

Research Article

RESEARCH OF INTERCHROMOSOMAL EFFECT IN MALE CARRIERS WITH CHROMOSOMAL HETEROMORPHISM BY USING FISH

Kromozom heteromorfizmi taşıyıcısı olan erkek bireylerde interkromozomal etkinin FISH yöntemiyle araştırılması

Özgür Balasar^{1*}, Hasan Acar²

¹ Department of Medical Genetics, Dr Faruk Sükan Maternity and Pediatric Hospital, Konya, Turkey

² Department of Medical Genetics, Medical Faculty of Selçuk University, Konya, Turkey

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate the existence of interchromosomal effect (ICE) on the sperm nuclei of males who have chromosomal heteromorphism.

Materials and Methods: In 9 male carriers of chromosomal heteromorphism (case group), and 14 male individuals who did not have any chromosomal abnormalities (control group), aneuploidy of chromosome 2, 3, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y in the sperm nuclei were investigated by using the fluorescence in situ hybridization (FISH) method.

Results: A total of 51710 sperm nuclei were analyzed (19273 from the case group and 32437 from the control group). ICE was determined in seven of nine carrier cases of a chromosomal heteromorphism.

Conclusion: Our results suggest that there was an interchromosomal effect on male carriers with a chromosomal heteromorphism. These effects also show individual differences among patients.

Key words: Aneuploidy, Chromosomal Heteromorphisms, FISH, Interchromosomal Effect, Sperm

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın hedefi kromozom heteromorfizmi olan erkeklerin sperm çekirdeklerinde interkromozomal etki varlığının araştırılmasıdır.

Araç ve Yöntem: Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak kromozom heteromorfizmi taşıyıcısı olan 9 erkekli olgu grubuyla herhangi kromozom düzensizliği bulunmayan 14 erkekli kontrol grubunda sperm çekirdeklerindeki 2, 3, 12, 13, 17, 18, 21, X ve Y anöplidileri araştırıldı.

Bulgular: Toplam 51710 sperm çekirdeği (olgu grubundan 19273, kontrol grubundan 32437) analiz edildi. Kromozom heteromorfizmi olan 9 taşıyıcının 7'sinde interkromozomal etkinin varlığı saptandı.

Sonuç: Elde ettiğimiz sonuçlar, kromozom heteromorfizmi olan erkek taşıyıcılarda interkromozomal etkinin bulunduğunu gösterdi. Bu etki aynı zamanda hastadan hastaya bireysel farklılıklar da göstermektedir.

GİRİŞ

Kromozom normal olan homologundan farklı morfoloji, boyut ve boyanma özelliğine sahip ise heteromorfik veya varyant olarak tanımlanır (1). Kromozom yapısında bir değişiklik olmasına rağmen anomali olarak kabul edilmemektedir. Bazen heteromorfizm yerine polimorfizm ifadesi kullanılsa da, polimorfizm teriminin genler için kullanılması daha uygun olmaktadır.

Heteromorfizmler en sık olarak 1q, 9q, 16q'nun sentromere komşu heterokromatin bölgelerinin ve Yq heterokromatin bölgelerinin artışı veya azalışı ya da bu bölgelerin inversiyonu ile akrosentrik kromozomların kısa kollarındaki satellit adı verilen kromatin kitlelerindeki artış (ps+) veya

heterokromatin bölgelerindeki artış (pst+) şeklinde görülmektedir. Bunlar arasında en yaygın 9 nolu kromozomun p11q12 bölgelerindeki kırıklar sonucu oluşan inv(9)'dur. Kromozomun 9'un heterokromatin bölgesini içine alan perisentrik inversiyon, tüm inversiyonlar arasında en sık görülen inversiyondur ve sitogenetik laboratuvarlarında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır.

