

**T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**YAPISAL KROMOZOMAL DÜZENSİZLİĞİ OLAN ERKEK  
BİREYLERİN SPERM NÜKLEUSLARINDA  
İTERKROMOZOMAL ETKİNİN FISH YÖNTEMİYLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Özgür BALASAR**

**UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Hasan ACAR**

**KONYA  
2009**

# I

## İÇİNDEKİLER

<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>2.1. Mayoz Bölünme</b> .....	3
<b>2.2. İğ İpliği Kontrol Mekanizması ve Sayısal Kromozomal Anomali Oluşumu İle İlişkisi</b> .....	5
2.2.1. İğ İpliği Kontrol Mekanizması.....	5
2.2.2. İğ İpliği Kontrol Mekanizmasının Sayısal Kromozomal Anomali Oluşumu İle İlişkisi.....	7
<b>2.3.Yapısal Kromozomal Anomaliler, Segregasyonu ve Oluş Mekanizması</b> .....	8
2.3.1. Yapısal Kromozomal Anomaliler .....	8
2.3.2. Dengeli Yapısal Kromozomal Anomalilerin Segregasyonu.....	10
2.3.3. Yapısal Kromozomal Anomalilerin Oluş Mekanizmaları.....	12
<b>2.4. Kromozomal Heteromorfizm</b> .....	17
<b>2.5. İnterkromozomal Etki</b> .....	19
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	22
<b>3.1. Olgular ve Kontroller</b> .....	22
<b>3.2. Periferik Kan Kültürü ve Kromozom Analizi</b> .....	22
<b>3.3. Semen Analizi</b> .....	25
<b>3.4. Sperm FISH Analizi</b> .....	25
<b>3.5. İstatistiksel Analiz</b> .....	27

<b>4. BULGULAR</b> .....	35
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	44
<b>6. ÖZET</b> .....	50
<b>7. ABSTRACT</b> .....	51
<b>8. KAYNAKLAR</b> .....	52
<b>9. TEŞEKKÜR</b> .....	57
<b>10. EKLER</b> .....	58
<b>10.1 C-Bantlama (Ek-1)</b> .....	58
<b>10.2 NOR-Bantlama (Ek-2)</b> .....	58

## II

### ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Resiprokal translokasyon ve mayoz profazında oluşturduğu quadrivalent yapının şematik gösterimi.....10
- Şekil 2.** Resiprokal translokasyonda olası normal, alternate, adjacent-1 ve adjacent-2 segregasyonu.....11
- Şekil 3.** Robertsonian translokasyon taşıyıcı bireyin mayoz profazındaki trivalent yapının (cis yapısında) ve segregasyonun şematik gösterimi.....12
- Şekil 4a, 4b ve 4c.** Homolog olmayan kromozomların homolog bölgeleri arasındaki rekombinasyon (NAHR) için genomik yeniden düzenlenme mekanizmasının şematik gösterimi.....14
- Şekil 5.** Homolog olmayan kromozomların uçlarının birleşimi (NHEJ) için genomik yeniden düzenlenme mekanizmasının şematik gösterimi.....15
- Şekil 6.** Replikasyon çatalının arızalanması ve kalıbın ayrılması (FosTes) için genomik yeniden düzenlenme mekanizmasının şematik gösterimi.....17
- Şekil 7.** Sperm çekirdeğine üç renkli 18XY sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyon (FISH) fotoğrafı.....28
- Şekil 8.** Sperm çekirdeğine üç renkli 18XY sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 18.....29
- Şekil 9.** Sperm çekirdeğine üç renkli 18XY sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) XY dizomisi.....30
- Şekil 10.** Sperm çekirdeğine 13-21 lokus spesifik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 13.....31

<b>Şekil 11.</b> Sperm çekirdeğine 13-21 lokus spesifik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 21.....	32
<b>Şekil 12.</b> Sperm çekirdeğine 2-12 sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 12.....	33
<b>Şekil 13.</b> Sperm çekirdeğine 3-17 sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 17.....	34

### III

#### TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Olguların karyotip, yaş ve fertilitite durumları.....	23
<b>Tablo 2.</b> Kontrollerin karyotip, yaş ve fertilitite durumları.....	24
<b>Tablo 3.</b> Olgu grubunun sınıflaması ve karyotipleri.....	36
<b>Tablo 4.</b> Olguların kendi içindeki karşılaştırılmasında dizomi sıklığında istatistiksel olarak fark tespit edilen olgular ve kromozomları .....	36
<b>Tablo 5.</b> Olgu ve kontrol grubundaki dizomi oranları.....	37
<b>Tablo 6.</b> Kontrol grubu, olgu grubu ve diğer gruplarda görülen toplam dizomi oranları...38	
<b>Tablo 7.</b> Olgulardaki dizomi oranları.....	40
<b>Tablo 8.</b> Toplam dizomi sayıları bakımından kontrol grubu ile istatistiksel olarak fark tespit edilen olguların ve grupların gösterimi.....	41
<b>Tablo 9.</b> Kontrol grubu ile olgu grubu, gruplar ve olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan dizomiler.....	42
<b>Tablo 10.</b> Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dizomi oranı istatistiksel olarak yüksek tespit edilen olgular ile bunlarda dizomi oranı yüksek bulunan kromozomların gösterimi.....	43

## IV

### KISALTMALAR

**APC/C:** Anafaz promoting complex or cyclosome/Anafaz ilerletici kompleks veya siklozom.

**Bub3:** Budding uninhibited by benzimidazole /Benzimidazol ile tomurcuklanmanın inhibe olması.

**BubR1:** Budding uninhibited by benzimidazole related/Benzimidazol ile tomurcuklanmanın inhibe olması ile ilişkili.

**CGH:** Comparative genomic hybridization/Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon.

**DAPI:** 6-diamino-2-phenylindole.

**DTT:** Dithiothreitol.

**DNA:** Deoksiribonükleik asit.

**DSB:** Double-stranded DNA break/Çift zincir kırığı DNA.

**FISH:** Floresan in situ hibridizasyon.

**FoSTeS:** Fork Stalling and Template Switching/Replikasyon çatalının arızalanması ve kalıbın ayrılması.

**fra:** Frajil.

**h:** Heterokromatin.

**İKE:** İnterkromozomal etki/Interchromosomal effect.

**İSSE:** İnterasitoplazmik sperm enjeksiyonu.

**inv:** İnversiyon.

**KCl:** Potasyum klorür.

**LCR:** Low-copy repeat/Düşük kopya tekrarı.

**Mad2:** Mitotic Arrest Deficient/Mitozu durdurma yetersizliği.

**Mb:** Megabaz.

**MEPS:** Minimal efficient processing segment/İşlem için gerekli küçük etkin kısım.

**NAHR:** Non-allelic homologous recombination/Homolog olmayan kromozomların homolog bölgeleri arasındaki rekombinasyon.

**NHEJ:** Non-homologous endjoining/Homolog olmayan kromozomların uçlarının birleşimi.

**OATS:** Oligoastenoteratozoospermi.

**p:** Kromozomun kısa kolu.

**PBS:** Fosfat buffer saline.

**Plk1:** Polo-like kinaz 1/Polo benzeri kinaz 1.

**PP2A:** Protein fosfataz 2A.

**q:** Kromozomun uzun kolu.

**Rec8:** Mayotik rekombinasyon proteini 8.

**RNA:** Ribonükleik asit.

**s:** Satellit.

**SA:** Scc3 accessory protein 3/Scc3 yardımcı protein 3.

**Scc3:** Sister chromatid cohesin protein 3/Kardeş kromatid kohezin proteim 3.

**Sgo1:** Shugoshin 1.

**Sgo2:** Shugoshin 2.

**SIRD:** Significantly increased rate of dizomy/Dizomi oranında önemli artış.

**Spo11:** Rec12/ Mayotik rekombinasyon proteini 12.

**t:** Translokasyon

## 1.GİRİŞ

Kromozom kırıkları ve hücrelerin mitoz ve mayozdaki rekombinasyon hataları, yapısal yeniden düzenlenmelere ve anormal kombinasyonlu yeni oluşumlara yol açar. Yapısal kromozomal anomaliler 375 yenidoğanda bir görülmektedir (1). Kromozomal anomalilerin nedenleri çok iyi bilinmemekle birlikte, kromozom kırıkları, iyonize radyasyon, bazı viral infeksiyonlar ve bazı kimyasallar gibi çevresel faktörlerden veya genetik faktörlerden kaynaklanabilir. Kromozomlarda oluşan yeniden düzenlenmeler, DNA seviyesindeki değişikliklerin veya hataların, tamir edilememesi ya da yanlış tamir edilmesi gibi nedenlerden dolayı ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte mayoz ve mitoz bölünmede rol alan yapılardaki etkilenmiş düzensizlikler de (iğ ipliklerinin fonksiyonunu yerine getirememesi gibi) anomalilerin oluş mekanizmaları arasında sayılmaktadır.

Yapısal kromozomal anomaliler, bir kromozom seti kromozom materyalinin normal sayısından oluşuyorsa “dengeli”, eksik veya fazla materyal varsa “dengesiz” olarak tanımlanmaktadır. Dengesiz yeniden düzenlenmeler; duplikasyonlar, delesyonlar, markır ve halka kromozomlar, izokromozomlar ve disentrik kromozomlardır. Dengeli yeniden düzenlenmeler ise genetik materyal kaybı olmayan inversiyonlar (perisentrik ve parasentrik inversiyonlar) ve translokasyonlardır (Robertsonian ve resiprokal translokasyonlar).

Tüm kromozomal anomalilerin %21’ini yapısal kromozomal anomaliler oluşturmaktadır (2). Robertsonian translokasyonlar ve dengeli resiprokal translokasyonlar sık görülen yapısal kromozom anomalilerdir ve sıklıkları sırasıyla 1,23/1000 (3) ve 1/625’dir (4).

Bazı çalışmalarda, infertil erkeklerde kromozomal anomali sıklığında artış olduğu gösterilmiştir (5, 6). Bu bireylerde resiprokal translokasyon ve Robertsonian translokasyon sık görülen yapısal kromozomal bozukluklardır ve bunlar fenotipik olarak normal olmasına rağmen genellikle oligospermi veya azospermi ile birlikte görülmektedir. Yapılan araştırmalarda, İSSE (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) sonucu oluşan gebeliklerde embriyoda ve doğan bebeklerde, sayısal kromozomal anomali olma insidansında artış olduğu gösterilmiştir (7, 8, 9, 10, 11). Bu tür gebeliklerde sayısal kromozomal anomalili çocuk sahibi olma riskindeki artışın, spermatogenez boyunca oluşan mayotik segregasyon anomalilerinden kaynaklandığı bilinmektedir (12). Translokasyon taşıyıcıları fenotipik olarak normalken, mayoz bölünmede gonad hücrelerinde kromozomal olarak dengesiz gametler oluşturabilmektedirler.

Bazen kromozom yapısında bir değişiklik olmasına rağmen anomali kabul edilmeyip, normalin bir varyantı olarak kabul edilen yapısal kromozomal değişimler de bulunmaktadır. Bu yapısal değişiklikler heteromorfizm (polimorfik yapı) olarak değerlendirilmekte ve bu yapısal değişikliklerin en sık gözlenenleri 1q, 9q, 16q'nun sentromere komşu heterokromatin bölgelerinin ve Yq heterokromatin bölgelerinin artışı veya azalışı ya da bu bölgelerin inversiyonu ile akrosentrik kromozomların (13, 14, 15, 21 ve 22 nolu kromozomların) kısa (p) kollarındaki satellit adı verilen kromatin kitlelerindeki artış veya heterokromatin bölgelerin artışıdır (ps+ ve pstk+). Bunlardan en yaygın görülen 9 nolu kromozomun (p11q12) bölgesindeki kırıklar sonucu oluşan inv(9), normalin bir varyantı olarak kabul edilmektedir. Bu yapısal değişikliklerin klinik etkileri tam olarak bilinmemekle birlikte mayoz bölünme sırasında segregasyonda etkin bir fonksiyon üstlendikleri öne sürülmektedir (13).

Yapısal kromozomal düzensizliklerine sahip olan bireylerdeki kromozomal düzensizlikler, diğer kromozomlarda anormal segregasyon ürünlerin oluşumuna yol açabileceği ve yeni oluşacak gamette anöploidi artışına sebep olabileceği öne sürülmektedir. Bu da embriyoda kromozomal anöploidi insidansında artışa sebep olduğu hipotezini ortaya koymaktadır. Kromozomların etkileşimi sonucu oluşan bu olaya "interkromozomal etki" (İKE) denir. İKE ilk defa 1963 yılında Lejeune tarafından insanda tanımlanmıştır (12).

Planlanan mevcut çalışma ile yapısal kromozomal düzensizliği olan bireylerde interkromozomal etkinin olup olmadığı ve interkromozomal etki var ise hangi tür kromozomal düzensizliklerde ve hangi tip kromozomları etkilediğini tespit edip, klinik olarak riskli çiftler için sağlıklı bir bebeğe sahip olma şansını hakkında kişisel bir risk belirleme ön görülebilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Canlılığın sürekliliği, genetik bilginin nesilden nesile doğru ve hatasız aktarımı ile gerçekleştirilmektedir. Genetik anomaliler, mutasyonlar veya yeniden düzenlenmeler gibi çeşitli mekanizmalar sonucu meydana gelmektedir.

Genetik anomaliler klasik olarak iki gruba ayrılır. Bunlar kromozomal seviyedeki anomaliler ve tek gen hastalıklarının nedeni olan nokta mutasyonları gibi kromozom seviyesinde gözlenemeyen anomalilerdir. Kromozomal anomaliler de kendi arasında sayısal ve yapısal anomaliler olmak üzere iki gruba ayrılır. Yapısal ve sayısal anomaliler, hücre döngüsünün farklı aşamalarında ortaya çıkar ve bunlar kromozomların maksimum paketleniği metafaz kromozomlarında mikroskopik olarak görülebilir hale gelirler. Her bir anomali tipinin farklı etkenleri veya farklı mekanizmaları olsa da hücre döngüsünün herhangi bir evresindeki herhangi bir etken ile genomik yapı bütünlüğünün bozulması sonucu ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Bu nedenle, hücre döngüsünün her bir evresi özelleşmiştir. Bu evrelerin herhangi birindeki aksama genetik anomalilere neden olmaktadır.

Hücre döngüsünün evreleri G1-S-G2-M dir. G1 ve G2 evreleri hücrenin dinlenme safhaları olarak isimlendirilse de hücrede sırasıyla, DNA sentezi, mitoz ve mayoz bölünmelere hazırlıkların yapıldığı, RNA ve protein sentezinin yoğun olduğu evrelerdir. Hücre döngüsünün S evresi ise temel olarak DNA sentezinin olduğu evre olup, hücrenin genetik yapısının doğru olarak yavru hücrelere mayoz ve mitoz ile aktarma hazırlığının yapıldığı evredir. Bu evrelerde meydana gelen her bir aksaklık genetik bilginin mitozda yavru hücreye, mayozda ise yavru döl aktarılmamasına veya yanlış aktarılmasına neden olmaktadır.

### 2.1. MAYOZ BÖLÜNME

Memelilerde genetik bilginin nesilden nesile aktarımını sağlayan en önemli mekanizma mayoz bölünmedir. Mayoz bölünme, bireylerin gonad dokusunda gerçekleşen özelleşmiş bir hücre bölünmesi şeklindedir. Eşeyli üreme için gereklidir. Eşeyli üreyen tek hücreli organizmalar da dahil tüm ökaryot hücrelerde görülür. Erkek bireydeki mayoz bölünmeye spermatogenez, dişi bireydekine ise oogeneze denmektedir. Somatik hücreler çoğalmak için mitoz girerken, üreme hücreleri haploid eşey hücrelerini (sperm ve yumurta hücrelerini) oluşturmak üzere mayoz girerler. Mayoz ileri derecede özgül olmak zorundadır. Mayoz

başarılı ve hatasız olarak tamamlandığında, genetik bilginin nesilden nesile doğru aktarımı sağlamış olur.

Mayozda kromozom sayısındaki azalma, tek bir DNA replikasyon turunu izleyen art arda iki hücre bölünmesi (mayoz I ve mayoz II) ile sağlanır. Mayozda homolog kromozomlar çiftli yapılar yani sinaps oluştururlar. Her bir sinapsı oluşturan yapılar bivalent olarak adlandırılır ve dört kromatitten oluştuğu için tetrat (dörtlü) olarakta isimlendirilir. Mayoz I'de iki homologu belirten her bir tetratın bileşenleri ayrılarak iki adet diyat oluşturur.

Birinci mayotik bölünmede profaz I boyunca kromatin, görülebilen kromozomlar halinde paketlenerek kalınlaşır. Homolog kromozomlar sinaps yapar ve sinaps halindeki homolog kromozomlar arasında gerçekleşen bir değiş-tokuş olayı olan krossover (rekombinasyon) meydana gelir. Profaz I, beş evreye ayrılmıştır;

1-Leptoten evresinde kromatin yoğunlaşmaya yani DNA kromozom şeklinde paketlenmeye başlar. Son çalışmalar, ileride tam bir krossover için başlangıç eşleşme işlemleri ve homoloji araması adı verilen olayın bu evrede başladığını öne sürmektedir (14). Ayrıca yüksek oranda korunmuş bir endonükleaz olan Spo11 (Rec12/Mayotik rekombinasyon proteini 12) tarafından indüklenen çift iplik kırılmaları bu evrede olur. Bu kırılmalar rekombinasyon için gereklidir.

2- Zigoten evresinde kromozomlar kısaltmaya ve kalınlaşmaya devam eder. Homolog kromozomlar birbirleri karşısında dizilmeye başlar. Homologlar arasında fermuar benzeri protein yapı, sinaptonemal kompleks oluşmaya başlar.

3-Pakiten evresinde sinaptonemal kompleksin daha ileri gelişimi gerçekleşir. Bu sinaps olarak bilinen daha yakın bir eşleşmeye neden olur. Bir kaç gün sürebilen pakiten evresi boyunca sinaptonemal kompleks, homolog kromozomları bir arada ve yan yana tutar.

4-Diploten evresinde sinaptonemal kompleks kaybolur ve kiazma bölgeleri hariç homolog kromozomlar birbirinden ayrılır. Homolog kromozomal bölgeler arasındaki fiziksel değiş-tokuş (rekombinasyon), bir önceki pakiten evresinde gerçekleştiği halde, kiazma bölgeleri diploten evresinde görünür hale gelir.

5-Diakinez evresinde homolog kromozomlar birbirinden ayrılır ama kardeş olmayan kromatidler, kiazmalar aracılığı ile gevşek olarak birbirine bağlı kalır. Ayrılma ilerledikçe kiazmalar tetratın uçlarına doğru hareket eder. Sonlanma adı verilen (terminalizasyon) bu olay geç diplotende başlar ve diakinez sırasında tamamlanır.

Kiazmalar, homolog kromozomların birbirine gevşek olarak tutunmasını sağlar ve homolog kromozomların zıt kutuplara doğru bir şekilde gitmesi için gerekli olan gerilimi oluşturur (15). İnsanda spermatozit başına yaklaşık 50 adet kiazma mevcuttur ve insanda akiazma (kiazma olmayan) kromozom çok nadirdir (16). Metafaz I'de bivalent kromozomlar iğ ipliği üzerinde dizilirler. Kardeş kromatidlerin kinetokorları birbirine bitişik ve aynı yöne bakarken, homolog kromozomların kinetokorları zıt kutuplara doğru bakar. Dolayısıyla kardeş kromatidler aynı kutuptan gelen mikrotübüllere tutunurken, homolog kromozomlar ise zıt kutuptan gelen mikrotübüllere tutunurlar.

Anafaz I, homolog kromozomları birleştiren kiazmaların ayrılmasıyla başlar. Kardeş kromatidler sentromerlerinden birbirlerine bağlı kalırken, homolog kromozomlar zıt kutuplara doğru hareket ederler. Sitokinezin (sitoplazma bölünmesi) hemen ardından, çoğunlukla kromozomlar yoğunluklarını tamamen kaybetmeden önce, mayoz II başlar. Mayoz I indirgenme bölünmesi olarak bilinir çünkü mayoz I sonucu oluşan hücredeki kromozom sayısı yarıya düşmüştür. Mayoz I bölünmesi sırasında, kardeş kromatidleri bir arada tutan sentromerler ayrılmaz.

Mayoz II'de, DNA replikasyonu olmadan hücre tekrar bölünmeye girer. Profaz II sırasında her bir diyat, ortak bir sentromer ile bağlanmış bir çift kardeş kromatitten oluşur. Metafaz II'de kromozomlar, zıt kutuplardan gelen mikrotübüllerin kardeş kromatidlerdeki kinetokorlara tutunması ile iğ iplikciğinin üzerinde, ekvatoryal düzlemde dizilir. Anafaz II'de kardeş kromatidlerin sentromerlerini saran kohezinin proteinin, yüzük yapısı açılır ve kardeş kromatidler zıt kutuplara doğru hareket eder. Sitokinez ile mayoz bölünme sona erer.

Mayoz bölünme, nesiller boyunca, genetik bilginin bütünlüğünü ve değişmezliğini korur ve toplumlar içinde genetik çeşitliliği sağlar.

## **2.2. İĞ İPLİĞİ KONTROL MEKANİZMASI VE SAYISAL KROMOZOMAL ANOMALİ OLUŞUMU İLE İLİŞKİSİ**

### **2.2.1. İĞ İPLİĞİ KONTROL MEKANİZMASI**

Hücre döngüsünün farklı evreleri arasındaki koordinasyon kontrol noktalarındaki sistemler ile sağlanır. Bu kontrol noktaları doğru replike olmamış ya da hasarlı DNA'lara duyarlıdır ve hücre döngüsü sırasında bir önceki evredeki olaylar tamamlanmadan sonraki evreye geçişi engeller.

İğ ipliği kontrol noktası, kromozomların metafazda iğ ipliği üzerinde dizilmelerini denetler. Kromozomlar iğ ipliği üzerinde başarılı bir şekilde dizilirse, düzenleyici anahtar protein olan, anafaza ilerleten kompleksin (APC/C) aktivasyonu ile mitoz ve mayoz II'de kardeş kromatidler arasındaki sentromerdeki kohezin proteinin yüzük yapısının açılmasına neden olur. Kohezin kardeş kromatidleri bir arada tutan protein kompleksidir. Böylece kardeş kromatidlerin zıt kutuplara doğru hareket etmesi sağlanır. Kardeş kromatid kollarının ayrılması APC/C yolundan bağımsız bir yol ile olur. Plk1 (Polo benzeri kinaz, Polo-like kinaz), kardeş kromatid kolları arasındaki kohezin alt birimini SA'yı (Scc3 accessory protein) fosforile eder ve kardeş kromatid kolları ayrılır. Mayoz I'de ise kardeş kromatidler beraber hareket etmelidir ve bunun için shugoshin (Sgo1 ve Sgo2), Rec8 ve fosfataz PP2A, kardeş kromatid kolları arasındaki ve sentromerdeki kohezinin fosforile olmasını engeller. Böylelikle mayoz I'de kardeş kromatidler kutuplara doğru beraber hareket eder.

