

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

NONOBSTRÜKTİF AZOOSPERMİK HASTALARDA GENETİK
NEDENLERİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Bulut DURAL

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İlhan GEÇİT

MALATYA 2021

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

NONOBSTRÜKTİF AZOOSPERMİK HASTALARDA GENETİK
NEDENLERİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Bulut DURAL

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İlhan GEÇİT

MALATYA 2021

Tanıştığımız günden beri her zaman ve her şartta benden desteğini esirgemeyen eşime ithaf edilmiştir.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Erkek Üreme Sistemi Anatomisi.....	5
2.2. Erkek Üreme Sisteminin Embriyolojisi	7
2.3. Erkek Üreme Sisteminin Fizyolojisi ve Spermatogenez.....	9
2.4. İnfertiliteye Neden Olan Genetik Bozukluklar	12
2.4.1. Kromozomal Bozukluklar	13
2.4.2. Tek Gen Mutasyonları.....	18
2.4.3. Gen Polimorfizmi ve Erkek İnfertilitesi	20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
3.1. Anamnez	23
3.2. Fizik Muayene.....	24
3.3. Laboratuvar Tetkikleri	25
3.3.1. Semen Analizi	25
3.4. Hormonal Değerlendirme.....	29
3.5. Görüntüleme Yöntemleri	30
3.5.1. Kriptoorşidizm ve Testis Tümörleri	31

3.6. Karyotip Analizi.....	33
3.7. Moleküler Karyotipleme	34
3.8. Yeni Nesil Dizileme (New Generation Scequesing).....	35
3.8.1. Yeni Nesil Dizileme Reaksiyonunun Hazırlanması	40
4. BULGULAR.....	41
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇLAR.....	55
KAYNAKÇA.....	56



TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim sürecinde klinik ve cerrahi birikim ve deneyimlerini aktararak eğitimimde katkısı bulunan ve bu süreçte benden destek ve hoşgörülerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ali BEYTUR, Prof. Dr. Fatih OĞUZ, Dr. Öğr. Gör. Ahmet ÇAMTOSUN, Dr. Öğr. Gör. Hüseyin ÇELİK, Prof. Dr. Ali GÜNEŞ'e, ve özellikle tez danışmanım Prof. Dr. İlhan GEÇİT'e teşekkür ederim. Bu süreçte iyisiyle kötüsüyle birçok anıyı paylaştığımız beraber çalıştığım bütün asistan arkadaşlarıma, sevgi ve saygısını esirgemeyen bütün hemşire ve personel arkadaşlarıma dostluklarından ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tanıştığımız günden beri her zaman ve şartta bütün desteğiyle yanımda olan eşim Seval DURAL'a, annem Gülhan DURAL'a, babam Aydın DURAL'a ve kardeşlerim Burak ve Damla DURAL'a çok teşekkür ederim.

Dr. Bulut DURAL

ÖZET

Non-obstrüktif Azoospermik Hastalarda Genetik Nedenlerin

Araştırılması

Amaç: İnfertilite dünya genelinde milyonlarca çifti etkileyen bir sağlık sorunudur. Başvuruların yaklaşık yarısından erkek infertilitesi sorumludur. Erkeklerin yaklaşık % 15'inde ve infertilitesi olan kadınların % 10'unda, kromozom anormallikleri ve tek gen mutasyonları dahil olmak üzere genetik anormallikler mevcut olabilir. Sonuç olarak gelecekte kısırlığın genetik nedenlerinin artmaması için genetik faktörlerin belirlenmesi, infertil çiftin uygun yönetimi için iyi bir uygulama haline gelmiştir. Biz, yapılan bu çalışmada infertilite nedeniyle başvuran ve Non-obstrüktif azoospermi tanısıyla testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) operasyonu yapılan hastaların genetik analiz sonuçları değerlendirildi. Bu çalışmada, erkek infertilitesinde spermatogenezi zayıflatan ya da engelleyen genetik defektlerin ortaya çıkması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 26-44 yaş arası non-obstrüktif azospermik infertil hastalarda; periferik kanda kromozom analizi, moleküler karyotipleme, erkek infertilite paneli, testosteron, prolaktin, folliküler stimülan hormon ve lüteinizan hormon düzeylerinin karşılaştırılması ve bu parametrelerle genetik mutasyonların ilişkisinin incelenmesini amaçladık.

Bulgular: Çalışmamızda 26 hastanın 1 tanesinde American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) 'in yayınladığı kriterlere göre patojenik olduğu kabul edilen INSL3 gen mutasyonu, ayrıca klinik önemi belirsiz varyant olarak 17 hastada FSHR gen polimorfizmi, 5 hastada CFTR mutasyonu, 1 hastada CATSPER1 ve TEX101, 1 hastada LHCGR, 1 hastada ZMYND15, 2 hastada DNAH5, 1 hastada DNAH11 değişikliği tespit edilmiştir. Yapılan kromozom analizinde 6 hastada 47XXY klinefelter sendromu izlendi.

Sonuçlar: Çıkan sonuçlar göstermiştir ki infertilite şikayeti ile başvuran non-obstrüktif azoospermik hastaların periferik kandan çalışılan kromozom analizi normal olsa dahi infertiliteye neden olan başka genetik değişiklikler olabilir. Altta yatan bu genetik bozuklukların araştırılması infertilitenin nedenini bulmamızda yardımcı olabilir.

ABSTRACT

Investigation of Genetic Causes in Non-obstructive Azoospermic Patients

Objective: Infertility is a health problem that affects millions of couples around the world. Male infertility is responsible for approximately half of the applications. About 15% of men and 10% of women with infertility may have genetic abnormalities, including chromosomal abnormalities and single gene mutations. As a result, the determination of genetic factors has become a good practice for the appropriate management of the infertile couple so that the genetic causes of infertility do not increase in the future. In this study, genetic analysis results of patients who applied for infertility and underwent testicular sperm extraction (TESE) operation with the diagnosis of Non-obstructive azoospermia were evaluated. In this study, it was aimed to reveal genetic defects that weaken or prevent spermatogenesis in male infertility.

Materials and Methods: In our study, we aimed to compare peripheral blood chromosome analysis, molecular karyotyping, male infertility panel, testosterone, prolactin, follicular stimulating hormone and luteinizing hormone levels in non-obstructive azoospermic infertile patients aged 26-44 years, and to examine the relationship between these parameters and genetic mutations.

Results: In our study, 1 of 26 patients had INSL3 gene mutation, which was considered pathogenic according to the criteria published by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), as well as FSHR gene polymorphism in 17 patients, CFTR mutations in 5 patients, CATSPER1 and TEX101 in 1 patient. , LHCGR in 1 patient, ZMYND15 in 1 patient, DNAH5 in 2 patients, and DNAH11 changes in 1 patient were detected. In the chromosome analysis, 47XXY klinefelter syndrome was observed in 6 patients.

Conclusion: The results show that non-obstructive azoospermic patients with infertility complaints may have other genetic changes that cause infertility, even if the chromosome

analysis of the peripheral blood is normal. Investigating these underlying genetic disorders can help us find the cause of infertility.

Keywords: Azoospermia, Genetic, Non-obstructive

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACMG	: American college of medical genetics and genomics
ACTH	: Adrenal kortikotropik hormon
AR	: Androjen reseptörü
AZF	: Azoospermi faktör
CBAVD	: Konjenital bilateral vaz deferens agenezisi
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici
CIS	: Karsinoma in situ
DAZ	: Deleted in azoospermia
DHT	: Dihidrotestosteron
DHT	: Dihidrotestosteron
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
FSH	: Folliküler stimülan hormon
GH	: Büyüme hormonu
HCG	: Human coryonic gonadotropin
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu
INSL3	: İnsülin benzeri faktör 3
IUI	: İntrauterin inseminasyon
IVF	: İn vitro fertilizasyon
KS	: Klinefelter sendromu
LH	: Luteinizan hormon
MIS	: Müllerian-inhibiting substance
mTESE	: Mikroskopik testiküler sperm ekstraksiyonu

MTHFR	: 5-Metilentetrahidrofolat redüktaz
NOA	: Non-obstrüktif azoospermi
OA	: Obstrüktif azoospermi
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SRY	: Sex-determining region Y
TESE	: Testiküler sperm ekstraksiyonu
TM	: Testiküler mikrolitiazis
TRUS	: Transrektal ultrason
TSH	: Tiroid stimülan hormon
YND	: Yeni nesil dizileme
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Erkek dış ve iç genital organları	5
Şekil 2.2. Testis damarları ve bölümleri	6
Şekil 2.3. Seminifer tübül ve Leydig hücreleri	9
Şekil 2.4. Erkek reproduktif sistemi	10
Şekil 2.5. Spermatogenez evreleri	11
Şekil 2.6. Azospermi faktör (AZF) bölgesi ile Y kromozomu.....	17
Şekil 3.1. Hipotalamo-hipofizer-gonadal aks.	30

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Erkek infertilitesi ile ilişkili ana faktörler	2
Tablo 2.1.İnfertiliteye neden olan genetik bozukluklar	12
Tablo 3.1. Dünya sağlık örgütüne göre patolojik semen parametreleri	28
Tablo 3.2. Semen analizi referans değerleri	28
Tablo 3.3. ACMG kriterlerine göre genetik varyantın patojenite sınıflaması	36
Tablo 3.4. Yeni nesil dizileme yöntemi ile çalışılan 44 adet gen ve görevleri.....	37
Tablo 4.1.Yapılan genetik analizler sonucunda bulunan parametreler.....	42

1. GİRİŞ

Fertilite insan neslinin sürdürülmesi amacıyla tüm tarih boyunca ilgi çekmiş ve eski kaynaklarda yer almış konulardan biridir. Elimizde bulunan en eski kaynaklar milattan önce 16. ve 17. Yüzyıllardan kalma eski mısır belgeleridir. Bunlardan biri olan Kahun papirüsü de eski mısırdaki insan üreme kavramına ait bilgileri içerir (1). Eski Mısırlılar, cinsel ilişki ve hamilelik arasındaki ilişkiyi kabul etmişlerdir. Erkeğin katkısını dişi rahmin verimli toprağına ekilen bir “tohum” olarak görmüşlerdir. Meninin omurilikten kaynaklandığına inanmışlar ve bu yanlış, tanrılara boğa kurban eden Mısırlı rahipler tarafından ileri sürülmüştür. Sığır retraktör penis kaslarının sakral omurlara bağlandığını gördükleri için boğanın fallusunu omurganın bir uzantısı olarak algılamışlardır (1).

İnfertilite, cinsel yönden aktif, doğum kontrolü yapmayan bir çiftin bir yıl içerisinde gebelik sağlayamamasıdır (2). Dünyadaki tüm çiftlerin yaklaşık % 15'ini etkileyen bir halk sağlığı sorunudur (3). Çiftlerin yaklaşık % 15'i 1 yıl içinde hamile kalamamaktadır. İnfertilite ile başvuran çiftlerin % 50'si korunmasız cinsel ilişkinin ikinci yılında ve % 14'ü üçüncü yılda kendiliğinden çocuk sahibi olmaktadır (4).

Son yıllarda, erkek fertilitesinde dünya çapında bir düşüş olması ile ilgili artan bir endişe vardır ve dünyadaki genel infertilitenin % 40-50'sinden erkek faktörünün sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalar, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer batı ülkelerinde sperm sayısının her yıl % 1,5 oranında azaldığını göstermiştir. Dünya çapında yaklaşık 70 milyon çiftin subfertilite veya infertilitenin kurbanı olduğu tahmin edilmektedir (5).

Erkek infertilitesinin etiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır ve vakaların çoğunda idiyopatik kalır. Bu bağlamda çeşitli çevresel, fizyolojik ve genetik faktörler açıklanmıştır (5). Doğurganlığa ulaşmak için bir erkeğin normal spermatogenez, başarılı epididimal olgunlaşma ve sperm depolanması ve uygun zamanlanmış cinsel ilişki ile birlikte normal sperm taşınması ve aksesuar bez fonksiyonuna ihtiyacı vardır.

Tablo 1.1 Erkek infertilitesi ile ilişkili ana faktörleri özetlemektedir (6).(Krausz C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2011;25(2):271-85.)

Konjenital Faktörler
-Anorşi
-Kriptorşidizm
-Konjenital Bilateral Vaz Deferens Yokluğu
-Genetik Anormallikler (Klinefelter sendromu; Y kromozomu mikrolelesyonu; Kallmann sendromu, Hipotalamu-Hipofiz-Gonadal aksı içeren gen mutasyonları)
Kazanılmış Faktörler
-Testis travması
-Testiküler torsiyon
-Post-inflamatuar olaylar (orşit, epididimit)
-Distal ve Proksimal üriner traktta tıkanıklık
-Rekürren üriner enfeksiyonlar (prostatit)
-Ekzojen faktörler (sitotoksik ilaçlar, radyasyon, ısı vs.)
-Sistemik hastalıklar (siroz, böbrek yetmezliği vs.)
-Varikosel (derecesine göre değişir)
-Testis damarlarını yaralayan cerrahi
-Eretil ve ejakülatör disfonksiyon
-Edinilmiş hipogonadotropik hipogonadizm veya endokrin nedenler
-Bilinmeyen nedenler (yaklaşık 50%)

Yakın zamana kadar, sperm üretimi anormallikleri olan erkeklerin % 40'ına varan bir kısmında, belirli bir etiyolojik faktör bulunamamıştır (7). Erkeklerin yaklaşık % 15'inde ve infertilitesi olan kadınların % 10'unda, kromozom anormallikleri ve tek gen mutasyonları dahil olmak üzere genetik anormallikler mevcut olabilir. Bununla birlikte, bazı genetik anormalliklerden etkilenen hastalar (örneğin, kromozomal değişiklikler ve Y kromozom mikrolelesyonları), anöploid oranı daha yüksek bir sperm frekansı üretir (8).

Aşağıdaki ana faktörler infertilitede prognozu etkiler:

-Kadın partnerin yaşı ve doğurganlık durumu

- İnfertilite süresi
- İnfertilitenin primer ya da sekonder olması
- Semen analiz sonucu

Kadın yaşı ve buna bağlı olarak yumurtalık rezervindeki düşüş, hem spontan hem de yardımcı üremede sonucu etkileyen en önemli tek değişkendir. 25 yaşındaki bir kadınla karşılaştırıldığında, doğurganlık potansiyeli 35. yılda % 50'ye, 38. yılda % 25'e ve 40. yılda < % 5'e düşmüştür (2).

Erkek faktörü bulunan vakaların ancak % 50'sinde oligozoospermi, teratozoospermi veya azoospermi gibi anormal semen parametreleri görülür (9). Azoospermi ise erkek kaynaklı infertilitenin en ağır şeklidir ve infertil çiftlerin yaklaşık % 10-20 sinde görülmektedir (10). Obstrüktif azoospermi (OA), epididim veya seminal veya ejakülatuar kanalların bilateral tıkanması nedeniyle semende ve postejakülat idrarda hem spermatozoa hem de spermatogenetik hücrelerin olmamasıdır. Normal boyutta testis ve normal FSH olup azoospermi veya şiddetli oligozoospermi hastalarında seminal yolun tıkanığından şüphelenilmelidir (9). Non-obstrüktif azoospermi (NOA) ise bu yollarda tıkanıklık olmamasına rağmen, semen analizinde hiç sperm saptanmamasıdır. NOA'lı hastaların bir kısmında, testisin heterojen yapıda olmasından dolayı bazı bölümlerinde fokal spermatogenez devam etmekte ve bu bölgelerden testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) veya mikro TESE (mTESE) yöntemleriyle sperm elde edilerek, yardımcı üreme teknikleri (YÜT)'de (in vitro fertilizasyon (IVF), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)) kullanılmakta ve bu hastaların kendi spermleriyle çocuk sahibi olmasına yardımcı olunmaktadır. NOA hastalarında bu yöntemlerle sperm elde etme oranı % 50 civarındadır ve testiküler histoloji ile sperm bulma arasında korelasyon mevcuttur (11, 12).

Yardımcı üreme tekniklerinin yüksek maliyeti TESE ve ovaryan hiperstimülasyon gibi işlemlerin komplikasyonu ile karşılaşmamak için sperm bulunma şansının önceden tespiti önemlidir. İnfertil çiftlerin büyük bir kısmında genetik nedenler tespit edilebilir (7). Sperm anöploidileri, yapısal genetik anormalliğin doğrudan bir sonucudur veya bu testis ortamının değişmesinin neden olduğu mitotik hatalardan kaynaklanır. Bu hataların aktarılma riski aynı zamanda standart in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrauterin inseminasyon (IUI) kullanımıyla da ilgilidir, çünkü normozoospermik kısır erkeklerde bazı genetik bozukluklar olabilir (örneğin 47 XYY erkekler). Yardımcı üreme tekniklerinin kullanımının artması normal gebelik ile

mutasyonları aktaramayacak bireylerin çocuk sahibi olarak bu mutasyonları sonraki nesillere aktarmasının önünü açmıştır. İşte bu yüzden infertil çiftlerin genetik nedenlerinin araştırılması bu faktörlerin belirlenmesi sonraki nesillerde oluşacak genetik nedenli infertilitenin artmaması için çok önemlidir (8). Bu genetik analizler seks kromozom anomalileri (Klinefelter sendromu (KS), XYY sendromu, XX erkek sendromu, Karışık gonadal disgenezi, Y kromozomu mikrolelesyonu, diğer Y kromozomu yapısal anormallikleri, cinsiyet kromozomları arasında resiprokal translokasyon), otozomal kromozomlardaki anomaliler (resiprokal translokasyonlar, robertsonian translokasyonlar, kromozomal segmental inversiyonu, diğer otozomal kromozom anomalileri) ve üreme hücrelerindeki genetik anormallikleri içeren testlerden oluşmaktadır. Yeni Nesil Dizileme (YND) yöntemi kullanılarak daha detaylı genetik analizler yapılmaya başlanmış ve infertiliteyle ilişkili olabilecek yeni genler gündeme gelmiştir.

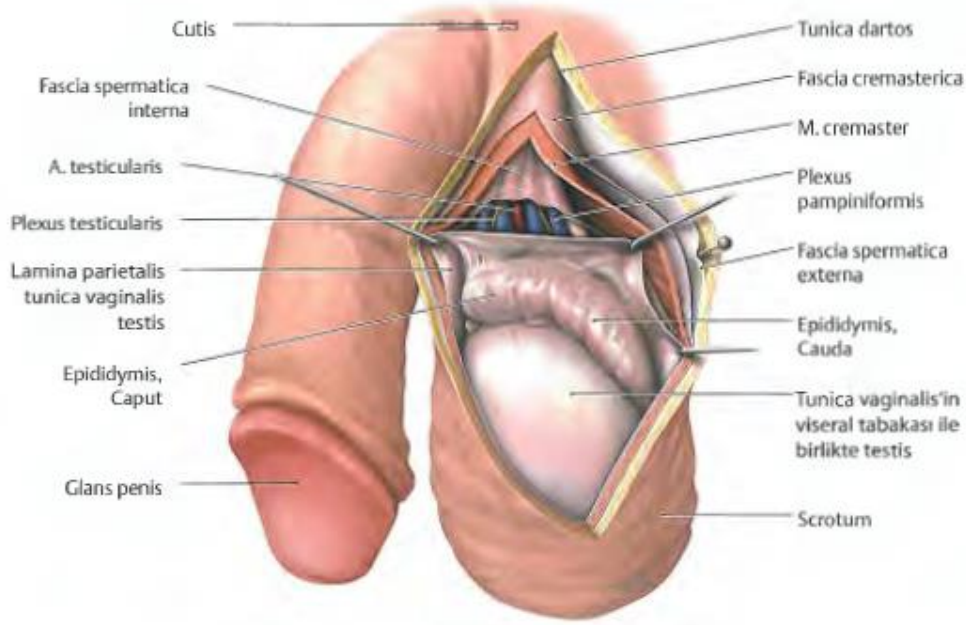
2009 yılında kullanılmaya başlanan YND yöntemi ile insan genomu üzerinde protein kodlayan bölgelerdeki mutasyonlar taranarak hastalıkların genetik alt yapıları ortaya konulmaya çalışılmaktadır. Mevcut teknoloji ile hastalıklara hızlı ve güvenilir bir şekilde tanı konulabilmektedir. Bu yöntem keşfedildiği günden bu yana hem sebebi bilinmeyen hastalıkların genetik alt yapısını ortaya çıkarmada, hem de birden fazla gene ve tipe sahip hastalıkların moleküler tanısının konulmasında oldukça etkili olduğu görülmüştür.

Biz, yapacağımız bu çalışmada infertilite nedeniyle başvuran ve NOA tanısıyla mikro-TESE operasyonu yapılan hastaların genetik analiz sonuçlarının değerlendirilmesini amaçladık. Çalışmadaki ana amacımız, erkek infertilitesinde spermatogenez sürecini aksatan veya engelleyen genetik defektlerin ortaya çıkmasını sağlamak olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Erkek Üreme Sistemi Anatomisi

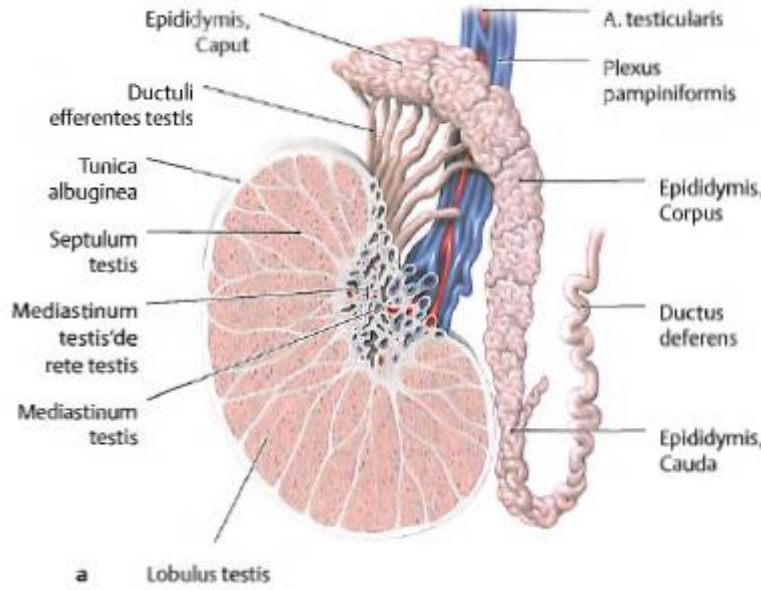
Erkek üreme sistemi yapıları kendi içerisinde iç ve dış üreme organları olmak üzere ikiye ayrılır. Penis ve skrotum dış üreme yapıları, testis, epididim, spermatik kord, seminal veziküller, ejakülatuar kanallar, prostat ve bulboüretral (Cowper) bezler ise iç üreme yapıları olarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 2.1 (Schünke M, Schulte E, Schumacher U. PROMETHEUS Anatomi Atlası 2005.)