* **Correspondence:** Özgür BALASAR
Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi
Tıbbi Genetik Polikliniği, Hastane Cad. No:22
42060 Selçuklu/Konya/TURKEY
Tel : 0 332 2354205-1077 Fax : 0 332 2366066
e-mail: ozgbalasar@hotmail.com

Heterokromatin bölgeleri iğ ipliği bağlanmasında, kromozom hareketinde, mayotik eşleşme, segregasyon ve kardeş kromatid kohezyonunda temel rol oynadığı bildirilmektedir (2, 3). Tüm kromozomlar içinde en çok değişken kromozomudur. Y kromozomunun heterokromatin bölgesinin artış veya azalışı, heterokromatin bölgenin perisentrik inversiyonu, satellitli Y kromozomu (Yqs) ve Y heterokromatin translokasyonu şeklinde olabilmektedir. Akrosentrik kromozomların kısa kollarındaki boy farklılığı da sık görülen heteromorfizmdir. Bu farklılığın nedeni, akrosentrik kromozomların kısa kollarında art arda tekrarlayan DNA sekansındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Akrosentrik kromozomların kısa kolundaki bantlar p11, p12 (satellit sap) ve p13'de (satellit) sırasıyla satellit DNA I, II, III ve IV, rRNA genleri ve β satellit bölgesini içerir (1). Satellit sap yani p12 bandı 18S ve 28S rRNA kodlayan gen tekrarlarını içerir.

Literatürde bazı çalışmalarda kromozomlardaki heteromorfizm bölgeleri ile hastalıklar arasında ilişki olduğu bildirilmiş ve klinik etkisi üzerine çok çelişkili görüşler öne sürülmüştür. Tekrarlayan düşükler (4), infertilite (4) ve psikiyatrik hastalıklarda (5) varyant kromozomların varlığı gösterilmiştir. Tüm varyantların normal olmayabileceğini savunan düşünceleri destekleyen görüşler ileri sürülmüştür (6). Heteromorfizmlerin moleküler seviyede genomda nasıl bir etkiye sahip olduğu tam olarak bilinmemektedir.

Bireyde mevcut olan translokasyon veya yapısal yeniden düzenlenme sebebiyle, translokasyona ya da yeniden düzenlenmeye karışmayan herhangi bir kromozomun mayoz I sırasındaki ayırlanamaması olayına "interkromozomal etki" (IKE) denmektedir. IKE ilk defa 1963 yılında Lejeune tarafından insanda tanımlanmıştır (7). Lejeune translokasyona karışan kromozomların ve homologlarının, diğer kromozomların segregasyonunu anormal şekilde etkileyebileceğini öne sürmüştür (7). IKE mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte yapısal kromozom bozukluğu taşıyan bireylerde anöploid sıklığının arttığı bildirilmektedir (8, 9, 10, 11, 12, 13). Buna karşılık literatürde yapısal kromozom anomalisi taşıyan bireylerde böyle bir etkinin olmadığı da savunulmuştur (14, 15, 16, 17). Inv(9) taşıyıcısı olan bir hastada yapılan çalışmada IKE tespit edilmiş iken (18) inv(9) taşıyıcısı başka bir bireyde yapılan çalışmada IKE tespit edilmemiştir (19). Literatürde akrosentrik p+ taşıyıcılarında herhangi bir IKE çalışması mevcut olmayıp heteromorfizm taşıyıcılarında IKE ile ilgili yeterli sayıda çalışma yoktur. IKE'in oluş mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte bazı görüşler ileri sürülmektedir. Sinaptonemal kompleks ile alakalı bir çalışmada, yapısal düzenlenmelerin pakitende eşleşme anomalileri ve kizma sayısında azalmaya neden olarak anöploidye yol açabileceği gösterilmiştir (10). Yeniden düzenlenmenin türü, hasta ve yeniden düzenlenmeye karışan kromozom IKE'i

etkileyebilmektedir (8, 9). IKE'nin temel mekanizmasının mayoz I'de olması gerektiği belirtilmektedir (9).

Literatürdeki bazı çalışmalarda semen parametreleri ile spermlerdeki anöploid oranları arasındaki ilişki incelenmiştir. Bazı çalışmalarda sperm anöploidisi ve total sperm progresif motilitesi arasında ters bir ilişki olduğu söylenirken (9), yine bir diğer çalışmada hem sperm sayısı hem de total sperm progresif motilitesi ile sperm anöploidisi arasında ters bir ilişki olduğu bildirilmiştir (11). Floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniğinin hızlı ve güvenilir olması, bu teknik ile çok sayıda spermatozoanın incelenmesi, elde edilen istatistiksel verinin daha güvenilir olmasına olanak sağlamıştır.

Mevcut çalışmada kromozom heteromorfizmi olan bireylerde IKE olup olmadığının araştırılması amaçlandı. Ayrıca IKE var ise hangi tür kromozom heteromorfizminde ve hangi tip kromozomları etkilediğini tespit etmektir.

