

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANA BİLİM DALI

OBSTRÜKTİF OLMAYAN AZOSPERMİ HASTALARINDA
GENETİK ETİYOLOJİLERİN ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Kübra ADANUR SAĞLAM

TRABZON

2024

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANA BİLİM DALI

OBSTRÜKTİF OLMAYAN AZOSPERMİ HASTALARINDA
GENETİK ETİYOLOJİLERİN ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi
Dr. Kübra ADANUR SAĞLAM

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayberk TÜRKYILMAZ

TRABZON

2024

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez yazım süresince akademik bilgi ve tecrübesini paylaşıırken her zaman yardımcı, destekçi ve iletişime açık olan danışman hocam sayın Doç. Dr. Ayberk TÜRKYILMAZ'a,

Asistanlık eğitimim süresince benimle bilgi ve tecrübesini paylaşarak yetişmeme katkı sağlayan hocam sayın Doç. Dr. Alper Han ÇEBİ'ye,

Birlikte çalışmaktan mutlu olduğum KTÜ Farabi Hastanesi Tıbbi Genetik laboratuvarı ailesi arkadaşlarım, Bediha KAYA, Günay DİNÇ, Elmas YAVUZ, Sude YILDIRIM, Sena EMİR, Elif İPEKÇİ, Ayşegül DİNER ve Aleyna Nisa ÖZEN'e,

Eğitim sürem boyunca desteklerini her zaman hissettiğim, birlikte öğrenip geliştığımız asistan doktor arkadaşlarım Dr. Mustafa YILMAZ, Dr. Tuna APUHAN, Dr. Oğuzhan DEMİR ve Dr. Ayşe Sena DEMİROĞLU'na,

Bu zorlu ve uzun eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda ve destekçim olan annem Fatma ADANUR, babam Hüseyin ADANUR, ablalarım Dr. Esra ÇANKAYA, Dr. Dt. Rabia ADANUR ATMACA ve erkek kardeşim İbrahim Utku ADANUR'a,

Her iyi ve kötü anımda yanımda olan sonsuz destekçim sevgili eşim Dr. Mustafa Mert SAĞLAM'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Kübra ADANUR SAĞLAM

ÖZET

Giriş ve Amaç: Azospermi santrifüje edilmiş semen pelleti dahil ejakülatta hiç sperm olmamasıdır ve erkek infertilitesinin sık sebeplerinden olup olguların %10-15'ini oluşturur. Azospermiye eşlik eden küçük testis hacmi, normal semen hacmi ve yüksek FSH varlığında non-obstrüktif azospermiden (NOA) şüphelenilir. NOA'nın rutin genetik değerlendirilmesinde kromozom analizi ve Y kromozomu mikrolelesyon (YKM) analizi yapılmaktadır. Son 20 yılda gelişen dizileme teknolojileri erkek infertilitesi alanında da genetik sebepleri ortaya çıkarmaya katkı sağlamıştır. Bu çalışmada NOA hastalarında yeni genetik nedenler araştırmayı amaçladık.

Yöntem: 2022 kasım-2024 haziran tarihleri arasında KTÜ Farabi hastanesi tıbbi genetik polikliniğine NOA bulgusu nedeniyle başvurmuş 31 yetişkin erkek çalışmaya dahil edildi. Azospermiye sebep olabilecek sekonder sebepleri olan olgular çalışmaya dahil edilmedi. 31 hastanın tamamına öncelikle kromozom analizi ve YKM analizi yapıldı. Azospermiyi açıklayacak sebep saptanmayan 25 hastaya Tüm Ekzom Dizileme (TED) testi yapıldı.

Bulgular: Toplam olguların genetik değerlendirme başvuru yaşı medianı 31 (22-46) yılıdır. Olguların %61'inde ailesinde infertilite, %55'inde ebeveynler arasında akrabalık öyküsü vardı. Toplam 31 NOA olgusunun %16,1'inde kromozomal hastalıklar (47, XXY (3 olgu), 45,X/46,X,del(Y)(q11.23) (1 olgu), 46,X,der(Y) t(Y;?)(q12;p13) (1 olgu)) ve %3,2'sinde YKM (AZFc delesyonu) (1 olgu) saptandı. TED yapılan 25 NOA olgusunun %16'sında *MSH4* (2 olgu), *STAG3* (1 olgu) ve *NR5A1* (1 olgu) genlerinde kliniği açıklayabilecek neden saptandı. *MSH4* geninde novel c.2639_2640del, p.Pro880ArgfsTer14 varyasyonu iki farklı aileden iki ilişkisiz olguda homozigot olarak saptandı. *STAG3* geninde novel c.671C>G, p.Ser224Ter varyasyonu homozigot olarak ve *NR5A1* geni c.251G>T, p.Arg84Leu varyasyonu heterozigot olarak saptandı.

Sonuç: NOA olgularında TED'nin kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır. Bu çalışmada kromozom analizi, YKM ve TED ile NOA olgularında genetik tanı başarısı %32,2 (10/31) olmuştur. TED'in NOA olgularında kullanılması genetik tanı başarısını arttırmakta ve infertil çiftlere gebelik planı sürecinde yardımcı olmaktadır.

Anahtar kelimeler: Erkek İnfertilitesi, Non-obstrüktif Azospermi, Tüm Ekzom Dizileme

SUMMARY

Introduction and Objective: Azoospermia is the absence of sperm in the ejaculate, including centrifuged semen pellet, and is a common cause of male infertility, accounting for 10-15% of cases. Non-obstructive azoospermia (NOA) is suspected in the presence of small testicular volume, normal semen volume and elevated FSH. Routine genetic evaluation of NOA includes chromosome analysis and Y chromosome microdeletion (YCM) analysis. Sequencing technologies developed in the last 20 years have contributed to revealing genetic causes in the field of male infertility. In this study, we aimed to investigate new genetic causes in NOA patients.

Methods: Between November 2022 and June 2024, 31 adult men admitted to the medical genetics outpatient clinic of KTU Farabi Hospital for NOA were included in the study. Patients with secondary causes of azoospermia were not included in the study. All 31 patients first underwent chromosome analysis and YCM analysis. Whole Exome Sequencing (WES) test was performed in 25 patients in whom no cause was found to explain azoospermia.

Results: The median age at presentation for genetic evaluation was 31 (22-46) years. There was a family history of infertility in 61% of cases and consanguinity between parents in 55%. Chromosomal disorders (47, XXY (3 cases), 45,X/46,X,del(Y)(q11.23) (1 case), 46,X,der(Y) t(Y;?)(q12;p13) (1 case)) were detected in 16.1% of the 31 NOA cases and YCM (AZFc deletion) was detected in 3.2% (1 case). In 16% of 25 NOA patients who underwent WES, a cause that could explain the clinic was found in *MSH4* (2 cases), *STAG3* (1 case) and *NR5A1* (1 case) genes. Novel c.2639_2640del, p.Pro880ArgfsTer14 variation in *MSH4* gene was found homozygous in two unrelated cases from two different families. Novel c.671C>G, p.Ser224Ter variation in *STAG3* gene was homozygous and *NR5A1* gene c.251G>T, p.Arg84Leu variation was heterozygous.

Conclusion: The use of WES in NOA cases has become widespread in recent years. In this study, the success rate of genetic diagnosis in NOA cases with chromosomal analysis, YCM and WES was 32.2% (10/31). The use of WES in NOA cases increases the success of genetic diagnosis and helps infertile couples in the process of pregnancy planning.

Keywords: Male Infertility, Non-obstructive Azoospermia, Whole Exome Sequencing

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Spermatogenez ve erkek üreme sistemi fizyolojisi.....	3
2.2. İnfertilite.....	4
2.2.1. Erkek İnfertilitesi.....	4
2.2.2. Erkek infertilitesi etiyolojileri.....	5
2.2.3. Erkek infertilitesi olan hastanın değerlendirilmesi.....	6
2.2.3.1. Öykü.....	6
2.2.3.2. Fizik muayene.....	7
2.2.3.3. Spermiyogram Analizi.....	7
2.2.3.4. Endokrin Değerlendirme.....	8
2.2.3.5. Görüntüleme.....	9
2.2.4. Erkek infertilitesi olan hastanın yönetimi.....	9
2.2.4.1. Azospermi.....	9

2.2.4.1.1. Obstrüktif azospermi.....	10
2.2.4.1.1.1. Azosperminin posttestiküler sebepleri.....	10
2.2.4.1.2. Non obstrüktif azospermi.....	11
2.2.4.1.2.1. Azosperminin pretestiküler sebepleri.....	11
2.2.4.1.2.2. Azosperminin testiküler sebepleri.....	12
2.2.4.1.2.2.1 Kromozomal hastalıklar.....	14
2.2.4.1.2.2.1.1. Klinefelter Sendromu.....	15
2.2.4.1.2.2.1.2 XX Male Sendrom.....	16
2.2.4.1.2.2.1.3 47,XYY Sendromu.....	16
2.2.4.1.2.2.1.4. Otozomal translokasyonlar ve inversiyonlar.....	17
2.2.4.1.2.2.1.5. Miks gonadal disgenezi (45,X/46,XY Mozaisizmi).....	18
2.2.4.1.2.2.2. Y Kromozomu ve mikrolelesyonları.....	19
2.2.4.1.2.2.3. Tek Gen Defektleri.....	22
2.2.5. Erkek infertilitesinde genetik değerlendirmeler.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Etik onay.....	26
3.2. Hasta seçimi ve klinik değerlendirme.....	26
3.3. Hastaların genetik değerlendirilmesi.....	28
3.4. Periferik Kan Örneklerinin Alınması.....	28
3.5. Kromozom analizi.....	28
3.6. Genomik DNA izolasyonu ve spektrofotometrik analiz.....	30
3.7. Y kromozomu mikrolelesyon analizi.....	31
3.8. Array.....	31

3.9. Tüm ekzom dizileme (TED)	32
3.9.1. TED ıslak laboratuvar aşamaları.....	33
3.9.2. TED biyoinformatik analizi.....	41
3.9.3. TED verilerinin analizi.....	42
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA.....	99
5.1. Kromozomal hastalıklar ve Y kromozomu mikrobelesyon.....	100
5.2. Tek gen defektleri.....	103
6. SONUÇ.....	120
7. KAYNAKLAR.....	122

KISALTMALAR DİZİNİ

NOA	: Non-obstrüktif azospermi
YKM	: Y kromozomu mikrodelesyon
TED	: Tüm ekzom dizileme
YND	: Yeni nesil dizileme
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
OA	: Obstrüktif azospermi
SCOS	: <i>Sertoli cell-only syndrome</i> (Yalnızca Sertoli Hücre Sendromu)
MA	: Maturasyon Arresti
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
PGT	: Preimplantasyon genetik tanı
UPD	: Uniparental dizomi
NAHR	: Non-allelik homolog rekombinasyona
KVDY	: Konjenital vas deferens yokluğu
HPO	: <i>Human Phenotype Ontology</i>
OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man
ACMG	: Amerikan tıbbi genetik ve genomik koleji (<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>)
VUS	: <i>Variant of uncertain significance</i> (Klinik önemi bilinmeyen değişiklik)
MP	: Muhtemel patojenik
P	: Patojenik
MB	: Muhtemel benign
B	: Benign

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	: Testisin genel anatomisi.....	3
Şekil 2	: Erkek üreme sistemi yapıları.....	4
Şekil 3	: Y kromozomu ve AZF bölgeleri.....	21
Şekil 4	: Olgu H2 karyotip 45,X[40]/46,X,del(Y)(q11.23)[10].....	53
Şekil 5	: H5 olgusu homozigot MSH4: c.2639_2640del, p.P880Rfs*14 varyasyonu IGV görüntüsü.....	62
Şekil 6	: H9 olgusu homozigot MSH4: c.2639_2640del, p.P880Rfs*14 varyasyonu IGV görüntüsü.....	62
Şekil 7	: H12 olgusu homozigot STAG3: c.671C>G, p.Ser224Ter varyasyonu IGV görüntüsü.....	63
Şekil 8	: H31 olgusu heterozigot NR5A1: c.251G>T, p.R84L varyasyonu IGV görüntüsü.....	63
Şekil 9	: (A) H28 olgusunun kromozom analizi. (B) H28 olgusunun babasının kromozom analizi.	103
Şekil 10	: Clinvar veri tabanında ve literatürde <i>MSH4</i> geninde bildirilen NOA ve spermatogenik yetmezlik fenotipiyle ilişkili MP/P varyantlar	107
Şekil 11	: Clinvar veri tabanında ve literatürde <i>STAG3</i> geninde bildirilen NOA ve spermatogenik yetmezlik fenotipiyle ilişkili MP/P varyantlar	108
Şekil 12	: Clinvar veri tabanında <i>NR5A1</i> geninde bildirilen spermatogenik yetmezlik ve erkek infertilitesi fenotipiyle ilişkili MP/P varyantlar	110

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1	: Erkek infertilitesi etiyolojileri ve risk faktörleri.....	5
Tablo 2	: Spermiogram analizi referans değerleri.....	8
Tablo 3	: Erkek Hipogonadizminin Pretestisküler Sebepleri.....	12
Tablo 4	: Erkek infertilitesinin testiküler sebepleri	13
Tablo 5	: AZF delesyon bölgeleri büyüklükleri ve fenotipleri.....	21
Tablo 6	: OMIM veri tabanında spermatogenik yetmezlik fenotipiyle ilişkilendirilmiş genler.....	24
Tablo 7	: Dizi varyantlarını sınıflandırmak için kriterleri birleştirme kuralları....	43
Tablo 8	: Patojenik varyantların sınıflandırılmasına yönelik kriterler	44
Tablo 9	: Benign varyantları sınıflandırma kriterleri.....	47
Tablo 10	: 176 genlik NOA ilgili genler listesi.....	51
Tablo 11	: OMIM veri tabanında spermatogenik yetmezlik fenotiplerinde azospermi bulgusu olan 45 gen listesi.....	51
Tablo 12	: Olguların klinik özellikleri.....	56
Tablo 13	: Kromozomal hastalık ve YKM olan olgular	60
Tablo 14	: TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde kliniği açıklayabilecek MP varyasyon saptanan olgular.....	61
Tablo 15	: TED yapılan olgularda tespit edilen NOA ilgili otozomal dominant kalıtmı genlerdeki heterozigot, NOA ilgili genlerdeki X'e bağlı genlerdeki hemizigot ve multipl heterozigot varyantlar.....	64
Tablo 16	: TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar.....	68
Tablo 17	: TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar.....	84
Tablo 18	: NOA ilişkili genler ve etkilenen patolojik spermatogenez basamağı.....	104

1.GİRİŞ

İnfertilite, korunmasız ve düzenli ilişkiye rağmen bir sene içerisinde spontan gebelik oluşamaması durumudur (1). Dünya genelinde yaklaşık olarak çiftlerin %8-12'sini etkileyen bir sağlık sorunudur ve infertilitelere yaklaşık yarısının sebebi erkek faktördür (2). Azospermi santrifüje edilmiş semen pelleti dahil ejakülatta hiç sperm olmaması olarak tanımlanır. Non-obstrüktif azospermi (NOA), erkek infertilitesinin şiddetli halidir ve erkeklerin yaklaşık %1'ini, infertil erkeklerinse %10'unu etkilemektedir ve erkek infertilitesinin sık sebeplerinden olmaktadır (3).

Azospermi sebepleri temel olarak pretestiküler, testiküler ve posttestiküler olmak üzere üç ana başlıkta sınıflandırılabilir ve bu başlıkların tamamında genetik etiyolojilerin de olduğu bilinmektedir (4). Azosperminin testiküler nedenleri, testislerdeki spermatogenezin intrinsik bozukluklarını kapsar. Genetik faktörler azosperminin %21-29'lık kısmını açıklamaktadır, azospermik olguların %12-41'iye büyük olasılıkla bilinmeyen genetik nedenlerden kaynaklanıp idiyopatik olarak sınıflandırılmaktadır (5).

Azospermi, biyolojik olarak çocuk sahibi olma zorluğu dışında bir erkek sağlığı sorunudur. Azospermisi olan erkekler fertil erkeklere göre daha yüksek kanser riski altındadır (6). Ayrıca erkek faktör infertil erkekler, fertil erkeklere kıyasla daha yüksek mortalite riski altındadır (7). Bu komorbiditelere ek olarak infertil erkeklerde kardiyovasküler hastalıklar açısından da risk altındadırlar (8).

Yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri yıllar içerisinde gelişmiş, daha uygun fiyatlı olarak ulaşılması kolaylaşmıştır ve kodlayan bütün bölgelerin dizilendiği tüm ekzom dizileme (TED) testinin de rutin kullanımı mümkün olmuştur. TED, bir süredir tıbbi genetik rutininde olmasına rağmen erkek infertilitesinin şiddetli bir hali olan NOA hastaları için rutin kullanılması veya bu konuyla alakalı bir kılavuz önerisi de yoktur. Genetik altyapısı güçlü olduğu düşünülen idiyopatik NOA olgularında TED'nin kullanılması idiyopatik olguların tanı almasına katkı sağlayabilir. NOA'da rol oynayan genetik nedenlerin ortaya çıkarılması psikolojik olarak stresli durumda olan çiftte genetik danışmanlık imkanı vermektedir. Ayrıca maliyetli bir tedavi olan yardımcı üreme teknikleriyle (YÜT) bireyselleştirilmiş tedavi planına katkı sağlamaktadır.

Bu alışma NOA olgularının genetik nedenlerini, sıklığını, genetik ve klinik özelliklerini araştırmayı amaçlamaktadır. NOA hastalarının genetik etiyolojisine yönelik olarak 31 hastada kromozom analizi ve Y kromozomu mikrolelesyon analizi (YKM) yapıldı. Ayrıca Türkiye’de ilk kez tüm ekzom dizileme (TED) ile 25 NOA olgusundan oluşan görece geniş bir hasta grubunu araştırıldı.

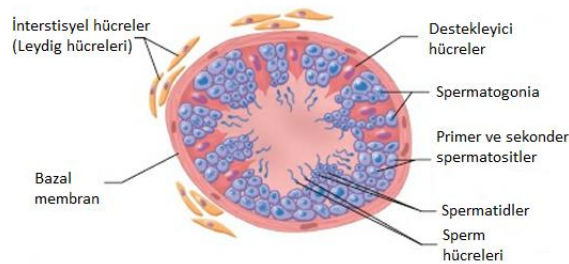


2. GENEL BİLGİLER

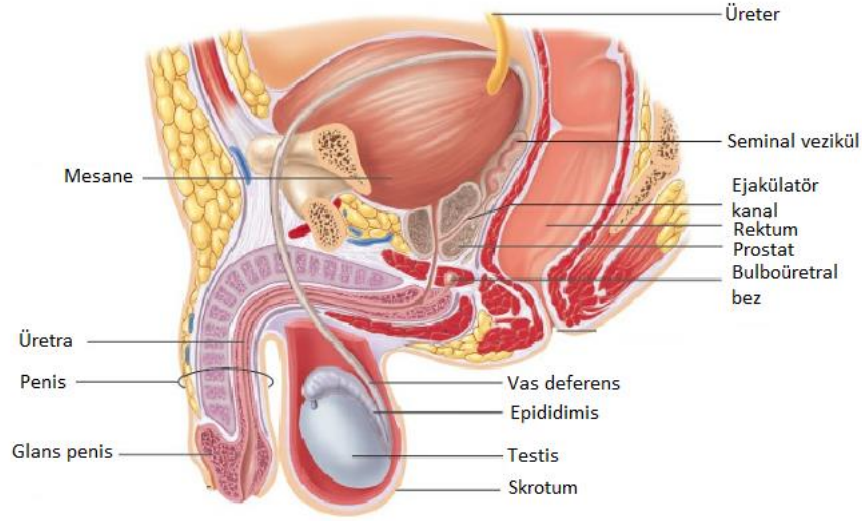
2.1. Spermatogenez ve erkek üreme sistemi fizyolojisi

Spermatogenez, seminifer tübüllerde matür erkek gamet hücresi oluşmasını sağlayan 42 ila 76 gün süren kompleks bir süreçtir (9). Spermatogenez ve hormon üretimi, Folikül Stimulan Hormon (FSH) ve Lüteinizan Hormon (LH) hormonları ile kontrol edilir. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) pulsatil olarak ön hipofizden salınır ve LH ile Leydig hücrelerini, FSH ile Sertoli hücrelerini uyarır. Sertoli hücreleri seminifer tübüllerde bazal membran boyunca uzanır ve germ hücrelerinin gelişimini destekler (Şekil 1). Leydig hücreleri ise interstisyel alanlardadır ve testosteron üretiminde rol alır. Sertoli hücrelerinde, FSH ve testosteron reseptörleri vardır. Sertoli hücreleri ayrıca inhibin, aktivin, follistatin gibi FSH sekresyonunda rol alan hormonları ve düşük düzeylerde estradiolü sentezler (10).

Erkek üreme sisteminin; spermatozoanın ve hormonların üretimi, depolanması ve spermin kadın üreme sisteminde ejaküle olması gibi üç temel fonksiyonu vardır (10). Seminifer tübüller germ ve destekleyici (Sertoli) hücre olmak üzere iki tip hücre içerir. Germ hücreleri, spermatogenez sırasında sperm hücrelerini oluşturmak üzere bölünen ve farklılaşan hücrelerdir. Spermatogenez süreci sırasıyla; i. spermatogonia proliferasyonu, ii. spermatosit dönüşüm, iii. mayoz bölünmeyle spermatositlerden spermatid oluşumu, iv. yuvarlak spermatid matürasyonu, v. matür spermatozoanın testiküler tübül lümenine salınması aşamalarını içerir (11). Epididim, vas deferens ve uretranın oluşturduğu erkek üreme yolları, spermli döllenmeye hazır hale gelene kadar depolar ve daha sonra penis yoluyla kadın genital yoluna iletir (şekil 2).



Şekil 1. Testisin genel anatomisi (12)



Şekil 2. Erkek üreme sistemi yapıları (12)

2.2. İnfertilite

İnfertilite, korunmasız ve düzenli ilişkiye rağmen bir sene içerisinde spontan gebelik oluşamaması durumudur (1). Dünya genelinde yaklaşık olarak çiftlerin %8-12'sini etkileyen bir sağlık sorunudur ve infertilitelerin yaklaşık yarısının sebebi erkek faktördür (2).

2.2.1. Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesi, heterojen multifaktöriyel kompleks bir hastalıktır (13). Genel popülasyondaki erkeklerin yaklaşık %7'si infertil olup çiftlerin de %10-15'i infertilite problemi yaşamaktadır (13). Erkek infertil hastaların %15-30'luk bir kısmını kromozomal hastalıklar, YKMLarı ve tek gen defektleri gibi genetik faktörler oluşturmaktadır (14). Primer testiküler yetersizliğin yaklaşık %40'ındaysa etiyoloji bilinmemektedir (13). Ancak yeni nesil dizileme (YND) gibi son yirmi yılda kullanımı artan yeni genetik teknolojiler, sebebi bilinmeyen genetik orjinli fenotiplerde tanıya katkı sağlamıştır. Genetik etiyolojilerin rol aldığı düşünülen infertil erkek hastalarda da YND yöntemleri genetik tanıya katkı sağlamıştır (13).

İnfertilite, spontan gebelik oluşumuyla çocuk sahibi olamamak dışında erkekler için bir sağlık sorunudur. Azospermisi olan erkekler fertil erkeklere göre daha yüksek kanser riski altındadır (6). Ayrıca erkek faktör infertil erkekler, fertil erkeklere

kıyasla daha yüksek mortalite riski altındadır (7). Bu komorbiditelere ek olarak infertil erkeklerde kardiyovasküler hastalıklar açısından da risk altındadırlar (8).

2.2.2. Erkek infertilitesi etiyolojileri

Erkek infertilitesi etiyolojileri; konjenital, kazanılmış ve idiyopatik olarak sınıflandırılmıştır (2). Konjenital ve kazanılmış infertilite sebepleri dışında; sigara, alkol, uyuşturucu, obezite, anabolik steroidler, psikolojik stres, ileri baba yaşı, diyet etkenleri, çevresel ve mesleki toksin maruziyeti gibi hayat tarzı etkenleri de erkek infertilitesiyle ilgilidir (Tablo 1) (2,6).

Tablo 1. Erkek infertilitesi etiyolojileri ve risk faktörleri (2)

Konjenital Faktörler	Kazanılmış Faktörler	İdiyopatik Risk Faktörleri
Anorşi	Varikosel	Sigara kullanımı
Konjenital vas deferens yokluğu (CAVD)	Testiküler travma	Alkol
Kriptorşidizm	Testiküler torsiyon	Uyuşturucu kullanımı
Y kromozomu mikrodelsiyonları	Germ hücreli tümörler	Obezite
Kromozomal veya genetik anormallikler - Klinefelter sendromu ve varyantları (47,XXY;46,XY/47,XXY) - Kallmann sendromu - Robertsonian translokasyonu - Androjen duyarsızlık sendromu (hafif)	Kazanılmış hipogonadotropik hipogonadizm	Psikolojik stres
	Tekrarlayan ürogenital enfeksiyonlar (prostatit, prostatovesikülit)	İleri baba yaşı
	Post inflamatuvar durumlar (epididimit, kabakulak orşiti)	Diyet faktörleri
Genetik endokrinopati	Ürogenital trakt tıkanıklığı	Çevresel ve mesleki toksin maruziyeti
Konjenital obstrüksiyon	Ekzojen faktörler (Kemoterapi, ilaç kullanımı, radyasyon, ısı)	
	Sistemik hastalıklar (siroz, renal yetmezlik)	
	Anti-sperm antikorları	

	Testis vaskülarizasyonunu etkileyen ameliyatlar
	Cinsel işlev bozukluğu (erektil veya ejakülasyon işlev bozukluğu)

2.2.3. Erkek infertilitesi olan hastanın değerlendirilmesi

2.2.3.1. Öykü

İnfertilite şüphesi olan erkekler öncelikle reproduktif öykü açısından sorgulanmalıdırlar ve ilk etapta aralarında en az bir ay bulunan en az iki spermiogram analizi ile değerlendirilmelidirler. Bir veya daha fazla spermiogram analizinde anormallik olan veya erkek infertilitesi olduğu düşünülen hastalar detaylı bir öykü ve fizik muayeneden geçirilmelidirler (6). Çocukluk çağında tespit edilebilen; kriptorşidizm, postpubertal kabakulak orşiti, testiküler travma veya torsiyon, testiküler atrofiye sebep olarak semende anormalliklere sebep olabilir. Ayrıca erkek üreme yollarındaki; prostatit, üretrit, epididimit, orşit gibi enfeksiyonlar da erkek infertilitesine sebep olmaktadır. Detaylı bir hasta öyküsü için aşağıda belirtilen ana başlıklar açısından hasta değerlendirilmelidir (2);

- İnfertilite öyküsü
 - Önceki infertilite araştırma tetkikleri ve tedavileri
- Tıbbi Öykü
 - Kriptorşidizm, puberte zamanı, testiküler travma-torsiyon, enfeksiyon, kanser, diyabet
- Cerrahi Öykü
 - Orşiopeksi, herni onarımı
- Gonadotoksin maruziyeti
 - Kemoterapi, radyoterapi, anabolik steroid, antihipertansif, antipsikotik, obezite, uyuşturucu, pestisit, ağır metal
- Seksüel Öykü
 - Libido, erektil-ejakülatuar disfonksiyon, koitus sıklığı ve zamanı, cinsel yolla bulaşan hastalık

- Aile öyküsü
 - Ailede infertilite varlığı, kistik fibrozis, androjen reseptör yetersizliği

2.2.3.2. Fizik muayene

Erkek infertilitesi değerlendirilmesinde fizik muayene önemli basamaklardan biridir. Fizik muayenede; genitya (penis, epididim, vas deferens, testis, spermatik kord, prostat), sekonder seks karakterleri ve vücut habitusu değerlendirilmelidir. Skrotal muayene hasta hem ayaktayken hem de supin pozisyondayken yapılmalıdır (10). Fizik muayenede ayrıca prostat kıvamı ve boyutu da değerlendirilmelidir. Genital muayenede testislerin konumu, kıvamı, boyutu (Prader orşidometresi ile) değerlendirilmelidir. Normal bir testisin ortalama hacmi 18 ml'dir ve ≥ 15 ml normal testiküler hacim olarak kabul edilir (4). İnfertil erkekler ayrıca testiküler neoplazi açısından risk altında olduğu için fizik muayenede testiküler kitle de dışlanmalıdır (15).

2.2.3.3. Spermiyogram Analizi

Spermiogram, spermin fonksiyonel özellikleri hariç sperm hakkında bilgi veren önemli ve temel bir testtir. Bu test, spermin miktarı, seminal vezikül ve prostat bezlerinin durumu, erkek üreme sisteminde obstrüksiyon olup olmadığı hakkında bilgi verebilir (4). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), spermiogram analizinin laboratuvar incelemesi için olan kılavuzunun 6. baskısını 2021'de yayınlamıştır (16). Spermiogram değerlendirilmeleri bu kılavuzdaki referans değerlere göre yapılmalıdır (Tablo 2). Her ne kadar infertilite değerlendirmesinde spermiogram önemli de olsa değerlerin normal aralıkta olması infertilite olmadığı anlamına gelmez. Spermiogram değerlendirmesi normal aralıkta olan hastaların %1-6'sı malignansi dahil klinik tanı alamayabilir (6).

Tablo 2. Spermogram analizi referans değerleri (16)

Parametreler	DSÖ 6. Baskı (2021) semen analizi kılavuzu	DSÖ 5. Baskı (2010) semen analizi kılavuzu
	5p ve 95% güven aralığı referans limitler	5p ve 95% güven aralığı referans limitler
Semen hacmi (mL)	1.4 (1.3-1.5)	1.5 (1.4-1.7)
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /mL)	16 (15-18)	15 (12-16)
Toplam sperm sayısı (10 ⁶ /ejakülat)	39 (35-40)	39 (33-46)
Toplam hareketli (PR+NP, %)	42 (40-43)	40 (38-42)
Progresif hareketlilik (PR, %)	30 (29-31)	32 (31-34)
Non-progresif hareketlilik (NP, %)	1 (1-1)	
İmmotil spermatozoa (IM, %)	20 (19-20)	
Vitalite (%)	54 (50-56)	58 (55-63)
Normal morfoloji (%)	4 (3.9-4.0)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (10 ⁶ /mL)	<1.0	<1.0

2.2.3.4. Endokrin Değerlendirme

Endokrin değerlendirme;

- Sperm konsantrasyonu mL’de 10 milyondan az olduğunda,
- Cinsel fonksiyon bozukluğu varlığında,
- Endokrinopatiden şphelenirecek bulgular varlığında,
- Hipogonadizm semptom ve bulguları olan hastalarda önerilir (4)

Temel hormonal değerlendirmede FSH ve total testosteronu değerlendirilir. Testosteron düşüklüğü olan hastalarda testosteron ölçümü tekrar edilir ve ayrıca LH ve Prolaktinin de test edildiği ileri araştırma gerekir (4). Düşük veya normal FSH/LH değerleri sekonder (hipogonadotropik) hipogonadizmi düşündürür (4). Yüksek FSH ve LH’a eşlik eden düşük veya normal testosteron, primer testis yetmezliği göstergesidir (10). Fakat bazı spermatogenik arrest olan nonobstrüktif azospermi olgularında FSH, LH ve testosteron düzeyleri normal olabilir (2).

FSH için normal değer aralığı laboratuvarlar arası farklılıklar da olsa genel olarak 1.5-12.4 IU/L aralığı normal aralık kabul edilir. Fakat 7,6 IU/L'den yüksek FSH düzeylerinin hipogonadizm olgularında primer gonadal yetmezliğin göstergesi olduğu bilinmektedir (17).

2.2.3.5. Görüntüleme

Bazı infertil erkek hastalarda ultrasonografi, magnetik rezonans (MR) gibi radyolojik yöntemlerle değerlendirmeye ihtiyaç olabilir. Skrotal ultrasonografik infertil erkeklerde görüntüleme en sık kullanılan yöntemdir ve AUA/ASRM (Amerikan Üroloji Derneği ve Amerikan Üreme Tıbbı Derneği) infertil erkeklerde ilk basamak değerlendirmede rutin kullanımını önermemektedir (6). Ultrasonografi; testis boyutları, hacmi, ekojenitesi, kan akışı, varikosel varlığı ve epididimis hakkında bilgi verebilir. Erkek üreme yollarında obstrüksiyon şüphesi olan hastalarda transrektal ultrasonografi yapılabilir. Ayrıca detaylı üriner sistem görüntülemesi için MR görüntüleme de kullanılabilir. Hipogonadizm ve prolaktin yüksekliği olan hastalardaysa hipofiz bezinde kitle varlığını araştırmak için hipofiz MR kullanılabilir.

2.2.4. Erkek infertilitesi olan hastanın yönetimi

2.2.4.1. Azospermi

Azospermi santrifüje edilmiş semen pelleti dahil ejakülatta hiç sperm olmaması olarak tanımlanır. Azospermi, erkek infertilitesinin sık sebeplerindendir ve erkek infertilitesi olguların %10-15'ini oluşturur (18). Azospermi olgularının yaklaşık 1/3'ünün sebepleri genetik faktörlerden kaynaklanmaktadır (18). Yaklaşık %40'ıysa muhtemelen genetik sebeplerden kaynaklanıp idiyopatik olarak kalmaktadır (19).

Azospermi saptanan hastalarda tam ve detaylı bir öykü, fizik muayene ve endokrin değerlendirme mutlaka gereklidir. Öyküde çocukluk çağında geçirilmiş orşit öyküsü, kriptorşidizm, travma, ilaç kullanım öyküsü, gonadotoksin maruziyeti, radyoterapi, kemoterapi öyküsü mutlaka sorgulanmalıdır (18). Ayrıca fizik muayenede klinik varikosel varlığı incelenmeli ve düzeyi belirlenmelidir. İleri düzey

varikosellerin azospermi ile ilişkili olabileceği bilinmektedir (20). Fizik muayenede gonadların palpasyonu ve boyutlarının ölçümü mutlaka yapılmalıdır. Bu değerlendirmedeki anormallikler spermatogenezdeki bozukluklarla ilgili olabilir ve azospermi sebeplerini sınıflandırırken önemlidir.

Azospermi bulgusu saptandığında hasta yönetiminde önemli farklılıklar olduğu için OA (Obstrüktif azospermi) ve NOA klinikleri ayırt edilmelidir. OA ve NOA sınıflandırırken; FSH ölçümü, testis boyutu ölçümü ve vas deferens varlığı/yokluğu gibi bazı fizik muayene bulguları yardımcı olur (2). Tanısal amaçlı testis biyopsisi OA ve NOA ayırımında rutin olarak kullanılmaz (2).

Azospermi sebepleri temel olarak pretestiküler, testiküler ve posttestiküler olmak üzere üç ana başlıkta sınıflandırılabilir ve bu başlıkların tamamında genetik etiyolojilerin de olduğu bilinmektedir (4). Azosperminin pretestiküler nedenleri spermatogenezde bozulmaya sebep olan endokrin anormalliklerdir. Testiküler nedenleriyse testislerdeki spermatogenezin intrinsik bozukluklarını kapsar. Pretestiküler ve testiküler nedenler de ikisi birlikte NOA'yı oluşturur (18). Posttestiküler nedenlerse büyük ölçüde erkek üreme sisteminde duktal tıkanıklıklardan kaynaklanan sebepleri içerir ve OA'yi oluşturur (18).