İğ ipliği kontrol komponentleri mitoz ve mayozun erken evresi boyunca kinetokorda lokalize olur. Genomun stabilitesinin sağlanması için kesinlikle tam ve doğru dizilim gerçekleşene kadar anafaza geçiş geciktirilmelidir. Mikrotübüllere bağlanmamış kinetokorlar Mad/Bub bağımlı yolu aktive eder ve bu yolda APC/C'yi inhibe ederek anafaza geçişi engeller. İğ ipliği kontrol noktasında APC/C'yi inhibe eden kompleksi Mad2 (mitozu durdurma yetersizliği, Mitotic Arrest Deficient), Bub3 (Benzimidazol ile tomurcuklanmanın inhibe olmaması, Budding uninhibited by benzimidazole) ve BubR1 (Benzimidazol ile tomurcuklanmanın inhibe olmaması ile ilişkili, Budding uninhibited by benzimidazole related) oluşturmaktadır. Bu komponentler hem oogeneizde hem de spermatogeneizde tanımlanmıştır (15).

Tüm kromozomlar ekvatoryal düzlemde aynı hizaya gelince kontrol noktası sinyali söner ve APC/C aktive olur ve anafaza geçiş meydana gelir. Ayrıca kinetokordaki gerilim duyarlı enzimler de anafazın negatif düzenleyicisidir (17). Bu modele göre bioryante olmayan kromozomlarda gerilim oluşmaz ve anafaza geçiş engellenir. Kromozomların bioryante olması ile mikrotübülde gerilim oluşmakta ve anafaza geçişi engelleyen sinyal kaybolmaktadır. Kinetokorda bulunan BubR1 düzeyi, kinetokora bağlanan mikrotübüle duyarlı değildir. Ancak BubR1 gerilime duyarlıdır ve metafaz kinetokorlarındaki gerilim düşük doz vinblastin ile azaltılırsa, BubR1 kinetokorda tekrar toplanmaya başlar (18). Mayoz II ve mitozda kardeş kinetokorlar farklı kutuplardan gelen mikrotübül ile bağlanınca bu gerilim metafazda oluşur ama mayoz I'de kardeş kromatidler aynı taraftan

gelen mikrotübüllere bağlanır. Dolayısıyla mayoz I'de segregasyonun doğru olarak gerçekleşmesi için gerekli olan gerilimi oluşturan, krossover sonucu oluşan kiazmalardır (15).

### **2.2.2. İĞ İPLİĞİ KONTROL MEKANİZMASININ SAYISAL KROMOZOMAL ANOMALİ OLUŞUMU İLE İLİŞKİSİ**

Kromozom anomalilerinin sıklığı yaklaşık olarak yenidoğan döneminde %0,6, ölü doğumda %6 ve düşüklerde %60'dır (19). Birçok kromozomal anomali ölümcüldür ve hataların büyük bir kısmı mayoz bölünmede meydana gelir. Kromozomal anomaliler içinde sayısal kromozomal anomaliler, yapısal kromozomal anomalilere oranla daha sıktır. Örneğin ilk trimester düşüklerinde tespit edilen kromozomal anomalilerin %96'sı sayısal kromozomal anomalilerdir (20). Tüm kromozomlar hataya yatkındır. İnsan oositlerinde (21) ve düşük materyallerinde (22) tüm kromozomların anöploidisi tanımlanmıştır. Ancak yapısal olarak daha küçük olan kromozomlar hataya daha çok yatkındır (19).

Birçok otozomal trizomi maternal orijinli iken, seks kromozomal anomalilerin çoğunun kaynağı paternaldir (23). İnsan oositlerinin %20'si sayısal (en sık kromozom 16, 21 ve 22), %1'i yapısal olmak üzere toplam %21'inde kromozomal anomaliye sahip iken, insan spermelerinin %1-2'sinde sayısal (en sık kromozom 21, 22, X ve Y), %~7'sinde yapısal olmak üzere toplam %~9'unda kromozomal anomali vardır (19).

Spriggs ve ark. (1996) otozomal kromozomlar 1, 2, 4, 9, 12, 15, 16, 18, 20 ve 21 ile seks kromozomlarının spermdeki dizomi oranlarını çalışmışlardır (24). Birçok bireyde otozomal kromozomların ortalama dizomi frekansını %0,1 ( 1000 spermde 1) olarak bulmuşlar. Ama kromozom 21 için bu oran %0,29 ve seks kromozomları için %0,43'dür. Spermelerde seks kromozomları anöploidide daha yatkındır. Bazı laboratuvarlar bu kromozomlar için yüksek anöploidi frekansı bulmazken, diğer birçok çalışma grubu 21 nolu kromozom (25) ve seks kromozomları (26) için yüksek anöploidi sıklığı bildirmektedir.

Anne yaşının artması anöploidinin sebeplerinden en bilinenidir. Yaş ile birlikte memeli oositlerinde iğ ipliği kontrol noktasında görevli protein ekspresyonunun azalması, buna sinerjik olarak mikrotübül ve organel fonksiyonu azalması (özellikle mitokondri) ve kardeş kromatidler arasındaki kısmi kohezinin kaybı, kromozom segregasyonunda hatalara ve anöploidide neden olmaktadır.

Baba yaşı ile anöploidi frekansı artışı arasında bir ilişki bulunamamış ama baba yaşı ile yapısal anomalilerin artışı arasında önemli derecede ilişki olduğu bildirilmiştir (27). Buna karşılık bazı çalışmalarda, baba yaşının sınırlı olarak seks kromozomlarında anöploidi artışına neden olduğu tespit edilmiştir (28, 29). Baba yaşının anöploidi üzerine maternal yaş gibi dramatik bir etkisi bulunmamaktadır.

Angell (1991) yaptığı çalışmada insan oositinde mayoz II metafazında tek kromatid hatalarını bildirmiştir (30). Bu durumun mayoz I bölünmesinde kardeş kromatidler arasındaki sentromerin erken ayrılması (predivision) sonucunda olduğunu rapor etmiştir ve insan anöploidilerin temel sebebinin predivision olduğunu öne sürmüştür (30).

Birçok kromozom için rekombinasyonda azalma, homologlar arasında kiazma azalmasına ya da yokluğuna neden olur. Böylece normal bir segregasyon için homolog kromozomların iğ ipliğinde doğru oryante olması bozulur. Mayoz I'de homologların zıt kutuplara doğru gitmesi bozularak anöploidiye sebep olabilir. Hem fertil hem de infertil erkeklerde G grubu kromozomlar ( 21 ve 22 nolu kromozomlar) ile seks kromozomlarının ayrılamamaya daha yatkın olduğu bildirilmektedir. Bu durumun G grubu kromozomlarının küçük olması nedeniyle tek krossover olması ve seks kromozomları olan X ve Y kromozomları arasında eşleşen bölgelerin psödootozomal bölgelerde sınırlı kalmasında kaynaklanabileceği bildirilmektedir. Rekombinasyon azalması veya yokluğu anöploidi artışına, sonuçta spermatogenezde durmaya neden olarak infertiliteye yol açabilir (19).

Yaşlanma (özellikle oosit), iğ ipliği kontrol noktasında görevli proteinlerin fonksiyon kaybı, mutasyonu veya azalması, erken sentromer ayrılması, rekombinasyon azalması ve akiazmaya sebep olabilecek durumlar anöploidiye neden olabilmektedir (19).

Diğer taraftan mayoz ve mitozda işe karışan faktörlerin dışında çevresel faktörlerin de anöploidi oluşumunda etkin olduğu bilinmektedir. Spermdede anöploidi oluşumuna neden olan etkenler arasında sigara, alkol, ilaçlar, kemoterapi ve viral etkenler sayılabilir (23).

## **2.3.YAPISAL KROMOZOMAL ANOMALİLER, SEGREGASYONU VE OLUŞ MEKANİZMASI**

### **2.3.1. YAPISAL KROMOZOMAL ANOMALİLER**

Tüm kromozomal anomalilerin %21'ini yapısal anomaliler oluşturmaktadır (2). Yapısal anomaliler, 375 yenidoğanda bir görülür (1). Yapısal kromozom anomalilerde, bir kromozom seti kromozom materyalinde kayıp olmaksızın normal sayısını korumuşsa “dengeli”, kromozom materyalinde eksiklik veya fazlalık varsa “dengesiz” olarak

tanımlanır. Dengesiz yeniden düzenlenmeler; duplikasyonlar, delesyonlar, markır ve halka kromozomlar, izokromozomlar ve disentrik kromozomlardır. Dengeli yeniden düzenlenmeler ise genetik materyal kaybı olmayan inversiyonlar (perisentrik ve parasentrik inversiyonlar) ve (Robertsonian ve resiprokal translokasyonlar) translokasyonlardır.

Resiprokal translokasyonlar, genellikle iki kromozomun işe karıştığı karşılıklı parça alışverişi sonucu oluşur. Üç veya daha fazla kromozomu ilgilendiren kompleks translokasyonlar nadirdir. Sıklığı genel popülasyonda yaklaşık olarak 1/625'dir (4). Dengeli translokasyonlar iki veya daha fazla spontan düşüğü bulunan çiftlerde ve infertil erkeklerde topluma göre daha sık görülür (4). Translokasyon taşıyıcıları, segmental anosomi sebebiyle mental ve fiziksel yönden anormal çocuklara sahip olma riskine sahiptirler.

Robertsonian (Rob) translokasyonlar, D grubu (akrosentrik) kromozomlar (13, 14 ve 15 nolu kromozomlar) ile G grubu kromozomlar (21 ve 22 nolu kromozomlar) arasında meydana gelir. İki akrosentrik kromozom kısa kollarını kaybederek sentromer bölgesinden birleşir. Oluşan dengeli karyotipte sadece 45 kromozom bulunur. Sıklığı doğumda yaklaşık olarak 1,23/1000 (3). Rob translokasyonlar arasında en sık (binde 0.97 ile) t(13;14), ikinci sıklıkla (binde 0.20 ile) t(14;21) görülür (2). Oligozoospermik erkekler arasında Rob translokasyon sıklığı %1.6'dır ve bu oran doğumda görülme sıklığının 13 katıdır (31). Akrosentrik kromozomların kısa kollarında ribozomal RNA kodlayan genlerin çok sayıda kopyası bulunduğu için, iki akrosentrik kromozomun kısa kollarının kaybının klinik etkisi hala bilinmemekle birlikte zararsız olduğu kabul edilmektedir. Taşıyıcıların fenotipleri genellikle normaldir. Mayotik yeniden düzenlenmeler, gametogenezdeki yetersizlik ve anormal gamet oluşumu fertilitiyi etkiler.

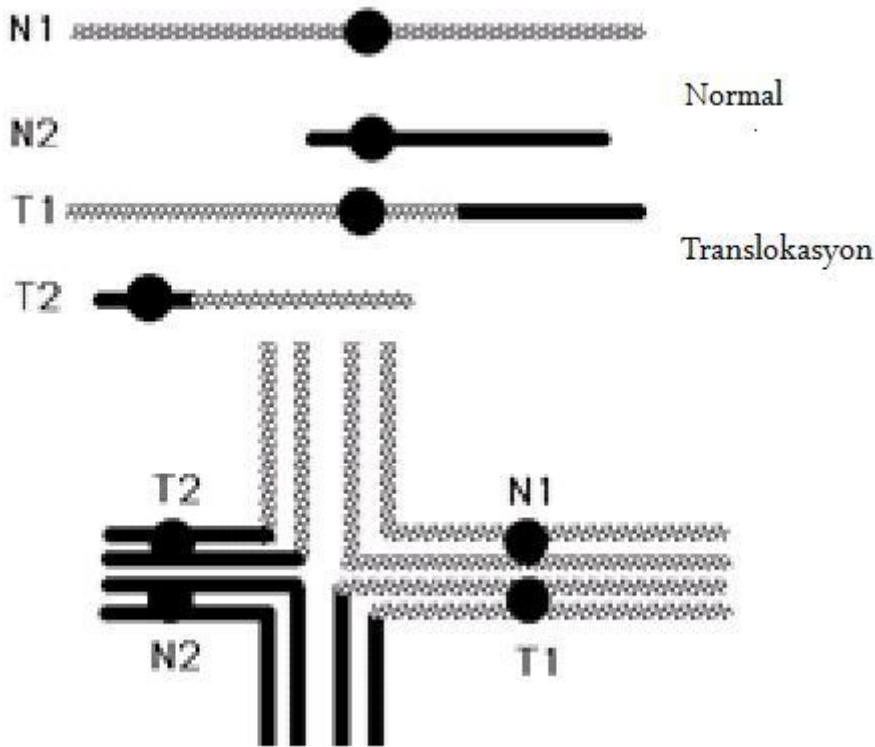
İnsersiyonlar, bir kromozoma ait bir segmentin yerinden ayrılarak farklı bir kromozoma, normal oryantasyonunda veya ters dönerek eklenmesiyle oluşan resiprokal tipte olmayan translokasyonlardır.

Inversiyonlar, intrakromozomal yapısal yeniden düzenlenmelerdir. Tek bir kromozomda iki kırık olduğunda ve kırıkların ortasında kalan kısım 180° ters dönerek tekrar birleştiğinde inversiyon oluşur. Eğer ters dönen kısım sentromer içeriyorsa perisentrik inversiyon, dönen kısım sentromer içermiyorsa parasentrik inversiyon olarak adlandırılmaktadır. Inversiyon dengeli bir yapısal yeniden düzenlenme olduğu için genellikle taşıyıcılarda anormal bir fenotipe yol açmaz. Eğer kırıklar kritik bir gen bölgesinde veya onun düzenleyicisi olduğu bir bölgede ya da imprinting merkezlerinde

olursa fenotipte bozukluklara neden olurlar. Perisentrik inversiyon sıklığı doğumda %0.012 (32) ama genel popülasyondaki sıklığı yaklaşık olarak %1-2'dir (33). Bunun büyük bir çoğunluğu kromozom 2 veya polimorfizm olarak değerlendirilen kromozom 1, 9, 16 ve Y'nin heterokromatin bölgesini için almaktadır. Parasentrik inversiyon sıklığı %0.002-0.049 arasındadır (4). İnfertil erkeklerde inversiyon sıklığı 13 kat daha fazla görülmektedir (5)

### 2.3.2. DENGELİ YAPISAL KROMOZOMAL ANOMALİLERİN SEGREGASYONU

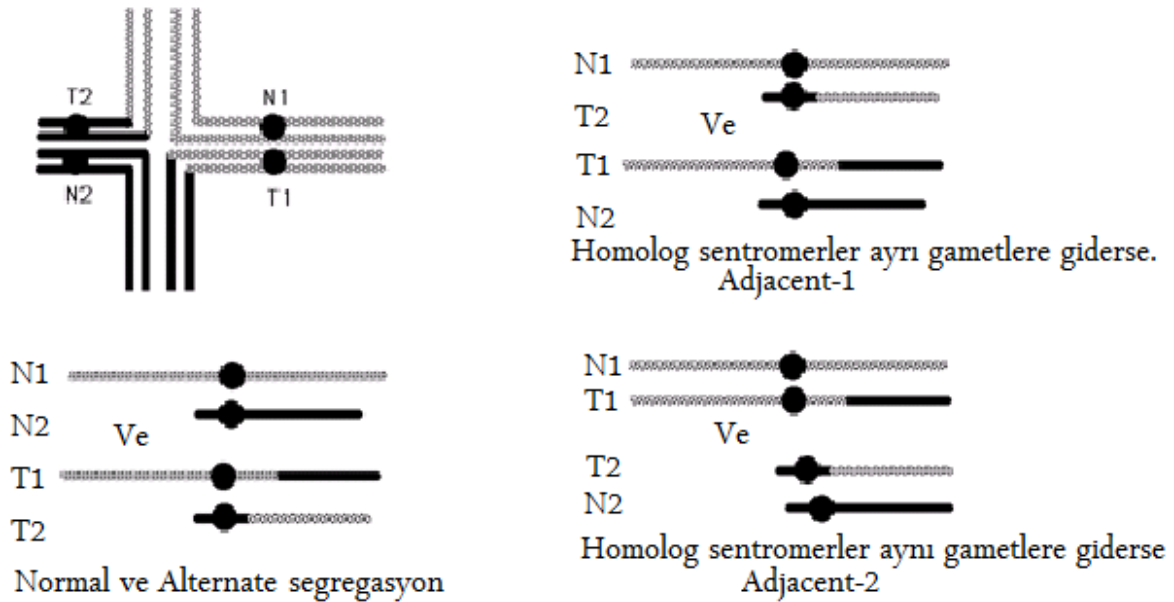
Resiprokal translokasyon taşıyıcısının, translokasyona karışan kromozomları mayoz I profazında eşleştiğinde quadrivalent yapı oluşur (Şekil 1). Spermde yapılan çalışmada temel quadrivalent yapının %91.8 ile yüzük konfigürasyonu (kapalı yapı) olduğu ve diğer tip quadrivalent yapının ise zincir (açık yapı) konfigürasyonu olduğu belirlenmiştir (34). Eğer transloke olan kısım kısa ise zincir konfigürasyonu oluşturmaktadır.



**Şekil 1.** Yukarıda resiprokal translokasyonun ve altta bunların mayoz profazında oluşturduğu quadrivalent yapının şematik olarak gösterimi. N=normal kromozom, T=transloke olan kromozom, küçük siyah daire=sentromer. Altta şemada kromozomlar bölünme safhasında olduğu için replike durumu gösterildi. <http://nitro.biosci.arizona.edu/courses/EEB320-2005/Lecture46/lecture46.html>'den uyarlanmıştır.

Anafazda, quadrivalent yapıyı oluşturan kromozomlar segregasyon sırasında çeşitli olasılıklardan birini izleyerek birbirinden ayrılırlar. Alternate segregasyonda ya normal bir kromozom seti, ya da iki resiprokal kromozomu olan gametler üretilir. Adjacent-1

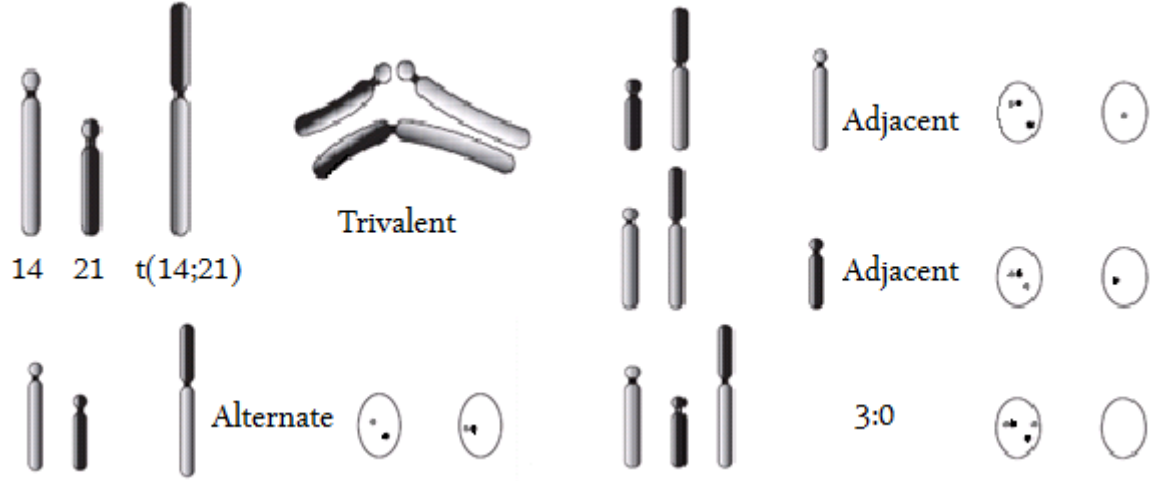
(komşuların beraber segregasyonu) segregasyonda homolog sentromerler ayrı yavru hücrelere giderken, adjacent-2 segregasyonda ise homolog sentromerler aynı yavru hücrelere gider (Şekil 2). Bu üç segregasyon tipi, 2:2 segregasyon (her kutba 2 kromozom) olarak tanımlanır. Her gamet 23 kromozom taşır. Resiprokal translokasyon taşıyıcıları 3:1 segregasyon göstererek 22 veya 24 kromozomlu gametlerin oluşumuna neden olabilir. Oluşan fetusta monozomi nadir olsa da, trizomi görülebilir. 4:0 segregasyon ise quadrivalent yapıyı oluşturan dört kromozomun sadece bir kutba gitmesi durumunda görülür ama bu durum preimplantasyon genetik uygulamalarında görülebilecek bir durumdur (35). Birçok resiprokal translokasyon taşıyıcısında alternate segregasyon oranları yaklaşık olarak %44-51 oranında görülmektedir (36).



**Şekil 2.** Resiprokal translokasyonda olası normal, alternate, adjacent-1 ve adjacent-2 segregasyonu. <http://nitro.biosci.arizona.edu/courses/EEB320-2005/Lecture46/lecture46.html>'den uyarlanmıştır.

Robertsonian translokasyon taşıyıcısında, mayoz I profazında translokasyonu içine alan kromozomlar trivalent bir yapı oluşturur (Şekil 3). Rob translokasyon taşıyıcılarında mayotik profaz hücre analizinde, bu yapı her zaman cis konfigürasyonda olmaktadır (37). Bu yapının alternate segregasyonu normal kromozoma sahip normal embriyo veya taşıyıcıdaki gibi dengeli 45 kromozomlu embriyo oluşturur. Adjacent segregasyon modunda dört olasılık vardır. İkisinde nullizomik, ikisinde ise dizomik gametler oluşur. Bunlarda sırayla monozomik ve trizomik embriyo oluşumuna neden olur. 3:0 segregasyon sonucu, gametlerde sırasıyla 21 ve 24 adet kromozom oluşur. Rob translokasyon taşıyıcılarında yapılan segregasyon çalışmasında, t(13;14) ve t(14;21) taşıyıcı hastalarının

spermeleri incelendiğinde alternate segregasyon oranları sırasıyla %73.6-91.0 ile %72.22-93.0 olarak bulunmuştur (38). Ancak t(21;21) taşıyıcılarda, %100 dengesiz gamet oluştuğu bildirilmiştir (39).



**Şekil 3.** Robertsonian translokasyon taşıyıcı bireyin mayoz profazındaki trivalent yapının (cis yapısında) ve segregasyonun şematik gösterimi. Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann C, Clavequin MC, Bresson JL. Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. Cytogenet Genome Res 2005;111:291-6'dan uyarlanmıştır.

Kısa inversiyonlarda homolog bölgelerin aynı hizaya gelmesi zordur ve asinaptik balon oluşur. İnverte olan bölge çok uzun ve kromozomun büyük bir kısmını içeriyorsa terminalde non-inverte segment çiftleşmez ve loop oluşmaz. Mayozda pakiten evresinde homolog bölgelerin aynı hizaya gelmesi için inverte olan segment bükülür ve loop yani ilmik oluşur. İnversiyon ilmikleri arasında rekombinasyon bir miktar baskılansa da, oluştuğunda dengesiz gametlerin oluşumuna yol açabilir. Perisentrik inversiyonda segregasyon sonucu oluşabilecek dengesiz ürünler, duplikasyonlu ve delesyonlu kromozom içeren gametlerdir. Dengesiz karyotipli bir çocuk olma olasılığı %5-10 arasındadır. Parasentrik inversiyonda ise dengesiz ürünlerde kromozomlar disentrik veya asentrik olurlar.

