

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN

İNFERİL ERKEK HASTALARDA 5,10
METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ (MTHFR) GEN
METİLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatih DİDİŞEN

EDİRNE-2016

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN

**İNFERTİL ERKEK HASTALARDA 5,10
METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ (MTHFR) GEN
METİLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatih DİDİŞEN

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2012/158

Tez No :

EDİRNE-2016

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç.Dr.Hakan GÜRKAN danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Fatih DİDİŞEN tarafından tez başlığı **“İnfertil Erkek Hastalarda 5,10 Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Metilasyonunun Araştırılması”** olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 04/02/2016 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **“Yüksek Lisans Tezi”** olarak kabul edilmiştir.



İmza

Prof.Dr. Suat ERDOĞAN

JÜRİ BAŞKANI

Prof.Dr. Filiz AYDIN

Doç.Dr. Hakan GÜRKAN

İmza



ÜYE

İmza



ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden tezimin bitim aŐamasına kadar kendisi ile çalışma olanağı sağlayan değerli hocam Doç.Dr. Hakan GÜRKAN'a, bu çalışmanın gerçekleŐmesinde yardımlarını esirgemeyen Yard.Doç.Dr.Hilmi TOZKIR ve Uzman Biyolog Ebru GÖNCÜ'ye, İstatistiksel danıŐmanlık yönünden bana yardımcı olan Ege Üniversitesi Biyostatistik Anabilim dalında görevli Hatice ULUER'e ve her zaman ve her konuda desteğini hissettiğim değerli eŐim ile yeni doğan biricik oğluma ve aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
ERKEK ÜREME FİZYOLOJİSİ.....	2
ERKEK ÜREME SİSTEMİ.....	2
SPERMATAGONEZ.....	2
EJAKÜLASYON.....	4
KLASİK SEMEN ANALİZİ.....	5
ÜREME VE İNFERTİLİTE.....	8
ÜREME VE İNFERTİLİTENİN TANIMI.....	8
EPİDEMİYOLOJİ VE PREVALANS.....	8
İNFERTİLİTE NEDENLERİ.....	9
İNFERTİLİTENİN TANILANMASI.....	12
ERKEK İNFERTİLİTESİNDE GENETİK DEĞERLENDİRME.....	12
ERKEK İNFERTİLİTESİNDE EPİGENETİK –EPİGENOM ROLÜ.....	18

EPIGENETİK.....	18
EPIGENETİK MEKANİZMALAR	18
GENETİK KONTROL VE EPIGENETİK DÜZENLEME.....	20
EPIGENOMİK.....	25
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	29
BULGULAR.....	38
TARTIŞMA.....	47
SONUÇLAR.....	52
ÖZET.....	55
SUMMARY.....	57
KAYNAKLAR.....	59
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	63
TABLolar LİSTESİ.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	65
EKLER	
EK-1 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	
EK-2 Etik Kurul Formu	
EK-3 Tez Çalışması Orijinallik Raporu	

SİMGE VE KISALTMALAR

μ l	: Mikro litre
5- metil THF	: 5-metil tetrahidrofolata
5,10-metilenTHF	: 5,10 metilentetrahidrofolat
ACTG	: Nükleotid sekansı
AZF	: Azoospermi İlişkili Faktör
BVDA	: Bilateral vaz deferens agenezi
C	: Sitozin
CBAVD	: Konjenital Bilateral Vas Deferens Agenezisi
CFTR	: Kistik fibroz transmembran iletim düzenleyicisi
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran regülatör
CG	: Sitozin Guanin
CpG	: DNA dizisindeki guaninin önünde yerleşmiş sitozinler
CUAVD	: Konjenital Unilateral Vas Deferens Agenezisi
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
DNMT	: DNA metiltransferazlar
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ESHRE	: Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği
FISH	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon

GnRH	: Gonadotropin salıcı hormon
HAT	: Histon asetil transferaz
HDAC	: Histon deasetilazlar
HDAC	: Histon deasetilaz
HLA	: Doku Grubu Antijenleri
HRB	: High resolution bantlama
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu
LH	: Luteinize edici hormon
MeCP2	: Methyl-binding protein
miRNA	: Mikro RNA
ml	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz geni
MTR	: 5-metiltetrahidrofolat-homosistein metiltransferaz
MTRR	: 5-metiltetrahidrofolat homosistein metiltransferaz redüktaz
OAT	: Oligoastenoterazoosperm
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyon
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
siRNA	: Küçük interferans RNA
SRY	: Y kromozomu üzerindeki gen
STS	: İşaretlenmiş dizi bölgeleri
THF	: Tetrahidrofolat

GİRİŞ VE AMAÇ

Erkeklerde kısırlığın çok karmaşık bir patoloji olduğu ve erkek kısırlığının etiyolojisinde fizyolojik, biyokimyasal ve genetik süreçler hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu bildirilmiştir. Birçok araştırmada erkek kısırlığının genetik temelleri incelenmiş ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda kısırlık vakalarının sadece % 15'lik bir kısmı açıklanabilmiştir. Bu noktada önemli olduğunu düşündüğümüz araştırma konularından bir tanesi de epigenetik yeniden düzenlenmelerdir. Epigenetik, DNA dizisinde bir değişiklik olmaksızın DNA ve histon yapısının değiştirilmesiyle gen ifadesinde elde edilen modifikasyonlardan oluşur. Epigenetik yeniden düzenlenmeler arasında DNA metilasyonu, çevrim sonrası histon değişimleri ve kromatin şekillenmesi gibi uygulamalar vardır (1). CpG dinükleotidleri içindeki sitozin artıklarının metilasyon yapıları gen ifadesine ilişkin önemli epigenetik bilgiler sunar. Bu dinükleotidler, guanine bir fosfodiester bağıyla bağlı olan sitozinden oluşurlar. CpG dinükleotidleri CpG adaları olarak bilinen bölgelerde bulunurlar (2). DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar (DNMT1, DNMT2, DNMT3A ve DNMT3B) tarafından düzenlenir (1). Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) folat metabolizmasında, DNA sentezinde ve remetilasyon tepkimelerinde temel düzenleyici olarak görev yapan bir enzimdir. MTHFR, 5,10-metiltetrahidrofolat'ın 5-metiltetrahidrofolat'a indirgendiği tepkimeyi katalize eder (3).

Bu tez çalışmasında nedeni açıklanamayan erkek infertilitesi ile MTHFR geni metilasyon düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

ERKEK ÜREME SİSTEMİ FİZYOLOJİSİ

Erkeklerde Üreme Sistemi

Erkek üreme fizyolojisi üç başlıkta incelenir; *Ejakülasyon, spermatogenez, kapasitasyon ve fertilizasyon* (4). Erkek üreme sisteminin organları ise; bir çift testis, taşıyıcı kanallar, bu kanallara açılan yardımcı üreme bezleri ve penistir. Sistemin çift fonksiyonlu organları olan testisler, üreme hücresi olan spermleri ve eşey hormonu olan testosteronu üretirler (5).

Spermatogenez

Spermin oldukça karmaşık ve uzun bir süreci vardır (6). İnsan spermatogenezini 70-72 günlük sikluslar halinde pubertede başlar, yaşam boyu devam eder. Spermatogenezin başlatılması ve kontrolü hipotalamus-hipofiz işbirliği ile olmaktadır (6,7).

Sperm hücreleri, seminifer tübüllerde üretilmektedir. Seminifer tübüller yapıca iki esas parçadan oluşmaktadır. Bunlardan birisi, tübülün iç kısmında yer alan ve seminifer epitel olarak adlandırılan kısım, diğeri ise tübülün çevresinde yer alan peritübular dokudur (5). Seminifer epitel hücreleri esas olarak iki grup altında toplanır; 1- Spermatogenik hücreler, 2- Destekleyici hücreler (Sertoli hücreleri). Sertoli hücreleri, spermatogenik hücreleri destekler, korur ve gelişmekte olan spermleri besler. Seminifer tübülün içerdiği ikinci grup hücreler olan spermatogenik hücreler, tübülün çevresinden lümenine kadar olan bölgeyi tamamiyle doldururlar. Tübülde erken gelişme evresindeki hücreler çevrede, ileri evredekiler daha içte bulunmaktadır. En dışta yer alan sperm ana hücrelerinden (spermatogonyum) çoğalma,

kromozom sayısını yarıya indirme, farklılaşma gibi birbirini izleyen bir seri olaylar dizisi sonucu olgun spermeler meydana gelmektedir. Bu süreç spermatogenez olarak tanımlanmaktadır (5).

Bir başka deyişle, "spermatogenez", germ hücrelerinin farklılaşma aşamalarından geçerek sperm hücresi haline gelmesidir. Bu aşamada germ hücreleri 46 kromozom sayısına sahip diploid (2n) durumdan, 23 kromozom sayısına sahip haploid (n) indirgenir ve yine 23 kromozom içeren haploid (n) yumurta hücresi ile birleşerek, 46 kromozom yapısına sahip yeni bir bireyin oluşmasına olanak sağlarlar (6).

Spermatogenezin evreleri; spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatositler, spermatidler ve olgun spermatozoadır (5,8).

Geçirdikleri mitoz bölünmelerle bu hücreler, primer spermatositleri ve yeni spermatogonyumları oluştururlar. Mayoz bölünmenin I. evresini tamamlayan primer spermatositler sekonder spermatositleri oluştururlar. Ardından II. evrenin sonunda görülen haploid hücreler olan spermatidler oluştururlar. Spermiyogenezis ile sitoplazmalarının çoğunu kaybeden haploid hücreler, organellerini yeniden düzenleyip ve flagellalarını oluşturup, morfolojik olarak spermatozoa şekline dönüşürler (8). **Şekil 1**'de spermatogenezin evreleri belirtilmiştir (5).

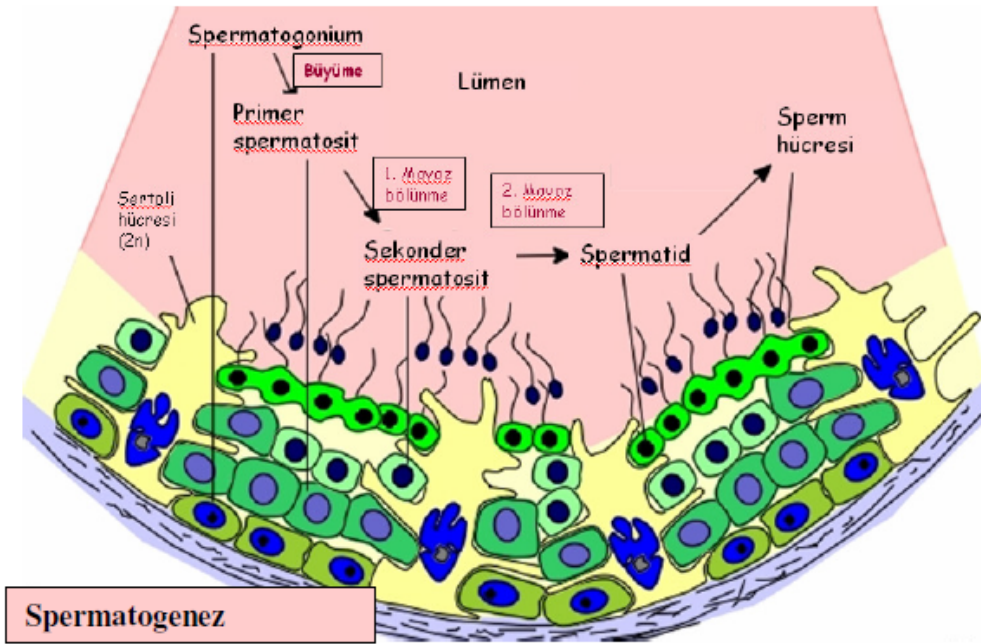
Birçok çevresel faktör oosit ile etkileşimini ve spermatozoanın kapasitasyonunu negatif yönde etkileyebilmektedir (6).

Spermatogenezis süreci hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen tarafından düzenlenir ve bu süreçte luteinize edici hormon (LH) ile folikül stimüle edici hormon (FSH) da yer alır. LH ve FSH reseptörleri germ hücrelerinde bulunmamasına rağmen, hormonal sinyalleri sertoli hücrelerinden germ hücrelerine doğru taşıyan yoğun bir iletişim ağı bulunur (8). Hipotalamusta salgılanan ve kendi portal venöz sistemi aracılığıyla taşınan gonadotropin salıcı hormon (GnRH), FSH ve LH salgılanması için ön hipofizi uyarır. Ön hipofizden salgılanan FSH seminifer tübüllerdeki sertoli hücrelerini uyararak sperm üretimini sağlar. LH etkisiyle uyarılan Leydig hücreleri ise testosteron üretir. Spermatogenezis ve germ hücrelerinin maturasyonunu FSH ve testosteron seminifer tübülleri uyararak stimüle eder (7).

Spermatogenez boyunca üretilen germ hücreleri sertoli hücreleri tarafından beslenir. Seminifer tübüllerin bazal kompartmanında bulunan diploid kök hücreleri “Koyu, Tip A spermatogonialar” olarak bilinirler ve bunlardan “Berrak, Tip B spermatogonialar” gelişir. Bu hücreler laminal kompartmana geçerek mayoz bölünme evresine ulaşırlar (7).

Tip B spermatogoniaların proliferasyonu sonucunda gelişen primer ve sekonder spermatositlerden daha sonra haploid kromozom yapısında spermatidler gelişir. Spermatidler spermiyogenez evresine geçerek şekil değiştirirler. Önce uzarlar, baş kısmında bir akrozomal kep gelişir. Daha sonra da arka kısmında kuyruksu çıkıntı kuyruğa dönüşerek, oval şekilli olan spermatozoon gelişir (7).

Spermatozoonlar, spermiyolizis olarak bilinen bir işlem sonrasında seminifer tübüllerin içine alınırlar. Sertoli hücreleri mayoz bölünmeye yanıt olarak glikoprotein yapısında inhibin A ve B tiplerini salgılar ve bu olay da FSH salgısını sınırlandırır. Spermatogenezin bozulduğu durumlarda FSH ve LH düzeyleri yükselir (7).



Şekil 1. Spermatogenezin evreleri (5).