2.2.4.1.1. Obstrüktif azospermi

Obstrüktif azospermi tüm azospermilerin %40'ından sorumludur (21). Obstrüktif azospermi etiyolojisinde pek çok faktör bilinmektedir fakat en yaygın sebeplerden biri vas deferens'in konjenital yokluğudur. Diğer etiyolojilerse cerrahiye sekonder iatrojenik, ejakülatör kanal tıkanıklığı, idiyopatik, travma, retrograd ejakülasyon ve vas deferens tıkanıklığıdır (18). Normal testis hacmi, normal FSH, azalmış semen hacmi, fizik muayenede genişlemiş proksimal epididimis saptanmış veya vas deferens palpe edilememişse tanı OA lehinedir (6).

2.2.4.1.1.1. Azosperminin posttestiküler sebepleri

Posttestiküler erkek infertilitesi sıklıkla erkek üreme yollarındaki blokaj veya seksüel disfonksiyondan kaynaklanır ve etkilenen erkeklerde spermatogenez normaldir (4). Bu olgularda infertilitenin temel sebebi seminal sıvının akışının bloke olmasından veya ereksiyon ve ejakülasyondaki işlev kaybından kaynaklanır (4).

2.2.4.1.2. Non obstrüktif azospermi (NOA)

NOA infertil erkeklerin yaklaşık %10'unda tespit edilir. NOA ve OA ayrımı için öykü, fizik muayene ve hormonal değerlendirmeler yardımcı olur. Küçük testis hacmi ve azospermisi olan hastalarda normal semen hacmi ve yüksek FSH olduğunda tanı genellikle NOA ile uyumlu olur (2). Obstrüktif azospermi hastalarında testiküler biyopsi ile sperm elde edilebilir. NOA'lardaysa çoğu zaman ejakülata ulaşan sperm üretimi olmaz fakat testis biyopsisilerinin yaklaşık %40'ında sperm elde edilebilir (22).

OA ve matürasyon arresti olan NOA'da da normal testis hacmi olabilir. Bu nedenle testis boyutu NOA ve OA ayırıcı tanısında faydalı olmayabilir (23). NOA'da görülen testis histolojisi bulguları: i. Yalnızca Sertoli Hücre Sendromu (SCOS), ii. Germ hücresi maturasyonunun farklı aşamalarında Maturasyon Arresti (MA) (Spermatogonial ve Spermatosit Arresti), iii. Hipospermatogenezdir (24).

2.2.4.1.2.1. Azosperminin pretestiküler sebepleri

Hipergonadotropik (testiküler sebepler) ve hipogonadotropik (pretestiküler sebepler) hipogonadizm gonadotropinler (FSH, LH) değerlendirilerek ayırt edilebilir (4). Düşük gonadotropin düzeyleri hipotalamik veya hipofizer yetmezliği işaret eder (4). Bu bulgular varlığında GnRH testi, Prolaktin ve TSH (Tiroid stimulan hormon) ölçümü, hipofiz MR görüntülemesi, kortikotropik ve somatotropik eksenin değerlendirilmesi içeren ileri değerlendirmelere devam edilmelidir (25, 26). Normal gonadotropin, total testosteron düzeyleri ve beraberinde normal testis hacmi olması normal fonksiyonda çalışan bir hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın göstergesidir (4). Gonadotropin düzeyleri dışında ilk muayenede hipogonadotropik hipogonadizm'den şüphelendirebilen azalmış sakal-bıyık, jinekomasti, uzun bacaklar ve obezite gibi bazı muayene bulguları da vardır.

Pretestiküler erkek infertilitesi sebepleri Hipotalamo-Hipofizer aksta farklı seviyelerde gerçekleşen patolojilerden kaynaklanır. Erkek hipogonadizminin pretestiküler sebepleri tablo 3'te sınıflandırılmıştır. Hipogonadotropik

hipogonadizmin (HH) bazı sebepleri genetikdir (4). Genetik sebepli olan HH tanı koymak çocuğa geçme riski dahil genetik danışma için gereklidir.

Tablo 3. Erkek Hipogonadizminin Pretestisküler Sebepleri (4)

Hastalık/Klinik durum	Patolojinin Gerçekleştiği Seviye
Kallmann sendromu, idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm	Hipotalamik
Konjenital sendromlar (Prader-Willi, serebellar ataksi, diğer sendromlar)	Hipotalamik/Hipofizer
İlaç kullanımı (alkol, androjenik steroidler, opioid)	Prehipotalamik/Hipotalamik/Hipofizer
Merkezi Sinir Sistemi tümörleri	Prehipotalamik/Hipotalamik
Prolaktinoma, Hiperprolaktinemi, Hipofiz tümörleri	Hipofizer
Stres, kritik hastalık, hiperkortizolizm	Prehipotalamik
Hemokromatozis, demir aşırı yüklemesi	Prehipotalamik
Sarkoidoz, Histiositozis ve diğer granülamatöz hastalıklar	Prehipotalamik/Hipotalamik/Hipofizer
Boş sella sendromu, hipofizer malformasyonlar	Hipofizer
Travmatik beyin hasarı	Prehipotalamik
Yaşlılık, obezite	Prehipotalamik/Hipotalamik
Çevre kirliliği ve toksinler, Radyoterapi	Prehipotalamik/Hipotalamik/Hipofizer

2.2.4.1.2.2. Azosperminin testiküler sebepleri

Erkek infertilitesine sebep olan genetik sebeplerin araştırılması sonra 20 yıl içerisinde insan genom projesinin de bitmesiyle artmıştır. Erkek infertilitesinin testiküler genetik sebepleri; sayısal/yapısal kromozomal bozukluklar, tek gen defektleri ve Y kromozomu mikrodelsyonları gibi çeşitli etiyolojilerden kaynaklanmaktadır. Azospermiye yol açan genetik defektlerin yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen gebeliklerde çocuğa geçme riski vardır. İnfertilite etiyolojisine göre aileye genetik ve üreme danışmanlığı verilmesi için genetik etiyolojilerin ortaya koyulması önemlidir.

Tablo 4. Erkek infertilitesinin testiküler sebepleri (4)

Primer testiküler nedenler	Sekonder testiküler nedenler
Konjenital • Anorşi • Kriptorşidizm • Cinsel farklılaşma bozuklukları • Vanishing testis sendromu	Sekonder testiküler yetmezlik
Genetik • Klinefelter sendromu • Y kromozomu mikrolelesyonları • XX erkek • XYY erkek • Translokasyonlar/inversiyonlar	Varikosel
Enfektif • Bakteriyel orşit • Viral orşit	Gonadotoksinler • Kemoterapi • Radyoterapi • İlaçlar
Spermatogenez bozuklukları • Spermatogenik arrest • Germ hücre aplazisi (Sertoli cell-only sendromu) • Spermin yapısal defektleri ➤ Globoozospermi ➤ İmmotil siliya sendromu	Sistemik sebepler • Kronik böbrek yetmezliği • Kronik karaciğer yetmezliği • Obezite
Testiküler tümörler	İdiyopatik
Testiküler travma	
Testiküler mikrokalsifikasyonlar	

Testiküler azospermiye sebep olan bazı genetik sebepleri Hamada ve arkadaşları şöyle sınıflandırmıştır (5):

1. Spermatogenezi ve androjen üretimini etkileyen genetik testis bozuklukları
 - Klinefelter sendromu
 - XX *male* sendromu
 - USP26 varyasyonları (X'e bağlı)
 - SOX3 varyasyonları (X'e bağlı)
 - Bilateral anorşi
 - Noonan sendromu
 - 45X/46XY mozaizmi (miks gonadal disgenezi)
2. Spermatogenezi etkileyen genetik testis bozuklukları
 - Y kromozomu mikrolelesyonları
 - Otozom translokasyonları
 - Monogenik hastalıklar
 - Multifaktöriyel hastalıklar (kriptorşidizm vb.)
3. Androjen üretimini veya etkisini etkileyen genetik testis bozuklukları
 - Androjen reseptör varyasyonları
 - StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) geni varyasyonları
 - 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz eksikliği tip II (*HSD3B2*)
 - SRD5A2 geni (Pseudovaginal perineoscrotal hypospadias #264600) varyasyonları
 - İşlevsiz hücre regülatör yollar
 - Epigenetik defektler
4. Primordial germ hücresi seviyesindeki genetik anormallikler

2.2.4.1.2.2.1 Kromozomal hastalıklar

Kromozom analizi ile sayısal ve yapısal kromozomal değişiklikler (delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon) saptanabilir. Kromozomal anomaliler erkek infertilitesinin en sık genetik sebepleridir ve azospermisi olan erkek infertil hastalarda kromozomal anomali oranı %12-15, şiddetli oligospermisi olan hastalarda %5 ve

normal spermiogramı olanlardaysa <1'dir (2). Azospermi hastalarında en sık karyotip pateni 47, XXY'dir. Klinefelter sendromlu olgularda mikrodiseksiyon TESE ile yaklaşık %50-60 oranında spermatogenez odakları bulunabilir. Y kromozom mikrolelesyonları erkek infertiliterinde bilinen ikinci en sık genetik sebebidir. Komplet AZFa ve/veya AZFb delesyonu olanlarda Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) ile hiç sperm elde edilemez ve TESE endikasyonu yoktur. AZFc delesyonu olan olgularda yaklaşık %50 oranında TESE'de sperm elde edilebilmektedir (6).

Primer infertilitesi olan şiddetli oligospermisi veya azospermisi olan hastalara karyotip analizi ve azospermi faktörü (AZF) mikrolelesyon analizi önerilmektedir (6).

Erkek infertil hastalarda en sık kromozomal sebep Klinefelter sendromu olup ayrıca translokasyonlar, inversiyonlar ve delesyonlar da rol almaktadır. EAU şiddetli oligospermisi ($<10 \times 10^6$ /mL.) ve azospermi olan erkek hastalara kromozom analizi önermektedir. Avrupa Üroloji Derneği (European Association of Urology) (EAU) ayrıca ailede tekrarlayan spontan düşük öyküsü, malformasyonlar veya entelektüel yetersizlik olanlara spermiogram analizinden bağımsız olarak kromozom analizi önermektedir.

2.2.4.1.2.2.1.1 Klinefelter Sendromu

Klinefelter sendromu (KS) erkeklerde görülen en sık kromozomal hastalık ve erkek infertilitesinin en sık kromozomal sebebidir (4). KS'nin sıklığı 660 erkekte 1'dir (27). KS'nin sıklığı infertil erkeklerde %6'yken NOA'lı olgularda %10-12'ye kadar ulaşır (28,29). KS, 47,XXY kromozom kuruluşuna sahip olguları tanımlar fakat olguların %15'inde de 46,XY/47,XXY gibi mozaik formlar olabilir (30).

KS olgularının %50'sinde fazla X kromozomu paternal mayoz I'de cinsiyet kromozomlarının ayrılamamasından kaynaklıdır. Olguların kalan %50'sinde ise maternal mayoz I veya mayoz II veya erken postzigotik mitotik bölünmelerde cinsiyet kromozomlarının ayrılamamasından kaynaklanır (31, 32). Anne veya babanın ileri yaşı olmasının da bu hücre bölünmesi hatalarına sebep olabildiği bilinmektedir (33).

Sendromun en sık bulguları küçük testisler, hipergonadotropik hipogonadizm ve azospermidir (34). Ayrıca jinekomasti, kıllanma azlığı, uzun boy da eşlik eden diğer bulgulardandır. KS'den etkilenen bireyler osteoporoz, metabolik sendrom ve psikososyal bozukluklar açısından da risk altındadırlar. Fakat KS'lu olgularda küçük testis hariç diğer bulgular oldukça değişkenlik göstermektedir (34). KS olgularında ergenlik yaşı genellikle normaldir ve ergenlikte testisler minimal büyür ve nihayetinde küçük kalır. Buna sekonder yetişkin KS olgularında gonadotropinler yüksektir. KS olgularının spermatozoaları çoğunlukla haploid de olsa hastaların bazılarının çocuklarında KS görüldüğü bildirildiği için bu riski azaltmak için genetik danışmanlık ve preimplantasyon genetik tanı (PGT) bir seçenek olabilir (35).

Germ ve sertoli hücrelerinin dejenerasyonu, seminifer tübüllerde yaygın fibrozis ve hiyalinizasyon, Leydig hücrelerinin hiperplazisi, interstisyum fibrozisi KS nin patolojik mikroskopik bulgularındandır (34). Seminifer tübüllerde çoğunlukla spermatogenez görülmez ancak az sayıda spermatozoa bulunan birkaç tübül bulunabilir (34). KS'li hastaların yaklaşık %30-60'ında spermatozoa bulunabilir ve yardımcı üremeye bildirilen canlı doğum oranı yaklaşık %16'dır (34).

Normal karyotipi olan olgularda anormal karyotipi olan azospermi hastalarına göre testiküler biyopsi ile sperm elde etme başarısı daha yüksektir (36). Ayrıca normogonadotropik azospermi olgularının da hipergonadotropik azospermi olgularına göre sperm elde edilme şansı daha yüksektir (36).

2.2.4.1.2.2.1.2 XX Male Sendrom

46,XX erkek sendromu 20.000 doğumda bir görülen nadir bir anöploididir (35). Bu nadir sendrom çoğunlukla Y kromozomunun kısa kolundaki *Sex-Determining Region* (SRY) bölgesinin X kromozomuna translokasyonu ile ortaya çıkar. Olguların genellikle komplet iç ve dış erkek genitali olmasına rağmen AZF komplet olarak olmadığı için sperm elde etme imkanı yoktur ve azospermiktirler (35).

2.2.4.1.2.2.1.3 47,XYY Sendromu (Jacobs sendromu)

47,XYY sendromu, mayoz II'de parental nondisjunction sebebiyle fazla Y kromozomunun çocuğa geçmesi nedeniyle ortaya çıkan kromozomal hastalıktır. Sıklığı 1/750 olup nispeten sık bir kromozomal anormalliktir. Etkilenmiş erkeklerde

uzun boy ve öğrenme güçlüğü bulgularının yanı sıra azospermiden normozoospermiye kadar değişken fertilitite durumları görülebilir (4).

2.2.4.1.2.2.1.4 Otozomal translokasyonlar ve inversiyonlar

NOA olgularında en sık kromozomal sebep Klinefelter sendromuyken, translokasyon/inversiyonlar gibi yapısal kromozomal hastalıklar oligospermi hastalarında daha sıktır (37). İnfertil erkeklerde en yaygın translokasyonlar akrosentrik kromozomlar olan 13, 14, 15, 21 ve 22 numaralı kromozomların füzyonu ile oluşan Robertsonian translokasyonlarıdır. Robertsonian translokasyon taşıyıcıları fenotipik olarak klinik göstermezler fakat füzyone olmuş yeni kromozomların hatalı segregasyonu nedeniyle spermatogenetik bozukluklara neden olabilirler (4).

Yapısal ve sayısal kromozomal değişikliklerin mayoz sırasında kromozom sinapsisine etkileyerek spermatogenik defektlere neden olduğuna düşünülmektedir (37). Ayrıca kromozomal yeniden düzenlemelerin etkilediği genlerin ekspresyonunun promotörleri kaldırarak veya spermatogenezde yer alan gen dizilerini kesintiye uğratarak da spermatogenezde bozukluklara sebep olabileceği potansiyel bir mekanizma olarak düşünülmektedir (37).

İnfertilite kliniğine başvuran şiddetli oligospermik ve azospermik erkeklerde sağlıklı yenidoğanlara kıyasla (%0.08) sırasıyla %1,6 ve %0,09 oranlarında artmış Robertsonian translokasyonları saptanmıştır (38). Resiprokal translokasyonlar, otozomal ve otozomal/seks kromozomları arasında translokasyon olmasıyla oluşur ve görülme sıklığı oligospermik ve azospermik erkeklerde %0,7'dir (4). Gonazomal kromozomlardaki translokasyonlar daha nadirdir ve Y kromozomu translokasyonları bazı çalışmalarda azospermi ile ilişkili bulunmuştur (39). Resiprokal translokasyon taşıyıcıları, kırılma noktalarına yakın belli genlerin işlevlerinin bozulması nedeniyle genellikle mayotik arrest ve spermatogenik defektlere neden olur (4). Spermatogenez mevcut olan translokasyon taşıyıcısı erkeklerin spermlerinin %50'sinden fazlasında dengesizlik taşıyan spermilerin olması beklenir (4). Yalnızca otozomal kromozomları içeren translokasyonlarda daha çok oligospermi görülürken gonazomal kromozomları içeren resiprokal translokasyonları olanlarda şiddetli erkek infertilitesi ve

azosperminin daha sık olduğu gösterilmiştir (40). Literatürde otozomal kromozomal anomalilerin de NOA ile ilgili olabileceğini düşündüren veriler vardır (41).

Çoğu andrologist resiprokal translokasyonlar, Robertsonian translokasyon ve inversiyonların spermatogenik yetmezliği tek başına açıklamadığını düşünmektedir ve dengeli translokasyon taşıyıcılarına yapılan genom dizilime çalışmaları erkek germ hücre gelişimi, apoptozis ve spermatogenezde rol oynayan gen bozukluklarının ve tek gen mutasyonlarının kliniğe katkısı olabileceğini göstermiştir (4, 40). Dengeli translokasyon taşıyıcılığı olan olguların çocuğuna trizomi 13, trizomi 21 gibi kromozomal hastalıkların geçiş riski sebebiyle in vitro fertilizasyon (IVF)/intrazitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) tedavisi sırasında ek olarak PGT de düşünülebilir. Ayrıca 45,XY,rob(14q;15q) kromozom kuruluşuna sahip ebeveynlerin çocuklarında uniparental dizomiye (UPD) sebep olabildiği için 15. kromozomun maternal veya paternal UPD'sinden kaynaklanabilecek Prader Willi sendromu ve Angelman sendromu ihtimali akılda tutulmalıdır (39).

İnversiyonların, erkek fertilitesi üzerinde değişken etkileri olabilir. 1.kromozomdaki perisentrik inversiyonlar, normal doğurganlığa sahip bireylerde de görülmekle birlikte spermatogenik bozulma ve azospermi riskiyle ilişkilendirilmiştir (4, 42). Bu durum inversiyonun kırık noktaları ile ilgilidir. Y kromozomundaki inversiyonlar AZFc bölgesinde delesyonlara sebep olarak spermatogenik yetmezliğe neden olabilir. (4).

2.2.4.1.2.2.1.5 Miks gonadal disgenezi (45,X/46,XY Mozaisizmi)

45,X/46,XY mozaisizmi nadirdir ve normal virilize olmuş erkek, Turner sendromu fenotipinde kadın ve belirsiz genitalya gibi değişen klinik bulgular gösterebilir. Olguların %90 gibi baskın bir kısmı erkek fenotip gösterir. Erken embriyonik gelişim sırasında Y kromozomunun mitotik kaybı 45,X/46,XY mozaik karyotipine sebep olur. Geri kalan olgular dişi veya belirsiz genitalyaya sahiptir. Anormal gonad formasyonu azospermiye sebep olmaktadır (4).

2.2.4.1.2.2.2 Y Kromozomu ve mikrolelesyonları

Y kromozomu kısa kolunda SRY genini, uzun kolundaysa AZF bölgesini bulundurur. AZF bölgesi delesyonları rutin karyotip analizinde görülemeyecek kadar küçüktür Y kromozomu mikrolelesyon analizinde Y kromozomun uzun kolundaki AZFa, b ve c bölgeleri değerlendirilir.

Y kromozomunun uzun kolunun makrolelesyonları, ring Y kromozomu veya Y kromozomunun duplikasyonu gibi yapısal anormallikler gibi farklı sebepler erkek infertilitesine rol alabilmektedir (39).

EAU, $10 \times 10^6/\text{mL}$ 'den az sperm konsantrasyonu olduğunda kromozom analizi ve $5 \times 10^6/\text{mL}$ 'den az sperm konsantrasyonu olanlara YKM analizi önerilir. Fakat YKM olan hastaların çoğunda sperm konsantrasyonu $<1 \times 10^6/\text{mL}$ 'dir (43). Y kromozomu mikrolelesyonu yardımcı üreme teknikleriyle elde edilen bir gebelikte erkek çocuğa aktarılabilir. Bu konuda genetik danışmanlık önerilir.

YKM analizi için en yaygın kullanılan teknik gDNA'nın multipleks PCR amplifikasyonudur. İnternal PCR kontrolü olarak ZFX veya ZFY kullanılır. Y kromozomunda belli bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu, Y kromozomunun erkek-spesifik bölgesine özgü dizi etiketli bölge (*sequence-tagged site* (STS)) primerleri kullanılarak gerçekleştirilir. STS primerleri Y kromozomunun nonpolimorfik bölgelerden tasarlanmalıdır. YKM analizi için kullanılan PCR primer setleri şöyledir: sY14 (SRY), ZFX/ZFY, sY84 (AZFa), sY86 (AZFa), sY127 (AZFb), sY134 (AZFb) ve sY254(AZFc/DAZ) ve sY255 (AZFc/DAZ).

YKM ikinci en sık erkek infertilitesi sebebidir (4). NOA'lı olguların %3-15'inde etiyojide YKM'ler rol oynamaktadır (4). Fakat YKM'lerin sıklığı toplumdan topluma değişebilmektedir. Almanya'da sıklığı %2'yken İran'da %24.2'ye kadar çıkmaktadır (4).

Y kromozomu haploiddir ve psödootozomal bölgeler olan PAR1 (*Pseudoautosomal Region 1*) ve PAR2 (*Pseudoautosomal Region 2*) bölgeleri hariç X kromozomu ile rekombinasyona girmez (24). Y kromozomu içerdiği segmental duplikasyonlar sebebiyle non-allel homolog rekombinasyona (NAHR) yatkındır ve bu durum Y kromozomunda segmental kazanç/kayıplara sebep olmaktadır (24).

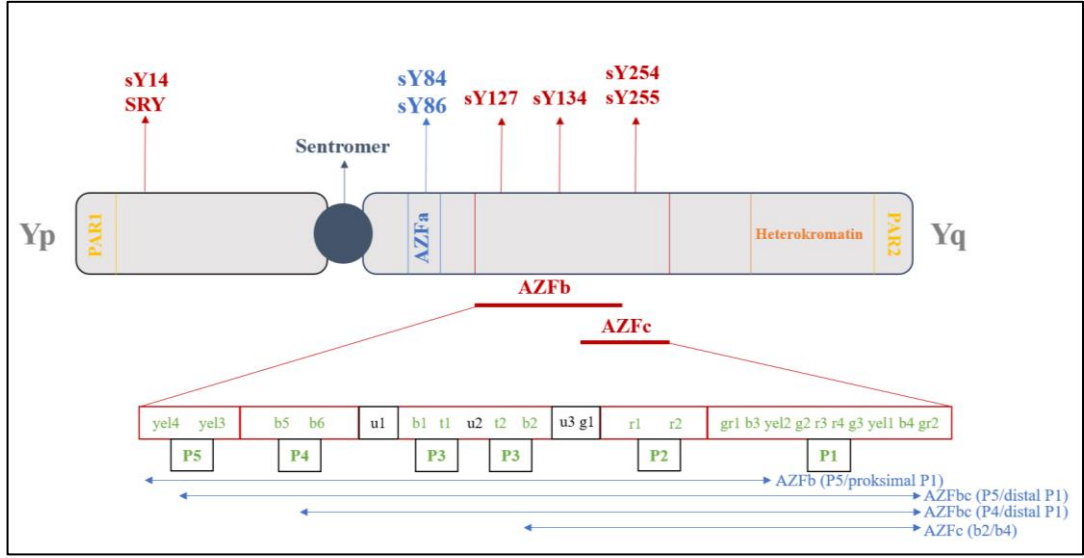
Mayoz bölünme sırasında bu bölgeler sebebiyle kardeş kromatitler arasında NAHR meydana gelebilir ve AZF delesyonlarına yol açabilir (44). AZF bölgesi delesyonları klinik bulgularla ilişkili olarak: AZFa, AZFb, AZFbc ve AZFc olarak sınıflandırılmaktadır. Mayoz sırasında kardeş kromatidler arasında gerçekleşen non-allel homolog rekombinasyon (NAHR), Yq11 bölgesinde DNA'nın segmental olarak kaybedilmesi sonucu 0,8 ila 7,7 Mb aralığında tekrarlayan delesyonlara ortaya çıkabilir (şekil 3) (24). AZFc delesyonları %80'lik bir oranla en sık delesyon tipidir (24). Diğer daha nadir delesyon tipleri olan AZF delesyonları ve sıklıklarıysa; AZFa delesyonları (%0.5-4), AZFb (%1-5) ve AZFbc (%1-3) şeklindedir.

AZFa bölgesi yaklaşık 800 kb büyüklüğündedir ve spermatogenez için gerekli genleri içerir. *USP9Y*, *DBY* ve *UTY* genleri bu bölgede yer almaktadır ve özellikle testis dokusunda eksprese olan *DBY* geninin spermatogenez için önemli olabileceği düşünülmektedir (45).

AZFb bölgesi 6.2 ile 7.7 Mb'lık bir bölgeyi içerir fakat 1.5 Mb'lık kısmı AZFc bölgesi ile süperpoze olmaktadır. Bu bölgedeki tek kopya genler *KDM5D*, *EIF1AY*, *RPS4Y2*, *CYorf15A*, *CYorf15B*'dir. *RPS4Y2* geninin ekspresyonunun testis-spesifik olduğu bilinmektedir (45). *XKRY*, *HSFY*, *RBMY1A1*, *PRY*, *CDY*, *BPY2*, *DAZ* genleriyse AZFb bölgesindeki çoklu kopya gen ailelerini oluşturur. *RPS4Y2*, *XKRY*, *PRY1*, *PRY2* testis spesifik ekspresyon göstermektedir.

AZFc bölgesi spesifik olarak testiste eksprese olan 21 gen içerir. Özellikle *DAZ*, *BPY2*, *CDY1* genlerinin spermatogenezde etkisi olduğu düşünülmektedir. *DAZ* geni AZFc bölgesinde tanımlanan ilk ve en önemli gendir. *DAZ* delesyonlarının infertil erkeklerde sıklığı artmıştır (45).

AZFc delesyonları dışındaki delesyonlarda (AZFa ve AZFb) sperm elde etme imkanı yoktur. Diğer delesyonların aksine AZFc delesyonlarındaysa mikroTESE ile ortalama sperm elde etme başarısı %47'dir (4). AZFc delesyonu olgularında sperm sayısı progresif olarak azalır. Azospermisi olan hastaların patolojik fenotipleri SCOS ve hipospermatogenez arasında değişkenlik gösterir (24). YKM'lerde farklı delesyon tiplerinde farklı doku tanıları görülebilmektedir (tablo 5).



Şekil 3. Y kromozomu ve AZF bölgeleri

Tablo 5. AZF delesyon bölgeleri büyüklükleri ve fenotipleri (37)

AZF bölgesi	Büyüklüğü	Semen fenotip	Testis histolojisi
AZFa	0.8 Mb	Azospermi	SCOS
AZFb	6.2 Mb	Azospermi	Spermatogenik arrest
AZFb + AZFc	7.0- 7.7 Mb	Azospermi	Spermatogenik arrest
AZFc	3.5 Mb	Oligospermi veya Azospermi	Değişken

2.2.4.1.2.2.3 Tek Gen Defektleri

İnfertiliteye yönelik rutin değerlendirmede tek gen hastalıklarını değerlendirmek amaçlı gen dizileme testleri ancak konjenital vas deferens yokluğu (KVDY) veya konjenital hipogonadotropik hipogonadizmden şüphelenildiğinde kullanılmaktadır. KVDY olan erkeklerin yaklaşık üçte ikisinde başka herhangi bir kistik fibrozis belirtisi olmaksızın *CFTR* varyasyonları bulunur (2). Vas deferens yokluğu olan hastalar ve partnerlerinin *CFTR* geni tek nükleotit değişimi ve 5T alleli açısından değerlendirilmesi önerilir. Ayrıca KVDY'nin genetik etiyolojisinde X'e bağlı kalıtım gösteren *ADGRG2* geni varyasyonlarının da rol aldığı gösterilmiştir. Konjenital HH olguları gonadotropin stimülasyonu bozukluğundan kaynaklanmaktadır ve genetik kaynaklıdır. Konjenital HH etiyolojisinde rol oynayan genler; *NHLH2*, *KISS1*, *HS6ST1*, *IL17RD*, *PROK2*, *GNRHR*, *TACR3*, *NDNF*, *SPRY4*, *SEMA3A*, *FEZF1*, *FGF17*, *GNRH1*, *FGFR1*, *CHD7*, *NSMF*, *FGF8*, *WDR11*, *FSHB*, *TAC3*, *DUSP6*, *TCF12*, *KISS1R*, *LHB*, *PROKR2*, *FLRT3*, *ANOS1* 'dir.

Gelişen dizileme teknolojisiyle birlikte erkek infertilitesinin en ağır hali olan NOA ile ilişkilendirilen gen sayısı da gün geçtikçe artmaktadır. Yakın zamanda yayınlanmış Muranishi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada güncel literatür verisine dayanarak NOA ilişkili 162 gen kesin neden, varsayılan neden, yatkınlık geni ve aday gen olarak sınıflandırılmıştır (46). Bu 162 gen aşağıda belirtildiği gibi sınıflandırılmıştır;

- i. Kesin NOA nedeni olarak tanımlanmış 29 gen (*ADAD2*, *C14ORF39*, *DMC1*, *DMRT1*, *FANCM*, *FKBP6*, *HFM1*, *KASH5*, *MIAP*, *MEI1*, *MEIOB*, *MSH4*, *NANOS1*, *NANOS2*, *PLK4*, *PSMC3IP*, *SHOC1*, *SOHLH1*, *STAG3*, *SYCE1*, *SYCP2*, *TDRD7*, *TDRD9*, *TERB1*, *TEX11*, *TEX14*, *TEX15*, *USP26*, *ZFX*),
- ii. NOA nedeni olduğu varsayılan 28 gen (*BRDT*, *C11orf80*, *CDC20*, *DDX25*, *DHH*, *EXO1*, *GCNA*, *GTF2H3*, *HAUS7*, *HENMT1*, *HSF2*, *MAJIN*, *MCM8*, *MCM9*, *MCMDC2*, *MLH3*, *MOV10L1*, *NPAS2*, *RAD21L*, *REC8*, *RNF212*, *SPINK2*, *SPO11*, *STX2*, *SYCP3*, *TERB2*, *TDRKH*, *WNK3*),

- iii. 24 NOA yatkınlık geni (*AHRR, ATM, BAX, CREM, DAZL, DNMT3L, E2F1, ERCC1, HORMAD1, KLHL10, PATZ1, PIN1, PIWIL1, PMS2, PRDM9, PRM1, PRM3, SETX, TAF4B, TDRD1, UBE2B, UBR2, YBX2, ZMYND15*),
- iv. 64 NOA aday geni (*AGPS, BCL2L2, BOLL, BSG, CCDC157, CCDC42, CDK2, CHFR, CKS2, CLCN2, CLDN11, CLPP, DDX4, EHD1, EIF4G3, ENTPD6, EXD1, FHL5, FSHR, GJA1, H2AX, HMGA1, HMGA2, HORMAD2, INSL6, IP6K1, LMTK2, MAD2L2, MEI4, MEIOC, MLH1, MORC1, MYBL1, NANOS3, NLRP3, NUPR1, PANK2, PARP2, PIWIL2, PIWIL4, PLD6, RANBP1, RANBP2, RBM5, RNF17, SBF1, SIAH1, SIX5, SLC4A2, SMC1B, SNRPA1, SOHLH2, SOX30, SPATA48, STRA8, SUN1, SYCE2, SYCP1, TBPL1, TDRD6, TEX19, TOPAZ1, UTP14C, YBX3*),
- v. 17 sendromik NOA'ya neden olan gen (*ANOS1, AR, CHD7, GNRH1, GNRHR, FANCA, FGFR1, FSHB, KISS1R, LHB, NR0B1, NR5A1, PROK2, PROKR2, TACR3, WT1, XRCC2*)

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) veritabanında *spermatogenic failure* (spermatogenik yetmezlik) fenotipi ile ilişkilendirilmiş 103 farklı gen tanımlanmıştır (tablo 6). Spermatogenik bozukluk yaratan mekanizmalar sperm motilite, morfoloji, sayı bozuklukları ve fertilizasyon defektleriyle ilgilidir. *Human Phenotype Ontology (HPO)* ve OMIM veri tabanlarında azospermi ve/veya oligospermi bulgusuyla ilişkilendirilmiş 62 gen aşağıda belirtilmiştir;

DNALI1, CFAP57, MSH4, SPAG17, DRC1, MIAP, CATIP, CFAP65, SPATA16, RNF212, SPINK2, PDHA2, MSH5, ARMC12, ARMC2, PNLDC1, FKBP6, CFAP69, STAG3, XRCC2, TEX15, KCNU1, FBXO43, IFT74, SHOC1, NR5A1, SOHLH1, CFAP70, NANOS1, SYCE1, DNHD1, CCDC34, CATSPER1, SYCP3, DNAH10, DZIP1, FANCM, RPL10L, C14ORF39, TDRD9, TERB2, MEIOB, SEPT12, TERB1, PMFBP1, ZMYND15, TEKT3, ZSWIM7, KLHL10, TEX14, DNAH17, TAF4B, KASH5, CFAP61, SUN5, SYCP2, MOV10L1, CFAP47, TEX11, GCNA, CT55, USP9Y

Tablo 6. OMIM veri tabanında spermatogenik yetmezlik fenotipiyle ilişkilendirilmiş genler

DNALI1	MSH4	BRDT	SPAG17	DRC1	MIAP	TSGA10	FSIP2	C2CD6
CFAP65	TTC21A	DNAH1	CFAP44	CFAP91	SPATA16	RNF212	WDR19	SPINK2
TTC29	SPEF2	MSH5	ARMC12	SLC26A8	DNAH8	SPACA1	ARMC2	AK9
ZBPB	FKBP6	CCDC146	CFAP69	STAG3	XRCC2	TEX15	KCNU1	FBXO43
CCIN	ACTL7A	SHOC1	NR5A1	SOHLH1	CFAP70	CFAP43	CFAP58	NANOS1
DNHD1	STK33	CCDC34	CATSPER1	AKAP3	LRRC23	PLCZ1	DPY19L2	SYCP3
CCDC62	DNAH10	DZIP1	PPP2R3C	FANCM	RPL10L	C14ORF39	AK7	TDRD9
MEIOB	SEPT12	TERB1	PMFBP1	ZMYND15	DNAH2	TEKT3	ZSWIM7	KLHL10
CEP112	QRICH2	DNAH17	TAF4B	ACTL9	IQCIN	GGN	KASH5	AURKC
SUN5	SYCP2	MOV10L1	ACR	CFAP47	SSX1	TEX11	GCNA	CYLC1
CT55	USP9Y	CATIP	PDHA2	PNLDC1	IFT74	SYCE1	WDR66	TERB2
TEX14	CFAP61	USP26	CFAP57					

*Oligospermi ve/veya azospermi bulgusuyla ilişkilendirilmiş genler koyu renkli yazılmıştır.