Skrotum, testis ile spermatik kordun alt kısmının bulunduğu, deri, kas ve fasyaların oluşturduğu bir yapıdır. Skrotumun dışardan bakınca ikiye ayrılmış gibi görünmesini sağlayan cilt kabarıntısına raphe skrotum adı verilir. Sol spermatik kordun sağa göre daha uzun olmasından dolayı skrotumun sol yarımı sağa göre daha aşağıda bulunmaktadır. Skrotumun dıştan içeri doğru tabakaları, deri (kutis skroti), tunika

dartos, fasya spermatika eksterna, fasya kremasterika ve bu fasyanın sardığı musculus kremasterika, fasya spermatika interna ve tunika vajinalisden oluşur. Skrotum içerisinde spermatik korda bağlı şekilde bulunan testisler, 10-15 gr. Ağırlığında ve 4x2,5x3 cm ebatlarındadır. İçerisinde bulunan leydig hücreleri testosteron üretimi yaparken, sertoli hücreleri ise spermin beslenmesini sağlama, inhibin hormonu salgılama ve fagositoz yapma gibi görevleri gerçekleştirir. Aynı zamanda sertoli hücreleri kan-testis bariyerini oluştururken leydig hücreleri interstisyumda bulunur. Skrotumu oluşturan düz kas liflerinin bulunduğu tabaka olan tunika dartos, kasılarak skrotumun büzüşmesini sağlar. Skrotumun büzüşmesi ile testislerin sıcaklığı optimum seviyede tutularak spermatogenezisin normal gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Testislerin bulunduğu sıcaklık normal vücut ısısından 2-3 °C daha soğuktur. Bu sıcaklık farkı skrotumda bulunan tunika dartos vasıtası ile sağlanmaktadır. Testisleri dışardan içeri doğru saran tunica vajinalis haricinde tunika albuginea ve tunica vaskülaris olmak üzere iki tabaka daha bulunmaktadır (13).



Şekil 2.2 (Schünke M, Schulte E, Schumacher U. PROMETHEUS Anatomi Atlası2005.)

Testisi saran tunika albuginea kalın ve fibröz bir tabakadır. Bu tabakanın elastikiyeti ve genişleme özelliği olmayıp arka taraftan testis içine sokularak testis

içerisinde küçük bölümler meydana getirir. Bu bölmelere mediastinum testis denilir. Bunlardan çıkan uzantıları olan septula testisler ve onların oluşturduğu koni biçiminde lobuli testisler içinde seminifer tübüller yer almaktadır. Her iki testiste 800-1000 kadar seminifer tübüller bulunur. Seminifer tübüller içerisinde sperm üretimi gerçekleştirilir. Her bir lobül içerisinde yaklaşık 200-300 tane seminifer tübül bulunmaktadır. Seminifer tübüllerin her biri 8 cm civarında bir boya sahiptir ve lobül içerisinde kıvrılarak yayılmıştır. Her bir Seminifer tübül birleşerek rete testisleri oluşturur. Oluşan rete testisler duktuli efferentes olarak epididim baş kısmına girip epididim lobüllerini meydana getirirler. Epididim lobülleri 15-20 cm boyutta olup kıvrımlı tek bir tubulustur. Bu tubuluslar birleşip epididim kanalı adını alırlar. Epididim kanalı altı metre boyunda olup bu kanaldan kuyruğa doğru ilerledikçe çapı ve kalınlığı artarak duktus deferensi oluşturur. Duktus deferens prostata girmeden önce ampulla denen bir genişleme meydana getirir. Bu ampullaya prostatın her iki tarafında yer alan seminal veziküller açılırlar ve hem ampullanın hem de seminal vezikülün içerikleri ortak bir ejakülatör kanalla prostat gövdesinden geçerek, prostatik üretraya drene olur. Ejakülatın %46-80 inin kaynağı seminal vezikül içeriğidir. Ejakülatör kanala ayrıca prostat bezinden çıkan prostat kanalcıkları da boşalırlar. Bu içerik vücut dışına üretra ile bağlanır.

Diğer dış genital organ olan penis bir çift kavernöz cisim ve bir adet spongioz cisimden meydana gelir. Dıştan içe doğru deri, süperfisiyal fasya (dartos), derin (buck) fasya ve tunika albuginea penisi saran tabakalardır. Pubisin penil hilum bölgesinde birleşerek penis shaftını oluşturan korpus kavernozumlar proksimalde iskiopubik ramusun altında ayırık olarak bulunurlar. Fibröz bir iskelete sahip olan korpus kavernozumlar çeperi endotel ile kaplı birbiri ile bağlantılı sinüslerden meydana gelir. Penisin ventralinde korpus spongiozum bulunmaktadır. Korpus spongiozum penisin bulbusundan sonra, distale doğru incelik ve sonunda genişleyip şapka şeklini alarak glans penisi oluşturur (13).

2.2. Erkek Üreme Sisteminin Embriyolojisi

Embriyoda ilk cinsiyete özgü değişiklikler 7. Haftada oluşmaktadır. Embriyonun erkek yönde gelişimi için Y kromozomunun kısa kolunda (SRY bölgesi; Y kromozomunun cinsiyet belirleyen bölgesi) bulunan genler başrolü oluşturmaktadır. Eğer embriyo XX kromozoma sahip ise 7. haftada henüz farklılaşmamış gonadın korteksi

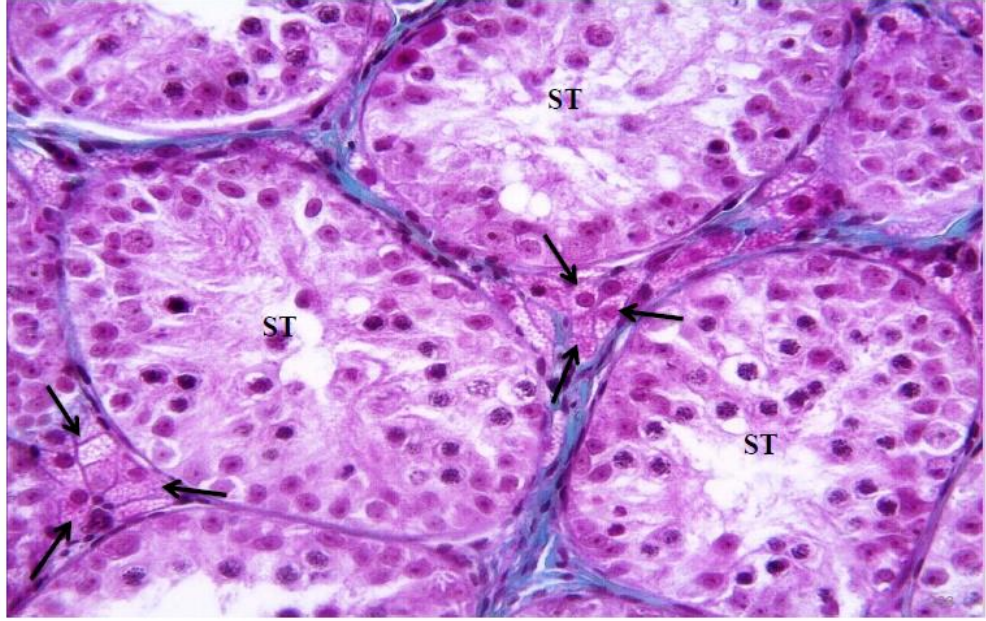
overe farklılaşıp medullasında gerileme gözlenir. Embriyo XY kromozoma sahip ise gonadın medullası testise farklılaşarak korteksinde gerileme oluşur (14).

Farklılaşmamış gonadda bulunan seks kord stromal hücreleri sadece SRY varlığında sertoli hücrelerine dönüşerek işlevini gerçekleştirmeye başlar. Eğer embriyo dişi yönde farklılaşacaksa seks kord stromal hücreleri SRY yokluğunda ovaryan folikülleri meydana getirirler. Farklılaşan sertoli hücreleri Müllerian-inhibiting faktör (MIF) adı verilen glikoprotein yapıda bir hormon salgırlar. Bu hormon sayesinde Mülleryen kanallar inhibe edilir. Regrese olan mülleryen kanaldan geriye apendiks testis ve prostatik utrikül kalır. MIF'in salgılanmadığı dişi embriyoda mülleryen kanallar regrese olmaz ve bunlardan uterus, fallop tüpleri ve vajen 2/3 proksimal kısmı meydana gelir (15).

Erkek embriyoda testis belirleyici faktör varlığında seminifer tübüller farklılaşmaktadır. Oluşan bu seminifer tübüllerin duvarında sertoli hücreleri ve spermatogonia bulunur ve etrafını ise leydig hücreleri çevreler. 8. haftada leydig hücrelerinden testosteron salınır. Bu testosteronun üretimi intrauterin dönemin erken aşamalarında plasental koryonik gonadotropin etkisinde iken sonraki dönemlerde pituiter gonadotropinlerin baskısı ile oluşur (16).

Dış genitalerin farklılaşması yedinci haftadan sonra başlamakta ve bu farklılaşma androjen reseptörlerinin uyarımının olup olmamasının etkisindedir. Erkek embriyoda bu farklılaşmayı başlatan androjen reseptörleri ile etki eden dihidrotestosteron (DHT) hormonu olup eksternal genitalerde maskülinizasyonu gerçekleştirir (17).

Farklılaşma fallusun uzayarak penis oluşması ve yedinci haftada penis gövdesinin içerisinde kavernoza cisimlerin görülmesi ile devam eder. Devam eden uyarım ile 14. haftada üretra ve spongioz cisimler oluşur. Spongioz cismin oluşması sonucu distal kısımdaki dairesel koronal sulkus gelişerek glans penis meydana gelir. Uzayan üretranın glansa doğru yürümesi ile glandüler üretra oluşarak penil üretranın distal ucu ile birleşim gösterir. Glans penis oluşumu glans tabanındaki deri kıvrımının glansı sararak prepisyumu oluşturmaları ile 5. aya kadar devam eder. Labioskrotal şişlikler birleşerek skrotumu meydana getirir (17, 18).

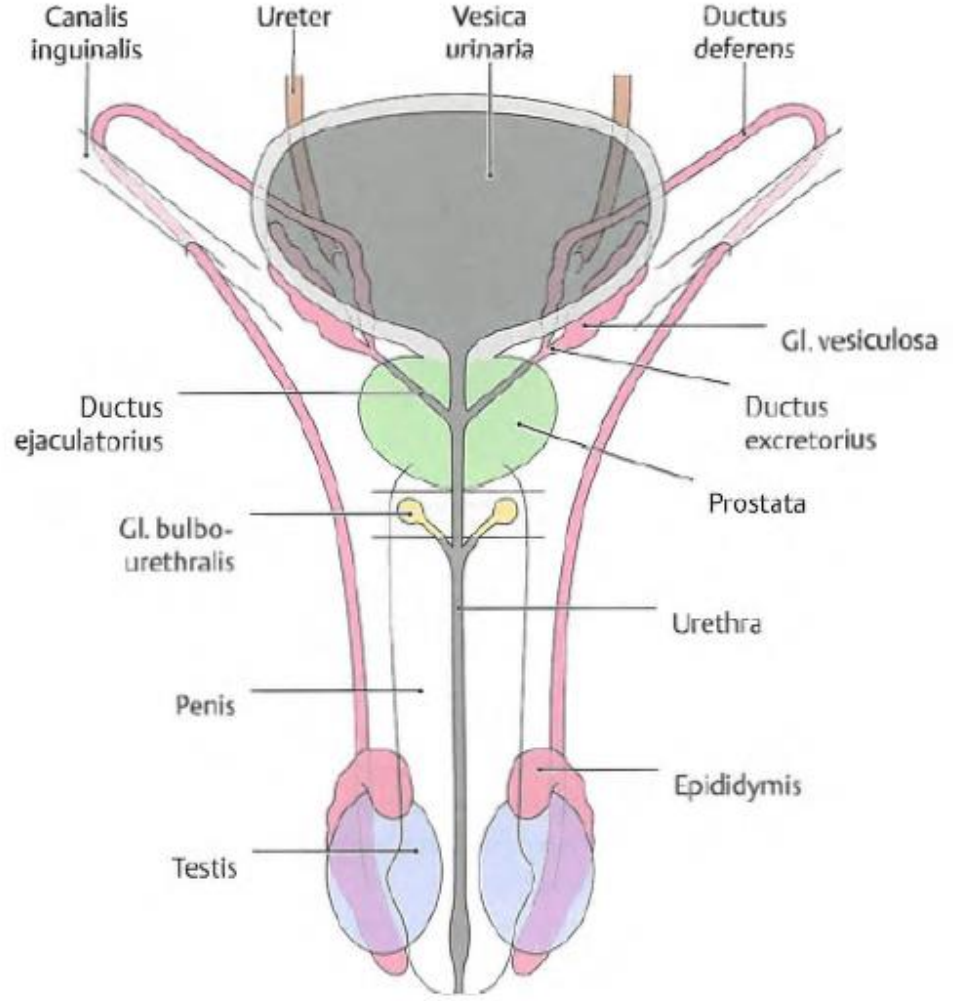


Şekil 2.3 Seminifer tübül (st) leydig hücreleri (oklar) İnönü üniversitesi histoloji ve embriyoloji anabilim dalı histoloji atlası

2.3 Erkek Üreme Sisteminin Fizyolojisi ve Spermatogenez

Spermatogenezis, seksüel eylemin gerçekleştirilmesi ve çeşitli hormonlarla erkek üreme sisteminin düzenlenmesi erkek üreme fonksiyonları için hayati öneme sahiptir. Aşağıdaki şekil erkek üreme sisteminin bölümlerini göstermektedir. Spermatogenez seminifer tübülde gerçekleştikten sonra rete testisler aracılığıyla yaklaşık 6 metre uzunluğunda olan epididime gelir. Epididim kanalı altı metre boyunda olup bu kanaldan kuyruğa doğru ilerledikçe çapı ve kalınlığı artarak duktus deferensi oluşturur. Duktus deferens prostata girmeden önce ampulla denen bir genişleme meydana getirir. Seminal veziküllerin içeriği bu ampullaya açılır. Ampullada bulunan epididimden gelen içerik ve seminal vezikül sıvısı, prostat bezinin içerisinden geçen bir ejakülatuar kanaldan geçerek internal üretraya boşalır (19).

Erkek üretrası boyunca uzanan çok sayıda üretral bez ve üretranın başlangıcında yerleşen bilateral bulboüretral bez (cowper bezi) üretral mukusu salgılar (20).



Şekil 2.4 (13) (Schünke M, Schulte E, Schumacher U. PROMETHEUS Anatomi Atlası 2005.)

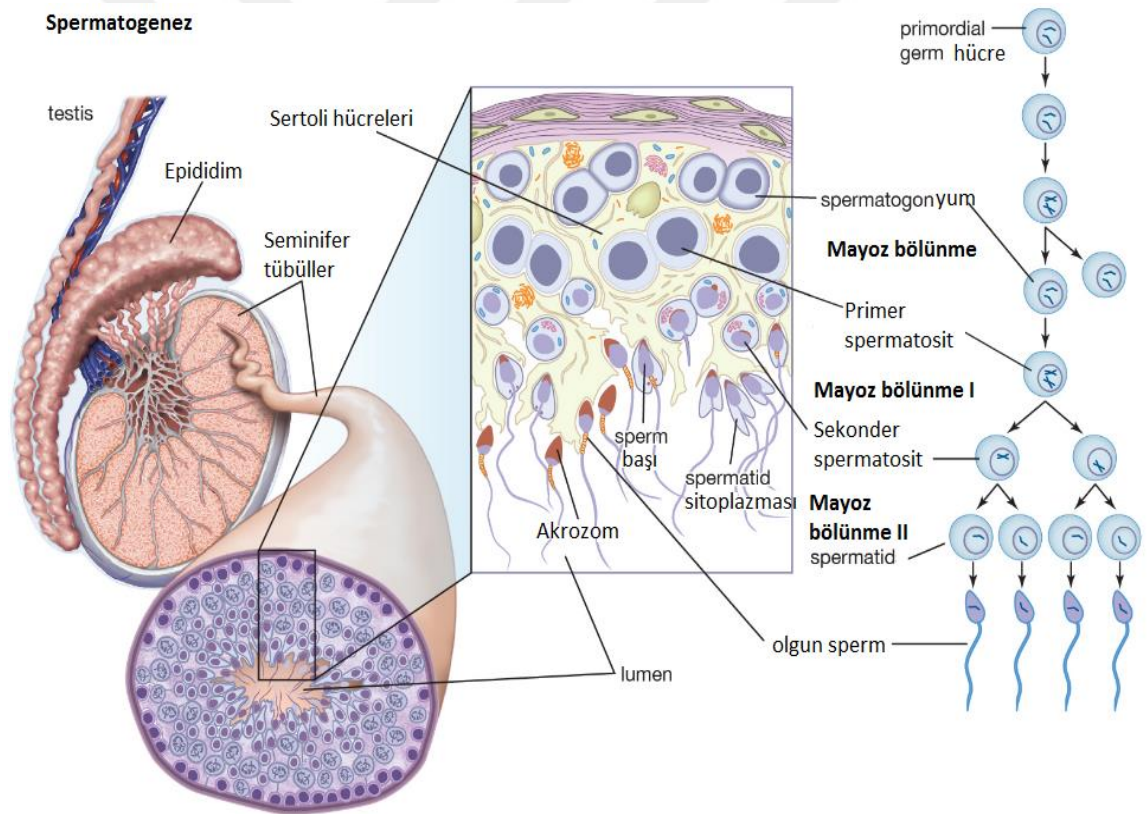
Spermatogonya olarak adlandırılan immatür germ hücreleri Embriyo oluşumu sırasında, primordiyal germ hücreler olarak testislere göç eder ve seminifer tübüllerin iç yüzeylerinin tabakalarında uzanırlar. Bu immatür germ hücreleri, puberteden itibaren mitoz bölünmelere başlar ve spermi oluşturmak üzere devamlı büyür ve farklı şekillere evrilir.

Puberte döneminde 13 yaş civarında, ön hipofiz hormonlarının etkisiyle spermatogenez seminifer tübüllerde başlar, yaşla birlikte azalarak hayat boyu devam eder. Spermatogonya, seminifer tübülün merkez lümenine doğru sertoli hücreleri

boyunca göç ederek spermatogenezin ilk basamağını gerçekleştirmek için harekete geçer (21).

Primer spermatositleri oluşturmak üzere sertoli hücre bariyerini geçen spermatogonya, progresif motilite kazanır. Oluşan primer spermatositler, sırayla sekonder spermatositleri oluşturmak üzere mayoz bölünme geçirirler. Sekonder spermatositler birkaç gün sonra, spermatozoaya (sperm) dönüşecek spermatidleri oluşturmak üzere bölünürler.

Primer spermatosit evresinden spermatid evresine değişim sürecinde, spermatositlerin 46 kromozomu bölünür ve 23 kromozomlu spermatidler oluşur. Bölünme sonucunda ayrılan genler ile fetüsün genetik özelliklerinin yarısı babadan diğer yarısı anne kaynaklı oositten meydana gelir. Spermatogenezin toplam süresi, ortalama 64 gün kadardır (22).



Şekil 2.5 Spermatogenez evreleri (Encyclopædia Britannica, Spermatogenesis, May 27, 2020)

2.4 İnfertiliteye Neden Olan Genetik Bozukluklar

İnfertilite, Batı ülkelerinde gebe kalmaya çalışan çiftlerin yaklaşık% 15'ini etkiler. İnfertil erkeklerin yaklaşık %7'sinde, yapısal veya sayısal kromozom anomalisi mevcut olup, karyotip anomalisi insidansı, sperm konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Karyotip anomalisinin azoospermide prevalansı %10 ila %15 iken, oligozoospermide %5, normal sperm sayıları olan hastalarda ise, %1'den azdır (23).

Tablo 2.1 (24) (Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore medical journal. 2009;50(4):336-47.)