Ejakülasyon

Spermatogenez üreme fizyolojisinin ilk basamaklarından ve kontrol eden genlerin büyük çoğunluğu Y kromozomunda uzun kolun orta kısmında bulunur. Spermatogenezin

oluşması için skrotum sıcaklığının vücut ısısından 2°C daha düşük olması, yeterince testosteron konsantrasyonuna ve arteriyel kanda bulunan doku oksijen basıncının yarısına gereksinim vardır. Leydig hücrelerince LH etkisi altında testesteron üretilir. Testosteron reseptörleri sertoli, leydig ve peritubuler hücrelerde saptanmıştır ancak germ hücrelerinde saptanmamıştır. Normal seviyelerde sperm üretimi için yine normal seviyelerde LH ve FSH üretilmesi gerekir. Yaklaşık olarak 70 güne varan spermatogenez süreci testislerde, seminifer tubulusları döşeyen sertoli hücrelerinde başlar. Bu süreç hipotalamik GnRH'nın kontrolündedir ve ön hipofiz bezinden gonadotropinleri salgılatır. LH – Leydig - Testosteron ile FSH – Sertoli - İnhibin B negatif feed-back aksları vardır. Sertoli hücresi içindeki spermatogonya primer ve sekonder spermatosit basamaklarıyla bölünerek mayoza girer. Haploid yuvarlak spermatidler oluşur, bu spermatidlerde başka bölünme olmadan spermatozoaya farklılaşırlar. Akrozomal başlık yoğun DNA içeren sperm başını zarf gibi sarar. Salınan spermatozoalar, epididimiste 2-14 günlük süreçte olgunlaşırlar. Epididimiste, semen içine, dölllenme ve hareket potansiyeli kazandıran proteinler salgılanır (4).

Klasik Semen Analizi

Dünya çapında 32 kliniği içeren çok merkezli bir çalışmada, infertil çiftlerin % 30-40'ında sadece erkek faktörü infertilite nedeni olarak rapor edilmiştir (6). Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasındaki ilk basamak klasik semen analizidir (4, 6, 9). Semen karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri (5. yüzdelikleri ve %95 güven aralıkları) **Tablo 1'** de verilmiştir.

Tablo 1. Semen karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri (5. yüzdeleri ve %95 güven aralıkları (10)

Semen Hacmi (ml)	1.5 (1.4-1.7)
pH	≥ 7.2
Sperm Konsantrasyonu (10^6/ml)	15 (12-16)
Toplam Sperm Sayısı (10^6/ejekülat)	39 (33-46)
Toplam motilite (PR+NP,%)	40 (38-42)
Sperm Morfolojisi (Normal Formlar,%)	4 (3,0-4,0)

Sağlıklı bir erkekte, 1 ml semende en az 15×10^6 spermatozoa bulunmalıdır. Ejakülatta, bu sayının altında (oligozoospermi-sperm konsantrasyonu $<15 \times 10^6$ spermatozoa/ml) veya hiç sperm bulunmaması (azoospermi) sperm sayısal anomalileri olarak bilinir (5). Semen analizinde normal ve patolojik bulguların isimlendirilmesi **Tablo 2'** de belirtilmiştir.

Azoospermi infertil erkeklerin %8'inde görülen ejakülatta sperm hiç olmamasıdır. Azoospermi ya ekstra-testikuler duktal sistemin obstrüksiyonu (obstrüktif azoospermi) ile ya da spermatogenez bozukluğundan (nonobstrüktif azoospermi) olabilir. Obstrüktif azoospermisi olan hastalar, normal boyutta testis, normal epididimal olgunluk ve normal serum FSH seviyesine sahiptir. Non-obstrüktif azoospermik hastalarda çoğunlukla testisler küçük ve yumuşak, FSH ise yüksektir (9).

Obstrüksiyonu olmayan ve rutin semen analizinde sperm görülmeyen erkeklerin yaklaşık %21.4'ünde semende santrifüj sonrası sperm görülür, dolayısıyla bunlar azoospermik değildir (9).

Tablo 2. Semen analizinde normal ve patolojik bulguların isimlendirilmesi

(4,5,6,9,11,12)

Normospermi	15 (12-16) (10^6 /ml)
Oligozoospermi	Sperm konsantrasyonu $< 15 \times 10^6$ spermatozoa/ml
Astenozoospermi	$< \% 50$ iken hareketli spermatozoa veya $< \% 25$ hızlı hareketli spermatozoa
Teratozoospermi	$< \% 30$ normal şekilli spermatozoa
Oligostenoteratospermi	Üç parametrenin (konsantrasyon, hareket, şekil) de bozuk olduğunu gösterir.
Azoospermi	Ejakülatta spermatozoa yokluğu
Aspermi	Ejakülata yokluğu

Semen analizinin en önemli kısmını ise mikroskopik inceleme oluşturmaktadır. Mikroskopik incelemede spermin hareketliliği, sayısı, aglütinasyonun varsa derecelendirilmesi, yuvarlak hücre sayısı, morfolojisi ve yuvarlak hücrelerin sınıflandırılması incelenir (4).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilen ve hareketliliği 4 dereceyle değerlendiren sistem, uygulamasının kolay olması ve karmaşık cihazlara ihtiyaç göstermeden gerekli kalitatif bilgiyi sağlaması nedeniyle rutin semen analizinde tercih edilmektedir:

- a. Hızlı doğrusal progresif hareket,
- b. Yavaş doğrusal ya da doğrusal olmayan hareket,
- c. Progresif olmayan hareketlilik,
- d. Hareketsiz (6).

ÜREME VE İNFERTİLİTE

Üreme ve İnfertilitenin Tanımı

Erkeklerde kısırlığın çok karmaşık bir patoloji olduğu ve erkek kısırlığının etiolojisinde fizyolojik, biyokimyasal ve genetik süreçler hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (13). Birçok araştırmada erkek kısırlığının genetik temellerini incelenmiş ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda kısırlık vakalarının sadece % 15'lik bir kısmı açıklanabilmiştir (1,13).

Fertil çiftleri de kapsayan çalışmalarda, gebelik oluşumunun çiftlerin %50'sinde evliliklerinin ilk 6 ayında, %90'ında ilk bir yıl içerisinde ve %10 çiftte ise bu sürenin daha uzun döneme yayıldığı rapor edilmiştir. Fertilitenin incelendiği istatistiksel çalışmalarda, çiftlerin yaklaşık %2-7'sinin infertil olduğunu bildirilmiştir (14).

Tüm canlıların en önemli ve temel içgüdülerinden birisi de üreme ve nesli devam ettirmektir. İnfertilite ise kişileri sosyoekonomik açıdan ilgilendiren, dolayısı ile toplumu da ilgilendiren önemli bir sağlık problemidir (15).

İnfertilite; üreme yeteneğinin istek dışında azalması veya kaybolması olarak da tanımlanan, reproduktif çağıdaki çiftlerin ortalama %15'ini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. DSÖ tarafından infertilite “çiftlerin en az bir yıl süre ile düzenli aralıklarla korunmasız cinsel birlikteliğe rağmen bebek sahibi olamaması” olarak tanımlanmıştır (13,16).

Epidemiyoloji ve Prevalans

Bir üreme sağlığı sorunu olan infertilite son yirmi yılda daha fazla tartışılır hale gelmiştir. DSÖ, dünyada 60-80 milyon infertil çift olduğunu tahmin etmektedir (13). İnfertilitenin görülme sıklığı, bölgeden bölgeye, ülkeden ülkeye değişmekle beraber, gelişmiş ülkelerde çiftlerin yaklaşık %8-10'unda (17) gelişmekte olan ülkelerde %15-20'sinde infertilite görülmektedir. Toplumların sosyokültürel farklılıklarına bağlı olarak infertilite insidansı da farklılık gösterebilmektedir (13).

Türkiye'de infertilite sıklığı ile ilgili net bir bilgi bulunmamaktadır. Toplumdaki çiftlerin yaklaşık %15-20'sini etkileyen bu önemli sağlık sorununda (18) erkek infertilitesinin %40-50 oranında olduğu öngörülmektedir (11,13,16,19,20,21).

Yapılan çalışmalar erkek infertilitesinin sonradan ortaya çıkabildiği gibi önemli bir kısmının da genetik kökenli olduğunu göstermektedir (7,20,22).

İnfertilite Nedenleri

Erkek infertilitesinin etiolojisinde rol oynayan faktörler: Kromozomal bozukluklar ve tek gen hastalıkları, diyabet, böbrek yetmezliği, hormonal bozukluklar gibi metabolik hastalıklar, beslenme, çevre kirliliğinin artması, inmemiş testis gibi patolojiler, artmış sigara tüketimi ve bağımlılık yapıcı maddelerin kullanımı, kimyasal maddelere maruz kalma, alkol, radyasyon gibi çevresel faktörler ile sık geçirilen ürogenital sistem infeksiyonları olarak sıralanabilir (18,21).

İnfertilite olgularının yaklaşık yarısı erkek faktörü olduğundan iyi bir semen analizi kaçınılmazdır (11). İnfertil çiftlerin araştırmasında 3 hafta aralıklarla en az iki semen analizi mutlaka yapılmalıdır (9,16). Son 6 aydan daha eski analizler güncel durumu yansıtmayabilir. Semen analizi sperm ve seminal karakteristiklerin değerlendirilmesini kapsar. Semen sınıflandırılması asperminin en zayıf ve antikör kaplı spermatozoanın en iyi olduğu tanımlama içinde üç hafta arayla iki örnekle arasında iyi sonuç veren temel alınarak yapılır (9). En az iki spermiyogram analizi sonucunun da anormal saptanması durumunda ileri androlojik değerlendirme gerekir (16).

Nieschlag ve ark.'ları (1997) çalışmalarında infertil erkeklerin %30'unun hormon bozukluğu ve diğer bilinen infertilite sebepleri olmamasına rağmen oligozoospermik veya azoospermik olduğunu bildirmişlerdir. Ma ve ark.'ları (2000) çalışmalarında, 25 ülke ve 33 merkezde yapılan çalışmaların sonuçlarını değerlendirmişler ve 6682 bireyden 717 (%10.2)'sinin azoospermik veya oligozoospermik ($<5 \times 10^6$ ml) olduğunu saptamışlardır (14).

Sebebi bilinmeyen oligozoospermik ve azoospermik olgularda sayısal ve yapısal kromozomal düzensizliklere ve Y kromozomu mikrodelsiyonlarına sık karşılaşıldığı bilinmektedir. Yapılan çok sayıdaki çalışmada azoospermik ve oligozoospermik olgularda kromozomal düzensizlik oranı %2,1-10,3 olarak rapor edilmiştir. Kromozomal düzensizlik oranının oldukça yüksek olduğu bu toplulukta spermatogenez sırasında dengesiz kromozom kuruluşların oluşması ihtimali yüksektir (7).

Bir başka çalışmada non-obstrüktif azoospermik erkeklerin yaklaşık % 12'sinde kromozom anomali bulunmasının, genetik etyolojinin erkek infertilitesinde belirgin rol

oynadığını desteklemektedir. Aynı zamanda non-obstrüktif azoospermik veya oligozoospermik erkeklerin % 6-18'inde Y kromozomu mikrolezyonları bulunmuştur (23).

Erkek infertilitesini etkileyen faktörlerin bir kısmı **Tablo 3'**de belirtilmiştir.

Tablo 3. Erkek infertilitesini etkileyen faktörler (13)

İNFERTİLİTEYİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER		
Erkek Genital Organlarının Anomalileri	Sperm Anomalileri ve Fonksiyon Bozukluğuna Neden Olan Faktörler	Diğer Faktörler
Kriptorşidizm Hipoplazik testis Testiküler atrofi Hipospadias Varikosel Vasdeferens ve epididimisin yokluğu ya da tıkanıklığı	Sigara, alkol ve madde kullanımı Yetersiz hormonal uyarı Toksinlere maruz kalma Akut /kronik hastalıklar Genital organ enfeksiyonları Anatomik anormallikler Kemoterapi ve Radyasyon Ereksiyon bozuklukları Seminal sıvı yapısına ilişkin bozukluklar Retrograt ejakülasyon Spinal kort yaralanmaları Stres/anksiyeteye bağlı prematür ejakülasyon Psikoterapik ve antihipertansif ilaçlar Travma	Endokrin bozukluklar Genetik bozukluklar Psikolojik bozukluklar Cinsel yolla bulaşan hastalıklar Toksik maddelere (kurşun, civa) maruz kalma Skrotumun yüksek ısıya maruz kalması (sıcak kuver banyoları ya da sauna) Kabakulağın neden olduğu orşit Yetersiz beslenme

ESHRE (Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği) tarafından infertil erkekler üzerinde yapılan geniş ölçekli bir çalışmada, yapılan tüm değerlendirmelere rağmen hastaların yaklaşık 1/3' üne tanı konulamamıştır.

Bu çalışmaya ait erkek infertilite nedenleri (4):

1	Nedeni açıklanamayan grup	% 31.1
2	Varikosel	% 15.6

3	Endokrin hipogonadizm	% 9.0
4	Subklinik enfeksiyonlar	% 8.0
5	İnmemiş testis	% 7.8
6	Eretil disfonksiyon, hipospadias	% 6.0
7	İmmünolojik	% 4.5
8	Genel ve sistemik hastalıklar	% 3.1
9	Obstrüktif patolojiler	% 1.7
10	Jinekomasti	% 1.1
11	Testis tümörleri	% 0.3
12	Malign hastalıklarda semen dondurulması	% 6.5
13	Diğer çeşitli nedenler	% 5.5

Sedanter yaşam, obezite, sigara, alkol, uyuşturucu alımı ve cinsel ilişki sıklığı gibi faktörler sperm yüzdesi, hareketliliği ve normal morfolojisine tersine olarak etki etmektedir. Çevresel tehlikelerin yanı sıra mesleki maruziyet de sperm kalitesinin düşmesine neden olan önemli faktörler arasındadır. Varikozel ve kriptorşidizmin patolojik bulguları büyük ihtimalle anormal sperm parametreleri ile ilişkili olduğu halde, erkek infertilitesine neden olan majör sebepler tam olarak açıklanamamıştır (24).