2.2.5. Erkek infertilitesinin genetik değerlendirilmesi

İnsanda toplam yaklaşık 20.000 gen bulunmaktadır ve 3.000'den fazla gen spermatogenezde ve üreme sürecinde rol almaktadır (4). Erkek infertilitesiyle ilgili 473'ten fazla gen fare modelleriyle tanımlanmıştır (8). Genecards (www.genecards.org) (47) biyoinformatik veri tabanıdaysa; “spermatogenesis” (spermatogenez) anahtar kelimesi ile arama yapıldığında 4007, “male infertility” (erkek infertilitesi) anahtar kelimesi ile arama yapıldığında 2958, “azoospermia” (azospermi) anahtar kelimesiyle arama yapıldığında 1847, “non-obstructive azoospermia” (non-obstrüktif azospermi) anahtar kelimesi ile arama yapıldığında 409 protein kodlayan gen tanımlandığı görülmektedir. Bu kompleks ve heterojen klinikte genetik etiyolojiyi saptamak ayrıca infertilitenin genetik etiyolojisi için ilişkilendirme analizleri yapmak zordur. Çünkü infertilitenin doğası gereği geniş aile çalışmaları yapılamamaktadır. Ayrıca otozomal dominant kalıtım gösteren genetik etiyolojilerde aile içerisinde eksik penetrans ve değişken fenotip olması da genetik testlerin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (48). Ayrıca infertilitenin çoğu toplumda sosyal bir tabu olmaya devam etmesi de infertilite araştırmalarını zorlaştırmaktadır.

Erkek infertilitesi tanısında kullanılan temel olarak üç grup test vardır: i. sitogenetik testler (kromozomal sayısal ve yapısal anormallikler), ii. PCR tabanlı testler (Y kromozomu mikrolelesyon) iii. dizi analizi teknolojileri (tek nükleotid değişimleri). Erkek infertilitesi olgularında en sık kullanılan genetik testler kromozom analizi, Y kromozomu mikrolelesyon analizi ve *CFTR* genine yönelik genetik testlerdir. AUA, azospermi hastalarında kromozom analizi ve Y kromozomu mikrolelesyon analizini önermektedir (6). Fakat yapılan bu testlere rağmen erkek infertilite hastalarının %30-%40'ı hala idiyopatik kalabilmektedir (4). Hala bilinmeyen sebeplere bağlı olan erkek infertilite sebepleri için genetik testlerin önemi git gide artmaktadır. Hem tanı-tedavi yönetimi hem de genetik danışmanlık için erkek infertilitesi olan hastalar genetik değerlendirmeden geçmelidirler. Özellikle son 20 yılda gelişen dizileme teknolojileri pek çok hastalıkta olduğu gibi erkek infertilitesi alanında da moleküler düzeyde genetik sebepleri ortaya çıkarmaya katkı sağlamıştır. Azospermi etiyolojisinde rol oynayan tek gen sebepleriye giderek artsa da çoğu hala nadir olarak kalmakta ve rutin hedefli panel testlerle araştırmak için düşük oranda kalmaktadır (8).

Genetik anormallikleri olan erkeklerde genellikle hatalı spermatogenez görüldüğü için şiddetli oligozoospermi/azospermiye ve artan anöploidi riskine neden olur (2). Genetik testler sayesinde azosperminin genetik sebeplerin tanınması, YÜT ile tedavi sürecinde hasta yönetimine yardımcı olacaktır. Ayrıca genetik sebebi bilinen ve çocuğa aktarılma riski olan genetik defektler eğer çocuk planından önce bilinirse çift sonraki kuşağa geçmesini engelleyen PGT gibi önleyici yöntemlerden faydalanabilir. Son literatür önerileri azospermisi olan hastalara kromozom analizi ve Y kromozom mikrolelesyon analizi gibi uzun yıllardır kullanılan rutin genetik testlerin yanında yeni nesil dizileme yöntemleriyle değerlendirilmesi gerektiğini savunmaktadır (46).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik onay

Bu çalışma için 10/11/2022 tarihli 2022/211 protokol numaralı Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TTU-2023-10659.

3.2. Hasta seçimi ve klinik değerlendirme

2022 kasım-2024 haziran tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Genetik polikliniğine azospermi bulgusu sebebiyle genetik değerlendirme için başvurmuş 31 yetişkin erkek hastanın genetik etiyolojileri araştırılmıştır. Olguları çalışmaya dahil etmek ve dışlamak için aşağıda belirtilen kriterler kullanılmıştır.

Dahil edilme ölçütleri:

- I. En az bir ay ara ile yapılmış en az iki spermiogramda azospermi bulgusu saptanmış 18 yaş üzeri erkek olgu
- II. NOA ön tanısını destekleyen klinik ve laboratuvar sonuçları olması;
 - a. Spermiogramda semen volümünün ≥ 1 ml ve $\text{pH} > 7,2$ olması
 - b. $\text{FSH} \geq 7.6$ IU/L veya azalmış testis volümü (< 15 ml ve/veya testis uzun aksının $< 4,6$ cm) veya testiküler biyopsi ile SCOS, spermatogenik arrest, hipospermatogenez patolojik tanılarından en az birinin saptanmış olması (4, 49)

Dahil edilmeme ölçütleri:

- I. Azospermiye sebep olacak kemoterapi, radyoterapi, kriptorşidizm, testis torsiyonu, travmatik ya da enfeksiyöz orşit öyküsü gibi kazanılmış sebeplerin olması
- II. Ürogenital sistemin konjenital veya kazanılmış yapısal bozuklukları olan hastalar
- III. Hipogonadotropik hipogonadizm, hiperprolaktinemi, hiper/hipotiroidi, anabolik steroid kullanımı gibi endokrinopatilerin olması
- IV. Spermatogenezi etkileyebilecek kronik hastalığı olanlar
- V. Pelvik veya spinal travma öyküsü olan hastalar
- VI. Genital trakt obstrüksiyonu ve/veya disfonksiyonu (varikosel (evre ≥ 2), obstrüktif azospermi olan olgular,
- VII. Radyasyona maruziyet öyküsü olan olgular

Olguların tamamı öncelikle üroloji hekimi tarafından değerlendirildi. Genetik değerlendirmeye yönlendirilebilecek hastalar dahil edilme ve dışlanma kriterlerine göre değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların tamamına üç kuşak soy ağacı bilgileri dahil detaylı anamnez, fizik muayene, en az iki spermiogram analizi, FSH, total testosteron (TT) ve gerekli görülen olgularda skrotal ultrasonografi (USG) görüntülemesi yapıldı. TESE ile testislerden sperm elde edilmesi planlanan olguların testiküler biyopsi örneklerin doku tanısı için patolojik değerlendirmeden geçti.

Testislerin hacim ölçümü için $\text{Uzunluk} \times \text{Genişlik} \times \text{Yükseklik} \times 0,71$ ml formülü kullanılmıştır (50). Normal testis volümü ≥ 15 ml kabul edilmiştir (10). FSH için normal referans aralık <7.6 IU/L, TT için normal referans aralık 240-950 ng/dl olarak kullanılmıştır (4, 49). Spermiogram analizleri WHO 6. Baskı semen inceleme laboratuvar kılavuzuna göre yapılmıştır (16).

3.3.Hastaların genetik değerdendirilmesi

Dahil edilme ve dışlama kriterlerine uygun olarak seçilen NOA ön tanıılı olgulara genetik araştırmanın ilk basamak testi olarak eş zamanlı kromozom analizi ve Y kromozomu mikrodelsyon (YKM) analizi yapılmıştır. Toplam 31 olgu kromozom analizi ve YKM testleri ile değerdendirilmiştir ve 6 olguda azospermi kliniğini açıklayabilecek pozitif sonuçlar saptanmıştır. Kromozom analizinde dengesiz translokasyon şüphesi olan 1 hastaya mikroarray testi yapılmıştır. İlk basamak genetik testlerde kliniğı açıklayabilecek genetik etiyojoloji saptanmayan 25 olguya tüm ekzom dizileme (TED) testi yapılmıştır. Klinikle ilişkili olabilecek varyasyon saptanan indeks olgularda saptanan varyasyonlar yeni nesil dizi analizi yöntemi ile doğrulanmıştır. Ayrıca hastaların ebeveynleri ve varsa etkilenmiş aile üyeleri için genetik değerdendirme önerilmiş ve kabul edenlerde segregasyon analizi yapılmıştır.

3.4. Periferik Kan Örneklerinin Alınması

3.4.1. Kromozom analizi için

Heparinli tüpe yaklaşık 4 cc periferik venöz kan alınmıştır.

3.4.2. Moleküler genetik testler için

EDTA (etilendiamintetraasetik asit)'lı tüpe yaklaşık 4 cc periferik venöz kan alınmıştır.

3.5. Kromozom analizi

Kromozom analizi mikroskopik olarak kromozomal sayısal ve yapısal değışikliklerin incelenebildiğı bir sitogenetik yöntemdir. 72 saatlik standart kültüre edilmiş lenfosit hücreler metafazda durdurularak ve kromozomlar mikroskopik görüntülemeler sonrası analiz edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 31 hastanın tamamına periferik kandan 72 saat kültür kromozom analizi yapıldı. Kromozom analizi için yapılan işlemlerin basamakları sırasıyla şöyledir:

1. Fitohemaglutinin-M (PHA-M), L-glutamin, fetal bovin serum ve RPMI-1640 içeren besiyeri hazırlandı.
2. Hazırlanan besiyerinden her hasta için iki falcon tüp içerisine 5'er ml besiyeri eklendi.
3. Hastanın 5-6 damla periferik kanı tüplere eklenildi ve birkaç kez alt üst edildi
4. Hasta kanı eklenen tüpler 45° eğimle tüpler 37°C'de etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı.
5. 48. saatte tüplere 250 µl timidin eklenildi.
6. 67. saatte tüpler santrifüj edilerek 900 RPM ve 8dk steril pipet ucu ile süpernatant kısmı atıldı ve üzerine 5'er ml taze RPMI-1640 eklenildi.
7. Tekrar 900 RPM ve 8dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı.
8. Kültürün 71. Saatinde 100 µl kolsemid eklenerek kromozomlar metafaz aşamasındayken hücre bölünmesinin durduruldu.
9. Kolsemid eklenildikten sonra 45 dk etüvde inkübasyona bırakıldı.
10. Tekrar santrifüj yapıldı.
11. 5 ml hipotonik (potasyum klorid) solüsyonu eklenerek 7-9 dk etüvde inkübe edilerek hücreler lizis edildi.
12. 3 birim Metanol ve 1 birim asetik asit ile fiksatif solüsyonu hazırlanarak -20 buzdolabında saklandı.
13. Tüpler etüvden çıkarılıp tekrar 900 RPM'de 8dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
14. Fiksatif eklenildi, sonra pellette açık renk elde edinceye kadar fiksatif ekleme ve santrifüj etme işlemlerine devam edildi.
15. +4 derecede 1-24 saat buzdolabında bekletildi.
16. 50% nem ve 23 derece ortam koşullarında, hücre süspansiyonu lam üzerine damlatılıp yaşlandırma işlemi yapıldı.
17. Tripsin, distile su ve 1 tablet PBS ile solüsyon oluşturuldu. Yayma yapılmış lamlar önce 40 sn PBS karışımında sonra 45 sn leichmann boya karışımında bekletildi.
18. Ardından boya yıkaması su ile yapıldı.
19. Lamlar, 70° derece etüvde 18 saat kurumaya bırakıldı.
20. Metafaz finder mikroskop yardımı ile lamlar tarandı.

21. Görüntüler cytovision görüntü analiz sistemi ile analiz edildi.
22. Kromozom analizinde “ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature” kılavuzu kullanıldı.
23. Her hasta için 20 metafaz alanı analiz edildi ve ISCN kılavuzuna göre rapor edildi.

3.6 Genomik DNA izolasyonu ve spektrofotometrik analiz

Genomik DNA eldesi her hasta için 200 µl periferik kan kullanılarak Qiacube® otomatize DNA izolasyon cihazı (Qiagen, Hilden, Almanya) ve QIAamp® DNA Blood Mini kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) spin kolon DNA izolasyon tekniği ile üreticinin aşağıda belirtilen protokollerine uyularak yapılmıştır.

1. 200 µl periferik kan, 20 µl proteinaz K ve 200 µl ligasyon buffer solüsyon 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne eklendi ve 56 °C’de 10 dakika lizis için inkübasyonda bırakıldı
2. Numuneye 200 µl etanol (%96–100) eklendi ve 15 sn vortekslendi.
3. Elde edilen numune spin kolona aktarılır. Spin kolon temiz 2 ml toplama tüpüne konulur.
4. 1 dakika boyunca 6000 x g’de (8000 rpm) santrifüj edildi ve filtrat atıldı.
5. 500 µl ‘Wash buffer 1’ eklendi. Spin kolon yeni bir temiz 2 ml toplama tüpüne konuldu.
6. 1 dakika boyunca 6000 x g’de (8000 rpm) santrifüj edildi ve filtrat atıldı.
7. 500 µl ‘Wash buffer 2’ eklendi. Spin kolon yeni bir temiz 2 ml toplama tüpüne konuldu.
8. 20000 x g’de (14000 rpm) 3 dk santrifüj edildi ve filtrat atıldı.
9. Spin kolon temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 200 µl buffer AE veya distile su eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında beklenildi.
10. 6000xg’de (8000 rpm) 1 dk santrifüj edildi. Spin kolonların atıldı.
11. Elde edilen DNA’lar saflıkları ve konsantrasyonları belirlendi.

DNA ve RNA gibi nükleik asitler 260 nm’de, proteinler de 280 nm’de maksimum absorbans gösterirler. Bu oranın 1,8-2,0 aralığında bulunmasının DNA’nın analiz için

uygun saflıkta olduğu kabul edilmektedir. DNA konsantrasyonu ise en az 40 ng/μl olmalıdır. Konsantrasyon ve saflık ölçümü (A260/A280) için NanoDrop 2000 cihazı (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ile yapıldı.

3.7. Y kromozomu mikrolelesyon analizi

1. Çalışma için 10-50 ng/μl DNA kullanılmıştır.
2. Y kromozomu AZFa, AZFb ve AZFc bölgeleri uygun primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltılmıştır.
3. Bu markerlardan 6'si AZFa, AZFb ve AZFc'de görülen en yaygın delesyon bölgelerinin belirlenmesi için dizayn edilmiş ve erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu bilinen önceden haritalanmış dizi etiketli bölge STS (*sequence-tagged site*) bölgelerini içermektedir. Bu markerların 6'sı: sY84 (AZFa), sY86 (AZFa), sY127 (AZFb), sY134 (AZFb) ve sY254(AZFc/DAZ) ve sY255 (AZFc/DAZ)'dır. Ayrıca internal kontrol olarak ZFX/ZFY ve sY14 (SRY) kullanıldı.
4. PCR' da sıcaklık koşulları; 95 °C' de 5 dk denatürasyon, 35 döngü olarak 95 °C' de 1 dk denatürasyon, 58 °C' de 1 dk hibridizasyon , 72 °C' de uzama ve 72 °C' de 7 dk son uzama olarak gerçekleştirilmiştir.
5. PCR sonrası PCR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenerek agaroz jel elektroforezinde değerlendirilmiştir.

3.8. Array

SNP-Array tekniği kullanılarak moleküler karyotipleme yapıldı. Hastadan elde edilen genomik DNA örnekleri ThermoFisher Scientific firmasına ait "CytoScan™ HT-CMA Assay" kiti ve "GeneTitan™ MC Fast Scan" cihazında kullanılmıştır.

Islak laboratuvar işlemlerinden sonra cihaza yüklendikten sonra elde edilen veriler "RHAS", "MSV" ve "CHAS" programları ile işlendi ve analiz edildi. Bu teste ait bazı teknik değerler şu şekildeydi: prob sayısı: 1.162.042, proplar arası ORTANCA

mesafe: genler arasında 4,1 kb, gen içerisinde 0,95 kb'di. Analizler BAF ve LRR tablosu üzerinden yapıldı.

BAF (B Allel Frekansı): İlgili SNP için B alleli sinyalinin toplam sinyal miktarına oranını gösterir. 0'a ve 1'e yakın değerler homozigotluğu, 0.5'e yakın değerler heterozigotluğu ifade eder.

LRR (Log R Ratio): Belirtilen SNP için ortalama sinyal miktarının logaritmik ifadesidir. Kopya sayısı hakkında bilgi verir. 0'a yakın değerler 2 kopya sayısını, pozitif değerler artmış, negatif değerler ise azalmış kopya sayısını işaret eder. Sonuç olarak kopya sayısı değişiklikleri, mozaizm, uniparental dizomi ve homozigot alanlar (Region of Homozygosity, ROH) tespit edildi.

15 ve daha az sayıda prob ile temsil edilen kopya sayısı değişiklikleri; 150 kb uzunluğun altında olan kopya sayısı azalmaları; 200 kb uzunluğun altında olan kopya sayısı artışları; hastanın kliniği ile ilişkili olmadığı düşünülen heterozigotluk kaybı (Region of Homozygosity) bölgeleri kapsam dışında bırakılmıştır.

Tespit edilen varyantların değerlendirilmesinde; Decipher (<https://www.deciphergenomics.org/>), ClinGen (<https://clinicalgenome.org/>), Database of Genome Variants (DGV, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), dbVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/>), Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), OMIM (<https://www.omim.org/>) veri tabanları ve laboratuvar iç verileri kullanıldı. Veriler insan referans genom 38'e göre işlendi ve raporlandı. Varyantların isimlendirmesi ISCN 2020 (<https://iscn.karger.com/>) standartlarına göre yapılmıştır. Bu test ile tespit edilen varyantların değerlendirilmesi ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) derneğinin bu konu üzerine yayınladığı standartlara göre yapılmıştır (51).

3.9. Tüm ekzom dizileme (TED)

TED için QIAseq® Human Exome Kit (QIAGEN®, Almanya) kullanılarak insan genomunun 37Mb büyüklüğündeki ekzonik bölgeleri hedef alınmıştır. Hedef bölgelerin ~%99'unda en az 20x ve üzeri kapsama derinliği hedeflenmiştir. Islak laboratuvarı takiben dizileme işlemi Novaseq 6000 (Illumina®, San Diego, CA) cihazı

ile yapılmıştır. Ardından biyoinformatik süreçler (bcl'den fastq dönüşümü, kalite değerlendirmeleri, referans genoma haritalama, düşük kalitedeki okuma ve varyantların filtrelenmesi ve vcf dosyası oluşturma) Qiagen CLC Genomics Workbench 12.0.3 (QIAGEN®, Almanya) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Varyantların değerlendirilmesinde Qiagen Clinical Insight, QCI (QIAGEN®, Almanya) yazılımı kullanılmıştır.

3.9.1. TED ıslak laboratuvar aşamaları

3.9.1.1. Genomik DNA etiketlenmesi

1. 96 well Midi Plate'in her kuyusuna 10 µl (5ng/µl) toplamda 50ng DNA eklendi.
2. 2 ml'lik PCR tüplerine sırasıyla;
 - a. TD (Tagment DNA) Buffer (25 µl),
 - b. 15 µl Tagment DNA Enzyme (TDE1)
3. Microseal 'B' adhesive seal ile plate kapatılıp microplate shaker da 1800 rpm'de 1 dk sallandı ve 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
4. Önceden ısıtılmış microheating sisteme 96 well plate yerleştirilip kapağı kapatıldı ve 58 °C'de 10 dk inkübe edilip ve plate sistemden alındı.
5. Her kuyucuğa 15 µl Stop Tagment Buffer (ST) eklendi.
6. Microseal 'B' adhesive seal ile plate kapatıldı ve microplate shakerda 1800 rpm'de 1 dk sallanıp 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
7. 4 dk oda sıcaklığında plate inkübe edildi.

3.9.1.2. Etiketlenmiş DNA temizlenmesi

1. 96 well plateden bir önceki aşamada yapıştırdığımız seal çıkarıldı.
2. Sample Purification Beadleri (SPB) vorteksledikten sonra her kuyuya 65µl eklenildi.
3. Microseal 'B' adhesive seal ile plate kapatıldı ve microplate shakerda 1800 rpm'de 1 dk sallandı. 8 dk oda sıcaklığında plate inkübe edildi ve 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
4. Manyetik standda platei yerleştirildi. 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.

5. Pipetinizi 130 μ l'ye ayarlayarak platein her kuyusundan üst fazı atın.
6. Her kuyuya yavaş yavaş 200 μ l Ethanol (%80) ekleyin ve 30 sn bekleyin. Ethanol ile yıkama aşamalarında plate manyetik stand üzerinde tutuldu.
7. Kuyulardaki ethanolü kuyudan atıldı.
8. Tekrar yavaş yavaş 200 μ l ethanol eklenilip 30 sn beklendikten sonra atıldı.
9. Kalan Ethanol 20 μ l'lik pipet ile her kuyudan alındı ve atıldı.
10. Plate manyetik stand üzerinde iken 10 dk kurutuldu.
11. Manyetik stand üzerinden plate'i alındı ve pipet uçları ile boncuklara dokunmadan platein her kuyusuna 22.5 μ l Resuspension Buffer (RSB) eklenildi.
12. Microseal 'B' adhesive seal ile plate kapatıldı ve microplate shakerda 1800 rpm'de 1 dk sallanılıp 2 dk oda sıcaklığında plate inkübe edildikten sonra 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
13. Manyetik standda platei yerleştirilip 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.
14. Midi plateden HSP plateine (0.2 ml'lik 96 well PCR plate) 20 μ l berrak süpernatant kısmını boncuklara dokunmadan iki seferde transfer edildi.

3.9.1.3. İlk PCR amplifikasyonu

1. Her kuyucuğa index 1 primerinden 5 μ l eklenildi.
2. Her kuyucuğa index 2 primerinden 5 μ l eklenildi.
3. Nextera Library Amplification Mix (NLM) den 20 μ l her kuyuya eklenildi.
4. Microseal 'A' adhesive seals ile kapatıldı.
5. Microplate shakerda 1200 rpm'de 1 dk karıştırıldı.
6. 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
7. Plate PCR cihazına yerleştirilip NLM AMP programını çalıştırıldı.

3.9.1.4. İlk PCR temizliği

1. PCR cihazındaki platei 280 x g'de 1 dk santrifüj edin ve seali çıkartıldı.
2. Platein her kuyusundan 50 μ l berrak süpernatant yeni midi plate aktarıldı.
3. Sample Purification Beads (SPB) iyice dağılana kadar vortekslenildi. Daha

- sonra her kuyuya 90 µl SPB eklenildi.
4. Microseal 'B' adhesive seal ile kapatılıp microplate shakerda 1800 rpm'de 1 dk karıştırıldı. Plate 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi ve seal çıkartıldı.
 5. Plate manyetik standa alarak 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.
 6. Dikkatlice platein üzerinden üst fazı atıldı.
 7. Her kuyuya yavaş yavaş 200 µl Ethanol (%80) eklenilip 30 sn beklenildi. Ethanol ile yıkama aşamalarında plate manyetik stand üzerinde tutuldu.
 8. Kuyulardaki ethanolü kuyudan atıldı.
 9. Tekrar yavaş yavaş 200 µl ethanol eklenilip 30 sn beklendi ve atıldı.
 10. Kalan Ethanol 20 µl'lik pipet ile her kuyudan alındı.
 11. Plate manyetik stand üzerinde iken 10 dk kurutuldu.
 12. Manyetik stand üzerinden plate'i alındı ve pipet ucu ile beadlere dokunmadan her kuyuya 27,5 µl Resuspension Buffer (RSB) eklenildi
 13. Microseal 'B' adhesive seals ile kapatılıp microplate shakerda 1800 rpm'de 1 dk karıştırıldı. Ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilip 280 x g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra seal çıkarıldı.
 14. Plate manyetik standa alarak 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.
 15. Midi plateden HSP plateine (0.2 ml'lik 96 well PCR plate) 25 µl berrak süpernatant kısmını boncuklara dokunmadan transfer edildi.
 16. Qubit ile DNA konsantrasyonu ölçüldü.

3.9.1.5. İlk hibridizasyon

1. Her kuyucuğa 40 µl kütüphane eklenilip üzerine 50 µl Enrichment Hybridization Buffer eklenildi.
2. Üzerine 10 µl Trusight Content Set CSO eklenilip toplamda her kuyuda 100 µl olacak şekilde hazırlandı.
3. Microseal 'B' adhesive seal ile iyice kapatıldı.
4. Microplate shakerda 1200 rpm'de 1 dk karıştırılıp 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

5. Önceden programlamasını yapılan NRC HYB programını PCR’da çalıştırıldı.
6. PCR, 58 °C’de hibridizasyon için bu dereceye ulaştıktan sonra; en az 90 dk en fazla 24 saat bekletildi.

3.9.1.6. İlk yakalama (*capture*)

1. PCR cihazından plate alındı ve 280 x g’de 1 dk santrifüj edilip seal çıkarıldı.
 2. PCR plateinden tüm içeriği (100 µl) yeni Midi platee aktarıldı.
 3. Pipetaj ile Streptavidin Magnetic Beads (SMB) iyice karıştırıldı ve her kuyuya 250 µl eklenildi.
 4. Microseal ‘B’ adhesive seal ile kapatılarak 1200 rpm’de 5 dk mikroplate shakerda bekletildi ve 280 x g’de 1 dk santrifüj edildi.
 5. Manyetik standda plate i yerleştirildi, 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.
 6. Her kuyunun üst fazından boncukları bozmadan süpernatantı atıldı ve plate manyetik stand üzerinden kaldırıldı.
 7. Enrichment Wash Solution (EWS) 200 µl her kuyuya eklenildi.
 8. Microseal ‘B’ adhesive seal ile kapatıldı ve 1800 rpm’de 4 dk mikroplate shakerda bekletildi.
 9. Önceden ısıtılan microheating sistemde 30 dk 50 °C’de inkübe edildi.
 10. Manyetik standda yerleştirildi, 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.
 11. Plateden seal çıkarıldı ve üst fazları atıldı. Plate manyetik stand üzerinden alındı.
 12. Yıkama işlemini ikinci kez tekrarlandı (basamak 7-11 tekrar)
 13. 0,2 µl’lik PCR tüpüne aşağıdaki hacimleri örnek sayısı ile çarparak eklenildi
- | | |
|-----------------------------|--------|
| Enrichment Elution Buffer 1 | 28.5ul |
| 2N NaOH | 1.5ul |
| TOPLAMHACİM | 30 ul |
14. Karışımı vortekslendi, her kuyuya 23,5 µl eklendi.
 15. Microseal ‘B’ adhesive seal ile kapatıldı ve 1800 rpm’de 2 dk mikroplate shakerda bekletildi ve 280 x g’de 1 dk santrifüj edildi.
 16. Plateden seal çıkarıldı ve manyetik standda yerleştirildi. 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.

17. Boncuklara dokunmadan 21 µl süpernatantı PCR plateine iki seferde transfer edildi.
18. Elute Target Buffer 2 (ET2) den platein her kuyusuna 4 µl eklenildi.
19. Microseal 'B' adhesive seal ile kapatıldı ve 1200 rpm'de 1 dk mikroplate shakerda bekletildi ve 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

3.9.1.7. İkinci hibridizasyon

1. EHB buffer Kristal kalmayana kadar vortexlenildi ve plateden sealı çıkarıldı.
2. Her kuyuya 15 µl Resuspension Buffer eklenildi.
3. Her kuyuya 50 µl Enrichment Hybridization Buffer eklenildi.
4. Her kuyuya 10 µl TruSight Content Set CSO eklenildi.
5. Microseal 'B' adhesive seal ile iyice kapatıldı ve mikroplate shakerda 1200 rpm'de 1 dk karıştırılıp 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
6. Önceden programlamasını yapılan NRC HYB programını PCR'da çalıştırıldı.

3.9.1.8. İkinci yakalama (*capture*)

1. PCR cihazından plate alındı ve 280 x g'de 1 dk santrifüj edilip seal çıkarıldı.
2. PCR plateinden tüm içeriği (100 µl) yeni Midi plate'e aktarıldı.
3. Pipetaj ile Streptavidin Magnetic Beads (SMB) iyice karıştırıldı ve her kuyuya 250 µl eklenildi.
4. Microseal 'B' adhesive seal ile kapatılarak 1200 rpm'de 5 dk mikroplate shakerda bekletildi ve 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
5. Manyetik standa plate i yerleştirildi, 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.
6. Her kuyunun üst fazından boncukları bozmadan süpernatantı atıldı ve plate manyetik stand üzerinden kaldırıldı.
7. Enrichment Wash Solution (EWS) 200 µl her kuyuya eklenildi.
8. Microseal 'B' adhesive seal ile kapatıldı ve 1800 rpm'de 4 dk mikroplate shakerda bekletildi.
9. Önceden ısıtılan microheating sistemde 30 dk 50 °C'de inkübe edildi.
10. Manyetik standa yerleştirildi, 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.

11. Plateden seal çıkarıldı ve üst fazları atıldı. Plate manyetik stand üzerinden alındı.

12. Yıkama işlemi ikinci kez tekrarlandı (basamak 7-11 tekrar)

13. 1.7 ml'lik santrifüj tüpüne aşağıdaki hacimleri örnek sayısı ile çarparak eklenildi.

Enrichment Elution Buffer 1	28.5ul
2N NaOH	1.5ul
TOPLAMHACİM	30 ul

14. Karışım vortekslenip her kuyuya 23,5 µl eklenildi.

15. Microseal 'B' adhesive seal ile kapatılıp 1800 rpm'de 2 dk mikroplate shakerda bekletilip 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

16. Plate'den seal çıkarıldı ve manyetik standda yerleştirilip 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.

17. Boncuklara dokunmadan 21 µl süpernatant iki seferde PCR plate ine alındı

18. Elute Target Buffer 2'den platein her kuyusuna 4 µl eklenildi.

19. Microseal 'B' adhesive seal ile kapatılıp 1800 rpm'de 1 dk mikroplate shakerda bekletilip 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

3.9.1.9. Capture örneği temizliği

1. Seal çıkartılıp SPB iyice dağılana kadar vortekslenildi. Daha sonra her kuyuya 45 µl SPB eklenildi.
2. Microseal 'B' adhesive seal ile kapatılıp mikroplate shaker'da 1800 rpm'de 1 dk karıştırılıp 280 x g'de 1 dk santrifüj edilip seal çıkartıldı.
3. Plate manyetik standda alınarak 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.
4. Dikkatlice plate üzerinden üst fazı atıldı.
5. Her kuyuya yavaş yavaş 200 µl Ethanol(%80) eklenildi ve 30 sn beklenildi. Ethanol ile yıkama aşamalarında plate manyetik stand üzerinde tutuldu.
6. Kuyulardaki etanolü kuyudan atıldı ve tekrar yavaş yavaş 200 µl etanol eklenilip 30 sn beklenip atıldı.
7. Kalan Ethanolü 20 µl'lik pipet ile her kuyudan alındı.
8. Plate manyetik stand üzerinde iken 10 dk kurutuldu ve manyetik stand üzerinden plate alındı.

9. Pipet ucu ile beadlelere dokunmadan her kuyuya 27,5 µl Resuspension Buffer (RSB) eklenildi.
10. Microseal 'B' adhesive seals ile kapatılıp microplate shakerda 1800 rpm'de 1 dk karıştırılıp 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
11. Platei manyetik standa alarak 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.
12. Midi plateden HSP plateine (0.2 ml'lik 96 well PCR plate) 25 µl berrak süpernatant kısmı boncuklara dokunmadan (12.5 µl, 12.5 µl) iki seferde transfer edildi.

3.9.1.10. İkinci PCR amplifikasyonu

1. PCR Primer Cocktail (PPC) her kuyuya 5 µl eklenildi.
2. Nextera Enrichment Amplification Mix (NEM) her kuyuya 20 µl eklenildi.
3. Microseal 'A' adhesive seals ile kapatıldı.
4. Microplate shakerda 1200 rpm'de 1 dk karıştırılıp 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
5. Plate PCR cihazına yerleştirilip NLM AMP programını çalıştırıldı.

3.9.1.11. İkinci PCR temizliği

1. PCR cihazındaki platei 280 x g'de 1 dk santrifüj edilip seal çıkartıldı.
2. Sample Purification Beads (SPB) iyice dağılana kadar vortekslenildi ve 50 µl örnek olan her kuyuya 90 µl SPB eklenildi.
3. Microseal 'B' adhesive seal ile kapatıldı ve microplate shakerda 1800 rpm'de 1 dk karıştırıldı. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilip 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi ve seal çıkartıldı.
4. Plate manyetik standa alarak 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildikten sonra üzerinden üst fazı atıldı.
5. Her kuyuya yavaş yavaş 200 µl Ethanol (%80) eklenilip 30 sn beklenildi. Ethanol ile yıkama aşamalarında plate manyetik stand üzerinde tutuldu.
6. Kuyulardaki etanolü kuyudan atıldı ve tekrar yavaş yavaş 200 µl etanol

- eklenip 30 sn beklenildi ve atıldı.
7. Kalan Ethanol 20 µl'lik pipet ile her kuyudan alındı.
 8. Plate manyetik stand üzerinde iken 10 dk kurutuldu ve manyetik stand üzerinden alındı.
 9. Pipet ucu ile beadlere dokunmadan her kuyuya 32.5 µl Resuspension Buffer (RSB) eklenilip microseal 'B' adhesive seals ile kapatıldı.
 10. Microplate shakerda 1800 rpm'de 1 dk karıştırılıp 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilip 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi ve sealı çıkarıldı.
 11. Plate manyetik standı alınıp 2 dk veya sıvı berrak görünene kadar beklenildi.
 12. Midi plate'den HSP plateine (0.2 ml'lik 96 well PCR plate) 30 µl berrak süpernatant kısmını boncuklara dokunmadan (15 µl, 15 µl) iki seferde transfer edildi.

3.9.1.12. Kütüphane validasyonu

1. Florometrik bir yöntem kullanarak kütüphaneleri ölçmek için aşağıdaki prosedür kullanıldı.
2. Formülde çıkan değere göre EB buffer ile konsantrasyon 4nM'e indirildi.

$$\frac{(\text{concentration in ng/}\mu\text{l}) \times 10^6}{\text{nM } 660\text{g/mol} \times \text{average library size}} = \text{concentration in nM}$$

Örneğin:

$$\frac{(15 \text{ ng/}\mu\text{l}) \times 10^6}{(660 \text{ g/mol} \times 400)} = 57 \text{ nM}$$

3. 4nM kütüphane konsantrasyonunu 20pM'e indirmek için, 4 nM sample DNA (5 µl) ve 0.2 N NaOH (5 µl) eklenildi.
4. 280 x g'de 1 dk santrifüj edilip 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

5. 10 µl denature DNA üzerine 5 µl 200mM Tris HCL PH7 eklenildi ve 985 µl HT1 eklenilerek 20 pM DNA elde edildi.
6. Bu konsantrasyonu 1,5 pM yapmak için 97 µl 20 pM Library üzerine 1203 µl HT1 eklenildi.
7. Toplam hacim 1,3 ml olarak Novaseq 6000 (Illumina®, San Diego, CA) kartuşa yükleme yapıldı.

3.9.2. TED biyoinformatik analizi

1. Okuma kalitesini değerlendirmek için FastQC yazılımı (versiyon 1.0.0) kullanıldı.
2. Ham verilerin kalitesini değerlendirmek için kalite skoru, GC içeriği, düşük kaliteli bazlar ve adaptör kontaminasyonları analiz edilir. Düşük kaliteli bazlar, adaptörler ve istenmeyen diziler Trimmomatic (sürüm 0.38) kullanılarak kaldırıldı.
3. FASTQ dosyaları, BWA (sürüm 0.7.17) kullanılarak referans genom (hg19/GRCh37) ile hizalandı ve BAM/SAM formatında dosyalar elde edildi.
4. SAMtools (versiyon 1.3) aracılığıyla PCR fazlalıkları giderildi ve BAM dosyalarına dönüştürüldü.
5. GATK UnifiedGenotyper (sürüm 4.1.9.0) kullanılarak tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) ve InDel varyantları oluşturuldu ve Variant Call Format (VCF) dosyaları üretildi.
6. IGV (Integrative Genomics Viewer) (version 2.16.2) hizalanmış dizileri ve tespit edilen varyantları görselleştirmek için kullanıldı.