MATERYAL VE METOT

Çalışma için Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmış ve çalışmaya dahil edilen olgulardan ve kontrollerden onamları alınmıştır.

Olgular ve kontroller

Olgu grubu kromozom heteromorfizmi olan 9 erkek bireyden oluşmaktadır. Olgu grubu heteromorfizmin tipine göre alt gruplara ayrılmıştır ve olgu grubunun klinik hikayesi, yaş ve karyotipik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir (Tablo 1).

Kontrol grubu, olgu grubu ile aynı yaş özellikleri taşıyan, kromozom düzensizliği ve heteromorfizmi olmayan, ayrıca genetik yapıyı değiştirebilecek herhangi bir hastalığı olmayan ve radyoterapi, kemoterapi almayan 14 bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubunun klinik hikayesi, yaş ve karyotipik özellikleri Tablo 2'de verilmiştir (Tablo 2).

Karyotipleme için periferik kan kültürü

Standart sitogenetik prosedürüne göre GTG-bantlama tekniği kullanılarak periferik kan lenfositlerinden karyotipleme yapılarak (20), International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2013'e göre raporlandırıldı (21). Preparatlar kromozom görüntüleme sisteminde analiz edildi (MacKtpye, ABD). Olgu ve kontrol gruplarındaki bireylere heteromorfizmi değerlendirmek amacıyla C-bantlama ve NOR-bantlama uygulandı.

Sperm-fiks örneği hazırlama

Olgu ve kontrol grubundan, 3-5 günlük cinsel perhizden sonra steril ortamda sperm örneği alındı. Sperm morfolojisi Kruger kriterlerine (13) göre değerlendirildi. FISH çalışması için sperm örneği üç kez PBS (fosfat buffer salin) ile yıkandı, hipotonik solüsyon (0.056M KCl) ile hücreler şişirildi ve standart 3:1 metanol-asetik asit fiksatif karışımı

Tablo 1. Olgulara ait karyotipik, yaş ve klinik özellikler.

	Olgu	Karyotip	Yaş	Açıklama
inv(9) taşıyıcı grup	O-1	46,XY,inv(9)(p11q12)	27	1 yıllık evli. Eşinin 4 gebeliğinde düşük ile sonuçlanmış.
	O-2	46,XY,inv(9)(p11q12)	32	8 yıllık evli. Çocuğu yok.
	O-3	46,XY,inv(9)(p11q12)	36	5 yıllık evli. Eşinin 2 gebeliği 3 aylık ve 5 aylık iken NTD sebebiyle küretaj ile sonlandırılmış.
Akrosentrik p+ taşıyıcı grubu	O-4	46,XY,22p+	26	1,5 yıllık evli.Eşinde 2 gebelik 6 haftalık iken anne karnında ölmüş , 1 gebelik 4 haftalık düşük.
	O-5	46,XY,21p+	36	10 yıllık evli. Trizomi 13 fetus tanısı amnion sıvısında kondu. İki sağlıklı çocuğu var.
	O-6	46,XY,21p+	29	7 yıllık evli. 1 defa IVF, 4 defa aşılama denenmiş ama başarısız olmuş. Çocuğu yok.
Diğer	O-7	46,X,Yqh-	26	4 yıllık evli. 1 çocuğu var
	O-8	46,XY,9qh+	33	11 yıllık evli. 2 defa IVF, 3 defa aşılama denenmiş ama başarısız olmuş. 3 gebelik (ikisi IVF ile) üçüde düşük olmuş.
	O-9	46,X,inv(Y)(p11.2q11.23)	43	18 yıllık evli. Amnion kültüründe fetuste tespit edilince aile taramasında ortaya çıktı. 2 sağlıklı çocuğu var, düşük yok.
			32±5,70	

O: Olgu, NTD: Nöral tüp defekti, IVF: İn vitrofertilizasyon

kullanılarak üç kez yıkandı. Ardından sperm-fiks örnekleri FISH çalışması yapılmaya kadar -20oC'de saklandı.

FISH analizi için sperm hücrelerinin hazırlanması ve kullanılan problemler

Hazırlanan sperm-fiks örnekleri temiz lama yoğunluğuna göre uygun şekilde damlatıldı.

