. Teratospermik indeks (multipl anomali indeksi) (TZI) defekt sayısının, defektli sperm sayısına bölünmesi ile elde edilir. $TZI > 1.6$ ise gebelik şansı düşüktür. Defekt sayısının toplam sperm sayısına bölünmesi ile de sperm deformite indeksi (SDI) hesaplanır. $SDI > 1.6$ ise fertilizasyon oranı düşmektedir (WHO 1999). Özellikle amorf ve baş anomali taşıyan spermlerin yapısal kromozom anomali sıklığı da artmaktadır. Böyle olgularda sperme ait kromozom anomaliilerinin fertilizasyon bozukluğundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Normal sperm değerleri, gebeliği sağlamak için gerekli olan minimum değerler değildir. Bu değerlerin dışında da olursa erkek fertil olabilir. Aksine sperm parametreleri normal sınırlar içinde bulunan erkeklerde infertil olabilirler (Aydos 2007).

4.5.6. Diğer tetkikler

İnfertilite etiyolojisini aydınlatmak amacıyla yapılabilecek diğer tetkikler sperm analizinin tekrarlanması, endokrin inceleme, ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranması, ultrasonografi, sperm ve semene ait spesifik testler ile genetik analizdir.

4.5.7. Erkek infertilitesinde endokrin değerlendirme

İnfertil bir erkeğin endokrin değerlendirmesinde amaç spermatogenezi olumsuz etkileyecek endokrinolojik bir hastalığın olup olmadığını saptamaktır. Spermatogenez direkt olarak endokrinolojik kontrol altında olmasına rağmen primer hormonal etiyoloji iinfertil erkeklerin %3'ünden daha azında bulunmaktadır (Berek et al. 1996).

Erkek üreme sisteminde etkili olan önemli hormonlar GnRH, LH, FSH, testosteron ve östradioldür. Erkek infertilitesinin endokrin sebepleri pretestiküler

nedenler olarak adlandırılır ve hormon fazlası ya da azlığına bağlı olarak fertilité etkilenir. Erkekte istenecek temel hormonlar serum FSH, testosteron ve östradioldür (Pavlovich et al. 2001). Testosteron düşük bulunursa total ve serbest testosteron ölçümlerinin tekrarı yanı sıra LH, ve prolaktine de bakılmalıdır.

Spermatogenezi bozuk olan erkeklerin çoğunda serum FSH değerleri normal bulunmakla birlikte, FSH aşırı yükselmiş ise büyük olasılıkla spermatogenez bozukluğuna işaret eder. Her ne kadar serum gonadotropin düzeyleri pulsatil salınımlarından dolayı değişkenlik göstermekteyse de, olgunun endokrinolojik yönden klinik durumunu aydınlatmada sabah tek ölçümleri yeterli olabilir. Testosteron, FSH, LH ve prolaktin arasındaki ilişki klinik durum hakkında bilgi verir (Aydos 2004).

Klinik durum	FSH	LH	T	Prolaktin
Normal spermatogenez	Normal	Normal	Normal	Normal
Hipogonadotropik Hipogonadizm	Düşük	Düşük	Düşük	Normal
Spermatogenez Bozukluğu*	Yüksek/Normal	Normal	Normal	Normal
Total testiküler yetmezlik /Hipergonadotropik hipogonadizm	Yüksek	Yüksek	Normal/Düşük	Normal
Prolaktin salgılayan hipofiz tümörü	Normal/Düşük	Normal/Düşük	Düşük	Yüksek

Tablo 7. Serum hormonları ile erkekte klinik bulgular arasındaki ilişki

4.5.8. Ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranması

Bilateral vas deferens agenezi ya da klinik olarak hipogonadizm belirtileri bulunmayan erkeklerde, ejakülat volümü $<1\text{ml}$ ise ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranmalıdır. Azospermik veya aspermik bir hastada idrarda sperme rastlanması retrograd ejakülasyona işaret eder. Düşük ejakülat volümlü oligospermik erkeklerde retrograd ejakülasyon tanısı koymak için idrarda bol miktarda sperm görülmesi gerekir (Aydos 2004).

4.5.9. Radyolojik değerlendirme

Transrektal ultrasonografi (TRUS) ve skrotal ultrasonografi/doppler ultrasonografi ile inceleme yapılır. Radyolojik değerlendirmenin amacı parsiyel veya total duktal obstrüksiyonu saptamaktır.

4.5.10. Testis biyopsisi

Obstrüktif azospermi olgularında sperm elde edilmesi amacıyla biyopsi uygulamaları yapılabilmektedir. Bununla birlikte özellikle son yıllarda mikrocerrahi konusunda sağlanan gelişmelerin ardından, testisten mikrodiseksiyon yöntemi ile sperm elde edilmesi ve elde edilen bu hücrelerin mikroenjeksiyonda kullanılması gündeme gelmiştir (Turek 1997).

Düşük Ejakülat Volümü	Azospermi	Oligoasthenoteratospermi	Normal Sperm	Asthenospermi
İlaçlar	<u>Hipogonadotropik Hipogonadizm</u>	Varikozel	Jinekolojik bozukluklar	Spermatozoanın yapısal defekti
Retroperitoneal veya mesane boyun operasyonları	1.Kallman sendromu	Kriptorşidizm	Koitus alışkanlığındaki bozukluklar	Uzamış cinsel perhiz
Ejakülatuar kanal tıkanıklıkları	2.Hipofiz tümörleri	İdiyopatik	Akrozom defektleri	Genital sistem enfeksiyonu
Diabetes Mellitus	<u>Spermatogenez Bozuklukları</u>	İlaçlar	Antisperm antikorlar	Antisperm antikorlar
Spinal kord yaralanması	1.Kromozom bozuklukları	Isı	İdiyopatik	Varikozel
Psikolojik Hastalıklar	2.Y kromozom mikrolelesyonu	Toksinler		Parsiyel Obstrüksiyon
İdiyopatik	3.Gonadal toksinler	Sistemik enfeksiyonlar		İdiyopatik
Örnek toplama hatası	4.Varikozel	Edokrinopati		
	5.Viral orşit			
	6.Torsiyon			
	7.İdiyopatik			
	<u>Duktal Obstrüksiyon</u>			
	1.Konjenital vas deferens agenezisi			
	2.Vasal obstrüksiyon			
	3.Epididim obstrüksiyonu			
	4.Ejakülatuar kanal obstrüksiyonu			

Tablo 8. Erkek infertilitesi ile birlikte görülebilecek durumlar

4.5.11. Sperm ve semene ait spesifik testler

Açıklanamayan infertilite olgularında erkek faktörünün de eşlik edip etmediğini ortaya koymak için ya da ÜYTY ile tedavi seçimi yapılmasında sperm ve semene ait spesifik testler yararlı olabilir. Bu testler arasında; semende lökosit konsantrasyonunun tayini, anti-sperm antikor tayini, sperm vitalite testleri, sperm-servikal mukus etkileşim testleri, zonası çıkarılmış hamster oositleri penetrasyon testi, spermin kompüterize analizinin yanı sıra akrozom reaksiyonunu ölçen testler,

insan zonasına bağlanma oranının ölçülmesi (HZA), sperm kreatin kinaz ölçümü, ROS tayini, sperm yüzeyinde mannozreseptör tayini gibi diğer nadiren gereken testler bulunur (WHO 1999, Wolff & Anderson 1988, Ayvaliotis et al. 1985, Glatstein et al. 1998, Smith et al. 1987, Fenichel et al. 1991, Frenken et al. 1989, Huszar et al. 1992, Kim & Parthasarathy 1998, Benoff et al. 1993).

4.5.12. Genetik araştırma

Azospermi ve şiddetli oligospermi ile birlikte genetik bozukluklar da bulunabilir. Genetik bozukluklar sperm yapımını bozarak veya spermin taşınmasını engelleyerek erkekte infertiliteye neden olabilirler. Erkek infertilitesi ile ilişkili olarak 3 genetik faktör bilinmektedir:

1. Konjenital vas deferens agenezisi nedeni olan kistik fibrozis gen mutasyonları,
2. Testis fonksiyonlarını bozan kromozom anomalileri,
3. İzole spermatogenez defekti yapabilen Y-kromozom mikrolelesyonları.

Konjenital bilateral vas deferens agenezisi ile kistik fibrozis transmembran kondüktans regülatör gen (CFTR) mutasyonları arasında anlamlı ilişki bulunmaktadır (Chillon et al 1995).

Azospermik erkeklerin %10-15'inde oligospermik erkeklerin %5'inde, normal erkeklerin ise <%1'inde karyotip analizinde bozukluk bulunur (De Braekeleer & Dao 1991). Y-kromozom mikrolelesyonuna azospermik veya şiddetli oligospermik erkeklerin %10-15'inde rastlanılır (Pryor et al. 1997). Bu nedenle, obstrüktif olmayan azospermisi ya da şiddetli oligospermisi bulunan erkeklerin, kromozom anomalisi veya Y-kromozomu mikrolelesyonu taşıyabilecekleri konusunda bilgilendirilmeleri gerekir.

GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Hasta Grubu

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Androloji Polikliniğine başvuran primer infertilite tanısı almış olan 6 azospermik, 14 oligozoospermik hastanın retrospektif taraması ile hastalardan alınan periferik kan örnekleri EDTA'lı tüp içerisinde laboratuvarımıza ulaştırılmıştır.

Çalışmamız için Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonu'ndan 23.09.2011-1 sayılı onay alınmıştır.

5.1.1. Çalışmaya dahil etme kriterleri

- Marmara Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı Androloji polikliniğinde ayrıntılı anamnez, fizik muayene (testis boyutları ve varikosel muayenesini içeren), semen analizi, hormon analizini içeren tam bir infertilite değerlendirmesi olması,
- İdiyopatik erkek faktör infertilitesi olması,
- Ağır Oligoastenozoospermi veya Azospermi olması,
- Primer infertil olması,
- Semen analizlerinin, infertilite polikliniğinde ilk değerlendirilmesi sırasında en az 15 gün arayla, en az iki kez bakılması,
- Erkek bireyin soy ağacında akraba evliliklerinin bulunması,
- Ailede en az infertil bir bireyin daha bulunması,
- Ailede tekrarlayan düşüklerin bulunması

5.1.2. Çalışma dışı bırakma kriterleri

- Erkek faktör infertilitesi nedeniyle daha önceden medikal tedavi alanlar,
- Y mikrodelesyonu bulunanlar,
- Eş zamanlı birden fazla medikal tedavi alanlar,
- İnfertiliteye yol açacak sistemik veya endokrinolojik hastalığı olanlar,
- Kriptorşidizm öyküsü olanlar,

- Genital sistem obstrüksiyonu olanlar,
- Varikozel ile ilişkili testiküler atrofi olanlar,
- Ciddi çift taraflı kabakulak orşiti geçirmiş olanlar,
- Hipogonadotropik hipogonadizmi olan veya kromozom anomalisi saptanan hastalar,
- Eşlerinde ICSI sonuçlarını etkileyebilecek infertilite patolojileri olanlar.

5.2. Gereçler

5.2.1. Kullanılan aletler

İnsan CGH Mikroarray Kiti 8x60K (Agilent G4450A SurePrint G3)
 Mikroarray Tarayıcısı (Agilent p/n G2565CA)
 Hibridizasyon Haznesi (leke tutmayan özellikte, Agilent p/n G2534A)
 Hibridizasyon Haznesi Contaıı Lamı (Agilent p/n G2534-60014)
 Hibridizasyon Fırını (Agilent p/n G2545A)
 Hybridization Fırını Rotatoru (Agilent p/n G2530-60029)
 Ozon bariyer lam kapağı (Agilent p/n G2505-60550)
 Manyetik Karıştırıcı Çubuk (Corning p/n 401435)
 Cam Tabak (1.5 L) (Borcam)
 Lam Yıkama Plakaları (250 ml) (Wheaton p/n 900200)
 Lam Tutucusu (Agilent G2505-60525)
 Pipet Takımı (Gilson)
 Jel Görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)
 Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (A.B.D.)
 Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)
 Soğutmalı Santrifüj IEC, MP4R (A.B.D.)
 Isı Bloğu, Techne DB-ZA (İngiltere)
 Ph Metre, WTW (Almanya)
 Manyetik Karıştırıcı, Elektro-Mag (Türkiye)
 Hassas Terazı, Mettler AT261 (İsviçre)
 Hassas Terazı, Mettler PJ6000 (İsviçre)
 Etüv, Heraeus (Almanya)

Laminar Flow, Özge A.Ş (Türkiye)
Otoklav, All American (A.B.D)
Kırık Buz Makinası, Scotsman (A.B.D.)
Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)
Biyolojik Güvenlik Kabini (A.B.D)
Isı döngüleyicisi (PE GenAmp PCR System 9700)
Çeker Ocak (LaminAir)
Su Banyosu (Nüve)
Vorteks (Heidolph)
Buz Dolabı, Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu -20oC, Philco (Türkiye)
Derin Dondurucu -80oC, Thermo 702 (A.B.D.)
Mikrodalga Fırın (Arçelik)
Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)
Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membran, 30 kDa Filtresi (Milipore p/n UFC503096)

5.2.2. Kullanılan kimyasal maddeler

DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen p/n 69504)
RNase A (100 mg/mL) (Qiagen p/n 19101)
Proteinaz K solüsyonu (>600 mAU/mL) (Qiagen p/n 19131)
İnsan gDNA'sı [Promega p/n G1521 (dişi) ve p/n G1471 (erkek)]
Alu I (10 U/μL) (Promega p/n R6281)
Rsa I (10 U/μL) (Promega p/n R6371)
Agaroz (Scjarlou)
Borik Asit (Sigma)
Etidyum Bromid (Sigma)
Moleküler Ağırlık Belirteci (Fermantas)
6X Jel yükleme tamponu (Sigma)
Genomik DNA Enzimatik Etiketleme Kiti (Agilent p/n 5190-0449)
[Nükleazdan arındırılmış su, Exo (-) Klenow, 5X Reaksiyon tamponu, Cyanine 5- dUTP, Cyanine 3-dUTP, 10X dNTP, Rasgele Primer

içermektedir.]

1 × TE (Tris EDTA) (pH 8.0) (Promega p/n V6231)

Asetonitril (%100, 1L) (Sigma p/n 271004)

Oligo aCGH Yıkama Tamponu 1 ve 2 (Agilent p/n 5188-5226)

Oligo aCGH Hibridizasyon Kiti (Agilent p/n 5188-5220)

Human Cot-1 DNA (Agilent p/n 5190-3393)

PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu)

Distile Su

Etanol (%95-100) (Tekel)

5.2.3. Kullanılan sarf malzemeleri

1.5 ml'lik mikrofüj tüpleri (Ambion p/n AM1240)

PZR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)

Toplama tüpü (Qiagen)

Spin kolonu (Qiagen)

Eppendorf Tüp 1.5 mL, Axygen (A.B.D.)

Eppendorf Tüp 2.0 mL, Axygen (A.B.D.)

Falkon Tüp 50 mL, TPP (İsviçre)

Falkon Tüp 15 mL, TPP (İsviçre)

Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)

Filtreli Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)

Serolojik Pipetler (5mL, 10mL, 25 mL), Axygen (A.B.D.)

5.3. Yöntemler

5.3.1. Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesi

Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde Roche High Pure PZR Template Preparation Kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır:

- Su banyosunun sıcaklığı 70 °C'ye getirildi.
- Elution Buffer Solüsyonu 70 °C su banyosuna konuldu.
- Kan örnekleri ve diğer malzemeler oda sıcaklığına getirildi.
- 1,5 ml ependorf tüpüne 200µl periferik kan konulup üzerine protokol numarası yazıldı.
- Kanların koyulduğu tüplerin üzerine 200 µl Binding Buffer Solüsyonu eklendi.
- Her bir tüpe 40 µl Proteinaz K eklendi ve 20 dakika 70°C'de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon bitiminde örneklerin üzerine 100 µl izopropil alkol eklendi.
- Toplama tüpünün üzerine filtreli tüp yerleştirildi.
- Filtreli tüpün kapağına protokol numarası yazıldı.
- Ependorf tüpündeki karışım dikkatlice filtreli tüpe aktarıldı.
- 8000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Santrifüj yapılan tüplerdeki filtreler yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
- Üzerine 500 µl Inhibitor Removal Buffer Solüsyonu eklendi.
- 8000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı .
- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konuldu.
- Üzerine 500 µl Wash Buffer Solüsyonu eklendi.
- 8000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konuldu.
- Üzerine 500 µl Wash Buffer Solüsyonu eklendi.
- 8000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konuldu.
- 13000g'de 10 saniye santrifüj yapıldı.
- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konuldu.

- Üzerine 200µl 70°C Elution Buffer Solüsyonu eklendi.
- 8000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpünde bulunan genomik DNA içeren sıvılar ependorf tüplerine alındı ve -20°C'de saklandı.