3.9.2.1. Varyant Anotasyonu

Anotasyon, genomik varyasyonların anlamlandırılması sürecidir. ANNOVAR, SnpEff, VEP (Variant Effect Predictor) gibi araçlar VCF dosyasındaki varyantları anlamlandırmak için gerekli filtrelerden geçirir:

1. Etkilenmiş gen ve transkriptlerin listesi oluşturulur
2. Varyantın bulunduğu bölge belirlenir (ekzonik, intronik, non-coding RNA gibi)
3. Varyantların gen ve protein fonksiyonuna muhtemel etkileri belirlenir (missense, nonsense, splice site ve PolyPhen-2, SIFT, MutationTaster gibi)
4. Varyantın GnomAD gibi popülasyon veri tabanlarındaki varlığı ve sıklığını değerlendirir
5. Varyantların daha önce OMIM, Clinvar, HGMD gibi veri tabanlarında herhangi bir fenotiple ilişkilendirilip ilişkilendirilmediği değerlendirilir

3.9.3. TED verilerinin analizi

3.9.3.1. Varyant Analizi

Çalışma sonucunda elde edilen veriler QIAGEN Clinical Insight (QCI) Interpret programı ile analiz edilmiştir. Varyantların klinikle ilişki değerlendirilme analizinden önce aşağıdaki şekilde filtrelenmiştir:

1. Tüm protein kodlayan genlerdeki sinonim olmayan (nonsynonymous), missense, nonsense, frameshift, splice-site, no-stop, no-start, inDels ve in-frame varyantlar,
2. Konsensüs splice bölgeyi etkileyen ve kriptik splice bölge oluşturan sinonim veya intronik varyantlar,
3. 1000 Genom (1000G), Genom Aggregation Database (gnomAD) popülasyon çalışmalarında minör alel frekansı $\leq 1.0\%$ olan varyantlar
4. Varyant frekansı %20-100 olan varyantlar
5. Varyantın okuma sayısı minimum 50 olanlar

Yeni varyantların patojenitesini değerlendirmek için;

6. In silico tahmin araçları (SIFT, PROVEAN, GERP, CADD, PolyPhen2 ve MutationTaster),
7. Segregasyon analizi
8. Popülasyon çalışmalarındaki alel sıklığı (1000 Genomes, Genome Aggregation Database ve Exome Aggregation Consortium)
9. *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) kriterleri ve Franklin (<https://franklin2.genoox.com/clinical-db/home>) biyoinformatik analiz aracı kullanılmıştır.

3.9.3.2. Tespit Edilen Varyantların Patojenite Değerlendirmesi

Varyant patojenitesi sınıflaması için ACMG kriterleri esas alındı (52). ACMG'ye göre varyant etkilerinin belirlenmesinde kullanılan değerlendirme kriterleri tabloları tablo7-8-9'da belirtilmiştir.

Tablo7. Dizi varyantlarını sınıflandırmak için kriterleri birleştirme kuralları

Patojenik	1. Çok güçlü (PVS1) ve a. ≥ 1 güçlü (PS1-PS4) veya b. ≥ 2 orta (PM1-PM6) veya c. 1 orta (PM1-PM6) ve 1 destekleyici (PP1-PP5) veya d. ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) 2. ≥ 2 güçlü (PS1-PS4) veya 3. 1 güçlü (PS1-PS4) ve a. ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya b. 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya
------------------	--

	c. 1 orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-PP5)
Muhtemel patojenik	i. 1 çok güçlü (PVS1) ve 1 orta (PM1-PM6) veya ii. 1 güçlü (PS1-PS4) ve 1-2 orta (PM1-PM6) veya 3. 1 güçlü (PS1-PS4) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya iii. ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya iv. 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) v. 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya vi. 1 orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-PP5)
Önemi belirsiz	1. Yukarıdaki diğer kriterler karşılanmıyor VEYA 2. Benign ve patojenik kriterleri çelişkilidir
Muhtemel benign	1. 1 güçlü (BS1-BS4) ve 1 destekleyici (BP1-BP7) veya 2. ≥ 2 destekleyici (BP1-BP7)
Benign	1. 1 bağımsız (BA1) veya 2. ≥ 2 güçlü (BS1-BS4)

Tablo8. Patojenik varyantların sınıflandırılmasına yönelik kriterler

Patojenite kanıtı	Kategori
Çok güçlü	PVS1 Fonksiyon kaybının (LOF) hastalık mekanizmasında yer aldığı bilinen genlerde null varyant varlığı

	(nonsense, frameshift, canonical ± 1 veya 2 splice sites, başlangıç kodonu, tek veya çoklu ekzonik delesyon)
Güçlü	PS1 Nükleotid değişiminden bağımsız olarak daha önce bildirilmiş bir patojenik varyant ile aynı aminoasit değişimi PS2 Hastalığı olan ve aile öyküsü olmayan bir hastada <i>de novo</i> (hem annenin hem de babanın doğrulandığı durumda) PS3 Gen veya gen ürünü üzerinde zarar verici etkiyi destekleyen iyi tanımlanmış in vitro veya in vivo fonksiyonel çalışmalar PS4 Etkilenmiş bireylerdeki varyant prevalansının kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olması
Orta	PM1 Mutasyonel <i>hotspot</i> noktada ve/veya kritik ve iyi bilinen fonksiyonel domaindedir ve benign varyasyon değildir PM2 1000 Genom Projesi, Ekzom Toplama Konsorsiyumu, Ekzom Dizileme Projesi gibi büyük çalışmalarda kontrol gruplarında bulunmaması PM3 Resesif hastalıklarda patojenik bir varyantla trans allelde gösterilmesi PM4 Tekrarlamayan bölgelerdeki in-frame delesyon/insersiyon ya da stop-loss kaybı varyantları sonucu proteininin uzunluğunda değişiklikleri

	PM5 Daha önce patojenik olduğu belirlenen farklı bir missense değişimin görüldüğü bir amino asit rezidüsünde novel missense değişim PM6 Anne ve babanın doğrulanmadığı ancak <i>de novo</i> olduğu varsayılan değişim
Destekleyici	PP1 Hastalığa neden olduğu kesin bilinen bir gende birden fazla etkilenen aile üyesinde varyasyonun kosegrege olması PP2 Benign missense varyasyonların düşük sıklıkta görüldüğü ve hastalık etiolojisinde missense varyantların sık yer aldığı genlerdeki missense varyantlar PP3 Gen ya da gen ürününde zararlı etkiye yol açabileceği (korunmuşluk, evrimsel, kırılma etkisi vb.) çeşitli işlemsel hesaplamalar ile desteklenen varyantlar PP4 Hastanın fenotipi veya aile öyküsü, tek bir genetik etiyojolojiye sahip bir hastalık için oldukça spesifik olduğu durum PP5 Güvenilir bir kaynak tarafından yakın zamanda varyant patojenik olarak bildirildi ancak laboratuvarın bağımsız bir değerlendirme yapması için kanıt mevcut değil

Tablo9. Benign varyantları sınıflandırma kriterleri

Benign etki kanıtı	Kategori
Bağımsız	BA1 1000 Genom Projesi, Ekzom Toplama Konsorsiyumu, Ekzom Dizileme Projesi gibi büyük çalışmalarda allel frekansının >%5 olması
Güçlü	BS1 Allel frekansının hastalık için beklenenden fazla olması BS2 Sağlıklı bir yetişkin bireyde, erken yaşta tam penetrans beklenen (resesifler için homozigot, dominant için heterozigot ve X'e bağı kalıtım için hemizigot) gözlenen değişimler BS3 İyi bilinen in vitro veya in vivo fonksiyonel çalışmalarda protein fonksiyonuna veya splicingine herhangi bir zararlı etkinin bulunmadığının gösterilmesi BS4 Değişimin ailedeki etkilenmiş bireylerde segrege olmaması
Destekleyici	BP1 Hastalık mekanizmasında öncelikle truncated varyantların yer aldığı bilinen genlerdeki missense varyantlar BP2 Tam penetrans gösteren dominant bir gen/hastalıkta, patojenik bir varyant ile trans konumda bulunması veya herhangi bir kalıtım paterninde patojenik bir varyant ile cis konumda olduğunun gösterilmesi

	BP3 Fonksiyonu bilinmeyen tekrar bölgelerinde yer alan in-frame delesyon/insersiyonları BP4 Gen veya gen ürününde herhangi bir etkiye yol açmadığı (korunmuşluk, evrimsel, kırılma etkisi vb.) çeşitli işlemsel hesaplamalar ile desteklenmiş olan varyantlar BP5 Hastalığın alternatif moleküler temeli olan bir vakada varyant bulundu BP6 Güvenilir bir kaynak tarafından yakın zamanda varyant benign olarak bildirildi ancak laboratuvarın bağımsız bir değerlendirme yapması için kanıt mevcut değil BP7 Splicing tahmin algoritmalarının splice konsensüs dizisine veya yeni bir splice bölgesinin oluşturulmasına herhangi bir etki öngörmediği ve nükleotidin yüksek oranda korunmadığı sinonim bir varyant
--	--

3.9.3.3. TED verilerinin klinikle analizi

TED yapılan indeks olgular:

1. Her hastada yukarıda verilen filtrelemeler uygulandığında yaklaşık 1000-1200 nadir varyant tespit edildi.
2. Bu nadir varyantlar öncelikle tablo10'da belirtilen 176 genlik filtre ile filtrelendi.
3. Tablo 10'daki 176 genlik liste oluşturulurken Muranishi ve arkadaşlarının (46) çalışmasında güncel literatür verisine göre bildirilmiş 162 farklı NOA ilgili gen ve OMIM veri tabanındaki "*spermatogenic failure*" fenotipindeki genler incelenmiş ve azospermi bulgusu olan genler (tablo 11) seçilerek yeni bir filtre oluşturulmuştur.
4. OMIM veri tabanında "*spermatogenic failure*" fenotipiyle 103 gen ilişkilendirilmiştir (tablo 6). Bu 103 genin 45'i OMIM veya HPO veri tabanında azospermi bulgusu bildirilen genlerdi (tablo 11).
5. NOA ilişkili genlerde muhtemel patojenik (MP)/ patojenik (P) varyant saptananlar not edildi. NOA ile ilişkili Klinik önemi bilinmeyen değişiklik (Variant of uncertain significance (VUS) heterozigot/homozigot/hemizigot/birleşik heterozigot varyantlar kalıtım şekilleri de göz önünde bulundurularak ayrıca not edildi.
6. Filtreleme dışında kalan varyantlar spermatogenezle ilişkili genler açısından değerlendirildi. Spermatogenezle ilgili genlerin taraması için Genecards (www.genecards.org) biyoinformatik veri tabanı kullanıldı.
7. ACMG'ye göre VUS, MP, P olarak sınıflanan nadir spermatogenez ile ilişkili genlerdeki varyantlar tespit edildi. Bu varyantlar heterozigot/homozigot/hemizigot/birleşik heterozigot olmalarına göre kalıtım şekilleri de göz önünde bulundurularak sınıflandırıldı.
8. Spermatogenezle ilgili varyantlar araştırılırken en az bi kere Clinvar veri tabanında Muhtemel benign (MB) ve/veya Benign (B) olarak sınıflandırılmış varyantlar dışlandı.
9. Novel varyasyonların klinikle ilgi olasılığı ve patojenite değerlendirilirken aşağıda belirtilen ölçütler kullanıldı:
 - a. Popülasyon (GnomAD v2.1.0 ve v.4.1.0) ve inhouse* veri tabanı sıklığı

- b. Varyant tipi
- c. ACMG kriterlerine patojenite sınıflaması
- d. Ailedeki segregasyon durumu
- e. Pubmed ve/veya Genecards ve/veya OMIM veri tabanında NOA veya spermatogenezle ilişkili veri olup olmaması
- f. In silico tahmin araçları (SIFT, PolyPhen-2, Mutation Taster, CADD, FATHMM vs.)

(*In-house veri içeriği aynı platform ve tanı kitleri ile çalışılmış olan farklı endikasyonlarla TED testi yapılmış kendi merkezimize ait 2800 farklı hastanın verisini içermektedir)



Tablo 10. 176 genlik NOA ilgili genler listesi

<i>ADAD2</i>	<i>C14ORF39</i>	<i>DMC1</i>	<i>DMRT1</i>	<i>FANCM</i>	<i>FKBP6</i>	<i>HFM1</i>	<i>KASH5</i>	<i>MIAP</i>
<i>MEI1</i>	<i>MEIOB</i>	<i>MSH4</i>	<i>NANOS1</i>	<i>NANOS2</i>	<i>PLK4</i>	<i>PSMC3IP</i>	<i>SHOC1</i>	<i>SOHLH1</i>
<i>STAG3</i>	<i>SYCE1</i>	<i>SYCP2</i>	<i>TDRD7</i>	<i>TDRD9</i>	<i>TERB1</i>	<i>TEX11</i>	<i>TEX14</i>	<i>TEX15</i>
<i>USP26</i>	<i>ZFX</i>	<i>BRDT</i>	<i>C11orf80</i>	<i>CDC20</i>	<i>DDX25</i>	<i>DHH</i>	<i>EXO1</i>	<i>GCNA</i>
<i>GTF2H3</i>	<i>HAUS7</i>	<i>HENMT1</i>	<i>HSF2</i>	<i>MAJIN</i>	<i>MCM8</i>	<i>MCM9</i>	<i>MCMDC2</i>	<i>MLH3</i>
<i>MOV10L1</i>	<i>NPAS2</i>	<i>RAD21L</i>	<i>REC8</i>	<i>RNF212</i>	<i>SPINK2</i>	<i>SPO11</i>	<i>STX2</i>	<i>SYCP3</i>
<i>TERB2</i>	<i>TDRKH</i>	<i>WNK3</i>	<i>AHRR</i>	<i>ATM</i>	<i>BAX</i>	<i>CREM</i>	<i>DAZL</i>	<i>DNMT3L</i>
<i>E2F1</i>	<i>ERCC1</i>	<i>HORMAD1</i>	<i>KLHL10</i>	<i>PATZ1</i>	<i>PIN1</i>	<i>PIWIL1</i>	<i>PMS2</i>	<i>PRDM9</i>
<i>PRM1</i>	<i>PRM3</i>	<i>SETX</i>	<i>TAF4B</i>	<i>TDRD1</i>	<i>UBE2B</i>	<i>UBR2</i>	<i>YBX2</i>	<i>ZMYND15</i>
<i>AGPS</i>	<i>BCL2L2</i>	<i>BOLL</i>	<i>BSG</i>	<i>CCDC157</i>	<i>CCDC42</i>	<i>CDK2</i>	<i>CHFR</i>	<i>CKS2</i>
<i>CLCN2</i>	<i>CLDN11</i>	<i>CLPP</i>	<i>DDX4</i>	<i>EHD1</i>	<i>EIF4G3</i>	<i>ENTPD6</i>	<i>EXD1</i>	<i>FHL5</i>
<i>FSHR</i>	<i>GJA1</i>	<i>H2AX</i>	<i>HMGA1</i>	<i>HMGA2</i>	<i>HORMAD2</i>	<i>INSL6</i>	<i>IP6K1</i>	<i>LMTK2</i>
<i>MAD2L2</i>	<i>MEI4</i>	<i>MEIOC</i>	<i>MLH1</i>	<i>MORC1</i>	<i>MYBL1</i>	<i>NANOS3</i>	<i>NLRP3</i>	<i>NUPR1</i>
<i>PANK2</i>	<i>PARP2</i>	<i>PIWIL2</i>	<i>PIWIL4</i>	<i>PLD6</i>	<i>RANBP1</i>	<i>RANBP2</i>	<i>RBM5</i>	<i>RNF17</i>
<i>SBF1</i>	<i>SIAH1</i>	<i>SIX5</i>	<i>SLC4A2</i>	<i>SMC1B</i>	<i>SNRPA1</i>	<i>SOHLH2</i>	<i>SOX30</i>	<i>SPATA48</i>
<i>STRA8</i>	<i>SUN1</i>	<i>SYCE2</i>	<i>SYCP1</i>	<i>TBPL1</i>	<i>TDRD6</i>	<i>TEX19</i>	<i>TOPAZ1</i>	<i>UTP14C</i>
<i>YBX3</i>	<i>ANOS1</i>	<i>AR</i>	<i>CHD7</i>	<i>GNRH1</i>	<i>GNRHR</i>	<i>FANCA</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FSHB</i>
<i>KISS1R</i>	<i>LHB</i>	<i>NR0B1</i>	<i>NR5A1</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>	<i>TACR3</i>	<i>WT1</i>	<i>XRCC2</i>
<i>SPAG17</i>	<i>MSH5</i>	<i>FBXO43</i>	<i>DNHD1</i>	<i>CCDC34</i>	<i>DNAH10</i>	<i>RPL10L</i>	<i>ZSWIM7</i>	<i>CT55</i>
<i>USP9Y</i>	<i>CATIP</i>	<i>PDHA2</i>	<i>PNLDC1</i>	<i>CFAP57</i>				

Tablo11. OMIM veri tabanında spermatogenik yetmezlik fenotiplerinde azospermi bulgusu olan 45 gen listesi

<i>MIAP</i>	<i>MSH4</i>	<i>BRDT</i>	<i>SPAG17</i>	<i>RNF212</i>	<i>SPINK2</i>	<i>MSH5</i>	<i>FKBP6</i>	<i>STAG3</i>
<i>XRCC2</i>	<i>TEX15</i>	<i>FBXO43</i>	<i>SHOC1</i>	<i>NR5A1</i>	<i>SOHLH1</i>	<i>NANOS1</i>	<i>DHND1</i>	<i>CCDC34</i>
<i>SYCP3</i>	<i>DNAH10</i>	<i>FANCM</i>	<i>RPL10L</i>	<i>C14ORF39</i>	<i>TDRD9</i>	<i>MEIOB</i>	<i>TERB1</i>	<i>ZMYND15</i>
<i>ZSWIM7</i>	<i>KLHL10</i>	<i>TAF4B</i>	<i>KASH5</i>	<i>SYCP2</i>	<i>MOV10L1</i>	<i>TEX11</i>	<i>GCNA</i>	<i>CT55</i>
<i>USP9Y</i>	<i>CATIP</i>	<i>PDHA2</i>	<i>PNLDC1</i>	<i>SYCE1</i>	<i>TERB2</i>	<i>TEX14</i>	<i>USP26</i>	<i>CFAP57</i>

176 genlik NOA ilgili genler listesi ile ortak olmayan genler koyu renkli boyanmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada 2022 kasım-2024 haziran tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi Tıbbi Genetik polikliniği'ne azospermi bulgusu nedeniyle başvurmuş 31 yetişkin erkeğin genetik değerlendirilme verileri ele alınmıştır. Hastaların tamamı azospermi bulgusu sebebiyle genetik değerlendirmeye yönlendirilen hastalardı ve tamamına ilk olarak kromozom analizi ve Y kromozomu mikrolelesyon analizi testi yapıldı. Çalışmaya dahil edilen 6 hastada (H1, H2, H20, H28, H31) azospermiyi açıklayacak kromozomal sebepler ve Y kromozomu mikrolelesyonu (H16) tespit edildi ve ileri tetkik planlanmadı. Çalışmaya dahil edilen 25 hastanın kromozom analizi ve Y kromozomu mikrolelesyon analizi testlerinde azospermiyi açıklayacak etiyoloji saptanmadı ve Tüm Ekzom Dizileme (TED) testine alındı.

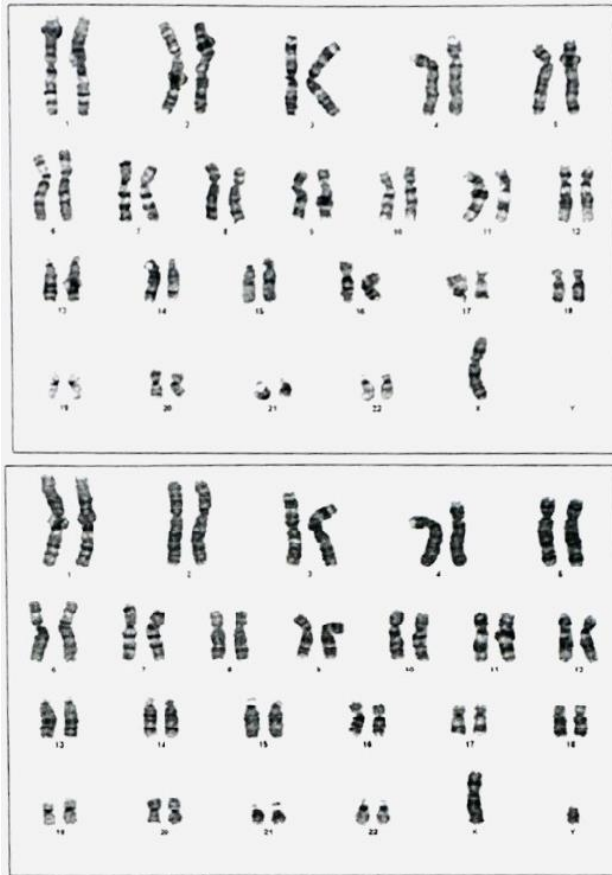
Total olguların genetik değerlendirme için başvuru yaş medianı 31 (22-46) yıldır. 31 olgunun %54,8'inde (17/31) ebeveynler arası akrabalık vardır. Olguların %96,8'sinde (30/31) başvuru şikayeti infertilite, %3,2'sinin (1/31) başvuru sebebi rutin kontroldü (H1). Olguların %3,2'si (1/31) Suriye kökenli, %6,5'ü (2/31) Doğu Anadolu bölgesinden ve %90,3'ü (28/31) Doğu Karadeniz bölgesindendir. Olguların %61,2'sinde (19/31) ailede infertilite öyküsü vardır. İnfertilite için aile öyküsü olan hastaların;

- 5'inde 1. Derece akrabalarda (kardeş) infertilite öyküsü
- 8'inde 2.derece akrabalarda (amca, hala, dayı, teyze) infertilite öyküsü,
- 11'unda 3.derece akrabalarda (1.kuzen) infertilite öyküsü
- 7'sindeyse ailede birden fazla bireyde infertilite öyküsü vardır.

Skrotal ultrasonografi görüntülemesi yapılan hastaların %70,8'inde (17/24) testis volümleri azalmış (<15 ml veya uzun aks <4,6 cm), %29,2'sindeyse (7/24) testis volümleri normal (≥15 ml veya uzun aks ≥4,6 cm) olarak raporlanmıştır. Olguların FSH median değeri 17,6 (2,1-66,9) IU/L'dir. Olguların total testosteron median değeri 327 (31-1008) ng/dl'dir. Olguların semen analizi median volümü 4,5 (1-8) ml'dir. H1'de inmemiş testis öyküsü, H30'deyse hipospadias cerrahisi öyküsü vardır. Olgular ait klinik verilerin detayları tablo13'de belirtilmiştir.

23 olguda FSH $\geq 7,6$ IU/L olarak, 8 olgudaysa (H9, H10, H12, H17, H21, H23, H28, H29) FSH $< 7,6$ IU/L olarak saptandı. FSH'ı artmış olan 15 olgunun testis volümleri azalmıştı, 5 olgununsa testis volümleri normaldi. H9, H17, H21, H23, H28, H29 olgularındaysa testis volümleri azalmıştı. H10 ve H12'nin testiküler biyopsi sonrası yapılan patoloji incelemesinde sırasıyla Yalnızca Sertoli Hücre Sendromu (SCOS) ve Hipospermatogenez bulguları saptanmıştır (tablo12).

Total NOA olgularının %16,1'inde (5/31) kromozomal hastalık %3,2'sinde (1/31) Y kromozomu mikroleksyonu saptandı. H1, H20 ve H31'ün kromozom analizi 47,XXY'di ve Klinefelter sendromu tanısı aldılar. Erkek fenotip olan H2'nin kromozom analizi 45,X[40]/46,X,del(Y)(q11.23)[10] olarak saptandı ve ayrıca YKM testinde AZFb ve AZFc deleksyonu saptandı. H28'in 8 sene önce oligospermisi varken son başvurusunda azospermisi vardı ve kromozom analizi 46,X,der(Y)t(Y;?)(q12;p13) olarak değerlendirildi. Yapılan SNP-array testinde PAR2 bölgesi genlerini de içeren arr[GRCh38] Yq12(56,890,550_57,216,419)x1 deleksyonu saptandı. H16'daysa AZFc deleksyonu saptandı (Tablo13).



Şekil 4. Olgu H2 karyotip
45,X[40]/46,X,del(Y)(q11.23)[10]

TED ile değerlendirilen 25 olguda NOA ilişkili 56 farklı gende toplam 78 farklı VUS(71)/LP(7) varyasyon saptanmıştır (tablo14,15,16).

NOA ön tanısı için TED yapılan olguların %16'sında (4/25) NOA fenotipini açıklayabilecek MP varyant saptandı (Tablo14). H5, H9, H12, H30 olgularında *MSH4*, *STAG3* ve *NR5A1* genlerinde 3 farklı varyasyon saptandı (şekil 4,5,6,7).

TED yapılan 25 olgunun 13'ünde, NOA ilişkili 176 gene dahil olan 10 farklı gende (*AR*, *FGFR1*, *KLHL10*, *NR5A1*, *RANBP2*, *SIX5*, *SOHLH1*, *SYCP2*, *TEX11*, *WT1*) otozomal dominant kalıtım gösterip heterozigot olan, X' bağlı kalıtım gösterip hemizigot olan veya kalıtım şekli bilinmeyen multipl heterozigot varyasyon saptanan toplam 14 farklı (toplam 16) varyasyon saptandı (Tablo15). Bu varyantlardan *AR* geni c.1152C>G, p.His384Gln varyantı hem H8 hem H25'te, *KLHL10* geni c.1070A>G, p.K357R varyantıysa hem H15 hem H26'da saptandı. Saptanan 14 varyantın tamamı missense varyantlardı ve VUS olarak değerlendirildi.

TED dizileme yapılan 25 olgunun 23'ünde NOA ilişkili 176 gene dahil olan ve otozomal resesif kalıtım gösteren veya kalıtım şekli bilinmeyen toplam 45 gende (*ADAD2*, *ATM*, *BRDT*, *C14orf39*, *CCDC42*, *CCDC157*, *CDC20*, *CFAP57*, *CHFR*, *CLDN11*, *DDX25*, *DMC1*, *DNAH10*, *DNHDI*, *DNMT3L*, *EXO1*, *GNRHR*, *GTF2H3*, *HFM1*, *KASH5*, *LMTK2*, *M1AP*, *MEI4*, *MOV10L1*, *PDHA2*, *PIWIL4*, *PSMC3IP*, *RNF212*, *RPL10L*, *SBF1*, *SHOC1*, *SIX5*, *SOHLH2*, *SPAG17*, *STAG3*, *SUN1*, *TERB2*, *TEX14*, *TEX15*, *TDRD1*, *TDRD6*, *TDRD7*, *TDRD9*, *TOPAZ1*, *UBR2*), 61 farklı heterozigot (toplam 62) varyant saptandı (Tablo16).

RNF212 geni heterozigot VUS c.53C>G, p.Ser18Trp varyasyonu hem H4 ve hem de H25'te saptandı.

GNRHR geninde heterozigot muhtemel patojenik c.317A>G, p.Gln106Arg varyasyonu H29'da,

DNHDI geni heterozigot muhtemel patojenik c.7165G>T, p.Glu2389Ter varyasyonları H24'te saptandı.

TEX15 geninde heterozigot patojenik c.6848_6849del, p.Arg2283AsnfsTer22 varyasyonu ve *PDHA2* geni heterozigot muhtemel patojenik c.599G>A, p.Gly200Glu varyasyonları H15'te saptandı. Diğer 57 varyant VUS olarak değerlendirilmiştir.

TED yapılan 25 hastada spermatogenezle ilişkili 69 gende (*ACADM, ACR, ADAD1, AKAP3, AK7, AMH, AURKC, ARMC2, BNC1, C2CD6, CEP128, CFAP47, CFAP61, CFAP70, CFAP251, CFTR, CLCA4, DDX41, DNAH1, DNAH2, DNAH3, DNAH5, DNAH6, DNAH8, DNAH9, DNM1L, DPY19L2, ELMO1, ETFa, ETV6, EVC, FANCI, FLG, FSIP2, GJB2, HK1, IFT122, IQCN, KATNAL2, LDHA, LMNA, LTF, LZTR1, MSH2, MYO15A, NLRP5, NPC1, PAH, PDE6A, PHKG2, PIBF1, PKD1L1, POLG, PRICKLE1, PRNP, RBMY1A1, RGN, SCN1A, SLC26A8, SPATA17, SPEF2, STUB1, TUBA8, TTC21A, UBQLN3, USH1G, VIPAS39, WDR19, WFS1*) 97 farklı (toplam 101) varyasyon saptandı (Tablo17).

DNAH8 geni heterozigot VUS c.9890C>T, p.Ser3297Phe varyantı hem H4 hem H17’de,

FLG geni heterozigot patojenik c.5690del, p.His1897ProfsTer198 varyantı hem H8 hem H19’da,

DNAH6 geni heterozigot VUS c.7399A>G, p.Lys2467Glu varyantı hem H6 hem H30’da,

USH1G geni heterozigot patojenik c.1373A>T p.Asp458Val varyantı hem H9 hem de H29’da saptanmıştır.

Hastaların %45,1’una (14/31) TESE yapıldı. Toplam olguların %25,8’inin (8/31) patolojik tanısı (SCOS (4), maturasyon arresti (4), hipospermatogenez(1)) vardı. H12’de hipospermatogenez ve maturasyon arresti saptandı (tablo12). TESE yapılan olguların %50’sinde (7/14) embriyo oluşumu oldu, %50’sinde (7/14) embriyo oluşmadı. Embriyo oluşan olguların hiçbirinde gebelik ve canlı doğum elde edilemedi.

Tablo12. Olguların klinik özellikleri

Hasta no	Yaş	Ailede infertilite öyküsü	Tıbbi öykü	USG Sağ testis boyutu	USG Sol testis boyutu	FSH (IU/L)*	Total testosteron (ng/dl)*	Testiküler biyopsi patolojik tanısı
H1	32	-	-	↓	↓	52.01 ↑	332	Ø
H2	40	+	HT, RA, DM	↓	↓	30.62 ↑	254	Ø
H3	46	-	-	↓	N	7.74 ↑	535	Ø
H4	44	+	-	Ø	Ø	7.9 ↑	327	Ø
H5	31	+	-	N	N	14.04 ↑	350	Ø
H6	33	+	-	↓	↓	37.66 ↑	370	Ø
H7	29	+	-	↓	↓	18.19 ↑	198 ↓	Ø
H8	35	+	-	↓	↓	27.42 ↑	295	Ø

Hasta no	Yaş	Ailede infertilite öyküsü	Tıbbi öykü	USG Sağ testis boyutu	USG Sol testis boyutu	FSH (IU/L)*	Total testosteron (ng/dl)*	Testiküler biyopsi patolojik tanısı
H9	26	+	-	↓	↓	2.1	550	spermatog enik arrest
H10	29	+	-	N	N	6.37	305	SCOS
H11	38	+	-	Ø	Ø	18.5 ↑	205 ↓	Ø
H12	28	-	-	Ø	Ø	4	1008 ↑	Hipospertogenez ve spermatog enik arrest
H13	46	-	hiperko lesterol emi	Ø	Ø	66.9 ↑	31 ↓	Ø
H14	22	-	-	N	N	19.6 ↑	670	Ø
H15	37	+	-	Ø	Ø	17.6 ↑	290	Ø
H16	31	-	-	N	N	8.8 ↑	530	Fokal spermatog enik arrest ve interstisyel fibrozis

Hasta no	Yaş	Ailede infertilite öyküsü	Tıbbi öykü	USG Sağ testis boyutu	USG Sol testis boyutu	FSH (IU/L)*	Total testosteron (ng/dl)*	Testiküler biyopsi patolojik tanısı
H17	27	-	-	↓	↓	2.23	464	Ø
H18	36	+	-	Ø	Ø	19.18 ↑	206 ↓	Ø
H19	26	-	-	N	N	17.3 ↑	450	Germ hücre aplazisi/ SCOS
H20	31	-	-	↓	↓	29.7 ↑	272	Ø
H21	46	+	-	↓	↓	5.3	920	Ø
H22	31	+	-	↓	↓	23.5 ↑	701	Ø
H23	29	-	-	↓	↓	3.85	343	Ø
H24	31	+	trombo sitopeni	↓	↓	13.8 ↑	260	Ø

Hasta no	Yaş	Ailede infertilite öyküsü	Tıbbi öykü	USG Sağ testis boyutu	USG Sol testis boyutu	FSH (IU/L)*	Total testosteron (ng/dl)*	Testiküler biyopsi patolojik tanısı
H25	33	-	-	↓	↓	28.73 ↑	316	Ø
H26	31	+	-	N	↓	20.9 ↑	190 ↓	Baskın SCOS/az sayıda spermatogonik arrest
H27	33	-	-	N	N	8.5 ↑	357	Spermatogonik arrest
H28	43	+	-	↓	↓	4.43	407	Ø
H29	37	+	-	↓	↓	3.77	276	Ø
H30	28	+	-	↓	↓	42.07 ↑	253	germ hücre aplazisi/ SCOS ve fokal spermatogonik arrest
H31	29	+	-	Ø	Ø	35 ↑	97 ↓	Ø

-: özellik yok, +: özellik var, N: normal, Ø: tetkik mevcut değil, HT: hipertansiyon, DM: diabetes mellitus, RA: romatoid artrit. SCOS: *Sertoli Cell Only Syndrome* (Yalnızca Sertoli Hücreleri Sendromu).

