

Varikoseli olan hastalarda Y kromozomu mikrolelesyonu-infertilite ilişkisi

Sevcan Bozdoğan*, Ahmet Dursun*, Çetin Yeşilli**, İlker Seçkiner**,
Feryal Çabuk*, Korhan Altan**, Gürdal Bozdoğan**

*Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, Zonguldak

**Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji AD, Zonguldak

Özet

Giriş: Varikosel hastalarında spermatogenezi etkileyen patolojik faktörler henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu hastalarda varikosele eşlik eden testiküler patolojilerin yanı sıra, Y kromozomunun uzun kolunda bulunan mikrolelesyonların da spermatogenezi etkilediği bilinmektedir. Y kromozom mikrolelesyonlarının, oligozoospermi ve azospermiden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, varikoseli olan hastalarda, Y kromozom mikrolelesyonlarının infertilite gelişimine katkısının araştırılması amaçlanmıştır. Hastalar ve yöntem: Çalışmaya 18'si infertil, 14'ü fertil toplam 32 varikosel hastası dahil edilmiştir. Tüm hastaların spermogramları yapılmış ve Y kromozomunun Azospermi Faktör-a (AZF-a), Azospermi Faktör-b (AZF-b), Azospermi Faktör-c (AZF-c) bölgeleri mikrolelesyon varlığı açısından değerlendirilmiştir. Bulgular: 3'ü azospermik olmak üzere 18 hastadan oluşan infertil grubun sperm sayısı 0-104 milyon/ml arasında değişmekte iken (ortalama 37.1 milyon/ml) 14 hastadan oluşan fertil grubun sperm sayısı 7.5-192 (ortalama 75.8) milyon/ml arasında bulunmuştur. İnfertil gruptaki hastaların 4'ünde Azospermi Faktör-a ve Azospermi Faktör-b bölgesinde mikrolelesyonlar tespit edilmiş iken fertil grupta Y kromozom mikrolelesyonuna rastlanmamıştır. Y kromozom mikrolelesyonu olan hastaların, birinin azospermik olmak üzere ortalama sperm sayılarının 24.8 milyon/ml olduğu saptanmıştır. Sonuç: Y kromozomu mikrolelesyonları varikoselli hastalarda da görülebilen ve fertilitiyi etkileyen nedenlerden biridir. Varikoseli olan hastalarda fertilitiyi değerlendirmesi yapılırken, Y kromozom mikrolelesyon olasılığının göz önünde bulundurulması uygun olacaktır. Özellikle post-operatif sperm sayısında artış olmayan varikoselli hastalarda, infertiliteden Y kromozom mikrolelesyonları sorumlu olabilir. Bu şekilde hem infertilite nedeni ortaya konabilecek, hem de varikoselektomi sonrası fertilitenin sağlanması için kullanılacak en uygun yardımcı üreme tekniğinin seçiminde yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: Y kromozom mikrolelesyonu, infertilite, varikosel

Abstract

The association of Y chromosome Microdeletions and Infertility in Patients with Varicocele

Introduction: The pathological factors cause spermatogenesis arrest in varicocele patients still remain unknown. In these patients, both testiculopathies and Y chromosome long arm deletions affect spermatogenesis. Y chromosome microdeletions are known to be responsible for oligozoospermia and azoospermia. In this study, the relation between Y chromosome microdeletion and infertility in varicocele patients aimed to be investigated. Patients and methods: Thirty-two varicocele patients (14 fertile and 18 infertile) were included in this study. All patients semen analysis were employed and screening for microdeletions in Azospermia Factor-a (AZF-a), Azospermia Factor-b (AZF-b), Azospermia Factor-c (AZF-c) were performed. Results: The sperm count of infertil group (3 of 18 had azoospermia) was between 0-104 million/ml (mean 37.1 million/ml), fertile group's sperm count was between 7.5-192 million/ml (mean 75.8 million/ml). While 4 patients of infertil group had Azospermia Factor-a and Azospermia Factor-b microdeletions, no microdeletion was determined in fertile group. The mean sperm count of 4 patients with microdeletion (one azoospermic) were 24.8 million/ml. Conclusion: Y chromosome microdeletion can be found in varicocele patients and one of the reasons of infertility. When evaluate the fertility in varicocele patients, Y chromosome microdeletion suggested to be taken into consideration. Y chromosome microdeletions could be the reason of infertility in patient with varicocele whose sperm count did not increase after operation. Therefore, not only the cause of infertility would be established, but also the appropriate assisted reproductive technologies would be chosen after varicocelectomy.