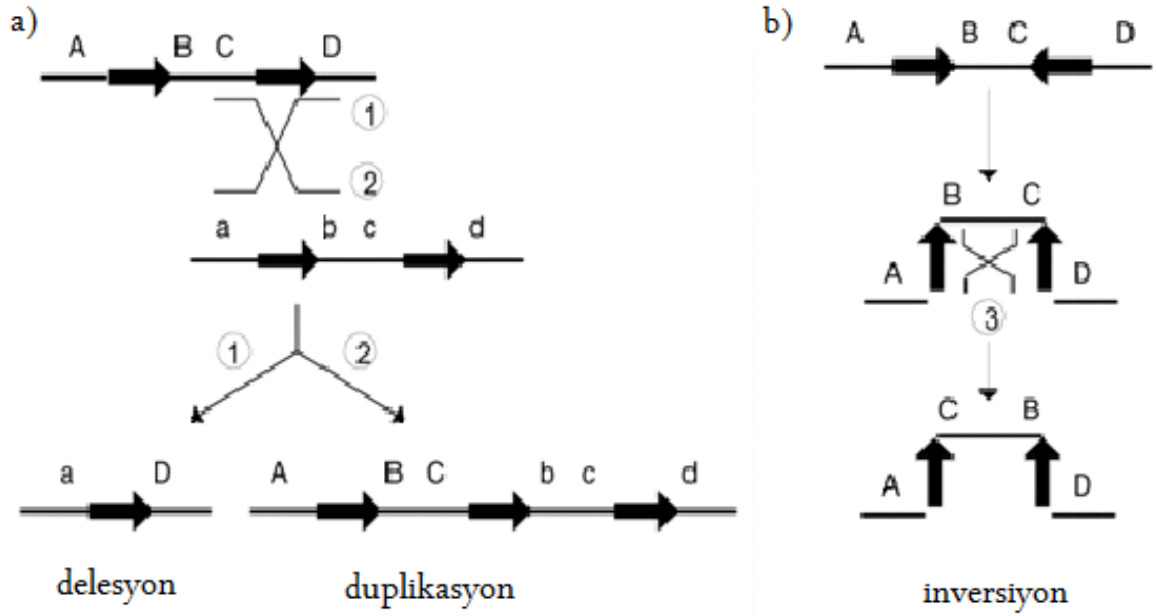
### 2.3.3. YAPISAL KROMOZOMAL ANOMALİLERİN OLUŞ MEKANİZMALARI

Kromozomal anomalilerin tanısı mikroskobik düzeyde ortaya konmaktadır. DNA'da yaklaşık olarak 3-5 Mb boyutunda meydana gelen değişiklikleri mikroskopta görmek mümkündür. Daha küçük değişiklikler moleküler inceleme ile belirlenebilmektedir. Genomik yeniden düzenlenme deyince translokasyon, inversiyon, duplikasyon, delesyon, insersiyon gibi mutasyonel değişiklikler anlaşılır.

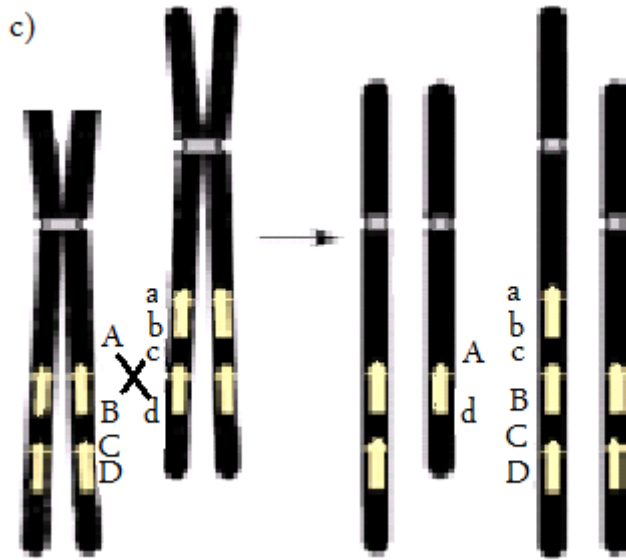
Genomdaki genomik yeniden düzenlenmelerin çoğundan 3 mekanizma sorumludur. Bu mekanizmalar, Non-Allelik Homolog Rekombinasyon (NAHR=Homolog olmayan kromozomların homolog bölgeleri arasındaki rekombinasyon), Non-Homolog End-Joining (NHEJ=Homolog olmayan kromozomların uçlarının birleşimi) ve Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS=Replikasyon çatalının arızalanması ve kalıbın ayrılması) (40).

1- NAHR, düşük kopya tekrarlarındaki (low-copy repeat, LCR) tercihli bölgelerde olur. Bu bölgeler “hotspots” olarak adlandırılır. LCR segmental duplikasyon olarak adlandırılır. LCR’ler 10-300 kb uzunluğunda, birbirlerine %95–97’den fazla benzerlik gösteren bölgelerdir. İnsan genomunda yaklaşık 130 adet LCR mevcuttur. Bu yüksek benzerlikten dolayı non-allelik LCR’lerin karşı karşıya gelerek yanlış eşleşmesi (misalignment) ve bunların rekombinasyonu sonucu genomik yeniden düzenlenmeler meydana gelir. NAHR birçok tekrarlayıcı (recurren) yeniden düzenlenmeyi izah eder. Tekrarlayıcı deyince düzenlenme aynı uzunlukta, aynı kırık noktalarını içermekte olduğu ve toplumda birçok bireyde görüldüğü anlaşılır. Eğer iki LCR aynı kromozom üzerinde ve doğru oryantasyonda ise NAHR delesyon ve/veya duplikasyona neden olabilir (Şekil 4a). Eğer LCR’ler aynı kromozom üzerinde ama zıt oryantasyonda ise NAHR sonucu inversiyon oluşur (Şekil 4b). LCR’ler farklı kromozomlarda olur ve NAHR meydana gelirse translokasyon oluşmaktadır (Şekil 4c).

NAHR mayotik ve mitotik hücrelerde meydana gelebilir. Aynı LCR hem mayotik hem de mitotik NAHR olayında rol oynayabilir ama aynı LCR’deki hotspot bölgeleri farklı olabilir. Aynı LCR’deki mayotik ve mitotik NAHR sıklığı birbirinden farklıdır. Verimli NAHR olması için MEPS’e (işlem için gerekli küçük etkin kısım, minimal efficient processing segment) ihtiyaç var. İki LCR arasındaki yüksek benzerlik gösteren minimal dizi bölgesine MEPS denir. MEPS’ler insan mayozunda yaklaşık 300-500 bp uzunluğundadır. MEPS’in önemi interkromozomal ve intrakromozomal mitotik rekombinasyonda gösterilmiştir. Bu diziler arasındaki benzerlik azaldıkça rekombinasyona uğrama olasılığı da azalır. Mayotik NAHR ve mitotik NAHR’daki MEPS’ler birbirinden farklılık gösterebilmektedir. NAHR erkekler ve bayanlar arasında farklı olabilmektedir.



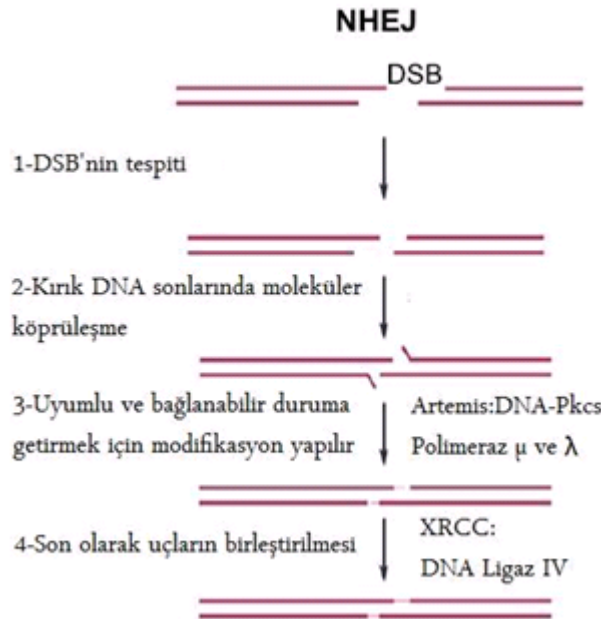
**Şekil 4a ve 4b.** Genomik yeniden düzenlenme mekanizması. NAHR (homolog olmayan kromozomların homolog bölgeleri arasındaki rekombinasyon, Non-Allelik Homolog Rekombinasyon). LCR'ler (Low copy repeat, düşük kopya tekrarları) arasındaki rekombinasyon sonucu oluşur. LCR'ler siyah kalın okla gösterilmekte ve okun yönü de oryantasyonu göstermekte. Rekombinasyon olayının sonuçları 1,2 ve 3 rakamları ile gösterilmekte. (a) Eğer iki LCR aynı kromozom üzerinde, doğru oryantasyonda ve aralarında rekombinasyon meydana gelirse delesyon ve/veya duplikasyon oluşur. (b) Eğer LCR'ler aynı kromozom üzerinde ama zıt oryantasyonda ise NAHR sonucu inversiyon oluşur. Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. Pathogenetics 1: 4 'den uyarlanmıştır.



**Şekil 4c.** Genomik yeniden düzenlenme mekanizması ( NAHR). Farklı kromozomlar üzerindeki LCR'ler arasında rekombinasyon olursa translokasyon meydana gelir. LCR'ler beyaz oklar ile gösterilmekte. Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. Pathogenetics 1: 4 'den uyarlanmıştır.

2-Bazı basit non-rekurren (sık tekrarlamayan) yeniden düzenlenmeler NHEJ ile gerçekleşmektedir. Non-rekurren yani tekrar etmeyen düzenlenmeler her birey için farklı uzunlukta ve farklı kırık noktaları anlamına gelir. NHEJ, ökaryotik hücrelerdeki DSB'nin (çift zincir kırığı, -double strand break) tamirindeki iki major mekanizmadan biridir. NHEJ, insan vücudundaki hem “fizyolojik” DSB’lerde (V(D)J rekombinasyon gibi), hem de “patolojik” DSB’lerde (iyonize radyasyon ve oksijen reaktifleri ile oluşur) rutin olarak kullanılmaktadır.

NHEJ mekanizması dört basamakta gerçekleşir. Önce DSB tespit edilir, kırık DNA sonlarında moleküler köprüler kurulur, modifikasyon yapılarak bağlanabilir ve uyumlu hale getirilir, son olarak uçların birleştirilmesi gerçekleşir (Şekil-5).



**Şekil 5.** Genomik yeniden düzenleme mekanizması. NHEJ (Homolog olmayan kromozomların uçlarının birleşimi, Non-Homolog End-Joining). Çift zincir DNA kırığı (DSB) meydana gelir ve NHEJ mekanizması ile tamir edilir. İki kalın çizgi çift zincir kırığı olan DNA'yı göstermekte. Her basamağı katalizleyen enzimlerde gösterilmektedir. Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. Pathogenetics 1: 4'den uyarlanmıştır.

NHEJ iki önemli özelliği mevcuttur.

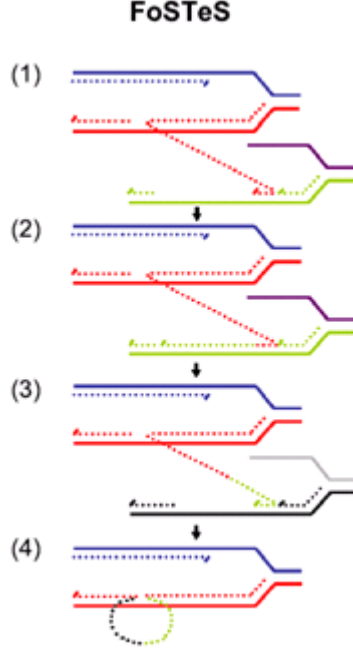
i-NHEJ için LCR veya MEPS'lere ihtiyaç olmaması.

ii-NHEJ ayrılırken “informasyon skarı” bırakır yani tekrar birleşen bölgelerde, birleşmeden önce yapılan düzeltme işleminde birkaç nükleotid ayırabilir veya ekleyebilir “signature of NHEJ”. Bu da delesyon ve insersiyonlara neden olur (40).

3-DNA replikasyon temelli FoSTeS mekanizması kompleks genomik yeniden düzenlenmeleri izah eder. Array-based Comparative Genomic Hybridization-CGH (Sıra-Temelli Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon) keşfi, kompleks yeniden düzenlenmelerin oluş mekanizması hakkında bize yeni öngörüler sağlamıştır. Genomdaki bazı yeniden düzenlenmeler, basit bir delesyon veya duplikasyondan daha karmaşık olduğunu göstermiştir. Bu kompleks oluşumlar NAHR ve NHEJ mekanizmaları ile açıklanamaz. Kompleks yeniden düzenlenmelerdeki her birleşim yerinde 2-5 nükleotid için mikrohomoloji gösteren yerler bulunmaktadır.

Bu modelde, DNA replikasyon çatalında bir pozisyonda, uzayan zincir yerinden ayrılmakta ve başka zincirde mikrohomoloji gösteren yere bağlanır ve burada uzamaya devam eder (Şekil 6). Uzayan zincir buradan da ayrılıp başka bir zincirde mikrohomoloji gösteren yere bağlanır ve tekrar uzamaya devam eder. Sonunda zincir bulunması gereken yere bağlanır ve kompleks bir düzenlenme oluşur. Bu ayrılma ve sonraki bağlanma zincirin kendi üzerindeki bölgelerinde de olabilir, eğer bağlanma downstream yere yani forward invazyon (zincirin replike olmamış bölgesine) olursa delesyon, eğer bağlanma upstream yere yani backward invazyon (zincirin replike olan bölgesine) olursa duplikasyon meydana gelir. Kompleks yeniden düzenlenmelerdeki major mekanizmanın FoSTeS modeli ile gerçekleştiğine inanılmaktadır (40).

NHEJ ve FoSTeS daha sonradan öne sürülen modellerdir. Hala bu modellerin hepsinde açıklanması gereken ve modifikasyona uğraması gereken yerler mevcuttur.



**Şekil 6.** Genomik yeniden düzenlenme mekanizması. FosTes (Replikasyon çatalının arızalanması ve kalıbın ayrılması, Fork Stalling and Template Switching). Replikasyon çatalındaki orijinal zincirler mavi ve kırmızı renkteki çizgiler. (1)Uzayan zincir (kırmızıçizgi) ayrılır ve mikrohomoloji ile ikici bir replikasyon çatalına bağlanır (eflatun ve yeşil).(2) DNA, yeşil zincirde uzamaya devam eder. (3)DNA zinciri buradan da ayrılır ve mikrohomoloji ile gri siyah zincire bağlanır. DNA burada da uzamaya devam eder. (4)Sonunda buradan da ayrılarak bulunması gereken zincire bağlanır ve kompleks bir düzenlenme meydana gelir. Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. Pathogenetics 1: 4'den uyarlanmıştır.

#### 2.4. KROMOZOMAL HETEROMORFİZM

Kromozom, normal olan homologundan farklı morfoloji, boyut ve boyanma özelliğinde ise heteromorfik veya varyant olarak tanımlanır (41). Heteromorfizmler, tespit edilen kişide bilinen fenotipik bir anomaliye neden olmaz. Polimorfizm teriminin genler ve moleküller için kullanılması daha doğru gözükmektedir.

Bazı nadir kromozomal varyantlar sadece tek bir aileye has olabilir. Tüm kromozomlar içinde en çok değişken olan kromozom, Y kromozomudur. Y kromozomunun heterokromatin bölgesinin artış veya azalışı, heterokromatin bölgenin perisentrik inversiyonu, satellitli Y kromozomu (Yqs) ve Y heterokromatin translokasyonu şeklinde olabilmektedir.

C-bantlama (sentromer boyama) ile inaktif DNA (konstitutif heterokromatin) bölgesi tespit edilebilmektedir. Bu bantlama ile her kromozomun sentromer bölgesiyle, 1q, 9q ve 16q'nun sentromere komşu bölgeleri ve Yq'nun distal kısmı koyu boyanır. Bu

heterokromatin bölgelerinin boyanmasındaki azalış ve artışları da heteromorfizmdir. Konstitütif heterokromatin bölgelerindeki artış ve azalışlar rutin sitogenetik analizde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Bu yapılar anomali olarak kabul edilmemekte, buna karşın moleküler seviyede genomda nasıl bir etkiye sahip olduğu da bilinmemektedir. Diğer taraftan heterokromatin bölgeleri iğ ipliği bağlanmasında, kromozom hareketinde, mayotik eşleşme ve kardeş kromatid kohezyonunda temel rol oynadığı bildirilmektedir (42). Benzer şekilde heterokromatin bölgedeki inversiyonların fenotipik anomalilere neden olmadığı kabul edilmektedir.

Diğer yandan ökromatik segment içeren inversiyon taşıyıcıları dengesiz gamet oluşturma eğiliminde olabilir. Kromozomun 9'un heterokromatin bölgesini içine alan perisentrik inversiyon, tüm inversiyonlar arasında en sık görülen inversiyondur. Taşıyıcılarda inv(9)(p11q12)'in kesin olarak ispatlanan zararlı bir etkisi bildirilmemiştir. Sitogenetik laboratuvarlarında tetkik edilen tüm bireylerin yaklaşık %1'inde bulunur ve genellikle normal bir varyant olarak kabul edilmektedir.

C-bant yöntemi ile tespit edilen varyasyonlar başka kromozomlarda da görülür. Örneğin heteromorfik 18ph+ (43) ve kromozom 4'ün heteromorfik varyantı (44) şeklinde yeniden düzenlenmeler bildirilmiştir.

Akrosentrik kromozomların kısa kollarındaki boy farklılığı da sık görülen heteromorfizmdir. Bu farklılığın nedeni, akrosentrik kromozomların kısa kollarında art arda tekrarlayan DNA sekansındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Akrosentrik kromozomların kısa kolundaki bantlar p11 (proksimal kısa kol), p12 (satellit sap) ve p13'de (satellit) sırasıyla satellit DNA I, II, III ve IV, rRNA genleri ve  $\beta$  satellit bölgesini içerir (41). Satellit sap yani p12 bandı 18S ve 28S rRNA kodlayan gen tekrarlarını içerir.

Frajil (kırılgan) bölgeler ise kromatid kırıklarına eğilim olan kromozom bölgeleridir ve birçok frajil bölge spesifik kromozom bantlarında meydana gelir. fra(X)(q27.3) ve fra(X)(q28) hariç frajil bölgeler zararsız olduğu kabul edilmektedir. İlk başta araştırmacılar frajil bölgeleri hastalıklarla ilişkilendirmeye çalışsalar da, sonradan frajil bölgeleri heteromorfizm olarak tanımlamışlardır (41).

Heteromorfizmler anormal fenotipik etkisi olmayan kromozomal yapılar olarak kabul edilmekle birlikte, literatürde bazı çalışmalarda kromozomlardaki heteromorfizm bölgeleri ile hastalıklar arasında ilişki olduğu bildirilmiş ve klinik etkisi üzerine çok çelişkili görüşler öne sürülmüştür. Tekrarlayan düşükler (45), infertilite (46) ve psikiyatrik

hastalıklarda (47) varyant kromozomların varlığı gösterilmiştir. Tüm varyantların normal olmayabileceğini kabul eden düşünceleri destekleyen görüşler ileri sürülmüştür (48).

## 2.5. İTERKROMOZOMAL ETKİ

Mayoz bölünme (oogenez ve spermatogenez) gonad hücrelerinde meydana gelir. Mayoz bölünmede yarıya inen kromozom sayısı gametlerin zigot oluşturmak amacı ile birleşmesi ile tekrar iki katına çıkar ve türlerin nesiller boyu kromozom sayılarının sabit kalması sağlanır.

Mayoz bölünmede oluşacak gametlerde genetik çeşitliliği artırmak için, mayoz I profaz safhasında homolog kromozomlar karşı karşıya gelerek bivalent yapı oluştururlar. Bivalent oluşumu homolog kromozomlar arasında krossover oluşumunu neden olur. Daha sonra homologların her biri ayrı kutba çekilir. Bu segregasyon olayında çeşitlenmiş homolog kromozomlar ayrı gamet hücrelerine gider. Bu normal yapı sonucunda oluşan sağlıklı gametlerin döllenmesi ile kromozomal olarak normal zigot oluşumu gerçekleşir.

Yapısal kromozom düzensizliklerine sahip olan bireylerde diğer kromozomlarda anormal segregasyon ürünlerin oluşumuna yol açabilmektedir. Gametlerdeki bu değişimler, oluşacak gamette anöploidi artışına sebep olabileceği öne sürülmektedir. Bu da embriyoda var olan kromozomal bir anomalinin, kromozomal anöploidi insidansında artışa sebep olduğu hipotezini ortaya koymaktadır. Bireyde mevcut olan translokasyon veya yapısal yeniden düzenlenme sebebiyle, translokasyona yada yeniden düzenlenmeye karışmayan herhangi bir kromozomun mayoz I sırasındaki ayrılamaması olayına “interkromozomal etki” (İKE) denmektedir. İKE ilk defa 1963 yılında Lejeune tarafından insanda tanımlanmıştır. Lejeune translokasyona karışan kromozomların ve homologlarının, diğer kromozomların segregasyonunu anormal şekilde etkileyebileceğini öne sürmüştür (49). Daha sonra Down Sendromlu çocukların babalarında, dengeli resiprokal translokasyon taşıyıcılık oranının artmış olduğunu bildirmiştir (50). İKE, insanda tartışmalı bir konu olsa da *Drosophila* (51) ve farede (52) gösterilmiştir. Son yıllarda, kromozom anomalilerin daha detaylı incelenmesi ve mekanizmaları üzerinde yoğun moleküler çalışmalar yapılması ile elde edilen bulgular İKE'nin tekrar gündeme gelmesine neden olmuştur. Ancak interkromozomal etki mekanizması bilinmemekle birlikte, kromozomal düzensizlik taşıyan bireylerde anöploidi sıklığının artışı bildirilmektedir (7, 8, 12, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62). Buna karşılık, literatürde yapısal kromozom anomalisi taşıyan bireylerde böyle bir etkinin olmadığı da savunulmuştur (9, 10, 63, 64, 65, 66, 67).