A. Kromozomal bozukluklar a. Sayısal kromozom bozuklukları -Klinefelter sendromu (47 XXY) -46 XX Erkek sendromu -47 XYY Sendromu -Trizomi 21 Down sendromu b. Yapısal kromozom bozuklukları - Y kromozomu mikrolelesyonu - Resiprokal translokasyonlar - Robertsonian translokasyonları - Seks kromozomu translokasyonları - Delesyonlar
B. Tek gen defektine bağılı gelişen ve sperm fonksiyonlarını direkt etkileyen genetik sendromlar a. Kistik fibrozis gen mutasyonları b. Kartegener sendromu c. Androjen duyarsızlık sendromu d. Kallman sendromu
C. Polimorfizmler

2.4.1 Kromozomal Bozukluklar

Normal insan somatik hücreleri 22 çift otozom ve 1 çift seks kromozomu olmak üzere total 46 kromozomlu diploid hücrelerdir. Erkekler X ve Y olmak üzere 2 farklı seks kromozomuna sahiptir. Kromozom anomalileri, sayısal ve yapısal anomaliler olmak üzere ikiye ayrılır. Toplam 9766 kısır erkek dahil olmak üzere 11 yayından toplanan verilerin toplandığı bir ankette, kromozom anormalliklerinin görülme sıklığı % 5,8 olarak bulundu. Bunlar arasında seks kromozom anormallikleri % 4,2 ve otozomal anormallikler % 1,5 olarak hesaplandı. Karşılaştırıldığında, toplam 94465 yeni doğan erkek bebeği kapsayan üç seriden havuzlanmış verilerdeki anormallik insidansı sadece % 0,38 idi; bunların 131'i (% 0,14) cinsiyet kromozomu anormalliği ve 232'si (% 0,25) otozomal anormalliklerdi (25). Kromozom anormalliği görülme sıklığı azospermik erkeklerde yaklaşık % 15'e yükselmekte olup, büyük ölçüde 47 XXY anöploidisi olan hastalar katkıda bulunmaktadır. Cinsiyet kromozom anormallikleri baskındır, ancak çok çeşitli yapısal otozomal anomaliler de bulunur. Yapısal kromozom anomalileri delesyon, inversiyon, duplikasyon ve translokasyonlardır. ICSI yoluyla gebe kalan gebeliklerle ilgili ilk sonuçlar, cinsiyet kromozom anomalilerinin doğal olarak meydana gelen gebeliklere göre daha sık olabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak, ICSI tarafından gebe kalan kadınların çocuklarının anormal karyotip riski artmıştır. Veriler hala tartışmalı olsa da, yaklaşık % 3'lük bir rakam tahmin edilmektedir, bunların yarısı kromozom olarak anormal bir baba tarafından iletilmektedir (8). Bu nedenle periferik kan karyotip analizi, azospermi ve şiddetli oligozoospermili deneklerin tanısı sırasında şiddetle tavsiye edilir. Herhangi bir yardımcı üreme tekniği prosedüründen (intrauterin semen enjeksiyonu dahil) önce, ayrıca sperm parametrelerinin normal sınırlar içinde olduğu veya çok az anormal olduğu durumlarda da sitogenetik tarama zorunludur. Aslında, bazı karyotip anomalileri (örneğin 47 XYY, bazı translokasyonlar ve diğer yapısal anormallikler), görünür bir normozoospermi ile ilişkili erkek kısırlığına neden olabilir (8). Karyotip anormallik riski, spermatojenik bozukluğun şiddeti ile artar. Mililitre başına <10 milyon spermatozoa olan hastalar, genel popülasyonla karşılaştırıldığında, otozomal yapısal anormallikler bakımından 10 kat daha yüksek insidansa (% 4) sahiptir. Primer testis yetmezliği olan erkekler en yüksek risk altındadır (26). Mililitrede <10 milyon spermatozoaya sahip veya azospermik veya oligospermik erkeklerde karyotip analizi yapılması gereklidir (27).

2.4.1.1 Klinefelter sendromu (47 XXY)

Klinefelter sendromu, erkeklerde en sık görülen sex kromozomu anormalliğidir. Canlı erkek doğumlarında 1/500 ve 1/1000 oranlarında görüldüğü tespit edilmiştir. Bu anormalliğe sahip erkeklerde fazladan X kromozomunun olması spermatogenez ve androjen yetersizliğine neden olmaktadır. Bu hastaların fenotipi, çok farklı şekillerde karşımıza çıkmaktadır. Normal olarak virilize olmuş bir erkekten, kadınsal saç dağılımı, yetersiz vücut kılı ve geç epifiz kapanması nedeniyle uzun kollar ve bacaklar dahil olmak üzere androjen eksikliği bulgularına kadar değişebilen çeşitlilik görülebilir (28, 29). Bu sendrom ilk kez Klinefelter tarafından 1942 yılında jinekomasti, hipergonadotropik hipogonadizm ve infertilite triadı olarak tarif edilmiş olsa da günümüzde bunların dışında çok geniş belirtiler ile karşılaşılmaktadır (29). Bununla birlikte, Klinefelter sendromlu tüm erkeklerin küçük sert testisleri vardır ve Leydig hücre işlevi genellikle bozuktur. Testosteron seviyeleri normal veya düşük olabilir, östradiol seviyeleri normal veya yüksek olabilir ve FSH seviyeleri yüksektir. Puberteden sonra bu hastalara genellikle androjen replasmanı ihtiyacı olur. Spermatogenez sıklıkla bozulur genellikle azoospermi mevcuttur. Ağırlıklı olarak testis içerisindeki patolojik bozukluk germinal aplazi ile birlikte tübüler sklerozis olmasına rağmen testis içerisinde sperm üretebilen bölgeler bulunabilir. Bununla birlikte, TESE ve özellikle mikrocerrahi TESE, ortalama % 30-50 testiküler sperm bulma oranı sağlar ve Klinefelter hastalarının ICSI yoluyla kendi genetik çocuklarını oluşturmaları sağlanabilir (30). Önceleri ileri düzeyde kognitif ve davranışsal bozuklukların KS ile birlikteliği belirtilmişse de yeni çalışmalar sadece orta düzeyde kognitif ve konuşma bozuklukları aynı zamanda ince motor gelişiminde gerilik olduğunu göstermiştir (31). Hipogonadizm nedeniyle metabolik sendroma eğilimleri yüksektir bu nedenle hiperlipidemi, diyabet, ve kardiovasküler hastalıklara eğilim mevcuttur. Ayrıca bu hastaların diyabet ve kardiovasküler komplikasyonlardan ölüm riski yüksektir (32). Son incelemelere göre, babaları Klinefelter olan çocuklar sağlıklıdır ve şu ana kadar sadece bir 47 XXY fetüsü bildirilmiştir (28).

2.4.1.2 Diğer seks kromozomu anöploidleri

Karyotip 47 XYY, cinsiyet kromozomlarının en sık ikinci tam anöploidisidir. XYY erkeklerin spermatozoa üzerinde floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile gerçekleştirilen çalışmaların çoğu, cinsiyet kromozom anormalliklerinin orta derecede arttığını göstermiştir. Bununla birlikte, 47 XYY erkeğinin soyunda anöploidi riskinin

arttığına dair hiçbir kanıt bulunamamıştır. 46 XX kromozomal anormalliği esas olarak azospermik erkeklerde %0,9 sıklıkta görülür (33). Fenotip olarak Klinefelter sendromuna benzer, ancak normal boy ve bozulmamış zeka mevcuttur. İki gruba ayrılır. SRY geni vakaların çoğunda mevcuttur (SRY + XX erkekler); SRY + XX erkekler her zaman kısırdır ve azospermi, testiküler atrofiye kaynaklanır. Diğer kategori, SRY – XX erkeklerdir. Bunlarda cinsiyet belirleme kademesinde rol alan SRY'nin olması gereken yerde bir mutasyon vardır (34).

2.4.1.3 Sex kromozomu translokasyonları

X-otozomal translokasyonların fenotip veya doğurganlık etkileri, cinsiyet taşıyıcısına, kırılma noktalarının kısımlarına ve X inaktivasyon modeline bağlı olarak değişir. Genellikle dişi taşıyıcılar, gonadal disgenez meydana gelebilse bile fertil kalır. Erkeklerde genellikle azospermi mevcuttur (35).

Y-otozomal translokasyonların sıklığı 2000 de 1 olarak bildirilmiştir (36). Y kromozomundaki kırılma noktaları, q kolunda q11 bandında meydana gelmektedir. Vogd ve ark. yaptıkları çalışmada, fertil erkeklerde Y kromozomunun kırılma noktası Yq12'de (heterokromatik bölge) ve kısır erkeklerde kırılma noktasının, azospermik faktörde (AZF) distal Yq11 ökromatik bölgede olduğu varsayılır (34).

2.4.1.4 Robertsonian translokasyonları

Robertsonian translokasyonları insanlarda en sık görülen yapısal kromozomal anormalliklerdir ve erkeklerde çeşitli derecelerde sperm değişiklikleri ile doğurganlığı etkileyebilir. Robertsonian translokasyonları, iki akrosantrik kromozomun birbirine kaynaşmasıyla oluşur. Ortaya çıkan tek anormal kromozom, genellikle disentriktir ve orijinal kromozomun ikisinin uzun kollarının çoğunu ve ardından kısa kollarının kaybını içerir. Dengeli translokasyon taşıyıcıları sadece 45 kromozoma sahiptir. Robertsonian translokasyon insidansı 1000 yenidoğanda ~1'dir (37). En yaygın kombinasyonlar, 13. ve 14. kromozomlar arasında ve 14. ve 21. kromozomlar arasındadır. Robertsonian translokasyon taşıyıcıları genellikle normal fenotiplere sahiptir. Ancak translokasyon, muhtemelen bozulmuş gametogenez ve/veya ebeveyn yeniden düzenlemesinin dengesiz bir kombinasyonu ile gamet üretimi nedeniyle doğurganlığı ve/veya gebelik sonucunu etkileyebilir. Robertsonian translokasyon erkek taşıyıcılarındaki doğurganlık sorunları, miyotik sürecin bozulmasıyla doğrudan ilişkili

çeşitli derecelerde spermatojenik kusurlardan kaynaklanmaktadır. İnfertil erkek popülasyonlarında % 0,8 robertsonian translokasyonun taşıyıcılarıydı ve bu genel popülasyondan dokuz kat daha yüksektir (38).

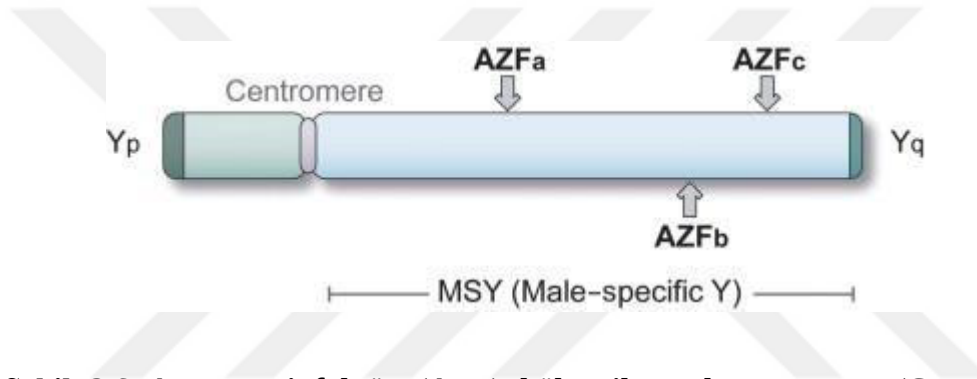
2.4.1.5 Resiprokal translokasyonlar

Karşılıklı translokasyonlar 0,9/1000 yenidoğan sıklığında bulunur. Bir translokasyon, iki kromozom arasında karşılıklı bir kromozomal segment değişiminden oluşur. Genel olarak, taşıyıcının fenotipinde belirgin bir değişiklik yoktur (35). Tekrarlayan gebelik kayıpları yaşayan çiftlerde kromozomal translokasyon insidansı, yenidoğan serilerinde mevcut olan insidansa göre daha yüksektir (38). Öte yandan, translokasyonların varlığının spermatojenik süreci değiştirdiğini gösteren kanıtlar da vardır. İnfertil, oligozoospermik ve azoospermik erkeklerde yapılan farklı çalışmalar serisinin bulgularını özetleyen resiprokal translokasyon taşıyıcılarının insidansı, yenidoğan serilerindekinden yedi kat daha yüksektir (35). Genel bir kural olarak, karşılıklı translokasyon taşıyıcıları, normal veya dengeli spermden daha fazla dengesiz sperm üretir. Dengesiz formların oranı yeniden yapılanmanın özelliklerine bağlıdır ve büyük ölçüde değişir (% 23'ten % 81'e). Bu nedenle, yeterli genetik danışmanlığı sağlamak için yeterli bilgi elde etmek amacıyla her bir özel translokasyon için ayrıntılı bir mayotik analiz gerçekleştirmek önemlidir (35).

2.4.1.6 Y kromozom mikrolelesyonları

Y kromozomunun normal moleküler yapıda olması sperm üretimi açısından kritik önem taşımaktadır. Y kromozomu bir akrosentrik kromozomdur ve kısa kol (Yp) ve uzun koldan (Yq) oluşur (39). 1976' daki bir dizi çalışma, Y kromozomundaki (Yq) mikrolelesyonların, obstrüktif olmayan azoospermi ve şiddetli oligozoospermide % 10-15'lik bir prevalansla gözlenen, şiddetli kısırlığın en sık moleküler genetik nedenini temsil ettiğini doğrulamıştır (40). Y kromozomunda iki önemli bölge bulunur, ökromatik bölge Yp, sentromer ve Yq' nun proksimal parçasını içerir. Heterokromatik bölge distal Yq' dan oluşur. Distal Yq' nun transkripsiyonel fonksiyonu yoktur ancak ökromatik bölge normal spermatogenezin oluşması için kritik önem taşıyan genetik lokuslara sahiptir. Seks belirleyici faktör (SRY) Yp üzerinde lokalizedir, embriyonik evrede gonadların testis yönünde gelişmesinde rol oynayan dönüşümü başlatır. Y kromozomu üzerindeki kritik bölgelerdeki delesyonlar veya mutasyonlar

spermatogenezin kesintiye uğramasına neden olabilir. İnfertil erkeklerde yapılan ilk çalışmalar Yq üzerinde azospermi faktör (AZF) olarak adlandırılan bir bölgenin normal spermatogenez üzerinde çok önemli etkisi olduğunu göstermiştir (41). "Azospermi faktörleri" olarak adlandırılan üç bölge (proksimalden distale AZFa, b ve c) spermatogenez lokusları olarak tanımlanmıştır (42). İnsan Y kromozomunun (Yq) uzun kolu, spermatogenezde yer alan birkaç geni ve spermatojenik başarısızlıkla sıkı bir şekilde ilişkilendirilen AZF delesyonları adı verilen çeşitli tekrarlayan Yq delesyonlarını barındırır. AZF delesyonları AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerine bölünür, azospermi ve şiddetli oligozoosperminin en sık moleküler genetik nedenini temsil eder (42).



Şekil 2.6 Azospermi faktör (AZF) bölge ile Y kromozomu. (Campbell-Walsh Urology, 10. Baskı, Bölüm 7, Kısım 21, syf: 641, 2011)

AZF delesyonlarının klinik görünümü:

-Klasik AZF delesyonları asla normozoospermik erkeklerde bulunmaz ve bu nedenle spermatojenik başarısızlıkla net bir neden-sonuç ilişkisine sahiptir.

-En yüksek sıklık azospermili erkeklerde (% 8-12) bulunur ve bunu oligozoospermi olanlarda (% 3-7) izler.

-Sperm konsantrasyonu 5 milyon / ml'den fazla olanlarda delesyonlar oldukça nadirdir(yaklaşık % 0.7) .

-En sık delesyona uğrayan bölge AZFc'dir (% 65-70), ardından AZFb ve AZFb + c veya AZFa + b + c bölgelerinin delesyonu (% 25-30), AZFa bölgesinin delesyonu ise oldukça nadirdir (% 5).

-AZFa ve AZFb bölgelerinin tamamen çıkarılması, sırasıyla ağır testiküler fenotip, Sertoli cell-only sendromu ve spermatojenik arrest ile ilişkilidir.

-AZFc bölgesinin tamamen çıkarılması, azospermiden oligozoospermiye kadar değişebilen değişken bir fenotipe neden olur.

Yeni yayımlanan özgüllük ve genotip / fenotip korelasyonu ile Y delesyon analizinin testiküler sperm elde etmek için hem tanısal hem de prognostik bir değere sahip olduğu bulunmuştur (43). Yq mikrolelesyon taraması, mililitre başına <5 milyon spermatozoa olan tüm infertil hastalarda endikedir. Testis veya ejakülatta spermatozoa varlığı ile uyumlu Y delesyonları zorunlu olarak erkek çocuğa iletilir; bu nedenle genetik danışmanlık zorunludur. Erkek yavrularda spermatojenik yetmezliğin boyutu büyük ölçüde değişebilir; ancak, AZF delesyonları ile bozulmuş spermatogenez arasındaki kesin neden-sonuç ilişkisi göz önüne alındığında, normal spermatogenez beklenemez (43). AZFa bölgesinde bulunan DDX3Y (aynı zamanda DBY olarak da adlandırılan) ve USP9Y genlerinin normal spermatogenez için önemli olduğu tespit edilmiştir. AZFa mikrolelesyonlarında testis histolojisinde germ hücre aplazisi olduğu görüldüğünden ve şu ana kadar var olan literatür bilgisine göre sperm bulma şansının çok düşük olmasından dolayı testisten sperm elde etme operasyonları önerilmemektedir (44). AZFc bölgesi, primer olarak spermatogoniada bulunan bir RNA bağlayıcı proteini kodlayan 'Deleted in Azoospermia' (DAZ) geninin bulunduğu yerdir (45). İzole AZFc mikrolelesyonları azospermik erkeklerin % 50'sinin üzerinde testisten sperm elde edilmesi nedeniyle daha iyi prognoza sahiptir (46).

2.4.2 Tek Gen Mutasyonları

2.4.2.1 Kistik fibrozis mutasyonları ve erkek infertilitesi

Kistik fibrozis, otozomal resesif bir hastalıktır ve beyazların en yaygın genetik hastalığıdır. Bu hastalığa sahip olan erkeklerde konjenital bilateral vaz deferens agenezisi (CBAVD) mevcut olup azospermi yapması nedeniyle infertiliteye sebebiyet verir. Sadece CBAVD ile bulgu veren hastalar hafif bir CF formu olarak kabul edilir ve bu hastaların % 80'inden fazlasında KF transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) geninin mutasyonları mevcuttur. 7. kromozomun kısa kolunda bulunan bu gen bir iyon kanalı olarak işlev görür ve aynı zamanda ejakülatör kanal, seminal vezikül, vas deferens ve epididimin distal üçte

ikisinin (Wolffian kanal yapıları) oluşumunu etkileyen bir membran proteinini kodlayarak erkek üreme sisteminin oluşumunu düzenler (43). CBAVD'si olan tüm erkekler, muhtemelen henüz tanımlanmamış başka bir gen defekti ile ilişkili olan renal agenez / malformasyon ile gelenler dışında, CFTR mutasyonu için taranmalıdır (47).

2.4.2.2 Kartegener sendromu

Sperm motilitesinin yanı sıra tüm respiratuar yolların ve sinüs yollarının yüzeyini etkileyen bu genetik hastalık İmmotil Silya Sendromu olarak da bilinir. Genellikle ilk şikayetleri infertilite problemi değildir. Doktora başvuru nedenleri daha sık olarak çocukluk döneminde mukusun üst solunum yollarına ve sinüslere doğru olan hareketinin bozulması sonucu gelişen sinüzit ve bronşiektazidir. Primer Siliyer Diskinezi'nin bir tipi olan Kartagener sendromunun kronik bronşit ve bronşiektazi, hareketsiz sperm veya düşük motilitesi ile birlikte olan infertilite ve situs inversus olmak üzere üç komponenti vardır. Bu hastalara tanı koymak için siliyer aksonemal yapıların elektron mikroskopik olarak incelenmesi gerekmektedir (48). Bugüne kadar tanımlanan mutasyonların çoğu DNAH5 (dynein axonemal heavy chain 5) ve DNAI1(dynein axonemal intermediate chain 1) genlerinde gerçekleşmiş olup çok az bir kısmı diğer genleri içerir. Primer siliyer diskinezili hastaların yaklaşık % 50'sinde lateralite defektleri (situs inversus totalis ve daha az yaygın olarak heterotaksi ve konjenital kalp hastalığı dahil) vardır ve bu, embriyolojik nodal siliyanın işlev bozukluğunu yansıtır. Erkek kısırlığı yaygındır ve sperm kuyruğu aksonemlerindeki kusurları yansıtır. Primer siliyer diskinezi olan hastaların çoğunda yenidoğan solunum sıkıntısı öyküsü vardır (49).

2.4.2.3 Androjen reseptörü geni mutasyonları

Androjenler ve fonksiyonel bir androjen reseptörü (AR), erkek fenotipinin ve spermatogenezin gelişimi ve sürdürülmesi için gereklidir. AR, X kromozomunda bulunan bir gen tarafından kodlanır ve sekiz ekzondan oluşur. AR genindeki mutasyonlar, topluca androjen duyarsızlığı sendromu (AIS) olarak bilinen çeşitli kusurlara neden olur. Hafif bir AIS (MAIS) olan hastalar, birincil veya hatta tek semptomları olarak erkek kısırlığına sahiptir. AR defektlerinin ciddiyetindeki değişikliklere bağlı infertilite tablosu da değişkenlik gösterir. AR eksikliği durumunda

fetal dönemde sertoli ve leydig hücre maturasyonu gerçekleşmez. Erkek dış genityasının gelişimi için gerekli olan testosteron ve dihidrotestosteron (DHT) miktarları da AR gen defektlerinde azalır. 1517 oligospermik hasta ile yapılan bir çalışmada 26 hastada (% 1,7) AR mutasyonu saptanmıştır (50). Önemlisi, AR gen mutasyonları olan 26 erkekten ikisi kriptorşidizm, bir kriptorşidizm ve hipospadya, bir jinekomasti gösterirken, 22'si spermatojenik bozukluk dışında androjen duyarsızlığı belirtileri göstermedi. AR gen mutasyonları erkek kısırlığının genetik nedeni olarak rol oynayabilir ve seçilmemiş kısır erkeklerde yaklaşık % 2'lik bir prevalans ile bulunur. Daha yüksek mutasyon riski taşıyan hastaları önceden seçmek için hiçbir açık hormonal veya klinik veri kullanılamaz (50).