5.3.2. Genomik DNA'nın niceliksel ve niteliksel analizi

Oligo aCGH deneyimizin başarısı için gDNA'nın (genomik DNA) niceliksel ve niteliksel değerlendirmesinin doğru biçimde yapılması son derece önemlidir. Yüksek kalitede gDNA karbohidratlar, proteinler ve organik çözücüler gibi atıklardan arınmış olmalı ve minimal degradasyona uğramış olmalıdır. gDNA konsantrasyonunun ve saflığının değerlendirilmesi için NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spektrofotometresi kullanılmıştır:

- NanoDrop Program menüsünden Nükleik Asit Ölçümü seçildikten sonra örnek tipi DNA-50 olarak ayarlanmıştır.
- Cihazın ölçüm ayarını sıfırlamak için elüsyon tamponundan 1.5 µL kullanılmıştır.
- Her gDNA örneğinden 1.5 µL kullanılarak her örneğin DNA konsantrasyonu ölçülmüştür. Ürün miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Ürün } (\mu\text{g}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{L)} \times \text{Örnek Hacmi } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng/} \mu\text{g}}$$

- Yüksek kalitedeki gDNA'nın A260/A280 oranı 1.8-2.0 arasında olması kontamine proteinlerin yokluğuna işaret etmektedir. Dolayısı ile A260/280 oranı kaydedilmiştir.

5.3.3. Genomik DNA enzimatik etiketleme kiti ile restriksiyon kesimi

Buffer C ve Asetillenmiş BSA (10 mg/µL) [Rsa I (10 U/ µL) enzimi ile birlikte -20 °C'de bulunmaktadır] oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra vorteks karıştırıcıda hızlıca sonra mikrosantrifüjde döndürüldü. Bütün malzemelerle buz üzerinde iken çalışıldı ve işi bitince tekrar -20 °C'ye kaldırıldı.

Her reaksiyon için PZR tüpüne Tablo 9.1'de belirtilen uygun miktarda gDNA eklendi ve distile su ile Tablo 9.1'de belirtilen hacme tamamlandı.

Mikroarray Formatı	Başlangıç gDNA miktarı (µg)	Restriksiyon Kesimli gDNA Hacmi (µL)
4x mikroarray	0.5 - 1.5	20.2

Tablo 9.1. Mikroarray başına gerekli başlangıç gDNA miktarı

Ana Kesim Karışımı (AKK) Tablo 9.2'te verildiği sıra ve miktarlarda buzun üzerinde hazırlandı.

Bileşen	Reaksiyon başına (µL)	16 reaksiyonluk (fazlası dahil) (µL)
Distile Su	2	34
10X Buffer C	2.6	44.2
Asetillenmiş BSA (10 mg/µL)	0.2	3.4
Alu I (10 U/µL)	0.5	8.5
Rsa I (10 U/µL)	0.5	8.5
Son Hacim	5.8	98.6

Tablo 9.2. Ana Kesim Karışımının Hazırlanışı

Yirmi olgu gDNA'sının ve yirmi referans gDNA'sının olduğu her bir PZR tüpüne (toplamda 40 PZR tüpü) 5.8 µL AKK eklendi. 20.2 µL hacme tamamlanan PZR tüplerine 5.8 µL AKK eklenmesi ile toplam hacmi 26 µL'ye ulaşan karışıma pipetaj yapıldı. Tüplere Tablo 9.3'te yer alan ısısal döngü programı uygulandı.

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	37 °C	2 saat
2	65 °C	20 dakika
3	4 °C	Beklet

Tablo 9.3. Isı Döngüleyicisi Programı

Isı döngüleyicisi programı sonrasında kesilmiş gDNA'dan 2 µL alındı. Kesimin etkinliği %1 rutin agaroz jelde etidyum bromid ile boyanarak jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi kullanılarak değerlendirildi. Kesilen ürünlerin büyük çoğunluğu 200-500 bp arasında yer aldı.

5.3.4. Genomik DNA'nın floresan işaretleme

Isı döngüleyicisindeki program bittikten sonra 26 µL gDNA içeren her bir PZR tüpüne (toplam 40 adet) 5 µL rastgele primerlerden eklendi ve toplam hacim 31 µL'ye ulaştı. DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu için Tablo 9.4'te verilen ısı döngüleyicisi programı uygulandı.

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	95 °C	3 dakika
2	4 °C	Beklet

Tablo 9.4. DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu için ısı döngüleyicisi programı

Cy3 ve Cy5 etiketleme ana karışımı (EAK) Tablo 9.5'deki sıra ile ve buzun üzerinde hazırlandı.

Bileşen	Reaksiyon başına (µL)	24 reaksiyonluk (fazlası dahil) (µL)
5X Reaksiyon Tamponu	10.0	250
10X dNTP	5.0	125
Cyanine 3-dUTP veya Cyanine 5-dUTP	3.0	75
Exo (-) Klenow	1.0	25
Son Hacim	19.0	475

Tablo 9.5. Etiketleme Ana Karışımı Hazırlanışı

Referans gDNA'larının bulunduğu PZR tüplerinin her birine Cyanine 3-dUTP (boya) eklenen etiketleme ana karışımından 19 µL eklendi. Örnek gDNA'larının bulunduğu PZR tüplerinin her birine ise Cyanine 5-dUTP (boya) eklenen etiketleme ana karışımından 19 µL eklendi. 50 µL hacime ulaşan PZR tüplerine pipetaj yapıldı. DNA etiketlenmesi Tablo 9.6'deki ısı döngüleyici programı kullanılarak yapıldı.

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	37 °C	2 saat
2	65 °C	10 dakika
3	4 °C	Beklet

Tablo 9.6. DNA Etiketlemesi için ısı döngüleyicisi programı

5.3.5. Etiketlenmiş gDNA'nın temizlenmesi

Etiketlenmiş gDNA Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membran, 30 kDa Filtresi kullanılarak aşağıdaki basamaklar takip edilerek temizlenmiştir:

- Her bir reaksiyon tüpüne 430 µL 1xTE (pH 8.0) eklendi.

- 2 µL'lik mikrofüj tüplerinin içine Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membran, 30 kDa Filtreler yerleştirildi ve etiketlenmiş olan her bir gDNA ( rnek ve referanslar dahil toplam 40 adet) filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 14,000 g 'de santrifüj edildi. Altta kalan kısım atıldı.

- Her bir reaksiyon tüpüne 480 µL 1xTE (pH 8.0) eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 14,000 g 'de santrifüj edildi. Altta kalan kısım atıldı.

- Filtreler yeni 2 µL'lik mikrofüj tüplerinin içine ters çevirilerek yerleştirildi. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 1,000 g'de santrifüj edilerek temizlenmiş örnek elde edildi. Temizlenme işlemi sonunda her bir tüpte yaklaşık olarak 20-32 µL hacim kaldı.

5.3.6.  r n miktarı ve spesifik aktivite hesaplanması

 r n miktarı ve spesifik aktivite hesaplanması için NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spektrofotometresi kullanılmıştır:

- NanoDrop Program menüsünden MikroArray  l  m  seçildikten sonra örnek tipi DNA-50 olarak ayarlanmıştır.

- Cihazın  l  m ayarını sıfırlamak için TE tamponundan 1.5 µL kullanılmıştır.

- Temizlenmiş etiketli her gDNA örneğinden 1.5 µL kullanılarak her  rne in A_{260nm} (DNA), A_{550nm} (cyanine 3), A_{650nm} (cyanine 5) absorbansı, gDNA konsantrasyonu ve hacmi ölçülmüştür.

- Spesifik Aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik Aktivite} \quad (\mu\text{g gDNA başma pmol boya}) = \frac{\mu\text{L boya başma pmol}}{\mu\text{L gDNA başma } \mu\text{g}}$$

-  r n miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{ürün miktarı } (\mu\text{L}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{L)} \times \text{ rnek Hacmi } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng/}\mu\text{g}}$$

- Spesifik aktivite ve ürün miktarı ile ilgili beklenen değerler Tablo 9.7'de verilmiştir.

Giriş gDNA (µg)	Ürün Miktarı (µg)	Cyanine-3 işaretli Referansların spesifik aktivitesi (pmol/µg)	Cyanine-5 işaretli Örneklerin spesifik aktivitesi (pmol/µg)
0.5	5-7	25-40	20-35

Tablo 9.7. Beklenen spesifik aktivite ve ürün miktar değerleri

- Etiketleme sonrası Cy3 ve Cy5 ürün miktarları birbirinin aynı olması gerekmektedir. Cy3 ile etiketlenmiş referansların olduğu PZR tüpleri (20 adet) ile Cy5 ile etiketlenmiş örneklerin olduğu PZR tüpleri (20 adet) tek bir PZR tütüpünde bu prensip doğrultusunda birleştirildi.

5.3.7. Etiketlenmiş gDNA'nın hibridizasyona hazırlanması

Hibridizasyon ana karışımında kullanmak üzere Oligo aCGH Hibridizasyon Kiti içerisinde liyofilize halde olan 10X bloke edici ajana 1.350 µL distile su eklendi ve oda sıcaklığında 60 dakika bekletildi, vorteks karıştırıcıda döndürüldükten sonra - 20 °C'de kullanıma hazır şekilde kaldırıldı.

Hibridizasyon ana karışımı Tablo 9.8'deki sıra ile ve buzun üzerinde hazırlandı.

Bileşen	Hibridizasyon başına hacim (µL)	24 reaksiyonluk (fazlası dahil) (µL)
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL)	5	125
10X aCGH Bloke Edici Ajan	11	275
2X HI-RPM Hibridizasyon Tamponu	55	1.375
Son Hacim	71	1.775

Tablo 9.8. Hibridizasyon Ana Karışımı Hazırlanması

Her bir PZR tüpünden (toplam 20 adet) 39 µL, hibridizasyon ana karışımından 71 µL alınarak toplam 110 µL yeni PZR tüpünde birleştirildi. Tablo 9.9'da yer alan ısı döngüleyicisi programı uygulandı.

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	95 °C	3 dakika
2	37 °C	30 dakika

Tablo 9.9. Isı döngüleyicisi programı

1.3.8. Mikroarray hibridizasyonu

Hibridizasyon haznesine açıklıkları üste bakacak şekilde temiz bir contalı lam yerleştirildi. Contalı lamın haznenin tabanı ile tam olarak oturduğundan emin olundu.

Conta ile çevrelenen ve dört adet olan örnek koyma kısmının içine hibridizasyon örnek karışımından 100 µL "sürükle ve dağıt" usulüne uygun olarak eklendi.

Problar, cam lamın "Agilent" etiketli yüzüne basılmıştır. Bu yüz "aktif kısım"; numerik barkodun olduğu kısım ise "inaktif kısım" olarak adlandırılmaktadır. Aktif kısmı contalı lamın üst yüzeyine; numerik barkod kısmı yukarı, Agilent etiketli

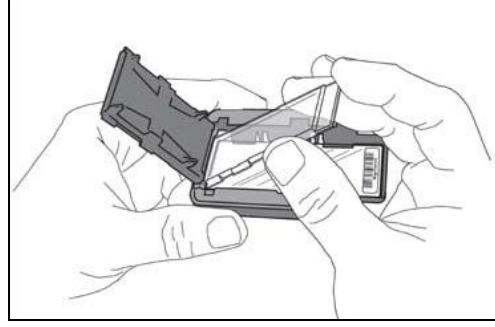
barkod kısmı aşağı bakacak şekilde yerleştirildi. Cam lamalar mikroyarraye zarar vermemek için kenarlarından dikkatlice tutuldu ve lamaların yüzeyine hiç bir suretle dokunulmadı. Hibridizasyon haznesi kapağı kapatıldı, mandal kaydırıldı ve döndürülerek sıkıldı. Hazne dik olarak döndürülerek lamalar tamamen karışım ile temas ettirildi, baloncuklar kontrol edildi. Kapatılmış lam haznesi 65 °C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınındaki rotator yuvaya yerleştirildi. Denge için yuvanın simetriğine ayrı boş bir hibridizasyon haznesi yerleştirildi. Santrifüj hızı 20 devir/dakika'ya ayarlandı. 65 °C'de 16-24 saat hibridizasyona bırakıldı.

1.3.9. Hibridizasyon sonrası yıkama

Yıkama tamponu 1'i içeren iki adet cam tabak, yıkama tamponu 2'yi içeren bir adet cam tabak, lam yıkama plakaları ve manyetik karıştırıcı çubuk yıkama öncesinde %100 asetonitril ile 5 dakika boyunca oda sıcaklığında ve çeker ocak içinde manyetik karıştırıcı yardımı ile yıkandı. Daha sonra çeker ocakta bekletilerek kurutuldu. Yıkamada kullanılacak olan asetonitril ile yıkanmış olan malzemeler distile su ile en az beş defa durulandı.

16-24 saatlik hibridizasyon süresinin bitimi sonrasında hibridizasyon haznesi yıkama tamponu 1'in bulunduğu cam tabak içinde birbirlerinden ayrıldı. Mikroarray lamı hemen sonrasında yıkama tamponu 1'in bulunduğu ve manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan cam tabaktaki lam yıkama plağına yerleştirildi ve 5 dakika boyunca bekletildi. Sonrasında lam yıkama plağı, yıkama tamponu 2'nin bulunduğu ve 37°C'ye ayarlı manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan cam tabağı aktarıldı burada da 1 dakika bekletildikten sonra emdirme kağıdının üzerine alındı (Optimum performans için bir gece boyunca 37 °C'ye ayarlanmış su banyosuna beher içinde bırakılan yıkama tamponu 2, yıkama işleminin hemen öncesinde 37 °C'ye ayarlı manyetik karıştırıcı plakaya yerleştirildi).

Mikroarray lamı, lam tutucusuna "Agilent" etiketi dış ve üst tarafa bakacak şekilde yerleştirildi, ozon bariyer lam kapağı da Şekil 9'da gösterildiği gibi lamin üzerine yerleştirilerek lam tutucusunun tırnağı yardımı ile kapatıldı.



Şekil 9. Mikroarray lamının lam tutucuya yerleştirilmesi ve ozon-bariyer lam kapağının kapatılması işlemi

1.3.10. Mikroarray taratılması

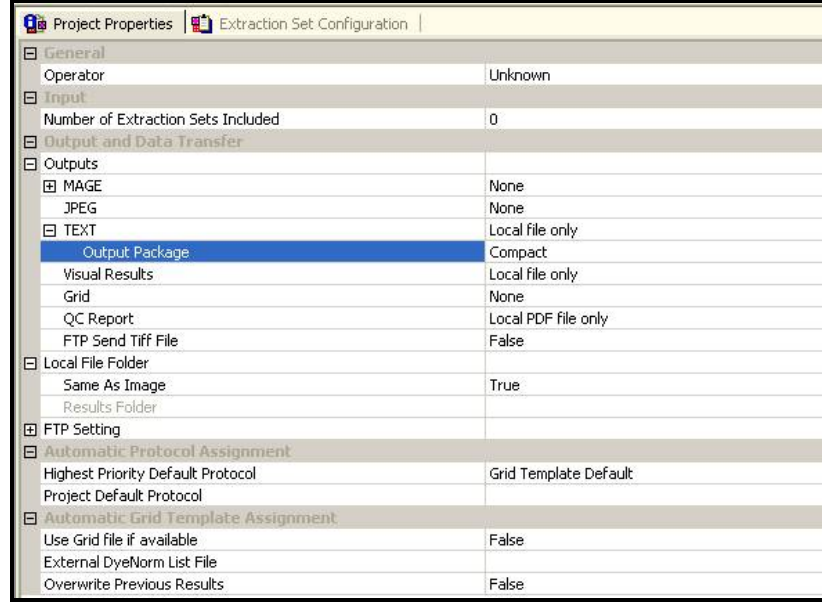
Lam tutucu taratıcı cihaz karuseline yüklendi. Bilgisayardan "Scan Control" programı açıldı ve aşağıda belirtilen ayarlar yapıldı:

- 4x180K mikroarrayi için Profile AgilentG3_CGH seçildi.
- Slide ID <Auto Detect> olarak seçildi.
- Channels R+G olarak ayarlandı.
- Scan Region Agilent HD (61x21.6 mm) olarak ayarlandı.
- Resolution (μm) 3 μm 'ye ayarlandı.
- Tiff 16 bit'e ayarlandı.
- R PMT ve G PMT %100'e ayarlandı.
- XDR ayarı <No XDR>'ye ayarlandı.
- İmaj dosyasının çıkartılacağı klasör dizini seçildi.

- Tarayıcı durum menüsünden "tarayıcı hazır" ifadesi görüldükten sonra mikroarrayin karuselde yerleştirildiği yuva "Slot m-n" (m ilk yuva n son yuva) olarak belirtilip tarama başlatıldı.

5.3.11. İmaj dosyalarının analizi

Tarama işlemi bittikten sonra aberasyonları analiz etmek için imaj dosyasından (.tiff) veri çıkartma ve log oranlarına dönüştürme işlemini yapmak amacıyla Feature Extraction 10.5.1.1 ve Agilent CytoGenomics 2.0.6.0 yazılımları kullanıldı. Feature Extraction yazılımının ayarları Şekil 10'da gösterildiği gibi yapıldı.