İKE oluş mekanizması hakkında bazı görüşler ileri sürülmektedir. Sinaptonemal kompleks çalışmalarında, yapısal düzenlenmelerin pakitende eşleşme anomalileri ve kiazma sayısında azalmaya neden olarak anöploidiye yol açabileceği gösterildi (56). Örneğin dengeli resiprokal translokasyon taşıyıcılarında, mayoz I profaz pakitende oluşan quadrivalent yapı, eşleşmeyen (unpaired) bölgelere neden olabilmekte ve sinaps yapmayan segmentler oluşmaktadır. Bu sinaps yapmayan (unsinapsed) segmentlerin diğer bivalentleri etkileyebileceği ve kromozomlarda ayrılama oranında artışa yol açabileceği ileri sürülmüştür (56). İKE'in, quadrivalent yapının simetrik yada asimetrik olması ile artıp artmayacağı tartışılırken, Ester Anton 2008 yılında dengeli resiprokal taşıyıcılarında yaptığı çalışmada asimetrik quadrivalent yapıların anöploidi artışına tercihli yatkınlık sağlamadığını göstermiştir (68). Rob translokasyon taşıyıcılarında, mayoz I profaz pakitende oluşan trivalent yapı ile benzer olaylar dizisi sonucunda İKE meydana gelebilir. Ayrıca İKE mayoz I boyunca seks vezikülü (X-Y bivalenti) ile transloke olan kromozomlar arasında meydana gelen heterosinaps formasyonu ile de açıklanmaktadır (55). Elektron mikroskop çalışmaları, oluşan heterosinaps oranlarının translokasyondan translokasyona farklı olduğunu göstermiş ve aynı translokasyonu taşıyanlarda bu oranın daha tutarlı olduğu görülerek, İKE'in translokasyon tipine bağlı olduğu fikrini öne sürmüşlerdir (56). Seks vezikülü ve transloke olan kromozomlar arasında oluşan heterosinaps formasyonuna bağlı İKE olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır. Diğer taraftan yeniden düzenlenmenin türü, hasta, yeniden düzenlenmeye karışan kromozom ve kromozomal kırık noktanın pozisyonu İKE'i etkilemektedir (12, 55). Aynı translokasyonu taşıyan hastalarda, dizomi oranları ve etkilenen kromozomlar farklılık gösterebilmektedir (55).

İKE'nin temel mekanizmasının mayoz I'de olması gerektiği ileri sürülmektedir (55). Çünkü İKE'e neden olabilecek eşleşme hataları, asinaps bölgeler ve akiazma mayoz I profazında meydana gelmektedir. Bunun için İKE varlığını gametlerde XY dizomilerin sıklığını ortaya koyarak belirlenmesi gerekmektedir. Seks kromozomlarında İKE ile bir anöploidi oluşuyorsa bu mayoz I'de oluşmaktadır ve oluşan sperm hücreleri XY kromozomlarını beraber taşırlar. Dizomi X ve dizomi Y mayoz II hatasıdır, bu nedenle İKE olarak kabul edilmemelidir.

Literatürdeki bazı çalışmalarda semen parametreleri ile spermlerdeki anöploidi oranları arasındaki ilişki incelenmiştir. Bazı çalışmalarda sperm anöploidisi ve total sperm progresif motilitesi arasında ters bir ilişki olduğu söylenirken (55), bir diğer çalışmada ise hem sperm sayısı hem de total sperm progresif motilitesi ile sperm anöploidisi arasında

ters bir ilişki olduğu bildirilmiştir (57). Yapısal kromozomal anomalisi olan erkeklerin semen parametrelerinin genellikle anormal olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla tespit edilen anöploidinin, gerçekten İKE'in sonucu mu yoksa anormal semen parametresinin bir ürünü mü olduğu açıklanmamıştır. Yapılan çalışmalarda normal karyotipli ama oligozoospermiye (OS) veya oligoastenoteratozoospermiye (OATS) sahip erkek hastalarda, spermelerde anöploidi frekansının arttığı bildirilmiştir (57, 69, 70, 71). Bu artışın OATS sendromuyla ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Normal semen parametreleri olan translokasyon taşıyıcılarında spermde anöploidi frekansında artış tespit edilmemiştir (12, 34, 66). Eğer İKE ve testiküler çevresel etkiler birbirinden ayrılamıyorsa, belirgin şekilde meydana gelen yanlış segregasyona, dizomi oranında önemli artış (significantly increased rate of dizomy-SIRD) denmektedir (55). Diğer yandan, resiprokal translokasyona sahip ve semen parametreleri normal olan bireyde 1, 15 ve 18 nolu kromozomlar için İKE mevcut olduğu gösterilmiştir (55).

Kromozomal yeniden düzenlenmeye sahip bireylerin spermelerindeki segregasyon ürünlerinin incelenmesinde insan sperm-hamster oosit füzyon tekniği kullanılmıştır (72). Ancak bu teknikle incelenen gamet sayısının azlığı, tekniğin uygulanabilirliğindeki zorluklar ve elde edilen kromozom kalitesinin düşük olması nedeni ile veriler sınırlı ve istatistiki analizlerden uzaktır. Bununla birlikte, 1960'lı yıllarda ortaya konan ve 1990 yıllarda yeni teknolojiler ile geliştirilerek rutin ve araştırmada yaygın bir kullanım alanı bulan Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi spermelerdeki kromozomal anomalilerin tespitinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. FISH tekniğinin hızlı ve güvenilir olması, bu teknik ile çok sayıda spermatozoanın incelenmesi, elde edilen istatistiksel verinin daha güvenilir olmasına olanak sağlamıştır.

Mevcut çalışmada, yapısal kromozomal düzensizliği olan bireylerde interkromozomal etkinin olup olmadığının araştırılması amaçlandı. İnterkromozomal etki var ise hangi tür kromozomal düzensizliklerde ve hangi tip kromozomları etkilediğini tespit edip, kromozomal anöploidi oluşumunun mekanizmasını ortaya koymak için ön veriler elde edilmiş olacaktır.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Çalışma için Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmış (22.02.2008 tarihli, 2008/035 nolu etik kurul kararı) ve çalışmaya dahil edilen olgulardan ve kontrollerden onamları alınmıştır.

#### **3.1. OLGULAR VE KONTROLLER**

Olgu grubu için sitogenetik olarak yapısal yeniden düzenlenmesi olan erişkin erkek bireyler çalışmaya dahil edilmiştir. Olgu grubunun fertilité durumu, yaş ve karyotipik özellikleri Tablo 1’de verilmiştir (Tablo 1). Olgu grubunun yaş aralığı 24-50 arasında olup, ortalaması 33.77’dir. Kromozomal yeniden düzenlenmesi olan bireylerdeki karyotipik yapı tekrar hücre kültürü yapılarak, sonuçları doğrulandı ve her bir bireyde semen analizi gerçekleştirildi. Olgu grubuna başlangıçta 24 birey dahil edildi, ancak bu bireylerden 6 tanesi azospermik olması nedeni ile çalışmadan çıkarıldı ve 18 birey ile çalışma tamamlandı.

Kontrol grubu, olgu grubu ile aynı yaş özellikleri taşıyan, evli, infertilite şikayeti olmayan, en az bir çocuğı olan, kromozomal olarak da herhangi bir yeniden düzenlenme (heteromorfizm de dahil) taşımayan, ayrıca genetik yapıyı değiştirebilecek herhangi bir hastalığı olmayan ve de radyoterapi, kemoterapi almayan 14 bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubunun yaş aralığı 25-50 arasında olup, ortalaması 32.85’dir. Kontrol grubundaki bireyler için de karyotip analizi ve semen analizi gerçekleştirildi. Kontrol grubunun fertilité durumu, yaş ve karyotipik özellikleri Tablo 2’de verilmiştir (Tablo 2).

#### **3.2. PERİFERİK KAN KÜLTÜRÜ VE KROMOZOM ANALİZİ**

Olgu grubu ve kontrol grubundan, steril bir şekilde heparinli enjektöre 2-3 ml periferik venöz kan alındı. Önceden hazırlanan içinde %20 fetal bovin serum (Biological Industries, İsrail) ve 2,0 ml fitohemaglutinin (PHA-M) (Biological Industries, İsrail) ve 1 ml Pen-Strep solüsyonu (Penisilin 10.000 ünite/mg, streptomisin 10 mg/ml)(Biological Industries, İsrail) içeren RPMI-1640 (Biological Industries, İsrail) ve/veya McCoy’s 5A (Biological Industries, İsrail) lenfosit kültür ortamı içeren kültür tüplerine, enjektör iğne ucu ile 10-15 damla periferik venöz kan eklenerek 37°C’deki etüvde 72 saatlik kültürü yapıldı.

**Tablo 1.** Olguların karyotip, yaş ve fertilitite durumları.

OLGU NO	KARYOTİP	YAŞ	AÇIKLAMA
O-1	46,XY,t(9;14)(q21;q11)	39	İnfertilite,17 yıllık evli, 5 defa IVF yapılmış,IVF ile 1 gebelik mevcut ama 5,5 aylık düşük olmuş.
O-2	45,XY,t(13;14)(q10;q10)	24	İnfertilite, 1,5 yıllık evli.
O-3	46,XY,22p+	26	1,5 yıllık evli.Eşinde 2 gebelik 6 haftalık iken anne karnında ölmüş , 1 gebelik 4 haftalık düşük.
O-4	45,XY,t(15;22)(q10;q10)	38	Amnionda fetusda tespit edilince aile taramasında ortaya çıktı. 20 yıllık evli. 3 sağlıklı çocuğu var, düşük yok.
O-5	45,XY,t(14;22)(q10;q10)	31	İnfertilite,10 yıllık evli, 2 defa IVF ve 3 defa aşılama denenmiş ama başarısız olmuş.
O-9	46,XY,21p+	36	Trizomi 13 fetus tanısı amnion sıvısında kondu. İki sağlıklı çocuğu var.10 yıllık evli.
O-10	45,XY,t(13;14)(q10;q10)	50	İnfertilite. 20 yıllık evli. 6 defa IVF, 4 defa aşılama denenmiş ama başarısız olmuş. 2 spontan gebelik ama düşük olmuş
O-11	46,XY,t(6;15)(q23;q24)	35	Eşinde habitüel abort.5 yıllık evli. 2 sağlıklı çocuğu var. Eşi 5 kez düşük yapmış.
O-12	46,XY,t(5;11)(q11.2;p11)	31	Sekonder infertilite.6 yıllık evli. 1 defa IVF, 2 defa aşılama denenmiş,başarısız olmuş. Kendisi gibi taşıyıcı bir çocuğu var
O-13	46,X,Yqh-	26	4 yıllık evli. 1 çocuğu var
O-14	46,XY,inv(9)(p11q12)	27	Eşinde habitüel abort.1 yıllık evli. 4 gebelik düşük olmuş.
O-15	46,XY,inv(9)(p11q12)	32	İnfertilite,8 yıllık evli
O-17	46,XY,21p+	29	İnfertilite, 7 yıllık evli. 1 defa IVF, 4 defa aşılama denenmiş ama başarısız olmuş.
O-18	46,XY,9qh+	33	İnfertilite, 11 yıllık evli. 2 defa IVF, 3 defa aşılama denenmiş ama başarısız olmuş. 3 gebelik (ikisi IVF ile) üçüde düşük olmuş.
O-19	46,XY,inv(9)(p11q12)	36	NTD'li fetus öyküsü. 5 yıllık evli. 2 gebelikte 3 ve 5 aylık iken NTD sebebiyle küretaj ile sonlandırılmış.
O-20	46,XY,inv(6)(p22q13)	27	Eşinde rekürren abort. 5 yıllık evli. 2 gebelikte 2 aylık iken düşük olmuş.
O-21	46,X,inv(Y)(p11.2q11.23)	43	Amnionda fetusda tespit edilince aile taramasında ortaya çıktı. 18 yıllık evli. 2 sağlıklı çocuğu var, düşük yok.
O-22	45,XY,t(13;15)(q10;q10)	45	İnfertilite, şu an 3. evliliğinden 3 yıllık evli. 1 defa IVF denenmiş ama başarısız olmuş.

IVF: in vitro fertilizasyon, NTD: nöral tüp defekti

Bu inkübasyon süresinin 70. saatinden sonra hücre siklusunu metafaz aşamasında durdurarak kromozom elde etmek amacıyla kolşisin (0.1 mg/ml)(Sigma, Almanya) damlatıldı. Tüpler homojenize edilerek yarım saat daha 37 C'lik etüvde bekletildi. Etüvden çıkarıldıktan sonra, 1200 devirde 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve altta kalan pelete (hücre topluluğuna) 8-10 ml hipotonik solüsyon (0.056 M KCl, %0.56 gr KCl) vorteksenerek eklendi. Etüvde 45 dakika daha bekletildikten sonra 1200 devirde 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve altta kalan pelete 8 ml soğuk ve taze hazırlanmış

fiksatif solüsyonu (3:1 metanol-asetik asit karışımı), vortekslenerek damla damla eklendi. Ardından 1200 devirde 6 dakika daha santrifüj yapıldı, süpernatant atıldı ve 5 ml fiksatif solüsyonu eklendi. Tekrar 1200 devirde 6 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı ve 3 ml fiksatif solüsyonu eklendi, 1200 devirde 6 dakika santrifüj yapılarak çalışma işlemi sona erdi.

Olgu ve kontrol grubuna ait tüplerdeki pelletler temiz lamlara damlatıldı. Bir gün oda ısısında kuruduktan sonra tripsin muamelesinin ardından %5'lik giemsa'da boyandı. Preparatlar görüntüleme sisteminde (MacKtpye) analiz edildi. Olgu ve kontrol grubunun boyanmamış preparatlarına C-bant (Ek-1) ve NOR-bant (Ek-2) yapılarak heteromorfizm incelemesi yapıldı. Akrosentrik kromozomların kısa kollarındaki satellit (p13) adı verilen kromatin kitlelerindeki artış ve satellit sap (p12) heterokromatin bölgesindeki artış sırasıyla ps+ ve pstk+ olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca p+ terimi hem ps+ hem de pstk+ ifadelerini içine almaktadır.

**Tablo 2.** Kontrollerin karyotip, yaş ve fertilité durumları.

KONTROL NO	KARYOTİP	YAŞ	AÇIKLAMA
K-6	46,XY	32	3 yıllık evli, bir çocuğu var, eği hamile.
K-11	46,XY	28	6 yıllık evli, bir çocuğı var.
K-13	46,XY	41	10 yıllık evli, bir çocuğu var.
K-14	46,XY	50	28 yıllık evli, üç çocuğu var.
K-15	46,XY	34	11 yıllık evli, dört çocuğu var.
K-16	46,XY	28	7 yıllık evli, iki çocuğu var.
K-17	46,XY	31	8 yıllık evli, üç çocuğu var.
K-18	46,XY	25	2 yıllık evli, bir çocuğu var.
K-19	46,XY	30	7 yıllık evli, iki çocuğu var.
K-20	46,XY	42	18 yıllık evli, üç çocuğu var.
K-21	46,XY	30	3 yıllık evli, iki çocuğu var.
K-22	46,XY	27	5 yıllık evli, bir çocuğu var.
K-24	46,XY	28	7 yıllık evli, bir çocuğu var.
K-25	46,XY	34	12 yıllık evli, iki çocuğu var.

### 3.3. SEMEN ANALİZİ

Olgu ve kontrol grubundan, 3-5 günlük cinsel perhizden sonra steril ortamda sperm örneği alındı. Sperm örneğinden Kruger kriterlerine (62) göre spermiogram analizi yapıldı. Her iki gruptaki bireylere yapılan spermiogram analizi aynı araştırmacı tarafından yapıldı. Geri kalan sperm örneğinden ise fiks-sperm hücreleri hazırlandı.

Sperm fiks örneği hazırlamak için gelen sperm örneği PBS (fosfat buffer salin) ile yıkandı. Ardından 1000 devirde 6 dakika santrifüj edildi ve üstteki süpernatant atıldı. Alttaki pelete 8 ml hipotonik solüsyonu (%0.56 KCl) eklendi ve pastör pipeti ile hafifçe pipetaj yapıldı. Etüvde 30 dakika bekletildikten sonra 1000 devirde 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra altta kalan pelete 8 ml soğuk ve taze fiksatif solüsyonu (3:1 metanol-asetik asit karışımı) eklendi. Ardından 1000 devirde 6 dakika daha santrifüj yapıldı, süpernatant atıldı ve 5 ml fiksatif solüsyonu eklendi. Tekrar 1000 devirde 6 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı ve 3 ml fiksatif solüsyonu eklendi, 1000 devirde 6 dakika santrifüj yapıldı ve fiks-sperm örnekleri eppendorf tüpe konarak FISH çalışmasına kadar -20°C'de stoklandı.

### 3.4. SPERM FISH ANALİZİ

İnterkromozomal etkiyi incelemek için kullanılan proplar, çalışma grubumuzdaki bireylerin karyotipik yapısında kromozomal yeniden düzenlenmeye karışmayan kromozomlar arasından rastgele seçildi. İncelenen kromozomlar; 2, 3, 12, 13, 17, 18, 21, X ve Y kromozomlarıdır. Kromozom 13 ve 21 sentromerik proplar ortak satellit dizisine sahip olduğu için bu kromozomlarda lokus spesifik proplar (13q14 ve 21q22 probları) (Kreatech, Almanya) kullanıldı. Diğer kromozomlarda ise her bir kromozomun sentromer bölgesine spesifik satellit probları (Kreatech, Almanya) kullanıldı. Problardan zayıf sinyaller alındığında ise sinyalleri güçlendirmek için probun orijinal işaretlemesine uygun olarak tekrar işaretleme (Kreatech işaretleme kiti, Almanya) yapıldı.

Ticari olarak elde edilen probları sperm FISH çalışmalarında kullanmadan önce prob kombinasyonları yapılarak bu kombinasyonlar sağlıklı bireylerin metafaz ve interfaz hücrelerinde optimize edildi. Periferik kandan elde edilen metafaz ve interfaz hücrelerinde kombine problarda spesifik sinyaller aldıktan sonra sperm-FISH çalışmaları için optimizasyon yapıldı. Uygulanan prob kombinasyonları dört grup halinde kullanıldı. Birinci grupta kromozom 18 (yeşil), X (kırmızı) ve Y (aqua) üçlü renk, diğer gruplarda

ikili renk kombinasyonu kullanılarak ikinci grupta kromozom 13 (yeşil) ve 21 (kırmızı) üçüncü grupta kromozom 2 (yeşil) ve 12 (kırmızı) ve dördüncü grupta kromozom 3 (kırmızı) ve 17 (aqua) beraber kullanıldı.

Hazırlanan fiks-sperm örnekleri temiz lama yoğunluğuna uygun şekilde damlatılarak preparatlar hazırlandı. Preparatlar 37°C'de 2xSSC (standart salin sitrat solüsyonu) içinde 5 dakika bekletildi. Preparatlar oda ısısında 0.01 M DTT (Dithiothreitol) (Sigma, Amerika) / PBS'de 20 dakika inkübe edildi. Artan alkol serisinde (%70, %90 ve %96) birer dakika süreyle dehidrate edildi ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar sperm-FISH çalışması için uygun hale geldi.

Preparat üzerine optimize, uygun konsantrasyondaki işaretli prob ve hibridizasyon tamponu karışımından 10µl konulduktan sonra 70°C'de 5 dakika boyunca hot plate üzerinde prob ve sperm DNA'sı denatüre edildi. Ardından gece boyunca hibridizasyon için 37°C'de etüvde bekletildi. Ertesi gün sabah, preparatlar iki ayrı şaledaki 2xSSC'de ve iki ayrı şaledaki 4xSSC'de 4'er dakika yıkandı. Sonra 10µl DAPI (6-diamino-2-phenylindole) konulan preparatlar lamel ile kapatılarak floresan mikroskop ile incelemeye hazır hale getirildi.

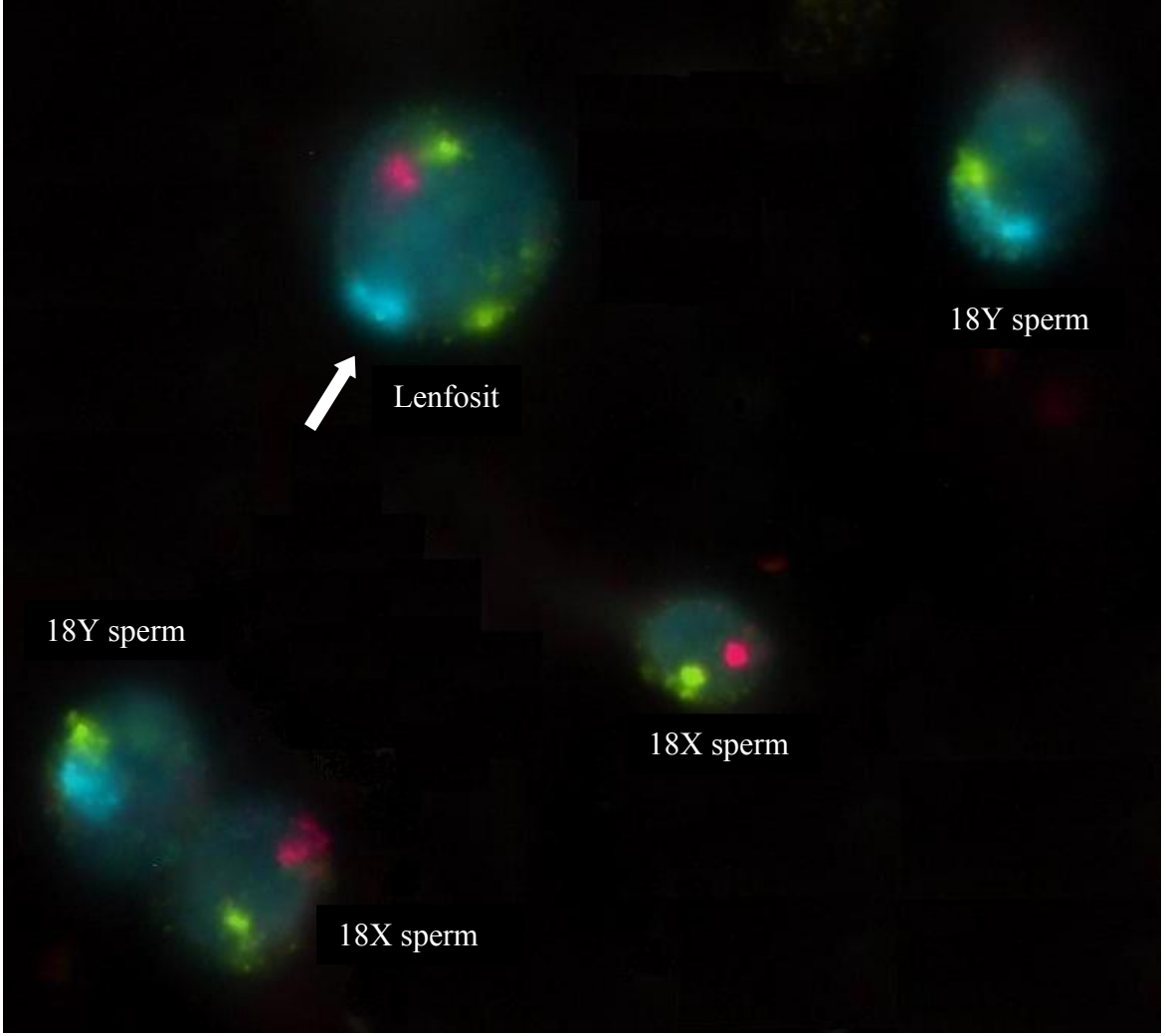
Preparatlar, DAPI (SIGMA, Amerika), FITC (fluorescein isothiocyanate), aqua, rhodamine ve dual band filtreleri bulunduran floresan mikroskopunda (Nikon E600) incelendi. Spermiler haploid yapıda oldukları için, normalde otozomal kromozomlar için tek sinyal, cinsiyet kromozomları için X veya Y'nin birine ait sinyal alınması gerekmektedir. Örneğin 18, X ve Y kromozomlarına ait prob kombinasyonu kullanıldığında, normalde bütün spermiler 18 nolu kromozom için tek sinyal içermekte, cinsiyet kromozomları için ise X yada Y kromozomlarından hangisini taşıyorsa ona ait olan tek sinyali içermektedir (Şekil 7). Yani sperm çekirdeği ya 18 ve X kromozomlarına ya da 18 ve Y kromozomlarında ait birer sinyal gösterecektir. Eğer sperm başı, bakılan kromozomlardan birisi için net iki sinyal gösterirken, diğer kromozom için net tek sinyal gösteriyorsa ve kuyruk taşıyorsa, sperm çekirdeği birinci kromozom için dizomik olarak değerlendirildi. Net sinyal, aynı büyüklükte, aynı renkte ve aynı yoğunlukta ve en az bir sinyal büyüklüğü kadar birbirinden ayrılmış olması gerekmektedir. Bu tür net sinyaller değerlendirilmeye alındı. Nullizomik spermelerde beklenen değer dizomiler ile eşit olacağı için (13, 73, 74) ve bu durumun ayrılamama mı yoksa teknik hatadan mı kaynaklandığı bilinemediği için değerlendirilmeye alınmadı (55, 74). Ayrıca üst üste düşen sperm çekirdekleri, sınırları seçilemeyen sperm çekirdekleri ve yaygın veya ayırt edilemeyen

sinyalleri olan sperm çekirdekleri ile kuyrukları olmayan sperm çekirdekleri değerlendirilmeye alınmadı.

