



Kriptorşidizimli Kardeşlerin Sitogenetik ve Y Kromozomu Moleküler Analizleri⁺

Gülay Güleç Ceylan*, Derya Devenci**, Hüseyin Yüce**, Halit Elyas**

* Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Bölümü, Ankara

** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Elazığ

Amaç: Kriptorşidizm, en sık görülen konjenital anomalilerden birisidir. Testiküler iniş bozuklukları vakaların %10-15'inde bilateral olarak oluşur. Bilateral ve unilateral formların her ikisi de bozulmuş spermatogenezin iyi bilinen nedenlerindedir. Kriptorşidizm etyolojisi multifaktöriyeldir. Bu hastalar normal sperm üretimine sahiptir. Y kromozomu uzun kolu ökromatik bölgesindeki mikrolezyonlara neden olabilen azospermi faktörleri kriptorşidizmde genetik bir temelin varlığını ortaya koymaktadır. Özellikle ailesel tekrarlardan dolayı kriptorşidizmin genetik etyolojisi olduğu önerilmiştir. Bu çalışmanın amacı, kriptorşidizimli kardeşlerde Y kromozom mikrolezyonu bulunup bulunmadığı ve kriptorşidizimli ailelerde Y kromozom mikrolezyonlarının etyolojik bir rolü olup olmadığını tespit etmektir.

Materyal Metod: Fırat Üniversitesi Tıp Merkezi Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarına inmemiş testis açısından gönderilen 3 erkek kardeşin karyotip analizleri konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle yapıldı. Y kromozomu mikrolezyonları varlığını saptamak üzere delesyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak moleküler analizleri yapıldı.

Bulgular: Olguların karyotipleri normal olarak tespit edildi. Her üç kardeşte de herhangi bir Y kromozom mikrolezyonuna rastlanmadı.

Sonuç: Üç kardeşte birden kriptorşidizm bulunması genetik bir etyolojiyi düşündürmektedir. Fakat yapılan sitogenetik ve moleküler incelemelerde herhangi bir anomali saptanmaması çevresel etkenlerin de multifaktöriyel kalıtımlı kriptorşidizm etyolojisinde oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Kriptorşidizimli bireylerdeki infertilite etyolojisinde diğer genlerin (SOX9, KALIG1, kistik fibrozis transmembran regülatör geni gibi genlerin mutasyonları) de etkili olabileceğini unutmamak gerekir.

Anahtar Kelimeler: Kriptorşidizm, Mutasyon, Kromozomal Anomali.

Cytogenetic and Molecular Analysis of Y Chromosome of Cryptorchid Brothers

Aim: Cryptorchidism is the most frequent abnormality seen in the male reproduction system. Cryptorchidism occurs bilaterally in 10–15% of the cases. Bilateral and unilateral types of cryptorchidism are well known causes of impaired spermatogenesis. The aetiology of cryptorchidism is probably multifactorial. The patients have normal sperm production. Azoospermia factors which are responsible from the microdeletions of Y, manifest the genetic basis of cryptorchidism. The genetic aetiology of cryptorchidism has been proposed especially because of the familial repeats. The aim of this study is to determine if there is Y chromosome microdeletions in cryptorchid brothers and if there is an aetiological role of Y chromosome microdeletions in families with cryptorchidism.

Material Method: Three brothers applied to Fırat Medical Center, Department of Medical Genetics because of cryptorchidism. Karyotype analysis were performed for the patients by conventional cytogenetic methods. To determine the Y chromosome microdeletions, molecular analysis was performed by using deletion specific PCR.

Results: The karyotypes and molecular analyses were normal.

Conclusion: Cryptorchidism in three brothers make us think a genetic basis for the aetiology. But the normal results show that environmental causes are also efficient in multifactorial inherited cryptorchidism. Other genes must also be taken into consideration in the aetiology of cryptorchidism.

Key Words: Cryptorchidism, Mutation, Chromosomal Anomaly.

+Çalışma 6-9 Mayıs tarihleri arasında Çanakkale'de düzenlenen VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi'nde tebliğ edilmiştir

Kriptorşidizm, en sık görülen konjenital anomalilerden birisidir.¹ Doğumda %4-5 sıklıkta görülür.

Spontan testiküler inmeler yenidoğan döneminde oluşabilir ve hayatın ilk yılında %1'e düşmektedir.