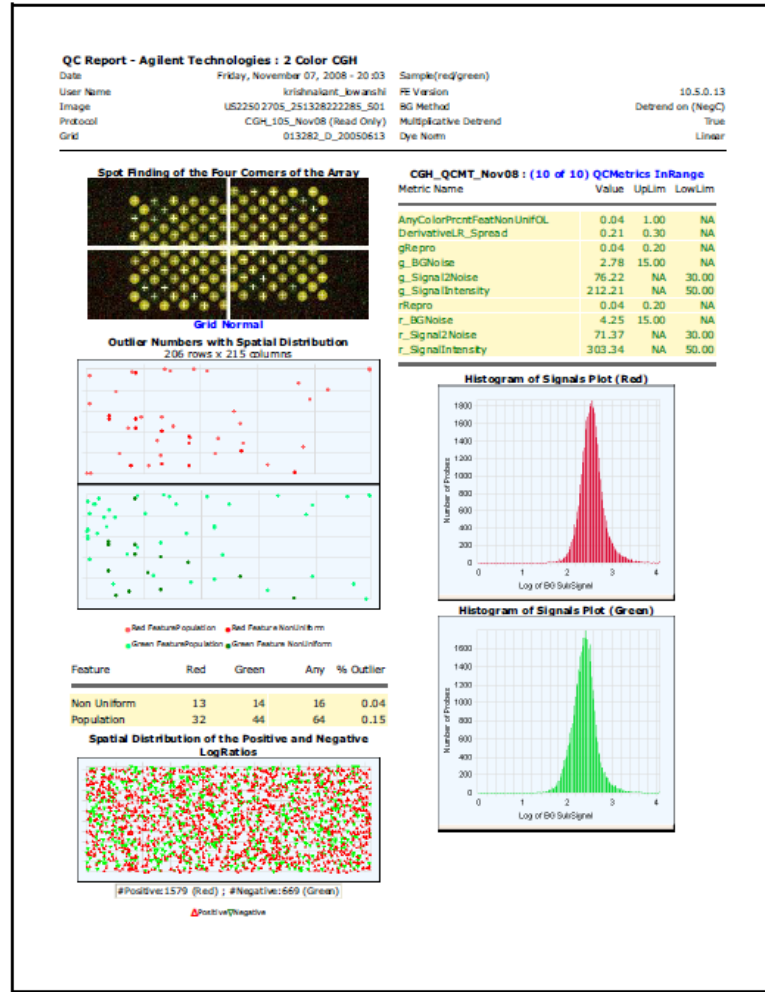


Şekil 10. Feature Extraction 10.5.1.1 Yazılımının Standart Ayarları

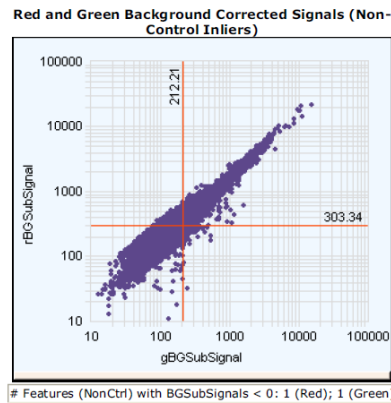
Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımı deneyin kalitesi ile ilgili Şekil 11’de ve Şekil 12’de örnek verildiği üzere kalite kontrol raporu vermektedir. Ayrıca enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri Tablo 9.10 'da verilmiştir.

Metrik Değer	Mükemmel	İyi	Değerlendir
Arka Plan Gürültüsü (BGNoise)	<10	10-20	>20
Sinyal Yoğunluğu (Signal intensity)	>150	50-150	<50
Sinyal/Gürültü (Signal to Noise)	>100	30-100	<30
Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)	<0.05	0.05-.0.2	>0.2
DLRSpread	<0.2	0.2-0.3	>0.3

Tablo 9.10. Enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri



Şekil 11. Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımının verdiği CGH Kalite Kontrol Raporu Örneği - 1



Şekil 12. Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımının verdiği CGH Kalite Kontrol Raporu Örneği – 2

Örnek no:	Sperm sayı ve miktarına göre tanıları:
1	Azoospermi
2	Azoospermi
3	Azoospermi
4	Oligozoospermi
5	Oligozoospermi
6	Oligozoospermi
7	Azoospermi
8	Azoospermi
9	Oligozoospermi
10	Oligozoospermi
11	Oligozoospermi
12	Oligozoospermi
13	Oligozoospermi
14	Oligozoospermi
15	Oligozoospermi
16	Oligozoospermi
17	Azoospermi
18	Oligozoospermi
19	Oligozoospermi
20	Oligozoospermi

Tablo 10. Hasta numaraları ve sperm sayı- miktarına göre tanıları

6. BULGULAR

6.1.DNA Konsantrasyon Sonuçları

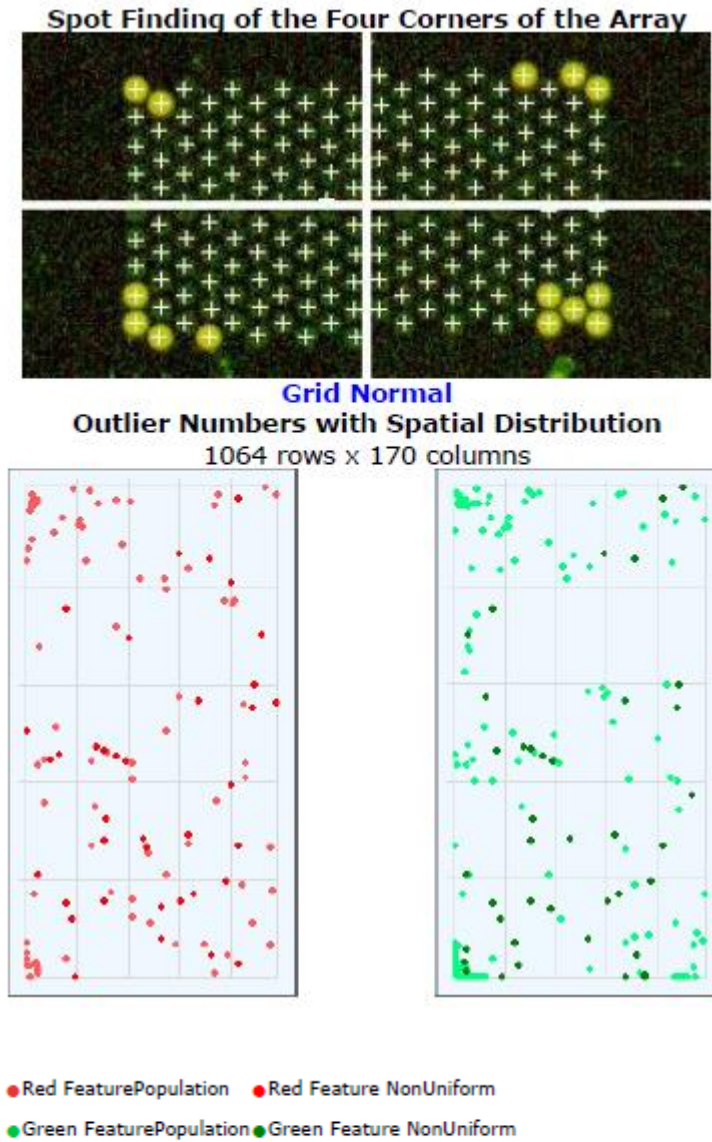
İnfertil erkek hastaların periferik kan örneklerinden izole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları deneyde kullanılabilir aralıktadır. Bazı örneklere ait liste aşağıda verilmiştir.

Örnek no	260/280	[DNA] ng/μl
1	1,80	35,6
2	1,80	48,3
3	1,78	27,3
4	1,81	35,6
5	1,84	26,7
6	1,86	32,5
7	1,82	29,9
8	1,85	32,3
9	1,87	36,8
10	1,90	37,5
11	1,89	33,2
12	1,81	37,5
13	1,82	44,5
14	1,84	30,6
15	1,80	34,4
16	1,82	29,1
17	1,85	33,2
18	1,84	27,7
19	1,81	42,3
20	1,78	30,4

Tablo 11. Örneklerin DNA Absorbans Ölçümleri

6. 2. Mikroarray Sonuçları

Mikroarray aşamasının ardından elde edilen sonuçlar, Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımının verdiği CGH Kalite Kontrol Raporu alınarak, analiz için uygun kalitede olup olmadıkları kontrol edildi. Tüm örneklerin kalite kontrol raporları sonucu çalışma açısından uygun bulundu. Bir kaç hastanın elde edilen Kalite Kontrol Rapor örnekleri Şekil 13’te verilmiştir.



Şekil 13. Hibridizasyon işleminin doğru yapılp yapılmadığını kontrol edebildiğimiz rapor.

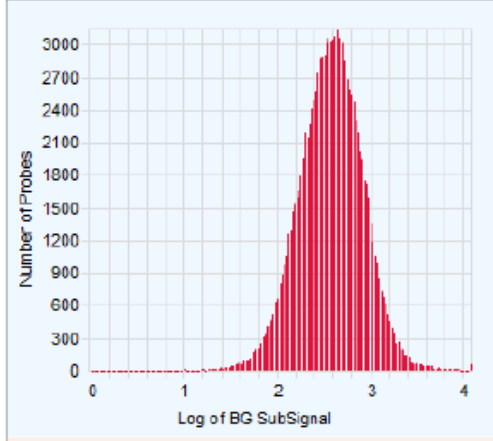
Evaluation Metrics for CGH_QCMT_Jul11 :

Excellent (6) ; Good (6)

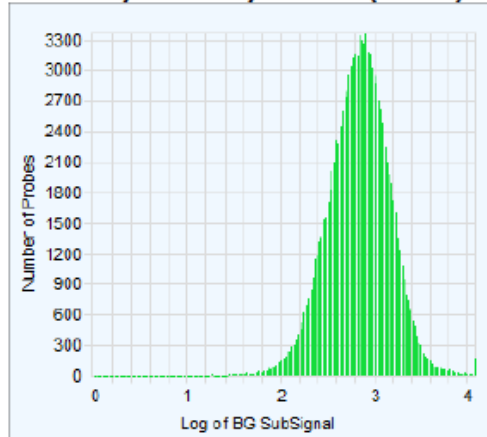
Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00	>1	NA	<1
AnyColorPrcntFeatNonUn...	0.03	<1	1 to 5	>5
DerivativeLR_Spread	0.17	<0.20	0.20 to 0.30	>0.30
gRepro	0.09	0 to 0.05	0.05 to 0.20	<0 or >0.20
g_BGNoise	6.28	<5	5 to 15	>15
g_Signal2Noise	95.83	>100	30 to 100	<30
g_SignalIntensity	602.06	>150	50 to 150	<50
rRepro	0.10	0 to 0.05	0.05 to 0.20	<0 or >0.20
r_BGNoise	4.00	<5	5 to 15	>15
r_Signal2Noise	82.86	>100	30 to 100	<30
r_SignalIntensity	331.78	>150	50 to 150	<50
RestrictionControl	0.94		0.80 to 1	<0.80 or >1
gDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

Histogram of Signals Plot (Red)



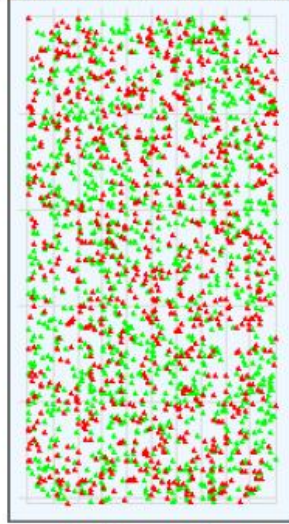
Histogram of Signals Plot (Green)



Şekil 14. Kırmızı ve yeşil sinyallerin dağılımı

Feature	Red	Green	Any	% Outlier
Non Uniform	37	41	52	0.03
Population	117	210	261	0.14

Spatial Distribution of the Positive and Negative LogRatios

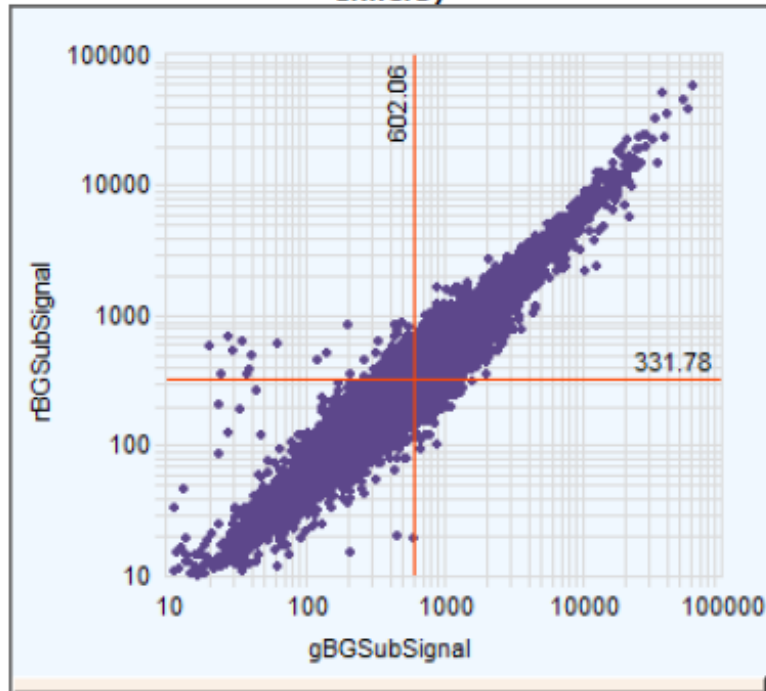


#Positive:919 (Red) ; #Negative:1282 (Green)

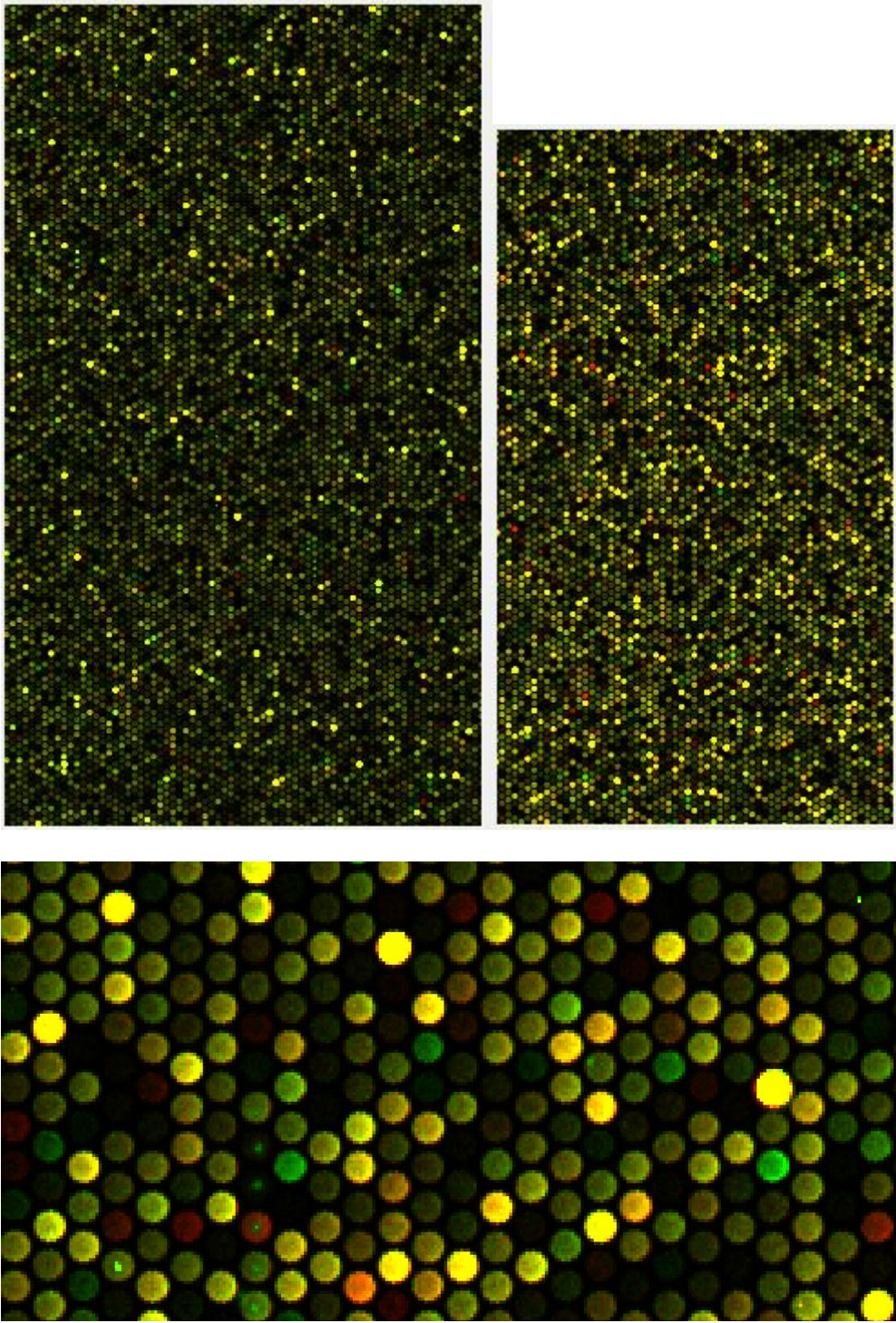
▲ Positive ▼ Negative

Positive: 0.81% of NonCtrl Features : Random (Value 1.02)
Negative: 1.13% of NonCtrl Features : Random (Value 1.02)

Red and Green Background Corrected Signals (Non-Control Inliers)



Şekil 15. Kırmızı ve yeşil sinyallerin dağılımı



Şekil 16. 2 Renk Microarray sonucu

Yapılan array CGH analizi sonucunda daha önce erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiş olan pek çok gende delesyon, amplifikasyon ve LOH (heterozigosite kaybı) saptandı. Bu genler ve saptanan gen kusurları Tablo11-20’de gösterilmiştir.