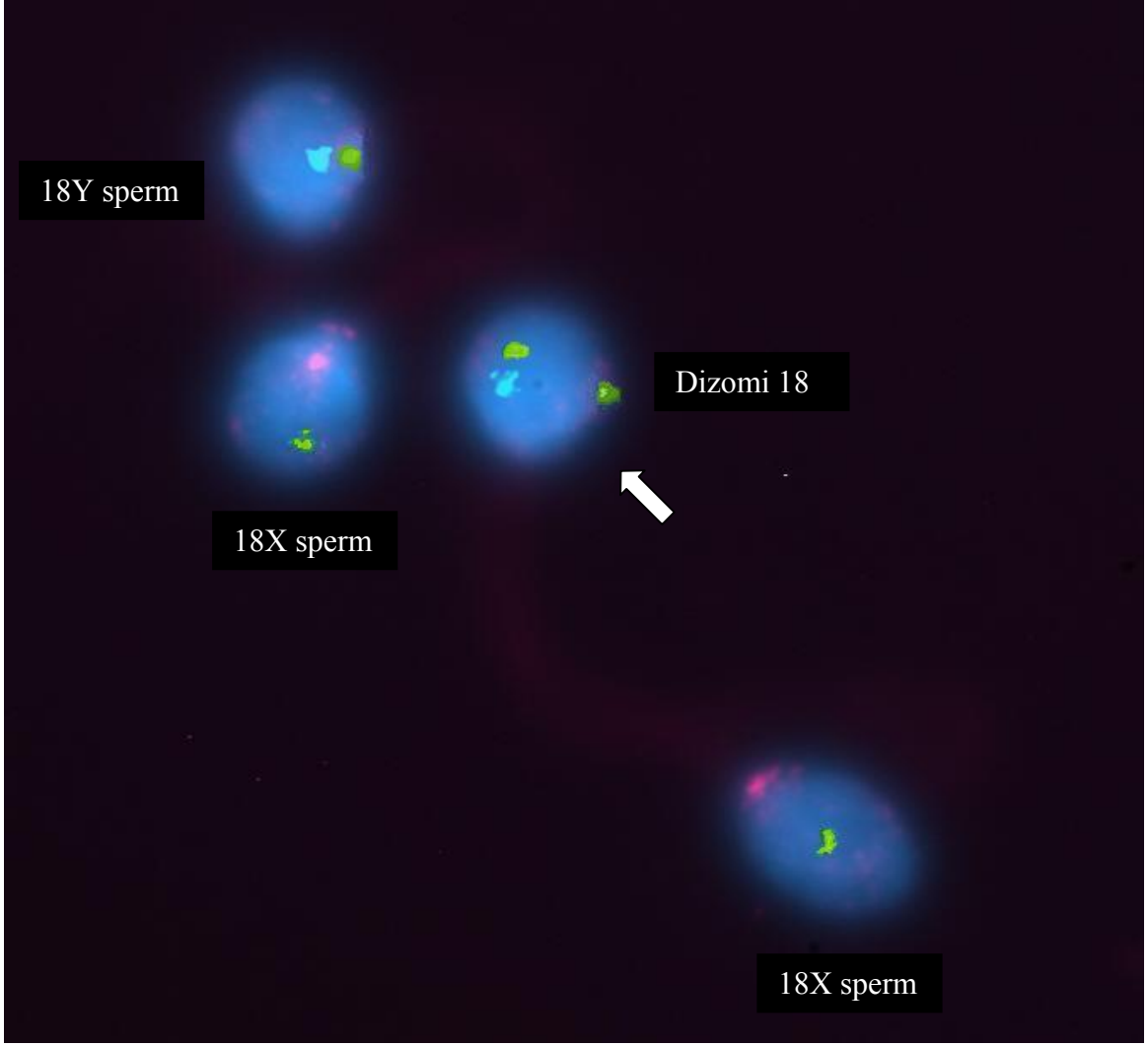
FISH yöntemi ile olguların sperm çekirdeklerinde tespit edilen dizomiler şekillerde gösterilmiştir (Şekil 8-13).

### **3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

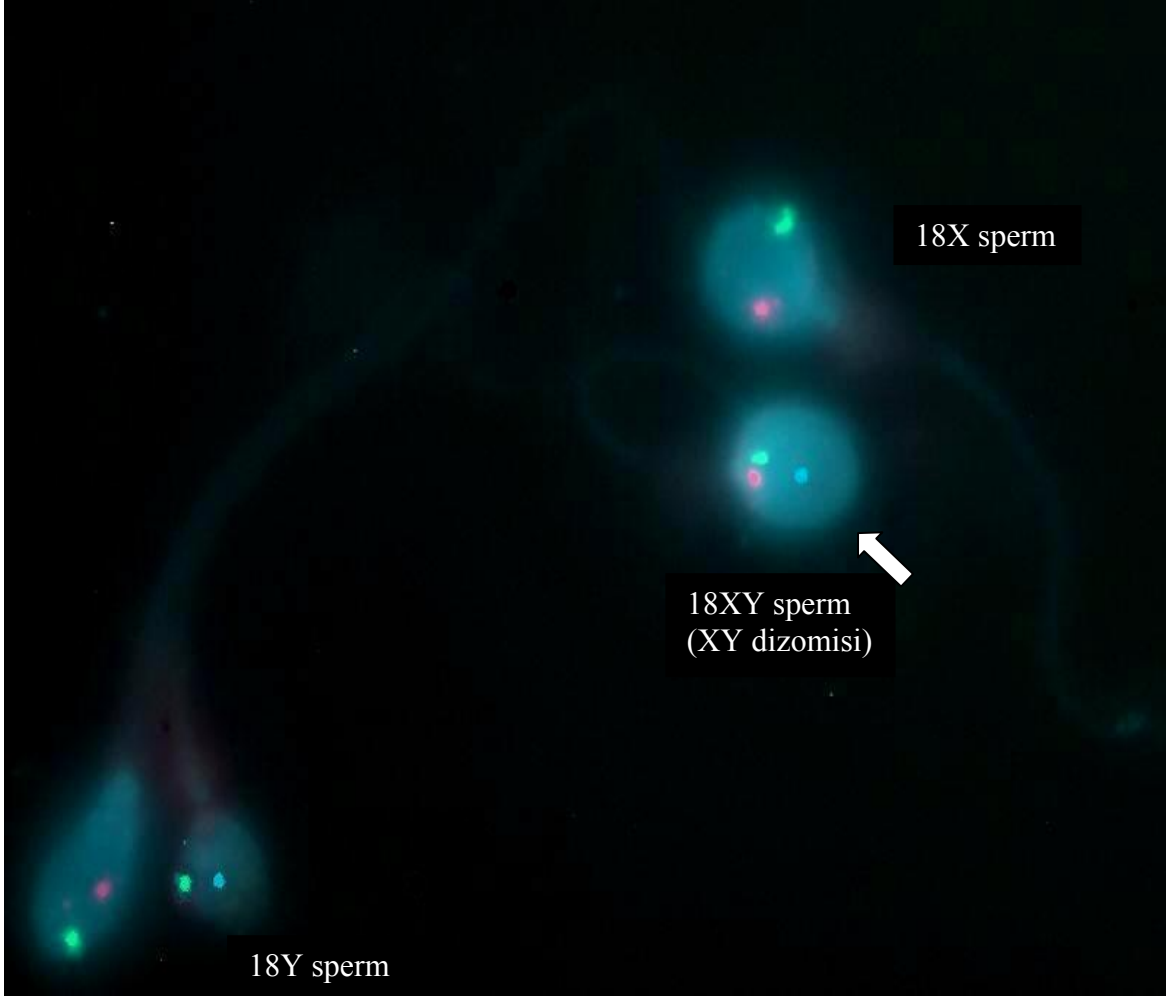
Yapısal kromozomal yeniden düzenlenmesi olan bireylerde interkromozomal etkinin incelenmesi kontrol ve olgu grubundan elde edilen semen parametreleri ve sperm-FISH sonuçlarının birbirleri ile karşılaştırılması istatistiki olarak yapıldı. Bunun için SPSS 10.01 For Windows istatistik paket programı kullanıldı. Kategorik veriler Chi-square testiyle değerlendirildi. Olgu ve kontrol grupları arasındaki, yaş ve spermiogram parametrelerinin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grafikler ise Microsoft Office Excel 2007 paket programı ortamında hazırlandı.



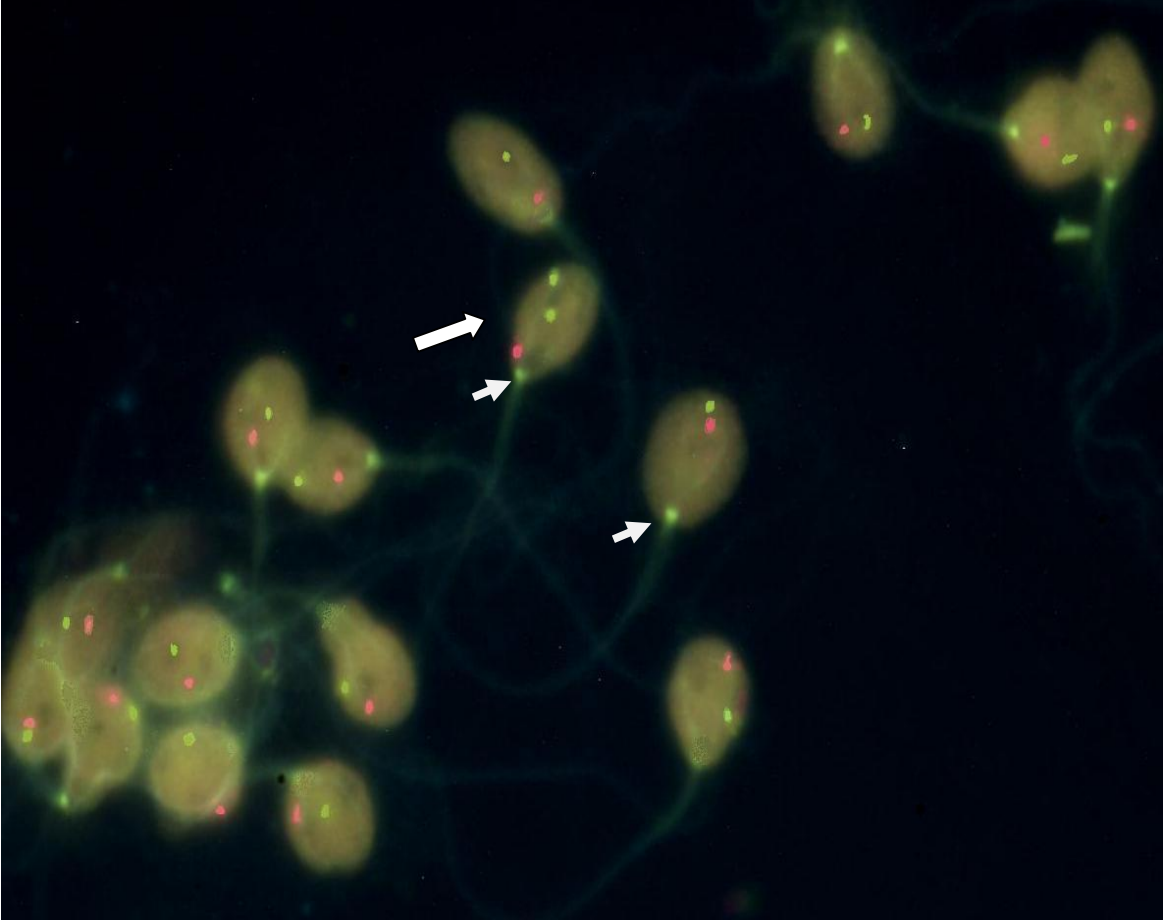
**Şekil 7.** Sperm çekirdeğine üç renkli 18XY sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyon (FISH). Kromozom 18 yeşil renk, X kromozomu kırmızı renk ve Y kromozomu aqua renk ile işaretlidir. Lenfosit (ok ile gösterilen) ve dört adet sperm gözükmemektedir.



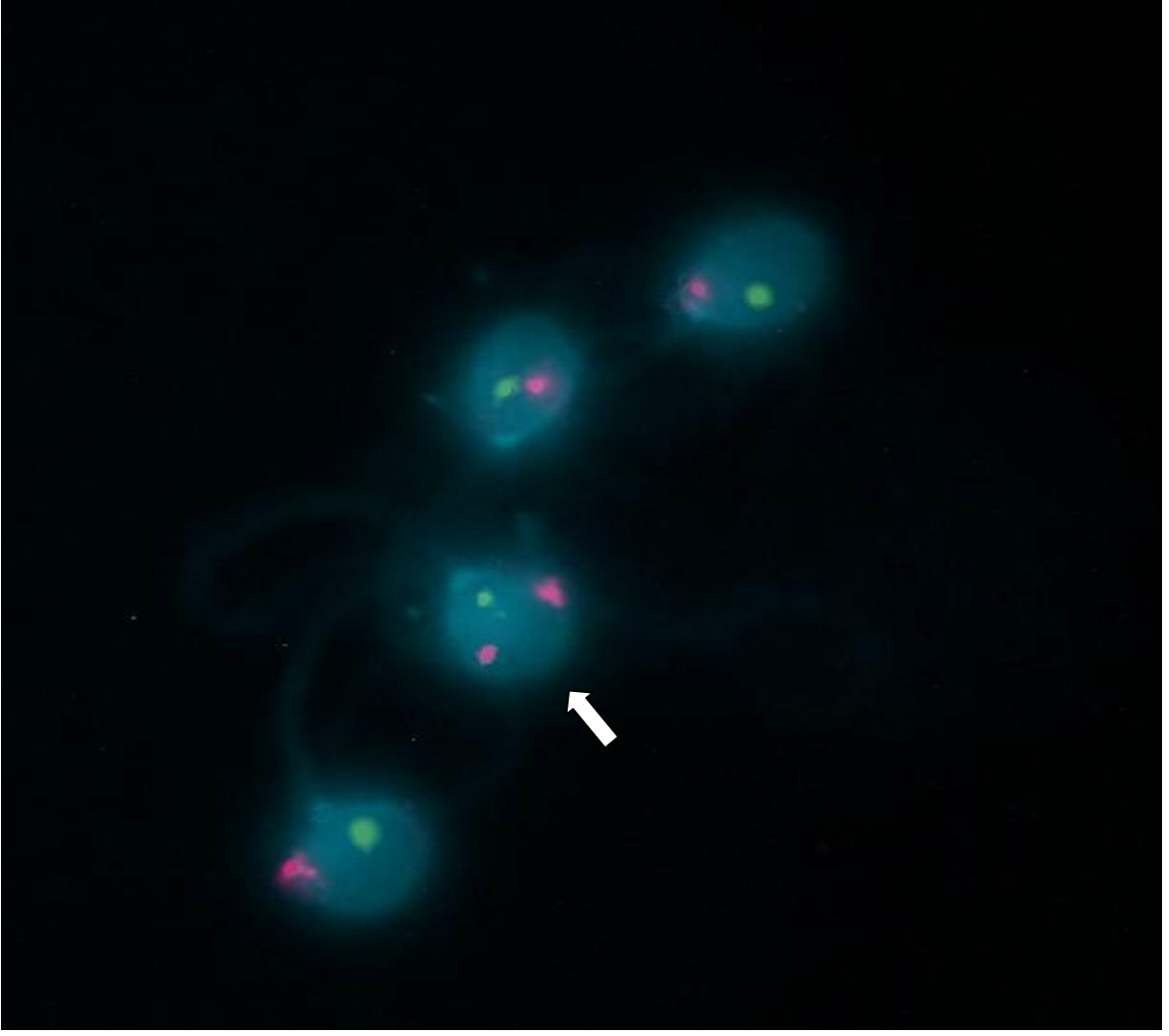
**Şekil 8.** Sperm çekirdeğine üç renkli 18XY sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 18 gözükmemektedir. Kromozom 18 yeşil renk, X kromozomu kırmızı renk ve Y kromozomu aqua renk ile işaretlidir. Ok ile gösterilen spermde bir adet aqua sinyal ve iki adet yeşil sinyal gözükmemektedir (dizomi 18).



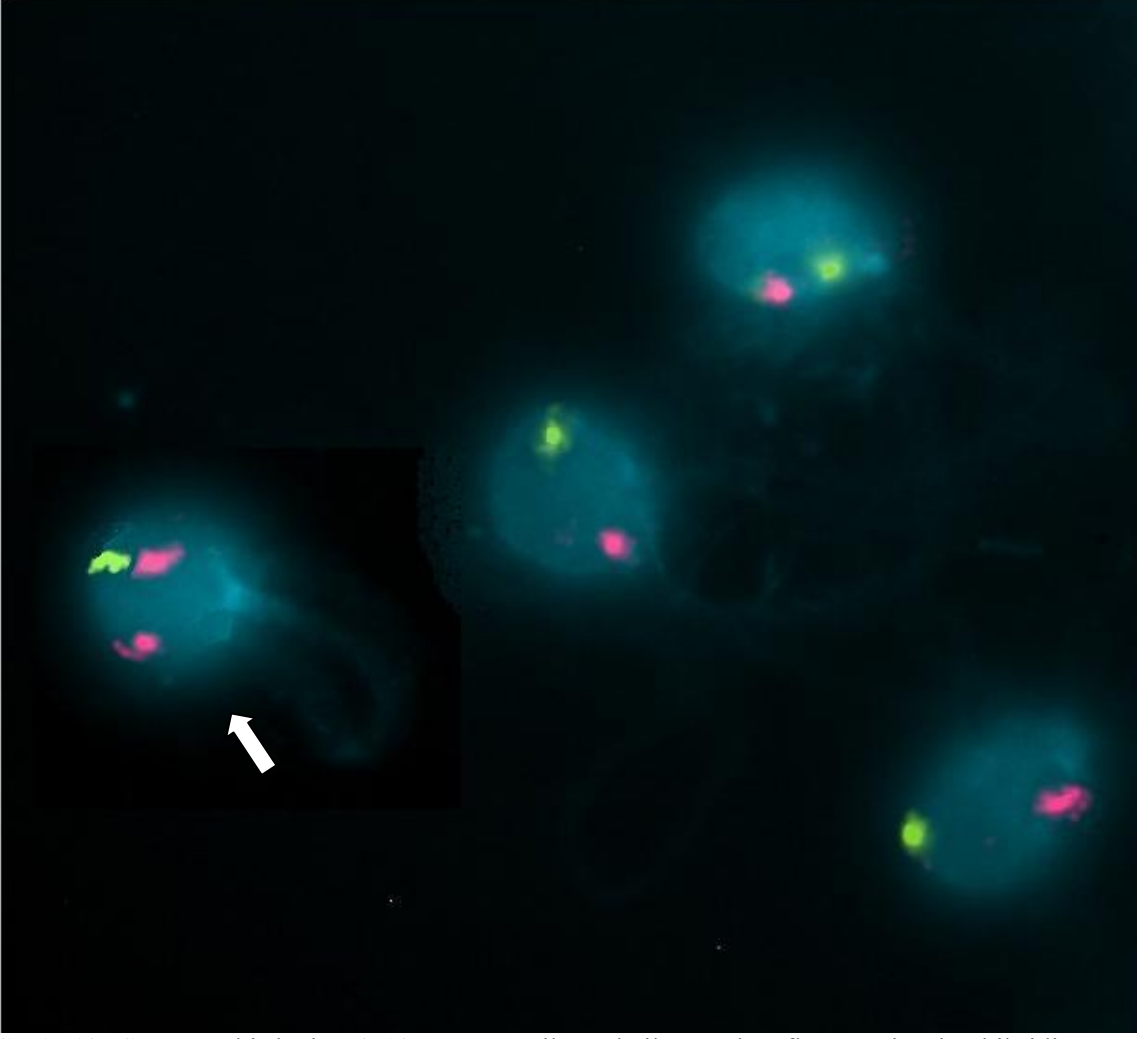
**Şekil 9.** Sperm çekirdeğine üç renkli 18XY sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) XY dizomisi gözükmemektedir. Kromozom 18 yeşil renk, X kromozomu kırmızı renk ve Y kromozomu aqua renk ile işaretlidir. XY dizomisi ok ile gösterilmiştir.