Preparatlar 37oC'de 2xSSC (standart salin sitrat solüsyonu) içinde 5 dakika bekletildi ve ardından oda ısısında 0.01 M DTT (Dithiothreitol) (Sigma, Amerika) PBS'de 20 dakika inkübe edildi. Artan alkol serisinde (%70, %90 ve %96) dehidrate edildi ve kurumaya bırakılarak FISH çalışması için uygun hale getirildi. Preparat üzerine optimize, uygun konsantrasyondaki işaretli prob ve hibridizasyon

Tablo 2. Kontrollere ait karyotipik, yaş ve klinik özellikler.

Kontrol	Karyotip	Yaş	Açıklama
K-1	46,XY	32	3 yıllık evli, bir çocuğu var, eşi hamile.
K-2	46,XY	28	6 yıllık evli, bir çocuğu var.
K-3	46,XY	41	10 yıllık evli, bir çocuğu var.
K-4	46,XY	50	28 yıllık evli, üç çocuğu var.
K-5	46,XY	34	11 yıllık evli,dört çocuğu var.
K-6	46,XY	28	7 yıllık evli,iki çocuğu var.
K-7	46,XY	31	8 yıllık evli,üç çocuğu var.
K-8	46,XY	25	2 yıllık evli,bir çocuğu var.
K-9	46,XY	30	7 yıllık evli,iki çocuğu var.
K-10	46,XY	42	18 yıllık evli,üç çocuğu var.
K-11	46,XY	30	3 yıllık evli,iki çocuğu var.
K-12	46,XY	27	5 yıllık evli,bir çocuğu var.
K-13	46,XY	28	7 yıllık evli,bir çocuğu var.
K-14	46,XY	34	12 yıllık evli,iki çocuğu var.
		32,86±6,98	

K: Kontrol

tamponu karışımından 10µl konuldu ve 70oC'de 5 dakika boyunca hot plate üzerinde prob ve sperm DNA'sı beraber denatüre edildi. Gece boyunca hibridizasyon için 37oC'lik etüvde bekletildi. Ardından preparatlar iki kez 2xSSC'de ve iki kez 4xSSC'de sırasıyla yıkandı. Sonra 10µl DAPI (6-diamino-2-phenylindole) konulan preparatlar lamel ile kapatılarak floresan mikroskop ile incelemeye hazır hale getirildi.

İnterkromozom etkiyi incelemek için 2, 3, 12, 13, 17, 18, 21, X ve Y kromozomlarına özgü problemler kullanıldı. Kromozom 13 ve 21 sentromerik problemler ortak satelit dizisine sahip olduğu için bu kromozomlarda lokus spesifik problemler (13q14 ve 21q22 problemleri) (Kreatech, Almanya) kullanıldı. Diğerlerinde ise her bir kromozomun sentromer bölgesine spesifik satelit problemleri (Kreatech, Almanya) kullanıldı. Problemlerden zayıf sinyaller alındığında ise sinyalleri güçlendirmek için probun orijinal işaretlemesine uygun olarak tekrar işaretleme (Kreatech işaretleme kiti, Almanya) yapıldı. Her bir sperm örnekleri triple-color FISH X-Y-18 ile kromozom X (Spektrum Red), Y (Spektrum Aqua) ve 18 (Spektrum Green), dual-color FISH 13-21 ile kromozom 13 (Spektrum Green) ve 21 (Spektrum Red), dual-color FISH 2-12 ile kromozom 2 (Spektrum Green) ve 12 (Spektrum Red), dual-color FISH 3-17 ile kromozom 3 (Spektrum Red) ve 17 (Spektrum Aqua) ile analiz edildi (Resim 1).

Skorlama

Preparatlar, DAPI (SIGMA, ABD), FITC (fluorescein isothiocyanate), aqua, rhodamine ve dual band filtreleri bulunduran epifloresan mikroskopunda (Nikon E600) incelendi. Sperm hücreleri haploid yapıda oldukları için, otozomal kromozomlar için tek sinyal, cinsiyet kromozomları için X veya Y kromozomlarından birine ait sinyal alınması gerekmektedir. Eğer sperm hücresinde, bakılan kromozomlardan birisi için net iki sinyal gösterirken, diğer kromozom için net tek sinyal gösteriyorsa, sperm çekirdeği birinci kromozom için dizomik olarak