Key words: Y chromosome microdeletion, infertility, varicocele

Yazışma Adresi: Arş. Gör. Sevcan Bozdoğan
Z.K.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD
Esenköy 67600, Kozlu Zonguldak
Tel: 0372 2610243 Fax: 0372 2610251
E mail: drsevcan@mynet.com

Giriş

Varikosel, testisleri drene eden ve pampiniform pleksusu oluşturan spermatik venlerin, genişlemesi, uzaması ve kıvrımlı hal almasıyla venöz dolaşımda reflü oluşmasıdır. Varikosel infertilite, testiküler büyümede ve gelişmede yetersizlik, rahatsızlık ve ağrı semptomları oluşturan bir patolojidir. Kendi haline bırakıldığında semen parametrelerinde ilerleyici düşüşe sebep olan (1) varikosele ait patognomonik histolojik değişiklikler tanımlanamamıştır. Sık rastlanan bulgular Leydig hücrelerinde hiperplazi, tübül başına düşen Sertoli Hücrelerinin sayısında azalma, spermatogenezde duraklama, germinal epitelde dökülme ve zamanla seminifer bazal membranda kalınlaşmadır (2,3). Varikoselin neden testiküler disfonksiyon oluşturduğuna ilişkin birçok hipotez ileri sürülmüş ve intraskrotal ısı artışı (4), gonadotoksinlerin (5), renal ve adrenal metabolitlerin toksik etkisi (6), hipoksi (7), azalmış oksijen, artmış venöz basıncın olumsuz etkisi (8), kontrolsüz ve aşırı antioksidan artışı (9), immünolojik nedenler (10), apoptozis (11), enzimatik fonksiyonlarda bozulma (12) gibi birçok faktör üzerinde durulmuştur. Varikoselli hastalarda spermatogenezini etkileyen patolojik faktörler henüz tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte diğer patolojilerin de bu hastalarda spermatogenezini etkilediği düşünülmektedir. Spermatogenezini etkileyebilecek faktörlerden biri de Y kromozom mikrodelesyonlarıdır. Genetik olarak, Y kromozomunun uzun kolunda bulunan mikrodelesyonların, oligozoospermi ve azoospermiden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Erkek infertilite olgularının %0.3-7'sinden Y kromozom mikrodelesyonlarının sorumlu olduğu bilinmektedir (13,14). Kötü semen parametrelerine ve testis hipotrofinesine sahip varikoselli erkeklerde bu oran daha da yüksektir (%17.5) (14). Genetik nedenlere bağlı olan infertilite ve varikoselin birlikte olduğu hastalarda operasyona rağmen fertilitenin düzelmediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (15). Bu nedenle kötü semen parametrelerine sahip varikoselli hastalarda tedaviden yarar görülmeyeceği için, ilgili genetik testleri preoperatif dönemde yapmakta yarar vardır. Bu çalışmanın amacı, varikoseli olan hastalarda Y kromozom mikrodelesyonlarının infertilite gelişimi ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