Hasta no:	TFAM	THEG	TTY11	TTY18	TTY19	UBE2B	UGT2B 15	UGT2B17	WASL
1		LOH							
2							del	del	
3							del	del	
4			amp	amp	amp		del	del	
5							del	del	
6							del	del	
7							del	del	
8									LOH
9									
10									
11									
12			amp						
13							del	del	
14	LOH		amp	amp	amp		del	del	
15							del	del	
16									
17									
18			amp	amp	amp				
19						LOH			
20			amp	amp	amp				

Tablo 12. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları (del: delesyon, amp: amplifikasyon, LOH: heterozigosite kaybı)

Hasta no:	SOX2	SOX5	SOX6	SOX8	SOX9	SOX10	SOX14	SOX21
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10	amp				amp			
11	amp							
12						LOH		LOH
13								
14								
15			del					
16	amp							
17	amp	LOH					LOH	
18								
19	amp							
20								

Tablo 13. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları

Hasta no:	SPACA3	SPACA4	SPAG1	SPAG4	SPAG5	SPAG8	SPAG9	SPAG11A/ SPAG11B	SPAG16
1		LOH				LOH		del/del	
2	LOH						LOH	del/del	
3	LOH						LOH	del/del	
4								del/del	del
5								del/del	
6								del/del	
7								del/del	
8								del/del	
9								del/del	
10								del/del	
11								del/del	
12				LOH				del/del	
13								-/del	
14			LOH				LOH	del/del	
15								del/del	
16								del/del	
17	LOH				LOH		LOH	del/del	
18								del/del	
19								del/del	
20								del/del	

Tablo 14. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları

Hasta no:	SPATA 1	SPATA 2	SPATA 5L1	SPATA 9	SPATA 12	SPATA 16	SPATA 17	SPATA 20	SPATA 21	SPATA 24	SPATS2L
1											
2								LOH			LOH
3											
4											
5											
6											
7						LOH					
8											LOH
9											
10											
11											
12	LOH										
13											
14			LOH	LOH				LOH			
15											
16											
17		LOH			LOH			LOH	LOH		LOH
18											
19	LOH						LOH			LOH	
20											

Tablo 15. Hastalarda gözlenen heterozigosite kayıplarının olduğu bölgeler

Hasta no:	SRM	SRY	STRA8	STRBP	TESK1	TEX9	TEX28	TEX101	TEX261	WAPAL	WNT4
1					LOH		del	LOH			
2			LOH	LOH				del			
3				LOH							
4											
5											
6											
7		del	LOH								
8											
9								del			
10											
11											
12											
13											
14				LOH		LOH					
15											
16											
17	LOH								LOH	LOH	LOH
18											
19											
20											

Tablo 16. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları

Hasta no:	ACR	BCL2L2	CATSPER2 CATSPER2P1	CATSPER3	CATSBERG	CDC25A	CDKN2D	CEP55	CYP19A1
1					LOH				
2									
3		LOH							
4			del						
5									
6									
7								LOH	
8							LOH		
9									
10									
11									
12									
13	del	del							
14			LOH						LOH
15									
16									
17			LOH			LOH			
18									
19				LOH					
20		LOH							

Tablo 17. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları

Hasta no:	CFHR1\ CFHR3	DMPK	DPY19L3	DZIP1	ELAVL1/3	ELAVL2	ESR1	ESR2	FSHR	HTT
1	del	LOH	LOH			LOH				
2	amp									
3	amp									LOH
4										
5										
6	amp									
7	amp			LOH						
8	amp				LOH					
9	del									
10										
11										
12	amp							LOH		
13	amp									
14							LOH			
15	ampl									
16										
17				LOH					LOH	
18	amp									
19	amp									
20	amp									

Tablo 18. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları

Hasta no:	GGNBP2	GNRHR	HSPA2	INHBB	LDLR	LHCGR	MEA1	MERTK	MLH1	MORC1
1										
2				LOH				LOH		
3	LOH			LOH				LOH		
4										
5										
6										
7										
8					LOH					
9					LOH					
10							amp			
11										
12			LOH							
13										
14										
15										
16										
17		LOH			LOH	LOH			LOH	LOH
18										
19										
20										

Tablo 19. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları

Hasta no:	NR0B1	ODF1	ODF3	PABPN1	PEX3	PEX6	PEX14	PFN3	PIWIL4	POLG	PLAGL1/HYMAI
1											
2											amp
3				LOH							
4											
5											
6											
7											amp
8									LOH		amp
9											
10											amp
11	amp										amp
12								del		LOH	amp
13				del							
14					LOH						LOH
15											
16											amp
17							LOH				amp
18											
19			del								amp
20		LOH		LOH		del					

Tablo 20. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları

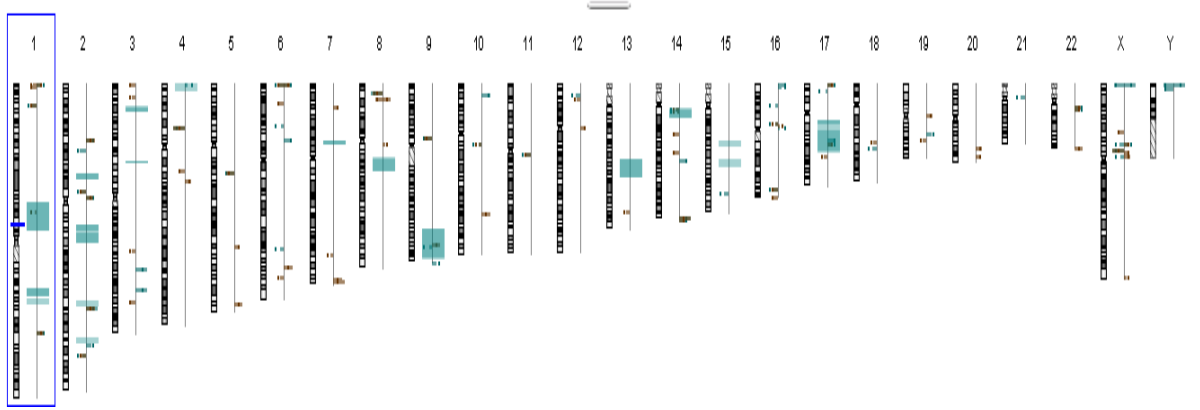
Hasta no:	PTCHD3	RAB8B	RB1	RBMV1A3P/ RBMV3AP	RFPL4A	RNF8\ RNF39	ROPN1	SMCP	SRD5A2
1									
2									
3		LOH							
4									
5									
6									
7					LOH	del			
8									
9								amp	
10			LOH						
11									
12			LOH						
13			del						
14	LOH								
15									
16									
17			LOH				LOH		LOH
18				amp					
19									
20				amp					

Tablo 21. Hastalarda gözlenen infertilite ile ilgili bazı gen kusurları

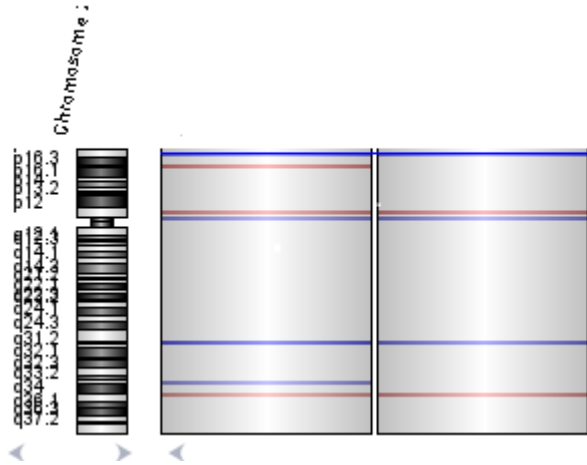
GEN	KROMOZOM
ACR	<u>22q13.33</u>
BCL2L2	<u>14q11.2</u>
CATSPER2\CATSPER2P1	15
CATSPER3	<u>5q31.1</u>
CATSPERG	<u>19q13.2</u>
CDC25A	<u>3p21.31</u>
CDKN2D	19
CEP55	<u>10q23.33</u>
CFHR1/ CFHR3	<u>1q31.3</u>
DMPK	19
DPY19L3	<u>19q13.11</u>
DZIP1	3
ELAVL1\3	<u>19p13.2</u>
ELAVL2	<u>9p21.3</u>
ESR1	<u>6q25.1</u>
ESR2	14
FSHR	<u>2p16.3</u>
GGNBP2	<u>17q12</u>
GNRHR	<u>4q13.2</u>
HSPA2	<u>14q23.3</u>
LDLR	<u>19p13.2</u>
LHCGR	<u>2p16.3</u>
MEA1	<u>6p21.1</u>
MERTK	<u>2q13</u>
MLH1	<u>3p22.2</u>
MORC1	<u>3q13.13</u>
NR0B1	X
ODF1	<u>8q22.3</u>
ODF3	<u>11p15.5</u>
PABPN1	14
PEX14	<u>1p36.22</u>
PEX3	<u>6q24.2,</u>
PEX6	<u>6p21.1</u>
PLAGL1\HYMAI	<u>6q24.2</u>
POLG	<u>15q26.1</u>
PTCHD3	<u>10p12.1</u>
RAB8B	15
RB1	<u>13q14.2</u>
RBMY1A3P\RBMY3AP	Y
RFPL4A	<u>19q13.42</u>
RNF39	<u>6p22.1</u>
RNF8	<u>6p21.2</u>
SMCP	<u>1q21.3</u>
SOX10	<u>22q13.1</u>
SOX14	<u>3q22.3</u>
SOX2	<u>3q26.33</u>
SOX21	<u>13q32.1</u>
SOX5	<u>12p12.1</u>
SOX6	<u>11p15.2-p15.1</u>
SOX8	<u>16p13.3</u>

SOX9	<u>17q24.3</u>
SPACA3	<u>17q11.2</u>
SPACA4	<u>19q13.33</u>
SPAG1	<u>8q22.2</u>
SPAG11A	<u>8p23.1</u>
SPAG11B	<u>8p23.1</u>
SPAG4	<u>20q11.22</u>
SPAG5	17
SPAG8	<u>9p13.3</u>
SPAG9	<u>17q21.33</u>
SPATA1	1
SPATA12	<u>3p14.3</u>
SPATA16	<u>3q26.31</u>
SPATA20	<u>17q21.33</u>
SPATA21	1
SPATA24	5
SPATA5L1	15
SPATA9	5
SPATS2L	<u>2q33.1</u>
SRD5A2	<u>2p23.1</u>
SRY	<u>Yp11.31</u>
STRA8	<u>7q33</u>
STRBP	<u>9q33.3</u>
TESK1	<u>9p13.3</u>
TEX101	<u>19q13.31</u>
TEX28	<u>Xq28</u>
TEX9	15
TFAM	<u>10q21.1</u>
THEG	19
TTY11	Y
TTY17	Y
TTY19	Y
UBE2B	<u>5q31.1</u>
UGT2B15/ UGT2B17	<u>4q13.2</u>
WAPAL	<u>10q23.2</u>
WASL	7
WNT-4	<u>1p36.12</u>

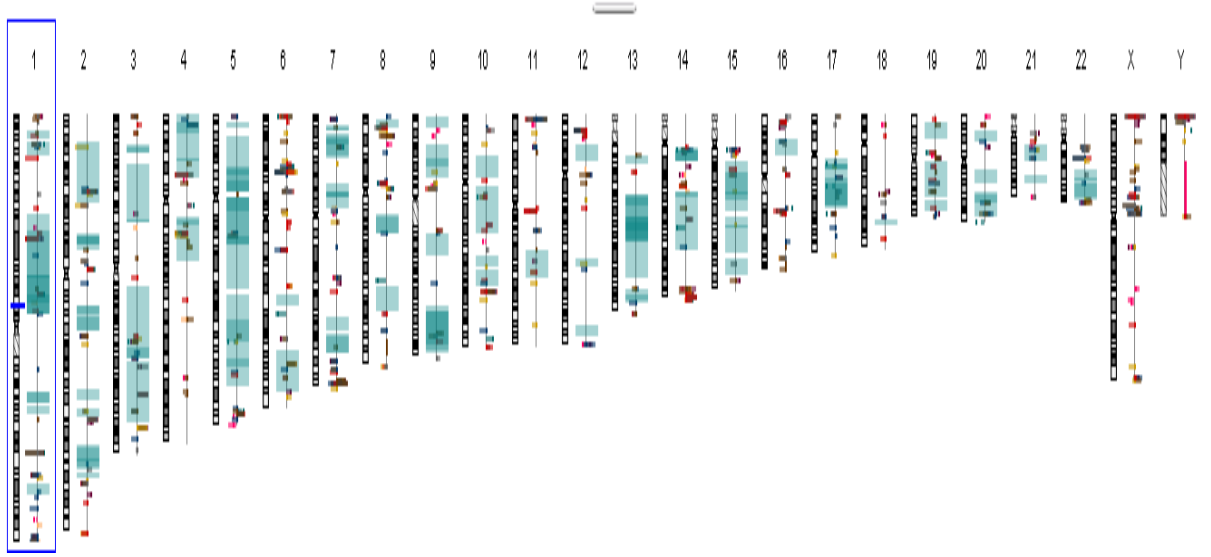
Tablo 22. Örneklerde gözlenen gen kusurlarının bulunduğu kromozom bölgeleri



Şekil 17. İkiz kardeş azoospermik örneklerin gen kusurlarının kromozomlar üzerinde bir arada görüntülenmesi (Hasta numaraları 2 ve 3).



Şekil 18. İkiz kardeş azoospermik örneklerin aynı kromozomun aynı bölgesinde bulunan gen kusurlarının bir arada görüntülenmesi (Hasta numaraları 2 ve 3).



Şekil 19. Tüm örneklerin amp/del/LOH bölgelerinin bir arada görüntülenmesi

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bugüne kadar, spermin yapısını ve fonksiyonunu etkileyen çevresel faktörler de dahil birçok faktör üzerinde durulmuş ancak buna rağmen birçok vakada infertiliteye neden olan faktör (ler) aydınlatılamamıştır.

Erkek infertilitesi genetik açıdan ele alındığında; kromozomal düzensizlikler ve gen mutasyonlarının önemli etkenler olabileceği bilinmektedir. Erkek infertilitesine neden olan otozomal gen kusurlarının bildirildiği az sayıda çalışma literatürde bulunmaktadır. Bu çalışmada da azospermik ve ağır oligozoospermik vakalarda erkek infertilitesine neden olan ve otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren gen mutasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 14 ağır oligozoospermili, 6 azospermili toplam 20, Türk, erkek hastaya ait kan örnekleri array teknolojisi ile incelenmiştir. Bu teknik ile incelenen 20 infertil erkek hastanın tüm genomları standart olarak kabul edilen erkek referans DNA örnekleriyle karşılaştırıldı. 7 numaralı örnekte “Sex-determining region” (SRY) gen delesyonu gözlemlendi. 1995 yılında Lahr ve ark tarafından tanımlanan SRY geninin embriyonik dönemde cinsiyetin belirlenmesinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir. 1996 yılında da Silva ve ark. “SRY related HMG-Box gene 9” (SOX9) geninin SRY geni ile birlikte memelilerde cinsiyet belirlenmesinde anahtar rol oynadığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda 7 numaralı hastada SRY gen delesyonu ve 10 numaralı hastada SOX9 geninde amplifikasyon saptandı.

Spermatogenezle ilişkili olduğu bilinen “Spermatogenesis-associated protein” (SPATA) gen ailesinden SPATA1, SPATA2, SPATA5L2, SPATA9, SPATA12, SPATA16, SPATA17, SPATA20, SPATA21, SPATA24, SPATS2L genlerinde heterozigosite kayıpları saptanmıştır. Xu ve ark.’nın çalışmalarında SPATA 16 geninin testis gelişimiyle ilişkili olduğu ve dişi farelerde ekspresyonunun olmadığı göstermiştir. Cheng ve ark. ise SPATA9 geninin SCOS hastalarında ekspresyonunun olmadığını göstermişlerdir. Çalışmamızda SPATA gen ailesinde çok sayıda gen kusurunun saptanması, bu gen ailesinin memeli erkek fertilizasyon yolağında önemli bir role sahip olduğunu desteklemektedir.

“Sperm-associated antigen” (SPAG) gen ailesine ait SPAG1, SPAG4, SPAG5, SPAG8, SPAG9, SPAG11A, SPAG11B, SPAG16 genlerinde heterozigosite kayıpları ve delesyonlar gözlemlendi. Çalışmaya dahil edilen 20 bireyde de SPAG11A ve SPAG11B genlerinde gözlenen delesyonlar, bu gen kusurlarının karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yönteminde kullanılan standart referans örneğinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Ancak SPAG11A ve SPAG11B genlerinin ürünlerinin epididimiste sperm olgunlaşması, sperm motilitesi, kapasitasyonu ve sperm-yumurta etkileşiminde etkin rol oynadıkları Zhou ve ark. tarafından 2004 yılında gösterilmiştir. Miao ve ark.’nın 1995 yılında yaptıkları çalışmada SPAG8 geninin testiste eksprese olduğunu, ancak beyin, karaciğer, kalp, akciğer ve böbrekte eksprese olmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmanın devamında kullandıkları otoradyografik yöntemler ile spermatogonia, spermatosit ve seminifer epitelindeki spermatidlerde SPAG8 transkriptlerinin varlığını göstermişlerdir. Neese ve ark. ’nın 2007 yılında yaptıkları çalışmada ise SPAG1 geninin testiste sperm hücrelerinde eksprese olduğu, ancak diğer hiçbir memeli dokusunda eksprese olmadığı gösterilmiştir. Shankar ve ark.’nın 1998 yılında yaptıkları çalışma sonucunda immunohistokimyasal boyamalar SPAG9 gen ürününün elonge spermatidler ile ilişkili olup, yuvarlak spermatidlerle ilişkilerinin bulunmadığı ve bu sayede ekspresyon ve transkripsiyon arasında gecikme varlığı gösterilmiştir.