*Referans değerler: FSH: 1.5-7.6 IU/L, Total Testosteron: 240-950 ng/dl (4)

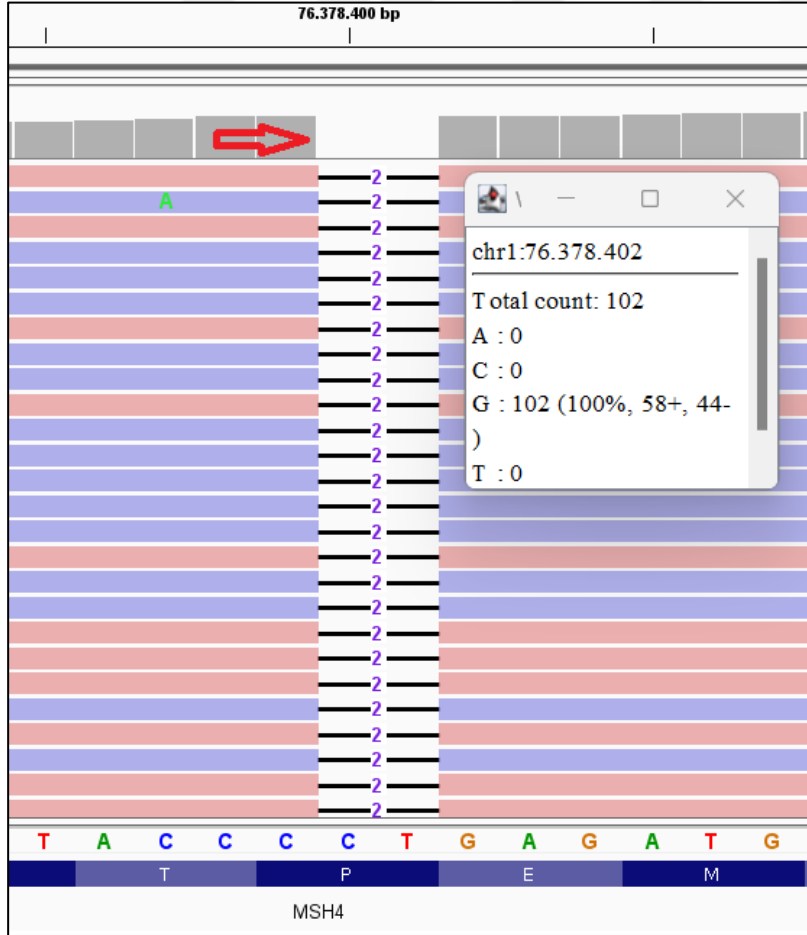
Tablo13. Kromozomal hastalık ve YKM olan olgular

Hasta no	Karyotip	YKM	SNP-array
H1	47,XXY	Normal	-
H2	45,X[40]/46,X,del(Y)(q11.23)[10]	AZFb+AZFc delesyonu	-
H16	46,XY	AZFc delesyonu	-
H20	47,XXY	Normal	-
H28	46,X,der(Y)t(Y;?)(q12;p13)	Normal	arr[GRCh38] Yq12(56,890,550_57,216,419)x1 İçerdiği genler: <i>SPRY3</i> , <i>VAMP7</i> , <i>IL9R</i> , <i>WASIR1</i> , <i>DDX11L16</i>
H31	47,XXY	Normal	-

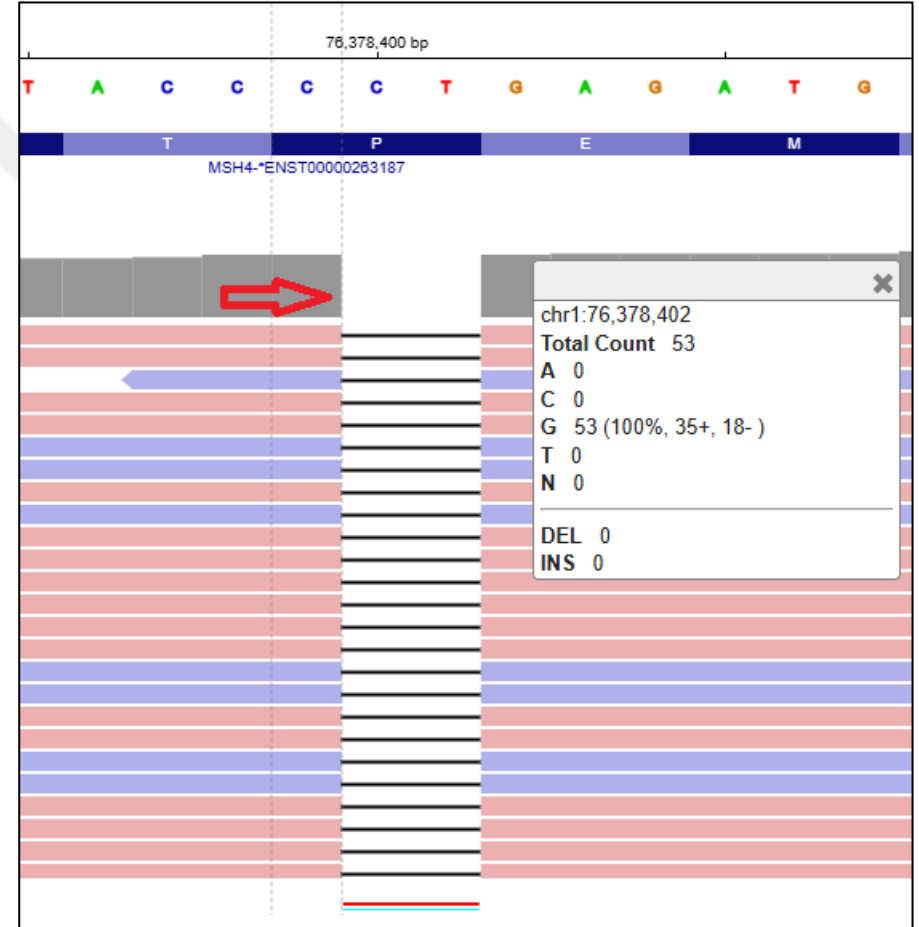
Tablo14. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde kliniği açıklayabilecek MP varyasyon saptanan olgular

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite/ Kalıtım	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritaba nı	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H5	-	<i>MSH4</i> NM_002440.4	c.2639_2640del p.Pro880ArgfsTer 14	Frameshift	Homozigot	MP (PVS1, PM2)	-	-	-	Spermatogenic failure 2 #108420 OR
H9	+	<i>MSH4</i> NM_002440	c.2639_2640del p.Pro880ArgfsTer 14	Frameshift	Homozigot	MP (PVS1, PM2)	-	-	-	Spermatogenic failure 2 #108420 OR
H12	+	<i>STAG3</i> NM_001282717.1	c.671C>G p.Ser224Ter	Stop-gain	Homozigot	MP (PVS1, PM2)	-	36.0	-	Spermatogenic failure 61 #619672 OR
H30	-	<i>NR5A1</i> NM_004959.5	c.251G>T p.Arg84Leu	Missense	Heterozigot	MP (PP3, PM2, PM5, PP2)	-	28.3	HGMD: DM	Spermatogenic failure 8 #613957 OD

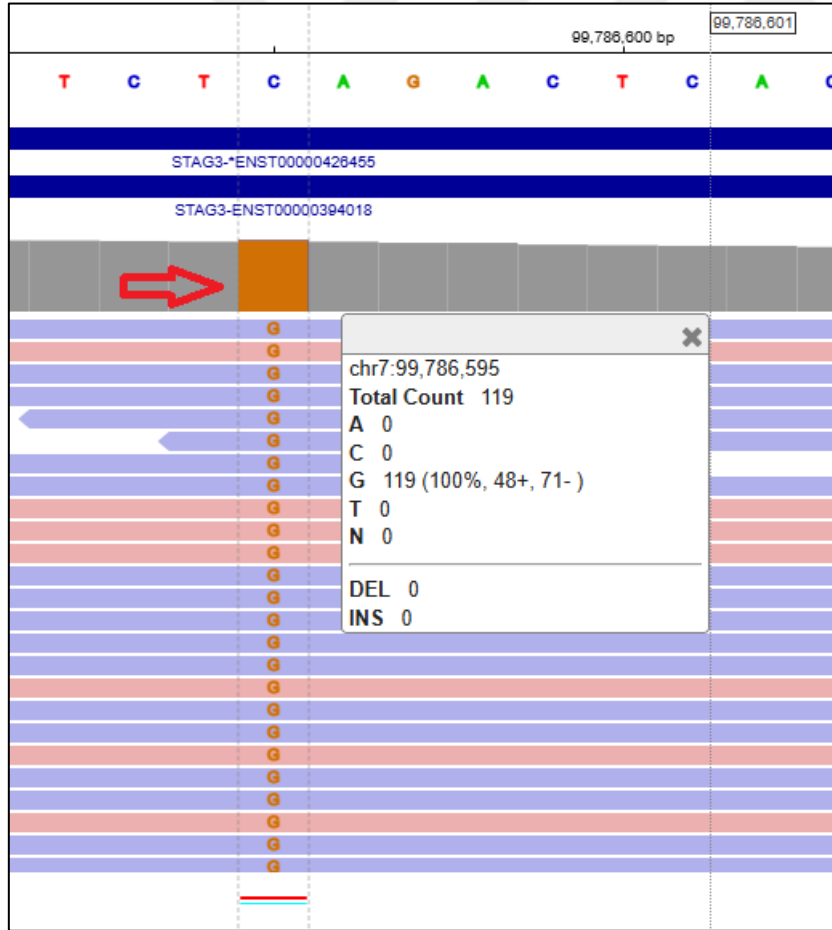
P: Patojenik, MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif



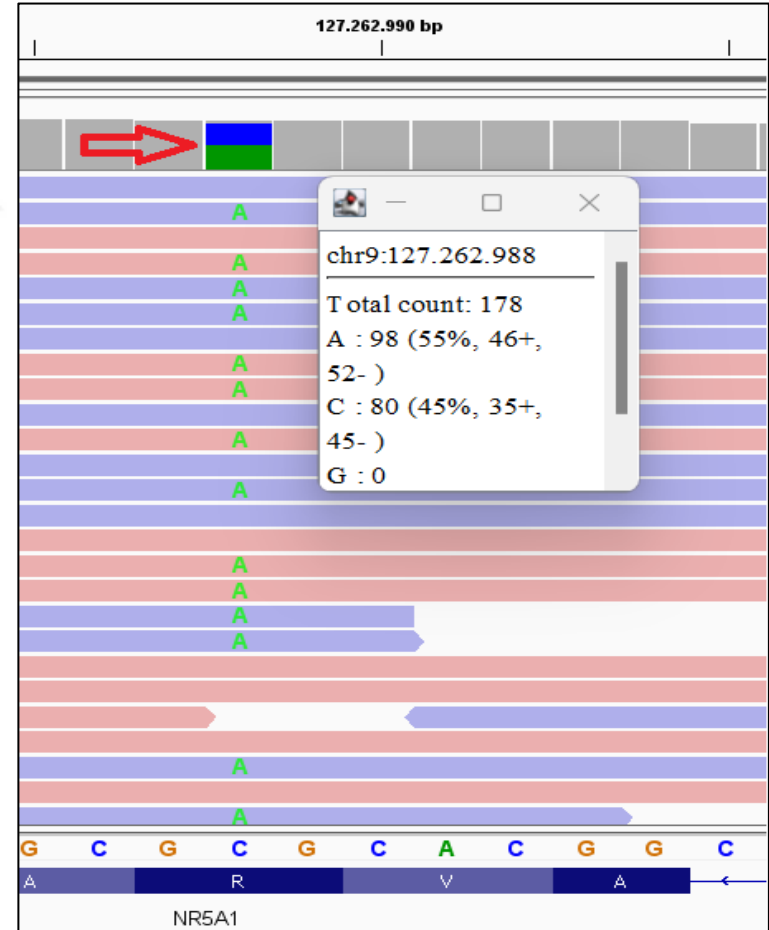
Şekil 5. H5 olgusu homozigot *MSH4*: c.2639_2640del, p.Pro880ArgfsTer14 varyasyonu IGV görüntüsü



Şekil 6. H9 olgusu homozigot *MSH4*: c.2639_2640del, p.Pro880ArgfsTer14 varyasyonu IGV görüntüsü



Şekil 7. H12 olgusu homozigot *STAG3*: c.671C>G, p.Ser224Ter varyasyonu IGV görüntüsü



Şekil 8. H31 olgusu heterozigot *NR5A1*: c.251G>T, p.Arg84Leu varyasyonu IGV görüntüsü

Tablo15. TED yapılan olgularda tespit edilen NOA ilgili otozomal dominant kalıtmımlı genlerdeki heterozigot, NOA ilgili genler deki X'e bağılı genlerdeki hemizigot ve multipl heterozigot varyantlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğı veritabanı	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H6	-	<i>FGFR1</i> NM_023110.3	c.1520G>A p.Arg507His	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PM1, PP2)	%0.0072	29.0	Clinvar: VUS	Hypogonadotropi c hypogonadism 2 with or without anosmia #147950 OD
H8	+	<i>AR</i> NM_000044.6	c.1152C>G p.His384Gln	Missense	Hemizigot	VUS (PM2, PP2)	-	<10	-	Androgen insensitivity, partial, with or without breast cancer #312300 X'e bağılı Resesif
H11	-	<i>SOHLH1</i> NM_001101677.2	c.68G>C p.Gly23Ala	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0292	<10	-	Spermatogenic failure 32 #618115 OD

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant

Tablo15. TED yapılan olgularda tespit edilen NOA ilgili otozomal dominant kalıtmıli genlerdeki heterozigot, NOA ilgili genlerdeki X'e bağıli genlerdeki hemizigot ve multipl heterozigot varyantlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğı veritabanı	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H12	+	<i>SOHLH1</i> NM_001101677.2	c.868G>C p.Glu290Gln	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0284	10.2	HGMD: DM?	Spermatogenic failure 32 #618115 OD
H15	+	<i>KLHL10</i> NM_152467.5	c.1070A>G p.Lys357Arg	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0064	18.9	-	Spermatogenic failure 11 #615081 OD
H17	-	<i>NR5A1</i> NM_004959.5	c.673G>A p.Glu225Lys	Missense	Heterozigot (Maternal)	VUS (PM1, PM2, PP2)	%0.0006	19.8	-	Spermatogenic failure 8 #613957 OD
H19	-	<i>SYCP2</i> NM_014258.4	c.3770A>T p.Lys1257Met	Missense	Heterozigot (Paternal)	VUS (PM2, BP4)	%0.0004	25.0	-	Spermatogenic failure 1 #258150 OD

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, DM?: *disease-causing mutation?* (Hastalık yapıcı mutasyon?)

Tablo15. TED yapılan olgularda tespit edilen NOA ilgili otozomal dominant kalımlı genlerdeki heterozigot, NOA ilgili genlerdeki X'e bağlı genlerdeki hemizigot ve multipl heterozigot varyantlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H19		<i>RANBP2</i> NM_006267.5	c.5431C>T p.His1811Tyr	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	13.0	-	-
		<i>RANBP2</i> NM_006267.5	c.3596C>G p.Ala1199Gly	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	22.8	-	-
H22		<i>WT1</i> NM_024426.6	c.98C>A p.Pro33Gln	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2, BP4)	-	17.0	Clinvar: VUS	*607102
H23	+	<i>TEX11</i> NM_031276.3	c.1154T>C p.Leu385Ser	Missense	Hemizigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0011	10.8	-	Spermatogenic failure, X-linked 2 #309120 X'e bağlı Resesif
H25		<i>AR</i> NM_000044.6	c.1152C>G, p.His384Gln	Missense	Hemizigot	VUS (PM2, PP2)	-	<10	-	Androgen insensitivity, partial, with or without breast cancer #312300 X'e bağlı Resesif

VUS: Variant of Uncertain Significance-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon

Tablo15. TED yapılan olgularda tespit edilen NOA ilgili otozomal dominant kalıtmıli genlerdeki heterozigot, NOA ilgili genlerdeki X'e bağıli genlerdeki hemizigot ve multipl heterozigot varyantlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğı veritabanı	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H26		<i>KLHL10</i> NM_152467.5	c.1070A>G p.Lys357Arg	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	0.0064%	18.9	-	Spermatogenic failure 11 #615081 OD
H29		<i>SIX5</i> NM_175875.5	c.1687C>T p.Leu563Phe	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	0.0041%	24.4	-	Branchiootorenal syndrome 2 #610896
		<i>SIX5</i> NM_175875.5	c.2150G>A p.Gly717Glu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	19.4	Clinvar: VUS	Branchiootorenal syndrome 2 #610896
H30		<i>FGFR1</i> NM_023110.3	c.1229G>A p.Ser410Asn	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2)	0.0008%	22.7	Clinvar: VUS	Hypogonadotropi c hypogonadism 2 with or without anosmia #147950 OD

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akra balık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H3	+	<i>BRDT</i> NM_207189.4	c.586T>G p.Ser196Ala	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	<10	-	?Spermatogeni c failure 21 #617644 OR
H4	+	<i>KASH5</i> NM_144688.5	c.1358C>G p.Ala453Gly	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	<10	-	Spermatogenic failure 88 #620547 OR
		<i>MIAP</i> NM_001321739.2	c.1438_1452dup p.G480_T484dup	In-frame duplikasyon	Heterozigot (Maternal)	VUS (PM2, PM4)	-	-	-	Spermatogenic failure 48 #619108 OR
		<i>SBF1</i> NM_002972.4	c.4708C>T p.Arg1570Cys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0056	28.2	Clinvar: VUS	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4B3 #615284 OR
		<i>CLDN11</i> NM_005602.6	c.454G>A p.Val152Met	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	20.6	-	Leukodistrofi, hypomyelinating, 22 #619328 OD

VUS: *Variant of Uncertain Significance* (Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon), OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H4	+	<i>RNF212</i> NM_001131034.4	c.53C>G p.Ser18Trp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BS2)	%0.1023	23.2	-	?Spermatogeni c failure 62 #619673 OR
		<i>DNHDI</i> NM_144666.3	c.3410G>A p.Arg1137Gln	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2, BP4)	%0.0149	22.8	Clinvar: VUS	Spermatogenic failure 65 #619712 OR
		<i>ATM</i> NM_000051.4	c.4076C>A p.Ala1359Asp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PM4)	-	16.8	Clinvar: VUS HGMD: DM?	Ataxia- telangiectasia #208900 OR

VUS: *Variant of Uncertain Significance* (Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon), OR: Otozomal Resesif, DM?: *disease-causing mutation?* (Hastalık yapıcı mutasyon?)

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H5	-	<i>SPAG17</i> NM_206996.4	c.5626A>C p.Thr1876Pro	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0187	<10	Clinvar: VUS	?Spermatogenic failure 55 #619380 OR
		<i>RANBP2</i> NM_006267.5	c.4432A>C p.Thr1478Pro	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0012	10.4	-	{Encephalopathy, acute, infection-induced, 3, susceptibility to} #608033 OD
H6	-	<i>TDRD9</i> NM_153046.3	c.1628T>C p.Met543Thr	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	23.7	-	?Spermatogenic failure 30 #618110 OR

VUS: *Variant of Uncertain Significance* (Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon), OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım
H6	-	<i>SOHLH2</i> NM_017826.3	c.1232C>T p.Thr411Met	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0215	15.8	-	-
		<i>SBF1</i> NM_002972.4	c.2977A>G p.Met993Val	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	14.8	-	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4B3 #615284 OR
		<i>CDC20</i> NM_001255.3	c.427+6A>G	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0176	13.7	-	Oocyte/zygote/embryo maturation arrest 14 #620276 OR
		<i>SUN1</i> NM_001130965.3	c.2206C>G p.Gln736Glu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	22.0	-	-

VUS: *Variant of Uncertain Significance* (Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon), OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM) / Kalıtım
H7	-	<i>MIAP</i> NM_001321739.2	c.1414C>T p.Pro472Ser	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0203	12.0	Clinvar: VUS	Spermatogenic failure 48 #619108 OR
		<i>EXO1</i> NM_130398.4	c.979C>T p.Leu327Phe	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	27.0	-	-
		<i>DNHDI</i> NM_144666.3	c.5009C>G p.Ala1670Gly	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2, BP4)	%0.0013	21.7	Clinvar: VUS	Spermatogenic failure 65 #619712 OR

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H8	+	<i>MOV10L1</i> NM_018995.3	c.224A>G p.Gln75Arg	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3)	0.0032%	25.4	Clinvar: VUS	?Spermatogenic failure 73 #619878 OR
		<i>HFMI</i> NM_001017975.5	c.284C>A p.Pro95His	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0004	<10	-	Premature ovarian failure 9 #615724 OR
		<i>PIWIL4</i> NM_152431.3	c.1277A>G p.Asn426Ser	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.1929	13.2	-	-
		<i>CHFR</i> NM_001161344.1	c.1781T>A p.Val594Asp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	24.1	-	-

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H8	+	<i>TERB2</i> NM_152448.3	c.285A>C p.Lys95Asn	Missense	Heterozigot	VUS (PP3, BS2)	%0.1611	25.5	-	?Spermatogenic failure 59 #619645 OR
H10	-	<i>TDRD7</i> NM_014290.3	c.2266C>T p.Arg756Trp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0052	23.4	-	Cataract 36 #613887 OR
		<i>TDRD9</i> NM_153046.3	c.3826G>T p.Val1276Phe	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.1677	25.0	Clinvar: VUS	?Spermatogenic failure 30 #618110 OR
		<i>LMTK2</i> NM_014916.4	c.4409G>A p.Arg1470Gln	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3)	%0.0068	29.6	Clinvar: VUS	-

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H11	-	<i>ATM</i> NM_000051.3	c.5740G>C p.Asp1914His	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	23.4	-	Ataxia-telangiectasia #208900 OR
H12	+	<i>RPL10L</i> NM_080746.3	c.182C>T p.Ser61Phe	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3)	-	25.0	-	?Spermatogenic failure 63 #619689 OR
		<i>UBR2</i> NM_015255.2	c.1494G>C p.Gln498His	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2, BP4)	%0.0024	17.0	-	-
H13	-	<i>DNMT3L</i> NM_175867.3	c.959C>T p.Ala320Val	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	22.1	-	-

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H14	-	<i>TEX14</i> NM_031272.5:	c.2384A>G p.Tyr795Cys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0152	22.8	Clinvar: VUS	Spermatogenic failure 23 #617707 OR
		<i>MEI4</i> NM_001322247.2	c.365T>C p.Val122Ala	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	<10	-	-
H15	+	<i>TDRD1</i> NM_001395205.1	c.1379A>G p.Asp460Gly	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0008	19.5	-	-
		<i>DNHDI</i> NM_144666.3	c.12215C>T p.Thr4072Met	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2, BP4)	%0.0008	12.9	-	Spermatogenic failure 65 #619712 OR

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H15	+	<i>GTF2H3</i> NM_001516.5	c.365-3C>T	Splice site	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0052	10.7	-	-
		<i>TEX15</i> NM_001350162.2	c.6848_6849del, p.Arg2283AsnfsTer22	Frameshift	Heterozigot	P (PM3, PVS1, PM2)	%0.0807	22.9	Clinvar: MP, P	Spermatogenic failure 25 #617960 OR
		<i>PDHA2</i> NM_005390.5	c.599G>A, p.Gly200Glu	Missense	Heterozigot	MP (PP3, PM2)	-	26.4	-	Spermatogenic failure 70 #619828 OR

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H17	-	<i>SBF1</i> NM_002972.4	c.5534C>T p.Thr1845Met	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0048	23.5	Clinvar: VUS	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4B3 #615284 OR
		<i>DDX25</i> NM_013264.5	c.38C>T p.Ala13Val	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	22.9	-	-
H18	-	<i>TDRD6</i> NM_001010870.3	c.2080G>A p.Glu694Lys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	14.4	-	-

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H18	-	<i>SUN1</i> NM_001130965.3	c.992G>A p.Arg331Gln	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.016	10.2	Clinvar: VUS	-
H19	-	<i>DNAH10</i> NM_001372106.1	c.8694T>A p.Asp2898Glu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-		-	Spermatogenic failure 56 #619515 OR
		<i>TDRD6</i> NM_001010870.3	c.1895A>G p.His632Arg	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0303	18.8	Clinvar: VUS	-
		<i>CCDC157</i> NM_001017437.5	c.2212C>T p.Arg738Trp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0012	19.3	Clinvar: VUS	-

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H21	+	TDRD6 NM_001010870.3	c.1472C>T, p.Ala491Val	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0187	23.4	-	-
H22	+	<i>TOPAZ1</i> NM_001145030.2	c.4884C>A p.Ser1628Arg	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0025	19.0	-	-
		<i>DNHDI</i> NM_144666.3	c.12445G>C p.Gly4149Arg	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2)	-	25.2	-	Spermatogenic failure 65 #619712 OR
H24	-	<i>DNHDI</i> NM_144666.3	c.7165G>T p.Glu2389Ter	Stop-gain	Heterozigot	MP (PVS1, PM2)	-	42.0	-	Spermatogenic failure 65 #619712 OR
		<i>DMCI</i> NM_007068.4	c.545A>G p.Asp182Gly	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0107	23.2	-	-

MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H24	-	<i>CCDC42</i> NM_144681.3	c.310C>T p.Arg104Trp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BS2)	%0.1586	26.1	-	-
H25	-	<i>STAG3</i> NM_001282717.2	c.628G>A p.Gly210Ser	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0001	22.2	-	Spermatogenic failure 61 #619672 OR
		<i>RNF212</i> NM_001131034.4	c.53C>G p.Ser18Trp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BS2)	%0.1023	24.2	-	?Spermatogenic failure 62 #619673 OR
H26	+	<i>PSMC3IP</i> NM_016556.4	c.646G>A p.Asp216Asn	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0314	23.0	-	Ovarian dysgenesis 3 #614324 OR
		<i>DNHDI</i> NM_144666.3	c.3398A>C p.Glu1133Ala	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2)	-	28.0	-	Spermatogenic failure 65 #619712 OR

VUS: Variant of Uncertain Significance-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H27	+	<i>CFAP57</i> NM_001378189.1	c.581G>A p.Arg194Lys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	13.4	-	Spermatogenic failure 95 #620917 OR
		<i>BRDT</i> (NM_207189.4)	c.1727G>A p.Arg576Lys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0005	22.5	-	?Spermatogenic failure 21 #617644 OR
H29	+	<i>GNRHR</i> NM_000406.3	c.317A>G p.Gln106Arg	Missense	Heterozigot	MP (PM1, PM2, PP2, PP5)	-	23.6	Clinvar: MP, P HGMD: DM	Hypogonadotrop ic hypogonadism 7 without anosmia #146110 OR
		<i>CI4ORF39</i> NM_174978.3	c.257T>A p.Phe86Tyr	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	23.6	-	Spermatogenic failure 52 #619202 OR

P: Patojenik, MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif, DM: *disease-causing mutation* (Hastalık yapıcı mutasyon)

Tablo16. TED yapılan olgularda NOA ilişkili genlerde tespit edilen diğer heterozigot varyasyonlar

Hasta no	Akrabalık	Gen/ Transkript	Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Tanımlı olduğu veritabanı	Fenotip (OMIM)
H30	-	<i>SHOC1</i> NM_001378211.1	c.3108G>C p.Lys1036Asn	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	22.3	-	Spermatogenic failure 75 #619949 OR
		<i>CCDC42</i> NM_144681.3	c.421C>T p.Arg141Trp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.002	17.0	-	-
		<i>ADAD2</i> NM_001145400.2	c.1426G>A p.Glu476Lys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0036	11.3	-	-
		<i>DNAH10</i> NM_001372106.1	c.6350A>C p.Gln2117Pro	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0008	25.1	-	Spermatogenic failure 56 #619515 OR

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H3	<i>RBMY1A1</i> (NM_005058.4) c.391G>A, p.Asp131Asn	Splicing	Heterozigot	VUS (PM2, PP3)	-	22.4	-
	<i>C2CD6</i> (NM_001168221.2) c.5458T>C, p.Tyr1820His	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	23.2	?Spermatogenic failure 68 #619805 OR
H4	<i>DNAH8</i> (NM_001206927.2) c.9890C>T, p.Ser3297Phe	Missense	Homozigot (Maternal/Paternal) (heterozigot/homozigot)	VUS (PM2)	-	32.0	Spermatogenic failure 46 #619095 OR
	<i>FANCI</i> (NM_001113378.2) c.1992+2T>G	Splicing	Heterozigot (Paternal)	MP (PVS1, PM2)	-	33.0	-
	<i>DNAH1</i> (NM_015512.5) c.893T>G, p.Leu298Arg	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	16.1	Spermatogenic failure 18 #617576 OR
H5	<i>DNAH3</i> (NM_001347886.2) c.362-2A>G	Splicing	Heterozigot	MP (PVS1, PM2)	-	33.0	-
	<i>SPATA17</i> (NM_138796.4) c.992G>A, p.Trp331Ter	Stop-gain	Heterozigot	MP (PVS1, PM2)	%0.0004	44.0	-

MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H6	<i>MYO15A</i> (NM_016239.4) c.812G>A, p.Trp271Ter	Stop-gain	Heterozigot	MP (PVS1, PM2)	-	35.0	Deafness, autosomal recessive 3 #600316 OR
	<i>AKAP3</i> (NM_001278309.2) c.2398C>T, p.Gln800Ter	Stop-gain	Heterozigot	VUS (PM2)	-	45.0	Spermatogenic failure 82 #620353 OR
H7	<i>DNAH1</i> (NM_015512.5) c.2602C>T, p.Arg868Ter	Stop gain	Heterozigot	P (PVS1, PM2, PP5)	-	36.0	Spermatogenic failure 18 #617576 OR
	<i>DNAH1</i> (NM_015512.5) c.6707C>T, p.Thr2236Ile	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0052	23.5	Spermatogenic failure 18 #617576 OR
	<i>AK7</i> (NM_152327.5) c.1831del, p.Tyr611MetfsTer3	Frameshift	Heterozigot	VUS (PM2)	-	-	?Spermatogenic failure 27 #617965 OR
	<i>FSIP2</i> (NM_173651.4) c.20135T>G, p.Phe6712Cys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2, BP4)	%0.0004	21.7	Spermatogenic failure 34 #618153 OR
	<i>LDHA</i> (NM_005566.4) c.592+2T>G	Splicing	Heterozigot	MP (PVS1, PM2)	-	35.0	Glycogen storage disease XI #612933 OR

P: Patojenik, MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H8	<i>DNAH5</i> (NM_001369) c.8351C>T, p.Thr2784Ile	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3)	-	27.6	-
	<i>SPEF2</i> (NM_024867.4) c.3086C>G, p.Pro1029Arg	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	25.2	Spermatogenic failure 43 #618751 OR
	<i>CFTR</i> (NM_000492.4) c.3161A>G, p.His1054Arg	Missense	Heterozigot	MP (PM1, PP2, PM2, PM5, PP3)	-	25.9	Cystic fibrosis #219700 OR
	<i>ELMO1</i> (NM_001206482.1) c.746C>T, p.Ala249Val	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2)	%0.0008	-	-
	<i>FLG</i> (NM_002016.2) c.5690del, p.His1897ProfsTer198	Frameshift	Heterozigot	P (PS4, PVS1, PM2)	%0.0004	20.5	Ichthyosis vulgaris #146700 OD, OR
H9	<i>DNAH8</i> (NM_001206927) c.5930G>C, p.Arg1977Thr	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	27.2	Spermatogenic failure 46 #619095 OR
	<i>ARMC2</i> (NM_032131) c.1685G>A, p.Ser562Asn	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	24.2	Spermatogenic failure 38 #618433 OR
	<i>ACADM</i> (NM_001286043.1) c.515A>G, p.Asp172Gly	Missense	Homozigot	MP (PM1, PP2, PM2, PP3)	%0.0004	23.3	Acyl-CoA dehydrogenase, medium chain, deficiency of #201450 OR

P: Patojenik, MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H9	<i>USH1G</i> (NM_173477.5) c.1373A>T, p.Asp458Val	Missense	Heterozigot	P (PM3, PP1, PS3, PP3, PM2)	%0.0004	28.7	Usher syndrome, type 1G #606943 OR
	<i>AMH</i> (NM_000479.5) c.1048_1050dup, p.Leu350dup	Inframe insersiyon	Heterozigot	VUS (PM2, PM4)	%0.0041	20.7	Persistent Mullerian duct syndrome, type I #261550 OR
	<i>NLRP5</i> (NM_153447.4) c.3583C>T, p.Arg1195Trp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0088	21.4	Oocyte/zygote/embryo maturation arrest 19 #620333 OR
	<i>TTC21A</i> (NM_145755.2) c.3232G>A, p.Glu1078Lys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0445	23.0	Spermatogenic failure 37 #618429 OR
	<i>AKAP3</i> (NM_001278309.2) c.55G>A, p.Val19Ile	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0004	17.5	Spermatogenic failure 82 #620353 OR
H10	<i>DNAH1</i> (NM_015512.5) c.12134T>A, p.Leu4045Gln	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	25.1	Spermatogenic failure 18 #617576 OR
	<i>FSIP2</i> (NM_173651.4) c.3229C>T, p.His1077Tyr	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2, BP4)	%0.0922	<10	Spermatogenic failure 34 #618153 OR

P: Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H11	<i>DNAH6</i> (NM_001370.2) c.7399A>G, p.Lys2467Glu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2)	%0.0416	23.5	-
	<i>DNAH8</i> (NM_001206927.2) c.3643A>G, p.Lys1215Glu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0008	14.0	Spermatogenic failure 46 #619095 OR
	<i>CFAP47</i> (NM_001304548.2) c.9044T>C, p.Ile3015Thr	Missense	Hemizigot	VUS (PM2, BS4)	% 0.008	21.4	Spermatogenic failure, X-linked 3 #301059 X'e bağlı Resesif
	<i>PIBF1</i> (NM_006346.4) c.1974_1977del, p.Asn658LysfsTer15	Frameshift	Heterozigot	P (PVS1, PM2, PP5)	%0.009	33.0	Joubert syndrome 33 #617767 OR
	<i>EVC</i> (NM_153717.3) c.919T>C, p.Ser307Pro	Missense	Heterozigot	P (PM3, PP1, PM2)	%0.0048	14.4	Ellis-van Creveld syndrome #225500 OR

P: Patojenik, MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H12	<i>HK1</i> (NM_001358263.1) c.2531C>T, p.Ala844Val	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3, PP2)	%0.0012	25.9	Hemolytic anemia due to hexokinase deficiency #235700 OR
	<i>BNC1</i> (NM_001717.4) c.1821G>T, p.Arg607Ser	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0203	14.4	?Premature ovarian failure 16 #618723 OD
	<i>ETFA</i> (NM_000126.4) c.1001G>T, p.Ter334LeuextTer6	Stop loss	Heterozigot	VUS (PM2, PM4)	%0.0012	17.2	Glutaric acidemia IIA #231680 OR
H13	<i>DNAH8</i> (NM_001206927.2) c.9817A>G, p.Lys3273Glu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	26.2	Spermatogenic failure 46 #619095 OR
	<i>ADADI</i> (NM_139243.4) c.355A>G, p.Thr119Ala	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0067	20.1	-
	<i>UBQLN3</i> (NM_017481.4) c.1073C>T, p.Thr358Ile	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	14.4	-
	<i>NPCI</i> (NM_000271.5) c.3130G>A, p.Val1044Met	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PM1, PP2)	%0.0052	25.3	Niemann-Pick disease, type C1 #257220 OR

P: Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H15	<i>GJB2</i> (NM_004004.6) c.358_360del, p.Glu120del	Inframe delesyon	Heterozigot	P (PM3, PS3, PM2, PM4)	%0.0072	17.1	Deafness, autosomal recessive 1A #220290 OR
	<i>CEP128</i> (NM_152446.5) c.284T>C, p.Leu95Ser	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	25.8	-
H17	<i>DNAH8</i> (NM_001206927.2) c.9890C>T, p.Ser3297Phe	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	32.0	Spermatogenic failure 46 #619095 OR
	<i>CFAP61</i> (NM_015585.4) c.1852G>A, p.Val618Met	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.006	26.9	Spermatogenic failure 84 #620409 OR
	<i>SCN1A</i> (NM_001165963.4) c.440T>C, p.Met147Thr	Missense	Heterozigot	MP (PM1, PP2, PM2, PP3)	-	23.1	Generalized epilepsy with febrile seizures plus, type 2 #604403 OD
	<i>LMNA</i> (NM_170707.4) c.1633C>T p.Arg545Cys	Missense	Heterozigot	MP (PM1, PP2, PM2, PM5, PP3, PP5)	-	31.0	*150330
	<i>DNAH9</i> (NM_001372.4) c.313C>G, p.Arg105Gly	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	19.2	Ciliary dyskinesia, primary, 40 #61830 OR