Başvuru Tarihi: 08.04.2009, Kabul Tarihi: 27.10.2009

Erişkin dönemde de bu şekilde kalır. Testiküler iniş bozuklukları vakaların %10-15'inde bilateral olarak oluşur. Bilateral ve unilateral formların her ikisi de bozulmuş spermatogenezin iyi bilinen nedenlerindedir. Bozulmuş fertilitéyle birlikte, kriptorşid hastalarda testiküler kanser gelişme riski de artmaktadır.

Patogenezi halen belirsizdir, altta yatan testisin herhangi bir bozukluğu veya kriptorşidizm lokalizasyonu sonucu olabilir.² Kriptorşidizm etyolojisi muhtemelen multifaktöriyeldir, testiküler inişi bozan ekstrinsik (extragonadal) veya intrinsik (gonadal) nedenlere bağlı olabilir. Extrinsik patogenezi, testiküler inişte defekt olduğunda veya hormonal anomaliler sonucu oluşabilir. Böyle vakalarda kriptorşid testisin testiküler hasarı abdomende uzun süreli kalışına bağlı olabilir.^{2,3}

Gerçekte, bu formda normal inmiş testis normal veya hipertrofik olabilir. Bu hastalar normal sperm üretimine sahiptir. İntrinsik gonadal nedenlerden tek taraflı kriptorşidizmin bilateral testiküler hasarla birlikte olduğu durumlarda şüphelenilir.

Bu hipotez, kontrateral testisten köken alan testiküler kanser varlığıyla teyid edilebilir. Son zamanlarda, bir azospermi faktörünün (AZF) bulunduğu Y kromozomu uzun kolu ökromatik bölgesindeki mikrodelesyonlara bağlı oluşan primer testikülopatilerdeki genetik bir temelin varlığı gösterilmiştir.² AZF için iki aday gen ailesi bildirilmiştir.

Bunlar RNA-binding motif (RBM) ve DAZ (deleted in azoospermia) genleridir. Bu genler dışında, Yq üzerinde yer alan ve spermatogenez düzenlenmesinde rolü olan genler de bulunmaktadır ve Yq11'de AZFa, AZFb ve AZFc olarak tanımlanmış 3 çakışmayan bölge tanımlanmıştır. AZFc'de DAZ, AZFb'de RBM'in 3 fonksiyonel kopyası tanımlanmıştır. Yq mikrodelesyonları idyopatik azospermi veya ciddi oligosperminin %10-15 nedenini oluşturmaktadır. Ciddi idyopatik primer testikülopatilerde bu oran daha yüksektir.

Kriptorşidizm pek çok konjenital sendromla ilişkili olabilir. Ailesel tekrarlardan dolayı kriptorşidizmin genetik etyolojisi olduğu önerilmiştir. Şu ana kadar sadece bir kriptorşid vakada Yq delesyonu saptanmıştır, bu vakadaki diğer özellikler ise küçük çene, yüksek damak ve mental retardasyondur.²⁻⁴

Kriptorşidizmin fizik muayenesinde skrotumda testisler palpe edilemez.⁵ Testiküler kanserlerin %10'u inmemiş testis sonucunda ortaya çıkar.⁶ Tek taraflı kriptorşidizm öyküsü olan erkeklerin yaklaşık olarak %30'unda, çift taraflı kriptorşidizm olanların ise %50'sinde oligospermi tespit edilmiştir.

İdyopatik infertiliteden olduğu kadar fenotipik olarak tek taraflı kriptorşidizmi olan bireylerde ciddi bilateral testiküler hasardan Yq mikrodelesyonları sorumlu olabilir.³ Erkek genitalya gelişiminden sorumlu olan, Y kromozomu ve otozomların üzerinde yer alan çok sayıda gen bulunmaktadır. Y kromozomu kısa kolu

üzerinde yer alan belirleyici faktör ise SRY (Sex Determining Region of Y) genidir.¹

Miadında yenidoğanlarda insidansı yaklaşık olarak %3 iken, preterm doğumlarda bu oran %33'e kadar çıkabilir.⁷ Büyüme çağında bu oran 1'e kadar inebilir.¹ Vakaların %10-15'inde bilateral olarak kriptorşidizm oluşur.^{8,9} Muhtemel nedenler ve risk faktörleri endokrinolojik bozukluklar, anatomik anomaliler, çevresel ve genetik faktörlerdir.^{10,11}

Bu çalışmanın amacı, kriptorşidizimli kardeşlerde Y kromozom mikrodelesyonu bulunup bulunmadığını saptamak ve kriptorşidizimli ailelerde Y kromozom mikrodelesyonlarının etyolojik bir rolü olup olmadığını tespit etmektir.