Çoğunlukla düzeltilebilir nedenler olarak bilinen faktörlerin haricinde erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde etiyolojik nedenler göz önünde bulundurulduğunda infertilitenin yaklaşık %23-76'sının idiyopatik olduğu bildirilmektedir (18). Kaynağı bilinmeyen infertilite diğer adıyla da idiyopatik infertilite, patofizyolojisi bilinmediğinden büyük endişe oluşturmaktadır. Çoğu olguda, infertilitenin tedavi edilecek bir nedeni olmadan erkekler klinik olarak normal bulunur. İdiyopatik erkek infertilitesi çevresel, hormonal ve genetik faktörler tarafından etkilenen multifaktöriyel bir hastalık olarak kabul edilmektedir (25).

Her ne kadar idiyopatik infertilitenin moleküler temeli açık olarak belirtilmemiş olsa da oksidatif stres altta yatan sebeplerden biri olarak gösterilmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS), akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon gibi normal sperm fonksiyonları için gerekli olmasına rağmen, onların aşırı olmasının sperm bütünlüğü ve işlevinin kaybına neden olduğu bilinmektedir (25).

İnfertilitenin Tanılanması

Erkek İnfertilitesinde Genetik Değerlendirme

Erkek infertilitesinin oluşmasına yol açan nedenlerin bir kısmı sonradan oluştuğu gibi, bir kısmı da genetik kökenlidir. Özellikle şiddetli oligozoospermik ve azoospermik hastaların etiyojilerinde genetik bozukluklar (hem otozomal kromozomlarda, hem de cinsiyet kromozomlarında meydana gelen yapısal ve sayısal bozukluklar) önemli bir yer tutmaktadır (22).

Erkek İnfertilitesinde Genetik Değerlendirmenin Amaçları:

1. Bir sonraki nesle aktarılacak genetik problemlerin öngörülmesi
2. Etiyojinin aydınlatılması
3. Testiküler sperm yapımının var olma olasılığının değerlendirilmesi (20,26).

Erkek infertilitesine yol açan sebeplerinin araştırılmasında, genetik açıdan risk taşıyan hasta grubuna hangi genetik testin yapılacağı ve hasta gruplarının özenle seçilmesi dikkat edilmesi gereken hususlardandır.

Genetik açıdan risk taşıyan gruplar:

1. Oligoastenoteratospermi ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı
2. Şiddetli oligoastenoteratospermi
3. Obstrüktif azoospermi
4. Nonobstrüktif azoospermi (26).

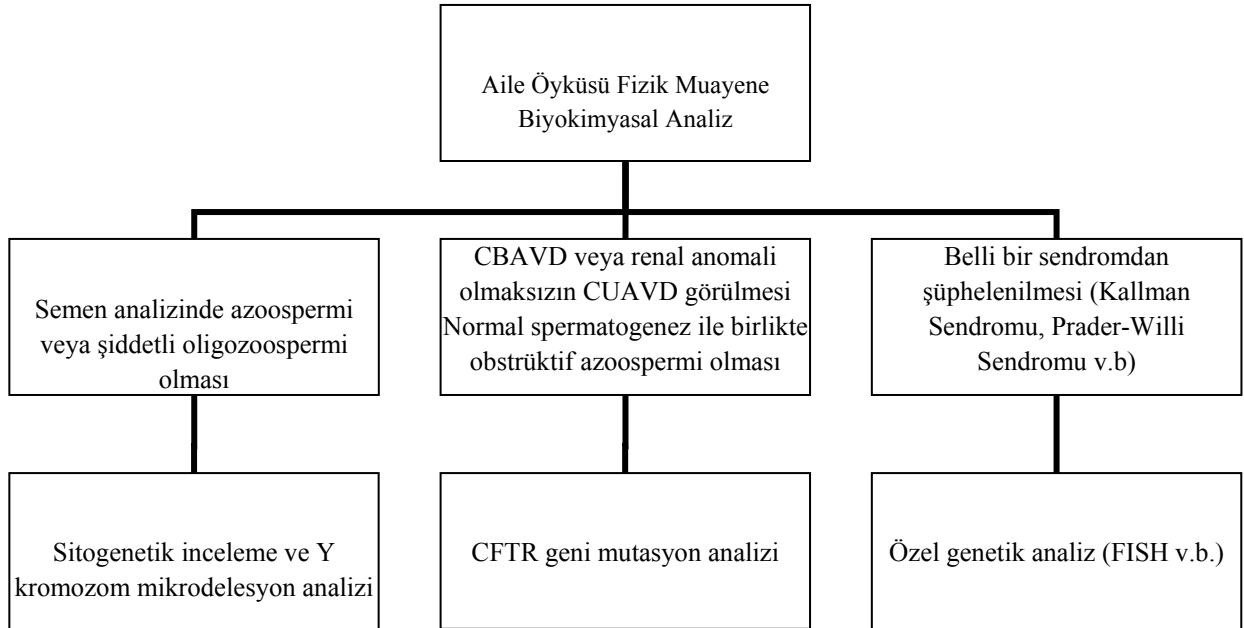
İnfertilite ile bağlantısı olan genetik anormallikler farklı yaklaşımlarla değerlendirilmektedir. İnfertil bireylerde kromozomlardaki tüm yapısal ve sayısal anormalliklerin tespit edilmesi ile karyotip analizler çok yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Son zamanlarda PCR (Polymerase Chain Reaction) metodu ile Y kromozomu üzerindeki mikrodelyasyonlar belirlenmektedir (27).

Genetik açıdan risk taşıyan hasta grubu, mutlak gerekli ve önerilebilir incelemeler **Tablo 4'** de ayrıntılı verilmiştir.

Tablo 4. Genetik açıdan risk taşıyan hasta grubu, mutlak gerekli ve önerilebilir incelemeler (26)

Hasta Grubu	Mutlak gerekli incelemeler	Önerilebilir incelemeler
Şiddetli OAT	Periferik kandan kromozom analizi	Y kromozom mikrodelsyonu Kistik fibrozis mutasyonları
Nonobstrüktif azospermi	Periferik kandan kromozom analizi Y kromozom mikrodelsyonu	
Obstrüktif azospermi	Kistik fibrozis mutasyonları	Periferik kandan kromozom analizi
Oligoastenoteratospermi ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	Periferik kandan kromozom analizi	

İnfertil hastaların etyolojik değerlendirmesinde izlenecek genetik tetkik algoritması ise **Şekil 2**'de gösterilmiştir (20).



Şekil 2. İnfertil erkek hastaların tanı algoritması (26).

Günümüzde hamileliğin doğal olarak başaramayacağı çiftlerde gelişen intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) olarak adlandırılan yeni teknikler ile sperm faktörüne dayanan infertilitenin üstesinden gelinmektedir. Fakat her çifte ICSI'den önce, çiftlerde mevcut olan infertilitenin, diğer değişken fenotipik belirtilerin ve mevcut olan genetik hasarın çocuğa geçme riski hakkında bilgi verilmelidir (22).

Şiddetli oligozoospermi ve azoospermi ile birlikte görülen genetik bozukluklar spermin taşınmasını engelleyerek ya da sperm yapımını bozarak erkekte infertiliteye neden olabilir. Erkek infertilitesi ile ilgili dört genetik faktör bilinmektedir (22).

- 1- Konjenital vaz deferens agenezine neden olan kistik fibrozis gen mutasyonları,
- 2- İzole spermatogenez defekti yapabilen Y kromozom mikrolelesyonları,
- 3- Sperm fonksiyonlarını direkt olarak etkileyen genetik sendromlar
- 4- Testis fonksiyonlarını bozan kromozomal anomaliler,

1- Y Kromozom Mikrolelesyonları

Kromozomların parça kaybetmesine delesyon adı verilmektedir. Bir kromozomun üzerinde dönüp ilmi oluşturmayla başlayan delesyon oluşumu ayrıca birbiriyle temasta olan iki kromozomun kesişme noktalarında kırılmalar olan sinapsis evresinde ve ortaya çıkan bu parçaların farklı kromozomlara yapışmasıyla da meydana gelebilir (5).

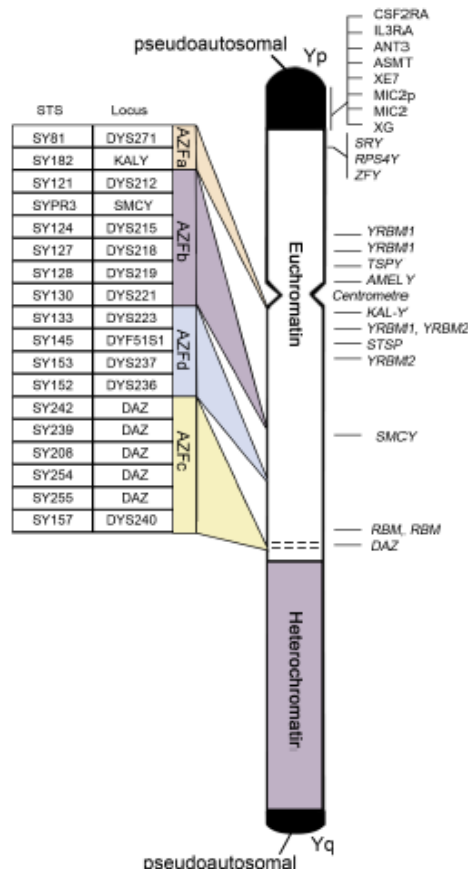
Spermatogenetik yetmezliğin en sık görülen sebeplerinden biri de en önemli erkek infertilite nedenlerinden birisi olan Y kromozom mikrolelesyonlarıdır (20). İlk olarak spermatogenezisteki bozukluklar ile genetik yapı arasındaki ilişkinin temeli 1976 yılında Tiepolo ve Zufardi tarafından yapılan infertil erkeklerdeki sitogenetik çalışmalarla atılmıştır. Aynı araştırmacılar, karyotip analizi ile azoospermik 6 hastada Y kromozomunun uzun kolunda geniş bir terminal delesyon bulmuş ve bu bölgenin spermatogenez için gerekli olduğunu bildirmişlerdir (7,15,23,28). Y kromozomu üzerinde delesyonun bulunduğu yer spermatogenezini etkilemesi bakımından önemlidir (28).

Tespit edilen bu bölge AZF (Azoospermi İlişkili Faktör) olarak adlandırılır ve bu delesyon bölgeleri spermatogenez ve germ hücreleri gelişim ve değişimi için kritik gen ailelerini içermektedir (7,23). Bu bölgede meydana gelen delesyonlar fenotipik bozukluk

yapmadan izole spermatogenez defektine (azoospermi ya da şiddetli oligozoospermiye) sebep olur (22).

Y kromozomu mikrodelesyonu, azoospermik ya da şiddetli oligozoospermik olan vakalarda %10-15 sıklığında görülmektedir (28).

Bugün Y kromozomunun uzun kolu üzerinde, infertil erkekte delesyona uğradığı ve bunlardan her birinin spermatogenezin farklı aşamalarında etkili olduğu gösterilen AZFa, AZFb ve AZFc olmak üzere en az 3 bölgenin varlığı bilinmektedir (**Şekil 3**).



Şekil 3. Y kromozomunun uzun kolu (20)

Bu bölgelerin delesyonları, AZFa, AZFb ve AZFc delesyonları olarak adlandırılır (23). Y kromozom mikrodelesyonları spermatogenetik yetmezliğin en sık görülen sebeplerinden biridir. İdiyopatik oligozoospermide %7-10, idiyopatik azoospermide %15-20 oranında Y kromozom mikrodelesyonlarına rastlanmıştır (20).

Bu nedenle şiddetli oligozoospermik veya nonobstruktif azoospermik hastaların hepsine ICSI işleminden önce Y kromozom mikrodelesyon testi yapılmalıdır. Y mikrodelesyonuna

sahip erkeklerin tüm erkek çocukları aynı patolojiye sahip olacağından aile bu konuda genetik danışma verilerek işleme başlanılmalıdır (22).

Y kromozom mikrolelesyonlarını belirlemek amacı ile, STSs denilen Y kromozomunun spesifik olarak işaretlenen bölgelerin çoğaltılması için PCR yöntemi kullanılabilir. STS genom üzerinde spesifik bir lokus için (Y kromozomu için 300 den fazla vardır) marker olarak fonksiyon gören DNA'nın kısa segmentleridir. Analiz, diğer özel bölgeleri kapsayan STS'leri ve putative spermatogenezis genlerini kodladığı düşünülen AZF bölgeleri her zaman içermelidir. Ölçüm negatif ve pozitif kontrollerle sırası ile normal erkek ve kadın DNA'sı ile yapılmalıdır ve Y kromozomu için özellikle de SRY geni için bir pozitif marker içermelidir. Y kromozom bölgeleri amplifiye edildikten sonra DNA fragmanları jel elektroforezi boyunca boyutlarına göre ayrılır. Silinen intervaller jel üzerinde band paterninde bir bantta değişiklik meydana gelmesi ya da bandın yok olmasıyla belirlenir (22).

Azoospermik vakaların %16'sında, ağır oligozoospermik vakaların %5'inde AZFc delesyonu saptanmaktadır. AZFc delesyonlarının toplumdaki sıklığının 1/4000 olduğu düşünülmektedir. AZFb delesyonları ise vakaların %2'sinde görülmektedir (28).

2- Konjenital Vaz Deferens Agenezisine Sebep Olan Kistik Fibrozis Gen Mutasyonları

Kistik fibrozis; Otozomal resesif geçişli genetik bir hastalık olarak görülen bu hastalık, kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) genindeki mutasyonlara bağlı olarak tanımlanmaktadır (20,22). CFTR geni, iyon kanalı olarak fonksiyon gören bir membran proteinini kodlar ve seminal vezikül, ejakülatör kanal, vas deferens ve epididimisin distal 2/3'ünün oluşumunu da etkiler (20). Bu nedenle CFTR genindeki bazı mutasyonlar vaz deferens agenezisi ile sonuçlanır (22).

İnfertilitenin genetik bağlantısını gösteren bir diğer durum, obstruktif azoospermi ile klinikte görülen, hastaların yaklaşık %25'inde tespit edilen konjenital bilateral vaz deferens agenezisi olgularıdır (15).

Azoospermik olguların %1.4'ünü oluşturan konjenital vaz deferens agenezili hastaların %85'inde CFTR gen mutasyonları tanımlanmıştır. Bugüne kadar 1500'ün üzerinde farklı mutasyon ve sayısız polimorfizm kistik fibrozisli ya da bilateral vaz deferens agenezili (BVDA) hastalarda rapor edilmiştir (22). Kistik fibrozis hastalarının %65-95'inde vaz

deferens agenezisi bulunmuş ve bu hastaların sadece %2-3'ünün fertil olduğu saptanmıştır (20).