2.4.2.4 INSL3-LGR8 gen mutasyonları

Relaxin benzeri faktör (RLF) olarak da bilinen insülin benzeri faktör 3 (INSL3), Leydig hücreleri tarafından üretilen gevşetici benzeri hormon ailesinin bir üyesidir. İnsanlarda INSL3 üzerine yapılan araştırmalar, kemirgenlerde bu peptidin gubernakulum üzerine etki ederek testis inişinin transabdominal fazında rolünün tanımlanmasının ardından son yıllarda genişledi (51). Bu araştırmaya bir başka dürtü, ilgili reseptör LGR8'in (lösin açısından zengin tekrar içeren G proteini birleşik reseptör 8) açıklamasıyla verilmiştir (52). INSL3 geni, C-peptid kodlama alanını kesintiye uğratan bir intron ile iki ekzon içerir ve Janus kinaz 3 (JAK3) genine yakın, kromozom 19'da lokalizedir (35). INSL3 ve LGR8'de aminoasit ikamesine yol açan birkaç mutasyon bulunduğundan, insan kriptorşidizminde bir rol öne sürülmüştür. Literatür incelendiğinde, kriptorşidizm veya eski kriptorşidizmi olan erkeklerde % 4-5 mutasyon prevalansı bulunmuştur (53). Testis inişi ve kriptorşidizmdeki rolünün yanı sıra, INSL3 yetişkinlerde olası endokrin ve parakrin etkilere sahiptir (53).

2.4.3 Gen Polimorfizmi ve Erkek İnfertilitesi

Spermatogenez ile ilgili genlerdeki polimorfizmlerin analizi, erkek kısırlığının genetiğinde en heyecan verici araştırma alanlarından birini temsil etmektedir. Bu genlerdeki polimorfizmler veya genetik varyantlar, spermatojenik yetmezliğin ciddiyetine katkıda bulunabilecek potansiyel risk faktörleri olarak kabul edilir. Erkek kısırlığı ile bağlantılı olarak çeşitli polimorfik varyantlar tarif edilmiştir. Ancak, bu ilişkilendirme çalışmaları genellikle benzer sonuçlar bildirmez. Bu temelde farklı

önemli hususlardan kaynaklanmaktadır; çalışma popülasyonunun boyutu ve bileşimi, analiz edilen polimorfizm türü ve kullanılan teknikler, erkek infertilite fenotipinin çok faktörlü durumu ve heterojenliği, etki eden nedenlerin fenotipik etkisindeki bireyler arası değişkenlik, testis seviyesi ve genetik varyasyonlara katkıda bulunan etnik ve coğrafi farklılıklar. Gen polimorfizmlerinin fenotipik etkileri, diğer genetik faktörler veya genetik arka plan ve çevresel faktörler tarafından modüle edilerek fenotip gelişiminde gen-çevre etkileşiminin önemli bir örneğini sağlar. Bu nedenle, polimorfizmlerin yalnızca belirli bir genetik arka planla ve/veya çevresel faktörlerle ilişkili olarak spermatogenetik bozulmaya veya testis işlev bozukluğuna yol açması muhtemeldir (35).

2.4.3.1 Androjen reseptörü ekzon 1 polimorfizmi

AR, ekson 1'de iki polimorfik bölge sergiler ve farklı sayılarda CAG ve GGC tekrarları ile karakterize edilir. AR fonksiyonunu modüle ediyor gibi görünen AR proteininin N-terminalinde değişken uzunluklarda poliglutamin ve poliglisin gerilmelerine neden olur. Son zamanlarda yapılan bir dizi çalışma, CAG tekrarının uzunluğu ile erkek kısırlığı arasındaki olası bağlantıyı incelemiştir. Bu, CAG yol uzunluğundaki polimorfizmlerin normal erkeklerdeki sperm konsantrasyonu ile ilişkili olduğu bulgusuyla tutarlıdır (54).

2.4.3.2 5-metilenetetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimini kodlayan gen polimorfizmi

5-metilenetetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, homosisteinin metiyonine dönüştürülmesinde rol oynar. Kodlama bölgesindeki (C677T) bir nokta mutasyonu, enzimin aktivitesini heterozigotlarda (CT) yaklaşık % 30 ve homozigotlarda (TT) % 80 azaltır. T alelinin sıklığı popülasyonlar arasında büyük ölçüde farklılık gösterir, Avrupa ve Amerika'da % 30 ile % 40, Afrikalılarda ve Sri Lanka'da % 5-10 arasında değişir (55). MTHFR (C677T) mutasyonunun erkek fertilitesi üzerindeki olası olumsuz etkileri, yetersiz metilasyonla indüklenen spermatogenez genlerinin ekspresyonundaki bir değişiklikten kaynaklanıyor olabilir. Alternatif olarak, spermatozoa, DNA hasarına neden olan toksik reaktif oksijen metabolitlerinin daha yüksek üretiminden zarar görebilir. Bugüne kadar altı çalışma, MTHFR C677T polimorfizmi ile erkek kısırlığı

arasındaki olası ilişkiyi bildirmiştir, ancak esas olarak homojen olmayan popülasyon seçimi ve etnik farklılıklar nedeniyle kesin veriler çıkarılamamaktadır (35).

2.4.3.3 Follikül stimulan hormon reseptör geni polimorfizmi

Follikül stimulan hormon ve FSH reseptörü (FSHR) arasındaki etkileşim, normal oogenez ve spermatogenez için gereklidir. Son zamanlarda, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) FSHR genine atanmıştır. Bunlar, FSH'nin etkisini değiştiren farklı FSHR haplotiplerine yol açar. FSHR geninin ekson 10'unda, olgun proteinin 307 ve 680 amino asit pozisyonlarına karşılık gelen iki SNP bulunur. Bu iki polimorfizm, Kafkas popülasyonunda neredeyse eşit derecede yaygın olan iki ana allelik varyantla sonuçlanır: Thr307-Asn680 ve Ala307-Ser680. Pozisyon 680'deki FSHR polimorfizmi, kadınlarda serum FSH seviyelerini ve in vivo FSHR'nin FSH'ye duyarlılığını etkiler. Aslında adet döngüsü sırasında FSH duyarlılıkları ve FSHR haplotipine bağlı olarak farklı döngü uzunlukları gözlenir. Ayrıca, in vitro fertilizasyon teknikleri için kontrollü over hiperstimülasyonu sırasında kadınlarda farklı bir FSH ihtiyacı görülmektedir. Başka bir SNP, etkisi tek başına veya ekson 10 SNP'ler ile kombinasyon halinde daha az net olan FSHR gen promoterinin 29. pozisyonunda bulunur (G → A değişimi ile sonuçlanır). Erkeklerde FSHR SNP'lerin etkisi belirsizdir. Özellikle, bir ön çalışma normal ve kısır erkekler arasında FSHR polimorfizmlerinin dağılımında hiçbir farklılık göstermezken, daha yakın tarihli bir çalışma normozoospermik erkeklere göre azoospermide farklı bir allelik frekans bildirmiştir. Bu nedenle FSHR haplotiplerinin, tek başına veya kombinasyon halinde spermatogenezi etkileyebilecek gen polimorfizmlerinden birini temsil etmesi mümkündür. Spermatogenezde yer alan hücrelerin normal işlevi, FSH reseptörünün (FSHR) ekspresyonuna bağlıdır. FSHR gen polimorfizmlerinin; FSH artışı, progesteron düşüşü ve semende sperm konsantrasyonlarında azalma ile ilişkilendirilebileceği belirtilmiştir. Bu ilişkinin önemi, muhtemelen farklı etnik kökene sahip diğer popülasyonlarda yapılacak daha ileri çalışmalarla doğrulanmalıdır (56).

2.5 İnfertil erkek hastanın değerlendirilmesi

2.5.1 Anamnez

İnfertil çiftin tanısai tetkikinin 12 aylık düzenli korunmasız cinsel ilişkiden sonra başlatılması gerektiği genel olarak kabul edilmektedir. Ancak ilk yıl hamile kalmayan çiftlerin yaklaşık yarısının ikinci yıl hamile kalacağı dikkate alınmalıdır. Bilinen erkek veya kadın risk faktörleri mevcutsa daha erken değerlendirme yapılabilir. İnfertil erkeğin tanısai tetkiki, dikkatli tıbbi ve üreme öyküsü, fizik muayene ve semen analizini ve ardından ikinci seviye muayeneleri içermelidir. Erkeğin değerlendirilmesi, fertilité ile ilgili olabilecek bütün yönleri araştıran detaylı bir medikal ve reprodüktif hikayeyi içermelidir. Erkek infertilitesi için prognostik faktörler; infertilite süresi, primer veya sekonder infertilite olması, semen analizi sonuçlarıdır.

İnmemiş testis 1 yaşına gelmiş erkek çocukların % 0,8'inde görülen ve fertilité durumunu etkileyen bir patolojidir. Tek taraflı inmemiş testis fertilitéyi hafif derecede azaltırken, iki taraflı inmemiş testisin fertilitéde anlamlı bir biçimde azalma yaptığı gözlenmektedir. Tek taraflı inmemiş testis öyküsü bulunan erkeklerin % 50 sinde, çift taraflı olanların ise %90'ında fertilitéde azalma bulunmaktadır (57).

Testis tümörü etraftaki dokunun yapısını bozarak, lokal olarak salgıladığı human corionic gonadotrophin (HCG) ve parakrin hormonlar etkisi ile, skrotum içerisinde ısı artışına ve lokal kan akımının artmasına sebep olarak spermatogenezi bozmaktadır. Kanser tedavisi esnasında kullanılan kemoterapi ajanları ve radyoterapi germ hücreleri üzerine sitotoksik etkilidirler (58).

Tıbbi ve üreme geçmişi, doğurganlığı etkileyebilecek risk faktörlerinin veya davranış kalıplarının tanımlanmasına odaklanır. Sistemik hastalıklar, daha önce geçirilmiş kemo / radyoterapi, alkol kullanımı, gonadal toksik madde maruziyeti, anabolik steroid ve toksik ilaç alımı ekarte edilmelidir. Hastaya kısırlığın süresi, tekrarlayan düşük ve malformasyonlar hakkında sorular sorulmalıdır. Kısırlık süresi ve önceki ya da şimdiki eşle önceki doğurganlık, bozulmuş libido, ejakülat hacminde azalma, erektil veya ejakülatuar disfonksiyon, koital sıklık ve zamanlama, orşit, testis travması, kasık cerrahisi, kriptorşidizm ve varikosel, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, prostatit, prostatovesikülit ve tekrarlayan ürogenital enfeksiyonlar infertilite nedeni olabilir (6). Kırk beş yaşından büyük erkeklerde yirmi beş yaş ve altı ile kıyaslandığında gebelik oluşturma süresinin beş kat uzadığı ve oranlarının azaldığı bildirilmiştir (59).

Hipotroidi ve hipertroidinin steroid metabolizmasını ve sperm kalitesini etkileyerek subfertiliteye yol açabildiği belirtilmektedir (60). Tiroit kanseri tedavisinde kullanılan radyoaktif iyot semen parametrelerini bozarak erkek infertilitesine yol açabilir.

Puberte ve sonrasında geçirilen kabakulak vakalarının %20-30'unda komplikasyon olarak orşit gelişir ve hipofertiliteye yol açar (61). Üretrit, prostatit ya da cinsel yolla bulaşan genital enfeksiyonlar üreme sisteminde kalıcı hasara neden olabilir ve bu da fertilitede azalma veya infertilite nedeni olabilir (62). Travma ve testis torsiyonu testiküler atrofiye yol açmakla birlikte antisperm antikorlarının oluşmasına da sebep olabildiği için, sperm parametrelerinin bozulmasına yol açabilir. Nitrofurantoin, eritromisin, gentamisin, ko-trimaksazol gibi antibiyotikler spermatogenez ve sperm fonksiyonunu etkileyerek fertiliteye zarar verebilmektedir (63). Cinsel öyküde ejakülasyonun olup olmadığı, spermisid etkisinden dolayı ilişkide kayganlaştırıcı kullanımı, ilişkinin sıklığı ve zamanlaması sorgulanmalıdır. Spermin uygun servikal mukus ortamında 2 ila 5 gün yaşayabildiği çalışmalarda gösterilmiştir. Konsepsiyonun sağlanması için, sperm ovulasyon ve luteinizan hormon (LH) pikine uygun bir zamanda kadın genitelyasına ulaşmalıdır ki bu döneme fertilizasyon penceresi denmektedir (64). Ejakülasyonla ilgili fiziksel parametrelerin sorgulanması hekimi tanı için yönlendirecek önemli bir basamaktır. Ejakülat miktarında azalma ejakülatör kanalda obstrüksiyonun veya seminal bez patolojilerinin belirtisi olabilir. Parsiyel/komplet retrograd ejakülasyon veya androjen yetersizliği de semen hacminin azaldığı durumlardır. Benign prostat hiperplazisi tedavisinde kullanılan alfa blokerler retrograd ejakülasyona sebep olabildiği için kullanımı sorgulanmalıdır. Ejakülat hacminde artış ise prostatit, üretrit gibi enfeksiyonlar esnasındaki aktif inflamasyon kaynaklı olabilir.

2.5.2 Fizik Muayene

Fertilite, genel sağlık durumunun göstergesi olabileceği için fizik muayene sadece genital muayene ile sınırlı olmamalıdır. Vücudun genel yapısı ve virilizasyon düzeyi androjenizasyon ile ilgili ipuçları vermektedir Fiziksel muayene, saç dağılımı, vücut oranları, ses ve jinekomasti gibi ikincil cinsiyet özelliklerinin değerlendirilmesini içermelidir. Pubik ve aksiller kıllanmanın olmaması, sakal olmaması ve jinekomasti varlığı, androjen eksikliğine ve hipogonadizme işaret eden bulgulardır.

Genital bölgeye özellikle odaklanılmalıdır: Üretral meatusun yeri dahil penis muayenesi, prader orşidometre ile testis hacminin ölçülmesi, testislerin palpasyonu,

kistler ve kıvam için epididimler, total veya segmental yokluk için vas deferens, varikosel için skrotumun palpasyonu, dijital rektal muayene yapılmalıdır. Normal koşullarda palpe edilemeyen seminal veziküller ejakülatuar kanal obstrüksiyonlarında belirginleşebilir. Hipoandrojenizasyon, hipospadias gibi belirli fiziksel özellikler, androjen reseptör genindeki mutasyonlardan kaynaklanıyor olabilir. Tipik anokoid özelliklere sahip son derece küçük sert testis, Klinefelter sendromunun göstergesidir. Öte yandan, çocukluk çağı cinsel organları, seyrek veya neredeyse hiç olmayan vücut kılları, jinekomasti ve düşük testis hacmi, konjenital gonadotropin eksikliğinin tipik bir örneğidir (6).

2.5.3 Laboratuvar Tetkikleri

Anamnez ve muayene sonrası hastanın fertilité durumunu somut olarak ortaya koymak, ön tanıları doğrulamak ve hastanın güncel durumunu değerlendirebilmek için semen analizi yapılmalı, hormonal dengeyi ve genel durumu değerlendirme maksadıyla laboratuvar tetkikleri ve radyolojik görüntüleme yöntemleri kullanılmalıdır

2.5.3.1 Semen Analizi

Erkek üreme hücreleri ilk kez 17. yüzyıl (yy)'da Anton van Leewenhoek tarafından yapılan mikroskopta görülmüş ve 'spermatick worms' olarak adlandırılmışlardır (65). İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde öykü ve fizik muayeneden sonra ilk istenecek laboratuvar testi semen analizidir. Semen analizi sadece fertil, subfertil ve infertil erkeklerin ayırımına değil, aynı zamanda infertilitenin belirli nedenlerinin ortaya çıkarılmasına ve uygun tedavinin seçimine de katkıda bulunur. Semen analizi, spermatozoa sayısında azalma (oligozoospermi), azalmış motilite (astenozoospermi) ve morfolojik incelemede birçok anormal form (teratozoospermi) gösterebilir. Bu anormallikler genellikle bir araya gelir ve OAT sendromu (oligo-astheno-teratozoospermi) olarak tanımlanır. Seminal hacim ve pH, seminal veziküllerin ve vas deferensin agenezisi gibi durumlar hakkında ipucu verebilir. Sperm kromatin yapı analizi ile sperm DNA bütünlüğü değerlendirmesi, spontan gebelik için değerli bir gösterge gibi görünmektedir (2). Semen analizi, erkek infertilitesinin ciddiyetini teşhis etmek ve tanımlamak için çok önemlidir. Ancak unutulmamalıdır ki, erkek faktör tanımı anormal semen parametrelerine dayandırılrsa da, diğer erkek faktörleri (nadir fonksiyonel kusurlar) semen analizi normal olsa bile rol oynayabilir. Tersine, semen

parametrelerindeki ciddi rahatsızlıklar, çiftin doğurganlığı ile uyumlu olmayabilir çünkü; oldukça doğurgan bir kadın partner, erkek subfertilitesini telafi edebilir. Semen analizi, DSÖ kılavuzuna göre standart bir şekilde yapılmalıdır (66). Semen analizinin doğruluğu ve etkinliği için örnek toplamadan önce iki ile yedi gün arasında cinsel perhiz yapılması gerekmektedir (67). Bu analiz sperm yoğunluğu, toplam sayısı, motilite, morfoloji ve semen hacmi, pH, viskozite gibi semen parametrelerini sağlayacaktır. Sperm parametreleri için referans aralıkları yakın zamanda güncellenmiş ve DSÖ kılavuzunun son versiyonu tarafından sağlanmıştır (66). Anormal sperm parametrelerinin bulunması durumunda semen analizi tekrarlanmalıdır. Patolojik bulgular durumunda kullanılan isimlendirme Tablo 3'te verilmiştir. Patolojik semen analizi ile tanı koymak için minimum 2 analize ve uyumsuz ise üçüncü bir analize gerek vardır. Semen analizi yapılmadan önce geçirilen ateşli bir hastalık veya toksik bir ilaç alım öyküsü mevcutsa spermatogenez bozulacağı için üç ay kadar beklenmesi gerekmektedir. Toplanan semen örneği ejakülasyon sırasında koagüle olur ancak 15-20 dakika içerisinde daha sıvı bir hal alır. Eğer semen örneği likeifiye olmazsa hipervisköz bir hal alarak kalın iplikler şeklinde izlenir. Sıvılaşmayan semen örneği sperm hareketliliğinin ve konsantrasyonunun belirlenmesinde sorun çıkarabilir. Toplanan semen örneğinin 37° de yaklaşık olarak 30 dakika boyunca karıştırılması likeifikasyon işleminin gerçekleşmesi için gerekli olup, işlem gerçekleştikten sonra ilk bir saat içerisinde değerlendirilmelidir. Eğer sperm örneği iki saat içerisinde değerlendirilmezse spermlerin hareketliliğinde ciddi bir düşüş oluşarak testis güvenilirliğini bozar. Yüksek viskositenin olması sperm hareketliliğinde bir azalmanın meydana geldiğini ve bunun sonucunda infertilitenin olduğunu gösterir. Semen vizkositesi genellikle yüksektir ve araştırma yapabilmek için tripsin ile işleminden geçmesi gerekmektedir. Normal semenin pH'ı 7,2 ile 8,0 arasında alkalidir (66). Sperm morfolojisine baktığımız zaman akrozomun sperm başının yaklaşık olarak %40 ile %70 i arasında olması, baş kısmının uzunluğunun 4-5.5 mikron ve genişliğinin de 2.5-3.5 mikron arasında olması gerektiği görülmüştür. Fertilité için spermlerde baş, boyun ve kuyruk defektleri olmamalıdır. Anormal olarak görülen baş defektleri arasında mikrosefalik (normal boyutun yaklaşık yarısı kadar), megalosefalik (normal boyutun yaklaşık bir buçuk katı kadar), sivri başlı, yuvarlak başlı (akrozomsuz), çift başlı ve çok başlı spermlere rastlanmıştır. Tespit edilen kuyruk defektleri içerisinde de kısa, çoklu, kıvrık veya kırılmış kuyruklu spermler mevcuttur. Eğer yapılan analizde sarmal şeklinde kuyruklu spermler görülüyor

ise osmotik stresin olduğu düşünölebilir (68). Yapılan analizde sperm motilitesi eğer %5 veya %10'dan az ise spermlere viabilite testi yapılmalıdır çünkü düşük motilite ölü spermler veya nekrospermi ile ilişkilidir. Viabilite testinde spermler Eosin Y boyası ile boyanır, hücre duvarı sağlam ve yaşayan spermler boyanmazken, ölü spermler hücre duvarı yapısı bozulduğu için boyalı olarak görülür (68). Semen içerisinde bulunan früktozu seminal veziküller androjen bağımlı mekanizmayla oluştururlar. Normal semen früktoz konsantrasyonu 120-450 mg/dl arasında değışmektedir. Eğer semen içerisindeki früktoz konsantrasyonu 120 mg/dl altına inmişse seminal veziküllerin inflamasyonu, androjen eksikliği, ejakülatuar kanalların parsiyel tıkanıklığı veya yetersiz ejakülasyon durumlarından herhangi bir tanesinden şüphelenmek gerekmektedir. Eğer semende hiç früktoz yoksa seminal vezikül içeriğinin olmadığı anlamına gelir. Asidik, früktoz bulunmayan, koagüle olmayan ve düşük volümü olan (< 1.0 ml) semen çıkaran hastalarda seminal veziküllerde tıkanıklık ya da vezikülün konjenital yokluğu mevcuttur (69). Yapılan semen analizinin güvenilirliğini etkileyebilecek preanalitik faktörler: Spermin uygun olmayan şekilde toplanması veya taşınması (örnek, taşıma sırasında vücut sıcaklığında tutulmalıdır; cinsel perhiz süresi 2-5 gün arasında olmalı, ejakülat kaybı olmamalıdır), antibiyotik tedavisi veya semen toplamadan önce ateş olması gibi nedenlerdir.