Materyal ve Metod

İnmemiş testis nedeniyle Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri kliniğine başvuran 3 erkek kardeşte genetik bir etyolojiden şüphelenildiğinden, hastalar Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarına yönlendirildiler. Hastaların karyotiplerinin ortaya konması için PHA indüklenmiş periferik kan lenfositleri kullanılarak 72 saatlik kültür yapıldı. Kültür sonrası elde edilen metafaz preparatları tripsin giemsa bantlama yöntemi (GTG) kullanılarak boyandı. Olguların incelemesinde, her bir hücrede en az 30 metafaz değerlendirildi. Kromozomal anormallikler, International System For Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2005'e göre rapor edildi.¹²

Hastalarda inmemiş testisle birlikte Y kromozomu mikrodelesyonu bulunup bulunmadığını anlamak için moleküler analiz yapıldı. Bunun için hastalardan alınan venöz kandan DNA izolasyonu, DNA purifikasyon kiti (Promega Cat.#1125) kullanılarak gerçekleştirildi. DNA örnekleri PCR ile çoğaltıldı. PCR koşulları ve primerler Simoni ve arkadaşlarınınca belirlenen protokole göre uygulandı.¹³

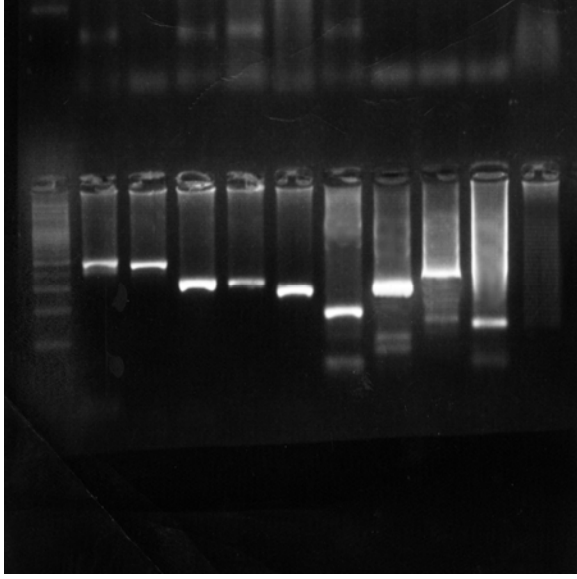
Primerler sY14 (SRY), ZFY, AZFa (sY84, sY86), AZFb (sY127, sY133, sY134) ve AZFc (sY254, sY255) bölgeleri için kullanıldı. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında değerlendirildi ve fotoğraflandı. Her üç kardeşten de bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Bulgular

Laboratuvarımıza gönderilen hastaların periferik kan metafazlarından yapılan sitogenetik inceleme sonucunda, her üç kardeşin de karyotipi normal (46, XY) olarak değerlendirildi. Daha sonra yapılan moleküler analizlerinde ise Y kromozom mikrodelesyonuna rastlanmadı, bu da daha önceki çalışmalara uygun olarak

Kriptorşidizimli Kardeşlerin Sitogenetik ve Y Kromozomu Moleküler Analizleri

değerlendirildi. Bir hastaya ait Y kromozomu mikrodelsiyon analiz sonucu Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Hastalardan birinin Y kromozom mikrodelsiyonu analizine yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 1: 100 bp'lik DNA boyut markırı, Sütun 2: ZFY/ZFX, Sütun 3: SRY, Sütun 4: sY84, Sütun 5: sY86, Sütun 6: sY127, Sütun 7: sY133, Sütun 8: sY134, Sütun 9: sY254, Sütun 10: sY255, Sütun 11: Bidistile su (negatif kontrol).

Tartışma

Kriptorşidizimli hastalarda Y kromozom mikrodelsiyonlarının tam olarak değerlendirilmesi henüz yapılmamıştır. Aslında aralarındaki korelasyonu tam olarak değerlendirebilmek mümkün değildir.¹

Kriptorşidizm, kromozom anomalileri veya tek gen hastalıklarına bağlı pek çok konjenital sendromla ilişkili olabilir. Kriptorşidizimli hastalarda HOXA10 geninde mutasyon, androjen reseptör geninde mutasyon veya Y kromozomu uzun kolundaki mikrodelsiyonlar gibi farklı genetik anomalilerle birlikte olabilir. Yapılan bir çalışmada kriptorşidizimli Türk çocuklarında Y kromozom mikrodelsiyonuna rastlanmamıştır.