3- Kromozom Anomalileri

Normal insan somatik hücrelerinde 1 çift seks kromozomu ve 22 çift otozom olmak üzere toplam 46 kromozomlu diploid hücrelerdir. Erkekler X ve Y olmak üzere 2 farklı cinsiyet kromozomuna sahiptir (22).

İnfertil ve subfertil erkeklerde kromozomal bozukluklar sıklıkla saptanmaktadır (5). Kromozom anomalileri normal populasyonla (%0,5) karşılaştırıldığında, infertil erkeklerde bu oran (%5,8) çok daha yüksektir. İnfertil bireylerde seks kromozom anomalileri otozomal kromozom anomalilerinden daha siktir (%4,2- %1,5) (22). Kromozom anomalileri tüm infertil erkek hastalarda yaklaşık %5,1 oranında gözlenirken, bu oran oligozoospermik erkek hastalarda %4,6 ve azoospermik erkek hastalarda %13,7 olarak saptanmıştır (20).

Kromozom anomalileri yapısal ve sayısal anomaliler olmak üzere ikiye ayrılır. Yapısal kromozom anomalileri inversiyon, delesyon, kromozomun bir parçasının diğer kromozoma translokasyonu ya da kromozomun bir kısmının dublikasyonu şeklinde gerçekleşir (22). İnfertil erkeklerde translokasyonların normal populasyona göre 8,5 kat, inversiyonların ise 8 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (20).

Sayısal kromozomal anomaliler tüm kromozomların multipl kopyalarını içeren hücreler poliploid ya da bir ya da daha fazla kromozomun bir ilavesini ya da delesyonunu içeren hücreler anöploid olarak sınıflandırılır (22).

Klinefelter Sendromu % 0,2 prevalansı ile erkek hipogonadizminin en sık görülen formudur (15). Klinefelter sendromu, XYY erkekler ve miks gonadal disgenezi bu grup hastalardır. Klinefelter sendromu en sık gözlemlenen seks kromozom bozukluğudur (26) ve infertil vakalarda 30 kat fazla rastlanır. Azoospermik vakalarda ise %14 oranında rastlanır (20).

4-Sperm Fonksiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar

Erkek infertilitesini indirekt olarak değerlendiren sperm sayısı, morfoloji ve motilitesini içeren testler fertilitite kliniklerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda anormal semen parametrelerine sahip hastalarda sperm DNA hasarının yüksek olduğunun tespit

edilmesi ile yeni yaklaşımlar gündeme gelmiştir. Sperm DNA hasarı anormal kromatin paketlenmesi, reaktif oksijen türevleri (ROS), sperm apoptozu gibi farklı mekanizmalar ile oluşabilmektedir (28).

Sperm aktivitesini dolayısıyla spermatogenezi etkileyen diğer faktörler de; Noonan Sendromu, Myotonik Distrofi, Androjen sentez ve fonksiyon bozuklukları, Genetik Endokrinopatiler, Gonadotropin-Releasing Hormonun (GnRH) üretim veya sekresyon bozuklukları, Primer Silier Diskinezi, Prader-Willi Sendromu, LH ve FSH fonksiyon bozuklukları ve Kallman Sendromu olarak sıralanmaktadır (20).

ERKEK İNFERTİLİTESİNDE EPİGENETİK –EPİGENOM ROLÜ

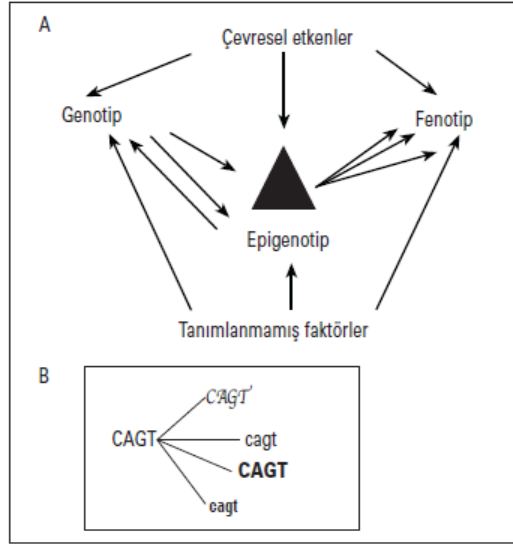
Epigenetik

Erkek kısırlığında halen açıklanamayan birçok nokta olduğu için erkek kısırlığının etiyojisini tamamen anlayabilmek için farklı yaklaşımlar kullanılmasının literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Bu noktada önemli olduğu düşünülen araştırma konularından bir tanesi de epigenetik yeniden düzenlemelerdir (1).

Epigenetik terimi 1950 yılında ilk olarak Conrad Waddington tarafından önerilen ve günümüzde de “DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler” olarak adlandırılmaktadır (29).

Epigenetik Mekanizmalar

Epigenotip adı verilen profil çevresel etkenler, epigenetik mekanizmalar ve henüz tanımlanmamış bazı faktörlerin katkısı ile kurulmaktadır. Fenotipe genotipin bu profil üzerindeki yansımasıyla ortaya çıkmaktadır (30).



Şekil 4. A: Genetik etkileşimler.

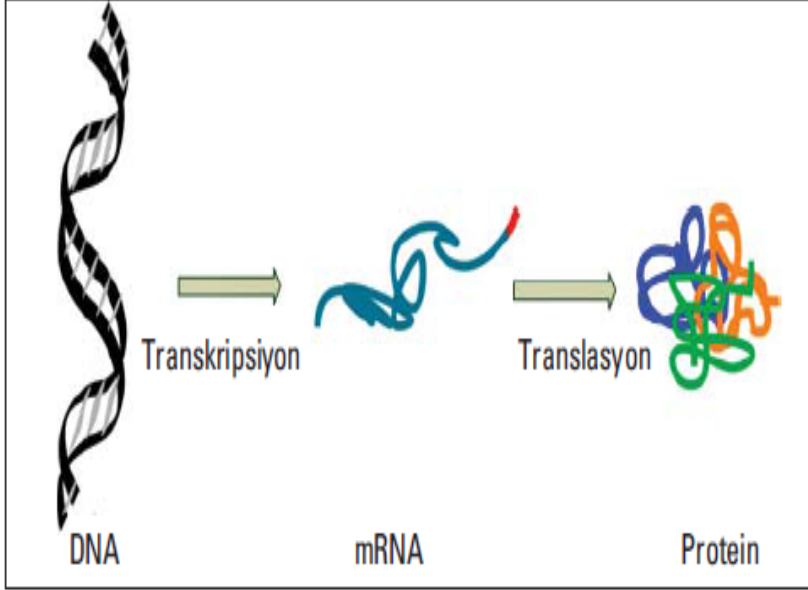
B: Epigenetiğin şematik gösterimi: genotip, nükleotidlerin yan yana dizilişle oluşmakta, epigenotip ise bu dizilişe anlam ve değişik ifade biçimleri kazandırmaktadır (30)

Epigenetik modifikasyonlar çok sayıda hastalığın etiyolojisini kısmen de olsa açıklayabilme potansiyeline sahiptir (29). Ayrıca epigenetik değişikliklerin en önemli özelliği DNA dizinini (nükleotid sekansı; ACTG) değiştirmemesidir. Buna rağmen genlerin promotor bölgelerinde meydana gelen düzenleme ile ilgili genin transkripsiyonunda nicel değişikliklere sebep olmaktadır. Bu ilişkili genin transkripsiyonunu serbestleştirebilir veya baskılayabilir. Epigenetik düzenlemeler sekansın değişime uğramamış olması nedeni ile dinamiktir. Ayrıca sekansa ait mutasyonlar gibi kalıcı değildir. Hücrenin ihtiyacına göre artış gösteren transkripsiyon yeri geldiğinde susturulabilir. Bu sebeple genetik kontrolün anlık ihtiyaçları da sağlanabilmektedir (31).

Epigenetik düzenlemenin bir başka önemli özelliği, oluşan değişikliklerin aktarılabilir olmasıdır. Son on yıl içerisinde yapılan araştırmalar neticesinde, epigenetik olayların, özellikle yüksek organizasyonlu canlılarda oldukça önemli etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Epigenetik fenomen, hücre farklılaşmaları sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişiklikler ve özellikle canlıların embriyodan yetişkin bireye doğru ilerleyen gelişim sürecinde gözlemlenen değişiklikler de önemli bir rol oynamaktadır. Gen ifadesinde ortaya çıkan bu değişiklikler, DNA'nın seçici olarak, farklı epigenetik durumlarda bulunan farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle meydana gelmektedir (29).

Genetik Kontrol ve Epigenetik Dzenleme

1958 yılında ilk olarak Francis Crick'in sözünü ettiği moleküler biyolojinin temel dogması, nükleik asit ile kodlanan bilginin mRNA üzerinden proteine translasyonunun olduğunu, bunun da tersinir bir işlev olmadığını iddia eder (31). (Şekil 5)



Şekil 5: Moleküler biyolojinin temel dogması. DNA'daki bilgi mRNA üzerinden (transkripsiyon) proteine (translasyon) aktarılmaktadır (31)

1980 yılından sonra bulunan moleküler kanıtlar bunun belirli zaman aralıklarında da tersi durumun söz konusu olduğunu, sekans değişikliği ile sonlanmasa bile çevresel faktörlerin DNA transkripsiyonunu, hem nitel hem de nicel olarak değiştirebildiğini ortaya koymaktadır (31).

Epigenetik düzenlemeler birçok farklı mekanizmayla gelişmektedir; (31).

- * Histon Metilasyonu
- * DNA Metilasyonu
- * Histon Ribozillenmesi
- * Histon Fosforilasyonu
- * Histon Asetilasyonu

* Histon Sitrulinizasyonu

* Histon Ubikutinasyonu

Üzerinde en çok çalışıma yapılmış olan epigenetik fenomenin 2 tipi *Histon modifikasyonları ve DNA metillenmesidir* (29). Bu iki olayın geri dönüşümlü ve birbiriyle bağlı olduğu düşünülmektedir (1).

DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları

Nükleotid olarak adlandırılan küçük yapı taşlarının birleşmesiyle kalıtım materyali olan DNA molekülü oluşmaktadır. DNA'daki nükleotidlerin dizilişi ve yapısı bir canlının tüm hücrelerinde benzer olmakla birlikte, hücreler arası farklılıklar da gen ifadesindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır (30).

Gen ifadesi temel olarak iki mekanizmayla düzenlenmektedir.

1. DNA ve kromatinde meydana gelen kovalent modifikasyonlar (epigenetik kontrol),
2. Transkripsiyonu aktive eden ve baskılayan proteinlerin aktivitelerinin düzenlenmesi (30).

İnsan genomu içerisinde yer alan yaklaşık 20.000 gen, belirli hücrelerde ve belirli zamanlarda ifade edilmelidir. Gen ifadesindeki bu kontrolü sağlayabilmek için hücreler DNA'larını globüler histon protein oktomerleri etrafına sararak oluşturdukları nükleozom yapılarını kullanırlar. Histon proteinleri ve DNA'dan oluşan bu nükleozomlar kromatin olarak organize edilirler. Gen ifadesini kromatin yapısındaki değişiklikler kontrol eder; kromatin yapı gevşeyerek açıldığında genler aktive (aktif), kromatin yapı sıkılaşmış yoğunlaştığında ise genler inaktive (sessiz) olarak ifade edilir. Kromatin yapısındaki bu aktif durum ise, geri dönüştürülebilir olan ve DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik paternler ile gerçekleştirilir. Bu işlemlerde görevli olan enzimler arasında, histon asetilazlar, DNA metiltransferazlar (DNMT), histon metiltransferazlar, methyl-binding protein MeCP2 ve histon deasetilazlar (HDAC) sayılabilir. Normal epigenetik paternlerden bir sapma gerçekleştiğinde ortaya çıkan gen ifadesindeki anormallikler çeşitli klinik sonuçlara neden olabilir (29).

Bir başka deyişle, kromatinin belli bir bölgesindeki DNA sıklığı epigenetik değerlendirme ile belirlenir; bundan dolayı epigenetik değişimler hangi genlerin ne zaman okunduğunun belirlenmesi açısından önemli role sahiptirler (1).

DNA Metilasyonu

En çok çalışılan epigenetik mekanizma DNA metilasyonu olup, gen ifadesinin baskılanmasını sağlamakta, kromatin yapısı, transkripsiyon, embriyonik gelişim, X-kromozom inaktivasyonu, kromatin kararlılığının korunmasında ve genomik “imprinting”in düzenlenmesi fonksiyonlarını görmektedir (30).

DNA metilasyonu, DNA genellikle CpG (sitozinfosfoguanin) bölgelerindeki sitozinden (C) metillenmekte ve DNA metil transferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenmektedir (31).

CpG dinükleotidleri içindeki sitozin artıklarının metilasyon yapıları gen ifadesine ilişkin önemli epigenetik bilgiler sunar. Bu dinükleotidler, guanine bir fosfodiester bağıyla bağlı olan sitozinden oluşurlar. CpG dinükleotidleri CpG adaları olarak bilinen bölgelerde bulunurlar (2). Genlerin promotor bölgelerinde bulunan CpG adacıkları, %55’ten fazla CG içeren, ortalama 500 baz çifti uzunluğunda ve düşük metilasyon oranı olan korunmuş dizilerdir (29,31).

Metillenme profillerinin fonksiyonel bir takım sonuçların nedeniyle olacağı düşünülmektedir. Konuyla ilk olarak yapılan çalışmada gen ifadesi ile metillenme arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Metilasyon seviyesinin genlerin promotor bölgelerinde düşük olması aktif gen ifadesiyle korelasyon olduğunu göstermektedir (29).

Tekrar dizilerinde olan CpG dinükleotidleri normal hücrelerde metile iken, genlerin %50'sinde promotor bölgelerinde olan CpG adacıkları ise demetiledir (1,2).