Tablo 3.1 Dünya sağlık örgütüne göre patolojik semen parametreleri (2010) (66)
(Lu JC, Huang YF, Lü NQ. [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: its applicability to andrology laboratories in china]. Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology. 2010;16(10):867-71.)

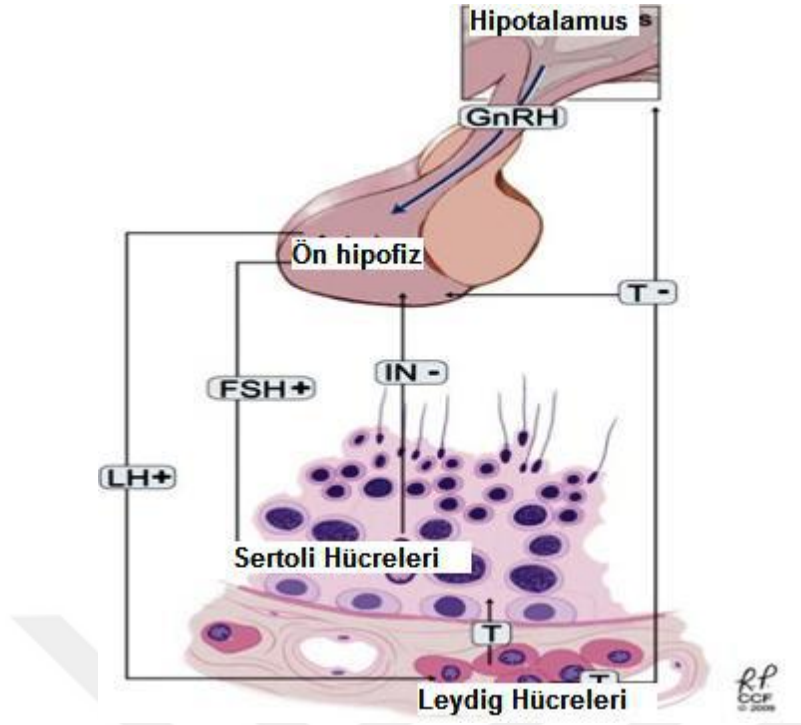
Oligozoospermi	Sperm konsantrasyonu $<15 \times 10^6/\text{ml}$; total sperm miktarı $<39 \times 10^6/\text{ml}$
Astenozoospermi	$<32\%$ hareketli sperm oranı
Teratozoospermi	$<4\%$ morfolojik olarak normal sperm oranı
Oligo-asteno-teratozoospermi	Üç parametrenin birarada olması
Azoospermi	Ejekülatta sperm olmaması
Aspermia	Ejekülat olmaması
Lökospermi	$>1 \times 10^6$ ml ejekülattaki lökosit sayısı

Tablo 3.2 Semen analizi referans değerleri (WHO laboratuvar el kitabı insan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi, 2010)

Semen Volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Toplam Sperm Sayısı ($10^6/\text{ejakülat}$)	39 (33-46)
Sperm Konsantrasyonu ($10^6/\text{ml}$)	15 (12-16)
Toplam Motilite (%)	40 (38-42)
İleri Hızlı Motilite (%)	32 (31-34)
Vitalite (%)	58 (55-63)
Normal Sperm Morfolojisi (%)	4 (3.0-4.0)
Ph	> 7.2

2.5.4 Hormonal Değerlendirme

Hormonal değerlendirme infertil erkek hastalarda etyolojinin ortaya çıkarılmasında spermatogenezi bozan hormonal bir nedenin bulunmasında önemli bir yere sahiptir. Yapılan çalışmalarda erkek infertilitesinin %3'ünden azında primer bir hormonal etiyoloji bulunduğu tespit edilmiştir (70). Yapılacak hormonal değerlendirmede, folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinize edici hormon (LH) ve testosteron düzeylerinin belirlenmesi gerekmektedir. Hipogonadizmden şüphelenilen durumlarda hormonlar detaylı olarak incelenmelidir. Hipogonadotropik hipogonadizm ve testiküler yetmezlik düşünülen durumlarda özellikle testosteron dolaşımdaki birincil androjen olduğu için bakılmalıdır. Erkek hastalarda östradiol düzeyinin artması ve testosteron/östradiol oranının düşmesi spermatogenezi olumsuz etkileyerek infertiliteye neden olmaktadır. Normal sağlıklı erkeklerde sertoli hücrelerinden salınan İnhibin B nin negatif geri beslemesi ile FSH salgısı düzenlenmektedir. Yapılan semen analizinde spermatogenezin bozulduğu tespit edilen hastalarda daima olmasa da sıklıkla FSH seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür. FSH düzeyinin normal olması spermatogenezde bozukluk olmayacağını garantilemez (71). Kallmann sendromu gibi hipogonadotropik hipogonadizmi olan hastalarda FSH ve LH düzeylerinin ikisinde de bir düşüklük saptanabilir ve eş zamanlı olarak hipofizer yetmezlik olabileceği için hastada tiroid stimulan hormon (TSH), adrenal kortikotropik hormon (ACTH) ve büyüme hormonu (GH) düşüklüğü de gözlemlenebilir. Sperm analizinde azospermi saptanan hastalarda obstrüktif ve nonobstrüktif nedenleri ayırt etmek gereklidir. Normal FSH değeri ve normal testis volümleri görülen hastalarda obstrüktif azospermiden şüphelenmek gerekir. Bununla birlikte, normal FSH'li erkeklerin %29'unda kusurlu spermatogenez (spermatojenik arrest) olduğu görülmektedir (2).



Şekil 3.1 Hipotalamo-hipofizer-gonadal aks. İlk olarak hipotalamustan salınan GNRH ön hipofizden FSH ve LH salınımını uyarır. FSH ise testisteki germ hücrelerine etki ederek spermatogenez oluşmasını sağlarken LH ise Leydig hücrelerini uyarıp testosteron üretimini sağlamaktadır. Gonadlardan salgılanan İnhibin B ve testosteron ise negatif feed-back etki ile gonadotropinlerin salgılanmasını baskılamaktadır. (Campbell-Walsh Urology, 10. Baskı, Bölüm 7, Kısım 21, syf: 627, 2011)

2.5.5 Görüntüleme Yöntemleri

İnfertile ile başvuran bireylerde, anamnez ve muayenenin yönlendirmesiyle tanı ve doğrulama amacıyla radyolojik yöntemlere başvurulabilir.

Testis büyüklüğünün değerlendirilmesi için skrotal ultrason zorunludur; rete testisin dilatasyonu, kistik lezyonlarla genişlemiş epididim, vaz deferensin yokluğu gibi tıkanma belirtilerinin bulunması; ve varikoseli olan erkeklerde reflünün değerlendirilmesi gibi işlevleri vardır. Skrotal ultrason, infertil erkeklerde testiküler mikrolitiyazisi (TM) de tespit edebilir, bu da testiküler karsinom in situ (CIS) olduğunu gösterebilir. TM ve testiküler atrofi, kriptorşidizm öyküsü, düşük sperm sayısı, bilateral TM ve kontralateral kanser öyküsü gibi testis kanseri için ilişkili risk faktörleri olan erkeklerde, CIS'nin erken tespiti için çift taraflı testis biyopsisi yapılmalıdır (2). Prostat

ve seminal veziküllerin transrektal ultrasonu (TRUS), semen hacmi düşük ve seminal vezikül büyümesi olan hastalarda, ejakülatuar kanal tıkanıklığı yapan orta hat prostatik kistleri ve ejakülatuar kanal kalsifikasyonu gibi hastalıklarda tanı amacıyla kullanılabilir (2).

2.5.5.1 Kriptorşidizm ve Testis Tümörleri

Kriptorşidizm, doğumda % 2-5'lik bir insidansla erkek cinsel organının en sık görülen doğuştan anomalisidir. 3 aylıkken insidans kendiliğinden % 1-2'ye düşer. Kriptorşidizmin etiyojisi çok faktörlüdür ve hem bozulmuş endokrin regülasyonu hem de birkaç gen kusuru söz konusu olabilir. Testislerin normal inışı için normal bir hipotalamik-hipofiz-gonadal eksene ihtiyaç vardır. İnmemiş testisli çoğu erkek çocuk doğumdan sonra hiçbir endokrin anormalliği göstermemesine rağmen, erken gebelikte endokrin bozulma potansiyel olarak gonadal gelişimi ve normal testis inişini etkileyebilir. Kriptorşidizmin, gebeliğin erken dönemlerinde çevresel ve / veya genetik etkilere bağlı gonadların gelişimsel bir bozukluğu olan testis disgenezinin sonucu olabileceği varsayılmıştır. Bu testiküler disgenezis sendromu, inmemiş testislere, doğurganlığın azalmasına, hipospadiasa ve malignite riskinde artışa neden olabilir (72). Kriptorşidizm öyküsü olan erkeklerde semen parametreleri sıklıkla bozulur. İnfertil hastaların % 2-9'unda bir kriptorşidizm öyküsü mevcuttur. 3 yaş altında yapılan cerrahi tedavinin semen kalitesine olumlu etkisi olduğu öne sürülmüştür (73). Edinilmiş hipogonadotropik hipogonadizm (HH) tanısı sadece kısırlık açısından değil, aynı zamanda genel sağlık üzerindeki olası etkileri açısından da önemlidir (bazı durumlarda hayatı tehdit eden bir durumu temsil edebilir). Aslında, edinilmiş HH, tümörler (hem iyi huylu hem de kötü huylu) ile ilişkili olabilir ve birden fazla hipofiz hormonunun salgılanmasını etkileyerek bunların eksikliğine veya fazlalığına yol açabilir. Edinilmiş HH'nin yaygın nedenleri tümörler (salgılanan veya salgılanmayan hipofiz adenomları, kraniofaringiyom, menenjiyom vb.), Enfeksiyonlar, infiltratif hastalıklar, boş sella, radyasyon tedavisi ve otoimmün hipofizittir. Doğuştan olan ve edinilmiş formların fenotipik sunumu büyük ölçüde farklıdır. Doğuştan gelen durumlar genellikle gecikmiş ergenlik ve ilgili belirtilerle ilişkilidir (önükoid vücut yapısı, seyrek veya neredeyse olmayan vücut kılları, jinekomasti ve çok düşük testis hacmi). Bununla birlikte, bazı durumlarda azalmış spermatogenez ve hafif hipoandrojenizm tek semptom olabilir ve bu nedenle tanı yetişkinliğe kadar ertelenebilir. Yetişkinlikte edinilen formlar genellikle

ejakülat hacminde azalma, sakal büyümesi, libido bozukluğu ve asteni gibi birkaç semptomla (sadece gonadotropinler etkilenirse) ortaya çıkar (6).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda 26-44 yaş arası non-obstrüktif azospermik infertil hastalarda; periferik kanda kromozom analizi, moleküler karyotipleme, erkek infertilite paneli, T, PRL, FSH ve LH, düzeylerinin karşılaştırılması ve bu parametrelerle genetik mutasyonların ilişkisinin incelenmesini amaçladık. Etik kurul onayı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (referans numarası:2020/105). Çalışmaya katılım gönüllülük esasına göre yapıldı. Katılımcılara çalışma protokolü anlatıldıktan sonra katılımcılardan bilgilendirilmiş onam formunu okuyup imzalamaları talep edildi. Dünya Tıp Birliği tarafından insanlardan elde edilen ve kime ait olduğu belirlenebilen materyal ya da veriler üzerinde yapılan araştırmalar için etik ilkeler olarak belirlenen Helsinki Bildirgesi'nde bildirilen etik kurallara uyuldu.

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Üroloji Anabilim Dalı'nda 2015-2021 yılları arasında TESE uygulanan ve sonuçta canlı sperm elde edilemeyen 26 NOA hastası bulunarak oluşturuldu. Tüm katılımcıların detaylı anamnezleri alınarak fizik muayeneleri yapıldı. Öyküsünde hipofiz ve tiroid patolojisi, sistemik bozuklukları (diyabet, hipertansiyon gibi) olan hastalar, kemoterapi almış olanlar, eksojen testosteron alım öyküsü olanlar çalışmaya dahil edilmedi.

Semen analizi en az 48 saat cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yoluyla numuneler alınarak yapıldı. Semen volümü düşük olan (<1,5 mL) adaylar retrograd ejakülasyon ve diğer obstrüktif patolojiler için değerlendirilmek üzere çalışmaya dahil edilmedi. Numuneler etüvde 37 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra, mikroskop altında 200 kat büyütmeyle makler sayım kamerası kullanılarak sperm konsantrasyonu belirlendi. Sonuçlar tablo 3.2.'de belirtilen DSÖ 2010 semen analizi referans değerleri baz alınarak değerlendirildi. Azoospermi ve oligozoospermi değerlendirmesi yapılırken en az 2-4 hafta ara ile yapılmış birden fazla tetkik olması gerekliliği dikkate alındı. Bu gruplara dahil edilecek katılımcılardan en az 2 tetkik sonucu görülerek çalışmaya katılımları sağlandı.

Katılımcılardan gecelik açlık sonrası sabah erken saatte venöz kan örnekleri alındı. Bu örneklerden T, PRL, FSH ve LH kan alınmasını takiben çalıştırıldı. T harici hormonlar; Siemens Advia Centaur XPT cihazı (Siemens Healthineers, Erlangen,

Almanya) ile, T; Siemens Immulite 2000 cihazı (Siemens Healthineers, Erlangen, Almanya) ile, kemoluminesans yöntemi kullanılarak çalışıldı.

Hastaların DNA eldesi, periferik kan örneklerinden ticari kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Almanya) kullanılarak aşağıda belirtilen protokole uygun şekilde gerçekleştirildi.

1. Her bir hastanın 200 µl kan örneği 1,5 ml'lik eppendorf tüplere konularak üzerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl proteinaz K eklendi.
2. Örnekler 10 dk. boyunca 70 °C'de inkübe edildi.
3. Tüplere 100'er µl izopropanol eklendi ve karışım filtreli tüplere aktarıldıktan sonra 8000 rpm (1 dakikadaki dönüş sayısı) hızda 1 dk. santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra, tüpün altındaki kısım nazikçe boşaltıldı ve her bir tüpe 500 µl Inhibitor Removal Buffer eklenip 8000 rpm hızda 1 dk. santrifüj edildi.
5. Bu işlemi takiben tüpün altındaki kısım boşaltıldı ve her bir tüpe 500 µl Wash Buffer eklendikten sonra 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
6. 5 numaralı işlem bir kez daha tekrar edildi.
7. Tüpün altındaki kısım boşaltıldı ve 13000 rpm'de 10 sn. santrifüj edildi
8. Filtreli kısım yeni tüplere aktarıldıktan sonra üzerine 200 µl Elution Buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj sonucu DNA elde edildi.

İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık tayini, NanoDrop ND-2000c spektrofotometrede ölçülerek yapıldı.

Daha önce nonobstrüktif azospermik hastalarda bu kadar detaylı genetik analiz yapılan bir araştırma literatürde mevcut olmadığı için benzer grup ve parametrelerle yapılmış genetik mutasyon üzerine olan bir çalışma baz alınarak (74) yapılan power analizinde tip 1 hata miktarı $\alpha = 0.05$ ve testin gücü $1-\beta = 0.80$ alındığında nonobstrüktif azospermik hastalarda genetik nedenlerin araştırılmasında Tex11'in ortalama değerinin 0.2 olabilmesi için en az 26 hastanın çalışmaya alınması gerektiği hesaplandı.

3.1 Karyotip Analizi

1840'larda bitki hücrelerinin çekirdeklerindeki iplik benzeri yapıları ilk kez tanımlayan İsviçreli botanikçi Nageli'ydı ve onun “geçici sitoblastlar” dediği şey artık kromozomlar olarak biliniyor. Daha sonra, 1888'de Waldeyer, boyama teknikleri

geliştirildikten sonra "kromozom" terimini ortaya çıkardı (kromoz = renk için Yunanca; soma = vücut için Yunanca). Sitogenetik, kromozomların yapısı ve özellikleri, büyüme ve gelişme sırasında somatik hücre bölünmesi sırasındaki davranışları (mitoz) ve üreme sırasında germ hücre bölünmesi (mayoz) ve fenotip üzerindeki etkilerinin incelenmesidir. Sitogenetik ayrıca kromozomal değişikliklere neden olan faktörlerin araştırılmasını da içerir (75). Başlangıçta memeli türlerinin diploid sayısını belirlemek zordu çünkü kromozomlar metafazda kalabalıktı. 1950'lerde, metafazdaki hücreleri yakalamak için kolşisin eklenmesi ve daha iyi kromozom yayılımları elde etmek için hipotonik çözelti kullanımı gibi çeşitli teknik iyileştirmeler yapıldı. Daha sonra normal insan kromozom sayısını ve kromozom anormalliklerini doğru bir şekilde tanımlamak mümkün oldu. Bu sayede down sendromundaki trisomi 21, turner sendromundaki 45 X, kleinfelter sendromundaki 47 XXY, trisomi 13, trisomi 18 ve kronik miyeloid lösemideki philadelphia kromozomu gibi sayısal kromozomal sapmalarının tespiti sağlandı. Zamanla kromozomların Giemsa solüsyonu ile boyanmasıyla üretilen G-bantlama en sık kullanılan yöntem haline geldi. Pardue ve Gall, C-bantlarını ilk kez 1970 yılında, fare kromozomlarının sentromerik bölgesinin yinelenen DNA dizileri açısından zengin olduğunu ve Giemsa ile koyu renkte boyandığını farkettilerinde rapor ettiler. C-bantları, kromozomların heterokromatik bölgelerinde lokalize olur. Birçok kromozomun, bireyler arasında farklılık gösteren, ancak patolojik önemi olmayan bölgeleri vardır. Bu polimorfik bölgeler, C-bandı yöntemleriyle en uygun şekilde görselleştirilebilir. Goodpasture ve arkadaşları belirli kromozom polimorfizmlerini incelemek için klinik uygulamada yararlı olan NOR-bantlama için basit bir gümüş nitrat boyama tekniği geliştirdi. Bununla birlikte, rutin analiz için, tripsin ve Giemsa kullanan G-bantlama tekniği dünya çapında en çok kabul gören teknik olmuştur . Bant örüntüsü, iyi bilinen sayısal sapmalara ek olarak translokasyonlar, ters çevirmeler, silmeler ve kopyalar gibi çeşitli yapısal sapmaların tespitini mümkün kıldı. Bu, bilinen taşıyıcıların sağlıklı aile üyelerinin ve tekrarlayan spontan düşüklerden muzdarip çiftlerin sitogenetik araştırılmasına yol açtı (76).

3.2 Moleküler Karyotipleme

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon olarak tanımlanan moleküler karyotipleme kromozomal dengesizliklerin saptanması için kullanılır. Tüm genom boyunca kromozomal konumun bir fonksiyonu olarak bir DNA dizisi kopya sayısı

haritası üretir. Farklı olarak etiketlenmiş test DNA'sı ve normal referans DNA aynı anda normal kromozom yayılmalarına hibridize edilir. Hibridizasyon iki farklı florokrom ile tespit edilir. Delesyonlar, duplikasyonlar veya amplifikasyonlar gibi DNA sekanslarının kazanç veya kayıp bölgeleri, hedef kromozomlar boyunca iki florokromun yoğunluklarının oranındaki değişiklikler olarak görülür (77). Pek çok hastalıkta bu DNA sekanslarının farklılıkları ortaya çıkar. Kanserlerde, silmeler ve kopya sayısı artışları, sırasıyla tümör baskılayıcı genlerin ve onkojenlerin ekspresyonundaki değişikliklere katkıda bulunur. Down, Prader Willi, Angelman ve Cri du Chat sendromları gibi gelişimsel anormallikler, bir kromozom veya kromozomal bölgenin bir kopyasının kazanılması veya kaybedilmesinden kaynaklanır. Bu nedenle kopya sayısı anormalliklerinin tespiti ve haritalanması, anormallikleri hastalık fenotipi ile ilişkilendirmek ve kritik genleri lokalize etmek için bir yaklaşım sağlar (78).

3.3 Yeni Nesil Dizileme (New Generation Sequecing)

İnsan popülasyonlarının genetik araştırması, YND platformlarının geliştirilmesi ve kullanılabilirliği sayesinde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydetti. Ekson-ekson büyütme ve Sanger dizileme yoluyla tek gen mutasyon taramasının zahmetli sürecinin aksine, YND, büyük gen panellerinin tek bir deneyde ve makul bir maliyetle sorgulanmasını sağlar (79). Bu teknoloji kullanılarak çok sayıda dizileme reaksiyonu paralel olarak gerçekleştirilebilmektedir. Sanger dizilemenin aksine dizileme sonucunun jel elektroforezinde değerlendirilmesine gerek olmamaktadır ve daha kısa fragman okuma esasına dayanmaktadır. Bu analizin yapılabilmesi adına çok sayıda algoritma geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bu teknolojilerin avantajı üretilen bilgi miktarı ve hızıdır. Tüm genomun analizi mümkündür. Bunun sonucunda büyük miktarda veri elde edilir ancak analiz ve değerlendirme oldukça zordur. YND genel olarak iki kategoriye ayrılabilir: hedeflenen paneller veya tüm genom. Hedeflenen yöntemler (bazen 'panel dizileme' olarak da anılır), genellikle bilinen hastalık ilişkisi temelinde seçilen veya genleri bilinen hastalık yolları içerisine dahil edecek şekilde genişletilen bir grup genin ('gen paneli' olarak adlandırılır) araştırılmasını içerir. Ticari olarak üretilen özel yakalama panelleri, ilgilenilen herhangi bir sayıda genomik parçaya uyacak şekilde uyarlanabilir (80). Tüm ekzom dizilemenin ötesinde, tüm genom dizilimi, tüm insan genomundaki varyantları keşfetmek için kullanılır. Kodlamayan ve genler arası bölgeleri kaplamanın avantajının yanı sıra, tüm genom dizileme, dizilemeden önce

hedef zenginleştirme gerektirmez ve bu nedenle minimum örnek hazırlama ile mümkündür ve tüm kromozomlar arasında eşit olarak dağılmış görünen sıralı fragmanlarla sonuçlanır. Bu rastgele dağılım, genomun çoğunda benzer kapsamla sonuçlanır, bu da varyantların ortalama genom derinliğinde 20 kat kadar düşük bir şekilde güvenilir bir şekilde çağrılabilceği anlamına gelir (81).