Memelilerin sperm kuyruğun aksonem haricinde 2 özel yapı içermektedir. Bu yapı kuyruğun tümü boyunca uzanan “outer dense fibers” (ODF) ve mitokondri yumağından başlayıp ODF’yi sperm kuyruğunun sonuna kadar saran fibröz kılıftır (FS). Shao ve arkadaşlarını 1997 yılında yaptıkları çalışmada SPAG4 geninin kodladığı ürünün bir lösün fermuar yapısı aracılığıyla ODF27 ile yakın ilişkili olduğunu ve sadece geçici olarak uzayan spermatidlerde eksprese olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda 19 numaralı hastada ODF3 geninde delesyon ve 20 numaralı hastada ODF1 geninde heterozigosite kaybı saptanmıştır. Gastmann ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptıkları çalışmada ODF geninin insan testisinde eksprese olduğu, fakat insan dalak, böbrek ve beyin dokularında ekspresyonunun gözlenmediğini ortaya koymuşlardır. Bu dış yoğun fibriller aksonem dışında sperm kuyruğunun orta ve ana parçalarında yer alır ve sperm kuyruğuna pasif elastik özelliklerini kazandırır. Carvalho ve arkadaşları 2002 yılında Odf3 transkriptinin

Leydig ve Sertoli hücrelerinde eksprese olmadığını, sadece germ hücrelerinde eksprese olduğunu göstermişlerdir.

“Sperm acrosome-associated protein” (SPACA) gen ailesinden SPACA3 ve SPACA 4 genlerine ait gen kusurları çalışmamızda saptanmıştır. 2, 3 ve 17 numaralı hastalarda SPACA3 ve SPAG9 heterozigosite kayıpları birarada görülmüştür. Literatürde bu iki genin kusurlarının bir arada görüldüğü bildirilmemiştir. Mandal ve ark 2003 tarihli çalışmasında SPACA3 geninin zonasız hamster yumurtalarına sperm bağlanmasında önemli bir rolünün olduğu gösterilememiştir. Çalışmamızda 3 hastada birlikte gösterilen SPACA3 ve SPAG9 gen kusurları bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşündürmüştür.

SOX gen ailesinin üyelerinden SOX2, SOX5, SOX6, SOX9, SOX10, SOX14, SOX21 gen kusurları yaptığımız çalışmada saptanmıştır. Bu genlerden sadece SOX2 geni Kelbermann ve ark. 2006 tarihli çalışmalarında hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkilendirilmiştir. Bu gen ailesindeki diğer genlerin erkek infertilitesindeki rolüne ait çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda 10, 11, 16, 17, 19 numaralı hasta örneklerinde SOX2 gen amplifikasyonu saptanmıştır. SOX ailesinin yukarıda belirtilen diğer üyelerine ait amplifikasyon, delesyon ve heterozigosite kayıpları da çalışmamızda gösterilmiştir. Bu bulgular eşliğinde bu gen ailesinin erkek infertilitesi ile yakından ilişkili olduğu ve bu konuyla ilgili örnek sayısı artırılarak yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

“Sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein” (SMCP) geni ürünü olan mitokondriyal kapsül selenoprotein, sperm mitokondrisinin hilal yapısının oluşumu ve korunmasında önemli rol oynayan 3 proteinden biridir. Aho ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada sperm mitokondrisinin somatik hücrelerdeki mitokondrilerden şekilsel ve düzensel olarak farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada selenyumsuz diyet ile beslenen sıçanlarda sperm motilitesinde azalma ve sperm mitokondrisinde düzensizlik oluşumu belirtilmiştir. Çalışmamızda 9 numaralı hasta örneğinde SMCP gen kusuru saptanmıştır.

Spermatogenez süresince germ hücreleri tabandan adluminal komplekse doğru göç ederler. Bu esnada aktin vasıtasıyla Sertoli hücrelerine bağlıdırlar. Lau ve Mruk’un 2003 yılında sıçanlarla yaptıkları çalışmada Sertoli hücre kültürlerinde veya

Sertoli hücreleri ile birlikte germ hücre kültürlerinde hücre-hücre bağlanması boyunca “Ras-associated protein 8B” (RAB8B) gen ürünü olan Rab8b ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada 3 numaralı bireyde RAB8B gen kusuru saptanmıştır.

“Patched Domain-Containing Protein 3” (PTCHD3) gen ürünlerinin yalnızca testiste eksprese olduğu, farelerde postnatal gelişimin 16. gününde ekspresyonunun başladığını ve Ptchd3 ürününün spermatogenezin pakiten safhasında eksprese olduğunu Fan ve ark. 2007 yılında göstermişlerdir. Çalışmamızda bir infertil hastada spermatogenezle doğrudan ilişkili olduğu bilinen PTCHD3 gen kusuru saptanmış olup literatür ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda 12 numaralı hastada “Polymerase, DNA, Gamma” (POLG) gen kusuru saptanmıştır. POLG geninin literatürde insan erkek infertilitesiyle ilişkili olduğunu gösteren bir kaç çalışma bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi 2001 yılında Rovio ve ark. tarafından yapılmış olan, azosperminin çalışma dışı bırakıldığı 99 hasta ile yapılan çalışmada 9 hasta 10 CAG tekrar eksikliği için homozigot bulunmuştur.

Krausz ve ark.’nın 2004 yılında 195 infertil hasta ve 190 normospermik birey ile yaptıkları çalışmada POLG geninde bulunan 10 CAG tekrar sıklığı iki grup arasında istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Bu da POLG geni üzerinde yer alan CAG dizi tekrarlarının spermatogenezde sanılanın aksine çok da etkili bir rolü olmadığını akla getirmektedir.

“Pleomorphic Adenoma Gene-Like 1” (PLAGL1) ve Hydatidiform Mole-Associated and Imprinted Transcript” (HYMAI) genlerinin literatürde tekrarlayan düşükler ile ilişkilendirilmiş olmasının (Arima et al. 2001) yanı sıra yaptığımız bu çalışmada her iki genin de aynı anda 2, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 19 numaralı hastalarda kusurlarının saptanması bu iki genin birlikte erkek infertilitesinde de rol aldığını düşündürmektedir. Bu konuda hasta sayısının artırılarak daha ileri analizlerinin yapılacağı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Watson ve ark.’nın 1998 yılında farelerde yaptıkları çalışma ile MORC1 “Morc Family CW-Type Zinc Finger1” geninin otozomal çekinik mutasyonunun farelerde spermatogenezde erken safhada duraklamaya yol açtığını saptamışlardır.

Aynı çalışmada MORC -/- farelerde testiste hücrelerin yoğun olarak apoptotik sürece girdiği saptanmıştır.

Inoue ve ark. 'nın 1999 yılında spermatogenezdeki duraklama safhasının mayozun profaz I evresinde meydana geldiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda 17 numaralı hastada MORC1 geninde heterozigosite kaybı saptanmıştır.

“Male-Enhanced Antigen 1” (MEA1) geni ile ilgili literatürde fazla çalışma bulunmamaktadır. Lau ve ark.'nın 1987 senesinde MEA1 gen ürününün özellikle testiste eksprese olduğunu göstermişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada MEA1 gen kusuru bulunan bir hasta bulunmaktadır.

“Heat-Shock 70 KD Protein 2” (HSPA2) genine sahip olmayan immatür sperm hücrelerinin sitoplazmik birikime sahip oldukları ve zona pellucidaya bağlanma yeteneğine sahip olmadıkları Huszar ve ark. tarafından 2000 yılında gösterilmiştir. Roux ve arkadaşları 1994'te HSPA2 ekspresyonunun kas, kalp, özofagus, beyin ve testiste olduğunu göstermişlerdir. Son ve ark., ise 1999'da SCOS hastalarında HSPA2 geninin testisteki ekspresyonunun çok düşük olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda 12 numaralı hastada HSPA2 geninde heterozigosite kaybı olduğu görülmüştür. Huszar ve ark 2000'de immunohistokimyasal analizler ile spermatositlerdeki HSPA2 ekspresyonunun düşük, olgun sperm kuyruğu ve spermatidlerde ekspresyonun yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Roux ve arkadaşları tarafından 1997 yılında yapılan çalışmada “Gonadotropin-releasing hormone receptor” (GNRHR) geninin heterozigot mutasyonunu idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda 17 numaralı hastada GNRHR gen kusuru bulunmuştur.

“Follicle-stimulating hormone receptor” (FSHR) geni ürünü olan FSH reseptörü erkeklerde spermatogenezin pubertal başlangıcı ve yetişkinlerde normal sperm üretimi için gereklidir. Tapanainen ve arkadaşları 1997 yılında homozigot FSHR mutasyonu olan erkek bireylerin değişik derecelerde spermatogenik yetmezlikleri olduğunu, fakat şaşırtıcı bir şekilde azospermi veya mutlak infertilitelerinin olmadığını göstermiştir. Çalışmamızda 17 numaralı hasta örneğinde FSHR gen kusuru saptanmıştır.

“DAZ-interacting protein 1” (DZIP1) yetişkin memelilerin testisinde spermatogonia nükleusunda lokalizedir. Primer spermatoisitlerde Dzip1 proteini bulunmamış, daha olgun germ hücrelerinde bulunmuştur (Nagase et al.1999). Çalışmamızda 7 ve 17 numaralı hastalarda DZIP1 gen kusuru bulunmuştur.

“Cation channel, sperm-associated” (CATSPER) gen ailesi üyeleri CATSPER2, CATSPER2P1, CATSPER3, CATSPERG gen kusurları çalışmamızda saptanmıştır. Bu gen ailesinin literatürde erkek infertilitesiyle ilişkili olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur. Zhang ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada akraba evliliği öyküsü bulunan 3 ailede erkek infertilitesi ve non-sendromik sağırılık bulguları olan bireylerde CATSPER2 gen delesyonunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da 3 hastada CATSPER2 ve CATSPER2P1 gen kusurları bir arada bulunmuştur.

Çalışmamızda “Acrosin” (ACR) gen delesyonu bulunan bir hasta gösterilmiştir. Akrosin eksikliğinin erkek infertilitesiyle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Florke-Gerloff et al. 1983). Ancak Adham ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmada IVF deneylerinde akrozine sahip olmayan spermatozoaların oosit fertilizasyon yeteneğine sahip olduğu, sadece fertilizasyon hızının azaldığı gösterilmiştir.

Toshima ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada “Testis-specific protein kinase 1” (TESK1) geninin sadece postpubertal farelerde pakiten fazındaki spermatoisitlerde eksprese olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda 1 numaralı hastada TESH1 gen kusuru saptanmıştır.

Çalışmamızda “Testis-expressed gene” (TEX) gen ailesinden TEX9, TEX28, TEX101 ve TEX261 genlerine ait delesyonlar saptanmıştır. TEX101, Takayama ve ark.’nın 2005 yılında yaptıkları fare deneylerinde testiküler germ hücre antijeni olarak tanımlanmış, spermatogenezin başlamasından sonra eksprese olduğu gösterilmiştir. Ayrıca embriyonik dişi germ hücrelerinde de TEX101 ekspresyonu saptanmış, fakat post-partum altıncı günden sonra ekspresyonun kesildiği bildirilmiştir.

2000 yılında Yanaka ve arkadaşları “Testicular haploid expressed gene, mouse, homolog of” (THEG) gen mutasyonu bulunan transgenik fareler ile yaptıkları

çalışmada, bu genin erkek sterilitesi ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Mutant erkekler anormal germ hücre gelişimi göstermiş, seminifer tübüllerinin lümeninde uzamış spermatidler bulunmuştur. Bu çalışmanın aksine Mannan ve arkadaşları 2003 yılında THEG “knockout” erkek farelerin fertilitelerinin etkilenmediğini göstermiştir. Çalışmamızda 1 numaralı hastada THEG heterozigosite kaybı bulunmuştur.

RAD6 yolağının 2 temel elemanından biri olan “Ubiquitin-conjugating enzyme E2B” (UBE2B) ile ilgili Roest ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptıkları çalışmada bu gen ürününün hasarlı olmasıyla RAD6B gen yolağının bozulmasının farelerde erkek infertilitesine neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda da 19 numaralı hastada UBE2B geninde heterozigosite kaybı gösterilmiştir.

“Wingless-type MMTV integration site family, member 4” (WNT4) geni daha önce literatürde müllerian aplazi ve hiperandrojenizm ile ilişkilendirilmiştir (Biaison-Laubert et al.2004). Çalışmamızda 17 numaralı hastada WNT4 geni heterozigosite kaybı bulunmuştur. Jordan ve arkadaşları 2001’de testiküler Sertoli ve Leydig hücrelerinde Wnt4’ün SRY’yi inhibe eden Dax1 genini “up” regüle ettiğini göstermiştir. Ayrıca Wnt4’ün içinde bulunduğu kromozom bölgesinin duplikasyonu insan XY cinsiyet değişimiyle muhtemelen ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. WNT4 geninin aşırı ekspresyonu dişi fenotipi ile sonuçlanan DAX1 up-regülasyonuna neden olmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbas NE, Toubanc JE, Boucekkin C, Toubanc M, Affara NA, Job JC, Fellous M (1990). A possible common origin of “Y-negative” human XX males and XX true hermaphrodites. *Hum genet*; 84(4): 356-360
- Adham, I. M., Nayernia, K., Engel, W(1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Molec Reprod Dev*; 46: 370-376.
- Adler ID (2000). Spermatogenesis and mutagenecity of environmental hazards: Extrapolation of genetic risk from mouse to man. *Andrologia*; 32: 233-237
- Affara N, Bishop C, Brown W, Cooke H, Davey P, Ellis N, Graves JM, Jones M, Mitchell M, Rapold G, Tyler-Smith C, Yen P, Lau Y-FC (1996). Repot of the second international workshop on Y-chromosome mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet*; 73: 33-76
- Aho H., Schwemmer M., Tessmann D., Murphy D., Mattei G., Engel W., Adham I. M(1996). Isolation, expression, and chromosomal localization of the human mitochondrial capsule selenoprotein gene (MCSP). *Genomics*; 32: 184-190.
- Aitken RJ, Baker HWG, Irvine DS (1995). On the nature of semen quality and infertility. *Hum Reprod*; 10: 248-249
- Aitken RJ, Kerr L, Bolton V and Hargreave T (1990). Analysis of sperm function in globozoospermia: implications for the mechanism of sperm zona interaction. *Fertil Steril*; 54: 701–707
- Aitken RJ, Ross A, Lees MM (1983). Analysis of sperm function in Kartagener’s syndrome. *Fertil Steril*; 40(5): 696-698
- Akhmanova A, Bindels PCT, Xu J, Miedema K, Kremer H, Henning W (1995). Structure and expression of histone H3,3 genes in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila hydei*. *Genome*; 38: 586-600
- Akhmanova A, Miedema K, Hennig W (1996). Identification and characterization of the *Drosophila* histone H4 replacement gene. *FEBS Lett*; 388:219-222
- Akhmanova A, Miedema K, Wang, van Bruggen M, Berden JH, Moudrianakis EN, Hennig W (1997). The localition of histone H3,3 in germ line chromation of drosophila male as established with a histone H3,3-spesific antiserum. *Chromosoma*; 106: 335-347
- Alan F Wright (2005). Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, UK;1:28-32
- Alpley L, Jimenez J, White-Cooper H, Dawson I, Nurse P, Glover DM (1992). Twine, a cdc25 homolog that functions in the male and female germline of *Drosophila*. *Cell*;69:977-988
- Aman RP (2002) A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl*;2:37
- Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C (1973). Semen analysis: An Office technique. *Urology*;2:605-11

Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N (1998). Temel Üroloji. Güneş Kitabevi Ltd Şti, Ankara, Türkiye

Andersson AM, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE (2003). Variation in levels of serum inhibin B, testosterone, estradiol, luteinizing hormone, folliclestimulating hormone, and sex hormone-binding globulin in monthly samples from healthy men during a 17-month period: possible effect of seasons. *J Clin Endocrinol Metab*;88:932-7

Andersson M, Page DC, Petday D, Subrt I, Turleau C, de Grouchy J et al (1988). Y; autosome translocations and mosaism in the ethiology of 45,X maleness: Assignemnt of fertility factor to distal Yq11. *Hum Genet*; 79: 2

Anguiano A, Oates R. D, Amos J. A, Dean M, Gerrard B, Stewart C, Maher TA, White MB, Milunsky A (1992). Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA*; 267: 1794–1797

Antonelli A, Gandini L, Petrinelli P, Marcucci L, Elli R, Lombardo F (2000). Chromosomal alterations and male infertility. *J Endocrinol Invest*;23: 677

Ariel M, Cedar H, McCarrey J (1994). Developmental changes in methylation of spermatogenesis-spesific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet*; 7: 59-63

Arima, T., Drewell, R. A., Arney, K. L., Inoue, J., Makita, Y., Hata, A., Oshimura, M., Wake, N., Surani, M. A(2001). A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Molec Genet*; 10: 1475-1483

Arima, T., Yamasaki, K., John, R. M., Kato, K., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Wake, N., Kono, T(2006). The human HYMAI/PLAGL1differentially methylated region acts as an imprint control region in mice. *Genomics*; 88: 650-658.