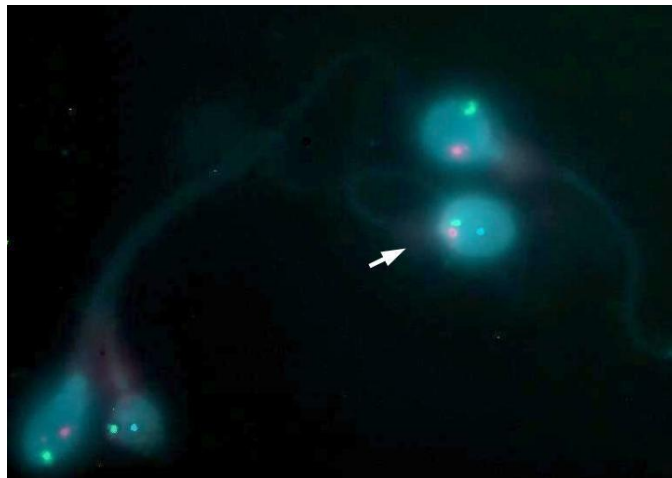
değerlendirildi. Net sinyal, aynı büyüklükte, aynı renkte ve aynı yoğunlukta ve en az bir sinyal büyüklüğü kadar birbirinden ayrılmış olması gerekmektedir. Bu tür net sinyaller değerlendirilmeye alındı. Nullizomik spermelerde beklenen değer dizomiler ile eşit olacağı için (18) ve bu durumun ayrılamama mı yoksa teknik hatadan mı kaynaklandığı bilinemediği için değerlendirilmeye alınmadı (9). Ayrıca üst üste düşen sperm çekirdekleri, sınırları seçilemeyen sperm çekirdekleri ve yaygın veya ayırt edilemeyen sinyalleri olan sperm çekirdekleri ile kuyrukları olmayan sperm çekirdekleri değerlendirilmeye alınmadı.

İstatistiksel yöntem

Kromozom heteromorfizmi olan bireylerde İKE'nin incelenmesi amacıyla kontrol ve olgu grubundan elde edilen semen parametreleri ve sperm-FISH sonuçlarının birbirleri ile karşılaştırılması istatistiksel olarak yapıldı. Bunun için SPSS 10.01 For Windows istatistik paket programı kullanıldı. Kategorik veriler Chi-square testiyle değerlendirildi. Olgu ve kontrol grupları arasındaki yaş ve spermogram parametrelerinin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi uygulandı. Tablolar ise Microsoft Office Excel 2007 paket programı kullanılarak hazırlandı.

BULGULAR

Olgu grubundan 19273 ve kontrol grubundan 32437 olmak üzere toplamda 51710 sperm nükleusu analiz edildi. Olgu grubu, inv(9) taşıyıcı grup, akrosentrik p+ taşıyıcı grup ve diğer olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır (Tablo 1). Olgularda ve gruplarda 1:1 oranında beklenen kromozom X taşıyan sperm sayıları ile kromozom Y taşıyan sperm sayıları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi. Olgu grubunun yaş ortalaması 32±5,70 ve kontrol grubunun yaş ortalaması 32,86±6,98 olup aralarında istatistiksel olarak fark tespit edilmedi (p>0.05). Heteromorfizm taşıyıcı bireyler ile kontrol grubuna ait spermogramlar arasında viabilite, sayı, morfoloji,



Resim 1. Sperm hücrelerinin floresan in situ hibridizasyon yöntemiyle gösterilmesi. Kromozom 18 yeşil, kromozom X kırmızı ve kromozom Y aqua ile boyandı. Sperm hücresindeki XY dizomisi ok ile gösterildi.

Tablo 3. Anöploidi frekansları ve oranları.