Yaygın olarak kullanılan genetik testler, sayısal veya yapısal kromozomal anormallikleri tespit etmek için karyotiplemeyi ve Y-kromozom mikrodelyasyonu, Anosmi (Kallmann sendromu) gen kusurları veya kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) varyantları gibi bilinen genetik anormallikleri tespit etmek için PCR'yi içerir. Tüm ekzon dizileme sayesinde son yıllarda klinik tanısı bilinen ancak genetik alt yapısı tespit edilemeyen çok sayıda hastalığın mutasyonları ortaya çıkarılabilmektedir. Aynı zamanda aynı hastalığa ait farklı alttiplerin de sınıflandırılmaları ve etiyolojilerinin ortaya çıkarılması mümkün olabilmektedir. Genlerinin tümü tanımlanmış olan multigenik hastalıklarda YND metodu ile tanımlanmış olan bu genlerin değerlendirilmesi son yıllarda sıklıkla tercih edilen yaklaşımlardan biridir.

Analiz sırasında hastalıklar ve varyantlar filtrelenerek istenilen hastalıklar taranabilir. Aile taraması yapılan vakalarda ebeveynlerde heterozigot, indeks vakada ise homozigot olarak görülen varyantların filtrelenmesi yapılabilmek germline mutasyonlar sonucu oluşan hastalıkların tanısı kolaylaştırılabilmektedir (82). Bu aşamadan sonra görülen varyantların patolojik olup olmadığının değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu da American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)'in 2015 yılında belirlediği rehber doğrultusunda yapılmaktadır. Bu rehberde, varyantın patojenik olup olmadığı değerlendirilirken taşıdığı özelliklere göre “çok güçlü”, “güçlü”, “orta” ve “destekleyici” patojenite kriterlerinden kaç tanesi ile uyumlu olduğu tespit edilir. Benzer şekilde benign olup olmadığı değerlendirilirken taşıdığı özelliklere göre “tek başına” “güçlü” ve “destekleyici” benign kriterlerden kaç tanesi ile uyumlu olduğu tespit edilir (83).

Tablo 3.3 (Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine. 2015;17(5):405-23.)

Class	Değişiklik Türü	Patojenite Olasılığı	Açıklama
1	Patojenik	>%99	Hastalık yapıcı etkisi (patojenisite) yeterli verilerle gösterilmiş değişiklikler
2	Olası Patojenik	%95-99	Hastalık yapıcı etkisinin (patojenisite) varlığı lehinde çok güçlü veriler bulunan değişiklikler
3	Patojenik Etkisi Bilinmeyen Varyant	%5-95	Hastalık yapıcı etkisine (patojenisite) ilişkin sınırlı veya tartışmalı veriler bulunan değişiklikler
4	Olası Benign	%1-5	Hastalık yapıcı etkisinin (patojenisite) olmadığı lehinde çok güçlü veriler bulunan değişiklikler
5	Benign	<%1	Hastalık yapıcı etkisinin (patojenisite) olmadığı yeterli verilerle gösterilmiş değişiklikler

Erkek infertilitesi spermatogenez süreci içerisinde sperm gelişimini engelleyen moleküler mekanizmalar veya fertilizasyonu takip eden süreçte oosit aktivasyonunun önüne geçen nedenlerden etkilenir. Bu nedenle infertilitenin nedenlerinden olan gen düzeyindeki bozuklukların tespit edilmesi hastalara koyulacak tanı ve uygulanacak tedavi açısından kritik öneme sahiptir. Çok sayıda genin aynı anda toplu olarak analiz edilmesine imkan sağlayan yeni nesil dizileme (YND) sayesinde aşağıdaki tabloda yer alan 44 adet gen test edilmiş ve infertil hastanın genetik nedenlerinin bulunması amaçlanmıştır.

Tablo 3.4 Yeni nesil dizileme yöntemi ile çalışılan 44 adet gen ve görevleri

GEN ADI	FONKSİYON
AR	CAG dizilerindeki tekrar artışları AR geninde düşük transkripsiyonel

	aktiviteye neden olmakta olup bu durum erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiştir (54).
AURKC	Spermatogenez bozukluğu Tip 5: Aurora kinaz C geni üzerindeki tek nükleotid delesyonu infertilite ile ilişkili olduğu görülmüş ve bunlarda büyük başlı sperm, değişik sayıda kuyruk ile artmış kromozomal içerik mevcuttur (84).
CATSPER1	Sperm kuyruğundaki plazma membranını üzerindeki kalsiyum kanal kapılarının ilevinde görevli proteini kodlar (85).
CATSPER2	Sperm kuyruğundaki plazma membranını üzerindeki kalsiyum kanal kapılarının ilevinde görevli proteini kodlar (86).
CFTR	Konjenital bilateral vaz deferens eksikliği ile ilişkilendirilmiştir (47).
DDX25	Leydig hücrelerinde steroidogenezi indükleyen gonadotropik hormonu düzenler (87).
DMC1	Mayoz bölünmede homolog kromozom eşlenmesinde görevlidir (88).
DNAH11	Primer silyer disgenezi ve kartegener sendromu ile ilişkilidir (89).
DNAH5	Primer silyer disgenezi ve kartegener sendromu ile ilişkilidir (90).
DNAI1	Primer silyer disgenezi ve kartegener sendromu ile ilişkilidir (91).
DPY19L2	Spermatogenez bozukluğu Tip 9: Globozoospermi ile ilişkilidir (92).
ESR1	Bu genin kaybı sperm sayısında hareketliliğinde ve fertilite kapasitesinde kayba neden olmuştur (93).
ESR2	Bu genin kaybı sperm sayısında hareketliliğinde ve fertilite kapasitesinde kayba neden olmuştur (93).
ESX1	Sperm kök hücrelerinden sırasıyla spermatosit, spermatidler ve spermatozoa gelişimini indükler (94).
FSHB	Hipogonadotropik hipogonadizme neden olmaktadır (95).
FSHR	Sertoli hücrelerinin proliferasyonunu ve testislerin spermatogenik kapasitesini düzenler (56).
GNRHR	Hipogonadotropik ipogonadizm ile ilişkilendirilmiştir (96).
INSL3	Bu gendeki mutasyonlar bilateral kriptoorşidizm görülen azospermik olgularda saptanmıştır (53).
KLHL10	Germ hücre kaybı ve spermatidlerin kusurlu morfolojisi ile karakterizedir (97).

LHCGR	İnsan LH hormon reseptör mutasyonlarını inaktive eder (98).
NANOS1	Azospermi ve oligospermiye neden olur (99).
NR5A1	Steroidogenez ve cinsiyet gelişiminde görev alan genlerin regülasyonunda görev alır (100).
PLCZ1	Erken embriyogenezde hücre döngüsü bağımlı kalsiyum osilasyonunu kontrol eder. Total fertilizasyon bozukluğu ile karakterizedir (101).
PRM1	Sperm DNA'sının paketlenmesinde görev alan protaminin ekspresyonunda görev alır (102).
PRM2	Sperm DNA'sının paketlenmesinde görev alan protaminin ekspresyonunda görev alır (102).
PRM3	Sperm DNA'sının paketlenmesinde görev alan protaminin ekspresyonunda görev alır (102).
RBMXL2	Bu gen ürünündeki bozukluk fonksiyonel sperm üretimini inhibe eder (103).
RXFP2	Bu gendeki mutasyonlar bilateral kriptorşidizm görülen azospermik olgularda saptanmıştır (104).
SEPT12	Defektif sperm annulusu ve spermatogenez bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir (105).
SHBG	Seks hormonlarının hedef dokulara iletilmesi ve androjen konsantrasyonunun kontrolünü sağlar (106).
SLC26A8	Bu gendeki mutasyonlar şiddetli astenozoospermi ve primer infertilite ile ilişkilendirilmiştir (107).
SPATA16	Globozoospermiler ve spermatogenik arrestler ya da sertoli cell only sendromlu hastaların testis örneklerinde SPATA16 ekspresyonu gözlenmemektedir (108).
SPO11	Düşük SPO11 ekspresyonu mayotik çift zincir kırılmalarındaki tamir mekanizmasındaki gecikmeleri arttırmaktadır (109).
STAG3	Önemli bir kohezin alt ünitesi olup bu gendeki mutasyonlar mayotik arrestlere ve gametogenezde bozukluklara neden olabilmektedir (110).
SYCE1	Mayoz bölünmede rol alan bazı proteinleri kodlar (111).
SYCP3	Mayotik arrest ile karakterize azospermik hastalarda mutasyonu izlenmiştir (112).

TAF4B	TAF4B mutasyonu olan erkeklerde germ hücrelerinden yoksun seminifer tübüller görülür (113).
TAF7L	Pre-mayotik aşamada spermatogenezi etkilemektedir (114).
TEX101	Oositin etrafındaki kümülüs hücrelerini uyararak progesteron salgısını arttırıp akrozom reaksiyonunu başlatır (115).
TEX11	AnafazI ve pakiten aşamalarında spermatositlerin eliminasyonuna neden olur (116).
USP26	Sertoli cell only sendromu ile ilişkilendirilmiştir (117).
USP9Y	Delesyonu azospermiye ve ağır oligospermiye neden olmaktadır (118).
UTP14A	Mutasyonu spermatogonyumların farklılaşmasını engeller (119).
ZMYND15	Spermatogenezde haploid genlerin ekspresyonunu kontrol eder (120).

3.3.1 Yeni Nesil Dizileme Reaksiyonunun Hazırlanması

3.3.1.1 DNA miktarı tayini

DNA örneklerinin ölçümü ticari kit (Qubit dsDNA HS Assay Kit, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyonda kullanılacak çözdürücü solüsyon iyice vortekslendi. Her bir örnek için 1 µl çözdürücü solüsyon ve 199 µl sulandırma solüsyonu olacak şekilde sonraki basamaklarda da kullanılmak üzere 3 adet çalışma solüsyonu hazırlandı. Qubit Assay tüplere 198 µl çalışma solüsyonu ve 2 µl DNA örneği eklenerek vortekslendi ve ölçüm yapıldı. Qubit ölçümü sonucunda DNA'lar 10 ng/µl olacak şekilde nuclease free su ile dilüe edildi.

3.3.1.2 Veri işleme ve analiz

İncelenen 44 genin ekzon ve ekzon-intron bileşkelerini kapsayan primerler kullanılarak YND yöntemi ile dizileme yapılmıştır. Sonuçlar Qiagen Ingenuity Variant Analysis ve Geneticist Assistant (Version 1.8.1.0 / Soft Genetics LLC-USA) analiz programları kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler baz dizilenmesi, düşük kalite okunanların ve artefaktların filtrelenmesi ve varyantların anotasyonu açısından iki farklı biyoinformatik analiz yöntemi ile değerlendirildi. HGMD, Clinvar ve CentoMD veri bankalarında rapor edilen tüm hastalığa neden olan varyantların yanı sıra, GnomAD veritabanında %1' in altında minör allel frekansı (MAF) olan tüm varyantlar

göz önünde bulundurulur. İlgili değişkenler için yapılan araştırma, kodlayıcı ekzonlara ve +/- 20 intronik bazları çevrelemeye odaklanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma grubu İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Üroloji Anabilim Dalında 2015-2021 yılları arasında tese operasyonu geçiren ve sperme rastlanmayan 26 bireyden oluşmaktadır. Hastalarımızın yaşları 26-44 (ortalama 34,5) arasında değişmektedir. Hastalarımızın tamamı azospermiktir. Vakalar 1 den 26 ya kadar numaralandırılmış ve bulgular hasta numarası ile belirtilmiştir. 26 hastanın 19'unda FSH yüksekliği, 14'ünde LH yüksekliği tespit edilmiştir. Sadece bir hastada prolaktin yüksekliği tespit edilmiştir. Ayrıca 10 hastada testosteron düşüklüğü mevcuttur. Hastaların tamamında periferik kanda kromozom analizi, moleküler karyotipleme ve infertilite paneli bakılmış olup görülen anormallikler tablo 4.1 'de listelenmiştir. 20 hastada 46 XY 6 hastada 46 XXY kleinefelter sendromu tespit edilmiştir. 1 numaralı hastanın moleküler karyotiplemesinde Yp11.32-p11.2(236524-8875193) bölgesinde yaklaşık 8,6 MB'lık bir artış, Yq11.21-q11.222(14545-21311821) bölgesinde yaklaşık 21,2 MB'lık bir artış, Yq11.222-q11.223(21353932-59311250) bölgesinde yaklaşık 35,8 MB'lık bir delesyon, Xp22.33(286524-2685674) bölgesinde yaklaşık 2,3 MB'lık bir artış, Xq28(1849744667-155208244) bölgesinde yaklaşık 0,8 MB'lık bir kayıp saptanmıştır. 5 numaralı hastanın 22q11.21q11.22(21444618-222580334) bölgesinde yaklaşık 1,1 MB'lık bir kayıp saptanmıştır. 16 numaralı hastada AZFc Delesyonu 24 numaralı hastada ise AZFa, AZFb ve AZFc delesyonu saptanmıştır. 2, 3, 10, 23 ve 26 numaralı hastalarda CFTR ve FSHR geninde varyant değişikliği saptanmıştır. 4, 15, 16, 17, 18, 20, 21 ve 22 numaralı hastalarda FSHR geninde varyant değişikliği saptanmıştır. 6 numaralı hastada DNAH11 geninde, 7 ve 9 numaralı hastada ise DNAH5 ve FSHR geninde varyant değişikliği saptanmıştır. 11 numaralı hastada ZMYND15 ve FSHR değişikliği, 12 numaralı hastada LHCGR değişikliği tespit edilmiştir. 14 numaralı hastada Class I INSL3 mutasyonu ve FSHR varyant değişikliği görülmüştür. 19 numaralı hastada TEX101 ve CATSPER1 değişikliği saptanmıştır. 14 numaralı hastadaki INSL3 mutasyonu dışındaki bütün değişiklikler Class III olarak sınıflanmıştır.

Tablo 4.1

H. NO	YA Ş	HORMON	KR. Anl.	MOLEKÜLER KARYOTİPLEME	YND İNFERTİLİTE PANELİ						
					Gen	Yeri	Varyant	Zigozite	Sınıf	Hastalık	Kalıtım
1	29	FSH:28,23 LH:10,18 T:116	46 XY	Yp11.32-p11.2(236524-8875193) bölgesinde yaklaşık 8,6 MB'lık bir artış, Yq11.21-q11.222(14545-21311821) bölgesinde yaklaşık 21,2 MB'lık bir artış, Yq11.222-q11.223(21353932-59311250) bölgesinde yaklaşık 35,8 MB'lık bir delesyon, Xp22.33(286524-2685674) bölgesinde yaklaşık 2,3 MB'lık bir artış, Xq28(1849744667-155208244) bölgesinde yaklaşık 0,8 MB'lık bir kayıp saptanmıştır.	-	-	-	-	-	-	-
2	34	FSH:29,64 LH:13,77 T:126	46 XY	NORMAL	CFTR	Ekzon11	c.1516A>G(p.Ile506Val) rs1800091	Heterozigot	Class 3	Konjenital bilateral vaz deferens eksikliği	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S680N	Homozigot	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S307N	Homozigot	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
3	30	FSH:10,29 LH:5,81 T:206	46 XY	NORMAL	CFTR	Ekzon14	c.2002C>T (p.Arg668Cys) rs1800100	Heterozigot	Class 3	Konjenital bilateral vaz deferens eksikliği	Otozomal resesif

					FSHR	Ekzon10	p.S680N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S307N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
4	30	FSH:9,83 LH:3,8 T:303	46 XY	NORMAL	FSHR	Ekzon10	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S307N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
5	32	FSH:23,99 LH:12,19 T:188	46 XY	22q11.21q11.22(21444618-222580334) bölgesinde yaklaşık 1,1 MB'lık bir kayıp saptanmıştır.	-	-	-	-	-	-	-
6	37	FSH:28,18 LH:7,45 T:51,9	46 XY	NORMAL	DNA H11	Ekzon15	c.2772G>A (p.Met924ile)rs766050153	Heterozi got	Class 3	Primer siliyer diskinezi/ Kartegener sendromu	Otozomal resesif
7	39	FSH:7,7 LH:0,05 T:417	46 XY	NORMAL	DNA H5	Ekzon43	c.7160C>A (p.Pro2387His)rs752767295	Heterozi got	Class 3	Primer siliyer diskinezi/ Kartegener sendromu	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S680N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.A307T	Homozi got	Class 3	Düşük FSH	Otozomal resesif

										cevabı	
8	38	FSH:23,84 LH:13,66 T:608	46 XY	NORMAL	-	-	-	-	-	-	-
9	44	FSH:27,38 LH:8,89 T:205	46 XY	NORMAL	DNA H5	Ekzon68	c.11583C>A(p.Ser3861Arg)rs5760967758	Heterozi got	Class 3	Primer siliyer diskinezi/ Kartegener sendromu	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S680N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.A307T	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
10	38	FSH:6,39 LH:2,44 T:250	46 XY	NORMAL	CFTR	Ekzon22	c.3683A>G(p.Glu1228Gly)rs1190355027	Heterozi got	Class 3	Konjenital bilateral vaz deferens eksikliği	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.A307T	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
11	33	FSH:61,15 LH:24,33 T:400	47 XXY	47 XXY	ZMYND15	Ekzon4	c.1027C>T(p.Arg343Trp)rs117858568	Heterozi got	Class 3	Spermatoenez bozukluğu tip 15	Otozomal resesif

					FSHR	Ekzon10	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.A307T	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
12	36	FSH:63,74 LH:19,74 T:19,74	46 XY	NORMAL	LHCG R	Ekzon11	c.1985A>G(p.Asn662Ser)rs200467316	Homozi got	Class 3	LHCGR ilişkili hastalıklar	Otozomal dominant/ Otozomal resesif
13	38	FSH:24,57 LH:5,12 T:323	46 XY	NORMAL	-	-	-	-	-	-	-
14	34	FSH:45,81 LH:14,55 T:<20	46 XY	NORMAL	INSL3	Ekzon2	c.305G>A p.Arg102His rs1219122556 CM036014	Heterozi got	Class 1	Kriptoörşi dizm	Otozomal dominant
					FSHR	Ekzon10	p.S680N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S307N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
15	30	FSH:13,01 LH:5,37 T:288	46 XY	NORMAL	FSHR	Ekzon10	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S307N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif

16	39	FSH:18,2 9 LH:6,73 T:368	46 XY	AZFc Delesyonu	FSHR	Ekzon1 0	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon1 0	p.S307N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
17	30	FSH:57,6 7 LH:38 T:66,8	47 XXY	47 XXY	FSHR	Ekzon1 0	p.S680N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon1 0	p.S307N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
18	44	FSH:33,3 LH:31,73 T:112	47 XXY	47 XXY	FSHR	Ekzon1 0	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon1 0	p.S307N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
19	33	FSH:64,8 6 LH:34,95 T:83,6	47 XXY	47 XXY	CATS PER1	Ekzon6	c.1834C> T (p.Arg12 Cys) rs200131 049	Heterozi got	Class 3	Total fertilizasy on bozukluğu	Otozomal resesif
					TEX1 01	Ekzon5	c.38C>T rs759736 291 (p.Thr131l e	Heterozi got	Class 3	TEX101 ilişkili hastalıklar	Otozomal dominant/ Otozomal resesif
20	40	FSH:16,7 4 LH:6,04 T:148	46 XY	NORMAL	FSHR	Ekzon1 0	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif

					FSHR	Ekzon10	p.S307N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
21	36	FSH:26,94 LH:13,23 T:208	46 XY	NORMAL	FSHR	Ekzon10	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S307N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
22	34	FSH:49,02 LH:34,19 T:131	47 XXY	47 XXY	FSHR	Ekzon10	p.S680N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S307N	Homozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
23	28	FSH:33,98 LH:15,16 T:31,4	47 XXY	47 XXY	CFTR	Ekzon15	c.2562_2563delTG insGA (p.Val855 ile) rs1584813846	Heterozi got	Class 3	Konjenital bilateral vaz deferens eksikliği	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon10	p.S307N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
24	26	FSH:14,38 LH:3,88 T:314	46,X,i(Y)(p10)	AZFα, AZFβ ve AZFγ delesyonu saptanmıştır.	-	-	-	-	-	-	-
25	29	FSH:33,82	46 XY	NORMAL	-	-	-	-	-	-	-

		LH:17,76 T:445									
26	36	FSH:50,9 6 LH:27,29 T:306	46 XY	NORMAL	CFTR	Ekzon1 8	c.2981T> G (p.Phe994 Cys) rs397508 469	Heterozi got	Class 3	Konjenital bilateral vaz deferens eksikliği	Otozomal dominant/ Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon1 0	p.S680N	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif
					FSHR	Ekzon1 0	p.A307T	Heterozi got	Class 3	Düşük FSH cevabı	Otozomal resesif

5. TARTIŞMA

İnfertilite, cinsel yönden aktif, doğum kontrolü yapmayan bir çiftin bir yıl içerisinde gebelik sağlayamamasıdır (2). Dünyadaki tüm çiftlerin yaklaşık % 15'ini etkileyen bir halk sağlığı sorunudur (3). Fertilite için erkekte normal bir spermatogenez, başarılı bir epididimal olgunlaşma ve depolanma, uygun zamanda cinsel ilişki gerekmektedir. İnfertil çiftlerin yarısına yakınında erkek faktörü suçlanmaktadır. Bu erkek kaynaklı infertilitenin %15-30 unu genetik nedenler oluşturmaktadır (121). En sık görülen genetik sebepler cinsiyet kromozom anormallikleri ve Y kromozomu mikrolelesyonlarıdır (122). Ayrıca spermatogenez basamaklarında yer alan genlerde oluşacak mutasyonlarında infertiliteye yol açacağı düşünülmektedir. Oluşacak bu mutasyonlar sperm üretimini, morfolojisini, hareket kabiliyetini ve ejakülat kalitesini bozarak infertiliteye neden olmaktadır.