Transpozonların bulunduğu heterokromatinin CpG bölgelerinde ve genomda tekrar dizilerinin metilasyon oranı yüksektir. Böylelikle transpozonların genom içindeki hareketi kısıtlanarak kromozomun kararlı halde kalması ve transkripsiyonun da baskılanması ortaya çıkar (30). Omurgalı DNA’sında bulunan C-G baz çiftlerinin %70’ten çoğu metillenmiş durumda bulunur. Bu metillenme durumunun türden türe ve dokudan dokuya göre farklı olduğu bilinmektedir (29).

DNA’da de novo metilasyonu ve bu durumun sürekliliğinin sağlanmasında DNA-metiltransferaz (DNMT)’lar görevlidir. Bilinen 5 insan DNMT’si vardır. Bunlar; DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olarak isimlendirilmiştir. Katalitik domeyni olmayan DNMT3L ve animoterminal regülatör domeyni bulunmayan DNMT2 haricinde hepsinde enzimatik aktivite görülür. DNMT1, “maintenance methyltransferase” olarak da bilinir ve yarı-metillenmiş olan DNA bölgelerine bağlanır. DNMT3a ve DNMT3b, “novo

metiltransferazlar” olarak isimlendirilir ve hiç metillenmemiş ve yarı-metillenmiş bölgelere bağlanarak metilasyonu gerçekleştirirler. DNMT2’nin korunmuş olan metiltransferaz motifini taşıdığı gösterilmiş ancak aktivitesi ise görülmemiştir (29).

Goll ve arkadaşları (2006) DNMT2’nin insan RNA’sını metillediğini rapor etmişler, ancak fare RNA’sının metillendiğine dair henüz kesin kanıt elde edememişlerdir. Sonuç olarak, DNMT3L’nin herhangi bir enzimatik faaliyeti yoktur ancak DNMT3a aktivitesi için gerekli bir transferazdır (1).

Yapılan genel genom araştırmaları ve analizlerine göre; testisler DNA metilasyonunda oldukça yüksek derecede benzer yapılar ortaya koymaktadırlar. Gerçekte somatik dokulardaki DNA’ya nazaran testis DNA’ları 8 kat daha fazla metillenmiş bölgeye sahiptirler. Bu bölgelerin çoğu tekrarlanmayan ve CpG adası içermeyen sekanslardır ve genellikle genlerin 5’ gen bölgesi uzağında yer alırlar. Hipometilasyon gen düzenleme bölgelerinde bulunmadığı için gen ekspresyon kalıpları ve bu sekansların hipometilasyonu arasında bir korelasyon bulunmamıştır. Ancak, CpG adası içermeyen sekansların hipometilasyonu ile kromozomal bölgedeki GC içeriği arasında bir korelasyon mevcuttur (1).

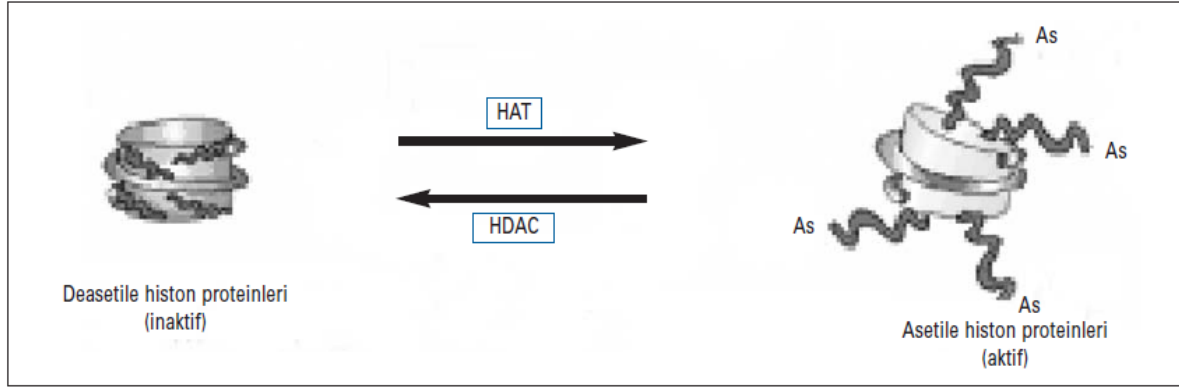
Marchal ve ark.’ları (2004) sertoli hücrelerindeki kromozomların ökromatinde düşük metilasyon seviyelerine sahipken, jukstasentromerik bölgelerde yüksek metilasyon derecelerine sahip olduklarını rapor etmişlerdir (1).

Çeşitli genlerin düzensiz bir şekilde metillenmesi anormal semen parametrelerinde gösterildiği gibi bazı erkek faktör infertilitesi örneklerinde de ortaya konmuştur. Houshdaran ve ark.’ları (2007) çalışmalarında düşük sperm yoğunluğunun, motilitenin ve morfolojinin bazı lokuslarda görülen büyük DNA hipermetilasyonu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bu sekanslardan dördü – PAX8, NTF3, SFN ve HRAS – sadece imprint olmayan genlere özgü kopya sekanslar olup, tekrarlayan element “Satellite 2” nin de hipermetilasyona tabi olduğu görülmüştür. Houshdaran ve ark.’larına göre bu lokusların hipermetilasyonuna, epigenetik programlamayı takip eden aberant metilasyon değil mevcut metilasyon işaretlerinin düzensiz bir şekilde silinmesi neden olmuş olup, bu çalışmada elde edilen verilere göre; imprint lokusun dışındaki metilasyon bozukluklarının bazı durumlarda kısırlığa neden olabildiği rapor edilmiştir (1,32).

Histon Modifikasyonları

Epigenetik modifiye edici olarak bilinen histon modifikasyonları, kromatin yapı ve fonksiyonun değiştirmeleri nedeniyle bu ismi alırlar. (30).

Histon proteinleri DNA'nın paketlenmesinde görevlidirler. Bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilir ve bazik amino-terminal uçları nükleozomdan çıkıntılar yapar. Asetilasyon üzerinde en çok çalışılan histon modifikasyonudur. Histonların asetilasyonu histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri ve histon asetil transferaz (HAT) tarafından düzenlenmektedir (**Şekil 6**)



Şekil 6. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu

HAT: Histon asetil transferaz, **HDAC:** Histon deasetilaz (30)

Pozitif yüklü lizin aminoasiti yükü, negatif yüklü asetil grubunun histon proteininin amino ucuna takılmasıyla kısmen azalmakta, kromatinde gevşeme oluşmakta, transkripsiyon faktörler genlerin promotor bölgelerine ulaşması kolaylaşmakta ve transkripsiyon oluşmaktadır. Asetilasyon durumu geri dönüşümlü olarak ortaya çıkan bir durumdur (30).

Histonlar üzerinde olan bu değişiklikler, kromatinin yapısının sıkı ya da gevşek olma durumunu etkileyerek gen ifadesinde regülasyon rol oynar. Örneğin asetil grupları histonlardaki (+) yükü nötralize ederek ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşimleri zayıflatırlar (29).

Belirli bazı histon modifikasyonları, heterokromatinin ve ökromatinin aktif ya da inaktif markırları olarak kullanılabilir. Aktif kromatinle H3 ve H4 histonlarının lizin rezidularından asetillenmesinin korelasyon oluşturduğu, deasetilasyon durumunun ise kromatinin daha sıkı bir şekilde paketlenerek, genlerin inaktif duruma geçme durumuyla oluştuğu bilinmektedir.

Asetilasyonun tersine histon lizin metilasyonu ise hangi rezidude olduğuna göre inaktivasyon yada aktivasyon ile sonuçlanabilir. Histonlardaki spesifik modifikasyonlar, transkripsiyonel olarak inaktif ve aktif kromatinin belirlenmesinde bir çeşit “*marker*” olarak kullanılabilir. DNA metilasyonunun ve histonlardaki modifikasyonların birlikte olarak gen ifadesinin durumunu belirlediği ve hücrenin yazgısının belirlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. (29).

RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing)

RNA'ların, DNA metilasyonunun başlaması ve histon modifikasyonları için itici güç oluşturduğu bilinmektedir. Böylelikle heterokromatin bölgenin oluşumuna katkıda bulunulur ve kalıtsal olarak sessizleştirilmesini sağladığı düşünülmektedir (30).

Son zamanlarda, kodlamayan RNA (non-coding RNA) ismi olarak geçen bazı küçük RNA moleküllerinin de epigenetik süreçte rol aldıkları belirlenmiştir. Örneğin; RNA interferans olarak tanımlanan, posttranslasyonel ve posttranskripsiyonel sessizleştirilmelerde görevli olan miRNA (micro RNA), siRNA (small-interfering RNA) ve X kromozom inaktivasyonundan görevli olan ise XIST RNA'dır (30).

EPIGENOMİK

Bir organizmanın nükleotid sekansında kodlanan toplam bilgi miktarına genom adı verilir. Epigenom, DNA sekansında bir değişiklik yapılmaksızın DNA ve histon yapısının değiştirilmesiyle gen ifadesinde elde edilen modifikasyonlardan oluşur (1).

Epigenomik, genom ve epigenetik bilimlerinin yeni bir alanıdır. Tek bir genden çok daha büyük bir alana doğru tüm genom çapında oluşan epigenetik modifikasyonları araştırır (29).

Epigenomik veriler, genomik bilimlerine katkı sağlamaya adaydır. Özellikle epigenetik bilgi, düzinelerce histon modifikasyonu taşıyabildiği ve tek bir gende yüzlerce metilenmiş sitozin içerdiği için multiplekştir. Ayrıca kesikli olan dizi bilgisinin tersine epigenetik bilgi kantitatifdir. Kısmi metilasyon dokulara özgü olarak belirli lokuslarda görülebilir ve görülen metilasyonun yoğunluğunda ise farklılıklar oluşabilir. Memelilerin genomunda regülatör dizilerinin fonksiyonu durumun anlaşılmasında yarar sağlayabilir (29).

Birçok kompleks organizmanın genomunda non-coding diziler, coding dizilerden çok daha büyük yer tutar ve bunların da regülasyonda rol oynadığı düşünülür. DNA'nın nükleus içindeki topolojik konformasyonunun epigenetik olarak kontrol edildiği bilinmektedir ve son zamanlarda yapılan çalışmalar ile bu düzenlemenin gen regülasyonunda çok önemli rolü olduğunu gösterilmektedir. Büyük ölçekli epigenomik yaklaşımlar geçmişte teknolojik yetersizlikler nedeniyle gerçekleştirilememiştir ancak günümüzde kullanılan microarray teknolojisi ile gerekli deneylerin yapılması için zemin hazırlanmıştır (29).

Birçok genin kontrol ettiği bir durum olan spermatogenez, karmaşık olaylar bütünüdür. Bu karmaşık olayda metabolizma seviyesinde folat metabolizması ve moleküler seviyede DNA metilasyonu rol oynayan önemli mekanizmalardır (33).

Folat; metilasyon reaksiyonları, DNA sentezi ve protein sentezinde önemli görevleri olan bir moleküldür. Folat döngüsünde önemli enzimler bulunur. Bu enzimler içerisinde, 5-metiltetrahidrofolat homosistein metiltransferaz redüktaz (MTRR) ve 5-metiltetrahidrofolat-homosistein metiltransferaz (MTR) enzimini kodlayan genlerde görülen bazı polimorfizmlerin, homosistein ve hipometilasyon artışıyla, metilasyonunu ve DNA sentezini etkileyerek anormal kromozomal segregasyona (ayrılma) ve mayotik non-disjunction neden olduğu saptanmıştır. Bu durum ile bazı hastalıkların gelişiminde rol oynadığı belirlenmiştir. bu genlerde bulunan polimorfizmler, bireylerde homosistein düzeylerinin artmasına ve enzimlerin aktivitesinin değişmesine de neden olabilmektedir (33).

MTR, spermatogenez olayını da metabolizma seviyesinde bir enzim olup, kobalamin bağlı, kromozom 1q43'e lokalize olan metiyonin sentaz gen ürünü olup (GeneID: 4548), karbon metabolizmasında da metiyonin aminoasidinin biyosentezinde katalizör rolü oynar. MTRR enzimi de kromozom 5p15.3 - p15.2'de yerleşmiş olan, MTRR geninin bir ürünüdür (Gene ID: 4552). Bu gen, DNA metilasyonunu azaltarak, fonksiyonel olan metiyonin sentezini oluşturmaktadır (33).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), metilentetrahidrofolat (MTHF)'ın tetrahidrofolata (THF)'a dönüşmesini uyararak, folat metabolizmasında, DNA sentezinde ve remetilasyon tepkimelerinde temel bir düzenleyici olarak görev yapan bir enzimdir (3,34, 35,36,37). Bu reaksiyonun olduğu yer, folik asit, homosistein, DNA metilasyonu ve nükleotid sentezini etkileyen önemli bir alandır. Böylelikle görevli metabolik yollar etkilenmekte ve bu mekanizmalarda görevli olan yollara da etki etmektedir (34).

Kromozom 1p36.3'de haritalandırılan insan MTHFR geni, 656 aminoasitten oluşan MTHFR enzimini kodlar. MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilenTHF) 5-metil tetrahidrofolata (5- metil THF) dönüştürür (3,35,36). 5-metil THF; metiyonin sentezi ve DNA metilasyonu için metil grubunu oluşturur. 5,10-metilenTHF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken, diğer yandan pürin sentezi için 10-formil THF'a okside olur. MTHFR geninde meydana gelen varyasyonlar, enzim aktivitesini azaltır. Azalan MTHFR aktivitesi nedeniyle, 5-metil THF düzeyi azalır, 5,10- metilen THF miktarı ve plazma homosistein düzeyi ise artmaktadır (35,36).

Dolayısı ile MTHFR, 5,10-metiltetrahidrofolat'ın 5-metiltetrahidrofolat'a indirgendiği tepkimeyi katalize eder. 5-metiltetrahidrofolat, homosisteinin metionine remetile edildiği tepkimenin metil vericisidir. Daha sonra metionin S-adenozilmetionine dönüşür. S-adenozilmetionin DNA, RNA, hormonlar ve lipidler gibi birçok materyalin tepkimelerinde kullanılan bir metil vericisidir. MTHFR eksikliğinin çok çeşitli maddelerin (DNA, RNA ve azalan metionin miktarı nedeniyle histonlar) metilasyonunu engellediği bildirilmiştir (3).