P: Patojenik, MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H18	<i>CFTR</i> (NM_000492.4) c.3659C>T p.Thr1220Ile	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2)	%0.01	<10	Cystic fibrosis #219700 OR
	<i>WDR19</i> (NM_025132.4) c.814C>T, p.Arg272Cys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3, PM1)	%0.0029	21.7	*608151
H19	<i>DNAH2</i> (NM_020877.5) c.10690G>A, p.Gly3564Ser	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3, BS2)	%0.1311	29.9	Spermatogenic failure 45 #619094 OR
	<i>DNAH2</i> (NM_020877.5) c.5431G>A, p.Glu1811Lys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3, BS2)	%0.0024	31.0	Spermatogenic failure 45 #619094 OR
	<i>CFAP70</i> (NM_001367801.1) c.823A>C, p.Ile275Leu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0299	13.4	?Spermatogenic failure 41 #618670 OR
	<i>CEP128</i> (NM_152446.5) c.1066C>T, p.Arg356Trp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0028	11.0	-
	<i>RGN</i> (NM_152869.4) c.673del, p.Ile225PhefsTer3	Frameshift	Homozigot (Maternal/paternal) (heterozigot/heterozigot)	VUS (PM2)	-	-	-

MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H19	<i>DNAH9</i> (NM_001372.4) c.4150C>T, p.Arg1384Trp	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.004	25.9	Ciliary dyskinesia, primary, 40 #618300 OR
	<i>DNAH8</i> (NM_001206927.2) c.5845A>G, p.Ile1949Val	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0052	18.6	Spermatogenic failure 46 #619095 OR
	<i>STUB1</i> (NM_005861.4) c.433A>C, p.Lys145Gln	Missense	Heterozigot	MP (PS4, PM2, PM1, PP2, PP3)	%0.0594	23.9	Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 16 #615768 OR
	<i>PRICKLE1</i> (NM_153026.3) c.2396C>G, p.Ser799Cys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	21.7	Epilepsy, progressive myoclonic 1B #612437 OR
	<i>PHKG2</i> (NM_000294.3) c.433del, p.His145MetfsTer10	Frameshift	Heterozigot	MP (PVS1, PM2)	%0.0004	-	Glycogen storage disease IXc #613027 OR
	<i>FLG</i> (NM_002016.2) c.5690del, p.His1897ProfsTer198	Frameshift	Heterozigot	P (PS4, PVS1, PM2)	%0.0004	20.5	Ichthyosis vulgaris #146700 OD, OR

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H21	<i>MSH2</i> (NM_000251.3) c.2050del, p.Val684Ter	Frameshift	Heterozigot	P (PVS1, PP5, PM2)	-	34.0	Lynch syndrome 1 #120435 OD
	<i>CFTR</i> (NM_000492.4) c.3154T>G, p.Phe1052Val	Missense	Heterozigot	P (PS4, PM2, PM1, PP2, PP3)	%0.0647	29.7	Cystic fibrosis #219700 OR
	<i>DNAH3</i> (NM_001347886.2) c.2932A>G, p.Lys978Glu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0096	21.8	-
H22	<i>ACADM</i> (NM_000016.6) c.792del, p.Ile264MetfsTer20	Frameshift	Heterozigot	MP (PVS1, PM2, PP5)	-	-	Acyl-CoA dehydrogenase, medium chain, deficiency of #201450 OR
	<i>TUBA8</i> (NM_018943.3) c.149C>G, p.Thr50Ser	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0004	19.1	Macrothrombocytopenia, isolated, 2, autosomal dominant #619840 OD
	<i>PKDILI</i> (NM_138295.5) c.1071dup, p.His358SerfsTer30	Frameshift	Heterozigot	P (PVS1, PM2, PP5)	%0.0067	19.8	Heterotaxy, visceral, 8, autosomal #617205 OR
	<i>LZTR1</i> (NM_006767.4) c.1397G>A, p.Arg466Gln	Missense	Heterozigot (Maternal)	P (PM3, PS3, PM2, PM5, PP3)	-	31.0	*600574
	<i>DNAH1</i> (NM_015512.5) c.2882C>T p.Ala961Val	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	-	22.7	Spermatogenic failure 18 #617576 OR

P: Patojenik, MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H23	<i>VIPAS39</i> (NM_001193315.2) c.107dup, p.Arg37AlafsTer	Frameshift	Heterozigot	MP (PVS1, PM2)	-	-	Arthrogryposis, renal dysfunction, and cholestasis 2 #613404 OR
	<i>LTF</i> (NM_002343.6) c.316C>T, p.Gln106Ter	Splicing	Heterozigot	VUS (PM2)	-	20.0	-
	<i>FSIP2</i> (NM_173651.4) c.4019A>C, p.Lys1340Thr	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2, BP4)	-	<10	Spermatogenic failure 34 #618153 OR
	<i>ACR</i> (NM_001097.3) c.907C>G, p.Pro303Ala	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0019	<10	?Spermatogenic failure 87 #620500 OR
H24	<i>CFAP251</i> (NM_144668.6) c.2975G>C, p.Arg992Thr	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PM3)	-	25.9	Spermatogenic failure 33 #618152 OR
	<i>ETV6</i> (NM_001987.5) c.1105C>T, p.Arg369Trp	Missense	Heterozigot	P (PS4, PP1, PM2, PM5, PM1)	-	32.0	Thrombocytopenia 5 #616216 OD
	<i>PAH</i> (NM_000277.3) c.842C>T, p.Pro281Leu	Splicing	Heterozigot	P (PM3, PS3, PP3, PM2, PM5, PP2)	%0.0103	32.0	Phenylketonuria #261600 OR

P: Patojenik, MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H24	<i>PRNP</i> (NM_000311.5) c.499G>A, p.Asp167Asn	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	-	18.9	* 176640
	<i>SPEF2</i> (NM_024867.4) c.3927A>C, p.Lys1309Asn	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0088	18.7	Spermatogenic failure 43 #618751 OR
	<i>SLC26A8</i> (NM_052961.4) c.548C>T, p.Ser183Leu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0008	23.0	Spermatogenic failure #606766 OR/OD
H25	<i>CFAP61</i> (NM_015585.4) c.2852A>G, p.Asn951Ser	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0029	18.6	Spermatogenic failure 84 #620409 OR
	<i>POLG</i> (NM_002693.3) c.752C>T, p.Thr251Ile	Missense	Heterozigot	MP (PS4, PM2, PP2)	%0.1548	13.9	* 174763
	<i>POLG</i> (NM_002693.3) c.1760C>T, p.Pro587Leu	Missense	Heterozigot	P (PS4, PM1, PP2, PM2,PP3)	%0.1545	29.3	* 174763
	<i>PDE6A</i> (NM_000440.3) c.2125G>A p.Glu709Lys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BS2, PP3)	%0.0284	29.0	Retinitis pigmentosa 43 #613810 OR
	<i>CFTR</i> (NM_000492.4) c.1040G>C, p.Arg347Pro	Missense	Heterozigot	P (PM3, PP1, PS3, PM1, PP2, PM2, PM5, PP3)	%0.0042	30.0	Cystic fibrosis #219700 OR

P: Patojenik, MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H26	<i>WFS1</i> (NM_006005.3) c.2576G>A, p.Arg859Gln	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3, PM1)	%0.0027	23.4	*606201
	<i>DDX41</i> (NM_016222.4) c.1266_1267del, p.Tyr423ProfsTer35	Frameshift	Heterozigot	MP (PVS1, PM2)	-	-	#616871
	<i>DPY19L2</i> (NM_173812.5) c.257G>T, p.Arg86Leu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, BP4)	%0.0024	<10	Spermatogenic failure 9 #613958 OR
	<i>AKAP3</i> (NM_001278309.2) c.1030G>A, p.Val344Ile	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0048	14.3	Spermatogenic failure 82 #620353 OR
H27	<i>DNAH1</i> (NM_015512.5) c.10211A>G, p.Asn3404Ser	Missense	Homozigot	VUS (PM2, BP4)	-	19.3	Spermatogenic failure 18 #617576 OR
	<i>AURKC</i> (NM_001015878.2) c.473A>G, p.His158Arg	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP3)	%0.0004	25.0	Spermatogenic failure 5 #243060 OR
	<i>GJB2</i> (NM_004004.6) c.445G>A, p.Ala149Thr	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PM1, PP2)	%0.0052	17.7	* 121011

MP: Muhtemel Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD v.2.1.1 (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H29	<i>USH1G</i> (NM_173477.5) c.1373A>T p.Asp458Val	Missense	Heterozigot	P (PM3, PP1, PS3, PP3, PM2)	%0.0004	28.7	Usher syndrome, type 1G #606943 OR
	<i>FSIP2</i> (NM_173651.4) c.18448G>A p.Val6150Ile	Missense	Heterozigot	VUS (BP4, PM2, PP2, PP5)	%0.0074	17.3	Spermatogenic failure 34 #618153 OR
	<i>CLCA4</i> (NM_012128.4) c.760dup, p.Thr254NfsTer3	Frameshift	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0389	25.4	-
	<i>DNAH8</i> (NM_001206927.2) c.7123A>C, p.Asn2375His	Missense	Heterozigot	VUS (PP3, BS1)	%0.08	27.0	Spermatogenic failure 46 #619095 OR
H30	<i>DNAH6</i> (NM_001370.2) c.7399A>G, p.Lys2467Glu	Missense	Heterozigot	VUS (PM2, PP2)	%0.0416	23.5	-
	<i>DNAH1</i> (NM_015512.5) c.11552G>A, p.Arg3851His	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.002	24.9	Spermatogenic failure 18 #617576 OR
	<i>DNM1L</i> (NM_012062.5) c.346_347del, p.Glu116LysfsTer6	Frameshift	Heterozigot	P (PS4, PVS1, PM2)	%0.0044	32.0	Optic atrophy 5 #610708 OD
	<i>KATNAL2</i> (NM_001387690.1) c.898_899del, p.Lys300AspfsTer10	Frameshift	Heterozigot	VUS (PM2)	-	-	-

P: Patojenik, VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Tablo17. TED yapılan olgularda spermatogenez ilişkili genlerde tespit edilen homozigot, heterozigot ve hemizigot varyasyonlar

Hasta no	Gen/ Varyant	Varyant tipi	Zigosite	ACMG kriterleri	GnomAD (Exome)	CADD skoru	Fenotip (OMIM)/ Kalıtım şekli
H30	<i>IFT122</i> (NM_052989.3) c.1795G>A, p.G599S	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0028	29.3	Cranioectodermal dysplasia 1 #218330 OR
	<i>IQCN</i> (NM_001145304.2) c.2566C>T p.Arg856Cys	Missense	Heterozigot	VUS (PM2)	%0.0365	24.9	Spermatogenic failure 78 #620170 OR

VUS: *Variant of Uncertain Significance*-Klinik Önemi Belirsiz Varyasyon, OR: Otozomal Resesif

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada 31 yetişkin NOA olgusu sitogenetik ve moleküler yöntemlerle genetik etiyolojileri araştırılmıştır. Literatür verisi incelendiğinde azospermi olgularında kromozomal anomali sıklığı %15 ila 25 arasında değişkenlik gösterip bu çalışmada da %16,1 (5/31) olarak saptanmıştır (36, 41). Kromozomal anomalilerin %60'ını (3/5) Klinefelter sendromu oluşturmaktadır. YKM'nin, NOA olgularındaki sıklığı popülasyondan popülasyona %2 ila 24 arasında oldukça değişkenlik göstermektedir (4). Bu çalışmada 31 NOA olgusunda YKM sıklığı %3,2 (1/31) olarak saptandı. Bu çalışmada olgu sayısı kısıtlı olmakla birlikte NOA'nın genetik nedenleri arasındaki kromozomal hastalıklar ve YKM'nin sıklığı literatürle uyumlu olarak saptanmıştır.

Toplam 25 olguya TED testi uygulandı ve olguların %16'sında (4/25) NOA kliniğini açıklayabilecek tek genlerde muhtemel patojenik (*MSH4*, *NR5A1*, *STAG3*) varyasyonlar saptandı. Bu genlerden *STAG3* ve *MSH4* genleri otozomal resesif (OR) kalıtım gösterirken *NR5A1* otozomal dominant (OD) kalıtım göstermektedir. H12 (*STAG3*) ve H9 (*MSH4*) olgularının anne babaları arasında akrabalık (1.kuzen evliliği) vardı. H5 (*MSH4*) olgusunun anne babası arasında akrabalık olmayıp anne ve baba yakın köylerdendi. Toplam olguların %54,8'inde ebeveynleri arasında akrabalık ve %61,2'sinde akrabaların en az birinde erkek infertilite öyküsü vardı. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'in 2023'te yayınladığı evlenme istatistikleri verilerine göre Türkiye'de akraba evliliği oranı %3,2'dir (53). Hasta grubumuzda akraba evliliği oranı Türkiye'deki genel orana göre daha yüksekti.

OMIM veri tabanındaki spermatogenik yetmezlik fenotipinde tanımlı toplam 103 genin %83,5'u (86/103) OR kalıtım göstermektedir ve akraba evliliklerinde OR kalıtım gösteren hastalıkların riskini arttığı bilinmektedir. Akraba evliliğinin erkek infertilitesine etkisi olabileceği düşünülmektedir ve bu konu akraba evliliğinin sık olduğu orta doğu toplumlarında araştırılmıştır (54, 55, 56, 57). Lübnan'da yapılan bir çalışmada yoğun akraba evliliği olan ailelerde erkek infertilitesinin sık görüldüğü ve erkek infertilitesinin en şiddetli hallerinden olan azospermi ve şiddetli oligospermi olgularında genetik nedenlerden kaynaklı infertilite görülme ihtimalinin yüksek olduğu gösterilmiştir (55). Ayrıca Türkiye'de yapılan bir çalışmada da idiyopatik NOA

tanısı almış anne ve babası arasında akrabalık olan erkeklerin oranının genel popülasyondaki akraba evliliği sıklığına göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (58). Bu çalışmada olguların %54,8'inde ebeveynler arasında akrabalık vardı. Inhorn MC ve arkadaşlarının (55) çalışmasındaysa şiddetli oligospermi ve azospermi olan olguların %29,2'inin ebeveynleri arasında akrabalık öyküsü vardı. Bu durum ebeveynler arasındaki akrabalık durumunun azospermi riskini arttırdığını düşündürebilirse de daha geniş hasta gruplarıyla değerlendirmek gereklidir. Bu verilerin aksine akraba evliliği yapan çiftlerde fertilite oranının daha yüksek olduğu çalışmalar da bildirilmiştir ve bu konu tartışmalı olmaya devam etmektedir (59, 60, 61). Akraba evliliklerinde nadir resesif kalıtım gösteren genetik hastalıkların riskinin arttığı bilindiği için ebeveynleri arasında akraba evliliği öyküsü olan infertil erkeklerin YÜT tedavileri öncesinde genetik danışma alması ve genetik değerlendirmeden geçmesi önerilebilir.

5.1. Kromozomal hastalıklar ve Y kromozomu mikrolelesyon

Bu çalışmada kromozomal anomalili olguların 3'ü (H1, H20, H31) Klinefelter sendromuydu (47,XXY). Klinefelter sendromu tipik olarak küçük testisler, hipergonadotropik hipogonadizm, öğrenme güçlüğü, jinekomasti ve infertilite ile karakterize nispeten sık görülen bir kromozomal hastalıktır. H1, H20 ve H31 olgularının ortalama testis hacmi 2.4 ml'di ve tüm olguların testis hacimleri (2.3 ml, 2.8 ml, 3.0 ml, 4.2 ml, 1.1 ml, 1.5 ml) azalmıştı. Bu üç Klinefelter sendromu olgusunun FSH ölçümleri ortalama 38,9 IU/L olup artmıştı. H1 olgusunun inmemiş testis öyküsü vardı, ayrıca H1 (188cm (+1,91 SDS)) hariç uzun boy bulgusu H20 ve H33 olgularında yoktu.

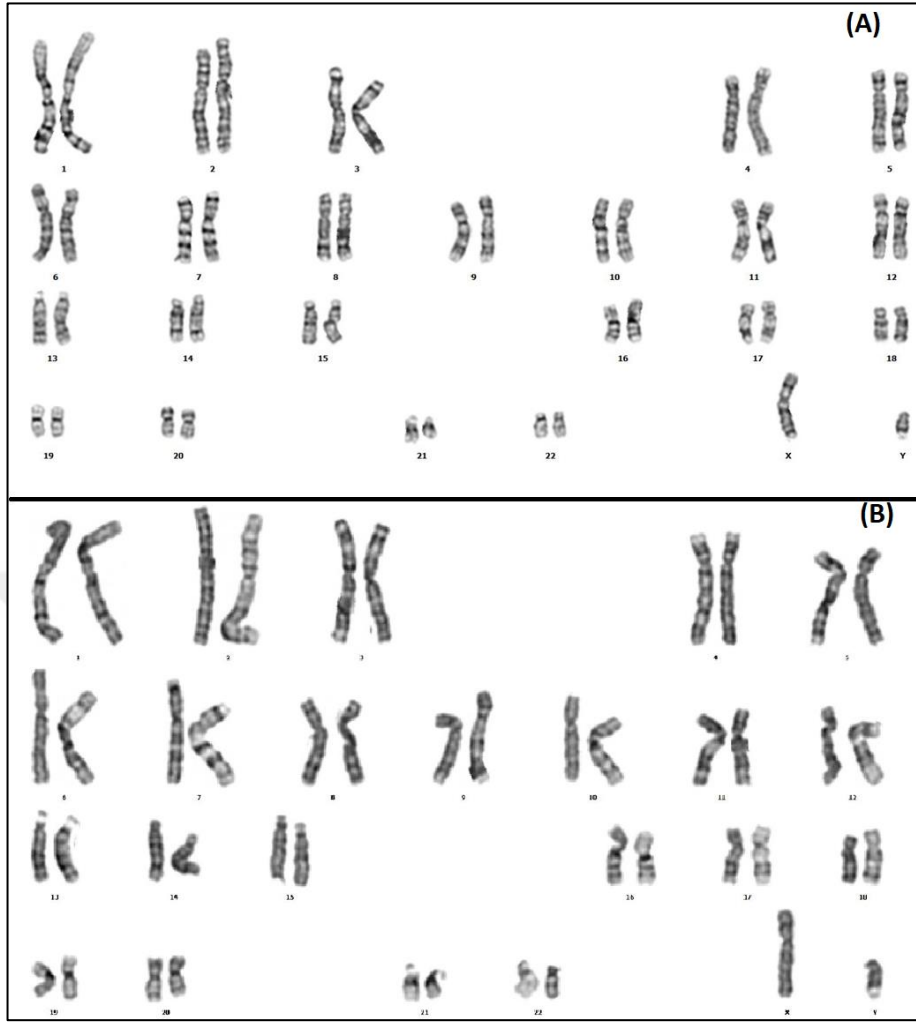
45,X/46,XY mozaikliği olan H2 olgusu kromozomal anomalisi olan 5 olgudan biriydi. 45,X/46,XY mozaikliği normal erkek fenotipinden cinsiyet gelişim bozuklukları ve Turner sendromu fenotipine kadar değişen oldukça geniş bir spektrumda klinik gösterebilen, 10.000/1.5 yenidoğanda görülen nadir bir kromozomal hastalıktır (62). İran'da bir infertilite merkezinde yapılan bir çalışmada azospermi ve oligospermisi olan erkeklerdeki sıklığıysa %0.6 olarak saptanmıştır (62). 45,X/46,XY mozaikliği olgularında azosperminin yanında ayrıca oligospermi ve hatta

normospermi de görülebilmektedir (62, 63). Ketheeswaran ve arkadaşları normospermisi, normal sınırlarda gonad hormonları ve normal boyu olan infertil erkek hastada periferik kanda konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemi ile %6 mozaiklik oranında 45,X/46,XY ve bukkal mukozada cut-off değeri olan %3'ün altında %0.6 oranında 45,X/46,XY tespit etmiştir. Spermelerde anöploidiye yönelik yaptıkları FISH sonucu normal sınırlarda çıkmış ancak nullizomik gonazomal spermeler 10 kat artmıştı. Bu durum gonadal mozaikizm ihtimaliyle açıklanmıştır (63). Boy kısalığı 45,X/46,XY'de sık görülebilen bulgulardan biridir (64, 65). Boyu 160 (-2,63 SDS) cm ve beden kitle indeksi 30.5 kg/m² olup obezite ve boy kısalığı vardı. 40 yaşındaki olgunun 14 yıllık infertilite öyküsü vardı. Ayrıca hipertansiyon, diyabetes mellitus ve romatoid artrit tanıları vardı. H2'ye yapılan kromozom analizinde 45,X[40]/46,X,del(Y)(q11.23)[10] saptandı ve hastada erkek fenotip vardı. Ayrıca X ve Y kromozomlarına yönelik periferik kandan yapılan interfaz FISH analizinde 45,X için benzer mozaiklik oranı (%70) saptandı. H2 olgusunda bu mozaikliğe ek olarak ayrıca YKM testinde ayrıca AZFb ve AZFc bölgesi delesyonları saptandı. Yapılan skrotal ultrasonografide testisler skrotumda ve 12.6 ml ve 8.1 ml hacminde olup testis volümleri azalmıştı. Olguya YÜT tedavisi uygulanmadı. 45,X/46,XY mozaik karyotipi olup oligospermisi olan erkek infertil olguda PGT ve ICSI ile canlı doğum elde edildiği literatürde bildirilmiştir fakat azospermi bulgusu olup canlı doğum elde edilen olgu bildirilmemiştir (62).

46,X,der(Y)t(Y;?)(q12;p13) kromozom kuruluşu olan H28 (şekil 8A), 43 yaşında erkek hastaydı. 9 yıldır infertilite şikayeti olan hastanın 8 yıl önce IVF tedavisiyle doğan erkek çocuğu vardı. H28'in 9 yıl önceki spermiogram analizi şiddetli oligospermi ile uyumluydu ve sperm konsantrasyonu 2 milyon/ml'ydi, güncel spermiogramıysa azospermi ile uyumluydu. Ayrıca yapılan YKM testinde AZF bölgesinde delesyon saptanmadı. H28'in ebeveynlerini fertilité problemi yaşamamışlardı ve spontan gebelikle doğan 2 çocukları vardı (H28 ve erkek kardeşi). Ayrıca hastanın amcasının oğlunda da erkek infertilitesi ve IVF ile çocuk sahibi olma öyküsü vardı. H28'in baba ve annesine de kromozom analizi yapıldığında olguyla aynı 46,X,der(Y)t(Y;?)(q12;p13) karyotipi babada da tespit edildi (Şekil 8B). Yapılan GTG, CBG, NOR bantlama ile dengesiz translokasyon ürünü olduğu düşünülen derive Y kromozomunun akrosentrik bir kromozomla Y kromozomunun translokasyonu

sonucunda çocuğa dengesiz olarak aktarılmasıyla ortaya çıktığı düşünüldü. Olgunun babasının babası hayatta olmadığı için segregasyon çalışması genişletilemedi. Muhtemelen ailede üst soylardaki akrosentrik bir kromozom ve Y kromozomu arasında dengeli translokasyonu olan erkek atadan kaynaklanıyor. H28'e yapılan SNP-Array testi sonucunda arr[GRCh38] Yq12(56,890,550_57,216,419)x1 saptandı. Bu bölgede delesyona uğrayan genler; *SPRY3*, *VAMP7*, *IL9R*, *WASIR1*, *DDX11L16* genleriydi ve PAR2 (*Pseudoautosomal Region 2*) bölgesini içeriyordu. PAR1 ve PAR2 bölgeleri Psödootozomal bölgeler olup X ve Y kromozomlarının terminal uçlarında bulunur ve mayoz sırasında eşleşip rekombinasyona uğrarlar. PAR1 bölgesi kopya sayısı değişikliklerinin spermatogenik duraklama ile ilişkisi olduğu PAR2 bölgesi kopya sayısı değişikliklerininse muhtemelen spermatogenik duraklama ile ilişkili olduğu düşünülmektedir fakat literatürde kesin veriler yoktur (66). Bu veriler ışığında hastanın ilerleyici azospermi şikayeti muhtemel olarak PAR2 bölgesi delesyonuyla ilgili olabileceği düşünüldü ve hastaya ayrıca TED testi planlandı.

AZFc delesyonu saptanan H16 olgusu 31 yaşındaydı. AZFc delesyonları AZF delesyonlarının yaklaşık %80'ini oluşturur ve en sık sebebidir (4). H16'nın histopatolojik tanısında fokal interstisyel fibrozis ve fokal spermatogenik arrest saptandı. Yapılan TESE sonucunda sperm elde edilemediği için YÜT tedavisi uygulanamadı. AZFa ve AZFb delesyonları olan olgulara TESE gibi sperm elde etme prosedürleri önerilmezken AZFc delesyonlarında sıklıkla azospermi görülsede şiddetli oligospermi de görülebilmektedir ve sperm elde edilebilmektedir. MikroTESE ile AZFc delesyonları olan hastalardan sperm elde etme oranı ortalama %47'dir (4). AZFa delesyonlarında en sık SCOS histopatoloji tanısı görülür, AZFb delesyonlarındaysa en sık maturasyon arresti tanısı görülür (4). NOA'nın histopatolojik bulgularından olan geç maturasyon arrestleri ve hipospermatogenezis olgularında sperm elde etme şansı erken maturasyon arrestleri ve SCOS'a göre sperm elde oranları daha fazladır (4). AZFc delesyonu olgularının histolojik tanılarıysa sıklık sırasına göre şöyledir; SCOS (%46), maturasyon arresti (%38,2) ve hipospermatogenezis (%15,7) dir (4).



Şekil 9 (A) H28 olgusunun kromozom analizi. (B) H28 olgusunun babasının kromozom analizi.

5.2. Tek gen defektleri

Spermatogenez, spermatogonyaların mitoz bölünmesi, mayoz bölünmeyle spermatidlerin oluşumu ve spermatidlerin olgun spermatozola dönüştüğü spermiogenez aşamalarının sonucunda matür spermatozoa üretimi sürecidir. Bu süreçte genetik düzenlemeler de önemli rol oynamaktadır ve bu aşamalardaki hatalar NOA'ya neden olabilmektedir. NOA'nın hücresel düzeydeki tek gen nedenleri tablo18'de gösterilmiştir.

Tablo18. NOA ilişkili genler ve etkilenen patolojik spermatogenez basamağı (67)

Etkilenen basamak	Görev alan genler
Yalnızca Sertoli hücresi sendromu (SCOS)	<i>NR5A1, WTI, DMRT1, FANCA, USP26</i>
Pre-mayotik arrest	<i>AR, NR5A1, APOA1, CDC14A, FSHR</i>
Mayotik/germ hücresi arrest	<i>AR, MIAP, TEX11, FANCM, MEI1, SYCP3, TEX15, CDC14A, DMRT1, FSHR, STAG3, TEX14, XRCC2</i>
Spermiogenez	<i>AURKC, CFAP43, CFAP44, CFAP251, DNAH1, DPY19L2, SUN5, CCDC39, CCDC40, CFAP65, CFAP69, DNAAF4, DNAAF6, DNAH17, LRRC6, PMFBP1, SPEF2, TTC29, ARMC2, CATSPER2, CDC14A, CEP290, CFAP91, DNAAF2, FSIP2, KLHL10, MNS1, PKD1, QRICH2, RSPH3, SEPTIN12, SYCP2, TSGA10</i>
Fertilizasyon defekti	<i>PLCZ1</i>

Güncel kılavuzlarda NOA'nın genetik etiyojisine yönelik şu anda rutin değerlendirmede kromozom analizi ve YKM testlerini önerilmektedir. Avrupa üroloji derneği (EAU), YÜT tedavileri öncesinde i. genetik anomali öyküsü olan çiftlere, ii. klinik veya genetik değerlendirme ile genetik hastalık şüphesi bulunan ve potansiyel olarak kalıtılan hastalığı olan çiftlere, iii. tüm azospermik erkekler için genetik danışmanlık önermektedir (68). NOA'lı olgular genetik danışmanlıkta YÜT elde edilen gebeliklerde çocuğa geçme riski, klinik sonuçlar ve PGT açısından bilgilendirilmelidir. NOA olgularına rutin olarak önerilen kromozom analizi ve YKM testi ile olguların yaklaşık %20'lik bir kısmına tanı koyulabilirken olguların oldukça büyük bir kısmı tanı alamamaktadır (69). Tıbbi genetik rutininde özellikle son 10 yılda TED kullanımı yaygınlaşmış ve genetik olarak heterojen olan NOA etiyojisi dahil erkek infertilitesi olgularında da tanıya yardımcı olmuştur. Özellikle TED olmak üzere yeni nesil dizileme yöntemleri aynı anda çok sayıda genetik varyasyon varlığını araştırma olanağı sağlar ve NOA etiyojisinde tanı oranını arttırmıştır (69). Moleküler genetik tanı, YÜT için sperm elde etme şansı hakkında bilgi verebilir ve infertil

çiftlerin tedavi süreci yönetimine katkısı olabilir. NOA etiyolojisiyle ilişkilendirilmediği için *CFTR* genetik değerlendirilmesi NOA için rutin test olmasa da taşıyıcılığının sık olduğu Kafkas toplumlarında çiftin çocuğunda olası kistik fibrozis hastalığı açısından infertil erkeklerde değerlendirilmesi faydalı olabilir.

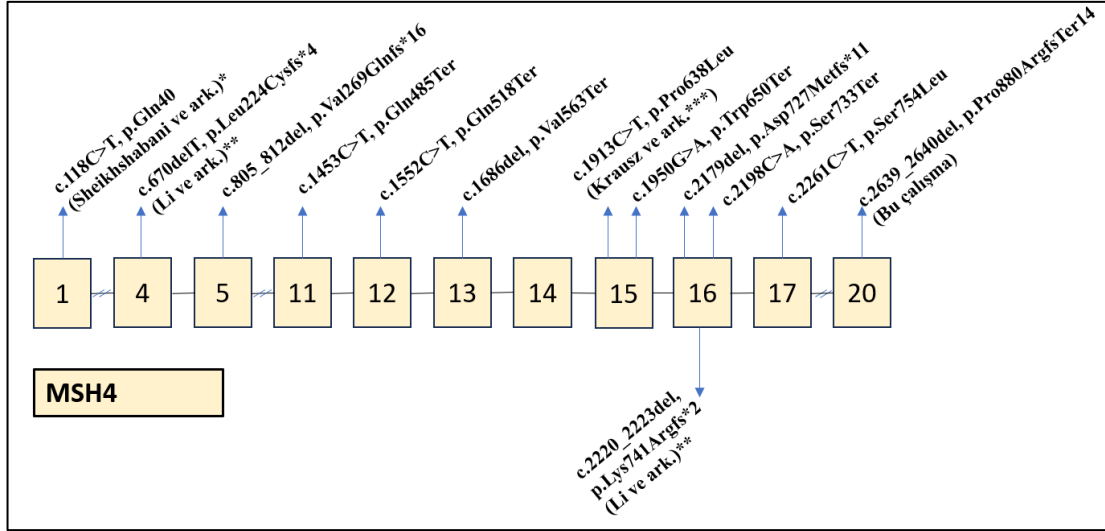
MSH4 (*MutS homolog 4*) geni (OMIM *602105) 1p31.1'e lokalize ve 20 ekzondan oluşur. *MSH4*, testiste yüksek düzeyde eksprese olur ve MutS protein homolog 4 (hMSH4), 936 aminoasit büyüklüğündedir. Mayoz I'de homolog kromozomların resiprokal rekombinasyonu ve uygun şekilde segregasyonunda rol oynar ancak *mismatch* düzeltmede görev almaz. Çift zincir kırılmalar, profaz I sırasında SPO11 aracılığıyla oluşturulur. MSH4-MSH5 heterodimeri, *double Holliday junctionları* (dHJ) stabilize ederek MLH1-MLH3 heterodimerini kendi tarafına çeker. dHJ'ler daha sonra crossing over ile çözülür ve homolog kromozomlar arasında genetik materyalin değişimine izin verir (70).

MSH4 geni OMIM veri tabanında “*Spermatogenic failure 2 #108420*” ve “*Premature ovarian failure 20 #619938*” fenotipleri ile OR kalıtım ile tanımlanmıştır. Clinvar veri tabanında şu ana kadar (değerlendirme tarihi: 19.09.2024) *MSH4* geninde 33'ü MP/P olan toplam 103 varyant bildirilmiştir. Bu veri tabanında spermatogenik yetmezlik veya NOA fenotipleri ile ilişkilendirilmiş 8 farklı MP/P varyasyon vardır (değerlendirme tarihi: 19.09.2024). Ayrıca literatürde de 4 farklı MP/P varyant bildirilmiştir (71, 72, 73) (şekil9). Bu varyantların 2'si missense olup diğer 10 varyant da bu çalışmada tespit edilen p.Pro880ArgfsTer14 varyantı gibi *truncated* (frameshift ve nonsense) varyantlardı. *MSH4* geninde tanımlanan MP ve P varyantlar genin her noktasına dağılım göstermiş olup 15 ve 16.ekzonlarda birden fazla varyant vardı, bu durum bu ekzonların olası bir *hotspot* bölge olduğunu düşündürebilirse de daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. *MSH4* geninde c.2220_2223del, p. Lys741ArgfsTer2 varyasyonu hem prematür ovaryan yetmezlik hem de NOA fenotipli olgularda bildirilmiştir (71).

Bu çalışmada birbiriyle ilişkisi olmayan 2 farklı aileden 2 farklı azospermi olgusu olan H5 ve H9'da *MSH4* geninde novel homozigot c.2639_2640del p.Pro880ArgfsTer14 varyasyonunu bildiriyoruz. Bu varyasyon ACMG kriterlerine göre MP olarak değerlendirilmektedir. Bu varyasyonun hMSH4 proteinde çerçeve

kaymasına neden olarak fonksiyon kaybına neden olması beklenmektedir. Bu varyasyon ACMG kriterlerinde göre MP olarak sınıflandırılan bir frameshift varyasyonu. H5'in ebeveynleri arasında akrabalık yoktu fakat anne ve babası yakın köylerdendi, H9'un ebeveynleri ise birinci kuzendi. p.P880Rfs*14 varyasyonunun in house veri tabanımızdaki heterozigot sıklığı %0,17 (5/2800)'di. Olguların her ikisi de Trabzonlu ve komşu ilçelerdendi. Bu durum p.P880Rfs*14 varyasyonu için Doğu Karadeniz bölgesinde potansiyel sık taşıyıcılığı olabilecek bir varyasyon olabileceğini düşündürdü. Fakat daha geniş gruplarda bu varyasyonu araştırmak gereklidir.