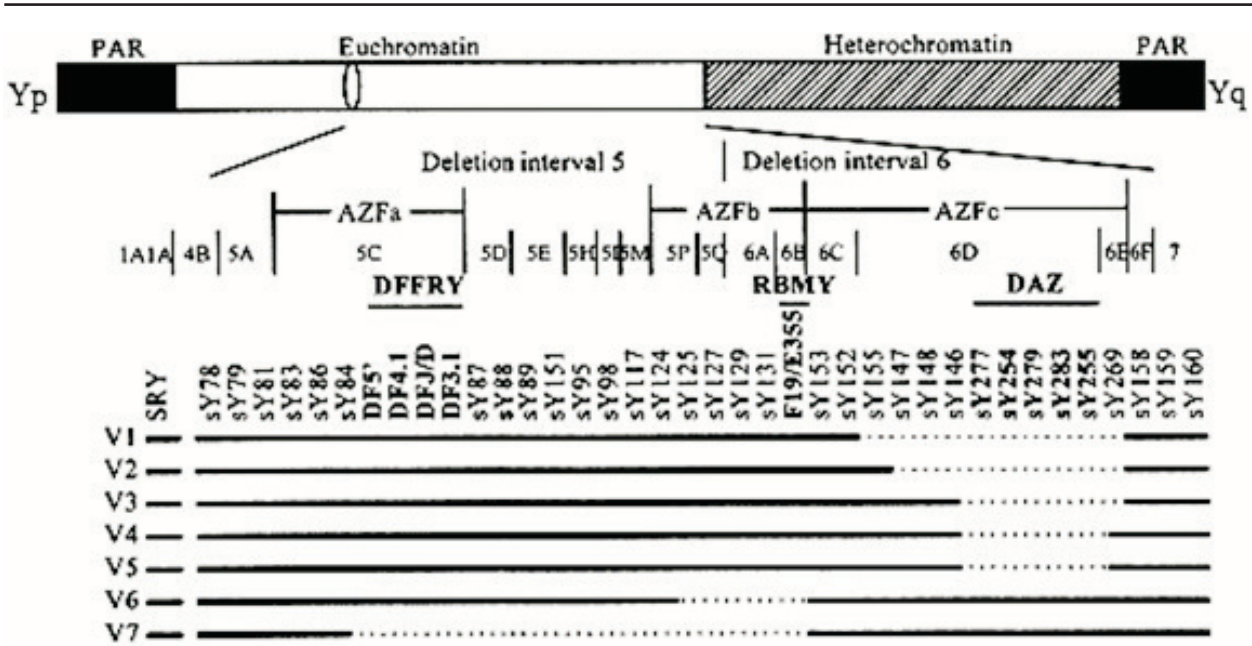
Bu çalışmaya 18'si infertil, 14'ü fertil toplam 32 varikosel hastası dahil edildi. Hastalarda varikosel

tanısı fizik muayene ile konup takiben renkli doppler USG ile doğrulandı. Bu hastaların fertilité durumları ile ilgili detaylı anamnezleri alındı ve fizik muayeneleri yapıldı. Bir yıl düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik sağlanamayan hastalar infertil olarak kabul edildi. Tüm hastaların spermogramları yapıldı; serum FSH, LH, prolaktin ve testesteron düzeyleri ölçüldü. Tüm hastalarda obstrüktif azospermi ve endokrinolojik infertilite nedenleri ekarte edildi. Hastaların yaş ortalaması 29.6 (fertil hastalar için 27.6, infertil hastalar için 34) idi. Ortalama infertilite süresi 3.9 ± 2.9 yıl idi. Hastaların tümünden bilgilendirilmiş onamları alındıktan sonra, steril şartlarda 2cc periferik venöz kan örneği alındı. Kan örneklerinden MN NucleoSpin DNA kiti (MN NucleoSpin, cat. no: 740951.250) üretici firma protokolüne uyularak DNA elde edildi. Bu kit ile 200 µl kan örneği kolonlu tüplerde proteinaz K ve lizis buffer olan B3 ile muamele edildi. Yıkama tamponları olan BW ve B5 ile yıkandı, son basamakta BE tampon çözeltisi ile sulandırıldı. İşlem sonucunda 100 µl (40-60 ng/µl) DNA elde edildi. Elde edilen DNA ile, AZF-a (sY81, sY82, sY84) AZF-b (sY127, sY142, sY145, sY164, rbm1) AZF-c (cdy, bpy2, sY152, sY153, sY254, sY255 ve sY277) 3 gen bölgesine ait 15 alan çalışıldı (Şekil-1).

Her bir alan için ayrı primerler kullanılarak toplam 50 µl hacimde 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 µM dNTP, her primerden 50 pmol, 1 U Taq DNA polymerase ve ekstrakte edilen DNA'dan 5 µl içeren karışım hazırlandı. 94°C'de 5 dakika süren ilk denatürasyon basamağından sonra 40 siklus 94°C 35 saniye, 58°C 35 saniye ve 72°C 40 saniye ile amplifiye edildi. 72°C'de 5 dakika son ekstansiyon basmağı uygulanarak çoğaltıldı. PCR ürünleri jel elektroforezi uygulandıktan sonra UV ışığı altında görüntüldü.