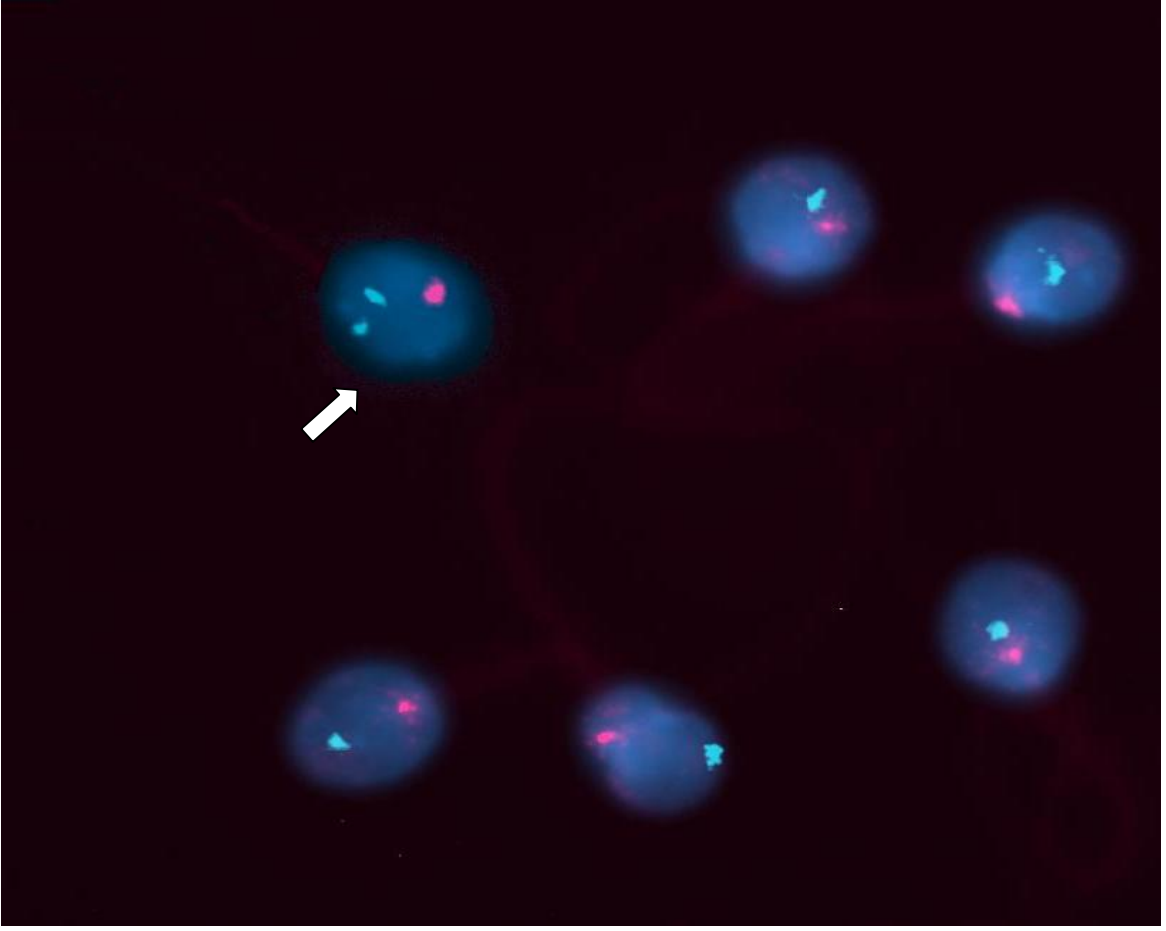
**Şekil 10.** Sperm çekirdeğine 13-21 lokus spesifik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 13 gözükmektedir. Kromozom 13 yeşil renk ve kromozom 21 kırmızı renk ile işaretlidir. Büyük ok ile gösterilen spermde iki adet yeşil sinyal ve bir adet kırmızı sinyal gözükmektedir (dizomi 13). Bazı spermelerde, spermin baş kısmına yakın boyun bölgesinde yeşil sinyal almıştır (küçük oklar ile gösterilmiştir).



**Şekil 11.** Sperm çekirdeğine 13-21 lokus spesifik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 21 gözükmemektedir. Kromozom 13 yeşil renk ve kromozom 21 kırmızı renk ile işaretlidir. Ok ile gösterilen spermde iki adet kırmızı sinyal ve bir adet yeşil sinyal gözükmemektedir (dizomi 21).



**Şekil 12.** Sperm çekirdeğine 2-12 sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 12 gözükmemektedir. Kromozom 2 yeşil renk ve kromozom 12 kırmızı renk ile işaretlidir. Ok ile gösterilen spermde iki adet kırmızı sinyal ve bir adet yeşil sinyal gözükmemektedir (dizomi 12).



**Şekil 13.** Sperm çekirdeğine 3-17 sentromerik prob ile yapılan floresan in situ hibridizasyonda (FISH) dizomi 17 gözükmemektedir. Kromozom 3 kırmızı renk ve kromozom 17 aqua renk ile işaretlidir. Ok ile gösterilen spermde iki adet aqua sinyal ve bir adet kırmızı sinyal gözükmemektedir (dizomi 17).

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya olgu grubu olarak yapısal kromozomal düzensizliği olan 18 erkek birey ile kontrol olarak herhangi bir kromozomal düzensizliği olmayan fertil, sağlıklı 14 erkek birey dahil edildi. Olgu grubunun yaş ortalaması  $33.77 \pm 7.19$  ve kontrol grubunun yaş ortalaması  $32.85 \pm 6.98$  olup aralarında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ( $p=0.67$ ).

Olgu grubundan 38757 sperm ve kontrol grubundan 32437 sperm olmak üzere toplam 71194 sperm analiz edildi. Olgu grubunda 18XY probu ile analiz edilen 9216 spermin %49.7'si (4581 sperm) X kromozomu, %50.3'ü (4635 sperm) Y kromozomu taşıırken, kontrol grubunda 18XY probu ile analiz edilen 8011 spermin %50.5'i (4043 sperm) X kromozomu, %49.5'i (3968 sperm) ise Y kromozomu taşıyordu. Hem olgu grubunda hem de kontrol grubunda X/Y oranları arasında istatistikî olarak fark yoktu ve benzer şekilde kontrol grubu ile olgu grubu arasında da fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ).

Olgu grubu kendi arasında resiprokal translokasyon taşıyıcı grup, Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup ve heteromorfizm taşıyıcı grup olarak sınıflandırıldı (Tablo 3). Resiprokal translokasyon taşıyıcı grup 3 olgudan [t(9;14), t(6;15) ve t(5;11)], Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup 5 olgudan [iki olguda t(13;14), t(13;15), t(14;22) ve t(15;22)] ve heteromorfizm taşıyıcı grup ise 9 olgudan [3 olguda inv(9), iki olguda 21p+, 22p+, 9qh+, inv(Y) ve Yqh-] oluşmaktaydı. İnversiyona sahip tek olgu (olgu-20) olduğundan [inv(6)] herhangi bir gruba katılmadı ama kontrol grubu ile olgu grubu arasındaki karşılaştırmalarda olgu grubuna dahil edildi. Ayrıca heteromorfizm taşıyıcı gruptan yeterli sayıya sahip olduğu için inv(9) taşıyıcı grup ve akrosentrik p+ taşıyıcı grubu adı altında iki grup daha oluşturuldu. İnv(9) taşıyıcı grup ve akrosentrik p+ taşıyıcı grup 3'er olgudan oluşmaktaydı.

Olgu grubu ile kontrol grubuna ait spermiogramlar karşılaştırıldığında viabilite, sayı ve morfoloji değerleri arasında istatistiksel olarak fark görülürken (sırasıyla  $p=0.005$ ,  $p=0.016$  ve  $p=0.034$ ), hacim ve motilite bakımından herhangi bir fark gözlenmedi (sırasıyla  $p=0.382$  ve  $p=0.732$ ).

İncelenen kromozomlara ait dizomi sıklığı, olguların kendi içinde birbirleri ile ayrı ayrı karşılaştırıldı. X ve Y kromozomlarına ait dizomi X ve dizomi Y oranları, düşük olduğundan dizomi (X)+(Y) başlığı altında toplandı. Dizomi (X)+(Y), dizomi 2, dizomi 3, dizomi 12, dizomi 17 ve dizomi 21 sıklığı bakımından olgular kendi içlerinde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark gözlenmediği tespit edildi ( $p>0.05$ ). Ancak XY dizomisi, dizomi 13, dizomi 18 ve toplam dizomi sıklığı olgu grubundaki bazı olgularda yüksek olarak tespit edildi (Tablo 4). XY dizomi oranı olgu-10 ve olgu 20'de, dizomi 18

oranı olgu-2, olgu-9 ve olgu-20’de, dizomi 13 oranı olgu-19 ve olgu-21’de, toplam dizomi oranı ise olgu-19 ve olgu-21’de olgu grubundaki bazı bireylere kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Bu olgular da söz edilen dizomiler bakımından kontrol grubu ile de aralarında istatistiksel olarak fark tespit edildi ( $p<0.05$ ) (Tablo 8 ve 9).

**Tablo 3.** Olgu grubunun sınıflaması ve karyotipleri.

<b>RESİPROKAL TRANSLOKASYON TAŞIYICI GRUP (GRUP-1) n=3</b>	<b>ROBERTSONİAN TRANSLOKASYON TAŞIYICI GRUP (GRUP-2) n=5</b>	<b>HETEROMORFİZM TAŞIYICI GRUP (GRUP-3) n=9</b>
O-1 46,XY,t(9;14)(q21;q11)	O-2 45,XY,t(13;14)(q10;q10)	<b>i) İnv(9) taşıyıcı grup (Grup-4)</b> O-14 46,XY,inv(9)(p11q12)
O-11 46,XY,t(6;15)(q23;q24)	O-4 45,XY,t(15;22)(q10;q10)	O-15 46,XY,inv(9)(p11q12)
O-12 46,XY,t(5;11)(q11.2;p11)	O-5 45,XY,t(14;22)(q10;q10)	O-19 46,XY,inv(9)(p11q12)
	O-10 45,XY,t(13;14)(q10;q10)	<b>ii) Akrosentrik p+ taşıyıcı grup (Grup-5)</b> O-17 46,XY,21p+
	O-22 45,XY,t(13;15)(q10;q10)	O-3 46,XY,22p+
		O-9 46,XY,21p+
		<b>iii) Diğer</b> O-13 46,X,Yqh-
		O-18 46,XY,9qh+
		O-21 46,X,inv(Y)(p11.2q11.23)

O:olgu

**Tablo 4.** Olguların kendi içindeki karşılaştırılmasında dizomi sıklığında istatistiksel olarak fark tespit edilen olgular ve kromozomları.

	<b>O-2</b>	<b>O-9</b>	<b>O-10</b>	<b>O-19</b>	<b>O-20</b>	<b>O-21</b>			
<b>Dizomi sıklığında fark tespit edilen kromozomlar</b>	18	18	XY	13	Toplam dizomi*	XY	18	13	Toplam dizomi*
<b>Fark tespit edilen olgular**</b>	O-1, O-3, O-4, O-5, O-11, O-12, O-13, O-14, O-15, O-17, O-18, O-19, O-20, O-21 ve O-22	O-3, O-4, O-11, O-13 ve O-21	O-12	O-1, O-4, O-14, O-15 ve O-18	O-4 ve O-18	O-12 O-4, O-11 ve O-13	O-1, O-4, O-14 ve O-18	O-4 ve O-18	

O:olgu

\* 2, 3, 12, 13, 17, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait dizomilerin toplam oranı, toplam dizomi olarak ifade edildi.

\*\* $p<0.05$

Olgu ve kontrol gruplarında spermlerde gözlenen dizomi oranları Tablo 5’de verilmiştir (Tablo 5). Toplam dizomi terimi ise her iki gruptaki tüm bireylerde incelenen kromozomlarda (2, 3, 12, 13, 17, 18, 21, X ve Y kromozomlarında) gözlenen dizomilerin toplam oranı olarak ifade edildi. Olgu grubunda en sık 13 nolu kromozomun dizomisi (%0.49) gözlemlendi ama kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmedi ( $\chi^2=3.521$  p=0.061). Kontrol grubunda ise en sık 21 nolu kromozomun dizomisi (%0.38) gözlemlendi ve olgu grubu ile arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmedi ( $\chi^2=0.219$  p=0.639). Olgu grubu ile kontrol grubu arasında 18 nolu kromozom dizomisi, XY dizomisi ve toplam dizomi sıklığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark gözlemlendi (sırayla  $\chi^2=3.985$  p=0.046,  $\chi^2=5.159$  p=0.023,  $\chi^2=20.418$  p=0.000) ve olgu grubunda bu dizomiler daha yüksek oranda tespit edildi. Her iki grupta da 21, 13 ve 17 nolu kromozomların dizomisi sık gözlenen dizomiler olarak tespit edildi. Ayrıca hem olgu hem de kontrol grubunda 2 nolu kromozom dizomisi ve dizomi (X)+(Y) en az gözlenen dizomiler olarak gözlemlendi.

**Tablo 5.** Olgu ve kontrol grubundaki dizomi oranları.

OLGU GRUBU		KONTROL GRUBU	
KROMOZOM	DİZOMİ ORANLARI (%)	KROMOZOM	DİZOMİ ORANLARI (%)
2	0.19	2	0.12
3	0.34	3	0.19
12	0.23	12	0.16
13	<b>0.49*</b>	13	0.30
17	0.43	17	0.28
18	<b>0.26<sup>b</sup></b>	18	0.12
21	0.42	21	0.38
(X)+(Y)	0.17	(X)+(Y)	0.11
XY	<b>0.39<sup>b</sup></b>	XY	0.20
<b>TOPLAM DİZOMİ ORANI</b>	<b>0.69*<sup>a</sup></b>	<b>TOPLAM DİZOMİ ORANI</b>	<b>0.46</b>

\*Olgu-2, olgu-10 ve olgu-22’de translokasyona karışan kromozomlardan biri 13 nolu kromozom olduğundan, bu olguların 13 nolu kromozomuna ait dizomiler dahil edilmedi.

a: p=0.000 (Kontrol grubundaki aynı kromozoma ait dizomi ile karşılaştırıldığında)

b: p<0.05 (Kontrol grubundaki aynı kromozoma ait dizomi ile karşılaştırıldığında)

Kontrol grubu, olgu grubu ve diğer gruplardaki toplam dizomi oranları Tablo 6’da verilmiştir (Tablo 6). Olgu grubundaki toplam dizomi oranı kontrol grubundan daha

yüksek bulundu. Toplam dizomi oranı en düşük kontrol grubunda gözlemlendi. İnv(9) taşıyıcı grupta ise toplam dizomi oranı diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksekti ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark vardı ( $\chi^2=14.323$   $p=0.000$ ). Ayrıca toplam dizomi oranı bakımından kontrol grubu ile olgu grubu, Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup, heteromorfizm taşıyıcı grup ve akrosentrik p+ taşıyıcı grup ile de istatistiksel olarak fark gözlemlendi (sırasıyla  $\chi^2=20.418$   $p=0.000$ ,  $\chi^2=11.528$   $p=0.001$ ,  $\chi^2=13.914$   $p=0.000$ ,  $\chi^2=5.054$   $p=0.025$ ) (Tablo 8). Kontrol grubu ile resiprokal translokasyon taşıyıcı grup arasında toplam dizomi bakımından istatistiksel olarak fark gözlenmedi ( $\chi^2=1.892$   $p=0.169$ ). Resiprokal translokasyon taşıyıcı grup, Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup, heteromorfizm taşıyıcı grup, inv(9) taşıyıcı grup ve akrosentrik p+ taşıyıcı grup aralarında toplam dizomi oranları bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ).

**Tablo 6.** Kontrol grubu, olgu grubu ve diğer gruplarda görülen toplam dizomi oranları.

GRUPLAR	TOPLAM DİZOMİ ORANLARI (%)
Kontrol grubu	0.46
Olgu grubu	0.69*
Resiprokal translokasyon taşıyıcı grup (Grup-1)	0.59
Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup (Grup-2)	0.65*
Heteromorfizm taşıyıcı grup (Grup-3)	0.71
İnv (9) taşıyıcı grup (Grup-4)	0.83
Akrosentrik p+ taşıyıcı grup (Grup-5)	0.69

\*Olgu-2, olgu-10 ve olgu-22'de translokasyona karışan kromozomlardan biri 13 nolu kromozom olduğundan bu olguların dahil olduğu gruplarda toplam dizomi hesaplanırken bu olgulara ait dizomi 13 oranları dahil edilmedi.

Olgularda görülen dizomi oranları ayrı ayrı ve gruplar şeklinde Tablo 7'de verilmiştir (Tablo 7). Resiprokal translokasyon taşıyıcı grubunda ve akrosentrik p+ taşıyıcı grubunda dizomi (X)+(Y) oranları yüksek tespit edildi ancak istatistiksel olarak kontrol grubu ve diğer olgu gruplarıyla arasında fark yoktu ( $p>0.05$ ). Robertsonian translokasyon taşıyıcı grupta dizomi 18 ve dizomi 3 oranları yüksekti ve istatistiksel olarak diğer olgu gruplarıyla arasında fark yoktu ( $p>0.05$ ) ama kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak fark vardı ( $p<0.05$ ). Ayrıca XY dizomi oranı inv(9) taşıyıcı grupta da yüksek tespit edildi ama kontrol grubu ve diğer olgu gruplarıyla arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ( $p>0.005$ ). Dizomi 2 oranı da hem Robertsonian translokasyon taşıyıcı grupta hem de

akrosentrik p+ taşıyıcı grupta yüksekti ve bunlardaki dizomi 2 oranı kontrol grubu ve diğer olgu gruplarıyla ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark tespit edilmedi ( $p>0.05$ ). Heteromorfik taşıyıcı grupta diğer gruplarla karşılaştırıldığında herhangi bir kromozoma ait yüksek bir dizomi oranı tespit edilmedi, ancak alt grubu olan inv(9) taşıyıcı grupta XY dizomi (Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup ile eşit oranda XY dizomi mevcut), dizomi 13, dizomi 21 ve dizomi 17 oranları yüksek tespit edildi ama diğer olgu gruplarıyla arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). Inv(9) taşıyıcı gruptaki dizomi 17 sıklığı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek olarak gözlendi ( $p<0.05$ ). Heteromorfik taşıyıcı grubun diğer bir alt grubu olan akrosentrik p+ taşıyıcı grupta dizomi (X)+(Y) (resiprokal translokasyon taşıyıcı grup ile eşit oranda), dizomi 2 (Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup ile eşit oranda) ve dizomi 12 oranları yüksek olarak tespit edildi ama kontrol grubu ve diğer olgu gruplarıyla arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 7). Robertsonian translokasyon taşıyıcı gruptaki 3 olguda translokasyona karışan 13 nolu kromozom olduğundan, bu grubun dizomi 13 oranı hesaplanırken, 3 olgunun dizomi 13 oranları dahil edilmedi.

İnterkromozomal etkinin olup olmadığının tespiti için dizomi sayıları karşılaştırıldı. Kontrol grubu her kromozomun dizomi oranı için ve toplam dizomi oranı için, önce olgu grubunun tamamı ile sonra olguların alt grupları ile, son olarak da her olgu ile ayrı ayrı karşılaştırıldı (Tablo 8, 9 ve 10). Kontrol grubu ile olgu grubu arasındaki toplam dizomi oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark tespit edildi ( $\chi^2=20.418$   $p=0.000$ ). Dizomi (X)+(Y) mayoz II hatası sonucu oluşmaktadır ve interkromozomal etki ise mayoz I'de meydana geldiği kabul edilmektedir. Bundan dolayı dizomi (X)+(Y) sayısını olgu ve kontrol grubundan çıkararak aradaki anlamlılığa tekrar bakıldığında, olgu grubu ve kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark hala vardı ( $\chi^2=19.313$   $p=0.000$ ). Tüm olgu grubuna ek olarak, kontrol grubu ile olgulara ait alt gruplar ve olgular ayrı ayrı karşılaştırıldı. Toplam dizomi sayılarında istatistiksel olarak anlamlı fark olan olgular ve olgulara ait gruplar Tablo 8'de gösterilmiştir (Tablo 8). Olgu grubu içinde olan resiprokal translokasyon taşıyıcı grup hariç diğer gruplar (Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup, heteromorfizm taşıyıcı grup, inv(9) taşıyıcı grup ve p+ taşıyıcı grup) ile kontrol grubu arasında toplam dizomi sayıları bakımından istatistiksel olarak fark tespit edildi (Tablo 8 ve 10). Resiprokal translokasyon taşıyıcı grup, Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup, heteromorfizm taşıyıcı grup, inv(9) taşıyıcı grup ve akrosentrik p+ taşıyıcı grup kendi aralarında toplam dizomi sayıları bakımından ve diğer kromozomlara ait dizomiler bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ).

**Tablo 7.** Olgulardaki dizomi oranları.

GRUPLAR	OLGU	KARYOTİP	dizomi XY (%)	dizomi XX+YY (%)	dizomi 18 (%)	dizomi 2 (%)	dizomi 12 (%)	dizomi 13 (%)	dizomi 21 (%)	dizomi 3 (%)	dizomi 17 (%)
RESİPROKAL TRANSLOKASYON TAŞIYICI GRUP (GRUP-1) n=3	O-1	46,XY,t(9;14)(q21;q11)	0.50	0.17	0.17	0.16	0.33	0.20	0.20	0.20	0.40
	O-11	46,XY,t(6;15)(q23;q24)	0.19	0.39	0.0	0.14	0.14	0.40	0.20	0.51	0.34
	O-12	46,XY,t(5;11)(q11.2;p11)	0.16	0.16	0.33	0.14	0.14	0.40	0.40	0.38	0.38
	<b>TOPLAM</b>		<b>0.29</b>	<b>0.23**</b>	<b>0.18</b>	<b>0.15</b>	<b>0.20</b>	<b>0.33</b>	<b>0.27</b>	<b>0.37</b>	<b>0.37</b>
ROBERTSONİAN TRANSLOKASYON TAŞIYICI GRUP (GRUP-2) n=5	O-2	45,XY,t(13;14)(q10;q10)	0.37	0.0	<b>1.48a</b>	0.16	0.49	<b>1.57*</b>	0.20	0.21	0.42
	O-10	45,XY,t(13;14)(q10;q10)	<b>1.08a</b>	0.22	0.22	0.20	0.20	<b>1.23*</b>	0.49	0.60	0.40
	O-22	45,XY,t(13;15)(q10;q10)	0.19	0.0	0.19	0.20	0.20	<b>3.27*</b>	0.58	0.40	0.40
	O-5	45,XY,t(14;22)(q10;q10)	0.36	0.18	0.18	0.14	0.14	0.40	0.20	<b>0.79c</b>	0.60
	O-4	45,XY,t(15;22)(q10;q10)	0.18	0.0	0.0	0.32	0.16	0.20	0.40	0.37	0.18
	<b>TOPLAM</b>		<b>0.42**</b>	<b>0.08</b>	<b>0.42**c</b>	<b>0.20**</b>	<b>0.24</b>	<b>0.30</b>	<b>0.38</b>	<b>0.48**c</b>	<b>0.40</b>
HETEROMORFİZM TAŞIYICI GRUP (GRUP-3) n=9	O-13	46,X,Yqh-	0.19	0.39	0.0	0.20	0.20	0.59	0.40	0.19	0.37
	O-21	46,X,inv(Y)(p11.2q11.23)	0.36	0.36	0.18	0.28	0.14	<b>1.55a</b>	0.58	0.20	0.40
	O-19	46,XY,inv(9)(p11q12)	0.36	0.18	0.18	0.18	0.36	<b>1.25a</b>	0.54	0.37	0.56
	O-14	46,XY,inv(9)(p11q12)	0.32	0.16	0.16	0.18	0.0	0.20	0.60	0.18	<b>0.90c</b>
	O-15	46,XY,inv(9)(p11q12)	0.58	0.0	0.19	0.14	0.14	0.19	0.77	0.60	<b>0.79c</b>
	O-18	46,XY,9qh+	0.32	0.16	0.16	0.14	0.14	0.19	0.58	0.15	0.15
	O-17	46,XY,21p+	0.58	0.0	0.19	0.20	<b>0.59c</b>	0.40	0.20	0.21	0.21
	O-9	46,XY,21p+	0.42	0.0	<b>0.84c</b>	0.21	0.42	0.22	0.22	0.21	0.21
	O-3	46,XY,22p+	0.18	<b>0.56c</b>	0.0	0.20	0.20	0.40	0.59	0.20	<b>0.78c</b>
	<b>TOPLAM</b>		<b>0.37</b>	<b>0.22</b>	<b>0.24</b>	<b>0.19</b>	<b>0.23</b>	<b>0.45</b>	<b>0.50</b>	<b>0.25</b>	<b>0.49</b>
İNVERSİYON 9 TAŞIYICI GRUP (GRUP-4) n=3	O-14	46,XY,inv(9)(p11q12)	0.32	0.16	0.16	0.18	0.0	0.20	0.60	0.18	<b>0.90c</b>
	O-15	46,XY,inv(9)(p11q12)	0.58	0.0	0.19	0.14	0.14	0.19	0.77	0.60	<b>0.79c</b>
	O-19	46,XY,inv(9)(p11q12)	0.36	0.18	0.18	0.18	0.36	<b>1.25a</b>	0.54	0.37	0.56
	<b>TOPLAM</b>		<b>0.42**</b>	<b>0.12</b>	<b>0.18</b>	<b>0.17</b>	<b>0.17</b>	<b>0.58**</b>	<b>0.64**</b>	<b>0.38</b>	<b>0.76**c</b>
AKROSENTRİK p(+) TAŞIYICI GRUP (GRUP-5) n=3	O-3	46,XY,22p+	0.18	<b>0.56c</b>	0.0	0.20	0.20	0.40	0.59	0.20	<b>0.78c</b>
	O-9	46,XY,21p+	0.42	0.0	<b>0.84c</b>	0.21	0.42	0.22	0.22	0.21	0.21
	O-17	46,XY,21p+	0.58	0.0	0.19	0.20	<b>0.59c</b>	0.40	0.20	0.21	0.21
	<b>TOPLAM</b>		<b>0.39</b>	<b>0.23**</b>	<b>0.23</b>	<b>0.20**</b>	<b>0.40**</b>	<b>0.34</b>	<b>0.34</b>	<b>0.20</b>	<b>0.41</b>
İNVERSİYON TAŞIYICI GRUP n=1	O-20	46,XY,inv(6)(p22q13)	<b>1.19b</b>	0.0	<b>0.79c</b>	0.17	0.34	0.55	0.37	0.31	0.31

O:olgu, inv:inversiyon, p:kromozomun kısa kolu.