Matürasyon arresti bulgusu olan olgularda spermatogenez, spermatosit veya spermatid gibi belli aşamalarda germ hücre gelişimi ve farklılaşması kesintiye uğrayarak matür spermatooza üretilmemektedir (66). *MSH4* olgularının testis patolojisinde maturasyon arresti bulgusu ile gösterilmiştir (70). Maturasyon arresti olgularında normal FSH ve testis hacimleri görülebilmektedir (4). H5'te FSH artışı varken H9'da FSH düzeyi ve inhibin B düzeyi normaldi (306 pg/ml). H5'in testis hacmi normalken H9'un testis uzun aksı kısaydı (sağ:4.0 cm, sol: 4.2 cm) ancak testis hacimleri normaldi (sağ:17.1ml, sol: 17.0 ml). H9'a TESE uygulanmış olup testiküler biyopsisi sonucunda spermatogonia ağırlıklı matür spermatositlerin olmadığı doku tanısı görüldü. Bu bulgular matürasyon arresti tanısını destekliyordu. TESE sonucunda H9'dan sperm elde edilemedi. H5 için 2 kere TESE yapılmasına rağmen sperm elde edilemedi. Literatür verisi incelendiğinde az sayıda olgu olmakla beraber *MSH4* geninde varyasyonu olan NOA olgularında daha önce sperm elde edilemediği bildirilmektedir (71). *MSH4*'te daha önce genotip fenotip korelasyonu tanımlanmamıştır. Bu yorum için daha çok sayıda olguya ihtiyaç vardır.



Şekil 10. *MSH4* geninde Clinvar veri tabanında (değerlendirme tarihi: 27.09.2024) ve literatürde bildirilen NOA ve spermatogenik yetmezlik fenotipiyle ilişkili MP/P varyantlar.

*Hashemi Sheikhshabani, S (2024). A novel homozygote nonsense variant of *MSH4* leads to primary ovarian insufficiency and non-obstructive azoospermia. *Molecular biology reports* (71)

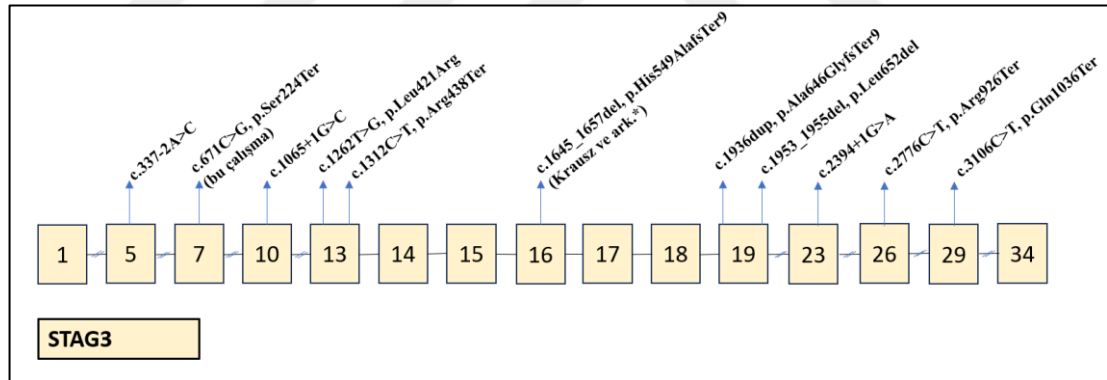
**Li, P (2022). Novel bi-allelic *MSH4* variants causes meiotic arrest and non-obstructive azoospermia. *Reproductive biology and endocrinology* (72)

***Krausz, C. (2020). Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* (73)

STAG3 (*STAG3 Cohesin Complex Component*) geni 7q22.1’de lokalize olup 34 ekzondan oluşur ve büyük bir protein kompleksi olan kohezinin subunitini kodlar. Kohezin kompleksi, kardeş kromatidlerin uygun şekilde eşleştirilmesi ve anafazda düzgün şekilde segregasyonu için gereklidir (74). *STAG3* testiste yüksek düzeyde eksprese olur ve Cohesin subunit SA-3 proteini 1225 aminoasitten oluşur.

STAG3 geni OMIM veri tabanında “*Spermatogenic failure 61* #619672” ve “*Premature ovarian failure 8* #615723” fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir. Bugüne kadar Clinvar veri tabanında (değerlendirme tarihi: 19.09.2024) *STAG3* geninde 179 varyasyon bildirilmiştir ve 43’ü MP/P’dir. Clinvar veri tabanında spermatogenik yetmezlik veya NOA fenotipleri ile ilişkilendirilmiş 9 farklı MP/P varyasyon vardır (değerlendirme tarihi: 19.09.2024). Ayrıca literatürde de MP c.1645_1657del,

p.His549AlafsTer9 varyantı bildirilmiştir (73) (şekil10). Bu varyantların 3'ü splice-site, 3'ü stop-gain, 2'si frameshift, 1'i in frame delesyon, 1'i de missense varyasyonlardı. Bu çalışmada da H12'de daha önce literatürde bu gende bildirilmiş bir varyant tipi olan stop-gain novel c.671C>G, p.Ser224Ter varyasyonu tespit edildi. Bu varyasyon ACMG kriterlerine göre MP olarak değerlendirilmektedir. Bu varyasyonun prematür stop kodon oluşmasına neden olarak güdük Cohesin subunit SA-3 proteini oluşması beklenmektedir. Patojenik truncating varyantları olan prematür ovaryan yetmezlik olgularında C-terminal ucunun kaybının olması bu bölgenin mayozda önemli rolü olduğunu düşündürmüştür (75). H12'nin FSH'ı normal aralıktaydı (4 IU/L), testis biyopsisindeyse hipospermatogenez ve spermatogenik arrest saptanmış ve matür spermatogenez gözlenmemiştir. *STAG3* varyantları maturasyon arresti patoloji bulgusu ile ilişkilendirilmiştir (74). *STAG3* geninde tanımlanan MP ve P varyantlar genin her noktasına dağılım göstermiştir (şekil 10). *STAG3* geni için erkeklerde bilinen bir genotip fenotip korelasyonu yoktur.



Şekil 11. *STAG3* geninde Clinvar veri tabanında (değerlendirme tarihi: 27.09.2024) ve literatürde bildirilen NOA ve spermatogenik yetmezlik fenotipiyle ilişkili MP/P varyantlar.

*Krausz, C. (2020). Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics* (73)

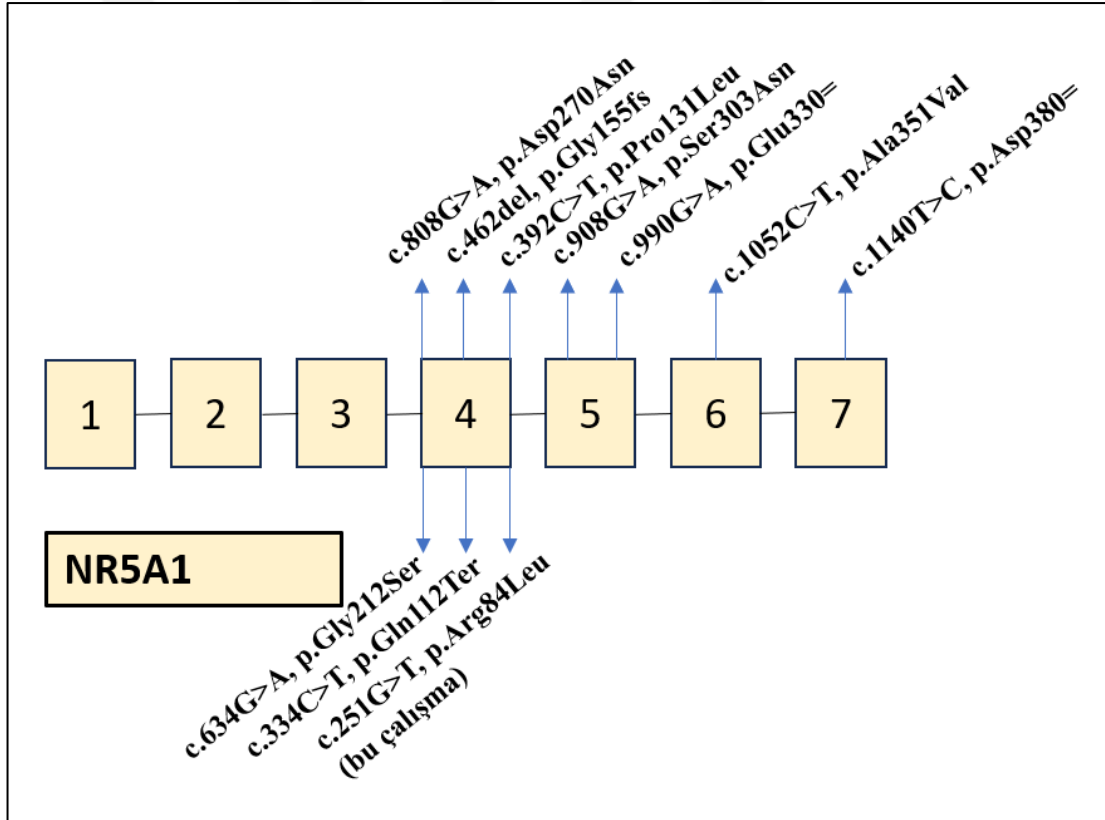
NR5A1 geni 9q33.3'e lokalize 7 ekzondan oluşan nükleer reseptör superfamily'e ait bir transkripsiyon faktörüdür ve AGGTCA core motifine bağlanarak reproduksiyon, steroidogenez ve cinsel farklılaşmayla ilgili birçok geni düzenler. *NR5A1* en çok adrenal bezlerde ve dalakta ardından lenf nodu ve testislerde eksprese olmaktadır ve Steroidogenic factor 1(SF1) proteini 461 aminoasitten oluşmaktadır.

NR5A1 geni OMIM veri tabanında “46XX sex reversal 4 #617480”, “46XY sex reversal 3 #612965”, “Adrenocortical insufficiency #612964”, “Premature ovarian failure 7 #612964” ve “Spermatogenic failure 8 #613957” fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir. Bu fenotipler cinsel gelişim bozukluğundan kadın ve erkek infertilitesine kadar değişen ağırlıkta oldukça farklılık göstermektedir. Erkek infertil olgularda klinik oligospermiden azospermiye geçebilmektedir (76). Aynı ailede aynı varyasyonu taşıyan ailelerde bile farklı klinik gösterilmiştir veya bazı olgular klinik göstermemiştir (77, 78). Bu durum genetik modifierlar veya oligenik kalıtımı ihtimalini düşündürmektedir (76). Fakat *NR5A1* geni için net bir genotip fenotip korelasyonu kurulamamıştır (76).

Bugüne kadar Clinvar veri tabanında (değerlendirme tarihi: 19.09.2024) *NR5A1* geninde 291 varyasyon bildirilmiştir ve 136'sı MP/P'dir. Clinvar veri tabanında spermatogenik yetmezlik veya erkek infertilitesi fenotipleri ile ilişkilendirilmiş 9 farklı MP/P varyasyon vardır (değerlendirme tarihi: 19.09.2024) (şekil 11). Bu varyantların 5'i missense, 2'si sinonim, 1'i frameshift, 1'i stop-gain varyasyonlardı. SF1'deki heterozigot *loss of function (LOF)* varyasyonlar hastalık yapıcı olabilmektedir. Varyantların çoğu, bu çalışmadaki p.Arg84Leu dahil, *DNA Binding domainde* yer almaktadır (78). Bu çalışmada H30'da tanımlı missense c.251G>T, p.Arg84Leu varyasyonu tespit edildi. p.Arg84Leu varyantı daha önce primer ovaryan yetmezlik olgusunda gösterilmiştir (79). Bu varyant evrimsel olarak türler arasında korunmuştur ve ACMG'ye göre MP olarak değerlendirilmektedir.

H30'un hipospaidas için cerrahi öyküsü ve klinik NOA tanısı vardı. Bunun dışında klinik özelliği olmayan 28 yaşında erkek hastaydı. Testis volümleri azalmış (4.7 ml ve 3.2 ml) ve FSH'ı artmıştı (42.07 IU/L). Yapılan TESE'de sperm elde edilmiş, ICSI ile embriyo oluşmuş fakat başarılı embriyo transferi yapılamamıştır. *NR5A1* olgularında testiküler biyopside normal spermatogenezden SCOS'a değişen

histopatolojik bulgu bildirilmiştir (80). Testiküler biyopside tubullerin %95'inde germ hücre aplazisi/SCOS, %5'inde seyrek genç spermatosit ve az sayıda spermatid görüldü ve fokal spermatogenez mevcut olarak yorumlandı. *NR5A1* varyasyonu olan NOA olgularında mikroTESE ile az sayıda spermatozoa elde edilebildiği literatürde bildirilmiştir (81). Olgunun ebeveynlerinin DNA'sına erişilemediği için segregasyon yapılamadı fakat hastanın bir erkek kardeşi olup kardeşi çocuk sahibiydi, ancak amcasının kızı ve teyzesinin oğlunda infertilite öyküsü vardı ve çocuk sahibi değillerdi. Bu gen dozaj bağımlılığı gösterip eksik penetrans ve değişken ekspresivite göstermektedir (77).



Şekil 12. *NR5A1* geninde Clinvar veri tabanında (değerlendirme tarihi: 27.09.2024) bildirilen spermatogenik yetmezlik ve erkek infertilitesi fenotipiyle ilişkili MP/P varyantlar.

MSH4, *STAG3*, *NR5A1* genlerinin patolojileri hem kadın hem de erkekte infertilite nedeni olarak bildirilmiştir. Bu genlerde kliniği açıklayabilecek varyasyon saptanan indeks olgulara (H5, H9, H12, H30) genetik danışmanlık verilip ebeveynleri ve risk altındaki kız ve erkek kardeşleri için aile taraması önerilmiştir. H12 hariç diğer olgular (H5, H9, H30) aile taraması çalışmasını kabul etmedikleri için segregasyon yapılamamıştır. İnfertilite hala pek çok toplumda bir tabu olmaya devam etmektedir ve yetişkin bireyler infertilite problemlerini ebeveynleri ile paylaşmayabiliyorlar. Bu nedenler ve geniş ailelerde tarama yapılması zorluğu bu çalışmanın ve infertilite genetiği çalışmalarının kısıtlılıklarındandır.

13 olguda NOA ilişkili 10 gende (*AR*, *FGFR1*, *KLHL10*, *NR5A1*, *RANBP2*, *SIX5*, *SOHLH1*, *SYCP2*, *TEX11*, *WT1*) 14 farklı heterozigot, hemizigot ve multipl heterozigot VUS varyant tespit edildi (Tablo15). Saptanan 14 farklı varyantın tamamı missense varyantlardı ve VUS olarak değerlendirildi.

AR geni varyasyonları OMIM veri tabanında X'e bağlı kalıtım ile “{Prostate cancer, susceptibility to} #301120”, “Androgen insensitivity #300068”, “Androgen insensitivity, partial, with or without breast cancer #312300”, “Hypospadias 1, X-linked #300633”, “Spinal and bulbar muscular atrophy, X-linked 1 #313200” fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir. Bu 14 varyanttan *AR* geni c.1152C>G, p.His384Gln varyantı hem H8 hem H25'te saptandı. İki olgunun da testis volümleri azalmış ve FSH'ı artmıştı. *AR* geni Xq12'de lokalize olup steroid hormon nükleer reseptör ailesi üyesidir ve spermatogenezde rol oynayan bir ligand-bağımlı transkripsiyon faktörü olan *Androgen receptoru* kodlar (82). H8 ve H25 olgularında ortak saptanan p.His384Gln varyasyonu inhouse veriler incelendiğinde bu iki olgu hariç epilepsi nedeniyle TED yapılan erkek pediatrik bir olguda daha saptanmıştı (1/2800). Ayrıca p.His384Gln varyasyonu GnomAD v4.1.0'da 3 olguda hemizigot olarak bildirilmişti ve 0.00001071 allel frekansındaydı. *Androgen receptor* proteini sırasıyla N-terminal domain, DNA binding domain ve Ligand binding domaininden oluşmaktadır. Yuan Y ve arkadaşları Ligand binding domaininde bulunan missense hemizigot varyasyonu olan ve ailesinde infertilite öyküsü olan azospermik olguyu bildirmiştir (83). Bu çalışmada iki farklı (H8 ve H25) ilgisiz NOA olgusunda saptadığımız p.His384Gln missense varyasyonu N-terminal domain'dedir. H8'in infertil iki dayısı vardı ve *AR* geninin X'e bağlı kalıtım gösterdiği düşünüldüğünde bu varyasyon için anlamlı olabileceğini

düşündürse de bu varyasyon ACMG kriterlerine göre (PM2, PP2) klinik önemi bilinmeyen değişiklik olarak sınıflandırılmaktadır. NOA kliniğine etkisi olup olmadığını değerlendirebilmek için daha çok veriye, fonksiyonel çalışmalara ve geniş segregasyona ihtiyaç vardır.

KLHL10 geni varyasyonları OMIM veri tabanında OD kalıtım ile “Spermatogenic failure 11 #615081” fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. *KLHL10* geni c.1070A>G, p.Lys357Arg missense varyantıysa hem H15 hem H26’da saptandı. Clinvar veri tabanında *KLHL10* geninde bir missense varyasyon patojenik olarak bildirilmiştir. *KLHL10*’nin spermatogenez sırasında görev alan CUL3 tabanlı E3 ubiquitin-protein ligaz kompleksinin substrat-spesifik adaptörü olabileceği düşünülmektedir H15 ve H26 olgularında ortak saptanan c.1070A>G p.Lys357Arg varyasyonu TED yapılan olguların in house veriler incelendiğinde bu iki olgu hariç toplam 8 hastada heterozigot olarak (8/2800) saptanmıştır. Ayrıca p.Lys357Arg varyasyonu GnomAD v4.1.0’da 1 olguda homozigot olarak bildirilmişti ve erkeklerdeki sıklığı 0.00005488 allel frekansındaydı. H26’ya yapılan TESE’de sperm elde edildi ve 6 iyi kalitede embriyo oluştu. Testiküler biyopsiye ağırlıklı olarak SCOS olup az sayıda tubulusta spermatogonium ve primer spermatosit görülmüştü. p.Lys357Arg varyasyonun GnomAD’de homozigot olarak gösterilmesi ve inhouse sıklığı da göz önünde bulundurulduğunda ACMG kriterlerine göre (PM2) VUS olarak değerlendirilen bu varyasyonun kliniği açıklıyor olma ihtimalinin düşük olduğu düşünüldü. NOA kliniğine etkisi olup olmadığını değerlendirebilmek için daha çok veriye ihtiyaç vardır.

FGFR1 geni varyasyonları OMIM veri tabanında OD kalıtım ile “Hartsfield syndrome #615465”, “Hypogonadotropic hypogonadism 2 with or without anosmia #147950”, “Jackson-Weiss syndrome #123150”, “Osteoglophonic dysplasia #166250”, “Pfeiffer syndrome #101600”, “Trigonocephaly 1 #190440” fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir. H30’da c.1229G>A, p.Ser410Asn ve H6’da c.1520G>A, p.Arg507His heterozigot VUS varyasyonları saptanmıştır. H6 ve H30 olgularının FSH’ı artmış ve testis volümleri azalmıştı. p.Ser410Asn’nın GnomAD v4.1.0’daki allel frekansı 0.000006815’dir. p.Arg507His’nın GnomAD v4.1.0’daki allel frekansı 0.0001468’dı, ayrıca bir kadında homozigot olarak bildirilmiştir. Hipogonadotropik

hipogonadizm fenotipiyle de ilişkili *FGFR1* genindeki bu varyasyonlarının H6 ve H30’da kliniği uyumsuz olarak yorumlanmıştır.

SOHLH1 geni varyasyonları OMIM veri tabanında OD kalıtım ile “Spermatogenic failure 32 #618115” fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. Hem erkek hem de dişi germline diferansiyasyonu transkripsiyon düzenleyicisidir. H11’de c.68G>C, p.Gly23Ala ve H12’de c.868G>C, p.Glu290Gln heterozigot missense varyasyonları saptanmıştır. H11’in FSH’ı artmıştı ve H12’ninse normal aralıktaydı. p.Gly23Ala’nın GnomAD v4.1.0’daki allel frekansı 0.0001477’dır ve biri erkek olan 2 ayrı kişide homozigot olarak gösterilmiştir. p.Glu290Gln’nın GnomAD v4.1.0’daki allel frekansı 0.0001531’di, ayrıca bir kadında homozigot olarak bildirilmiştir. Her iki varyant da ACMG’ye göre VUS (PM2, BP4) değerlendirilmektedir. H11’de saptanan p.Gly23Ala varyasyonu TED yapılan hastaların in house verileri incelendiğinde 11 olguda heterozigot olarak saptanmıştı (11/2800). H12’de saptanan p.Glu290Gln varyasyonu TED yapılan hastaların in house verileri incelendiğinde 1 olguda heterozigot olarak saptanmıştı (1/2800). VUS olarak değerlendirilen bu varyasyonların NOA kliniğine etkisi olup olmadığını değerlendirebilmek için daha çok veriye ihtiyaç vardır.

RANBP2 geni infertiliteyle ilgili bir OMIM fenotipiyle ilişkilendirilmemiş olup NOA ile ilgili aday gen olarak sınıflandırılmıştır. Spermatogeneze ilişkilendirilmiştir. OMIM veri tabanında OD kalıtım ile “{Encephalopathy, acute, infection-induced, 3, susceptibility to} #608033” fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. *RANBP2* geni çok sayıda dokuda eksprese olmakla birlikte en çok testiste eksprese olur. H19’da *RANBP2* geninde c.5431C>T, p.His1811Tyr ve c.3596C>G, p.Ala1199Gly missense varyantları saptanmıştır. p.His1811Tyr varyasyonu TED yapılan olgulardan elde edilen in house veride (3/2800) olguda heterozigot olarak gösterilmiştir. p.Ala1199Gly varyasyonu TED yapılan olgulardan elde edilen in house veride 4/2800 olguda heterozigot olarak gösterilmiştir. p.His1811Tyr ve p.Ala1199Gly varyasyonları GnomAD v4.1.0’da bildirilmemiştir. *RANBP2* geni NOA ilişkili aday genlerdendir. *RANBP2* nükleer por kompleksinin parçası olup protein import ve exportunda görev alır (84). *RANBP2* biallelik null allel olan farelerin embriyonik lethal olduğu gösterilmiştir (85). Ayrıca RanBP1-knockout farelerde spermatogenezin spermatid uzaması aşamasında *RANBP2*’nin azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (86). Her iki varyant da ACMG’ye göre VUS olarak değerlendirilmektedir ve NOA kliniğine etkisi olup

olmadığını değerlendirebilmek için genin fonksiyonuyla alakalı daha çok veriye ihtiyaç vardır.

SIX5 geni infertiliteyle ilgili bir OMIM fenotipiyle ilişkilendirilmemiş olup NOA ile ilgili aday gen olarak sınıflandırılmıştır. Spermatogenezle ilişkilendirilmiştir. OMIM veri tabanında “Branchiootorenal syndrome 2 #610896” fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. *SIX5* geni çok sayıda dokuda eksprese olmakla birlikte en çok over, prostat ve endometriumda eksprese olur. H29’da *SIX5* geninde c.1687C>T, p.Leu563Phe ve c.2150G>A, p.Gly717Glu missense VUS varyantları saptanmıştır. H5’in testis volümleri azalmış ancak FSH’ı normal aralıktaydı. *SIX5* geni p.Leu563Phe varyantının GnomAD’deki allel sıklığı 0.00003723’tür. *SIX5* geni p.Gly717Glu varyantının GnomAD’deki allel sıklığı 0.000002479’dur. p.Leu563Phe ve p.Gly717Glu varyasyonları in house verideki 5 olguda ortak gösterilmiştir. Bu durum bu varyantların cis pozisyonunda olabileceğini düşündürmüştür. p.Gly717Glu varyasyonu TED yapılan olgulardan elde edilen in house veride 7/2800 olguda, p.Leu563Phe varyantı 8/2800 olguda heterozigot olarak gösterilmiştir. *SIX5*’in kesin fonksiyonu bilinmemekle birlikte organogenezin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen bir transkripsiyon faktörüdür. NOA kliniğine etkisi olup olmadığını değerlendirebilmek için öncelikle genin fonksiyonu ile alakalı daha çok veriye ihtiyaç vardır.

TEX11 geni varyasyonları OMIM veri tabanında X’e bağlı kalıtım ile “Spermatogenic failure, X-linked 2 #309120” fenotipiyle ilişkilendirilmiştir ve NOA ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Kromozom sinapsisinin başlatılması ve/veya sürdürülmesi ve çaprazlamaların oluşumunda rol oynayıp mayozda crosing-over düzenleyicisidir. B tipi spermatogonyumlarda ve erken spermatositlerde *TEX11* proteininin bol miktarda eksprese edilmektedir ve bu durum *TEX11*’in germ hücre gelişiminde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (87). *TEX11*’i yetersiz spermatositler genellikle pakiten aşamasında apoptoza uğrar veya hayatta kalırlarsa mayozda kromozomal ayrışma göstermeyip hücre ölümü ve infertiliteye yol açar (87). H23’te *TEX11* geni c.1154T>C, p.Leu385Ser heterozigot missense varyasyonu saptanmıştır. H23’ün FSH’ı normal aralıkta testis volümleri ise azalmıştı. p.Leu385Ser’nın GnomAD v4.1.0’daki allel frekansı 0.000003309’dır ve bir erkekte hemizigot olarak gösterilmiştir. p.Leu385Ser, Meiosis-specific SPO22 domainindedir.

Clinvar veri tabanında *TEX11* geninde NOA ile ilişkilendirilen patojenik olarak sınıflandırılan missense bir varyasyon bildirilmiştir (değerlendirme tarihi: 30.09.2024) *TEX11* missense varyasyonlarının çoğu Clinvar veri tabanında VUS/Muhtemel benign/Benign olarak bildirilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada *TEX11* geni SPO22 domainini de kodlayan ekzon 9-11 delesyonu olan dişi ve erkek farelerin fertil olduğu gösterilmiştir (88). *TEX11* geni p.Leu385Ser varyantı ACMG'ye göre VUS (PM2, BP4) değerlendirilmektedir. H23'te saptanan p.Leu385Ser varyasyonu TED yapılan hastaların in house verileri incelendiğinde 6 olguda heterozigot/hemizigot olarak saptanmıştı (6/2800). VUS olarak değerlendirilen bu varyasyonların NOA kliniğine etkisi olup olmadığını değerlendirebilmek için daha çok veriye ihtiyaç vardır.

WT1 geni infertiliteyle ilgili bir OMIM fenotipiyle ilişkilendirilmemiş olup NOA'nın sendromik nedenlerindendir (46). *WT1*, hücre gelişimi ve hayatta kalmasında önemli rol oynayan transkripsiyon faktörüdür. *WT1* en çok endometrium ardından sırasıyla testis ve overlerde eksprese olmaktadır. *WT1* genindeki defektler ağırlıklı olarak genitoüriner sistemi etkileyen farklı konjenital sendromlara neden olur (OMIM *607102). Literatürde *WT1* proteininin C-terminal ucundaki nonsense veya missense varyasyonları sonucu şiddetli genitoüriner fenotipler ortaya çıkarken, konjenital ürogenital anomaliler olmadan erkek infertilitesi gibi bulgular genellikle *WT1* proteininin N-terminal uçtaki varyasyonlarla ilişkilendirilmiştir (89). Ayrıca *WT1* proteininin N-terminalindeki missense varyantların sağlıklı erkeklerde izole spermatogenik yetmezliğe neden olabileceği gibi gonad ve böbrek gelişiminde hafif bozukluklarla da gösterebileceği düşünülmektedir (89).

H22'de *WT1* geni ekzon 1'de c.98C>A, p.Pro33Gln heterozigot missense varyasyonu saptanmıştır. H22'nin FSH'ı artmış ve testis volümleri azalmıştı. p.Pro33Gln varyantı GnomAD v4.1.0'da gösterilmemiştir. Bu varyant da ACMG'ye göre VUS (PM2, PP2, BP4) olarak değerlendirilmektedir. H22'de saptanan p.Pro33Gln varyasyonu TED yapılan hastaların in house verileri incelendiğinde başka bir olguda gösterilmemiştir (0/2800). p.Pro33Gln oldukça nadir bir varyasyon ve *WT1* proteininin N-terminal ucunda yer almaktadır. ACMG'ye göre VUS olarak değerlendirilen bu varyantın NOA kliniğine etkisi olup olmadığını değerlendirebilmek için daha çok veriye ihtiyaç vardır.

NR5A1 geni OMIM veri tabanında OD kalıtım gösteren “46XX sex reversal 4 #617480”, “46XY sex reversal 3 #612965”, “Adrenocortical insufficiency #612964”, “Premature ovarian failure 7 #612964” ve “Spermatogenic failure 8 #613957” fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir. *NR5A1* olgularında klinik oldukça değişkendir ve aynı ailede aynı varyasyonu taşıyan ailelerde bile farklı klinik gösterilmiştir (77, 78). Clinvar veri tabanında NOA ilişkili varyasyonlar missense varyasyon ağırlıklıdır. H17’de c.673G>A, p.Glu225Lys heterozigot missense varyasyonu saptanmıştır. H17’de FSH normal testis volümleri ise azalmıştı. p.Glu225Lys’nın GnomAD v4.1.0’daki allel frekansı 0.000001908’dır. p.Glu225Lys varyantı ACMG’ye göre VUS (PM1, PM2, PP2) olarak değerlendirilmektedir. H17’de saptanan p.Glu225Lys varyasyonu TED yapılan hastaların in house verileri incelendiğinde 9 olguda heterozigot olarak saptanmıştı (9/2800). p.Glu225Lys, SF1 proteininde *hinge* bölgesi ve Ligand bağlayıcı domain sınırında bulunmaktadır. SF1 proteini *Hinge* bölgesi ve civarındaki varyantların sonucunda ağırlıklı olarak erkek infertilitesi olduğu gösterilmiştir (90). p.Glu225Lys varyasyonu için aile taraması yapıldığında varyasyonun anneden kalıtıldığı görüldü. H17’nin annesinin 5 gebeliği vardı ve diğer 4 kız kardeşin tamamı çocuk sahibiydi. Yapılan TESE’de sperm elde edilebildi ve ICSI ile 2 embriyo oluştuysa da transfer sonrası gebelik elde edilemedi. VUS olarak değerlendirilen bu varyasyonların NOA kliniğine etkisi olup olmadığını değerlendirebilmek için daha çok veriye ihtiyaç vardır.

SYCP2 varyasyonları OMIM veri tabanında OD kalıtım ile “Spermatogenic failure 1 #258150” fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. Mayoz bölünme sırasında profazda sinaptonemal komplekslerin (SCS) aksiyal/lateral elemanlarının ana bileşenidir. Sinaptonemal komplekslerin bir araya getirilmesinde rol oynar. Oosit ve spermatosit gelişimi sırasında normal mayotik kromozom sinapsı ve normal erkek ve dişi fertilitesi için gereklidir. H19’de c.3770A>T, p.Lys1257Met heterozigot missense varyasyonları saptanmıştır. *SYCP2* geni p.Lys1257Met varyasyonu için ebeveynler değerlendirildiğinde babadan kalıtıldığı görülmüştür. H19’un FSH’ı artmış testis volümleriyse normaldi. Clinvar veri tabanında *SYCP2* geninde MP/P olarak bildirilen NOA ilişkili varyantların tamamı frameshift, splice site gibi truncating varyantlarıdır (değerlendirme tarihi: 30.09.2024). p.Lys1257Met’nın GnomAD v4.1.0’daki allel frekansı 0.000008078’dır. Bu varyant ACMG’ye göre VUS (PM2, BP4)

değerlendirilmektedir. H19’da saptanan p.Lys1257Met varyasyonu TED yapılan hastaların in house verileri incelendiğinde 1 olguda heterozigot olarak saptanmıştı (1/2800). VUS olarak değerlendirilen bu varyasyonun NOA kliniğine etkisi olup olmadığını değerlendirebilmek için daha çok veriye ihtiyaç vardır

NOA ilişkili genlerde otozomal resesif kalıtım gösterip heterozigot MP veya P varyantlar da saptanmıştır. Bunlar; H15’te heterozigot MP *PDHA2* c.599G>A, p.Gly200Glu ve patojenik *TEX15* c.6848_6849del, p.Arg2283AsnfsTer22 varyasyonları ve H24’te heterozigot MP *DNHDI* c.7165G>T, p.Glu2389Ter varyasyonlarıydı. Bu olgularda ikinci bir varyasyon saptanamamış da olsa TED’in kapsamı dışında kalan ikinci olası varyantlar (intronik, yapısal varyantlar) saptanamamış olabilir. Tüm genom dizileme (TGD) TED’den üstün olarak intronik ve yapısal varyantları değerlendirebilmektedir.

176 genlik NOA genleri dışında kalan ve spermatogenez ilişkili genler ayrıca tablo 17’de belirtilmiştir. TED yapılan 25 hastada spermatogenezle ilişkili 69 gende 97 farklı (toplam 101) varyasyon saptandı. Bazı önemli olabilecek varyantlar şöyledir;

H4’te *DNAH8* geni homozigot VUS c.9890C>T, p.Ser3297Phe varyasyonu saptanmıştır. Yapılan aile taramasında bu varyasyon annede heterozigot babadaysa homozigot olarak saptanmıştır. p.Ser3297Phe varyasyonunun GnomAd v4.1.0’daki allel frekansı 0.0000006199’dır. H4’ün 2 kardeşi daha vardı ve ebeveynleri arasında akrabalık vardı. Fertil olan babanın da aynı varyasyon açısından homozigot saptanması bu varyasyonun NOA kliniğine etkisi olma ihtimalini azaltmaktadır.

H19’da *RGN* geninde homozigot frameshift c.673del, p.Ile225PhefsTer3 VUS varyasyonu saptanmıştır. GnomAD v4.1.0’da allel frekansı 0.0000008264’dır. Clinvar veri tabanında *RGN* geni ilişkili bildirilmiş MP/P varyantlar arasında daha önce tek nükleotid değişimi olmamıştır (değerlendirme tarihi: 30.09.2024). *RGN* geni OMIM veri tabanında henüz herhangi bir fenotiple ilişkilendirilmemiştir. Regünokalsin (RGN) hücre içi kalsiyum homeostazını düzenleyen bir kalsiyum bağlayıcı proteindir (91). Literatürde spermatogenez ve erkek fertilitésinin düzenlenmesi için kalsiyum homeostazının önemli rolü olduğu gösterilmiştir (91). *RGN*’nin spermatogenezin düzenlenmesinde doğrudan veya androjen yanıtı aracı olarak rol oynayabileceği düşünülmektedir (92). *RGN* geni ile ilişkilendirilmiş bir fenotip olmasa da ACMG’ye

göre VUS olarak sınıflandırılrsa da homozigot frameshift bir varyant olduğu için spermatogenezi etkiliyor olabilir.

CFTR geninde 3 olguda heterozigot (H8, H21, H25) MP/P, 1 olguda heterozigot (H18) VUS varyant saptanmıştır. Olguların hiçbirinde vas deferens yokluğu bulgusu yoktu. Olgularının H21 hariç hepsinin FSH'ı artmıştı ve H8, H21, H25'nin testis volümleri azalmıştı, ayrıca semen volümü >2 ml ve pH >7.5 olup obstrüktif azospermi düşündürecek bulgu yoktu. Biallelik *CFTR* varyasyonları obstrüktif azospermi nedenlerinden biridir. Ayrıca tek varyasyon varlığında da vas deferens yokluğu gibi obstrüktif azospermi nedenleri gösterilmiştir. Literatürde spermatogeneze dahil olduğunu öne süren çalışmalarla birlikte NOA'lı olgular ve genel popülasyon arasında *CFTR* varyantlarının sıklığı arasında önemli bir farklılık yoktu (93). 100 NOA'lı erkekte yapılan bir çalışmada T5 aleli ve TG12-T5-V470 genotipleri NOA için yüksek riskli bulunup F508del ve R117H varyasyonları riskli bulunmadı (68). *CFTR*'nin spermatogeneze etkisi konusunda kesin bir veri yoktur.