Şimdiye kadar infertilitenin genetik etyolojisini araştırmak için kromozom anomalileri, Y kromozom mikrolelesyonları, CFTR, DAX1, AZF, CATSPER1, TEX11 gibi mutasyonlar çalışılmıştır. Ancak nonobstrüktif azospermik hastaların genetik etyolojisinin aydınlatılması için bu kadar fazla sayıda genin araştırıldığı bir çalışma olmadığını gördük. Bu çalışmada infertilitede rol aldığı düşünülen 44 adet gen yeni nesil dizileme sistemiyle çalışıldı.

İnfertil erkeklerde yapılan ilk çalışmalar Yq üzerinde azospermi faktör (AZF) olarak adlandırılan bir bölgenin normal spermatogenez üzerinde çok önemli etkisi olduğunu göstermiştir (41). "Azospermi faktörleri" olarak adlandırılan üç bölge (proksimalden distale AZFa, b ve c) spermatogenez lokusları olarak tanımlanmıştır (42). AZF delesyonları AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerine bölünür, azospermi ve şiddetli oligozoosperminin en sık moleküler genetik nedenini temsil eder (42). 2011-2019 yılları arasında Trakya Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Bölümü Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi kliniğine başvuran non-obstrüktif azospermi veya oligozoospermili 446 erkek hastaya kromozom analizi ve Y kromozom mikrolelesyon analizi yapılmış ve 446 vakanın 19'unda (% 4,26) Y kromozom mikrolelesyonu tespit edilmiş (123). Bizim yaptığımız çalışmada ise 26 non-obstrüktif azospermik hastanın 2 tanesinde (% 7,69) AZF delesyonuna rastlanmıştır. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada

normal karyotipli 556 idiyopatik NOA hastasının 67'sinde (% 12.05) Y kromozomunun AZF bölgesinde mikrodelesyon vardı. Görüldüğü gibi sadece NOA hasta grubuyla yapılan çalışmalarda genetik patoloji bulunma oranları normal popülasyona göre çok daha fazla olmaktadır.

Klinefelter sendromu, erkeklerde en sık görülen sex kromozomu anormalliğidir. Bir X kromozomunun fazladan oluşu spermatogenez ve androjen yetersizliğine neden olarak infertiliteye yol açar. Fenotip, normal olarak virilize olmuş bir erkekten, kadınsal saç dağılımı, yetersiz vücut kılı ve geç epifiz kapanması nedeniyle uzun kollar ve bacaklar dahil olmak üzere androjen eksikliği bulgularına kadar değişebilir (28, 29). Genel popülasyonda % 0,1–0,2 oranında ve infertil erkek popülasyonunda % 3,1'e kadar bildirilen yaygınlık mevcuttur (124). Münster Üniversitesi androloji kliniğine 25 yılda başvuran 15600 hastanın 278 tanesi klinefelter olarak belirlenmiş (28). Bizim yaptığımız çalışmada ise 26 non-obstrüktif azoospermik hastadan 6 tanesi (%23,07) 47 XXY klinefelter sendromu olarak belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada örnek verdiğimiz çalışmalardan daha yüksek oranda genetik patoloji bulmamız sadece non-obstrüktif azoospermik hasta grubu ile çalışma yapmamızdan dolayı olduğunu düşünüyoruz. Çünkü karyotip anomalisinin azoospermide prevalansı % 10 ila % 15 iken, oligozoospermide %5, normal sperm sayıları olan hastalarda ise, %1'den azdır (23).

Çalışmamızda araştırdığımız 44 genden biri olan ve 17(%65,38) hastada polimorfizmine rastlanan FSHR geni spermatogenezin başlatılmasında FSH'nin hücreye bağlanmasını sağlayan reseptörü kodlamaktadır. Testisteki sertoli hücrelerinde spermatogenez sağlar. Bu reseptör yokluğunda FSH hücreye bağlanamaz, spermatogenez başlatılamaz. FSHR geni, 9 intron ve 10 eksondan ve bir promoter bölgesinden oluşur ve kromozom 2p21'de bulunur. Mutasyon taraması, FSHR geninde birkaç tek nükleotid polimorfizmi (SNP'ler) tanımlamıştır (125). Bunlar arasında, FSHR geninin ekson 10'undaki 307 ve 680 konumlarındaki bağlantılı SNP'ler daha fazla ilgi görmüştür. Bununla birlikte, FSHR genindeki Thr307Ala ve Asn680Ser polimorfizmleri ile erkek kısırlığı arasındaki olası ilişkileri araştıran birçok çalışmaya rağmen, bulgular belirsizliğini korumaktadır. Buna rağmen FSHR polimorfizmlerinin erkek kısırlığında önemli bir rol oynadığına ait düşünceler mevcuttur. FSHR genindeki Thr307Ala ve Asn680Ser polimorfizmleri ile erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi daha fazla araştırmak için, Kuzey Çin'den 212 infertil ve 164 fertil erkeğin vaka-kontrol

çalışması ile gerçekleştirilen bir meta-analiz yayınlandı (126). Bu çalışmada bulunan FSHR gen polimorfizmlerinin infertil hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek frekansa sahip olduğunu göstermiştir (% 6.6-% 1.8) (126). Çalışmamızda 17 hastada ‘patolojik etkisi belirsiz’ FSHR polimorfizmine rastlandı. Bu 17 hastanın 11’inde (%64,7) FSH seviyeleri normalden yüksek olarak saptandı. Ayrıca 6 kleinefelter hastamızın 5 tanesinde FSHR polimorfizmi tespit edildi ve 6 tanesinde FSH seviyeleri normalden yüksek izlendi. Görüldüğü gibi infertil hastalarda yapılan analizde FSHR polimorfizm oranının yüksek çıktığı belirlenmiştir.

Kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) genindeki mutasyonlar kistik fibrozise (CF) neden olur (127). Bu hastalık, ilerleyici akciğer hastalığı, pankreas disfonksiyonu, yüksek ter elektrolitleri ve erkek kısırlığı ile karakterizedir. Vaz deferensin (CBAVD) konjenital bilateral yokluğundan dolayı hemen hemen tüm CF erkek hastaların kısır olduğu gerçeği göz önüne alındığında, CFTR'nin de tek başına CBAVD nedeniyle kısırlığa dahil olup olmadığı sorusu ortaya çıkmıştır. Küçük bir Fransız çalışmasında, epididim ve vas deferens konjenital aplazisi olan 17 azospermik erkekten yedisinin (% 41) F508del mutasyonu için heterozigot olduğu tespit edilirken, genel popülasyondaki bireylerin sadece % 2,8'inin heterozigot olduğu tespit edilmiştir (128). CFTR geni, genomik seviyede yaklaşık 190 kb genişliğindedir ve 27 ekson içerir, insan kromozomu 7'nin uzun (q) kolundaki q31.2 bölgesinde bulunur. Birçok transkript bulunmuş olmasına rağmen içlerinde en önemlisi ekzon 9 kaybı ile oluşandır (129). Yapılan başka bir çalışmada seçilmemiş oligozoospermik 750 hastanın 9 tanesinde CFTR gen mutasyonuna rastlanmıştır (130). Yakın zamanda Alman popülasyonunda da benzer sonuçlar tanımlanmıştır. Bir heterozigot CFTR mutasyonu, seçilmemiş 597 kısır hastanın 34'ünde (% 5,7) gözlenmiştir (131). Bizim çalışmamızda ise 26 non-obstrüktif azospermik hastanın 5 (%19,23) tanesinde CFTR gen mutasyonuna rastlandı. Mutasyonların her biri farklı lokalizasyonda bulunmaktaydı. Yapılan çalışmalara bakıldığında azospermik hastalarada CFTR gen mutasyonu sıklığının normal popülasyona göre çok daha fazla olduğu görülmüştür. Bizim yaptığımız çalışma da bu hipotezi destekler niteliktedir.

CATSPER1 geni spermatogenezin son aşamasında olgun spermilerin hareket kabiliyeti kazanması sırasında görev alan bir kalsiyum kanalını kodlamaktadır. Bu gendeki mutasyonların sperm flagellumunun hareket kabiliyetini bozacağı, ejakülate sağlıklı hücrelerin ulaşmasına engel olacağı ve bu nedenle infertiliteye yol açacağı

öngörülmektedir. Azospermi veya flagellum anomalisine sahip morfolojisi sağlıklı olmayan spermiler üretilmesi durumunda astenozoospermiden bahsedilmektedir. Sperm motilitesinin bozuk olmasının infertiliteye neden olabileceği bildirilmiştir (132). Bizde yaptığımız çalışmada sadece bir hastamızda (19 numaralı hasta) CATSPER1 mutasyonuna rastladık. 19 numaralı hastamız 47 XXY kromozom analizine sahip olup aynı zamanda TEX101 mutasyonunada sahiptir.

TEX101, germ hücrelerinin bir moleküler markörü olarak tanımlanan bir glikosilfosfatidil inositol (GPI) bağlı glikoproteindir. TEX101'deki arızanın erkek üreme kabiliyetini etkileyebileceğine dair göstergeler olmasına rağmen, tam fizyolojik işlevi ve altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. Son zamanlarda, bir çalışma, TEX101 gen yokluğunda spermin uterotuberal bağlantıdan geçemediğini veya Zona Pellucida'ya bağlanamadığını ve bu da erkek kısırlığına yol açtığını gösterdi. Ayrıca yapılan bir çalışmada TEX101 mutasyonu mevcut farelerden oluşan grupta uterotuberal göç kusurunun bulunduğu ve spermin dışı genital yolunun yüzeyine yapışma kabiliyetinin olmadığıda bulmuşlardır (115). Bizim çalışmamızda ise 19 numaralı klinefelter tanılı hastada TEX101 mutasyonuna rastlanmış olup hastada aynı zamanda CATSPER1 mutasyonu da mevcuttur.

INSL3 geni, C-peptid kodlama alanını kesintiye uğratan bir intron ile iki ekzon içerir ve Janus kinaz 3 (JAK3) genine yakın, kromozom 19'da lokalizedir (35). Prenatal Leydig hücreleri tarafından üretilen INSL3, kemirgenlerde gösterildiği gibi, büyümenin uyarılması ve gubernakulumun farklılaşması yoluyla testis inişinin transabdominal kısmı için gereklidir (51). INSL3 ve LGR8'de amino asit ikamesine yol açan birkaç mutasyon bulunduğundan, insan kriptorşidizmde bir rol öne sürülmüştür. Literatür incelendiğinde, kriptorşidizm veya eski kriptorşidizmi olan erkeklerde % 4-5 mutasyon prevalansı bulundu (53). Testis inişi ve kriptorşidizmdeki rolünün yanı sıra, INSL3 yetişkinlerde olası önemli ancak tanımlanmamış endokrin ve parakrin etkilere sahiptir. Bu hormonun eksikliği, fonksiyonel hipogonadizmin önemli bir belirtisini temsil edebilir (53). Son yapılan bir çalışmada germ hücrelerinde LGR8 ekspresyonunun, INSL3'ün LGR8'e bağlanarak apoptozun baskılanması, INSL3'ün germ hücrelerin hayatta kalmasında etkin bir rol oynadığını düşündürmüştür (133). 135 normal erkek ve 85 testiküler bozukluğu olan erkek hastada serum INSL3 seviyelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada normal erkeklerde serum INSL3 seviyelerinin normal aralıkta olduğunu ve testiküler bozukluğu olan hastalarda düşük olduğunu göstermiştir (134). Bizim

yaptığımız bu çalışmada 14 numaralı hastada INSL3 mutasyonu ve FSHR gen polimorfizmi saptanmıştır. Hastanın bilateral testisleri skrotal yerleşimli olup boyutları normalden küçük izlenmiştir.

İnsülin benzeri hormon-3 (INSL3) ve reseptörü LGR8, luteinize edici hormon (LH) / LH-koryonik gonadotropin reseptörü (LHCGR) sisteminin ve 5 α -redüktaz dahil androjen oluşumu için gerekli olan steroidojenik enzimlerin ve androjen reseptörünün bütünlüğü testisin inguinal kanaldan skrotuma inişte etkili olduğu gösterilmiştir (135). Bu proteinleri kodlayan genlerdeki kusurlar, testisler klinik muayene ile saptanamazsa ve inguinal kanalın yukarısında bulunuyorsa kriptorşidizm adı verilen inmemiş testislerle sonuçlanır. LH ve reseptörünün testis inişinde rol oynadığı iyi bilinmektedir. Hipogonadotropik hipogonadizmi olan veya LHCGR geninin inaktive edici mutasyonları olan hastalarda androjen eksikliği nedeniyle inmemiş testisler vardır (136). 278 normal anatomik bölgesinde olmayan testise sahip hasta, 277 infertil erkek ve 271 normal spermatogeneze sahip erkek kullanılarak yapılan bir çalışmada testis bozukluğu olan hastalarda normal testosteron düzeylerini korumak için yüksek bir LH düzeyinin olduğu, ancak bu LH yüksekliğinin herhangi bir LHCGR genotipi ile ilişkili olmadığını göstermiştir (137). Genellikle kör sonlanan bir vajina ve uterus ve fallop tüplerinin yokluğu ile yetersiz maskülinizasyon ile sonuçlanır. Bazen, inmmiş testisler ve bir mikropenis oluşabilir. Bazal ve hCG ile uyarılan testosteronun serum seviyeleri düşüktür, bazal LH seviyeleri belirgin şekilde yükselmiştir (~20 mIU/ml) ve FSH seviyeleri normaldir. Germ hücreleri genellikle yoktur ve Leydig hücreleri azalır (138). Bizim yaptığımız çalışmada 12 numaralı hastada homozigot olarak LHCGR mutasyonu izlenmiştir.

ZMYND15'in histon deasetilaza bağımlı bir transkripsiyonel baskılayıcı olarak hareket ettiğini ve spermiogenez sırasında haploid hücre genlerinin normal geçici ekspresyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir. ZMYND15'in inaktivasyonu Prm1, Tnp1, Spem1 ve Catpser3 olmak üzere çok sayıda önemli haploid genin transkripsiyonunun erken aktivasyonu ile sonuçlanarak geç spermatidlerin tükenmesine ve erkek kısırlığına neden olmaktadır. ZMYND15, sperm üretimi ve erkek doğurganlığı için gerekli olduğu belirlenen ilk transkripsiyonel baskılayıcıdır (120). Yapılan bir çalışmada şiddetli oligozoospermik 219 hastadan yapılan sanger diziliminde 3 hastada ZMYND15 mutasyonuna rastlanmıştır (139). Bizim yaptığımız çalışmada 11 numaralı kleinfelter sendromlu hastada ZMYND15 mutasyonu ve FSHR gen polimorfizmi izlenmiştir.

Sperm motilitesinin yanı sıra tüm respiratuar yolların ve sinüs yollarının yüzeyini etkileyen bu genetik hastalık İmmotil Silya Sendromu olarak da bilinir. Genellikle ilk şikayetleri infertilite problemi değildir. Doktora başvuru nedenleri daha sık olarak çocukluk döneminde mukusun üst solunum yollarına ve sinüslere doğru olan hareketinin bozulması sonucu gelişen sinüzit ve bronşiektazidir. Primer Siliyer Diskinezi'nin bir tipi olan Kartagener sendromunun kronik bronşit ve bronşiektazi, hareketsiz sperm veya düşük motilitesi ile birlikte olan infertilite ve situs inversus olmak üzere üç komponenti vardır. Bu hastalara tanı koymak için siliyer aksonomal yapıların elektron mikroskopik olarak incelenmesi gerekmektedir (48). Bugüne kadar tanımlanan mutasyonların çoğu DNAH5 (dynein axonemal heavy chain 5) ve DNAI1(dynein axonemal intermediate chain 1) genlerinde gerçekleşmiş olup çok az bir kısmı diğer genleri içerir. Primer siliyer diskinezi hastaların yaklaşık % 50'sinde lateralite defektleri (situs inversus totalis ve daha az yaygın olarak heterotaksi ve konjenital kalp hastalığı) vardır ve bu, embriyolojik nodal siliyanın işlev bozukluğunu yansıtır. Sperm kuyruğundaki aksonemlerde oluşan kusurlar erkek infertilitesine neden olur. Primer siliyer diskinezi olan hastaların çoğunda yenidoğan solunum sıkıntısı öyküsü vardır (49). DNAH5, DNAI1 VE DNAH11 mutasyonlarının araştırıldığı 90 astenozoospermik ve 200 normospermik hasta ile yapılan araştırmada astenozoospermik grupta 7 hastada mutasyona rastlandığı bildirildi (140). Bizim yaptığımız çalışmada 6 numaralı hastada DNAH11, 7 ve 9 numaralı hastalarda DNAH5 class 3 varyantına rastladık. Ayrıca 7 ve 9 numaralı hastalarda FSHR gen polimorfizmi mevcuttu.

Erkek infertilitesinin genetik etiyolojisini tanımlamak amacıyla yapılan bu çalışmada, ACMG 2015 kriterlerine ve in silico veri tabanlarına göre, sadece 14 numaralı hastada patojenik (INSL3), geri kalan olgularda ise çok sayıda 'klinik önemi belirsiz varyant' tespit edilmiştir. Bizim kullandığımız yeni nesil dizileme yöntemi ile daha fazla mutasyon tespit edilebileceğini düşünmekteyiz. Hastaların çoğunda 'klinik önemi belirsiz varyant' bulunmasının sebebi bu konuda yeteri kadar çalışma yapılmamış olması ve bu varyantlar ile infertilite arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılmamış olmasından kaynaklanmaktadır. Bu değişiklikler günümüzde doğrudan infertiliteyle ilişkilendirilmemiş, bir kısmı polimorfizm, bir kısmı ise henüz önemi belirsiz varyant olarak sınıflandırılmıştır. Bu kriterler veri tabanlarının sürekli güncellenmesi ve yeni verilerin eklenmesiyle değişiklik gösterebilir. Bu nedenle yaptığımız çalışmada bulduğumuz bir çok mutasyon ve polimorfizm "klinik önemi

belirsiz varyant” olarak değerlendirilmiş olsada ilerki süreçte ‘patojenik’ varyant olarak kabul edilebilmesi için kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu değişikliklerin infertiliteye neden olup olmadığının anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu, sebebi belirlenemeyen infertilite vakalarında FSHR, DNAH5 ve DNAH11 genleriyle ilgili mutasyonların ve polimorfizmlerin belirlenmesinde tanı testi olarak yeni nesil dizileme yönteminin kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Üroloji ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından infertil hastalarda yapılmıştır. Çalışmamız infertilitenin genetik nedenlerinin anlaşılması için hastalardan periferik kanda kromozom analizi, moleküler karyotipleme ve Yeni Nesil Dizileme yöntemiyle 44 adet gen taranarak yapılmıştır. İnfertil hastalarda ilk defa bu kadar geniş bir genetik analiz yapılması yönüyle özgün bir çalışma olmuştur.

Çalışmamızda 26 hastanın 1 tanesinde ACMG kriterlerine göre patojenik olduğu kabul edilen INSL3 mutasyonu, ayrıca klinik önemi belirsiz varyant olarak 17 hastada FSHR gen polimorfizmi, 5 hastada CFTR mutasyonu, 1 hastada CATSPER1 ve TEX101, 1 hastada LHCGR, 1 hastada ZMYND15, 2 hastada DNAH5, 1 hastada DNAH11 değişikliği tespit edilmiştir. Yapılan kromozom analizinde 6 hastada 47XXY klinefelter sendromu izlendi. Bu hastaların 5 tanesinde FSHR gen polimorfizmi mevcuttu. FSHR polimorfizmi tespit edilmeyen klinefelter sendromlu hastamızın ise CATSPER1 VE TEX101 mutasyonu mevcut olup FSH seviyeleri normalden yüksekti. Yapılan moleküler karyotipleme testlerinde ise 2 hastamızda AZF delesyonu mevcuttu.

Çalışmamızda bulunan ve ACMG kriterlerine ve *in silico* veri tabanlarına göre “klinik önemi belirsiz” olduğu belirtilen çok sayıda değişikliğin patojenik ve/veya olası patojenik olup olmadığı ve infertiliteyle ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceğine karar verilebilmesi için bu genlerle daha fazla vaka ve fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Çıkan sonuçlar göstermiştir ki infertilite şikayeti ile başvuran non-obstrüktif azoospermik hastaların periferik kandan çalışılan kromozom analizi normal olsa dahi infertiliteye neden olan başka genetik değişiklikler olabilir. Altta yatan bu genetik bozuklukların araştırılması infertilitenin nedenini bulmamızda yardımcı olabilir. Bundan dolayı polikliniğimize infertilite şikayeti ile başvuran ve altta yatan

nedenin açıklanamadığı hastalarda sadece kromozom analizi yapmanın yeterli olmadığı, daha derin bir genetik araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmüştür.