\* dizomi 13 oranı hesaplanırken dahil edilmedi,

\*\* gruplarda dizomi oranı yüksek gözlenenler.

Kontrol grubu ile istatistiksel olarak fark gözlenen olgu ve gruplar **a:** p=0.000, **b:** p=0.001, **c:** p<0.05

**Tablo 8.** Toplam dizomi sayıları bakımından kontrol grubu ile istatistiksel olarak fark tespit edilen olguların ve grupların gösterimi.

OLGU ve toplam dizomi oranı (%)	O-2	O-3	O-10	O-15	O-19	O-20	O-21	Rob translokasyon taşıyıcı grup	Heteromorfizm taşıyıcı grup	inv(9) taşıyıcı grup	Akrosentrik p+ taşıyıcı grup	Olgu grubu
	0.85	0.78	0.86	0.80	1.00	0.85	0.97	0.65	0.71	0.83	0.69	0.69
KONTROLdeki toplam dizomi** oranı (%) n=14	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
$\chi^2$	9.989	4.079	9.291	5.262	12.351	5.984	11.173	11.528	13.914	14.323	5.054	20.418
df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
p	0.002	0.043	0.002	0.022	0.000	0.014	0.001	0.001	0.000	0.000	0.025	0.000

KG:kontrol grubu, O:olgu.

\*Olgularda, translokasyona karışan kromozomlardan biri 13 nolu kromozom olduğundan toplam dizomiye, dizomi 13 dahil edilmedi.

\*\*2, 3, 12, 13, 17, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait dizomilerin toplam oranı, toplam dizomi olarak ifade edildi.

Ayrıca dizomi sıklığına bakılan her kromozom için olgu grupları ve olgular ayrı ayrı olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak farklı olanlar Tablo 9’da verildi (Tablo 9). Kontrol grubu ile olgu grubu arasında XY dizomi ve dizomi 18 sıklığında istatistiksel olarak fark tespit edildi (sırasıyla  $\chi^2=5.159$  p=0.023 ve  $\chi^2=3.985$  p=0.046) ama olgu grubunda XY dizomi oranı yüksek olan olgu-10 eğer olgu grubundan çıkarılırsa, kontrol grubu ile olgu grubu arasındaki fark ortadan kalkmakta ( $\chi^2=3.537$  p=0.060) idi. Benzer şekilde olgu grubunda dizomi 18 oranı yüksek olan olgu-2 eğer olgu grubundan çıkarılırsa, kontrol grubu ile olgu grubu arasındaki istatistiksel fark ortadan kalkmakta ( $\chi^2=0.942$  p=0.332) idi. XY dizomi ve dizomi 18 sıklığını olgu grubunda anlamlı kılan sırayla olgu-10 ve olgu-2 bireylerdi ve iki olguda Robertsonian translokasyon taşıyıcı grubuna ait olgulardı. Dizomi 2 ve dizomi 21 sıklığı bakımından kontrol grubu ile olgu grubu, olgu grupları ve olgular ayrı ayrı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark gözlenmedi (p>0.05). Olgu grupları (resiprokal translokasyon taşıyıcı grup, Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup, heteromorfizm taşıyıcı grup, inv(9) taşıyıcı grup ve akrosentrik p+ taşıyıcı grup) incelenen kromozomlarda tespit edilen dizomi oranları bakımından kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark gözlenmedi (p>0.05).

**Tablo 9.** Kontrol grubu ile olgu grubu, gruplar ve olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan dizomiler.

	O-2	O-3		O-5	O-9	O-10	O-14	O-15	O-17	O-19	O-20		O-21	Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup		inv(9) taşıyıcı grup	Olgu grubu	
DİZOMİ	18	(XX)+(YY)	17	3	18	XY	17	17	12	13	XY	18	13	3	18	17	XY	18
DİZOMİ ORANI (%)	1.48	0.56	0.78	0.79	0.84	1.08	0.90	0.79	0.59	1.25	1.19	0.79	1.55	0.48	0.42	0.76	0.39	0.26
KONTROLDEKİ DİZOMİ ORANI (%) n=14	0.12	0.11	0.28	0.19	0.12	0.20	0.28	0.28	0.16	0.30	0.20	0.12	0.30	0.19	0.12	0.28	0.20	0.12
x <sup>2</sup>	44.587	7.044	3.957	7.524	8.160	13.888	6.281	4.123	4.750	13.286	10.600	7.764	20.452	5.926	8.699	8.499	5.159	3.985
df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
p	0.000	0.008	0.047	0.006	0.004	0.000	0.012	0.042	0.029	0.000	0.001	0.006	0.000	0.015	0.003	0.004	0.023	0.046

O:olgu

Her olgu ve olgu grubunda, istatistiksel olarak yüksek bulunan dizomiler Tablo 10’da gösterildi (Tablo 10). Dizomi sıklığı bakımından kontrol grubu ile olgu grubu karşılaştırıldığında, olgu-1, olgu-4, olgu-11, olgu-12, olgu-13, olgu-18, olgu-22 ve resiprokal translokasyon taşıyıcı grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 10). Dizomi sıklığı kontrol grubundan farklı olmayan bu yedi olgunun üçü resiprokal translokasyon taşıyıcısı [O-1=t(9;14), O-11=t(6;15), O-12=t(5;11)], ikisi Robertsonian translokasyon taşıyıcısı [O-4=t(15;22), O-22=t(13;15)] ve diğer ikisinin ise heteromorfik taşıyıcısı (O-18=9qh+ ve O-13=Yqh-) grubuna ait olduğu gözlemlendi.

**Tablo 10.** Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dizomi oranı istatistiksel olarak yüksek tespit edilen olgular ile bunlarda dizomi oranı yüksek bulunan kromozomların gösterimi.

OLGU	KARYOTİP	KONTROL GRUBUNA GÖRE YÜKSEK OLAN DİZOMİLER
O-1	46,XY,t(9;14)(q21;q11)	herhangi bir kromozoma ait fark görülmedi
O-2	45,XY,t(13;14)(q10;q10)	<b>toplam dizomi, dizomi 18</b>
O-3	46,XY,22p+	<b>toplam dizomi, dizomi XX+YY, dizomi 17</b>
O-4	45,XY,t(15;22)(q10;q10)	herhangi bir kromozoma ait fark görülmedi
O-5	45,XY,t(14;22)(q10;q10)	<b>dizomi 3</b>
O-9	46,XY,21p+	<b>dizomi 18</b>
O-10	45,XY,t(13;14)(q10;q10)	<b>toplam dizomi, XY dizomi</b>
O-11	46,XY,t(6;15)(q23;q24)	herhangi bir kromozoma ait fark görülmedi
O-12	46,XY,t(5;11)(q11.2;p11)	herhangi bir kromozoma ait fark görülmedi
O-13	46,X,Yqh-	herhangi bir kromozoma ait fark görülmedi
O-14	46,XY,inv(9)(p11q12)	<b>dizomi 17</b>
O-15	46,XY,inv(9)(p11q12)	<b>toplam dizomi, dizomi 17</b>
O-17	46,XY,21p+	<b>dizomi 12</b>
O-18	46,XY,9qh+	herhangi bir kromozoma ait fark görülmedi
O-19	46,XY,inv(9)(p11q12)	<b>toplam dizomi, dizomi 13</b>
O-20	46,XY,inv(6)(p22q13)	<b>toplam dizomi, XY dizomi, dizomi 18</b>
O-21	46,X,inv(Y)(p11.2q11.23)	<b>toplam dizomi, dizomi 13</b>
O-22	45,XY,t(13;15)(q10;q10)	herhangi bir kromozoma ait fark görülmedi
Grup-1	Resiprokal translokasyon taşıyıcı	herhangi bir kromozoma ait fark görülmedi
Grup-2	Robertsonian traslokasyon taşıyıcı	<b>toplam dizomi, dizomi 3, dizomi 18</b>
Grup-3	Heteromorfizm taşıyıcı	<b>toplam dizomi</b>
Grup-4	İnversiyon 9 taşıyıcı	<b>toplam dizomi, dizomi 17</b>
Grup-5	Akrosentrik p+ taşıyıcı	<b>toplam dizomi</b>
Olgu grubu	Tüm olgular	<b>toplam dizomi, XY dizomi, dizomi 18</b>

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bireyde mevcut olan translokasyon veya yapısal yeniden düzenlenme sebebiyle, translokasyona yada yeniden düzenlenmeye karışmayan kromozomun mayoz I sırasındaki ayrılammaması olayına İKE denmektedir. İKE ilk defa 1963 yılında Lejeune tarafından insanda tanımlanmıştır (49). Lejeune, translokasyona karışan kromozomların ve homologlarının, diğerkromozomların segregasyonunu anormal şekilde etkileyebileceğini öne sürmüştür (50). Lejeune, Down Sendromlu çocukların babalarında, dengeli resiprokal translokasyon taşıyıcılık oranının artmış olduğunu bildirmiştir (50). Down sendromlu, Turner sendromlu ve Klinefelter sendromlu çocuklara sahip babaların spermlerinde kromozom 21'de ve seks kromozomlarında anöploidi artışı olduğu bildirilmiştir (25, 75, 76).

İKE oluş mekanizması hakkında bazı görüşler ileri sürülmektedir. Sinaptonemal kompleks çalışmaları gösterdi ki, yapısal reorganizasyonun varlığı pakitende eşleşme anomalilerine ve kiazma sayısında azalmaya neden olarak anöploidiye yol açabilmektedir (56). Her nasılsa eşleşmeyen bölgeler anafaz kontrol noktasında karışıklığa sebep olduğu bildirilmektedir (77). Dengeli resiprokal translokasyon taşıyıcılarında, mayoz I profaz pakiteninde oluşan quadrivalent yapı, eşleşmeyen (unpaired) bölgelere neden olabilmekte ve sinaps yapmayan (unsynapsed) segmentler oluşmaktadır. Bu sinaps yapmayan segmentler seks vezikülü (X-Y bivalenti) ve diğerkromozomal bivalentleri etkileyebileceği ve mayotik arreste (durma) veya kromozomlarda ayrılammama olayında artışa yol açabileceği ileri sürülmüştür (56). İnsan genomunda yaklaşık olarak 130 adet LCR mevcuttur. LCR'ler arasındaki yüksek nükleotid dizi benzerliğinden dolayı, transloke olan kromozom parçasındaki sinaps yapmayan bu bölgede olabilecek olan LCR'ler diğerkromozomun LCR'leri ile mayoz I profazda karşı karşıya gelerek yanlış eşleşmeye neden olarak anöploidiye neden olabilir.

Literatürde, araştırmamızda incelenen resiprokal translokasyonların, translokasyon bölgelerinin benzeri herhangi bir vaka üzerinde İKE çalışması mevcut değildir. Bu üç resiprokal translokasyon taşıyıcısında, analiz edilen kromozomlardaki anöploidi oranların bakımından kontrol grubu ile arasında fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Resiprokal translokasyon taşıyıcısı grup ile kontrol grubu arasında anöploidi oranları bakımından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Translokasyon tipi, hasta, kromozom ve kırık noktanın pozisyonu İKE'yi etkilediği bildirilmiştir (12, 55). Aynı translokasyonu taşıyan hastalarda dizomi oranları ve etkilenen kromozomlar farklı olabilmektedir.

Down sendromlu çocuklara sahip ailelerde resiprokal translokasyonun artmış insidansı ailelerin ileri yaşta çocuk sahibi olmasından kaynaklanabilmektedir (66). Çünkü resiprokal translokasyon taşıyıcıların partnerlerinin gebe kalmasında ve gebeliği sürdürmesindeki zorluklar ileri yaşta çocuk sahibi olmaya neden olabilmektedir. Ama Blanco ve arkadaşlarının 1998 yılında 17 Down sendromlu hastalarda ve babalarında yaptığı çalışmada, 17 babanın spermi dizomi 21 bakımından incelenmiş (25) ve iki babanın sperminde dizomi 21 oranında belirgin artış olduğu gösterilmiştir. Babalarının sperminde dizomi 21 artışı gözlenen bu iki olgudaki fazla kromozom paternal mayoz I ve paternal mayoz II hatasından kaynaklanmaktaydı. Diğer Down sendromlu çocuklardaki fazla kromozomun maternal mayoz ve post zigotik hatalardan kaynaklandığı rapor edilmiştir.

Normal bireylerde, spermlerde anöploidi oranları arasında bireysel farklılıklar tespit edilmiştir ve hatta aynı bireyin farklı zamanlarda verdiği örneklerde bile anöploidi oranında fark olduğu gösterilmiştir (78). Aynı translokasyonu taşıyan olgularda da İKE'e bakıldığında kişiler arası ve kromozomlar arası çok büyük farklılıklar gözlenmiştir (62). Bu farklılığın sebebi hasta seçimindeki kriterlerin benzer olmaması, hastaların farklı coğrafik alanlardan olması, semen örneklerin alınmadan önceki cinsel perhiz süresindeki farklılıklar, FISH tekniğinin ve problemlerin farklı olması, aynı skorlama kriterlerinin her zaman uygulanmaması olabilmektedir (57). Ayrıca bu farklılık yeniden düzenlenen kromozomun spesifik karakteri ile de ilişkili olabilmektedir ve akrosentrik kromozomlardaki satellit heteromorfizmi ( $\alpha$ -satellit heteromorfizmi) örnek olarak verilebilir (61).

Literatürde Robertsonian translokasyon taşıyıcı bireylerde de İKE araştırılmıştır. Robertsonian translokasyon taşıyıcılarında İKE olmadığını söyleyen çalışmalar olduğu gibi (39, 66, 79), İKE olduğunu söyleyen çalışmalarda mevcuttur (60, 61). Araştırmamıza katılan beş Robertsonian translokasyonlu taşıyıcının üçünde İKE tespit edilmiştir. İki olguda t(13;14) vardı ve ikisinde de sırayla dizomi 18 ve XY dizomi oranları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Diğer olgumuz olan t(14;22)'de ise dizomi 3 oranı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Robertsonian translokasyon taşıyıcı grupta dizomi 3, dizomi 18 ve toplam dizomi oranları kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Robertsonian translokasyon taşıyıcı grupta dizomi 18 oranını anlamlı kılan bireyin, olgu-2 olduğu tespit edilmiştir. Olgu-2, Robertsonian translokasyon taşıyıcı gruptan çıkartıldığında, dizomi 18 oranı bakımından kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ). Olgu-2'deki translokasyonun

aynısına sahip olan olgu-10'da, dizomi 18 oranının kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmaması ( $p>0.05$ ), İKE'de bireysel farklılığın varlığını göstermektedir. Robertsonian translokasyon taşıyıcı grup XY dizomi oranı en yüksek olan gruptu ama kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak fark tespit edilmedi ( $p>0.05$ ). Morel ve arkadaşları (2001) t(13;14) taşıyan üç hastada yaptığı çalışmada dizomi 8, 18, 21 ve XY dizomi oranlarının kontrol grubundan yüksek olduğunu bulmuştur (60). Morel ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışma ile mevcut çalışmamızın her ikisinde de dizomi 18 ve XY dizomi oranları yüksek bulunmuştur (60). Ama çalışmamızda Robertsonian translokasyon taşıyıcı grubun dizomi 21 oranı kontrol grubu ile eşit bulunmuştur. Literatürde diğer çalışmalarda da Robertsonian translokasyon taşıyıcılarında seks kromozom dizomi oranları yüksek bulunmuştur (12). Anton ve ark. (2004) yaptığı çalışmada 7 Robertsonian translokasyon taşıyıcısının ikisinde seks kromozom dizomi oranlarının kontrol grubundan daha yüksek olduğunu tespit etmiştir (61). Ancak gözlenen bu anöploidileri dizomi X, dizomi Y ve XY dizomisi olarak sınıflamamıştır. XY dizomisi mayoz I hatasından, dizomi X ve dizomi Y ise mayoz II hatasından kaynaklanmaktadır. İKE'in ise yapısal düzenlenme sebebiyle, bivalentler arasında olmaması gereken heterosinapsın oluşması sonucu meydana geldiği yönünde fikirler vardır (55) ve heterosinaps mayoz I'de oluşmaktadır. Dolayısıyla İKE'den bahsedebilmek için oluşan hatanın mayoz I'de olması gerekmektedir (55). Bazı çalışmalarda (61) ise dizomi X, dizomi Y ve XY dizomilerinin tek bir başlık altında toplanması, İKE ile ilgili yapılan çalışmalarda bir standardın olmadığını göstermektedir.

Robertsonian translokasyon taşıyıcılarında, mayoz I profaz pakiteninde oluşan trivalent yapı eşleşme bozukluklarına ve/veya kiazma sayısında azalmaya sebep olarak İKE'e neden olabilmektedir. Sinaptonemal kompleks çalışmalarında kiazma sayısının azalması ve yokluğunda ya anöploidi frekansının arttığı ya da mayotik arreste uğradığı gösterilmiştir (16, 23, 36). Ayrıca İKE mayoz I boyunca seks vezikülü ile transloke olan kromozomlar arasında meydana gelen heterosinaps formasyonu ile de açıklanmaktadır (55). Mayoz I profazında seks vezikülü ile trivalent yapıdaki füzyon yapmamış akrosentrik kromozomların p kolu ile aralarında rastgele olmayan bir ilişki gözlemlenmiştir (37, 80, 81). Elektron mikroskop çalışmaları, oluşan heterosinaps oranlarının translokasyondan translokasyona farklı olduğu gösterilmiş ve aynı translokasyonu olanlarda bu oranın daha tutarlı olduğu görülmüştür. Bu da İKE'in translokasyon tipine bağlı olduğunu gösterir hipotezini öne sürmüşlerdir (56). Seks vezikülü ve transloke olan kromozomlar arasında oluşan heterosinaps formasyonuna bağlı İKE olduğuna dair yeterli kanıt bulunmamaktadır.

Sinaptonemal kompleks çalışmalarında 15 nolu kromozom sinaptonemal kompleksi ve 21 nolu kromozom sinaptonemal kompleksi ile seks vezikülü arasında yakın bir ilişki gösterilmiştir (82) ve bunun da 15 ve 21 nolu kromozomların kısa kolları ile Y kromozomun q kolundaki sekans homolojisinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (82).

Olgu grubumuzda herhangi bir gruba dahil etmediğimiz inv(6) taşıyıcısında dizomi 18, XY dizomi, toplam dizomi oranları kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Literatürde farklı kromozomlara ait inversiyonu olan taşıyıcılarda İKE araştırılmıştır ve bazı çalışmalarda İKE'in olmadığı sonucuna varılırken (83, 84, 85) bazı çalışmalarda ise İKE'in var olduğu sonucuna varılmıştır (86). Anton ve ark. (2002) inv(6) taşıyıcısında 18, X ve Y kromozom anöploidisini incelemiş ve bulunan dizomi oranlarının kontrol grubundan farklı olmadığını tespit etmiştir (87) ama bu durum incelenen inv(6) taşıyıcısı bireydeki kırık noktalarının, olgumuzdaki (olgu-20'deki) kırık noktaları ile benzer olmamasından kaynaklanabilmektedir. Çalışmamızda üç olgudan oluşan inv(9) taşıyıcı grubundaki dizomi oranlarını ayrı ayrı ve inv(9) taşıyıcı grup olarak kontrol grubu ile karşılaştırdık. Inv(9) taşıyıcılarının birinde dizomi 13, diğer ikisinde ise dizomi 17 oranları istatistiksel olarak yüksek gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Inv(9) taşıyıcı grubunda ise dizomi 17 ve toplam dizomi oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Literatürde inv(9) taşıyıcılarında dizomi oranları incelenmiştir ve İKE tespit etmeyen çalışmalar olduğu gibi (56, 88), İKE var diyen çalışmada mevcuttur (13).

Literatürde daha önceden akrosentrik p+ taşıyıcı grupta İKE'in varlığı araştırılmamıştır. Çalışmamızda ise akrosentrik p+ taşıyıcı üç olgu vardı ve bunlardaki dizomi oranları ayrı ayrı ve akrosentrik p+ taşıyıcı grup olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Çalışmamızdaki üç olguda da (olgu-17, olgu-3 ve olgu-9'da) farklı kromozomlara ait (12, 17 ve 18 nolu kromozomlara ait) dizomi oranları istatistiksel olarak yüksek gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Akrosentrik p+ taşıyıcı grupta toplam dizomi oranları istatistiksel olarak yüksek gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Ayrıca bu grupta XY dizomisi yüksek olmasına rağmen, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ).