H7'de *DNAH1* geninde patojenik c.2602C>T, p.Arg868Ter ve VUS c.6707C>T, p.Thr2236Ile heterozigot varyasyonları saptanmıştır. p.Arg868Ter varyasyonunun GnomAD v4.1.0'daki sıklığı 0.000004960'dır. p.Thr2236Ile varyasyonunun GnomAD v4.1.0'daki sıklığı 0.00004523'dür. p.Arg868Ter varyasyonu in house veri tabanında daha önce bildirilmemiştir (0/2800). p.Thr2236Ile varyasyonu in house veri tabanında daha önce 1 kere bildirilmiştir (1/2800). *DNAH1* geni OMIM veri tabanında OR kalıtım gösteren "Spermatogenic failure 18 #617576" ve "Ciliary dyskinesia, primary, 37 #617577" fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir. *DNAH1* geni sperm flagella hareketliliği için gereklidir ve iç dinein kollarının oluşumu ve aksonom biyogenezi için spermatozoa'da gereklidir. Multipl heterozigot varyantlar için cis veya trans pozisyonunda olup olmadığını değerlendirmek için H7'nin ebeveynlerine ulaşılamadı.

H19'da *DNAH2* geninde VUS c.10690G>A, p.Gly3564Ser ve c.5431G>A, p.Glu1811Lys varyantları saptanmıştır. p.Gly3564Ser varyasyonunun GnomAD sıklığı 0.0005998'dir. p.Glu1811Lys varyasyonunun GnomAD sıklığı 0.000008054. p.Gly3564Ser varyasyonu TED yapılan in house veri tabanında 23 olguda heterozigot olarak gösterilmişti (23/2800). p.Glu1811Lys varyasyonu TED yapılan in house veri

tabanında 2 olguda heterozigot olarak gösterilmişti (2/2800). *DNAH2* geni OMIM veri tabanında OR kalıtım gösteren “Spermatogenic failure 45 #619094” fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. *DNAH2* geni sperm flagella hareketliliği için gereklidir.

H11’de *CFAP47* hemizigot VUS c.9044T>C, p.Ile3015Thr varyantı saptanmıştır. *CFAP47* geni OMIM veri tabanında X’e bağlı kalıtım gösteren “Spermatogenic failure, X-linked #301059” fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. GnomAD v4.1.0’daki allel frekansı 0.0002145’dir. p.Ile3015Thr varyasyonu TED yapılan in house veri tabanında daha önce gösterilmemişti. *CFAP47* sperm flagellası ve motilitesinde rol oynar.

Sonuç olarak bu çalışmada yeni nesil dizileme yöntemiyle yapılan TED testi, kromozom analizi ve YKM testi ile 31 NOA olgusunun 10’una klinikle ilgili olan genetik anormallikler saptandı ve toplam tanı başarısı %32,2 oldu. TED, NOA ilişkili olduğu bilinen *MSH4* (2 olgu), *NR5A1* (1 olgu) ve *STAG3* (1 olgu) genlerinde nadir tek gen defektlerini saptayarak NOA olgularında tanı oranını arttırmıştır. 2 farklı NOA olgusundaysa NOA aday genlerinden *RANBP2* ve *SIX5* genlerinde multipl heterozigot VUS varyantlar saptanmıştır. Bu veriler ışığında sekonder sebeplerin dışlandığı NOA olgularında TED testinin tanısal olarak rutin kullanıma girmesi tanı başarısını artırarak çiftlerin genetik danışmanlık, fertilite planları ve tedavilerine yardımcı olabilir.

6.SONUÇ

Bu çalışmada NOA ön tanılı 31 yetişkin erkek hastada genetik nedenler araştırıldı. 31 olgunun tamamına kromozom analizi ve YKM testleri, 25 olguyaysa TED testleri yapıldı.

1. Türkiye’de ilk kez görece büyük bir NOA hasta grubunda (25 olgu) TED ile genetik etiyolojiler araştırıldı.
2. 31 NOA olgusunun 5’inde kromozomal anormallikler saptandı ve tanı oranı %16,1’di. 31 NOA olgusunun 1’inde AZFc delesyonu saptandı ve tanı oranı %3,2’di. Kısıtlı hasta sayısına rağmen literatürle uyumlu tanı başarısı oranları bulundu.
3. Literatürde NOA olgularında akraba evliliğinin genel popülasyona göre daha sık olduğuna dair veriler vardır ve bu çalışmada da akraba evliliği oranı Türkiye’deki akraba evliliği oranına göre daha yüksekti (%54,8). Spermatogenik yetersizlik nedenlerinin ağırlıklı olarak otozomal resesif kalıtım gösteren tek gen nedenleri olduğu göz önünde bulundurulduğunda özellikle akraba evliliği sık olan toplumlarda NOA’nın genetik etiyoloji araştırmasında tek gen defektlerini tespit edebilmek için TED faydalı olmuştur.
4. NOA ön tanısı için TED yapılan 25 olgunun %16’sında *MSH4*, *NR5A1* ve *STAG3* genlerinde (4/25) NOA fenotipini açıklayabilecek tek gen defektleri saptandı.
5. NOA olgularının %84’ünde (21/25) klinikle ilişki kurulabilecek tanı koydurucu varyasyon saptanmadı. Bu olgularda saptanan VUS varyantların takibi, güncel literatür verisiyle olguların yılda bir yeniden analizi ve yeni genetik testler veya yöntemler ile sonraki yıllarda yeniden değerlendirilmesi için hastalara takip planı oluşturuldu.
6. 14 olguda NOA ilgili *AR*, *FGFR1*, *KLHL10*, *NR5A1*, *RANBP2*, *SIX5*, *SOHLH1*, *SYCP2*, *TEX11*, *WT1* genlerinde heterozigot VUS varyasyonlar saptandı. Popülasyon veri tabanlarındaki sıklığının az olması, ailedeki infertilite kalıtım paternine uyuyor olması, NOA ilişkili aday genler olması

gibi farklı nedenlerden dolayı özellikle *AR*, *RANBP2*, *WT1* ve *NR5A1* genlerindeki varyasyonlar için fonksiyonel çalışmalar planlanabilir.

7. Genetik testlerle beraber infertil çiftlerin takibi daha bireyselleştirilmiş olmuştur. *CFTR* geninde taşıyıcılık saptanan olguların eşleri de *CFTR* geni için test edilerek çiftin kistik fibrozis hastalığı olan çocuk sahibi olma ihtimali azaltılmıştır.
8. 2 farklı olguda *MSH2* ve *ETV6* tanımlı patojenik varyantları bulunmuş ve hastalar kanser riski için takibe alınmış ve genetik danışmanlık verilmiştir.
9. Erkek infertilitesinde genotip-fenotip korelasyonunu arttırabilecek veriler literatüre kazandırılmıştır.
10. Kromozom analizi ve YKM testinin ardından TED ile tüm kodlayan ekzon ve ekzon-intron bileşkeleri dizilenmesine rağmen, yaklaşık %70'lik bir hasta grubu hala genetik tanı alamamıştır. Tüm genom dizileme testinin kodlamayan intronik bölgeleri ve yapısal varyantları da saptayabilmesi nedeniyle NOA hastalarında kullanımı tanı başarısını arttırabilir.
11. NOA'nın tek gen nedenleri bu çalışmada da gösterilen gibi nadir nedenlerdir ve geniş kitlelerde rutin araştırma için verimli olmayabilir. Fakat aynı anda tüm genlerin kodlayan bölgelerini dizileme şansı sunan TED gibi kapsamlı testler tanı başarısı için faydalı olacaktır.
12. YÜT tedavileri ile NOA'lı erkekler de biyolojik olarak ebeveyn olabilmektedir. Fakat NOA'ya neden olan genetik defektin çocuğa aktarılma riski vardır. Bu risklere dair ailenin genetik danışmanlık alması ve PGT seçeneği hakkında ailenin bilgilendirilmesi çiftlerin tedavi planını etkileyebilir. Ayrıca PGT ile sağlıklı embriyoların oranı arttırılarak gebelik oluşma ihtimali arttırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and sterility*, 108(3), 393–406
2. Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. *Lancet* (London, England), 397(10271), 319–333.
3. Cerván-Martín, M., Castilla, J. A., Palomino-Morales, R. J., & Carmona, F. D. (2020). Genetic Landscape of Nonobstructive Azoospermia and New Perspectives for the Clinic. *Journal of clinical medicine*, 9(2), 300.
4. Agarwal A, Boitrelle F, Drakopoulos P, Sallam HN, Saleh R. Male infertility: Management of infertile men in reproductive medicine. 1st ed. Philadelphia: Elsevier; 2024. (sf 11, 13, 24, 29, 32, 36, 116, 118, 119, 120, 186, 188)
5. Hamada, A. J., Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2013). A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 68 Suppl 1(Suppl 1), 39–60.
6. Schlegel, P. N., Sigman, M., Collura, B., De Jonge, C. J., Eisenberg, M. L., Lamb, D. J., Mulhall, J. P., Niederberger, C., Sandlow, J. I., Sokol, R. Z., Spandorfer, S. D., Tanrikut, C., Treadwell, J. R., Oristaglio, J. T., & Zini, A. (2021). Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline Part I. *The Journal of urology*, 205(1), 36–43.

7. Glazer 2019, Male factor infertility and risk of death: a nation wide record-linkage study
8. Tharakan, T., Luo, R., Jayasena, C. N., & Minhas, S. (2021). Non-obstructive azoospermia: current and future perspectives. *Faculty reviews*, 10, 7.
9. Misell, L. M., Holochwest, D., Boban, D., Santi, N., Shefi, S., Hellerstein, M. K., & Turek, P. J. (2006). A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *The Journal of urology*, 175(1), 242–246.
10. Rizk B, Agarwal A, Sabanegh ES. Male infertility in reproductive medicine: diagnosis and management. 1st ed. New York: CRC Press; 2020 (sf 29)
11. Turek, P. J. (2016). Male reproductive physiology. *Campbell Walsh Urology*. 11th Ed. Philadelphia: Elsevier, 516-537
12. VanPutte C, Regan J, Russo A. Seeley's essentials of anatomy & physiology. 11th ed. New York: McGraw Hill; 2021.
13. Krausz, C., Escamilla, A. R., & Chianese, C. (2015). Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction (Cambridge, England)*, 150(5), R159–R174.
14. Sudhakar, D. V. S., Shah, R., & Gajbhiye, R. K. (2021). Genetics of Male Infertility- Present and Future: A Narrative Review. *Journal of human reproductive sciences*, 14(3), 217–227.
15. Walsh, T. J., Croughan, M. S., Schembri, M., Chan, J. M., & Turek, P. J. (2009). Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. *Archives of internal medicine*, 169(4), 351–356

16. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth edition, 27 July 2021, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
17. Thurston, L., Abbara, A., & Dhillon, W. S. (2019). Investigation and management of subfertility. *Journal of clinical pathology*, 72(9), 579–587
18. Gunasekaran K, Pandiyan N. Male infertility: a clinical approach. 1st ed. Springer: New delhi; 2017 sf 93
19. Hernández Uribe, L., Hernández Marín, I., Cervera-Aguilar, R., & Ayala, A. R. (2001). Frecuencia y etiología de azoospermia en el estudio de parejas infértiles [Frequency and etiology of azoospermia in the study of infertile couples]. *Ginecología y obstetricia de Mexico*, 69, 322–326.
20. Cocuzza, M., Alvarenga, C., & Pagani, R. (2013). The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 68 Suppl 1(Suppl 1), 15–26.
21. Jarow, J. P., Espeland, M. A., & Lipshultz, L. I. (1989). Evaluation of the azoospermic patient. *The Journal of urology*, 142(1), 62–65
22. Liu, G., Huang, Z., Zhu, W., Zhang, H., Fan, L., & Huang, C. (2024). Successful Sperm Retrieval and Clinical Pregnancies Following Micro-TESE and ICSI Treatments in Patients with Nonobstructive Azoospermia Due to Various Etiologies. *Cells*, 13(18), 1582.
23. Andrade, D. L., Viana, M. C., & Esteves, S. C. (2021). Differential Diagnosis of Azoospermia in Men with Infertility. *Journal of clinical medicine*, 10(14), 3144.

24. Cioppi, F., Rosta, V., & Krausz, C. (2021). Genetics of Azoospermia. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3264.
25. Besser, G. M., McNeilly, A. S., Anderson, D. C., Marshall, J. C., Harsoulis, P., Hall, R., Ormston, B. J., Alexander, L., & Collins, W. P. (1972). Hormonal responses to synthetic luteinizing hormone and follicle stimulating hormone-releasing hormone in man. *British medical journal*, 3(5821), 267–271.
26. Kirsch C. F. E. (2021). Imaging of Sella and Parasellar Region. *Neuroimaging clinics of North America*, 31(4), 541–552.
27. Ramasamy, R., Ricci, J. A., Palermo, G. D., Gosden, L. V., Rosenwaks, Z., & Schlegel, P. N. (2009). Successful fertility treatment for Klinefelter's syndrome. *The Journal of urology*, 182(3), 1108–1113.
28. Tournaye, H., Krausz, C., & Oates, R. D. (2017). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 5(7), 544–553.
29. Ferlin, A., Dipresa, S., Delbarba, A., Maffezzoni, F., Porcelli, T., Cappelli, C., & Foresta, C. (2019). Contemporary genetics-based diagnostics of male infertility. *Expert review of molecular diagnostics*, 19(7), 623–633.
30. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F. Thompson & Thompson genetics in medicine. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016
31. Lanfranco, F., Kamischke, A., Zitzmann, M., & Nieschlag, E. (2004). Klinefelter's syndrome. *Lancet (London, England)*, 364(9430), 273–283.
32. Tüttelmann, F., & Gromoll, J. (2010). Novel genetic aspects of Klinefelter's syndrome. *Molecular human reproduction*, 16(6), 386–395.

33. Zitzmann, M., Bongers, R., Werler, S., Bogdanova, N., Wistuba, J., Kliesch, S., Gromoll, J., & Tüttelmann, F. (2015). Gene expression patterns in relation to the clinical phenotype in Klinefelter syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 100(3), E518–E523.
34. Zitzmann, M., Aksglaede, L., Corona, G., Isidori, A. M., Juul, A., T'Sjoen, G., Kliesch, S., D'Hauwers, K., Toppari, J., Słowikowska-Hilczner, J., Tüttelmann, F., & Ferlin, A. (2021). European academy of andrology guidelines on Klinefelter Syndrome Endorsing Organization: European Society of Endocrinology. *Andrology*, 9(1), 145–167.
35. Lee, J. Y., Dada, R., Sabanegh, E., Carpi, A., & Agarwal, A. (2011). Role of genetics in azoospermia. *Urology*, 77(3), 598–601.
36. Donker, R. B., Vloeberghs, V., Groen, H., Tournaye, H., van Ravenswaaij-Arts, C. M. A., & Land, J. A. (2017). Chromosomal abnormalities in 1663 infertile men with azoospermia: the clinical consequences. *Human reproduction (Oxford, England)*, 32(12), 2574–2580.
37. Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature reviews. Urology*, 15(6), 369–384.
38. Johnson M. D. (1998). Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertility and sterility*, 70(3), 397–411.
39. Kuroda, S., Usui, K., Sanjo, H., Takeshima, T., Kawahara, T., Uemura, H., & Yumura, Y. (2020). Genetic disorders and male infertility. *Reproductive medicine and biology*, 19(4), 314–322.

40. Ghieh, F., Barbotin, A. L., Prasivoravong, J., Ferlicot, S., Mandon-Pepin, B., Fortemps, J., Garchon, H. J., Serazin, V., Leroy, C., Marcelli, F., & Vialard, F. (2021). Azoospermia and reciprocal translocations: should whole-exome sequencing be recommended?. *Basic and clinical andrology*, 31(1), 27.
41. Takeda, T., Iwatsuki, S., Hamakawa, T., Mizuno, K., Kamiya, H., Umemoto, Y., Kubota, H., Kubota, Y., Sasaki, S., & Yasui, T. (2017). Chromosomal anomalies and sperm retrieval outcomes of patients with non-obstructive azoospermia: a case series. *Andrology*, 5(3), 473–476.
42. Li, R., Fan, H., Zhang, Q., Yang, X., Zhan, P., & Feng, S. (2020). Pericentric inversion in chromosome 1 and male infertility. *Open medicine (Warsaw, Poland)*, 15(1), 343–348
43. Brannigan, R. E., Hermanson, L., Kaczmarek, J., Kim, S. K., Kirkby, E., & Tanrikut, C. (2024). Updates to Male Infertility: AUA/ASRM Guideline (2024). *The Journal of urology*, 101097JU00000000000004180. Advance online publication.
44. Turner, J. M., Mahadevaiah, S. K., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C. X., & Burgoyne, P. S. (2005). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature genetics*, 37(1), 41–47.
45. Yu, X. W., Wei, Z. T., Jiang, Y. T., & Zhang, S. L. (2015). Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(9), 14634–14646.

46. Muranishi, Y., Kobori, Y., Katoh-Fukui, Y., Tamaoka, S., Hattori, A., Osaka, A., Okada, H., Nakabayashi, K., Hata, K., Kawai, T., Ogata-Kawata, H., Iwahata, T., Saito, K., Kon, M., Shinohara, N., & Fukami, M. (2024). Systematic molecular analyses for 115 karyotypically normal men with isolated non-obstructive azoospermia. *Human reproduction* (Oxford, England), 39(5), 1131–1140.
47. Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., & Lancet, D. (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current protocols in bioinformatics*, 54, 1.30.1–1.30.33. [genecards at f](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5015281/)
48. Kasak, L., & Laan, M. (2021). Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: challenges, established knowledge, limitations and perspectives. *Human genetics*, 140(1), 135–154.
49. Schoor, R. A., Elhanbly, S., Niederberger, C. S., & Ross, L. S. (2002). The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility. *The Journal of urology*, 167(1), 197–200
50. T.U. Mbaeri, J.C. Orakwe, A.M.E. Nwofor, C.K. Oranusi, O.O. Mbonu (2013). Ultrasound measurements of testicular volume: Comparing the three common formulas with the true testicular volume determined by water displacement. *African Journal of Urology*, 19 (2), 69-73.
51. Riggs, E. R., Andersen, E. F., Cherry, A. M., Kantarci, S., Kearney, H., Patel, A., Raca, G., Ritter, D. I., South, S. T., Thorland, E. C., Pineda-Alvarez, D., Aradhya, S., & Martin, C. L. (2020). Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics

- (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 22(2), 245–257.
52. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424.
53. TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu. *İstatistiklerle Aile, 2023* (Mayıs 2024). <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=nufus-ve-demografi-109&dil=1>
54. Vander Borcht, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, 62, 2–10.
55. Inhorn, M. C., Kobeissi, L., Nassar, Z., Lakkis, D., & Fakih, M. H. (2009). Consanguinity and family clustering of male factor infertility in Lebanon. *Fertility and sterility*, 91(4), 1104–1109.
56. Tadmouri, G. O., Nair, P., Obeid, T., Al Ali, M. T., Al Khaja, N., & Hamamy, H. A. (2009). Consanguinity and reproductive health among Arabs. *Reproductive health*, 6, 17.
57. Zauner, G., & Girardi, G. (2020). Potential causes of male and female infertility in Qatar. *Journal of reproductive immunology*, 141, 103173.
58. Özman, O., & Bakırcıoğlu, M. E. (2020). Clinical impact of parental consanguineous marriage in idiopathic nonobstructive azoospermia. *F&S reports*, 1(3), 209–212.

59. Fuster V. (2003). Inbreeding pattern and reproductive success in a rural community from Galicia (Spain). *Journal of biosocial science*, 35(1), 83–93.
60. Helgason, A., Pálsson, S., Gudbjartsson, D. F., Kristjánsson, T., & Stefánsson, K. (2008). An association between the kinship and fertility of human couples. *Science* (New York, N.Y.), 319(5864), 813–816.
61. Weller, M., & Santos, S. (2013). A positive association between consanguinity and fertility in communities of Paraíba, Northeast Brazil. *Annals of human biology*, 40(6), 527–530.
62. Mohammadpour Lashkari, F., Sadighi Gilani, M. A., Ghaheri, A., Zamanian, M. R., Borjian Boroujeni, P., Mohseni Meybodi, A., & Sabbaghian, M. (2018). Clinical aspects of 49 infertile males with 45,X/46,XY mosaicism karyotype: A case series. *Andrologia*, 50(5), e13009.
63. Ketheeswaran, S., Alsbjerg, B., Christensen, P., Gravholt, C. H., & Humaidan, P. (2019). 45,X/46,XY Mosaicism and Normozoospermia in a Patient with Male Phenotype. *Case reports in medicine*, 2019, 2529080.
64. Akinsal, E. C., Baydilli, N., Bayramov, R., & Ekmekcioglu, O. (2018). A Rare Cause of Male Infertility: 45,X/46,XY Mosaicism. *Urologia internationalis*, 101(4), 481–485.
65. Alkhunaizi, E., Albrecht, J. P., Aarabi, M., Witchel, S. F., Wherrett, D., Babul-Hirji, R., Dupuis, A., Chiniara, L., Chater-Diehl, E., Shago, M., Shuman, C., Rajkovic, A., Yatsenko, S. A., & Chitayat, D. (2024). 45,X/46,XY mosaicism: Clinical manifestations and long term follow-up. *American journal of medical genetics. Part A*, 194(3), e63451.

66. Halder, A., Kumar, P., Jain, M., & Iyer, V. K. (2017). Copy number variations in testicular maturation arrest. *Andrology*, 5(3), 460–472
67. Houston, B. J., Riera-Escamilla, A., Wyrwoll, M. J., Salas-Huetos, A., Xavier, M. J., Nagirnaja, L., Friedrich, C., Conrad, D. F., Aston, K. I., Krausz, C., Tüttelmann, F., O'Bryan, M. K., Veltman, J. A., & Oud, M. S. (2021). A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships. *Human reproduction update*, 28(1), 15–29.
68. Shah R, Rambhatla A, Atmoko W, Martinez M, Ziouziou I, Kothari P, Tadros N, Phuoc NH, Kavoussi P, Harraz A, Salvio G, Gul M, Hamoda T, Toprak T, Birowo P, Ko E, Arafa M, Ghayda RA, Karthikeyan VS, Saleh R, Russo GI, Pinggera GM, Chung E, Savira M, Colpi GM, Zohdy W, Pescatori E, Park HJ, Fukuhara S, Tsujimura A, Rojas-Cruz C, Marino A, Mak SK, Amar E, Ibrahim W, Sindhwani P, Alhathal N, Busetto GM, Al Hashimi M, El-Sakka A, Ramazan A, Dimitriadis F, Timpano M, Jezek D, Altay B, Zylbersztejn DS, Wong MY, Moon DG, Wyns C, Gamidov S, Akhavizadegan H, Franceschelli A, Aydos K, Quang VN, Ashour S, Al Dayel A, Al-Marhoon MS, Micic S, Binsaleh S, Hussein A, Elbardisi H, Mostafa T, Taha E, Ramsay J, Zachariou A, Abdelrahman IF, Rajmil O, Kalkanli A, Molina JM, Bocu K, Duarsa GW, Ceker G, Serefoglu EC, Bahar F, Gherabi N, Kuroda S, Bouzouita A, Gudeloglu A, Ceyhan E, Hasan MS, Musa MU, Motawi A, Chak-Lam C, Taniguchi H, Ho CC, Vazquez JF, Mutambirwa S, Gungor ND, Bendayan M, Giulioni C, Baser A, Falcone M, Boeri L, Blecher G, Kheradmand A, Sethupathy T, Adriansjah R, Narimani N, Konstantinidis C, Nguyen TT, Japari A, Dolati P, Singh K, Ozer C, Sarikaya S, Sheibak N, Bosco NJ, Özkent MS, Le ST, Sokolakis I, Katz D, Smith R, Truong MN, Le TV, Huang Z, Deger MD, Arslan U, Calik G, Franco G, Rashed A, Kahraman O, Andreadakis S, Putra R, Balercia G, Khalafalla K, Cannarella R, TuấnAnh Đặng, El Meliegy A, Zilaitiene B, Ramirez ML, Giacone F, Calogero AE, Makarounis K, Jindal S, Hoai BN, Banthia R, Peña MR, Moorthy D, Adamyan A, Kulaksiz D, Kandil

H, Sofikitis N, Salzano C, Jungwirth A, Banka SR, Mierzwa TC, Turunç T, Jain D, Avoyan A, Salacone P, Kadioğlu A, Gupta C, Lin H, Shamohammadi I, Mogharabian N, Barrett T, Danacıoğlu YO, Crafa A, Daoud S, Malhotra V, Almardawi A, Selim OM, Moussa M, Haghdani S, Duran MB, Kunz Y, Preto M, Eugeni E, Nguyen T, Elshahid AR, Suyono SS, Parikesit D, Nada E, Orozco EG, Boitrelle F, Trang NT, Jamali M, Nair R, Ruzaev M, Gadda F, Thomas C, Ferreira RH, Gul U, Maruccia S, Kanbur A, Kinzikeeva E, Abumelha S, Quang N, Kosgi R, Gokalp F, Soebadi MA, Paul GM, Sajadi H, Gupte D, Ambar RF, Sogutdelen E, Singla K, Basurkano A, Kim SH, Gilani MA, Nagao K, Brodjonegoro SR, Rezano A, Elkhoully M, Mazzilli R, Farsi HM, Ba HN, Alali H, Kafetzis D, Long TQ, Alsaid S, Cuong HB, Oleksandr K, Mustafa A, Acosta H, Pai H, Şahin B, Arianto E, Teo C, Jayaprakash SP, Rachman RI, Yenice MG, Sefrioui O, Paghdar S, Priyadarshi S, Tanic M, Alfatlawy NK, Rizaldi F, Vishwakarma RB, Kanakis G, Cherian DT, Lee J, Galstyan R, Keskin H, Wurzacher J, Seno DH, Noegroho BS, Margiana R, Javed Q, Castiglioni F, Tanwar R, Puigvert A, Kaya C, Purnomo M, Yazbeck C, Amir A, Borges E, Bellavia M, Deswanto IA, V VK, Liguori G, Minh DH, Siddiqi K, Colombo F, Zini A, Patel N, Çayan S, Al-Kawaz U, Ragab M, Hebrard GH, Hoffmann I, Efesoy O, Saylam B, Agarwal A. Global Practice Patterns in the Evaluation of Non-Obstructive Azoospermia: Results of a World-Wide Survey and Expert Recommendations. *World J Mens Health*. 2024 Oct;42(4):727-748.

69. Kherraf, Z. E., Cazin, C., Bouker, A., Fourati Ben Mustapha, S., Hennebicq, S., Septier, A., Coutton, C., Raymond, L., Nouchy, M., Thierry-Mieg, N., Zouari, R., Arnoult, C., & Ray, P. F. (2022). Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia. *American journal of human genetics*, 109(3), 508–517
70. Wyrwoll, M. J., van Walree, E. S., Hamer, G., Rotte, N., Motazacker, M. M., Meijers-Heijboer, H., Alders, M., Meißner, A., Kaminsky, E., Wöste, M., Krallmann, C., Kliesch, S., Hunt, T. J., Clark, A. T., Silber, S., Stallmeyer, B., Friedrich, C., van Pelt, A. M. M., Mathijssen, I. B., & Tüttelmann, F. (2021).

Bi-allelic variants in DNA mismatch repair proteins MutS Homolog MSH4 and MSH5 cause infertility in both sexes. *Human reproduction* (Oxford, England), 37(1), 178–189

71. Hashemi Sheikhshabani, S., Ghafouri-Fard, S., Hosseini, E., & Omrani, M. D. (2024). A novel homozygote nonsense variant of MSH4 leads to primary ovarian insufficiency and non-obstructive azoospermia. *Molecular biology reports*, 51(1), 68.
72. Li, P., Ji, Z., Zhi, E., Zhang, Y., Han, S., Zhao, L., Tian, R., Chen, H., Huang, Y., Zhang, J., Chen, H., Zhao, F., Zhou, Z., Li, Z., & Yao, C. (2022). Novel bi-allelic MSH4 variants causes meiotic arrest and non-obstructive azoospermia. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 20(1), 21.
73. Krausz, C., Riera-Escamilla, A., Moreno-Mendoza, D., Holleman, K., Cioppi, F., Algaba, F., Pybus, M., Friedrich, C., Wyrwoll, M. J., Casamonti, E., Pietroforte, S., Nagirnaja, L., Lopes, A. M., Kliesch, S., Pilatz, A., Carrell, D. T., Conrad, D. F., Ars, E., Ruiz-Castañé, E., Aston, K. I., ... Tüttelmann, F. (2020). Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 22(12), 1956–1966.
74. van der Bijl, N., Röpke, A., Biswas, U., Wöste, M., Jessberger, R., Kliesch, S., Friedrich, C., & Tüttelmann, F. (2019). Mutations in the stromal antigen 3 (STAG3) gene cause male infertility due to meiotic arrest. *Human reproduction* (Oxford, England), 34(11), 2112–2119.
75. Mellone, S., Zavattaro, M., Vurchio, D., Ronzani, S., Caputo, M., Leone, I., Prodam, F., & Giordano, M. (2021). A Long Contiguous Stretch of Homozygosity Disclosed a Novel STAG3 Biallelic Pathogenic Variant Causing

Primary Ovarian Insufficiency: A Case Report and Review of the Literature. *Genes*, 12(11), 1709.

76. Luppino, G., Wasniewska, M., Coco, R., Pepe, G., Morabito, L. A., Li Pomi, A., Corica, D., & Aversa, T. (2024). Role of NR5A1 Gene Mutations in Disorders of Sex Development: Molecular and Clinical Features. *Current issues in molecular biology*, 46(5), 4519–4532.
77. Fabbri-Scallet, H., de Sousa, L. M., Maciel-Guerra, A. T., Guerra-Júnior, G., & de Mello, M. P. (2020). Mutation update for the NR5A1 gene involved in DSD and infertility. *Human mutation*, 41(1), 58–68.
78. Domenice, S., Machado, A. Z., Ferreira, F. M., Ferraz-de-Souza, B., Lerario, A. M., Lin, L., Nishi, M. Y., Gomes, N. L., da Silva, T. E., Silva, R. B., Correa, R. V., Montenegro, L. R., Narciso, A., Costa, E. M., Achermann, J. C., & Mendonca, B. B. (2016). Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 108(4), 309–320.
79. Gorski, B., Hernandez, E., Moore, M. B., Moriwaki, M., Chow, C. Y., Coelho, E., Taylor, E., Lu, C., Walker, A., Touraine, P., Nelson, L. M., Cooper, A. R., Mardis, E. R., Rajkovic, A., Yandell, M., & Welt, C. K. (2022). Causal and Candidate Gene Variants in a Large Cohort of Women With Primary Ovarian Insufficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 107(3), 685–714.
80. Liu, W., Li, X., Ma, Q., Zhu, Y., Zhao, W., Yang, Y., Xiao, W., Huang, D., Cai, F., Chan, D. Y. L., Zhao, S., & Chu, Q. (2023). Testis cell pyroptosis mediated by CASP1 and CASP4: possible sertoli cell-only syndrome pathogenesis. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 21(1), 53.

81. An, M., Liu, Y., Zhang, M., Hu, K., Jin, Y., Xu, S., Wang, H., & Lu, M. (2021). Targeted next-generation sequencing panel screening of 668 Chinese patients with non-obstructive azoospermia. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 38(8), 1997–2005.
82. Zhou, H., Yin, Z., Ni, B., Lin, J., Luo, S., & Xie, W. (2024). Whole exome sequencing analysis of 167 men with primary infertility. *BMC medical genomics*, 17(1), 230.
83. Yuan, Y., Xu, W. Q., Chen, Y., Luo, T., & Chen, H. Y. (2022). A Gly684Ala substitution in the androgen receptor is the cause for azoospermia in a Chinese family with mild androgen insensitivity syndrome and normal hormone levels. *Frontiers in genetics*, 13, 988202.
84. Neilson, D. E., Adams, M. D., Orr, C. M., Schelling, D. K., Eiben, R. M., Kerr, D. S., Anderson, J., Bassuk, A. G., Bye, A. M., Childs, A. M., Clarke, A., Crow, Y. J., Di Rocco, M., Dohna-Schwake, C., Dueckers, G., Fasano, A. E., Gika, A. D., Giannis, D., Gorman, M. P., Grattan-Smith, P. J., ... Warman, M. L. (2009). Infection-triggered familial or recurrent cases of acute necrotizing encephalopathy caused by mutations in a component of the nuclear pore, RANBP2. *American journal of human genetics*, 84(1), 44–51.
85. Aslanukov, A., Bhowmick, R., Guraju, M., Oswald, J., Raz, D., Bush, R. A., Sieving, P. A., Lu, X., Bock, C. B., & Ferreira, P. A. (2006). RanBP2 modulates Cox11 and hexokinase I activities and haploinsufficiency of RanBP2 causes deficits in glucose metabolism. *PLoS genetics*, 2(10), e177.
86. Nagai, M., Moriyama, T., Mehmood, R., Tokuhiro, K., Ikawa, M., Okabe, M., Tanaka, H., & Yoneda, Y. (2011). Mice lacking Ran binding protein 1 are viable and show male infertility. *FEBS letters*, 585(5), 791–796.

87. Bellil, H., Ghieh, F., Hermel, E., Mandon-Pépin, B., & Vialard, F. (2021). Human testis-expressed (TEX) genes: a review focused on spermatogenesis and male fertility. *Basic and clinical andrology*, 31(1), 9.
88. Ghieh, F., Passet, B., Poumerol, E., Castille, J., Calvel, P., Vilotte, J. L., Sellem, E., Jouneau, L., Mambu-Mambuani, H., Garchon, H. J., Pailhoux, E., Vialard, F., & Mandon-Pépin, B. (2024). A partial deletion within the meiosis-specific sporulation domain SPO22 of *Tex11* is not associated with infertility in mice. *PloS one*, 19(9), e0309974.
89. Seabra, C. M., Quental, S., Lima, A. C., Carvalho, F., Gonçalves, J., Fernandes, S., Pereira, I., Silva, J., Marques, P. I., Sousa, M., Barros, A., Seixas, S., Amorim, A., & Lopes, A. M. (2015). The mutational spectrum of WT1 in male infertility. *The Journal of urology*, 193(5), 1709–1715.
90. Zare-Abdollahi, D., Safari, S., Mirfakhraie, R., Movafagh, A., Bastami, M., Azimzadeh, P., Salsabili, N., Ebrahimizadeh, W., Salami, S., & Omrani, M. D. (2015). Mutational screening of the NR5A1 in azoospermia. *Andrologia*, 47(4), 395–401.
91. Laurentino, S. S., Correia, S., Cavaco, J. E., Oliveira, P. F., Rato, L., Sousa, M., Barros, A., & Socorro, S. (2011). Regucalcin is broadly expressed in male reproductive tissues and is a new androgen-target gene in mammalian testis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 142(3), 447–456.
92. Laurentino, S. S., Correia, S., Cavaco, J. E., Oliveira, P. F., de Sousa, M., Barros, A., & Socorro, S. (2012). Regucalcin, a calcium-binding protein with a role in male reproduction?. *Molecular human reproduction*, 18(4), 161–170.
93. Bieniek, J. M., Lapin, C. D., & Jarvi, K. A. (2021). Genetics of CFTR and male infertility. *Translational andrology and urology*, 10(3), 1391–1400.