	Karvotip	Dizomi XY		Dizomi XX+YY		Dizomi 18		Dizomi 2		Dizomi 12		Dizomi 13		Dizomi 21		Dizomi 3		Dizomi 17	
		İki sinyal	Toplam sperm sayısı	İki sinyal	Toplam sperm sayısı	İki sinyal	Toplam sperm sayısı	İki sinyal	Toplam sperm sayısı	İki sinyal	Toplam sperm sayısı	İki sinyal	Toplam sperm sayısı	İki sinyal	Toplam sperm sayısı	İki sinyal	Toplam sperm sayısı	İki sinyal	Toplam sperm sayısı
O-1	46.XY.inv(9)(p11q12)	^a 2 0,32%	621	1 0,16%	621	1 0,16%	621	1 0,18%	559	0 0,00%	559	1 0,20%	504	3 0,60%	504	1 0,18%	561	5* 0,90%	561
O-2	46.XY.inv(9)(p11q12)	3 0,58%	516	0 0,00%	516	1 0,19%	516	1 0,14%	702	1 0,14%	702	1 0,19%	520	4 0,77%	520	3 0,60%	507	4* 0,79%	507
O-3	46.XY.inv(9)(p11q12)	2 0,36%	556	1 0,18%	556	1 0,18%	556	1 0,18%	557	2 0,36%	557	7* 1,25%	560	3 0,54%	560	2 0,37%	535	3 0,56%	535
O-4	46.XY.22p+	1 0,18%	544	3* 0,56%	544	0 0,00%	544	1 0,2%	512	1 0,2%	512	2 0,4%	505	3 0,59%	505	1 0,2%	515	4* 0,78%	515
O-5	46.XY.21p+	1 0,42%	239	0 0,00%	239	2* 0,84%	239	1 0,21%	473	2 0,42%	473	1 0,22%	453	1 0,22%	453	1 0,21%	472	1 0,21%	472
O-6	46.XY.21p+	3 0,58%	519	0 0,00%	519	1 0,19%	519	1 0,20%	507	3* 0,59%	507	2 0,40%	503	1 0,20%	503	1 0,21%	482	1 0,21%	482
O-7	46.X.Yqh-	1 0,19%	517	2 0,39%	517	0 0,00%	517	1 0,20%	502	1 0,20%	502	3 0,59%	505	2 0,40%	505	1 0,19%	533	2 0,37%	533
O-8	46.XY.9qlt+	2 0,32%	619	1 0,16%	619	1 0,16%	619	1 0,14%	719	1 0,14%	719	1 0,19%	514	3 0,58%	514	1 0,15%	652	1 0,15%	652
O-9	46.X.inv(Y)(p11.2q11.23)	2 0,36%	553	2 0,36%	553	1 0,18%	553	2 0,28%	718	1 0,14%	718	8* 1,55%	516	3 0,58%	516	1 0,20%	503	2 0,40%	503
Kontrol ** n=14	46.XY	16 0,20%	8046	9 0,11%	8046	10 0,12%	8046	10 0,12%	8616	14 0,16%	8616	22 0,29%	7482	28 0,37%	7482	16 0,19%	8293	23 0,28%	8293

^a : İki sinyal (dizomi) görülen sperm sayısını, incelenen sperm sayısına bölerek anöploidi oranı hesaplandı.

* : p<0.05 İstatiksel karşılaştırma dizomi sayılarına göre yapılmıştır.

** : Kontrol grubundaki 14 bireye ait dizomi sayıları ve incelenen sperm sayıları toplam olarak verilmiştir.

O : Olgu

hacim ve motilite bakımından herhangi bir fark gözlenmedi (sırasıyla $p=0.141$, $p=0.201$, $p=0.277$, $p=0.179$ ve $p=0.643$). X ve Y kromozomlarına ait dizomi oranları düşük olduğundan dizomi (X)+(Y) başlığı altında toplandı.

Heteromorfizm taşıyan bireylerdeki ve kontrol grubundaki anöploidi frekansları ve dizomi oranları Tablo 3'de verildi (Tablo 3). Heteromorfizm taşıyıcısı olan 7 olguda farklı kromozomlara ait İKE tespit edildi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapısal yeniden düzenlemeye karışan kromozomların ve homologlarının, mayoz bölünmede diğer kromozomların segregasyonunu anormal şekilde etkileyebileceği fikri Lejuene tarafından öne sürülmüş ve interkromozomal etki olarak adlandırılmıştır (7). İKE, insanda tartışmalı bir konu olsa da *Drosophila* (22) ve farede (23) gösterilmiştir.