Heterokromatin bölgesi iç ipliği bağlanmasında, kromozom hareketinde, mayotik eşleşme ve kardeş kromatid kohezyonunda temel rol oynayan yapılardır (42). Bundan da öte çevresel strese cevap olarak insan genomundaki konstitutif heterokromatin bölgelerinin transkripsiyonel aktivasyonu meydana gelebilmektedir (48). Heterokromatin bölgeleri hücre tipine spesifik olarak nükleer laminada toplanır, genomdaki transkripsiyon olarak

aktif bölgeler, nükleus içine doğru loop oluşturur (89). Heterokromatin bölgelerin sitogenetik karakteristiği tekrarlayıcı sekanstan yoğun olmasıdır (90) ve mayozda geç eşleşme yaptığı bilinmektedir (91). Non-sentromerik heterokromatin bölgeler sinapsa geç girerek bölünmenin zamanını değiştirebilmekte ve mayotik hataya neden olabilmektedir (82). Kromozomların kendi içindeki ilmek (loop) ve diğer kromozomlar arasındaki köprüler (bridge) sayesinde genomda diğer lokuslar ile fiziksel etkileşimi sürdürmektedir (89). Bu etkileşim transkripsiyonun ekspresyon hızını ve süresini değiştirmektedir. Tek nükleotid değişikliklerinin (single nükleotid polimorfizm-SNP) genomun farklı yerlerindeki ilmekleri artırarak veya azaltarak etki gösterebildiği bildirilmiştir (89). Dolayısıyla heterokromatin yapıdaki değişiklikler de kromozomlar arası ilmek ve köprüleri etkileyebilmektedir mayozda değişikliğe sebep olabilir. Mayoz boyunca 9qh bölgesi akrosentrik kromozomlarla etkileşebilmekte ve bu ilişkide bazı perisentrik inv(9) taşıyıcılarında akrosentrik kromozom dizimi insidansında artışa sebebiyet verebilmektedir (92). İnsandaki 9p12 ve 9q13-21.1 bantları akrosentrik kromozomların kısa kolları ile nükleotid dizilerinde belli bir homoloji göstermektedir (93). Mevcut çalışmamızda inv(9) taşıyıcı grupta 13 ve 21 nolu kromozomlara ait dizimi oranları çok yüksek olmasına rağmen kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). Bu durum az bir oranda İKE'e neden olabilir. İnverte olan segmentin büyük olması ( $>100$  Mb yada kromozomun %50'sinden fazlasını içermesi durumunda) segregasyonda rekombinant gamet oluşumunu artırmaktadır (32). Benzer durum İKE içinde geçerli olabilir yani inverte olan segmentin büyüklüğü İKE'i etkileyebilmektedir (86). Inv(9) taşıyıcı sıklığı ile ilgili yapılan bir çalışmada dişi fetüslerde erkek fetüslere oranla taşıyıcılık daha fazla oranda tespit edilmiş (94) ama infertil bireylerde ise erkeklerdeki inv(9) taşıyıcılığı fazla gözlenmiştir (95). Bu inv(9)'un mayozda bir şekilde değişikliğe neden olduğunu göstermektedir. Heteromorfik grupta yer alan 9qh+ taşıyıcısında ise analiz edilen kromozomlar için herhangi bir İKE gözlenmedi, ama bu olguda analiz edilen kromozomlar arasında dizimi oranı en yüksek kromozom, 21 nolu kromozom olarak bulundu. Spesifik kromozomlardaki heterokromatin bölgedeki küçük değişiklikler, daha büyük değişikliklerdeki etkinin aynısını yapmayabilir (13). Çalışmamızdaki 9qh+ taşıyıcısındaki heterokromatin büyüklüğü İKE oluşturabilecek büyüklükte olmayabilir.

Kromozom boyutu ile spermlerdeki anöploidi oranının doğru orantılı olduğunu bildiren çalışmalar olsa da (55), küçük kromozomlar ve seks kromozomları anöploidiye daha yatkındır (23, 65). Çalışmamızda hem kontrol grubunda hem de olgu grubunda küçük

kromozomların ve seks kromozomların anöploidi oranının daha yüksek olduğu görülmüştür.

Olgu grubu ile kontrol grubunun semen analizleri karşılaştırıldığında viabilite, sayı ve morfoloji değerleri arasında istatistiksel olarak fark gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Yapısal kromozomal anomalisi olan erkeklerin semen parametreleri genellikle anormal olduğu bilinmektedir. Olgu grubumuzdaki anöploidi oranında kontrol grubundan fazla tespit edildi. Dolayısıyla tespit edilen anöploidi, gerçekten İKE'in bir sonucu mu yoksa anormal semen parametresinin bir sonucu mu olduğu belirlenememektedir. Yeniden düzenlenme olsun ya da olmasın zayıf semen parametreleri ile artmış sperm anöploidisi arasındaki ilişki mayotik karışıklığın göstergesi olarak görülmektedir.

Flouresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi 1990'lı yıllarda spermlerdeki kromozomal anomalilerin tespitinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır ve sperm nükleuslarında kromozomların spesifik olarak tanımlanmasına izin vermektedir. FISH tekniği hızlı, güvenilir olması ve teknik olarak çok sayıda spermatozoa incelenmesine izin vererek elde edilen istatistiksel verinin daha güvenilir olmasına olanak sağlamıştır. Literatürde bazı çalışmalarda FISH tekniği ile sınırlı sayıda kromozom inceleyerek İKE'in olmadığı belirtilmektedir, ancak aynı düzenlenmeye sahip taşıyıcılarda bile farklı kromozomları tutan İKE görülebilmektedir. Bunun için çalışmalarda daha fazla sayıda kromozom incelenirse daha güvenli sonuçlar elde edilebilecektir.

Sonuç olarak olgu grubu ile kontrol grubu arasında XY dizomi ve dizomi 18 oranında İKE tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgu genel bir bulgu olarak değerlendirilmemelidir. Çünkü aynı anomaliyi gösteren vakalar arasında İKE bakımından fark görülmektedir. Bu nedenle bu farklılıkların mekanizmasını ortaya koyacak çalışmalar planlanması gerekmektedir. İKE'in oluş mekanizmasını anlamak için sinaptonemal kompleks çalışmaları ve kromozom varyantlarında moleküler genetik çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca semen profilini etkileyen faktörlerin sperm genomunda ne derece etkili olduğu ortaya konmalıdır. Tüm bu veriler beraber değerlendirildiğinde elde edilecek bulgular ile klinik olarak riskli çiftler için sağlıklı bir bebeğe sahip olma şansını hakkında kişisel bir risk belirleme ön görülebilecektir.

## 6. ÖZET

**Amaç:** Yapısal kromozomal düzensizlik taşıyıcısı olan erkek bireylerin sperm nükleuslarında interkromozomal etkinin varlığının araştırılması.

**Gereç ve yöntem:** Yapısal kromozomal düzensizlik taşıyıcısı olan 18 erkek birey (olgu grubu) ile yapısal kromozomal düzensizlik taşıyıcısı olmayan 14 fertil erkek bireyin (kontrol grubu) sperm nükleuslarında, floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle kromozom 2, 3, 12, 13, 17, 18, 21, X ve Y dizomisi değerlendirildi.

**Bulgular:** Toplam 71194 sperm analiz edildi (olgu grubunda 38757, kontrol grubunda 32437). Olgu grubundaki 11 bireyde analiz edilen kromozomların az biri için dizomi oranı yüksek tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Resiprokal translokasyon taşıyıcı grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dizomi oranları arasında fark gözlenmedi ( $p > 0.05$ ). Robertsonian translokasyon taşıyıcı grupta, heteromorfik taşıyıcı grupta ve bu grupların bazı olgularında dizomi oranları yüksek olarak tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Olgu grubunda dizomi 18, XY dizomisi ve toplam dizomi oranlarının yüksek olduğu gözlemlendi ( $p > 0.05$ ).

**Sonuç:** Yapısal kromozomal düzensizlik taşıyıcısı olan erkek bireylerde interkromozomal etkinin olduğu bulunmuştur. Aynı yapısal düzensizliği taşıyan bireylere baktığımızda etkilenen kromozomların ve dizomi oranlarının farklı olduğu gözlenmiştir. Gözlenen interkromozomal etki yapısal kromozomal düzensizliğin tipine, düzensizliğin olduğu kromozoma ve hastaya bağlı olarak değişmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Interchromosomal effect, FISH, sperm, meiosis

## 7. ABSTRACT

### **Investigation of interchromosomal effect in sperm nuclei of male carrier with structural chromosomal rearrangement by using FISH technique**

**Objective:** To investigate the occurrence of aneuploidy on sperm nuclei due to the interchromosomal effect in male carrier with structural rearrangement.

**Material(s) and method(s):** The study consist of 18 infertile men who have structural chromosomal rearrangements and 14 infertile males who are normal phenotype and no chromosomal rearrangements. Semen analysis and cytogenetic study were done in all cases by using Kruger's strict criteria and conventional cytogenetic analysis, respectively. In order to carry out the aneuploidy frequency, conventional dual color and triple color fluorescence in situ hybridization (FISH) with chromosomes 2, 3, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y were done. Data were analysed by using  $\chi^2$  test.

**Result(s):** A total of 71194 sperm nuclei for both cases and controls (38757 for cases and 32437 for controls) were analyzed. At least one chromosome disomies were determined in case group of 11 individuals ( $p < 0.05$ ). There was no difference dizomy rates between control group compared with the reciprocal translocation carriers group ( $p > 0.05$ ). Some cases but not all have high percentage of disomy of different chromosomes in Robertsonian translocation carriers group and heteromorphic carriers group ( $p < 0.05$ ). Specifically dizomy rates was high for chromosome 18, sex chromosome (XY dizomy) and all other chromosome aneuploidies in case group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion(s):** Interchromosomal effect was found in male carrier with structural chromosomal rearrangement. When we compared dizomy rates and affected chromosomes at the individuals who carrying the same structural rearrangement that were different each other. Observed interchromosomal effect was depend on patient, chromosome and type of chromosomal rearrangement.

**Key words:** Interchromosomal effect, FISH, sperm, meiosis

## 8. KAYNAKLAR

- 1-Nussbasum RL, McInnes RR, Willard HF. *Tompson & Thompson Tıbbi Genetik*. 6. baskı. Türkiye:Güneş kitabevi, 2005:143.
- 2-Pandiyan N, Jequier AM. Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile men. *Hum Reprod* 1996;11:2604-8.
- 3-Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from 13-years incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet* 1995;87:81-3.
- 4-Van Dyke DL, Weiss L, Roberson JR, Babu VR. The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *Am J Med Genet* 1983;35:301-8.
- 5-De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;6:245-50.
- 6-Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, et al. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod* 2001;16:82-90.
- 7-Lam R, Ma S, Robinson WP, Chan T, Yuen BH. Cytogenetic investigation of fetuses and infants conceived through intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:1272-5.
- 8-Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002;17:2600-14.
- 9-Causio F, Fischetto R, Sarcina E, Geusa S, Tartagni M. Chromosome analysis of spontaneous abortions after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;105:44-8.
- 10-Van Steirteghem A, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I. Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod Update* 2002;8:111-6.
- 11- Samli H, Solak M, Imirzalioglu N, Beyatli Y, Simşek S, Kahraman S. Fetal chromosomal analysis of pregnancies following intracytoplasmic sperm injection with amniotic tissue culture. *Prenat Diagn* 2003;23:847-50.
- 12-Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, et al. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 2005;28:372-9.
- 13-Amiel A, Sardos-Albertini F, Feijgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 2001;46:245-50.
- 14-Klug WS. *Genetik kavramlar*. 6. baskı. Türkiye:Palme yayıncılık, 2003:31.
- 15-Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res* 2008;651:14-29.
- 16-Vallente RU, Cheng EY, Hassold TJ. The synaptonemal complex and meiotic recombination in humans: new approaches to old questions *Chromosoma* 2006;115:241-9.
- 17-McIntosh JR. Structural and mechanical control of mitotic progression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1991;56:613-9.
- 18-Taylor SS, Scott MI, Holland AJ. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation *Chromosome Res* 2004;12:599-616.
- 19- Martin RH. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis symposium: Genetic and epigenetic aspects of assisted reproduction. *Reprod BioMed Online* 2008;16:523-53.
- 20-Nussbasum RL, McInnes RR, Willard HF. *Tompson & Thompson Tıbbi Genetik*. 6. baskı. Türkiye:Güneş kitabevi, 2005:140.
- 21- Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Mechanisms of nondisjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of missegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 2002;17:2134-45.

- 22-Hassold T. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 1980;32:723-30.
- 23-Martin RH. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 2006;22:142-7.
- 24-Spriggs EL, Martin RH. Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier t(1;11)(p36.3;q13.1) by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev* 1994;38:247-50.
- 25-Blanco J, Gabau E, Gomez D, Baena N, Guitart M, Egozcue, et al. Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 1998;63:1067-72.
- 26-Scarpato R, Naccarati A, Mariani M, Migliore L. Aneuploidy and diploidy rates in sperm of five men after three-colour hybridization: indication of X chromosome-associated autosome 2 aneuploidy. *Mutat Res* 1998;412:227-33.
- 27-Martin RH, Ko E, Rademaker A. Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 1991;39:321-31.
- 28-Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Sheean LA, Feingold E, Sherman SL, Hassold TJ. Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Hum Mol Genet.* 1995;4:2227-32.
- 29-Kinakin B, Rademaker A, Martin R. Paternal age effect of YY aneuploidy in human sperm, as assessed by fluorescence In situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997;78:116-9.
- 30-Angell RR. Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 1991;86:383-7.
- 31-Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod.* 1996;11:1-24.
- 32-Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, et al. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2007;22:136-41.
- 33-Kaiser P. Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum Genet* 1984;68:1-47.
- 34-Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Abad C, Guitart M, Egozcue J, et al. From spermatocytosperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum Reprod* 2004;19:2515-22.
- 35-Gardner McKinlay RJ, Sutherland GR. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. 3<sup>rd</sup> ed. USA:Oxford University Press, 2004:60-4.
- 36-Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001;121:655-66.
- 37-Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR. Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenet Cell Genet* 1984;38:14-22.
- 38-Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann C, Clavequin MC, et al. Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers *Cytogenet Genome Res* 2005;111:291-6.
- 39-Acar H, Yıldırım MS, Çora T, Ceylaner S. Evaluation of segregation patterns of 21;21 Robertsonian translocation along with sex chromosomes and interchromosomal effects in sperm nuclei of carrier by FISH technique. *Mol Reprod Dev* 2002;63:232-6.
- 40-Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 2008;1: 4.
- 41-Kowalczyk M, Srebniak M, Tomaszewska A. Chromosome abnormalities without phenotypic consequences. *J App Genet* 2007;48:157-66.
- 42-Endow SA, Glover DM. *Dynamics of Cell Division*. 2<sup>nd</sup> ed. England: Oxford University Press, 2002:203-35.
- 43-Tabet AC, Dupont JM, Lebbar A, Couturier-Turpin MH, Feldmann G, Rabineau D. Heteromorphism 18ph+: with or without reproductive consequences? *Ann Genet* 2001;44:139-42.

- 44-Zaslav AL, Pierno G, Fougner A, Jacob J, Shikora G, Kazi R, et al. Prenatal diagnosis of a rare inherited heterochromatic variant chromosome 4. *Am J Med Genet* 2004;126:420-2.
- 45-Patel Z, Madon P, Adhia R et al. 1996 Chromosomal rearrangements in couples with recurrent pregnancy losses - 874 cases. Abstract book of VIII International Conf on Early Prenatal Diagnosis and Therapy.
- 46-Fryns J, Kleczkowska A, Londers L, van den Berqhe H. Unusual chromosome 9 polymorphism and reproductive failure. *Ann Genet* 1985;28:49-51.
- 47-Di Gennaro G, Mascia A, Grammaldo L. Focal cortical dysplasia and pericentric inversion of chromosome 9; a case report. *Journal of Neurological Sciences (Turkish)* 2004;21:143-6.
- 48-Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online* 2005;11:726-32.
- 49-Lejeune J. Autosomal disorders. *Pediatrics* 1963;32:326-37.
- 50-Lejeune J. The meiotic consequences of chromosome modification. *Ann Genet* 1965;8:9-10.
- 51-Grell RF. Distributive pairing in man? *Ann Genet* 1971;14:165-71.
- 52- Ford CE, Evans EP. Robertsonian translocation in mice: segregational irregularities in male heterozygotes and zygotic imbalance. *Chrom Today* 1973;4:387-97.
- 53-Burns JP, Koduru PR, Alonso ML, Chaganti RS. Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for two reciprocal translocations using the hamster in vitro penetration system. *Am J Hum Genet* 1986;38:954-64.
- 54- Templado C, Navarro J, Beneti J, Genesca A, Perez MM, Egozcue J. Human sperm chromosome studies in a reciprocal translocation, t(2;5). *Hum Genet* 1998;79:24-8.
- 55-Machev N, Gosset P, Warter S, Treger M, Schillinger M, Viville S. Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertil Steril* 2005;84:365-73.
- 56- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 2000;106:500-5.
- 57-Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000;15:351-65.
- 58-Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J. Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *Eur J Hum Genet* 2001;9:395-403.
- 59-Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 2002;8:958-63.
- 60-Morel F, Roux C, Bresson JL. FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. *Mol Hum Reprod* 2001;7:483-8.
- 61-Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004;19:1345-51.
- 62-Vozdova M, Oracova E, Horinova V, Rubes J. Sperm fluorescence in situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Hum Reprod* 2008;23:581-8.
- 63-Kekesi A, Erdei E, Török M, Dravucz S, Toth A. Segregation of chromosomes in spermatozoa of four Hungarian translocation carriers. *Fertil Steril* 2007;88:5-11.
- 64-Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K. Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9) (q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1999;105:428-36.
- 65-Estop AM, Ciepły KM, Munne S, Surti U, Wakim A, Feingold E. Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet* 2000;106:517-24.
- 66-Pellestor F, Imbert I, Andreo B, Lefort G. Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod* 2001;16:1155-64.

- 67-Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, et al. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999;105:266-72.
- 68-Anton E, Vidal F, Blanco J. Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior. *Genet Med*. 2008;10:730-8.
- 69-Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, et al. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:1266-73.
- 70-Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo, et al. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod* 2001;16:1172-9.
- 71-Durakbasi-Dursun HG, Zamani AG, Kutlu R, Görkemli H, Bahce M, Acar A. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoteratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil Steril* 2008;89:1709-17.
- 72-Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 1978;274:911-3.
- 73-Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;11:722-6.
- 74-Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F. FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 1998a;83:275-80.
- 75-Martínez-Pasarell O, Nogués C, Bosch M, Egozcue J, Templado C. Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 1999;104:345-9.
- 76-Eskenazi B, Wyrobek AJ, Kidd SA, Lowe X, Moore D 2nd, Weisiger K, et al. Sperm aneuploidy in fathers of children with paternally and maternally inherited Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 2002;17:576-83.
- 77-Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, et al. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet*. 2000;17:307-9.
- 78-Tempest HG, Ko E, Rademaker A, Chan P, Robaire B, Martin RH. Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men. *Fertil Steril* 2009;91:185-92.
- 79-Kirkpatrick G, Ferguson KA, Gao H, Tang S, Chow V, Yuen BH, et al. A comparison of sperm aneuploidy rates between infertile men with normal and abnormal karyotypes. *Hum Reprod* 2008;23:1679-83.
- 80-Rosenmann A, Wahrman J, Richler C, Voss R, Persitz A, Goldman B. Meiotic association between the XY chromosomes and unpaired autosomal elements as a cause of human male sterility. *Cytogenet Cell Genet* 1985;39:19-29.
- 81- Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S, Egozcue J. XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod* 1991;6:376-81.
- 82-Codina-Pascual M, Navarro J, Oliver-Bonet M, Kraus J, Speicher MR, Arango O, et al. Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum Reprod* 2006;21:1490-7.
- 83-Martin RH. Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(3)(p25q21). *Am J Hum Genet* 1991;48:856-61.
- 84-Martin RH. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(8)(p23q22). *Cytogenet Cell Genet* 1993;62:199-202.
- 85-Ferfourri F, Clement P, Gomes DM, Minz M, Amar E, Selva J, et al. Is classic pericentric inversion of chromosome 2 inv(2)(p11q13) associated with an increased risk of unbalanced chromosomes? *Fertil Steril* 2009;92:1497.

- 86-Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 2006;85:661-6.
- 87-Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion *inv(6)(p23q25)* carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 2002;97:149-54.
- 88-Colls P, Blanco J, Martinez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Marquez C, et al. Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, *inv(9)(p11q13)* analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 1997;99:761-5.
- 89-Göndör A, Ohlsson R. Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature* 2009;10:212-7.
- 90-Lee JT, Jaenisch R. Long-range cis effects of ectopic X-inactivation centres on a mouse autosome. *Nature* 1997;20:275-9.
- 91-McKee BD. Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;15:165-80.
- 92-Stahl A, Luciani JM, Devictor M, Capodano AM, Hartung M. Heterochromatin and nucleolar organizers during first meiotic prophase in quail oocytes. *Exp Cell Res* 1975;15:365-71.
- 93-Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, et al. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet* 2002;10:790-800.
- 94-Uehara S, Akai Y, Takeyama Y, Takabayashi Y, Okamura K, Yajima K. Pericentric inversion of chromosome 9 in prenatal diagnosis and infertility. *Tohoku J. Exp. Med* 1992;166:417-27.
- 95-Yüce H, Ozbey U, Etem E, Erol D, Deveci ŞD, Ceylan GM ve ark. İnversiyon 9 açısından 41 olgunun değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008;28:765-768.
- 96-Lecture 46: Changes in Chromosome Structure.  
<http://nitro.biosci.arizona.edu/courses/EEB320-2005/Lecture46/lecture46.html> (Son erişim tarihi 11.01.2010)

## 9. TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof.Dr.Hasan Acar'a, tezimin deney materyalinin toplanmasında yardımcı olan Doç.Dr.Murat Aktan'a, Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğindeki ve Üroloji kliniğindeki hocalarıma, istatistiksel analizlerin yapılmasında yardımcı olan Prof.Dr.Said Bodur'a, eğitimimde emeği geçen tüm hocalarıma ve ayrıca eğitimim boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteği esirgemeyen ailemin her bir ferdine ve özellikle anneme teşekkürü bir borç bilirim.

## 10. EKLER

### 10.1 C-BANTLAMA (Ek-1)

Damlatma yapılan ve belli bir kuruma sürecinden geçen preparat sırasıyla;

- 1- 0.2 M'lik HCl'de 20 dakika çalkalanır. (0.2 M HCl hazırlamak için 100 ml distile suya 1.66 ml HCl eklenir)
- 2- Üç ayrı distile suda çalkalanır. Preparat kendi kendine kurumaya bırakılır.
- 3- Oda sıcaklığında NaOH (sodyum hidroksit) ile 50 saniye çalkalanır.
- 4- Üç ayrı kapta bulunan 2xSSC içinde sırayla çalkalanır.
- 5- İçinde 2xSSC bulunan şalenin içine preparat konur ve 65°C'de 4 saat inkübe edilir.
- 6- Sonra sırasıyla 2 adet %70'lik etanol ve 3 adet %90'lık etanolde çalkalanır. Preparat kendi kendine kurumaya bırakılır.
- 7- Soransende çalkalanır ve içinde %5'lik giemsa bulunan şalede 40 dakika boyanır.
- 8- Distile suda çalkalanır ve kendi kendine kurumaya bırakılır.
- 9- Son aşamada preparatın üzeri entellan ve lamel ile kapatılır.

### 10.2 NOR-BANTLAMA (Ek-2)

Damlatma yapılan ve belli bir kuruma sürecinden geçen preparat sırasıyla;

- 1- Çalışma karanlık odada yapılır.
- 2- 5 gr AgNO<sub>3</sub> (gümüş nitrat) ile 10 ml distile su içinde çözündürülür.
- 3- Daha sonra gümüş nitrat solüsyonu süzülür.
- 4- Petri kabı içine nemli kurutma kağıdı konulur.
- 5- Preparat petri kaba konur ve üzerine gümüş nitrat solüsyonu damlatılır. Üzeri lamel ile kapatılır.
- 6- Petri kutusu alüminyum folyo ile sarılır ve 37°C'de etüvde 36 saat inkübe edilir.
- 7- Distile su ile yıkanır, lamel uzaklaştırılır.
- 8- %2'lik giemsa soransen solüsyonunda 10 saniye yıkanır ve kurumaya bırakılır.
- 9- Son olarak preparatın üzeri entellan ve lamel ile kapatılır.