KAYNAKÇA

1. Steinbock RT. The Medical Skills of Ancient Egypt. JAMA. 1990;264(23):3074-.
2. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. European Urology. 2012;62(2):324-32.
3. Sengupta P, Dutta S, Tusimin M, Irez T, Krajewska-Kulak E. Sperm counts in Asian men: Reviewing the trend of past 50 years. 2018;7(2):87-92.
4. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. Human Reproduction Update. 2002;8(2):141-54.
5. Dutta S, Biswas A, Sengupta P. Obesity, endocrine disruption and male infertility. 2019;8(5):195-202.
6. Krausz C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2011;25(2):271-85.
7. de Kretser DM. Male infertility. The Lancet. 1997;349(9054):787-90.
8. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. European Journal of Human Genetics. 2002;10(5):303-12.
9. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ, World Health O. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple / Patrick J. Rowe ... [et al.]. Cambridge, Mass. : Cambridge University Press; 1993.
10. Stanwell-Smith RE, Hendry WF. The prognosis of male subfertility: a survey of 1025 men referred to a fertility clinic. British journal of urology. 1984;56(4):422-8.
11. Abdel-Meguid TA. Predictors of Sperm Recovery and Azoospermia Relapse in Men With Nonobstructive Azoospermia After Varicocele Repair. The Journal of Urology. 2012;187(1):222-6.

12. Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Human Reproduction Update*. 2007;13(6):539-49.
13. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. *PROMETHEUS Anatomi Atlası* 2005.
14. Pask A. The Reproductive System. *Adv Exp Med Biol*. 2016;886:1-12.
15. Lewis JM, Kaplan WE. Anatomy and embryology of the male reproductive tract and gonadal development. In: Niederberger CS, Lipshultz LI, Howards SS, editors. *Infertility in the Male*. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p. 1-13.
16. PK. K. Surgical, Radiographic, and Endoscopic Anatomy of the Male Reproductive System. 2020. In: *Campbell-Walsh-Wein Urology* 2020. [6332-405]. p.
17. Carlson BM. Chapter 16 - Urogenital System. In: Carlson BM, editor. *Human Embryology and Developmental Biology (Fifth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2014. p. 376-407.
18. Marshall FF. Embryology of the lower genitourinary tract. *Urol Clin North Am*. 1978;5(1):3-15.
19. Trevisan CM, Montagna E, de Oliveira R, Christofolini DM, Barbosa CP, Crandall KA, et al. Kisspeptin/GPR54 System: What Do We Know About Its Role in Human Reproduction? *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;49(4):1259-76.
20. Heindel J, Treinen K. Physiology of the Male Reproductive System: Endocrine, Paracrine and Autocrine Regulation. *Toxicologic pathology*. 1989;17:411-45.
21. Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N. The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens, Greece)*. 2015;14(4):479-503.
22. Heller CG, Clermont Y. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science (New York, NY)*. 1963;140(3563):184-6.
23. Ratbi I, Legendre M, Niel F, Martin J, Soufir J-C, Izard V, et al. Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene rearrangements enriches the mutation spectrum in congenital bilateral absence of the vas deferens and impacts on genetic counselling. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2007;22:1285-91.
24. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore medical journal*. 2009;50(4):336-47.
25. Johnson MD. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertility and Sterility*. 1998;70(3):397-411.
26. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al. Cytogenetics of infertile men. *Human Reproduction*. 1996;11(suppl_4):1-26.

27. VINCENT M-C, DAUDIN M, DE MAS P, MASSAT G, MIEUSSET R, PONTONNIER F, et al. Cytogenetic Investigations of Infertile Men With Low Sperm Counts: A 25-Year Experience. 2002;23(1):18-22.
28. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. The Lancet. 2004;364(9430):273-83.
29. KLINEFELTER HF, JR., REIFENSTEIN EC, JR., ALBRIGHT F, JR. Syndrome Characterized by Gynecomastia, Aspermatogenesis without A-Leydigism, and Increased Excretion of Follicle-Stimulating Hormone¹. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1942;2(11):615-27.
30. Ramasamy R, Ricci JA, Palermo GD, Gosden LV, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Successful Fertility Treatment for Klinefelter's Syndrome. 2009;182(3):1108-13.
31. Fales CL, Knowlton BJ, Holyoak KJ, Geschwind DH, Swerdloff RS, Gonzalo IG. Working memory and relational reasoning in Klinefelter syndrome. Journal of the International Neuropsychological Society. 2003;9(6):839-46.
32. Ishikawa T, Yamaguchi K, Kondo Y, Takenaka A, Fujisawa M. Metabolic syndrome in men with Klinefelter's syndrome. Urology. 2008;71(6):1109-13.
33. Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. Cytogenetic and Genome Research. 2005;111(3-4):317-36.
34. Vogt P, Edelmann A, Hirschmann P, Kohler M. The azoospermia factor (AZF) of the human Y chromosome in Yq11: function and analysis in spermatogenesis %J Reproduction, Fertility and Development. 1995;7(4):685-93.
35. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. Reproductive Toxicology. 2006;22(2):133-41.
36. Alves C, Carvalho F, Cremades N, Sousa M, Barros A. Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia: cytogenetic and molecular studies. European Journal of Human Genetics. 2002;10(8):467-74.
37. Therman E, Susman M. Human chromosomes: Structure, behavior, and effects: Springer-Verlag, New York, NY (United States); 1993. Medium: X; Size: 393 p. p.
38. De Braekeleer M, Dao T-N. REVIEW: Cytogenetic studies in male infertility. Human Reproduction. 1991;6(2):245-50.
39. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum Genet. 1976;34(2):119-24.
40. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Prognostic value of Y deletion analysis: The role of current methods. Human Reproduction. 2001;16(8):1543-7.

41. Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Molecular Human Reproduction*. 1998;4(8):739-44.
42. Vog PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y Chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*. 1996;5(7):933-43.
43. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. 2004;27(4):240-9.
44. Blagosklonova O, Florence F, Clavequin M, Roux C, Bresson J. AZFa deletions in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study. *Molecular human reproduction*. 2000;6:795-9.
45. Collier B, Gorgoni B, Loveridge C, Cooke HJ, Gray NK. The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *The EMBO journal*. 2005;24(14):2656-66.
46. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC. Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Human Reproduction*. 1998;13(12):3332-7.
47. De Braekeleer M, Férec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Molecular Human Reproduction*. 1996;2(9):669-77.
48. Rutland J, De longh RU. Random Ciliary Orientation. 1990;323(24):1681-4.
49. Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, et al. Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genetics in Medicine*. 2009;11(7):473-87.
50. Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, et al. Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. 2006;65(5):606-10.
51. Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nature Genetics*. 1999;22(3):295-9.
52. Overbeek PA, Gorlov IP, Sutherland RW, Houston JB, Harrison WR, Boettger-Tong HL, et al. A transgenic insertion causing cryptorchidism in mice. 2001;30(1):26-35.
53. Ferlin A, Foresta C. The *INSL3-LGR8* Hormonal System in Humans: Testicular Descent, Cryptorchidism and Testicular Functions. *Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*. 2005;5(5):421-9.
54. von Eckardstein S, Syska A, Gromoll Jr, Kamischke A, Simoni M, Nieschlag E. Inverse Correlation between Sperm Concentration and Number of Androgen Receptor CAG Repeats in Normal Men1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(6):2585-90.

55. Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ, Jr. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. *American journal of human genetics*. 1997;60(1):229-30.
56. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005;16(8):368-73.
57. Cendron M, Keating MA, Huff DS, Koop CE, Snyder HM, 3rd, Duckett JW. Cryptorchidism, orchiopexy and infertility: a critical long-term retrospective analysis. *J Urol*. 1989;142(2 Pt 2):559-62; discussion 72.
58. Nalesnik JG, Sabanegh ES, Jr., Eng TY, Buchholz TA. Fertility in men after treatment for stage 1 and 2A seminoma. *American journal of clinical oncology*. 2004;27(6):584-8.
59. Hassan MAM, Killick SR. Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertility and Sterility*. 2003;79:1520-7.
60. Krassas GE, Poppe K, Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocrine reviews*. 2010;31(5):702-55.
61. Masarani M, Wazait H, Dinneen M. Mumps orchitis. *J R Soc Med*. 2006;99(11):573-5.
62. Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peipert JF. Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;216(1):1-9.
63. Wallach EE, Schlegel PN, Chang TSK, Marshall FF. Antibiotics: potential hazards to male fertility. *Fertility and Sterility*. 1991;55(2):235-42.
64. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. Timing of Sexual Intercourse in Relation to Ovulation — Effects on the Probability of Conception, Survival of the Pregnancy, and Sex of the Baby. 1995;333(23):1517-21.
65. Clarke GN. A.R.T. and history, 1678–1978. *Human Reproduction*. 2006;21(7):1645-50.
66. Lu JC, Huang YF, Lü NQ. [WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: its applicability to andrology laboratories in China]. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology*. 2010;16(10):867-71.
67. Carlsen E, Petersen JH, Andersson A-M, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertility and Sterility*. 2004;82(2):358-66.
68. McLachlan RI, Gordon Baker HW, Clarke GN, Harrison KL, Matson PL, Holden CA, et al. Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathology*. 2003;35(1):25-33.
69. Campbell Walsh Urology. Tenth edition Volume 22012. p. 616-47.
70. Sigman M, Jarow JP. Endocrine evaluation of infertile men. *Urology*. 1997;50(5):659-64.

71. Turek PJ, Kim M, Gilbaugh JH, 3rd, Lipshultz LI. The clinical characteristics of 82 patients with Sertoli cell-only testis histology. *Fertil Steril*. 1995;64(6):1197-200.
72. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Human Reproduction*. 2001;16(5):972-8.
73. Hadziselimovic F. Cryptorchidism, Its Impact on Male Fertility. *European Urology*. 2002;41(2):121-3.
74. Yu XC, Li MJ, Cai FF, Yang SJ, Liu HB, Zhang HB. A new TEX11 mutation causes azoospermia and testicular meiotic arrest. *Asian journal of andrology*. 2021.
75. Hare WCD, Singh EL. Cytogenetics in animal reproduction. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux.; 1979. 138 pp. p.
76. Kannan TP, Zilfalil BA. Cytogenetics: past, present and future. *Malays J Med Sci*. 2009;16(2):4-9.
77. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science (New York, NY)*. 1992;258(5083):818.
78. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics*. 1998;20(2):207-11.
79. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(1):31-46.
80. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(11):745-55.
81. Xi R, Kim T-M, Park PJ. Detecting structural variations in the human genome using next generation sequencing. *Briefings in Functional Genomics*. 2011;9(5-6):405-15.
82. Dolled-Filhart MP, Lee M, Ou-Yang C-w, Haraksingh RR, Lin JC-H. Computational and bioinformatics frameworks for next-generation whole exome and genome sequencing. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:730210.
83. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015;17(5):405-23.
84. Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nature Genetics*. 2007;39(5):661-5.

85. Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LLH, Kahrizi K, et al. Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;84(4):505-10.
86. Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattani D, Pariente A, Thulliez M, et al. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *European Journal of Human Genetics*. 2003;11(7):497-502.
87. Dufau ML, Tsai-Morris C-H. Gonadotropin-regulated testicular helicase (GRTH/DDX25): an essential regulator of spermatogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2007;18(8):314-20.
88. Ding Z-j, Wang T, Chong K, Bai S. Isolation and characterization of OsDMC1, the rice homologue of the yeast DMC1 gene essential for meiosis. *Sexual Plant Reproduction*. 2001;13(5):285-8.
89. Bartoloni L, Blouin J-L, Pan Y, Gehrig C, Maiti AK, Scamuffa N, et al. Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(16):10282.
90. Drick N, Dahlmann J, Sahabian A, Haase A, Göhring G, Lachmann N, et al. Generation of two human induced pluripotent stem cell lines (MHHi017-A, MHHi017-B) from a patient with primary ciliary dyskinesia carrying a homozygous mutation (c.7915C > T [p.Arg2639*]) in the DNAH5 gene. *Stem Cell Research*. 2020;46:101848.
91. Guichard C, Harricane M-C, Lafitte J-J, Godard P, Zaegel M, Tack V, et al. Axonemal Dynein Intermediate-Chain Gene (DNAI1) Mutations Result in Situs Inversus and Primary Ciliary Dyskinesia (Kartagener Syndrome). *The American Journal of Human Genetics*. 2001;68(4):1030-5.
92. Zhu F, Gong F, Lin G, Lu G. DPY19L2 gene mutations are a major cause of globozoospermia: identification of three novel point mutations. *Molecular Human Reproduction*. 2013;19(6):395-404.
93. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. Association of polymorphisms in the estrogen receptors alpha, and beta (ESR1, ESR2) with the occurrence of male infertility and semen parameters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2010;122(4):193-203.
94. Bonaparte E, Moretti M, Colpi GM, Nerva F, Contalbi G, Vaccalluzzo L, et al. ESX1 gene expression as a robust marker of residual spermatogenesis in azoospermic men. *Human Reproduction*. 2010;25(6):1398-403.
95. Dai L, Zhao Z, Zhao R, Xiao S, Jiang H, Yue X, et al. Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH beta-subunit gene on semen quality and fertility in bulls. *Animal Reproduction Science*. 2009;114(1):14-22.
96. Antelli A, Baldazzi L, Balsamo A, Pirazzoli P, Nicoletti A, Gennari M, et al. Two novel GnRHR gene mutations in two siblings with hypogonadotropic hypogonadism %J *European Journal of Endocrinology* eur j endocrinol. 2006;155(2):201.

97. Yatsenko AN, Roy A, Chen R, Ma L, Murthy LJ, Yan W, et al. Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoal RNA: KLHL10 mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization. *Human Molecular Genetics*. 2006;15(23):3411-9.
98. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenetic and Genome Research*. 1990;54(1-2):77-9.
99. Kusz-Zamelczyk K, Sajek M, Spik A, Glazar R, Jędrzejczak P, Latos-Bieleńska A, et al. Mutations of *NANOS1*, a human homologue of the *Drosophila* morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-astheno-teratozoospermia. *Journal of Medical Genetics*. 2013;50(3):187.
100. Fabbri-Scaliet H, de Sousa LM, Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G, de Mello MP. Mutation update for the NR5A1 gene involved in DSD and infertility. 2020;41(1):58-68.
101. Lee HC, Arny M, Grow D, Dumesic D, Fissore RA, Jellerette-Nolan T. Protein phospholipase C Zeta1 expression in patients with failed ICSI but with normal sperm parameters. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2014;31(6):749-56.
102. Imken L, Rouba H, El Houate B, Louanjli N, Barakat A, Chafik A, et al. Mutations in the protamine locus: association with spermatogenic failure? *Molecular Human Reproduction*. 2009;15(11):733-8.
103. Yelumalai S, Kashir J, Jones C, Bagheri H, Oo SL, McLaren L, et al. Clinician-induced (iatrogenic) damage incurred during human infertility treatment: Detrimental effects of sperm selection methods and cryopreservation upon the viability, DNA integrity, and function of human sperm. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2012;1(1):69-75.
104. Ayers K, Kumar R, Robevska G, Bruell S, Bell K, Malik MA, et al. Familial bilateral cryptorchidism is caused by recessive variants in *RFXP2*. *Journal of Medical Genetics*. 2019;56(11):727.
105. Kuo Y-C, Lin Y-H, Chen H-I, Wang Y-Y, Chiou Y-W, Lin H-H, et al. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. 2012;33(4):710-9.
106. Vanbillemont G, Bogaert V, De Bacquer D, Lapauw B, Goemaere S, Tøye K, et al. Polymorphisms of the SHBG gene contribute to the interindividual variation of sex steroid hormone blood levels in young, middle-aged and elderly men. 2009;70(2):303-10.
107. Mäkelä S, Eklund R, Lähdetie J, Mikkola M, Hovatta O, Kere J. Mutational analysis of the human SLC26A8 gene: exclusion as a candidate for male infertility due to primary spermatogenic failure. *Molecular Human Reproduction*. 2005;11(2):129-32.
108. Dam AHDM, Kosciński I, Kremer JAM, Moutou C, Jaeger A-S, Oudakker AR, et al. Homozygous Mutation in SPATA16 Is Associated with Male Infertility in Human Globozoospermia. *The American Journal of Human Genetics*. 2007;81(4):813-20.

109. Karimian M, Nikzad H, Azami-Tameh A, Taherian A, Darvishi FZ, Haghighatnia MJ. SPO11-C631T Gene Polymorphism: Association With Male Infertility and an in Silico-Analysis. *Journal of family & reproductive health*. 2015;9(4):155-63.
110. Llano E, Gomez-H L, García-Tuñón I, Sánchez-Martín M, Caburet S, Barbero JL, et al. STAG3 is a strong candidate gene for male infertility. *Human Molecular Genetics*. 2014;23(13):3421-31.
111. Maor-Sagie E, Cinnamon Y, Yaacov B, Shaag A, Goldsmidt H, Zenvirt S, et al. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015;32(6):887-91.
112. Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *The Lancet*. 2003;362(9397):1714-9.
113. Ayhan Ö, Balkan M, Guven A, Hazan R, Atar M, Tok A, et al. Truncating mutations in *TAF4B* and *ZMYND15* causing recessive azoospermia. *Journal of Medical Genetics*. 2014;51(4):239.
114. Akinloye O, Gromoll J, Callies C, Nieschlag E, Simoni M. Mutation analysis of the X-chromosome linked, testis-specific TAF7L gene in spermatogenic failure. 2007;39(5):190-5.
115. Li W, Guo X-J, Teng F, Hou X-J, Lv Z, Zhou S-Y, et al. Tex101 is essential for male fertility by affecting sperm migration into the oviduct in mice. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2013;5(5):345-7.
116. Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, et al. X-Linked TEX11 Mutations, Meiotic Arrest, and Azoospermia in Infertile Men. 2015;372(22):2097-107.
117. Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I. Possible role of USP26 in patients with severely impaired spermatogenesis. *European Journal of Human Genetics*. 2005;13(3):336-40.
118. Luddi A, Margollicci M, Gambera L, Serafini F, Cioni M, De Leo V, et al. Spermatogenesis in a Man with Complete Deletion of USP9Y. 2009;360(9):881-5.
119. Rohozinski J. Lineage-independent retrotransposition of UTP14 associated with male fertility has occurred multiple times throughout mammalian evolution. 2017;4(12):171049.
120. Yan W, Si Y, Slaymaker S, Li J, Zheng H, Young DL, et al. Zmynd15 Encodes a Histone Deacetylase-dependent Transcriptional Repressor Essential for Spermiogenesis and Male Fertility*. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(41):31418-26.
121. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007;14(6):734-45.
122. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis*. *Endocrine reviews*. 2001;22(2):226-39.

123. Yalcintepe S, Eker D, Gurkan H. THE FREQUENCY OF Y CHROMOSOME MICRODELETIONS AND CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN CASES WITH MALE INFERTILITY FROM THRACE REGION: SINGLE CENTER EXPERIENCE/TRAKYA BOLGESI ERKEK INFERTILITE OLGULARINDA Y KROMOZOM MIKRODELESYONLARI VE SITOGENETIK ANOMALILERIN SIKLIGI: TEK MERKEZ DENEYIMI. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*. 2021;84:27+.
124. Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Århus, Denmark. *Hum Genet*. 1991;87(1):81-3.
125. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function. *Endocrine reviews*. 2000;21(5):551-83.
126. Wu XQ, Xu SM, Wang YQ, Li Q, Wang ZQ, Zhang CL, et al. FSHR gene Thr307Ala and Asn680Ser polymorphisms in infertile men: An association study in North China and meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14:5592-601.
127. Augarten A, Yahav Y, Laufer J, Szeinberg A, Dor J, Mashiach S, et al. Congenital bilateral absence of vas deferens in the absence of cystic fibrosis. *The Lancet*. 1994;344(8935):1473-4.
128. Dumur V, Gervais R, Rigot J-M, Lafitte J-J, Manouvrier S, Biserte J, et al. Abnormal distribution of CF $\Delta F508$ allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *The Lancet*. 1990;336(8713):512.
129. Chu C-S, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genetics*. 1993;3(2):151-6.
130. Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic Abnormalities among Severely Oligospermic Men Who Are Candidates for Intracytoplasmic Sperm Injection. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(1):152-6.
131. Schulz S, Jakubiczka S, Kropf S, Nickel I, Muschke P, Kleinstein J. Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. *Fertility and Sterility*. 2006;85(1):135-8.
132. Ren D, Xia J. Calcium Signaling Through CatSper Channels in Mammalian Fertilization. 2010;25(3):165-75.
133. Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun S-Y, Pisarska M, Morita H, et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(19):7323.
134. Bay K, Hartung S, Ivell R, Schumacher M, Jürgensen D, Jorgensen N, et al. Insulin-Like Factor 3 Serum Levels in 135 Normal Men and 85 Men with Testicular Disorders: Relationship to the Luteinizing Hormone-Testosterone Axis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(6):3410-8.

135. Adham IM, AgoulNIK AI. Insulin-like 3 signalling in testicular descent. 2004;27(5):257-65.
136. Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE. Luteinizing hormone in testicular descent. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007;269(1):34-7.
137. Simoni M, Tüttelmann F, Michel C, Böckenfeld Y, Nieschlag E, Gromoll J. Polymorphisms of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene: association with mal descended testes and male infertility. 2008;18(3):193-200.
138. Layman LC. Human gene mutations causing infertility. *Journal of Medical Genetics*. 2002;39(3):153.
139. Hu T-Y, Zhang H, Meng L-L, Yuan S-M, Tu C-F, Du J, et al. Novel homozygous truncating variants in ZMYND15 causing severe oligozoospermia and their implications for male infertility. 2021;42(1):31-6.
140. Zuccarello D, Ferlin A, Cazzadore C, Pepe A, Garolla A, Moretti A, et al. Mutations in dynein genes in patients affected by isolated non-syndromic asthenozoospermia. *Human Reproduction*. 2008;23(8):1957-62.