Y kromozomu üzerinde yer alan fakat çalışılmayan bölgeler olabilir. Y kromozom mikrodelsiyonu ile kriptorşidizm arasında bir ilişki yok gibi görünse de genetik anomalilerin yavruya geçme ihtimalinden dolayı kriptorşid hastalarda Y kromozom mikrodelsiyon taraması önemlidir.¹

Kriptorşid babaların %1.5-4'ünün oğullarında, erkek kardeşlerden ise %6.2 diğer kardeşte kriptorşidizm tespit edilmiştir.² Bu kalıtım otozomal bir genin veya Y

kromozomu üzerindeki bir genin rolü olduğunu düşündürmektedir.

Bu tip vakalar genellikle kompleks bir sendromun parçasıdır ve hemen her zaman çift taraflıdır.²⁻¹⁴ Yapılan bir çalışmada kriptorşid hastaların düşük bir oranında erkek germ hücre gelişiminde önemli olduğuna inanılan Y kromozomunda delesyonlara rastlanmıştır. Gözlenen bu Yq mikrodelsiyonları fenotipik olarak tek taraflı kriptorşidizm olarak kendini gösteren ciddi bilateral testiküler hasardan sorumlu olabilir.² Y kromozom mikrodelsiyonları (AZF gen bölgesi) testiküler hasardan sorumlu olabilir, bu da inmemiş testis gelişimine neden olabilir. Kriptorşidizimli hastalarda Y kromozom mikrodelsiyonuna rastlanmadığını gösteren birçok çalışma vardır.¹

Bu çalışmada 3 erkek kardeşteki kriptorşidizm varlığının sitogenetik olarak veya Y kromozomu üzerinde yer alan genlerle bir ilişkisi olup olmadığı araştırılmıştır, ancak her üç kardeşin de karyotipinin normal olduğu tespit edilmiş olup, aralarında herhangi bir korelasyon, daha önceki çalışmalarda olduğu gibi bulunamamıştır. Çalışmanın devamı olarak Y kromozomunun diğer bölgelerinin delesyonları veya farklı genetik nedenler kriptorşidizmin muhtemel nedenleri olarak literatür bilgileri ışığında araştırılabilir.

Kaynaklar

1. Gurbuz N, Ozbay B, Aras B, Tasci AI. Do microdeletions in the AZF region of the Y chromosome accompany cryptorchidism in Turkish children? *Int Urol Nephrol* 2008;40:577-81.
2. Foresta C, Moro E, Garolla A, Onisto M, Ferlin A. Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3660-3665.
3. Suzuki Y, Sasagawa I, Tateno T, Yazawa H, Ashida J, Nakada T. Absence of microdeletions in the Y chromosome in patients with Prader-Willi syndrome with cryptorchidism. *Int J Androl* 2002;25:1-5.
4. Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R, Hauser R, Botchan A, Lessing JB, Paz G, Yavetz H. Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod* 1999;14:33-38.
5. Moretti E, Di Cairano G, Capitani S, Scapigliati G, Baccetti B, Collodel G. Cryptorchidism and semen quality: a TEM and molecular study. *J Androl* 2007;28:194-199.
6. Bor P, Hindkjaer J, Kolvraa S, Rossen P, von der Maase H, Jorgensen TM, Sorensen VT, Eiberg H, Ingerslev HJ. Screening for Y microdeletions in men with testicular cancer and undescended testis. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:41-45.
7. Mathews R, Gearhart JP, Pohl HG. The undescended testis: an update. *Dialogues Pediatr Urol* 1997; 20:1-8.
8. Fallon B, Kennedy TJ. Long-term follow-up of fertility in cryptorchid patients. *Urology* 1985; 25:502-504.
9. Lee PA. Fertility in cryptorchidism. Does treatment make a difference? *Endocrinol Metab Clin North Am* 1993;22:479-490.
10. Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns CF. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* 1997;18:259-280.
11. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Milani C, Oliva G, Rossato M. Functional and cytologic features of the contralateral testis in cryptorchidism. *Fertil Steril* 1996;66:624-629.

12. Shaffer LG, Tommerup N, eds. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: S. Karger; 2005.
13. Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Müller CR, Vogt PH. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. Int J Androl 1999;22:292-299.
14. Josso N, Picard JV, Imbeaud S, Carré-Eusèbe D, Zeller J, Adamsbaum C. The persistent mullerian duct syndrome: a rare cause of cryptorchidism. Eur J Pediatr 1993; 152:S76 –S78.

İletişim Adres:

Uzm.Dr. Gülay Güleç CEYLAN
Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Genetik Bölümü, Bilkent/ANKARA
Tel: 0 312 2912525- 4515
Fax: 0 312 2912735
E-mail: nil_cey@yahoo.com