MTHFR'in spermatogenez ve erkek fertilitesindeki rolünü daha iyi bir şekilde ortaya koymayı amaçlayan Khazamipour ve ark.'ları çalışmalarında (2009) obstrüktif olmayan azospermik erkek testisindeki MTHFR gen promotörünün metilasyonu ile spermatogenez bozukluğu olmayan obstrüktif azospermik hastaların gen promotörünün metilasyonunu karşılaştırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre obstrüktif olmayan azospermik erkeklerin % 53'ünde MTHFR promotörü hiper-metillenirken, obstrüktif azospermik erkeklerin hiçbirinde bu bölgede hipermetilasyon saptanmamıştır. İstatistiksel açıdan anlamlı olan bu verilere göre MTHFR hipermetilasyonu özel bir epigenetik anomalidir ve erkek kısırlığında önemli sonuçları vardır (1).

Wu ve ark.'ları çalışmalarında (2010) sperm MTHFR gen promotörünün hipermetilasyonunun idiyopatik erkek infertilitesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada hipermetilasyonlu hastaların sayısı kontrol grubundaki bireylerin üç katıydı (1).

İmprint genlerin anormal bir şekilde DNA metilasyonuna maruz kalmalarının oligozoospermi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Spermatogenez metil havuzunda MTHFR eksikliği nedeniyle ortaya çıkan değişimlerden etkilenebilir. Kelly ve ark.'ları çalışmalarında (2005) erkek farelerde, MTHFR'nin pasif hale getirilmesinin hiperhomosistinemi'ye ve infertiliteye neden olduğunu rapor etmişlerdir. Elde edilen bu bulgular MTHFR'in normal spermatogenezde önemli bir rolü olduğunu ve MTHFR aktivitesinin azalmasının erkek infertilitesine neden olabileceğini göstermiştir (3).

Bununla birlikte MTHFR polimorfizmlerinin erkek infertilitesindeki rolü üzerine yapılan bazı çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bu çalışmaların bazılarında MTHFR polimorfizmleri ve erkek infertilitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar bulunurken, bazı çalışmalarda herhangi anlamlı bir ilişki elde edilememiştir (3).

MTHFR mutasyonları birçok durumda araştırılmış, çalışmaların bir kısmında güçlü bağlantılar olduğu saptanmıştır. Özellikle multifaktöryel etyolojisi bulunan bu hastalıklarda, genetik durumun etkisinin altında olması, popülasyonlar arasında büyük farklılıklar

yapabilmektedir. Bundan dolayı, coğrafi bölgelerde gen havuzları ile ilişkili mutasyonların değerlendirilmesi, bu hastalıklara doğru yapılan yaklaşımlarda özerklik kazanılmasına yardımcı olacaktır (36).

MTHFR folat metabolizmasında, DNA sentezinde ve remetilasyon tepkimelerinde temel düzenleyici olarak görev yapan bir enzimdir. Bu tez çalışmasında nedeni açıklanamayan erkek infertilitesi ile MTHFR geni metilasyon düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma Türkiye’de Trakya Bölgesinde yaşayan infertil erkek hastalarda nedeni açıklanamayan erkek infertilitesi ile MTHFR geni metilasyon düzeyi arasındaki ilişkinin araştırıldığı ilk literatür çalışmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇLER

Çalışmaya 102 hasta ve 90 kontrol grubu olmak üzere toplam 192 kişi dahil edildi. Hasta grubunda yaş ortalaması (30.00±6.3), kontrol grubunda ise yaş ortalaması (33.00±5.9) olarak belirlenmiştir.

HASTA GRUBU

Hasta grubuna Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 15.06.2012-15.06.2013 tarihleri arasında primer infertilite (nedeni açıklanamayan erkek infertilitesi) şikâyeti ile müracaat eden hastalardan, birbirileri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan, 46,XY kromozom yapısına sahip, Y kromozom mikrolelesyonu taşımayan, klinik muayene ve spermiyogram (Dünya Sağlık Örgütü standartlarına göre) sonucuna göre non-obstruktif azoospermik 48 ve oligozoospermik 54 olmak üzere toplam 102 (yüz iki) infertil erkek hasta dâhil edildi.

KONTROL GRUBU

Kontrol grubuna Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarına HLA doku tipleme amacı ile başvuran erkek bireylerden son bir yıl içerisinde yardımcı üreme teknikleri kullanılmadan en az bir tane sağlıklı bebek sahibi olan, birbirileri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan 90

(doksan) kişi dahil edildi. Bu bireylerden HLA doku tiplemesi amacı ile EDTA'lı tüpe alınmış olan 5 cc periferik venöz kandan 200 mikrolitre alınarak genomik DNA'ları ayrıştırıldı.

Hasta ve kontrol grubunda metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni promoter bölgesi metilasyon düzeyleri belirlendikten sonra istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Ayrıca hasta grubunda (azoospermik ve oligozoospermik) rutin tetkikler içerisinde istenen FSH ve total testosteron düzeyi sonuçları da çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubundaki bireylere onayının alındığını belgeleyen ve çalışma hakkında bilgileri içeren "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" imzalatıldı (Ek-1).

Yerel Etik Kurul onayı, "T.C. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, Edirne, Türkiye" tarafından çalışma protokolü ve bilgilendirilmiş yazılı olur formu incelenerek 31.05.2012 tarih ve 15/11 karar numaralı yazısı ile alınmıştır. Çalışmanın laboratuvar aşamaları Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

KULLANILAN KİMYASAL MALEMELER VE CİHAZLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında mevcut olan laboratuvarlar:

1- Moleküler Genetik Laboratuvarı:

- Pre PCR Laboratuvarı: 1 adet vortex (yellowline), 1 adet Soğutmalı santrifüj (Hettich), 1 adet altı kanallı otomatik DNA izolasyon robotu (Qiagen), 1 adet termomikser (Eppendorf), iki adet pipet seti (Eppendorf),

- PCR Laboratuvarı: Dört adet PCR cihazı (1 adet ABI 9700 marka, 1 adet ABI 2700 marka, iki adet Sensequest marka)

2- PyroSekans Laboratuvarı:

2 adet PyroSekans cihazı (Qiagen),

2 adet pipet seti (eppendorf)

2 adet -20 °C derin dondurucu (Kitleri saklamak üzere)

1 adet -86 °C derin dondurucu

2 adet +4 °C buzdolabı (Kitleri ve kan örneklerini saklamak üzere)

YÖNTEMLER

KARYOTİP ANALİZİ

Hastalara ait kromozom analizleri hastalardan alınan periferik venöz kan örneklerinden, 72 saatlik yüksek çözünürlüklü kromozom bantlama [HRB, 550 bant düzeyinde] yöntemi ile elde edilen preparasyonların, Giemsa yöntemi ile boyanması ve en az 20 metafaz analiz edilmesi şeklinde yapıldı.

PERİFERİK VENÖZ KANDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU

Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrollerden 2 cc periferik venöz kan, 5 cc'lik EDTA'lı tüpe alındı ve DNA izolasyonu yapılana kadar +4 °C'de saklandı. Genomik DNA eldesi, periferik kan lökositlerinden Qiagen DNA izolasyon kiti (EZ1® DNA Blood 200 µl Kit, Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak EZ1 Advanced XL nükleik asit izolasyon sistemi (Qiagen, Hilden, Germany) ile kitin protokolüne uygun olarak yapıldı. 200 µl kan örneği ile izolasyona başlanmış ve izolasyonun son hacmi 100 µl olacak şekilde DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA örnekleri izolasyondan sonra çalışma zamanına kadar -20 °C'de saklanmışlardır.

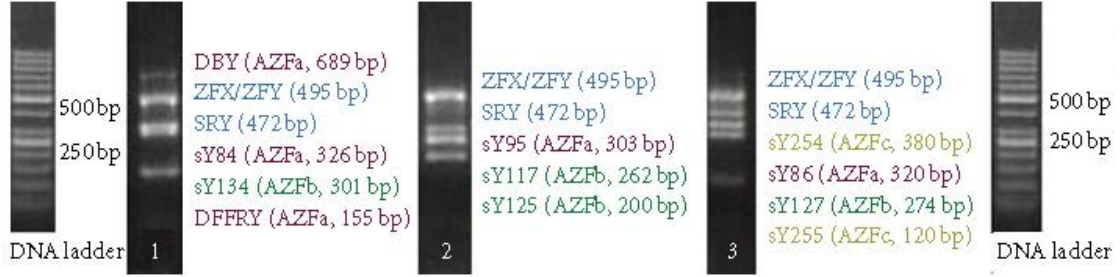
GENOMİK DNA'LARIN SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜMLERİ

Genomik DNA'lar NanoDrop ile 260-280 nm dalga boylarında ölçülerek, dalga boyu oranı 1.4–1.8 arasında olan genomik DNA örnekleri çalışmaya dahil edildi. Ölçümler sonucunda çalışmaya alınan genomik DNA değerlerinin µl'de 15-75 ng arasında değiştiği tespit edildi [Nanodrop 2000C, Thermo Scientific, USA]

Y KROMOZOM MİKRODELESYON ANALİZİ

Çalışmaya dahil edilen non-obstrüktif azoospermik infertil erkek hastalarda Y kromozom mikrodelsiyon analizi, Y kromozomu üzerinde 13 STS [Sequence Targeted Site] bölgesini [ZFX, ZFY, SRY, AZFa: sY84, sY86, DFFRY, DBY, AZFb: sY117, sY125, sY127, sY134, AZFc: DAZ gene- sY254, sY255] kapsayan in-vitro diagnostik onaylı kit kullanılarak yapıldı [Genequality AZF MX, AB-Analitica].

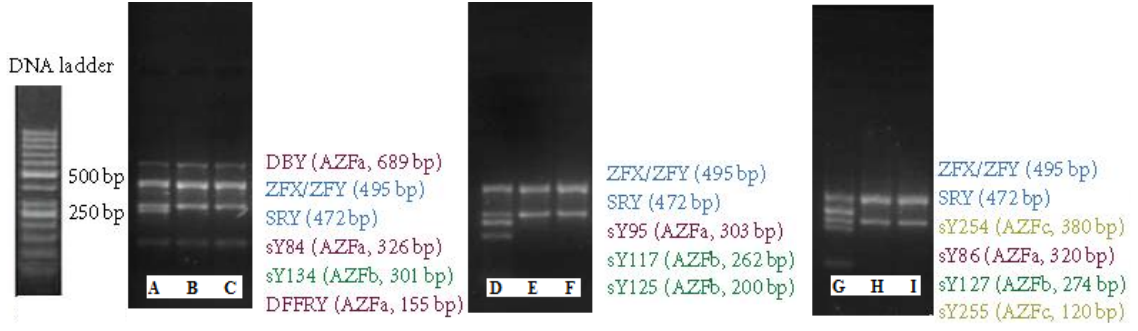
İzole edilen genomik DNA örneklerinden kitin protokolüne uygun olarak üç multipleks polimeraz zincir reaksiyonu [PZR] yapıldı. Elde edilen PZR ürünlerine % 3'lük nusive agaroz jelde, 85 V.'da, 2 saat 30 dakika elektroforez uygulandı. Elektroforez sonuçları UV transilluminatörde bant paternlerine göre değerlendirildi (Şekil 7).



Şekil 7. AZFa, b, c lokuslarına özgü 13 STS'in % 3 nusive agaroz jelde UV

transilluminatör görüntüsü

Bant paternlerine göre Y kromozom mikrodelsiyonu saptanan hastalar çalışmaya dahil edilmedi (Şekil 8).



Şekil 8. A, D, G: AZFa, AZFb ve AZFc mikrolelesyonu saptanmamış olan hasta,

B ve C: sY134 [-], AZFb mikrolelesyonu saptanmış olan hastalar,

E ve F: sY117 [-], sY125 [-], AZFb mikrolelesyonu saptanmış olan hastalar,

H ve I: sY127 [-], AZFb mikrolelesyonu ve sY254 [-], sY255 [-], AZFc mikrolelesyon saptanmış olan hastalar

BİSÜLFİT DNA ELDESİ

85 µl Bisulfite Mix [Bisulfite mix 800 µl distile su ile sulandırılır ve alikotlanıp -20 °C saklanır] (+) 35 µl Bisulfite Buffer her bir reaksiyon için 120 µl olacak şekilde hazırlanır.

Buffer BW → 30 ml etanol ile sulandırılır.

Carrier RNA → 310 µl distile su ile sulandırılır.

Buffer BL → µl'sinde 100ng'dan az DNA içeren örnekler için carrierRNA eklenmiş BL buffer, 100 ng üzerindeki örnekler için sade BL buffer kullanılır.

Buffer BD → 27 ml etanol ile sulandırılır.

Çalışma öncesinde kolon ve kitler oda sıcaklığına gelmesi beklenmelidir.

Kolonlar maksimum 700 µl alır.

1. PCR ürünleri 1,5 ml ependorfa aktarılır ve üzerine 560 µl BL Buffer eklenir, vorteklenip spin atılır.

2. BL buffer eklenen örnekler Epiect spin kolona aktarılır en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilir alt kısım boşaltılır kolon tutulur.
3. Kolona 500 µl BW buffer konulur ve en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilir alt kısım boşaltılır kolon tutulur.
4. Kolona 500 µl BD buffer konulur ve 15 dakika oda ısısında beklendikten sonra en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilir alt kısım boşaltılır kolon tutulur.
5. Kolona 500 µl BW buffer konulur ve en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilir alt kısım boşaltılır kolon tutulur.
6. Tekrar kolona 500 µl BW buffer konulur ve en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilir alt kısım boşaltılır kolon tutulur.
7. En yüksek devirde 1 dakika boş olarak santrifüj edilir.
8. Kolonlar 1,5 ml ependorflara aktarılır ve ağzı açık şekilde 56⁰C de 5 dakika bekletilerek etanollden kurtarılır.
9. 20 µl EB Buffer eklenir ve en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilerek kolondan Bisülfıt DNAların ependorfa geçmesi sağlanır. Bisülfıt DNA'lar (-)20⁰C'de saklanırlar.