Arn P, Chen H, Tuck Muller CM, Mankinen C, Wachtel G, Li S, et al (1994). SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2-p22.11. *Hum Genet*; 93:389

Arnault A, Scheved JF, Gris JC, Costa P, Navratil H, Hurneau C (1994). Tissue-type plasminogen activator level is decreased in human seminal plasma with abnormal liquefaction. *Fertil Steril*;61:741-5

Audebert A (2005). Ovarian endometrioma and infertility. *Gynecol Obstet Fertil*;33(6): 416-422

Aydos K (2004). Subfertil erkeğin değerlendirilmesi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği;s.161-74

Aydos K (2007). Erkek infertilitesi. İç: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N (eds). Temel Üroloji 3. baskı; Güneş Tıp Kitabevleri;s.989-990

Ayvaliotis B, Bronson R, Rosenfeld D, Cooper G (1985). Conception rates in couples where autoimmunity to sperm is detected. *Fertil Steril*; 43: 739-742,

Baker HWG (1986). Relative incidence of ethiologic disorders of male infertility. In: Samten RJ, Swerdloff RS(eds): Male Reproductive Dysfunction, New York, p291

- Baltz JM, Williams PO, Cone RA (1990). Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol Reprod*; 43: 485-491
- Barrat CLR (1995). Spermatogenesis. In: Grudzinkas JG, Yovich JL(eds): Gametes- The Spermatozoon. Cambridge, Cambridge University Press,p.250-267.
- Başar M (2007). Erkek reproduktif sistem fizyolojisi. TUYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Ünal Ofset;s.288-289
- Benchai M, Ajina M, Lornage J, Niveleau A, Durand P, Guerin J F (2003). Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization: a preliminary study. *Fertil Steril*; 80: 947–953,
- Benoff S, Cooper GW, Hurley I, Napolitano B, Rosenfeld DL, Scholl GM, Hershlag A (1993). Human sperm fertilizing potential in-vitro is correlated with differential expression of a head specific mannose-ligand receptor. *Fertil Steril*; 59: 854-862
- Benoff S, Jacob A, Hurley IR (2000). Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update*; 6(2): 107-21
- Berek JS, Adashi EY, Hillard PA (1996). Infertility. In: Novak's Gynecology. 12th edition. Mass Publishing co, pp 915-963
- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*; 348: 448
- Bhasin S, de Kretser DM, Baker HWG (1994). Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*;79: 1525-1529,
- Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F., Schoenle, E. J(2004). A WNT4 mutation associated with mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *New Eng J Med*; 351: 792-798.
- Bick D, Franco B, Sherins RJ, Heye B, Pike L, Crawford J (1992). Brief report: Intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med*; 326: 1752
- Bradtke A (1999). Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction: what are we learning from transgenic and knock-out animals? *Steroids*;64:598-604
- Brandel RA, Mielnic A, Liotta D, et al (1998). AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction. Preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod*; 13: 2812-2815
- Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD (1989). Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*; 337: 373-376
- Buratowski S (1993). DNA repair and transcription: the helicase connection. *Science*; 260: 37-38
- Burfeind P, Hoyer-Fender S (1991). Sequence and developmental expression of a mRNA encoding a putative protein of a rat sperm outer dense fibers. *Dev Biol*;148: 195-204
- Burger HG (1989). Inhibine, a member of a new peptide family. *Reprod Fertil Dev*; 1: 1

- Caldwell KA, Handel MA (1991). Protamine transcript sharing among postmeiotic spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA*;88: 2407-2411
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilinska B, Benahmed M, Levallet J (2001). Aromatase expression in male germ cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 79: 203-208
- Carroll SB (1995). Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature*; 376: 479-485
- Çayan S, Conaghan J, Schriock ED, et al (2001). Birth with ICSI and testicular sperm from men with Kartagener/immotile cilia syndrome. *Fertil Steril*;76: 612-614
- Çayan S, Lee D, Black LD, Reijopera RA, Tureg PJ (2001). Response to varicocelectomy in oligospermic men with and without defined genetic infertility. *Urology*; 57: 530-535
- Chaillet JR, Vogt TF, Beier DR, Leder P (1991). Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. *Cell*; 66: 77-83,
- Chandley AC (1998). Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as causal factors in male infertility. *Hum Reprod*;13 Suppl 1: 45-50
- Cheng LJ, Li JM, Chen J, Ge YH, Yu ZR, Han DS, Zhou ZM, Sha JH (2003). NYD-SP16, a novel gene associated with spermatogenesis of human testis. *Biol. Reprod*; 68: 190-198.
- Chevret E, Roussaux S, Monteil M, Usson Y, Cozi J, Pelletier R, Sele B (1996). Increased incidence of hyperhaploid 24,XY spermatozoa detected by three-color FISH in a 46,XY/47,XXY male. *Hum Genet*; 97(2): 171-175,
- Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, et al (1995). Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med*; 332(22): 1475-1480
- Chung LW, Cunha GR (1983). Stromal-epithelial interactions: II Regulation of prostatic growth by embryonic urogenital sinus mesenchyme. *Prostate*;4:503-11.
- Clarke IJ, Rao A, Fallest PC, Shupnik MA (1993). Transcription rate of the follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit gene is reduced by inhibin in sheep but this does not fully explain the decrease in mRNA. *Mol Cell Endocrinol*;91:211-6
- Clermont Y (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*;52:198
- Cooke HJ, Elliott DJ (1997). RNA binding proteins and human male infertility. *Trend Genet*; 13: 87-89
- Cooke HJ, Hargreave T, Eliot DJ (1998). Understanding the genes involved in spermatogenesis: A progress report. *Fertil Steril*; 69: 989-95.
- Cooke J, Nowak MA, Boerlijst M, Maynard-Smith J (1997). Evolutionary origins and maintenance of redundant gene expression during metazoan development. *Trends Genet*; 13: 360-364
- Courtot C, Frankhauser C, Simantis V, Lehner CF (1992). The Drosophila cdc25 homologue twine is required for meiosis. *Development*;116:405-416

Cozzi J, Chevret E, Rousseaux S, Pelletier R, Benitz V, Jalbert H, Sele B (1994). Achievement of meiosis in XXY germ cells: study of 543 sperm karyotypes from an XY/XXY mosaic patient. *Hum Genet*;93(1): 32-34,

Cunha GR, Chung LW (1981). Stromal-epithelial interactions: I Induction of prostatic phenotyp in urothelium of testicular feminized (Tfm_y) mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*;14:1317-24

Cyry MR, Watson PF: Sperm structure and function. In: Grudzinskas JG, Yovich JL(eds): Gametes the spermatozoon. Cambridge University Press. Cambridge UK, pp 45-69

Czyglik F, Mayaux M-J, Guihard-Moscato M-L, David G, Schwartz D (1986). Lower sperm characteristics in 36 brothers of infertile men, compared with 545 controls. *Fertil Steril*; 45:255-258

Dale B, Iaccarino M, Fortunato A, Gragnaniello G, Kyozuka K, Tosti E (1994). A morphological and functional study of fusibility in round-headed spermatozoa in the human. *Fertil Steril*; 61: 336–340

De Braekeleer M, Dao TN (1991). Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*; 6(2): 245-250

De Carvalho, C. E., Tanaka, H., Iguchi, N., Ventela, S., Nojima, H., Nishimune, Y(2002). Molecular cloning and characterization of a complementary DNA encoding sperm tail protein SHIPPO 1. *Biol Reprod*; 66: 785-795.

De Krester DM, Robertson DM (1989). The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol Reprod*;40:33-47

De Kretser DM (1997) Male infertility. *Lancet*; 349: 787-790

Dearth RK, Hiney JK, Dees WL (2000). Leptin acts centrally to induce the prepubertal secretion of luteinizing hormone in the female rat. *Peptides*;21:387-92

Denis H, Lacroix J-C (1993). The dichotomy between germ line and somatic line, and the origin of cell mortality. *Trends Genet*; 9:7-11,

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

Dikmen N, Leventerler H (2002). Y kromozomu. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, 11: 321

Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, van den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC (2002). Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod*; 17: 13–16

Dube JY, Gaudreault D, Tremblay RR (1989). The concentration of immunoreactive prostatic specific antigen is not decreased in viscous semen samples. *Andrologia*;21:136-9

Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA (1996). Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. *Nature*;381: 783-785

Eberhart CG, Wasserman SA (1995). The pelota locus encodes a protein required for meiotic cell division: an analysis of G2/M arrest in Drosophila spermatogenesis. *Development*;121:3477-3486,

- Eddy E, Toshimori K, O'Brien (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Micros Res Tech*;61: 103-115
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, et al (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*; 137: 4796
- Edwards BG, Bishop CE (1996). On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility. *Mol. Hum. Reprod*, 3: 549-554
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*; 12(2): 241-253
- El Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaniemi I (1998). Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod*;58:116-23
- Elliott DJ, Cooke HJ (1997). The molecular genetics of male infertility. *Bioassays*; 19: 801-809
- Elsawi MM, Pryor JP, Klufio G, Barnes C, Patton MA (1994). Genital tract function in men with Noonan's syndrome. *J Med Genet*; 31: 468
- Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwerchman (2004). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod*; 11: 2904- 2911
- Emir L (2008). Erkek infertilitesinde tanı yöntemleri. *TUYK Ders Notları Kitabı*;291-298
- Erickson RP (1990). Post-meiotic gene expression. *Trends Genet*;6: 264-269,
- Fan J., Akabane H., Zheng X., Zhou X. Zhang L., Liu Q., Zhang Y.-L., Yang J., Zhu G.-Z(2007). Male germ cell-specific expression of a novel Patched-domain containing gene Ptchd3. *Biochem Biophys Res Commun*; 363: 757-761.
- Fawcett DW (1965). The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the guinea pig. *Z Zellforsch*; 67: 279-296
- Fawcett DW (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*;44:394-436
- Feng HL (2003). Molecular Biology of Male Infertility. *Arch Androl*, 49(1): 19-27
- Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL (1991). Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in-vitro fertilization. *Fertil Steril*; 55: 994-999
- Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L (1998). Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low quality semen. *Hum Genet*; 102: 129
- Flörke-Gerloff S, Töpfer-Petersen E, Müller- Esterl W, Mansouri A, Schatz R, Schirren C, Schil W, Engel W (1984). Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. *Andrologia*; 16: 187-202
- Flörke-Gerloff, S., Topfer-Petersen, E., Muller-Esterl, W., Schill, W.-B., Engel, W(1983). Acrosin and the acrosome in human spermatogenesis. *Hum Genet*; 65: 61-67.

Foe VE, Odell GM, Edgar BA (1993). Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. In: Martinez-Arias A, Bate M (eds): The development of *Drosophila melanogaster*. New York, Cold Spring Harbor Lab Press, pp 149-300

Foresta C., Moro E. and Ferlin A (2001). Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev*; 22: 226–239

Foresta C., Moro E., Rossi A., Rossato M., Garolla A., Ferlin A. (2000). Role of the AZFa candidate genes in male infertility. *J Endocrinol Invest*; 23 (10): 646-651.

Fourie MH, Du Toit D, Bornman MS, Van Der Merwe MP, Du Plessis DJ (1991). Alpha-Glucosidase, sperm ATP concentrations, and epididymal function. *Arch Androl*, 26:139-41

Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti ., Bardoni B, Tonlorenzi R, Carrozzo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P (1991). A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature*; 353 (6344): 529-536

Frenken DR, Oehninger S, Burkmann LJ, Coddington CC, Kruger TF, Rosenwaks Z, Acosta AA, Hodgen GD: The hemizona assay(HZA) (1989). a predictor of human sperm fertilizing potential in in-vitro fertilization (IVF) treatment. *J In Vitro Fert Embryo Transf*; 6: 44-50,

Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Köhn FM, Vogt HJ, Mayerhofer A (2002). Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril*; 78: 298-306

Fuller MT (1993). Spermatogenesis. In: Martinez-Arias A, Bate M (eds):The Development of *Drosophila melanogaster*. New York, Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, pp 71-147

Gartner LP, Hiatt JL (1997). Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W.B. Saunders Company, pp 406-412)

Gastmann, O., Burfeind, P., Gunther, E., Hameister, H., Szpirer, C., Hoyer-Fender, S(1993). Sequence, expression, and chromosomal assignment of a human sperm outer dense fiber gene. *Molec Reprod Dev*; 36: 407-418.

Gaudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Miesusset R (2000). Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counselling. *Fertil Steril*; 74: 116

Gazvani MR, Wilson EDA, Richmond DH, Howard PJ, Kingsland CR, Lewis-Jones DI (2000). Role of mitotic control in spermatogenesis. *Fertil Steril*;74: 251-256

Girardi SK, Mielnic A, Schlegel PN (1997). Sub-microscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod*; 12: 1635-1641

Glass AR, Swerdloff RS, Bray GA, Dahms WT, Atkinson RL (1977). Low serum testosterone and sex hormone binding globuline in massively obese men. *J Clin Endocrinol Metab*; 45: 1211-1219

Glatstein IZ, Harlow BL, Hornstein MD (1998). Practice patterns among reproductive endocrinologists: Further aspects of the infertility evaluation. *Fertil Steril*; 70: 263-269,

- Glover T.D., Barratt C.L.R. (2003) Male Fertility and Infertility, Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Gönczy P, Viswanathan S, Dinardo S (1992). Probing spermatogenesis in drosophila with p-element enhancer detectors. *Development*; 114: 89-98
- Gottlieb B, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L, Trifiro M (1999). Update of the androgen receptor gene mutations database. *Hum Mutat*; 14: 103
- Gottlieb B, Trifiro M, Lumbroso R, Vasiliou DM, Pinsky L (1996). The androgen receptor gene mutations database. *Nucleic Acids Re*;24(1): 151-154
- Griffin JE, Wilson JD (1992). Disorders of sexual differentiation. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED (eds): Campbell's Urology, 6th edition. Edited by, Philadelphia: W.B.Saunders co., vol2, pp. 1509-1542
- Grisswold MD (1995). Interactions between germ cells and sertoli cell in the testis. *Biol Reprod*; 52: 211-216
- Gürkan K (1999). Smith Genel Üroloji. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, İstanbul, Türkiye
- Hackstein JHP (1991). Spermatogenesis in Drosophila. A genetic approach to cellular and subcellular differentiation. *Eur J Cell Biol*;56: 151-169
- Hackstein JHP, Beck H, Hochstenbach R, Kremer H, Zacharias H (1990). Spermatogenesis in Drosophila hydei: a genetic survey. *Roux's Arch Dev Biol*; 199:251-280
- Harley HG, Runtle SA, MacMillan JC, Myring J, Brook JD, Crow S (1993). Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet*; 52: 1164
- Hayes FJ, Crowley WFJ (1988). Gonadotropin pulsations across development. *Horm Res*;49:163-8
- Hayes FJ, De Cruz S, Seminara SB, Boepple PA, Curovley WF Jr. (2001). Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*;86:53-8
- Hedger MP, Meinhardt A (2003). Cytokines and the immune- testicular axis. *J Rep Immunol*; 58: 1-26
- Heyting C (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*; 8: 389-396
- Hook EB (1992). Chromosome abnormalities: prevalence, risk, and recurrence. In: Brock DJH, Rodeck CH, Fergusson-Smith MA(eds.); Prenatal Diagnosis and Screening. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp.351-392
- Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN (2003). Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod*; 18(8): 1660-1665

- Hsu C. C., Kuo P. L., Chuang L., Lin Y. H., Teng Y. N., Lin Y. M. (2006). Uniform deletion junctions of complete azoospermia factor region c deletion in infertile men in Taiwan. *Asian J Androl*; 8 (2): 205-211
- Huang WJ, Lamb DJ, Kim ED, de Lara J, Lin WW, Lipshultz LI (1999). Germ cell nondisjunction in testes biopsies of men with idiopathic infertility. *Am J Hum Genet*; 64: 1638
- Hunter DG, Fishman GA, Mehta RS, Kretzer FL (1986). Abnormal sperm and photoreceptor axonemes in Usher's syndrome. *Arch Ophthalmol*; 104: 385
- Huszar G, Vigue L, Morshedi M (1992). Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: a blind study of 84 couples treated with in-vitro fertilization. *Fertil Steril*; 57: 882-888,
- Huszar, G., Stone, K., Dix, D., Vigue, L(2000). Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod*; 63: 925-932.
- Inoue, N., Hess, K. D., Moreadith, R. W., Richardson, L. L., Handel, M. A., Watson, M. L., Zinn, A. R(1999). New gene family defined by MORC, a nuclear protein required for mouse spermatogenesis. *Hum. Molec. Genet.* 8: 1201-1207.
- Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT (1997). Obesity and impaired hormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*; 16: 303
- Jaffe TMOR (1996). Genetic disorders affecting male infertility. In: Book MT(ed.); *Advancers in Urology.*, Year Book Medical Publishers, vol9, Chicago, pp.363-405
- Jarov JP (1994). Life-threatening conditions associated with male infertility. *Urol Clin North Am*; 21: 409-415
- Jarov JP, Sharlip ID, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howatz SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JV, Sadovsky R (2002). Male infertility best practice policy committee of the American Urological Association Inc. Best practice policies for male infertility. *J Urol*; 167: 2138-2144
- Jarrow JP (1993). Transrectal ultrasonography of infertile men. *Fertil Steril*; 60:1035-9
- Johnson L (1986). Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl*;7(6):331-54
- Johnson L, Varner DD (1988). Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biol Reprod*;39:812-7
- Johnson MD (1998). Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril*; 70: 397
- Jordan, B. K., Mohammed, M., Ching, S. T., Delot, E., Chen, X.-N., Dewing, P., Swain, A., Rao, P. N., Elejalde, B. R., Vilain, E(2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet*; 68: 1102-1109.