Bulgular

18 hastadan oluşan infertil grubun sperm sayısı 3'ü azospermik olmak üzere 0 ile 104 milyon/ml arasında değişiyor (ortalama 37.1 milyon/ml) iken 14 hastadan oluşan fertil grubun sperm sayısı 7.5 ile 192 milyon/ml arasında (ortalama 75.8 milyon/ml) idi. Fertil grupta ortalama FSH, LH, prolaktin ve total testesteron düzeyleri sırası ile 4.4 mIU/ml, 3 mIU/ml, 7.9 ng/ml ve 594 ng/dl iken infertil grupta bu değerler 8.9 mIU/ml, 5.2 mIU/ml, 11 ng/ml ve 553 ng/dl olarak bulundu ve her iki grubun sonuçları normal sınırlar içerisinde idi. İnfertil gruptaki hastaların 4'ünde (infertil grubun %22.2'si, tüm hastaların %12.5'i)



Şekil-1: Y kromozomu ve AZF bölgeleri

AZF-a ve AZF-b bölgesinde mikrodelesyonlar tespit edilmiş iken (bir hastada sy81, 2 hastada rbm1 delesyonu, bir hastada ise sy81,sy127,sy142 ve rbm1 delesyonları) fertil grupta Y kromozom mikrodelesyonu tespit edilmemiştir. Y kromozom mikrodelesyonu olan ve biri azospermik olan hastaların ortalama sperm sayıları 24.8 milyon/ml olarak tespit edilmiştir (Tablo-1).

Tablo1 İnfertil hastaların, yaş, sperm sayı ortalamaları ve Y kromozom mikrodelesyon dağılımı

SIRA	YAŞ	SPERM Y DELESYON SAYI Milyon/ml	
1	30	23	VAR (sy81)
2	32	45	YOK
6	35	83	YOK
9	30	40,3	YOK
11	35	0	YOK
12	34	58	VAR (rbm1)
13	39	63	YOK
14	30	0	YOK
18	35	0,66	YOK
19	35	20	YOK
21	31	9,5	YOK
23	32	34	VAR (rbm1)
25	32	83	YOK
27	41	24,55	YOK
28	40	104	YOK
29	36	0	VAR (sy81,sy127,sy142,rbm1)
30	36	1	YOK
31	31	73	YOK

Tartışma

Çiftlerin %10-15 ini etkileyen infertilite olgularının %50'den fazlasında erkek faktörler sorumludur (16). Dünya Sağlık Örgütü'nün 9043 infertil çift ile yaptığı bir çalışmada sperm parametrelerinde bozukluk olan erkeklerin %25.4'ünde, normal sperm parametresi olan erkeklerin %11.7'sinde varikozel saptanmıştır (WHO 1992a). İnfertil hastalarda sık görülen bir klinik bozukluk olmasına karşın varikozel her zaman infertiliteye sebep olmamaktadır. Günümüzde varikozeli olan hastalarda infertilite gelişimi ve varikozektomi sonrası klinik başarıyı yani fertilitenin geri dönüşümünü belirlemede etkili olabilecek parametreler araştırılmaktadır.

1994'ten beri Yq mikrodelesyonlarının azospermik ve oligospermik hastalardaki oranını belirlemek; infertil fenotip ile delesyonun boyutu ve yeri arasında bağlantı kurmak amacıyla klinik ve moleküler çalışmalar yapılmaktadır (17). Böyle bir bilginin edinilmesi Sertoli Cell-Only sendromu veya hipospermatogenez gösteren hastaların Intrastoplasmik Sperm İnjesiyonu yöntemi ile çocuk sahibi olabilmeleri ve olan genetik defektin erkek çocuklara geçirilme riski açısından değer taşımaktadır. Y kromozomu mikrodelesyonları spermatogenetik yetmezliğin nedenlerinden birisidir (13,14). İdiyopatik azospermili hastaların %12'sinde, oligospermili hastaların %3-4'ünde Y kromozom mikrodelesyonlarının sorumlu olduğu saptanmıştır

(18). AZF lokuslarının her biri spermatogenezin farklı bir fazına etki ettiği için delesyonun yeri prognostik önem taşıyabilmektedir. AZF-a ve proksimal AZF-b bölgelerinde mikrodelesyon varlığı spermatogenezde Sertoli Cell-Only gibi daha ciddi defektlere sebep olmaktadır (16) ve daha kötü sperm oluşumu ile sonuçlanmaktadır. AZF-b bölgesinin delesyonu spermatogenezin pakiten evresinde arrest olmasına neden olmakta iken AZF-c delesyonlarında ejakülatta az sayıda sperm bulunabildiği gibi Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) ile sperm eldesi genellikle mümkün olmaktadır (19).