PCR REAKSİYONU

PCR reaksiyonu kullanılan kitin [Hs_CLCN6_PM PyroMark CpG Assay (200) (PM00000091) MTHFR, Qiagen] protokolüne uygun olarak her bir örnek için tablo 5'de belirtilen şekilde hazırlandı:

Tablo 5. PCR reaksiyonu

Pyromark PCR Master Mix (turuncu kapak)	12,5 µl
Primer	2,5 µl
Distile Su (Kit içi Sulardan)	5 µl
Bisülfid DNA	5 µl

SEKANS PCR

95⁰C 15 Dakika

94⁰C 30 Saniye

56⁰C 30 Saniye

72⁰C 30 Saniye

72⁰C 10 Dakika

+4⁰C ∞



45 Döngü

PYRO SEKANS

Washing buffer 10x → 1x' e düşürülerek kullanıldı. %70 Etanol hazırlandı.

Sekans Primeri 1175 µl Annealing Buffer ile sulandırıldı.

Pyro Sekansda her bir reaksiyon Tablo 6'da belirtilen değerler dikkate alınarak miks hazırlandı.

Tablo 6. Pyro sekans reaksiyonu

Binding Buffer	40 µl
Streptavidin	2 µl
Su	28 µl
Toplam	70 µl

Streptavidin çabuk çökmesi nedeni ile elle karıştırılarak hızlı kondu. 96'lık pleytten 3 sıra kesildi ve hazırlanan mix 70 µl dağıtılarak üzerine 10 µl PCR ürünü koyularak üzeri bantlandı. 1400 devirde 10 dakika T-Shakker da inkübe edildi. Costar plate içine örnek başına 2,5 µl primer ve 22,5 µl Annealing Buffer ile hazırlanan miks konarak hazırlandı. Fazla bekletmeden vakuma çektirildi. Vakum 5 saniye %70 alkol çekilir yukarıya kaldırılarak tam çekiş sağlanır. Vakum 5 saniye denatürasyon çekilir yukarıya kaldırılarak tam çekiş sağlanır. Vakum 10 saniye washing buffer da bekletilir yukarıya kaldırılarak tam çekiş sağlanır. Vakum uçları yukarıya bakarken vakum pompasının üzerinden ve pompanın motorundan düğmeler kapatılarak cihaz kapatılır ve Costar plate üzerine vakum konur 1 dakika boyunca örneklerin sekans primeri içine aktarımı sağlanır. Costar plate 2 dk 80°C inkübe edilir. Vakum pompası ilk distile suda yıkandıktan sonra ikinci suda vakumla su çekilerek temizlenir. Costar plate 15 dakika oda ısında karanlıkta inkübe edilir. Kartuş yazıları bize bakacak şekilde hazırlanır bilgisayar çıktısına göre enzim substrat ve bazlar olması gereken kuyucuğa aktarılır mümkünse filtresiz pipet ucu kullanılır. Kartuş alt kapak çıkartılarak cihaza yerleştirildi.

BİLGİSAYARDA PROGRAM HAZIRLIĞI

Masa üstünde pyromark Q24 programı açılıp, yeşil işaretli new run tıklanmıştır. Instrument metottan kartuş numarası seçilmiştir. Çalışma kuyucukları işaretlenmiştir. Example Files çift tıklanarak MTHFR metilasyon sürüklenerek çalışma kuyucuklarının üzerine bırakılmıştır. Kuyucuklarda ikinci sıraya örnek adları girilerek flaşta çalışılacaklara kaydedilmiştir. Çıktı alma için tools seçeneğinde prerun information tıklanır ve printer işaretinden çıktı alınmıştır.

İSTATİSTİK

Hasta ve kontrol grubu verileri SPSS 16.0 programına girilerek veriler analiz edilmiş olup, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda görevli Öğretim Üyesi ile birlikte çalışılarak bulgular değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun demografik verileri; sayı (n), %, χ^2 , mean, min, max değerler ve ortalama verilerek açıklanmıştır. Çalışmada hasta ve kontrol grubunun arasında MTHFR geni üzerinde çalışılan bölgeye özgü metilasyon düzeylerinin anlamlı düzeyde farklılaşıp farklılaşmadığını belirlemek amacıyla, örneklem grubumuz normal dağılıma uygun olmadığından dolayı, niteliksel ölçekli gözlemleri verilen iki örnekleme karşılaştırmak amacıyla non parametrik bir test olan Mann-Whitney U kullanılarak (n, mean, std deviation, U Değeri, z ve p) değerlendirilmiştir. Ayrıca FSH ve total testosteron düzeyleri de (n, Mean, std deviation, U, s, p) istatistiksel olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya 102 hasta (azoospermik ve oligozoospermik) ve 90 kontrol olmak üzere, toplam 192 kişi dahil edildi. Hasta grubu (azoospermik+oligozoospermik) yaş ortalaması ise 30.00 ± 6.3 (min:19, max:64), kontrol grubu yaş ortalaması 33.00 ± 5 (yaş aralığı 24 ile 63) olarak belirlendi. Azoospermik hasta grubu (n=48) yaş ortalaması 31.54 ± 5.6 (min:23, max:51), oligozoospermik hasta grubu (n=54) yaş ortalaması ise 31.39 ± 7.0 (min:19, max:64) olarak belirlendi (Tablo.7)

Tablo 7. Hasta ve kontrol grubunun yaş demografik özelliğine göre dağılımı

Yaş demografik özelliğine göre dağılımı	Ortalama	Standart Sapma	Min	Max	n
Azoospermik Hasta Grubu	31.54	5.608	23	51	48
Oligozoospermik Hasta Grubu	31.39	7.051	19	64	54
Azoospermik+ Oligozoospermik Hasta Grubu	30.00	6.382	19	64	102
Kontrol Grubu	33.57	5.910	24	63	90

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubunda kullanılan kitin içeriğine uygun olarak MTHFR geni promotor bölgesinde bisülfid uygulamasından sonra sekans dizisinde de [GGTTATTGAGTTATYGATGGGGGYGAGGATAYGGGT] belirtildiği üzere üç CpG adacığının metilasyon düzeyleri değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubunda MTHFR geni promotor bölgesine özgü üç CpG adacığı metilasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak

anlamli olup olmadigini belirlemek amaciyla, Mann-Whitney U Test kullanilmistir. Üç CpG adaciğının metilasyon düzeyleri ortalamasi **Tablo 8'de** verilmiştir.

Tablo 8. Hasta (azoospermik+oligozoospermik) ve kontrol grubunda MTHFR geni üç CpG adaciğının metilasyon düzeylerinin dağılımı

MTHFR geni üç CpG adaciğının metilasyon düzeyleri (nmol)	(Azoospermik+ Oligozoospermik) hasta ve kontrol grubu	n	Ortalama	Standart Sapma	U değeri	z	p
1. CpG Adaciğı	Azoospermik+ Oligozoospermik Hasta Grubu	102	6,47	1,902	3772.000	-2,153	.031
	Kontrol Grubu	90	6,01	2,291			
2. CpG Adaciğı	Azoospermik+ Oligozoospermik Hasta Grubu	102	2,12	0,679	3730.500	-2,487	.013
	Kontrol Grubu	90	1,86	0,787			
3. CpG Adaciğı	Azoospermik+ Oligozoospermik Hasta Grubu	102	4,28	1,230	3555.500	-2,756	.006
	Kontrol Grubu	90	3,80	1,530			
Üç CpG adaciğının metilasyon düzeylerinin toplamı	Azoospermik+ Oligozoospermik Hasta Grubu	102	12,87	3,483	3558.000	-2,696	.007
	Kontrol Grubu	90	11,67	4,399			

Tablo 8'de MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri incelendiğinde, hasta grubu (azoospermik + oligozoospermik) ve kontrol grubu arasında hem

3. CpG adacığında hem de üç CpG adacığının metilasyon düzeylerinin toplamları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.05$).

Azoospermik hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırıldı, bulgular ise **Tablo 9**'da verildi.

Tablo 9. Azoospermik hasta ve kontrol grubunda MTHFR geni üç CpG adacığının metilasyon düzeylerinin dağılımı

MTHFR geni üç CpG adacığının metilasyon düzeyleri (nmol)	Azoospermik Hasta ve Kontrol grubu	N	Ortalama	Standart Sapma	U değeri	z	p
1. CpG Adacığı	Azoospermik Hasta Grubu	48	6,65	1.995	1675.500	-2,189	.029
	Kontrol Grubu	90	6,01	2.291			
2. CpG Adacığı	Azoospermik Hasta Grubu	48	2,23	0,751	1604.500	-2,715	.007
	Kontrol Grubu	90	1,86	0.787			
3. CpG Adacığı	Azoospermik Hasta Grubu	48	4,44	1,270	1557.000	-2,751	.006
	Kontrol Grubu	90	3,80	1,530			
Üç CpG adacığının metilasyon düzeylerinin toplamı	Azoospermik Hasta Grubu	48	13,31	3,556	1536.500	-2,797	.005
	Kontrol Grubu	90	11,67	4,399			

Tablo 9’da MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri incelendiğinde, hasta grubu (azoospermik) ve kontrol grubu arasında hem 2. ve 3. CpG adacığında hem de üç CpG adacığının metilasyon düzeylerinin toplamı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlendi ($p < 0.05$).

Oligozoospermik hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırıldı, buna ilişkin bulgular ise **Tablo 10’da** verildi.

Tablo 10. Oligozoospermik hasta ve kontrol grubunda MTHFR geni üç CpG adacığının metilasyon düzeylerinin dağılımı

MTHFR geni üç CpG adacığının metilasyon düzeyleri (nmol)	Oligozoospermik hasta ve kontrol grubu	n	Ortalama	Standart Sapma	U değeri	z	p
1. CpG Adacığı	Oligozoospermik Hasta Grubu	54	6,31	1,820	2096.500	-1,394	.163
	Kontrol Grubu	90	6,01	2,291			
2. CpG Adacığı	Oligozoospermik Hasta Grubu	54	2,02	0,598	2126.000	-1,382	.167
	Kontrol Grubu	90	1,86	0,787			
3. CpG Adacığı	Oligozoospermik Hasta Grubu	54	4,15	1,188	1998.500	-1,825	.068
	Kontrol Grubu	90	3,80	1,530			
Üç CpG adacığının metilasyon düzeylerinin toplamı	Oligozoospermik Hasta Grubu	54	12,48	3,402	2021.500	-1,693	.091
	Kontrol Grubu	90	11,67	4,399			

Tablo 10’da MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri incelendiğinde, hasta (oligozoospermik) ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).

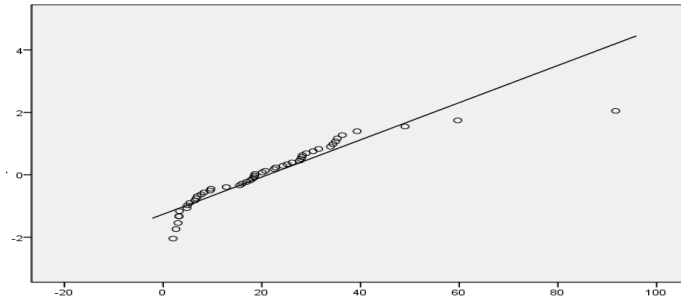
Azoospermik ve oligozoospermik hasta grupları arasında MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırıldı ve buna ilişkin bulgular **Tablo 11’de** verildi.

Tablo 11. Azoospermik ve oligozoospermik hasta gruplarında MTHFR geni üç CpG adacığının metilasyon düzeylerinin dağılımı

MTHFR geni üç CpG adacığının metilasyon düzeyleri (nmol)	Azoospermik ve Oligozoospermik hasta grubu	n	Ortalama	Standart Sapma	U değeri	z	p
1. CpG Adacığı	Azoospermik Hasta Grubu	48	6,65	1,995	1152.500	-,974	.330
	Oligozoospermik hasta grubu	54	6,31	1,820			
2. CpG Adacığı	Azoospermik Hasta Grubu	48	2,23	0,751	1092.500	-1,599	.110
	Oligozoospermik hasta grubu	54	2,02	0,598			
3. CpG Adacığı	Azoospermik Hasta Grubu	48	4,44	1,270	1102.000	-1,343	.179
	Oligozoospermik hasta grubu	54	4,15	1,188			
Üç CpG adacığının metilasyon düzeylerinin toplamı	Azoospermik Hasta Grubu	48	13,31	3,556	1080.500	-1,452	.146
	Oligozoospermik hasta grubu	54	12,48	3,402			

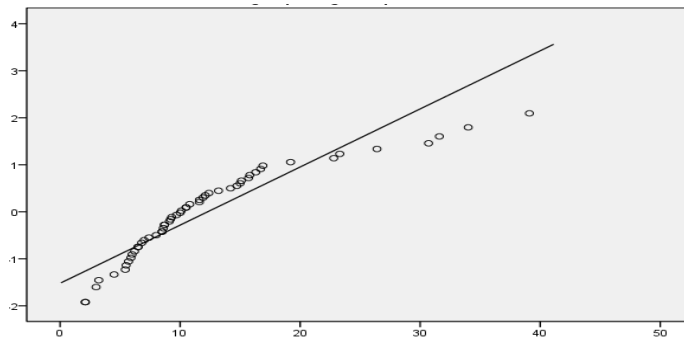
Tablo 11’de MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri incelendiğinde, azospermik ve oligozoospermik hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).

İnfertil erkek hastalarda, FSH ve total testosteron düzeyleri infertilitenin hem prognozu hem de tedavisi açısından önem taşır. Spermiyogram sonucu ml’deki sperm sayısı 10 milyon/ml’den az olan infertil erkekler hastalarda FSH ve serum testosteron düzeylerine bakılması klinik açıdan önem taşır. Çalışmamızda hasta grubunda rutin tetkik amacı ile istenmiş olan FSH düzeyi sonuçları da değerlendirildi. FSH’nin hipotalamus-hipofiz-testis aksındaki görevi, spermatogenezis için serum belirteci olarak kullanılmasıdır. Yetişkin erkeklerdeki FSH düzeyi 1.5-12.4 IU/L referans aralığındadır. Azoospermik hasta grubunda FSH düzeyi ortalaması 21.22 ± 16.78 IU/L (min:2.00, max:91.70) olarak saptandı (**Şekil 9**).



Şekil 9. Azoospermik hasta grubunun FSH ((IU/L)) düzeyine göre dağılımı

Oligozoospermik hasta grubunda ise FSH düzeyi ortalaması 12.30 ± 8.08 IU/L (min:2.10, max:39.10) olarak belirlendi (**Şekil 10**).