Kadioğlu A, Aydos K, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M (edt) (2004). Subfertil erkeğin değerlendirilmesi, İn: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi; İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, s. 161-174

Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M (edt) (2004). Şamlı MM. Spermatogenezin genetik kontrolü, İn: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi; İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, s. 101-114

Kadioğlu A., Çayan S., Semerci B., Orhan İ., Aşçı R., Yaman M.Ö., Usta M.F., Kendirci M (edt) (2004). Erkek reprodüktif sistem hastalıkları ve tedavisi; İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul: s. 268-78

Kandırılı E. Semen analizi ve sperm morfolojisi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M (edt) (2004). Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul.s.317-323

Kaplan H, Aspillaga M, Shelley TF, Gardner LI (1963). Possible fertility in Klinefelter's syndrome. *Lancet*; 1: 506

Karsch-Misrachi I, Haynes SR (1993). The Rb97D gene encodes a potential RNA-binding protein required for spermatogenesis in drosophila. *Nucleic Acids Res*; 21: 2229-2235

Kefi A, Esen A. Testis biopsisi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, editörler. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; 2004.s.238-239

Kelberman D., de Castro S. C. P., Huang S., Crolla J. A., Palmer R., Gregory J. W., Taylor D., Cavallo L., Faienza M. F., Fischetto R., Achermann J. C., Martinez-Barbera J. P., Rizzoti K., Lovell-Badge R., Robinson I. C. A. F., Gerrelli D., Dattani M. T(2008). SOX2 plays a critical role in the pituitary, forebrain, and eye during human embryonic development. *J. Clin. Endocr Metab*; 93: 1865-1873.

Kent-First M, Kol A, Muallem R, et al.: The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletion in babies born after ICSI and their infertile fathers. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 243

Kent-First M, Kol A, Muallem R: Infertility in ICSI-derived sons. *Lancet* 1996 Aug; 348: 332

Kent-First M, Muallem A, Schultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, et al.: Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 1999; 53: 27

Kent-First M., Muallem A., Shultz J., Pryor J., Roberts K., Nolten W., Meisner L., Chandley A., Gouchy G., Jorgensen L., Havighurst T., Grosch J. (1999). Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Ychromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev*; 53 (1): 27-41

Kierszenbaum AL (1994). Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenetic and somatic cell lineages. *Endoc Rev*;15: 116-134

Kim JG, Parthasarathy S (1998). Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol*; 16: 235-239,

Koehler JK(1983). Structural heterogeneity of the mammalian sperm flagellar membrane. *J Submicrosc Cytol*;15: 247-253

Kolb BA, Stanczyk FZ, Sokol RZ (2000). Serum inhibin B levels in males with gonadal dysfunction. *Fertil Steril*;74:234-8

Komori S, Kasumi H, Kanazawa R, Sakata K, Nakata Y, Kato H, Koyama K (1995). CAG repeat length in the androgen receptor gene of infertile Japanese males with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod*; 5(1): 14-16

Krausz C, McElreavey K(1999). Y chromosome and male infertility. *Frontiers in Bioscience* 4, e1-8

Krausz, C., Guarducci, E., Becherini, L., degl'Innocenti, S., Gerace, L., Balercia, G., Forti, G(2004). The clinical significance of the POLG gene polymorphism in male infertility. *J Clin Endocr Metab*; 89: 4292-4297.

Kremer H, Hennig W, Dijkhof R (1986). Chromatin organization in the male germ line of *Drosophila hydei*. *Chromosoma*;94:147-161,

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S (1998). Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro fertilization. *Fertil Steril*; 49: 112-117

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lambard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K (1986). Sperm morphology features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril*;46:118-23

Kumar, A., Goel, G., Fehrenbach, E., Puniya, A. K., Singh, K. Microarrays (2005). The Technology, Analysis and Application, *Eng. Life Sci*; 5, No. 3

Lahn BT, Page DC (1997). Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*; 278: 675

Lahr G, Maxson SC, Mayer A, Just W, Pilgrim C, Reisert I(1995). Transcription of the Y chromosomal gene, Sry, in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*; 33(1):179-82.

Lamb DJ (1999). Debate: is ICSI a genetic time-bomb? Yes. *J Androl*; 20:23

Lahn BT, Page DC (1997). Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*; 278: 675-680

Laron Z, Dickerman Z, Zamir R, Galatzer A (1982). Paternity in Klinefelter's syndrome- a case report. *Arch Androl*;8(2): 149-151,

Lau A. S. N., Mruk D. D(2003). RAB8B GTPase and junction dynamics in the testis. *Endocrinology*; 144: 1549-1563.

Lau, Y.-F., Chan, K., Kan, Y. W., Goldberg, E(1987). Structure and expression of a gene isolated with an anti-H-Y antibody. (Abstract) *Clin Res*; 35: 647A

Layman LC (2002). Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet* ; 39: 153–161

Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, Reindollar RH (1998). Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Genet*; 18: 14,

Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R (1996). Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod*; 11: 1942-1946

Lee S, Lee SH, Chung TG, Kim HJ, Yoon TK, Kwak IP, Park SH, Cha WT, Cho SW, Cha KY (2003). Molecular and cytogenetic characterization of two azoospermic patients with X-autosome translocation. *J Assist Reprod Genet*; 20: 385–389

Levin HS (1979). Testicular biopsy in the study of male infertility. Its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Hum Pathol*; 10:569

Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J (2001). Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with ICSI. *Fertil Steril*; 76: 479

Lilford R, Jones AM, Bishop TD, Thornton J, Mueller R (1994). Case-control study of whether subfertility in men is familial. *Br Med J*, 309:570-573

Lindsley DL, Grell EH (1969). Spermiogenesis without chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*; 61 Suppl (1): 69-78

Linsley DL, Tokuyasu KT (1980). Spermatogenesis. In: Ashburner M, Wright TRF (eds) *The genetics and the biology of Drosophila* vol 2b. Academic Press, London; 225-294,

Lipshultz LI, Howards SS (1999). *Infertility in the Male*. Mosby-Year Book Inc, St Louis, USA

Lopez FJ, Merchenthaler IJ, Moretto M, Negro-Vilar A (1998). Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. *Cell Mol Neurobiol*; 18:125-46

Lui WY, Lee WM, Cheng CY (2003). Rho GTPases and spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1593: 121-129

Lundin K, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L (1994). Fertilization and pregnancy after intracytoplasmic microinjection of acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril*; 62: 1266–1267

Lyon MF (1974). Sex chromosome activity in germ cells. *Basic Life Sci*; 4(PART A):63-71

Main KM, Schmidt IM, Skakkebaek NE (2000). A possible role for reproductive hormone in newborn boys: progressive hypogonadism without the postnatal testosterone peak. *J Clin Endocrinol Metab*; 85:4905-7

Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ (1998). Immunoeexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 alpha hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol Reprod*; 58:520-25

Mandal A., Klotz K. L., Shetty J., Jayes F. L., Wolkowicz M. J., Bolling L. C., Coonrod S. A., Black M. B., Diekman A. B., Haystead T. A. J., Flickinger C. J., Herr J. C (2003). SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa. *Biol Reprod*; 68: 1525-1537.

Martin RH (1996). The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod*; 11: 924

- Martini E, Geraedts JP, Liebaers I, Landt JA, Capitanio GL, Ramaekers FC, Hopman AH (1996). Constitutions of semen samples from XYY and XXY males as analyzed by in-situ hybridization. *Hum Reprod*; 11(8): 1638-1643
- Martins MRFB, Silva JRCP (2001). Ultrastructure of spermatogonia and primary spermatocytes of C57BL6J Mice. *Anat Histol Embryol*; 30: 129-32
- Maurer B, Simoni M (2000). Y chromosome microdeletion screening in infertile men. *J Endocrinol Invest*; 23: 664,
- Mazzi C, Bazonni N, Martinelli I (1996). Evaluation of the pituitary-gonadal axis in men with growth hormone-secreting adenomas: Comparison with non functioning adenomas. *Int J Androl.* ;19:42
- McCarrey JR (1993). Development of the germ cell. In: Desjardins C, Ewing LL(eds) Cell and molecular biology of the testis. New York, Oxford Univ Press, pp58-89,
- McElreavey K (1999). Y chromosome and male infertility. *Frontiers in Bioscience*; 4: 1-8
- McKee BD (1996). The license to pair: identification of meiotic pairing sites in drosophila. *Chromosoma*; 105: 135-141
- McKee BD, Handel MA (1993). Sex chromatin, recombination and chromatin conformation. *Chromosoma*; 102: 71-80
- McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Wilson CM, Griffin JE, Wilson JD (1992). Mutations in the ligand-binding domain of the androgen receptor gene cluster in two regions of the gene. *J Clin Invest*; 90: 2097
- Meistrich ML, Bucci LR, Trostle-Weige PK, Brock WA (1985). Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev Biol*; 112:230-240,
- Meistrich ML, Wilson G, Shuttlesworth GA, Porter KL (2003). Dibromochloropropane inhibits spermatogonial development in rats. *Rep Toxicol*; 5515: 1-9
- Mewes HW, Albermann K, Bahr M, Frishman D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maierl A, Oliver SG, Pfeiffer F, Zollner A (1997). Overview of the yeast genome. *Nature*; 387 Suppl: 7-65
- Miao S., Yan Y., Li Y., Bai Y., Wei S., Zong C., Zhao M., Zong S., Wang L(1995). cDNA encoding a human sperm membrane protein BS-84. *Prog. Natural Sci.* 5: 119-122.
- Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Ibuki Y, Igarashi M (1991). Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*; 175(3): 1125-1130
- Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumiya K, Takao T, Tohda A, Kogav M, Takeyama M, Fujioka H, Takada S, Koide T, Okuyama A (2005). Outcome of gonadotropin therapy for male hypogonadotropic hypogonadism at university affiliated male infertility centers: a 30-year retrospective study. *J Urol*; 173 (6): 2072-2075.,
- Moinkes JC, Jones RS, Liang B-C, Gelbart W, Fuller MT (1992). A drosophila model for Xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome: Haywire encodes the fly homolog of ERCC3, a human excision repair gene. *Cell*; 71: 925-937

Moore KL, Persaud TVN (1998). The Developing Human. 6th edn, W.B. Saunders Company, Pennsylvania, pp22-23.

Morais da Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A., Lovell-Badge R(1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genet*; 14: 62-68.

Mortimer ST (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reprod*; 3: 403-439

Musulmanoglu M. H., Turgut M., Cilingir O., Can C., Ozyurek Y., Artan S.(2005). Role of the AZFd locus in spermatogenesis. *Fertil Steril*; 84(2): 519-22

Nagase, T., Ishikawa, K., Suyama, M., Kikuno, R., Hirosawa, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., Ohara, O(1999). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res*; 6: 63-70.

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

Neesse A., Gangeswaran R., Luetges J., Feakins R., Weeks M. E., Lemoine N. R., Crnogorac-Jurcevic, T(2007). Sperm-associated antigen 1 is expressed early in pancreatic tumorigenesis and promotes motility of cancer cells. *Oncogene*; 26: 1533-1545.

Neugebauer DC, Neuwinger J, Jockenhovel F, Nieschlag E (1990). “9+0” axoneme in spermatozoa and some nasal cilia of a patient with totally immotile spermatozoa associated with thickened sheath and short mid-piece. *Hum Reprod*; 5(8): 981-986

Niederberger CS, Lamb DJ (1997). Spermatogenesis in the Adult. In Lipshultz LI, Howards SS (eds), Infertility in the Male, 3rd edn. Mosby, St Louis, pp 106-122

Nikolettos N, Küpker W, Demirel C, Schöpper B, Blasig C, Sturm R, Felberbaum R, Bauer O, Diedrich K, Al-Hasani S (1999). Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. *Hum Reprod*; 14 (Suppl 1): 47-70

Ombelet W, Pollet H, Bosmans E, Vereecken A (1997). Results of questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum Reprod*;12:1015-20

Orhan İ (2006). Erkek üreme fizyolojisi. TÜYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Kongre Basımevi;s.250-252

Orth JM, Gunsalus GM and Lamperti AA (1998). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*; 122: 787–794

- Osawa Y, Sueoka K, Iwata S, Shinohara M, Kobayashi N, Kuji N, Yoshimura Y (1999). Assessment of the dominant abnormal form is useful for predicting the outcome of intracytoplasmic sperm injection in the case of severe theratozoospermia. *J Asist Reprod Genet*; 16: 436-442
- P.May-Paloup M.-F., Chretien F., Savagner C., Vasseur M. Jean (2003). Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human reproduction*;18 (3): pp550-556
- Page AW, Orr-Weaver TL (1997). Stopping and starting the meiotic cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* ;7:23-31
- Page DC, Brown LG, de la Chapelle A (1987). Exchange of terminal portions of X- and Y-chromosomal short arms in human XX males. *Nature* ; 328: 437
- Palermo GD, Schlegel PN, Hariprasat JJ (1999). Fertilization and pregnancy outcome with ICSI for azoospermic men. *Hum Reprod* ; 14: 741-748
- Pao CC, Kao SM, Hor JJ, Chang SY (1993). Lack of mutational alteration in the conserved region of ZFY and SRY genes of 46,XY females with gonadal dysgenesis. *Hum Reprod*; 8: 224
- Park JM (2005). Ürogenital Sistemin Normal ve Anormal Gelişimi. İç: Alan BR, E Darracott V, Alan JW, editörler. Campbell Üroloji. Güneş Kitabevi;s.1737-64
- Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT (2003). Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology*; 59: 73-86
- Pavlovich CP, King P, Goldstein M, Schlegel PN (2001). Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. *J Urol*;165:837-41
- Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP (2004). Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. *J Urol*; 152(2 pt 2): 788-790
- Pisarska MD, Casson PR, Cisneros PL, Lamb DJ, Lipshultz LI, Buster JE, Carson SA (1999). Fertilization after standard in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes. *Fertil Steril*;71: 627-632
- Plas E, Berger P, Hermann M, Pflüger H (2000). Effects of aging on male fertility? *Exp Gerontol*; 35: 543-551
- Plug AW, Peters AHFM, Keegan KS, Hoekstra MF, de Boer P, Ashley T (1998). Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J Cell Sci*; 111: 413-423
- Poccia D (1986). Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol*;105:1-65,
- Poonthai J, Gopenath TS, Manonayaki S (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*;50(4):336-47
- Prasanth SG, Ali S (2003). Expression of Protooncogene c-kit receptor in rats *Rattus norvegicus* and identification of a mutant mRNA transcript implicated in spermatogenic failure. *DNA Cell Biol*; 22: 447– 456
- Print CG, Lakoski Loveland K(2000). Germ cell suicide: New insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*; 22: 423-430
- Pryor J, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Noltén WE, Meisner L, Roberts KP (1997). Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med*;336: 534-539

- Pryor JL, Kent-First M, Muallen A, (1997). Prospective analysis of Y chromosome microdeletions in 200 consecutive male infertility patients. *N Engl J Med*; 336: 534-539
- Quereshi SJ, Ross AR, Ma K, Cooke HJ, Intyre MA, Chandley AC, Haargreave TB (1996). PCR screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod*; 2(10): 775-779
- Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrinol Rev*; 16: 271,
- Quinton ND, Smith RF, Clayton PE, Gill MS, Shalet S, Justice SK, Simon SA, Walter S, Prostel-VinayMC, Blackmore AL, Ross RJ (1999). Leptin binding activity changes with age: the link between leptin and puberty. *J Clin Endocrinol Metab*;84:2336-41
- Quinzii C, Castellani C (2000). The cystic fibrosis transmembran regulator gene and male infertility. *J Endocrinol Invest*; 23: 684
- Raman R, Narayan G (1995). 5-Aza deoxyCytidine-induced inhibition of differentiation of spermatogonia into spermatocytes in the mouse. *Mol Reprod Dev*; 42: 284-290
- Rao MM, Rao DM (1977). Cytogenetic studies in primary infertility. *Fertil Steril*; 28: 209
- Regan CL, Fuller MT (1999). Interacting genes that affect microtubule function in drosophila melanogaster: two classes of mutation revert the failure to complement between haync2 and mutations in tubulin genes. *Genetics*; 125: 75-90
- Reijo R, Lee T-Y, Salo P (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet*; 10:383-392
- Reijo R, Lee T-Y, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page DC (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet*;10:383-393,
- Reilly JMOR (1992). Preliminary investigation of the fertility status of post-pubertal males with myelodysplasia. Baltimore: American Urological Association
- Roest, H. P., van Klaveren, J., de Wit, J., van Gurp, C. G., Koken, M. H. M., Vermey, M., van Roijen, J. H., Hoogerbrugge, J. W., Vreeburg, J. T. M., Baarends, W. M., Bootsma, D., Grootegeod, J. A., Hoeijmakers, J. H. J(1996). Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell*; 86: 799-810.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W (2003). Histology: A Text and Atlas, 4th edn, Lippincott Williams-Wilkins, Philedelphia; p.689-696
- Roux, A.-F., Nguyen, V. T. T., Squire, J. A., Cox, D. W(1994). A heat shock gene at 14q22: mapping and expression. *Hum Molec Genet*; 3: 1819-1822.
- Rovio A. T., Marchington D. R., Donat S., Schuppe H.-S., Abel J., Fritsche E., Elliott D. J., Laippala P., Ahola A. L., McNay D., Harrison R. F., Hughes B(2001).Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nature Genet*; 29: 261-262.