Literatürde inv(9) taşıyıcılarında dizomi oranları incelenmiş ve İKE'in tespit edilmediği çalışmalar olduğu gibi (10, 18), İKE'in gösterildiği çalışmalar da vardır (21). Mevcut çalışmada inv(9) taşıyıcılarının birinde dizomi 13, diğer ikisinde ise dizomi 17 oranları istatistiksel olarak yüksek gözlenmiştir ($p<0.05$). Aynı heteromorfizm taşıyıcılarında farklı kromozomlara ait İKE'in bulunması, İKE'de bireysel farklılığın varlığını göstermektedir. Aynı tanslokasyonu taşıyan olgularda da İKE'e bakıldığında kişiler arası ve kromozomlar arası çok büyük farklılıklar gözlenmiştir (13). Ayrıca bu farklılığın sebebi hasta seçimindeki kriterlerin benzer olmaması, hastaların farklı coğrafik alanlardan olması, semen örneklerin alınmadan önceki cinsel perhiz süresindeki farklılıklar, FISH tekniğinin ve problemlerin farklı olması, aynı skorlama kriterlerinin her zaman uygulanmaması olabilmektedir (11). Ayrıca bu farklılık yeniden düzenlenen kromozomun spesifik karakteri ile de ilişkili olabilmektedir ve akrosentrik kromozomlardaki satelit heteromorfizmi (α -satellit heteromorfizmi) örnek olarak verilebilir (12).

Literatürde yakın zamana kadar akrosentrik p+ taşıyıcı grupta İKE'in varlığı araştırılmamıştır. Çalışmamızda ise akrosentrik p+ taşıyıcı gruptaki üç bireyde farklı kromozomlara ait (12, 17 ve 18 nolu kromozomlara ait) anöploidi frekansları istatistiksel olarak yüksek gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu altgrupta bir olguda dizomi XX+YY anöploidisi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek görülmesine rağmen İKE olarak değerlendirilmedi. Çünkü XY dizomisimayoz I hatasından, dizomi X ve dizomi Y ise mayoz II hatasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla İKE'den bahsedebilmek için oluşan hatanın mayoz I'de olması gerekmektedir (9).

Kromozom heteromorfizminin nasıl İKE'e neden olduğu bilinmemektedir. Heterokromatin bölgesi iğipliği bağlanmasında, kromozom hareketinde, mayotik eşleşme ve kardeş kromatid kohezyonunda temel rol oynayan yapılarıdır (2). Bundan da öte çevresel strese cevap olarak insan genomundaki konstitutif

heterokromatin bölgelerinin transkripsiyonel aktivasyonu meydana gelebilmektedir (6). Heterokromatin bölgeleri hücre tipine spesifik olarak nükleer laminada toplanır, genomdaki transkripsiyon olarak aktif bölgeler, nükleus içine doğru loop oluşturur (24). Heterokromatin bölgelerin sitogenetik karakteristiği tekrarlayıcı sekanstan yoğun olmasıdır (25) ve mayozda geç eşleşme yaptığı bilinmektedir (26). Non-sentromerik heterokromatin bölgeler sinapsa geç girerek bölünmenin zamanını değiştirebilmekte ve mayotik hataya neden olabilmektedir (27). Kromozomların kendi içindeki ilmek (loop) ve diğer kromozomlar arasındaki köprüler (bridge) sayesinde genomda diğer lokuslar ile fiziksel transkripsiyonun ekspresyon hızını ve süresini değiştirmektedir. Tek nükleotid değişikliklerinin (single nükleotid polimorfizm-SNP) genomun farklı yerlerindeki ilmekleri artırarak veya azaltarak etki gösterebildiği bildirilmiştir (24). Dolayısıyla heterokromatin yapıdaki değişiklikler de kromozomlar arası ilmek ve köprüleri etkileyebilerek mayozda değişikliğe sebep olabilir.

Mayoz boyunca 9qh bölgesi akrosentrik kromozomlarla etkileşebilmekte ve bu ilişkide bazı perisentrik inv(9) taşıyıcılarında akrosentrik kromozom dizomi insidansında artışa sebebiyet verebilmektedir (28). İnsandaki 9p12 ve 9q13-21.1 bantları akrosentrik kromozomların kısa kolları ile nükleotid dizilerinde belli bir homoloji göstermektedir (29). Mevcut çalışmada inv(9) taşıyıcı bireylerde 21 nolu kromozoma ait dizomi oranları yüksek olmasına rağmen kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ($p>0.05$). Bu durum az bir oranda İKE'e neden olabilir. İnverte olan segmentin büyük olması (>100 Mb yada kromozomun %50'sinden fazlasını içermesi durumunda) segregasyonda rekombinant gamet oluşumunu artırmaktadır (30). Benzer durum İKE içinde geçerli olabilir yani inverte olan segmentin büyüklüğü İKE'yi etkileyebilmektedir (31). 9qh+ taşıyıcısı ve 9qh- taşıyıcısı bireylerde ise analiz edilen kromozomlar için herhangi bir İKE gözlenmedi. Belki de bu olgularda heterokromatin bölgesindeki değişikliğin boyutu İKE oluşturabilecek düzeyde değildir.