Varikoselli hastalarda görülen infertilitenin tamamının ameliyat ile geri dönmemesi infertiliteye neden olan etmenin varikozel patogenezinden farklı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda bu hasta grubunda Yq mikrodelesyon sıklığı literatür ile uyumlu olarak yüksek bulunmuştur (20-22).

Sonuç

Y kromozomu mikrodelesyonları varikoselli hastalarda da görülebilen ve fertilitiyi etkileyen nedenlerden biridir. Varikoseli olan hastalarda fertiliti değerlendirilmesi yapılırken, Y kromozom mikrodelesyon olasılığının göz önünde bulundurulması uygun olacaktır. Özellikle post-operatif sperm sayısında artış olmayan varikoselli hastalarda, infertilitenin sebebinden Y kromozom mikrodelesyonları sorumlu olabilir. Bu şekilde hem infertilite nedeni ortaya konabilecek, hem de varikozektomi sonrası fertilitenin sağlanması için kullanılacak en uygun yardımcı üreme tekniğinin seçiminde yol gösterici olacaktır.

Kaynaklar

1. Chehval MJ, Purcel MH. Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertil Steril* 1992; 57(1): 174-177.
2. Wang YX, Lei C, Dong SG, Chandley AC. . . Study of bilateral histology and meiotic analysis in men undergoing varicocele ligation. *Fertil Steril* 1991; 55(1): 152-155.
3. Paduch DA, Skoog SJ. Current management of adolescent varicocele. *Rev Urol* 2001; 3(3): 120-133.
4. Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED Jr. Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 1981; 68(1): 39-45.
5. Peng BC, Tomashefsky P, Nagler HM. The co-factor effect: varicocele and infertility. *Fertil Steril* 1990; 54(1): 143-148.
6. MacLeod J. Seminal cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril* 1965; 16: 735-757.
7. Turner TT, Jones CE, Roddy MS. Experimental varicocele does not affect the blood-testis barrier, epididymal electrolyte concentrations, or testicular blood gas concentrations. *Biol Reprod* 1987; 36(4): 926-932.
8. Shafik A, Bedeir GA. Venous tension patterns in cord veins. In normal and varicocele individuals. *J Urol* 1980; 123(3): 383-385.
9. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48(6): 835-850.
10. Knudson G, Ross L, Stuhldreher D, Houlihan D, Bruns E, Prins G. Prevalence of sperm bound antibodies in infertile men with varicocele: the effect of varicocele ligation on antibody levels and semen response. *J Urol* 1994; 151(5): 1260-1262.
11. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae semino-logicae). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28(4): 587-596.
12. Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, Kojima K, Kamidono S. Decrease of topoisomerase 1 activity in the testes of infertile men with varicocele. *Arch Androl* 1988; 21(1): 45-50.
13. Maurer B, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile men who consulted a tertiary care medical centre: the Munster experience. *Andrologia* 2001; 33(1): 27-33.
14. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A., Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L, Roberts KP. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997; 336(8): 534-9.
15. Cayan S, Lee D, Black LD, Pera R, Turek PJ. Response to Varicocelectomy in Oligospermic Men with and without Defined Genetic Infertility: *Adult Urology* 2001; 57:530-535.
16. Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod* 2002; 17(1): 17.
17. Krausz C, Quintana L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis. *Hum. Reprod* 2000; 15(7): 1431-1434
18. Simoni M., Kamischke A., Nieschlag E. Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the workup of male infertility. Initiative for international quality control. *Hum. Reprod* 1998, 13: 1764-1768.
19. Vogt P. H., Edelmann A., Kirsch S., Henegariu O., Kiesewetter P., Köhn F.M., Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y chromosome azospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet* 1996, 5 (7): 933-943

20. Moro E, Marin P, Rossi A, Garolla A. Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000,161:67-71
21. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. AZF microdeletions associated with idiopathic and non-idiopathic cases with cryptorchidism and varicocele. *Asian J Androl.* 2000 Dec; 4(4): 259-63.
22. Rao L, Babu A, Kanakavalli M, et al. Chromosomal Abnormalities and Y Chromosome microdeletions in Infertile Men with Varicocele and Idiopathic Infertility of South Indian Origin. *J Androl.* 2004 Jan-Feb; 25(1):147-53.