- Rowley MJ, Teshima F, Heler CG (1970). Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertil Steril*;21:390.
- Rucker GB, Mielnik A, King P, Goldstein M, Schlegel PN (1998). Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction. *J Urol*; 160: 2068-2071
- Ruiz-Pesini E, Lapena AC, Diez C, Alvarez E, Enriquez JA, Lopez Perez MJ: Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clinica Chimica Acta* 2000; 300: 97-105
- Rutland J, de Longh RU (1990). Random ciliary orientation. A Cause of respiratory tract disease. *N Engl J Med*; 323(24): 1681-1684
- Sairam MR, Krishnamurthy H (2001). The role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis: Lessons from knockout animal models. *Arch Med Res*;32: 601-608
- Santen RJ, Paulsen CA (1973). Hypogonadotropic eunuchoidism. I. Clinical study of the mode of inheritance. *J Clin Endocrinol Metab*; 36 (1): 47-54
- Sarıkaya Ş (2007). Genital embriyoloji. TÜYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Ünal Ofset; s. 42-44
- Sassanfar S, Walker G (2003). DNA Microarray Technology. What Is It and How Is It Useful, MIT, Biology Science Outreach
- Sassone-Corsi P (1997). Transcriptional checkpoints determining the fate of male germ cells. *Cell*; 88: 163-166
- Schafer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ, Chambon P, Egly J-M (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2(TFIIH) basic transcription factor. *Science*; 260: 58-63
- Schafer M, Börsch D, Hülster A, Schafer U (1993). Expression of a gene duplication encoding conserved sperm tail proteins is translationally regulated in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*; 13: 1708-1718
- Schafer M, Nayernia K, Engel W, Schafer U (1995). Translational control in spermatogenesis. *Dev Biol*; 172: 344-352
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*; 20; 270 (5235): 467-70
- Schirren CG, Holstein AF, Schirren C (1971). Über die morphogenese rund-köpfiger Spermatozoen des Menschen. *Andrologia*;3:117-125
- Schlegel PN, Hardy M (2002). Male reproductive physiology. In: Retig AB, Vaughan ED, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editörs. Campbell's Urology. 8th ed. Philadelphia: Saunders; Vol2p.1437-74
- Schlegel PN, Matthew H (2005). Erkek Reprodüktif Fizyolojisi. İç: Alan BR, E Darracott V, Alan JW, editörler. Campbell Üroloji. Güneş Kitabevi;s.1437-41
- Schweikert HU, Weissbach L, Leyendecker G, Schvinger E, Wartenberg H, Kruck F (1982). Clinical, endocrinological, and cytological characterization of two 46,XX males. *J Clin Endocrinol Metab*; 54: 745,

Seminara SB, Oliveria LM, Beranova M, Hayes FJ, Crowley WF Jr.(2000). Genetics of hypogonadotrophic hypogonadism. *J Endocrinol Invest*; 23: 560

Sergio Oehninger (2001). Strategies for the Infertile Man. *Sem Reproductive Med*; 19 (3): 231-237

Shankar S., Mohapatra B., Suri A(1998). Cloning of a novel human testis mRNA specifically expressed in testicular haploid germ cells, having unique palindromic sequences and encoding a leucine zipper dimerization motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 243: 561-565.

Shao X., van der Hoorn F. A(1996). Self-interaction of the major 27-kilodalton outer dense fiber protein is in part mediated by a leucine zipper domain in the rat. *Biol. Reprod*; 55: 1343-1350.

Sharpe RM (1994). Regulation of spermatogenesis. In: E Knobil and JD Neill (eds.): The Physiology of Reproduction 2nd Edition. Raven Press, New York, USA: pp 1363–1434

Shiraishi K, Takihara H, Naito K (2002). Influence of interstitial fibrosis on spermatogenesis after vasectomy and vasovasostomy. *Contraception*; 65: 245-249

Sigman M, Howards SS (1992). Male infertility. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED, Jr(eds.):Campbell's Urology, 6th edition. W.B. Saunders Co, vol1, Philadelphia; pp.661-705

Sigman M, Jarow JP (2004). Male Infertility. In: Walsh P, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ(eds.): Campbell's Urology. 8 ed. Philadelphia: Saunders; p. 1475-531

Sigrist S, Ried G, Lehner CF (1995). Dmcd2 kinase is required for both meiotic divisions during Drosophila spermatogenesis and is activated by the Twine/cdc25 phosphatase. *Mech Dev*;53: 247-260,

Silber SJ, Alogappan R, Brown LG (1998). Y chromosome deletions in azoospermic and severe oligoospermic men undergoing ICSI after testicular sperm extraction. *Hum Reprod*; 13: 3332-3337

Simerly C, Wu G-J, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M, Rinehart J, Binor Z, Asch R, Schatten G (1995). The paternal influence of the centrosome, the cell's microtubule organizing center in humans, and the implication for fertility. *Nat Med*;1:47-52

Skakkebaeg NE, Bryant JI, Philip J (1973). Studies on meiotic chromosomes in infertile men and controls with normal karyotypes. *J Reprod Fertil*; 35(1): 23-36

Skakkebaek NE, Giwercman A, de Kretser D (1994). Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet*;343:1473-1479

Skakkebaek NE, Philip J, Hammen R (1969). Meiotic chromosomes in Klinefelter' syndrome. *Nature*; 221(185): 1075-1076

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B (1994). Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*; 331: 1056

Smith RG, Johnson A, Lamb D, Lipshultz LI (1987). Functional tests of spermatozoa. Sperm penetration assay. *Urol Clin North Am*; 14: 451-458

Son, W.-Y., Hwang, S.-H., Han, C.-T., Lee, J.-H., Kim, S., Kim, Y. C(1999). Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. *Molec Hum Reprod*; 5: 1122-1126.

Stanwell-Smith RE, Hendry WF (1984). The prognosis of male subfertility: a survey of 1025 men referred to a fertility clinic. *Br J Urol*; 56: 422-428

Steinberger E, Smith KD, Perloff WH (1965). Spermatogenesis in Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*;10: 1325-1330,

Stone S, O'Mahony F, Khalaf Y, Taylor A, Braude P (2000). A normal live birth after intracytoplasmic sperm injection for globozoospermia without assisted oocyte activation. *Hum Reprod*; 15: 139–141

Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, Oates R, Page DC (1999). An azoospermic man with a de novo point mutation in the Ychromosomal gene USP9Y. *Nat. Genet*; 23: 429– 432

Syed V, Hecht NB (2002). Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. *Mol Cell Endocrinol*; 186: 155-157

Syner FN, Moghtsii KS, Yanez J (1975). Isolation of a factor from normal human semen that accelerates dissolution of abnormally liquefying semen. *Fertil Steril*. 1975;26:1064-9., Wilson VB, Bunge RG. Infertility and semen non-liquefaction. *J Urol*;113:509-10

Takayama, T., Mishima, T., Mori, M., Jin, H., Tsukamoto, H., Takahashi, K., Takizawa, T., Kinoshita, K., Suzuki, M., Sato, I., Matsubara, S., Araki, Y., Takizawa, T(2005). Sexually dimorphic expression of the novel germ cell antigen TEX101 during mouse gonad development. *Biol Reprod*; 72: 1315-1323.

Tapanainen, J. S., Aittomaki, K., Min, J., Vaskivuo, T., Huhtaniemi, I. T(1997). Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nature Genet*; 15: 205-206.

Tarlatzis BC, Grimbizis G (1999). Pregnancy nd child outcome after assisted reproduction techniques. *Hum Reprod*; Suppl 14:231

Temizkan G (1994). Genetik; 1.Temel Genetik, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, Türkiye,s. 209-211

Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E (2000). Homologous and heterologous down regulation of leptin receptor messenger ribonucleic acid in rat adrenal gland. *J Endocrinol*;167:479-86

Terada S, Suzuki N, Uchide K, Ueno H, Akasofu K (1994). Ethiology of prune belly syndrome: evidence of megalocystic origin in an early fetus. *Obstet Gynecol*; 83: 865

Terzoli G, Lalatta F, Lobbiani A, Simoni G, Colucci G (1992). Fertility in a 47,XXY patient: assessment of biological paternity by deoxyribonucleic acid fingerprinting. *Fertil Steril*; 58(4):821-822

- Therman ESM (1993). Human Chromosomes: In Structure, Behavior and Effects (eds): New York, Springer-Verlag
- Thompson ST, Grillis MA, Wolkoff LH, Katzin WE (1994). Transvers testicular ectopia in a man with persistent müllerian duct syndrome. *Arch Pathol Lab Med*; 118: 752
- Tiepolo L, Zuffardi O (1976). Localization of factor controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*; 34:119
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Suzuki, M., Noda, T., Mizuno, K(2001). Cell-type-specific expression of a TESK1 promoter-linked lacZ gene in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*; 286: 566-573.
- Trainer TD (1997). Testis and excretory duct system. In: Sternberg SS (ed): Histology for Pathologists, 2nd edn. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p.1022-1024
- Tureg PJ, Givens C, Schriock ED (1999). Testis sperm extraction and ICSI guided by prior fine needle aspiration mapping in the NOA. *Fertil Steril*; 71: 522-525
- Turek PJ, Cha I, Ljung BM (1997). Systematic fine-needle aspiration of the testis: correlation to biopsy and results of organ 'mapping' for mature sperm in azoospermic men. *Urology*; 49:743-8
- Turner TT, D'Addario D, Howards SS (1978). Further observations on the initiation of sperm motility. *Biol Reprod*; 19:1095-101
- Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL (1997). Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*; 82(11): 3777-3782
- Uluğ M, Duman SB, Uluğ AA, Teksen Ç (2006). Testiküler Azospermili Erkeklerde Y Kromozomunda Azospermi Faktör Mikrodelesyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*; 37: 126 – 130
- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (1996). Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod*; 11 Suppl(4):1-26
- Van Steirteghem AC, Verheyen G, Tournaye YH, Devroey P (1996). Assisted reproductive technology by ICSI in male-factor infertility. *Curr Opin Urol*; 6: 333
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A (2000). Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Human Reproduction*; 15 (2): 351-365
- Vicdan A, Vicdan K, Günel S, Kence A, Akarsu C, Işık AZ, Sözen E (2004). Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 117(1): 49-54
- Vogel F, Motulsky AG (1997). Human genetics: problems and approaches. Springer, Berlin Heidelberg New York, USA
- Vogt PH, Affara N, Davey P, Hammer M, Jobling MA, Lau YF (1997). Report of the third international workshop on Y chromosome mapping 1997. *Cytogenet Cell Genet*; 79:1,

Vogt PH, Edelmann E, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kieswetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Wiedner W, Gröne H-J, Jung A, Engel W, Haidl G (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Tq11. *Hum Mol Genet*;5:933-943

Wang Q, Ghadessy FJ, Trounson A, de Kretser D, McLachlan R, Ng SC, Yong EL (1998). Azoospermia associated with a mutation in the ligand-binding domain of an androgen receptor displaying normal ligand-binding, but defective trans-activation. *J Clin Endocrinol Metab*; 83(12): 4303-4309,

Watson, M. L., Zinn, A. R., Inoue, N., Hess, K. D., Cobb, J., Handel, M. A., Halaban, R., Duchene, C. C., Albright, G. M., Moreadith, R. W (1998). Identification of morc (microorchidia), a mutation that results in arrest of spermatogenesis at an early meiotic stage in the mouse. *Proc Nat Acad Sci*; 95: 14361-14366.

Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E (2000). Physiology of testicular function. In: Nieschlag E, Behre HM, editors. *Andrology*. 2 th ed. Berlin: Springer;p.23-61

Weiss J, Axelrod L, Withcomb RV, Harris PE, Crowley WF, Jamesson JL (1992). Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med*; 326: 179

White-Cooper H, Alpey L, Glover DM (1993). The cdc25 homologue twine is required for only some aspects of the entry into meiosis in *Drosophila*. *J Cell Sci*;106: 1035-1044,

WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction 5th edition: World Health Organization, 1998, New York, Cambridge University Press

Wilson JD, Harrod MJ, Goldstein JL, Hemsell DL, MacDonald PC (1974). Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 1. Evidence for androgen resistance and variable clinical manifestations in a family with the Reifenstein syndrome. *N Engl J Med*; 290(20): 1097- 1103

Wilton LJ, Teichtahl H, Temple-Smith PD, Johnson JL, Sauthwick YJ, Burger HG (1991). Young's syndrome (obstructive azoospermia and chronic sinobronchial infection): A quantitative study of axonemal ultrastructure and function. *Fertil Steril*; 55: 144

Wolff H, Anderson DJ (1988). Immunohistologic characterization and quantitation of leucocyte subpopulations in human semen. *Fertil Steril*; 49: 497-504,

Wong WY, Flik G, Groenen PMW, Swinkels DW, Thomas CMG, Copius-peereboom JHJ, Merkus HMWM, Steegers-Theunissen RPM (2001). The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Rep Toxicol*; 15: 131-136

Woodhouse CR (1994). The sexual and reproductive consequences of congenital genitourinary anomalies. *J Urol*; 152: 645

Xu M., Xiao J., Chen J., Li J., Yin L., Zhu H., Zhou Z., Sha J (2003). Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12. *Molec. Hum. Reprod*; 9: 9-17.

Yanaka, N., Kobayashi, K., Wakimoto, K., Yamada, E., Imahie, H., Imai, Y., Mori, C(2000). Insertional mutation of the murine *kisimo* locus caused a defect in spermatogenesis. *J Biol Chem*; 275: 14791-14794.

Yokota T, Ohno N, Tamura K, Seita M, Toshimori K(1993). Ultrastructure and function of cilia and spermatozoa flagella in a patient with Kartagener's syndrome. *Intern Med*; 32: 593,

Zamboni L (1987). The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in evaluation of semen quality. *Fertil Steril*; 48: 711-734

Zeyneloglu HB, Baltaci V, Duran HE, Erdemli E, Batioglu S (2002). Achievement of pregnancy in globozoospermia with Y chromosome microdeletion after ICSI. *Hum Reprod*; 17(7): 1833-1836

Zhang XD, Miao SY, Wang LF (2000). Human Sperm Membrane Protein(Hsmp-1): A developmental testis-specific component during germ cell differentiation. *Arch Androl*; 45: 239-246

Zhang, Y., Malekpour, M., Al-Madani, N., Kahrizi, K., Zanganeh, M., Lohr, N. J., Mohseni, M., Mojahedi, F., Daneshi, A., Najmabadi, H., Smith, R. J. H(2007). Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *J. Med. Genet.* 44: 233-240, 2007. Note: Erratum: *J Med Genet*; 44: 544.

Zhou C. X., Zhang Y.-L., Xiao L., Zheng M., Leung K. M., Chan M. Y., Lo P. S., Tsang, L. L., Wong, H. Y., Ho, L. S., Chung, Y. W., Chan, H. C(2004). An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nature Cell Biol*; 6: 458-464

Zuhlke C, Thies U, Braulke I, Reis A, Schirren C (1994). Down syndrome and male fertility: PCR-derived fingerprinting, serological and andrological investigations. *Clin Genet*;46(4): 324-326

EK 5

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gözde	Soyadı	GİRGİN
Doğum Yeri	Edremit	Doğum Tarihi	02.01.1985
Uyruğu	T.C	Tel	05542749918
E-mail	gozdegirgin85@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi	
Lisans	Uludağ Üniversitesi	2008
Lise	Beyoğlu Anadolu Lisesi	2003

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	iyi	iyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu ☐								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	67.5							

☐ Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

☐ KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	81.74344	83.19178	72.31534
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar
Ön Değerlendirme Komisyonu

PROJENİN ADI: Azospermik ve Ağır Oligozoospermik Vakalarda Otozomal Resesif Gen Kusurlarının Araştırılması

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Yrd. Doç. Dr. İlter GÜNEY

PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Gözde GİRGİN

ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 23.09.2011 – 1

Sayın Yrd. Doç. Dr. İlter GÜNEY

94 protokol nolu “Azospermik ve Ağır Oligozoospermik Vakalarda Otozomal Resesif Gen Kusurlarının Araştırılması” isimli projeniz Enstitümüzün ön değerlendirme komisyonunda incelenmiş ve araştırmanın Komisyonumuzun ön değerlendirme kriterlerine uygunluğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG
Komisyon Başkanı

Doç. Dr. Ebru IŞIK ALTURFAN
Komisyon Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Bahar GÜRSOY

Prof. Dr. Gül AYANOĞLU DÜLGER

Prof. Dr. Can İKİZLER

Prof. Dr. Refika ERSU

Doç. Dr. Oğuzhan DEYNELİ

Doç. Dr. Asım ÇİNGİ

Yrd. Doç. Dr. Murat ÇEKİN

Yrd. Doç. Dr. Mustafa TAŞDEMİR

Öğr. Gör. Dr. Tolga GÜVEN