Kötü semen parametreleri de spermelerde görülen anöploidi frekansını artırmaktadır (9). Olgular ile kontrol grubu arasında semen parametreleri arasında istatistiksel olarak fark görülmediğinden, 7 olguda görülen anöploidi frekansı artışı İKE'in varlığını kuvvetlendirmektedir.

Sonuç olarak heteromorfizm taşıyan 7 bireyde İKE tespit edildi. Elde edilen bu bulgu genel bir bulgu olarak değerlendirilmemelidir. Çünkü aynı heteromorfizmde bile bireyler arasında İKE bakımından fark görülmektedir. Bu nedenle bu farklılıkların mekanizmasını ortaya koyacak çalışmalar planlanması gerekmektedir. İKE'in oluş mekanizmasını anlamak için sinaptonemal kompleks çalışmaları ve kromozom varyantlarında moleküler genetik çalışmalar yapılmalıdır.

NOT: Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir. (BAP No: 09102001).

KAYNAKLAR

- Kowalczyk M, Srebniak M, Tomaszewska A. Chromosome abnormalities without phenotypic consequences. *J App Genet* 2007;48:157-166.
- Endow SA, Glover DM. Dynamics of Cell Division. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2002. pp 203-235.
- Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from 13-years incidence study in Arthus, Denmark. *Hum Genet* 1995;87:81-83.
- Fryns J, Kleczkowska A, Londers L, van den Bergh H. Unusual chromosome 9 polymorphism and reproductive failure. *Ann Genet* 1985;28:49-51.
- Di Gennaro G, Mascia A, Grammaldo L. Focal cortical dysplasia and pericentric inversion of chromosome 9; a case report. *Journal of Neurological Sciences* 2004;21:143-146.
- Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online* 2005;11:726-732.
- Lejeune J. Autosomal disorders. *Pediatrics* 1963;32:326-337.
- Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, et al. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 2005;28:372-379.
- Machev N, Gosset P, Warter S, Treger M, Schillinger M, Viville S. Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertil Steril* 2005;84:365-373.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 2000;106:500-505.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000;15:351-365.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004;19:1345-351.
- Vozdova M, Oracova E, Horinova V, Rubes J. Sperm fluorescence in situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Hum Reprod* 2008;23:581-588.
- Kekesi A, Erdei E, Török M, Dravucz S, Toth A. Segregation of chromosomes in spermatozoa of four Hungarian translocation carriers. *Fertil Steril* 2007;88:5-11.
- Estop AM, Ciepły KM, Munne S, Surti U, Wakim A, Feingold E. Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet* 2000;106:517-524.
- Pellestor F, Imbert I, Andreo B, Lefort G. Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod* 2001;16:1155-1164.
- Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, et al. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999;105:266-272.
- Colls P, Blanco J, Martinez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Marquez C, et al. Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q13) analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 1997;99:761-765.
- Claussen U, Michel S, Mühlig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, et al. Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res* 2002;98:136-146.
- Shaffer LG, McGovan-Jordan J, Schmid M (eds). *ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger; 2013.
- Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 2001;46:245-250.
- Grell RF. Distributive pairing in man? *Ann Genet* 1971;14:165-171.
- Ford CE, Evans EP. Robertsonian translocation in mice: segregational irregularities in male heterozygotes and zygotic imbalance. *Chrom Today* 1973;4:387-397.
- Göndör A, Ohlsson R. Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature* 2009;10:212-217.
- Lee JT, Jaenisch R. Long-range cis effects of ectopic X-inactivation centres on a mouse autosome. *Nature* 1997;20:275-279.
- McKee BD. Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;15:165-180.
- Codina-Pascual M, Navarro J, Oliver-Bonet M, Kraus J, Speicher MR, Arango O, et al. Behaviour of human heterochromatic regions during the

- synapsis of homologous chromosomes. *Hum Reprod* 2006;21:1490-1497.
28. Stahl A, Luciani JM, Devictor M, Capodano AM, Hartung M. Heterochromatin and nucleolar organizers during first meiotic prophase in quail oocytes. *Exp Cell Res* 1975;15:365-371.
29. Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, et al. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet* 2002;10:790-800.
30. Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 2006;85:661-666.
31. Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, et al. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2007;22:136-141.