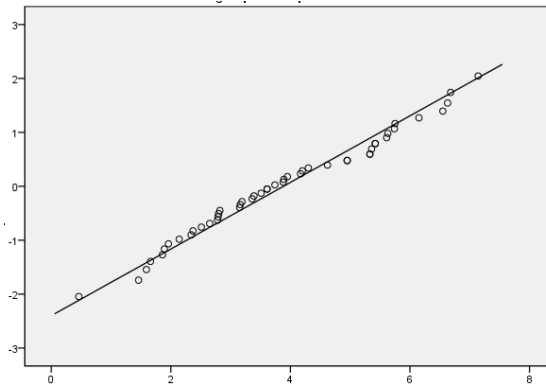
Şekil 10. Oligozoospermik hasta grubunun FSH düzeyine göre dağılımı

Azoospermik ve oligozoospermik hasta gruplarının FSH düzeyine göre dağılımı Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırıldı ve buna ilişkin bulgular **Tablo 12’de** verildi.

Tablo 12. Oligozoospermik ve azoospermik hasta gruplarının FSH düzeylerine göre dağılımı

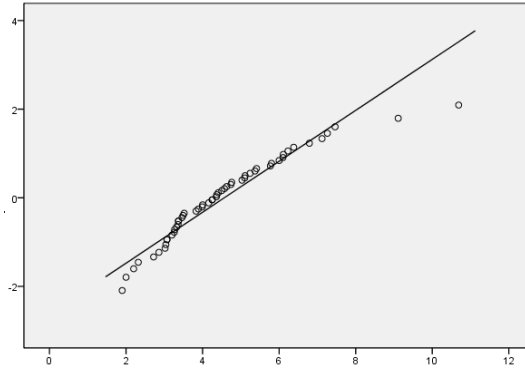
Azoospermik hasta ve Oligozoospermik hasta grubu ile FSH düzeyleri	Azoospermik hasta ve Oligozoospermik hasta grubu	n	Ortalama	Standart Sapma	U değeri	z	p
FSH düzeyleri (IU/L)	Azoospermik Hasta Grubu	48	21,228	16,780	879.000	-2,796	.005
	Oligozoospermik hasta grubu	54	12,303	8,089			

Tablo 12’de azoospermik hasta grubu ile oligozoospermik hasta grubu arasında FSH düzeyleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p \leq 0.05$). Çalışmamızda azoospermik ve oligozoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyleri değerlendirildi. Azoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyi ortalaması 3.88 ± 1.61 pg/ml (min:0.46, max:7.14) olarak saptandı (**Şekil 11**).



Şekil 11. Azoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyine göre dağılımı

Oligozoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyi ortalaması 4.56 ± 1.73 pg/ml (min:1.90, max:10.69) olarak saptandı (Şekil 12).



Şekil 12. Oligozoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyine göre dağılımı

Azoospermik ve oligozoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyine göre dağılımı Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırıldı ve buna ilişkin bulgular **Tablo 13**'de verildi.

Tablo 13. Oligozoospermik ve azoospermik hasta gruplarının total testosteron düzeylerine göre dağılımı

Azoospermik hasta ve Oligozoospermik hasta grubu ile total testosteron düzeyi	Azoospermik hasta ve Oligozoospermik hasta grubu	n	Ortalama	Standart Sapma	U değeri	z	p
total testosteron düzeyi (pg/ml)	Azoospermik Hasta Grubu	48	3,884	1,619	1026.000	-1,810	.070
	Oligozoospermik Hasta Grubu	54	4,566	1,739			

Azoospermik ve oligozoospermik hasta grupları arasında total testosteron düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı, ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Günümüzde insan yaşamını tehdit eden bir hastalık olarak sınıflandırılmayan infertilite durumu, toplumu, aileyi ve bireyi etkileyen sosyal bir problemin başında gelmektedir (13).

Erkek faktör ilişkili infertilite, infertil çiftler arasında yüksek öneme sahip bir durumdur. Dünya Sağlık Örgütünün tanımladığı standart sperm analizindeki sperm kalitesine etki eden faktörleri anlamak için son zamanlarda çok çaba harcanmakta ve görünüşe göre sperm analizindeki değişiklikler ırk, mevsim hatta gece gündüze göre bile değişkenlik gösterebilmektedir (24). 3956 infertil çiftin değerlendirildiği, 1962-1983 yılları arasında yapılan bir çalışmada, erkeklerin infertilite durumunun yaklaşık olarak %40'ında sorumlu olduğunu belirlenmiştir (14). Çiftlerdeki infertilitenin % 25-40'ının oligozoospermi ve/veya astenospermi gibi erkek faktörüne bağlı olduğu tahmin edilirken, daha güncel yayınlarda erkek faktörü oranının %50'lerde olduğu, her 20 erkekte birinin subfertiliteden etkilenebileceği vurgulanmaktadır (38).

Günümüzde pretestiküler (hormonal), testiküler (genetik anomaliler) ve posttestiküler (antisperm antikor, obstrüksiyonel) faktörlerin erkek infertilitesi üzerinde etkili olduğu kabul edilmektedir. Erkek infertilitesine sebep olan genetik nedenler arasında, sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler, CFTR geni mutasyonları, hormonal bozukluklara yol açan genetik sendromlar, Y kromozomu mikrolezyonları ve mtDNA mutasyonları sayılabilir (5).

Semen sınıflandırılmasında oligozoospermi referans değerinden daha az sperm konsantrasyonu (<15milyon spermatozoa/mL) , azospermi santrifüj (standart mikroskopik incelemede) sonrasında hiç sperm bulunamamasını tanımlamaktadır (9,11,16).

Spermatogenez çok sıkı bir gen ekspresyon olayları dizisidir. Y kromozomu ve otozomal genler, spermatogenezi değişik adımlarda kontrol ederler ve bu genlerin anormal ekspresyonları infertiliteye sebep olabilir (39).

Özellikle şiddetli oligozoospermik ve azoospermik hastaların etyolojisinde genetik bozuklukların önemli bir yer aldığı belirtilmiştir (14,22).

1998-Haziran ve 2001-Mart tarihleri arasında yapılmış olan bir araştırmada, hastaneye başvuran azoospermik ve ciddi oligozoospermik hastalardan, oligozoospermik hastaların yaş ortalaması 29.5 olduğu belirlenmiştir (14). Bizim çalışmamızda da oligozoospermik hasta grubunun yaş ortalaması ise 31.39 ± 7.0 olarak saptanmıştır.

Y kromozom mikrodelsiyonlarının analizi amacı ile azoospermik, oligozoospermik infertil olgular ve sağlıklı kontrol grubunun (51 oligozoospermik, 64 azoospermik ve 70 sağlıklı olgu) dahil edildiği çalışmada; yaş ortalamalarının sırasıyla, $(36,80 \pm 5,39)$, $(40,48 \pm 8,38)$ ve $(35,46 \pm 4,82)$ olduğu belirlenmiştir (40). Bizim çalışmamızda da azoospermik hasta grubunun (n=48) yaş ortalaması 31.54 ± 5.6 olarak saptandı.

Spermatogenezde başarısızlığa genetik yatkınlık için olası aday genlerden birisi de 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) genidir. MTHFR polimorfizmleri nedeniyle azalmış enzimatik aktivite, infertilite dahil olmak üzere hiperhomosisteinemi ile ilişkili olan pek çok hastalık için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Erişkin fare testislerinde MTHFR aktivitesinin diğer büyük organlara göre daha yüksek saptanması, bu enzimin testis fonksiyonlarında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür (41).

DNA ve histon metilasyonu, spermatogenez sürecinde görevli genlerin ifade edilmesini (ekspresyonunu) düzenleyen DNA'daki önemli bir epigenetik mekanizmadır. Bu genlerin anormal ekspresyonları hipometilasyon kaynaklı olabilir ve bu da MTHFR hasarından kaynaklanıyor olabilir. MTHFR'nin inaktivasyonu germinal hücrelerin eksikliğine neden olarak spermatogenezi geciktirir. Literatürde MTHFR'nin spermatogenezdeki rolüne dikkat çeken ve MTHFR geni ekspresyonu eksikliğinin erkek infertilitesinin etiyolojisinde önemli role sahip olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur (42).

MTHFR polimorfizmlerinin erkek infertilitesindeki rolü üzerine yapılan çalışmaların sonuçları birbirileri ile çelişkilidir. Yapılan çalışmaların bir kısmında MTHFR geni polimorfizmleri ile erkek infertilitesi arasında istatistiksel olarak belirlenmiş anlamlı bir ilişki

durumu belirlenirken, diğerk yapılmış çalışmalarda bu iki parametre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (3).

Hindistan, İtalya ve Batı Avrupada yapılan çalışma gruplarında MTHFR polimorfizmi ve erkek infertilitesi arasındaki ilişki analiz edilmiş ve MTHFR 677TT genotipinin erkek infertilitesinde risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Bezold ve ark.'ları, bu gruplar arasından Batı Avrupa grubunu araştırmış olup, infertilite için risk faktörü olarak, homozigot MTHFR 677TT'nin olabileceğini rapor etmişlerdir (33).

Gürkan ve ark.'larının (2014) Türkiye'de Trakya Bölgesi'nde yaşayan nonobstrüktif azospermik ve oligozoospermik infertil erkek hastalarda MTHFR c.677C>T ve c.1298A>C polimorfizmlerini araştırdıkları çalışmalarında, oligozoospermik infertil erkek hasta grubunda MTHFR c.677TT genotipinin risk faktörü olabileceğini rapor etmişlerdir (43).

Literatürde Türkiye'de azospermik ve/veya oligozoospermik infertil erkek hastalarda MTHFR geni metilasyon düzeylerini araştıran çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda azospermik, oligozoospermik hasta grubu ile kontrol grubu arasında MTHFR geni promotor bölgesindeki 3 CpG adacığının metilasyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirdik. Çalışmamızın önemli sonuçlarından biri hasta grubu (azospermik + oligozoospermik) ile kontrol grubu arasında MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri (3 CpG adacığının metilasyon düzeyleri toplamı) arasında, istatikselsel olarak anlamlı bir fark saptanmış olmasıdır ($p<0,05$). Çalışmamızdaki bir diğerk önemli sonuç ise azospermik hasta grubu ile kontrol grubu arasında MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farkın belirlenmiş olmasıdır ($p<0,05$).

Khazamipour ve arkadaşlarının çalışmalarında nonobstrüktif azospermik 50 hasta ile fertil 50 kontrolde periferik venöz kan DNA'larında, non obstrüktif azospermik 32 hasta ve normal spermatogeneze sahip obstrüktif azospermik 5 hastanın testis biyopsi DNA'larında MTHFR geni promotor bölgesinin metilasyon düzeylerini araştırmışlardır. Araştırmacılar periferik kan DNA'larında hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR promotor bölgesi metilasyon profilleri arasında anlamlı bir fark saptamadıklarını, testis biyopsi örneklerine ait DNA'larda non obstrüktif azospermik erkek hastaların % 53'ünde MTHFR promotor bölgesinin hipermetile, obstrüktif azospermik erkeklerin hiçbirinde MTHFR promotor bölgesinde hipermetilasyon saptamadıklarını bildirmişlerdir (39).

Bizim çalışmamızda da azoospermik hasta grubu (n=48) ile sağlıklı kontrol grubunun (n=90) MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p<0,05). Oligozoospermik hasta (n=54) grubu ile kontrol grubunun MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0,05).

Wu ve arkadaşlarının çalışmalarında sperm MTHFR geni promotor bölgesinin hipermetilasyonunun nedeni açıklanamayan erkek infertilitesi ile ilişkili olduğunu ve MTHFR promotor gen bölgesinin hipermetilasyonunun hasta grubunda kontrol grubuna göre üç kat daha fazla olduğunu rapor edilmiştir (3).

Rotondo ve ark.'larının sperm MTHFR geni promotor bölgesi hipermetilasyonu ile tekrarlayan gebelik kaybı ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, RSA etiyolojisinde MTHFR geni promotor bölgesi hipermetilasyonunun yeni varsayılan risk faktörü olduğunu bildirmişleridir (44).

Testiküler bağ dokusunda artış, Leydig hücre sayı ve fonksiyonunda azalma, azalan testiküler perfüzyon ve azalan sertoli hücre fonksiyonu, yaşla ilişkili olarak görülebilecek değişiklikler olup spermatogenezi sürecini bozabilir ve FSH ve luteinizan hormon (LH) artışına neden olabilir. Ancak Hellstrom ve arkadaşlarının çalışmasında, serum total testosteron düzeyleri ile sperm parametreleri arasında anlamlı bir ilişki durumu saptanmamıştır (45).

Çalışmamızda azoospermik (n=48) ve oligozoospermik (n=54) hasta grubunun FSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (p ≤0,05).

Soydan ve arkadaşlarının (2003) çalışmasında idiopatik infertil erkek hastalarda (ciddi oligozoospermisi veya azoospermisi olan) Y kromozomu mikrolezyonları ile diğer parametreler arasındaki ilişki araştırılmış ve delesyon olan azoospermik hastaların beşinde serum FSH değerleri normalden yüksek, serum testosteron değerleri ise normal olarak rapor edilmiştir (14). Çalışmamızda da azoospermik ve oligozoospermik hasta grupları arasında total testosteron seviyelerini arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p >0.05). Soydan'ın çalışmasında delesyon durumu saptanmayan azoospermik hastaların serum FSH değeri 20.613± 9.919 (IU/L) iken, delesyon belirlenenlerin ise 13.580± 1.441 (IU/L)

olarak belirlenmiştir. Delesyon olan ve olmayan azospermik erkeklerin serum FSH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.813$) (14).

SONUÇLAR

Çalışmaya 102 hasta ve 90 kontrol grubu olarak toplam 192 birey dahil edildi. Hasta grubuna Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 15.06.2012-15.06.2013 tarihleri arasında primer infertilite (nedeni açıklanamayan erkek infertilitesi) şikayeti nedeni ile müracaat eden hastalardan, birbirileri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan, 46,XY kromozom yapısına sahip, Y kromozom mikrolelesyonu taşımayan, klinik muayene ve spermiyogram (Dünya Sağlık Örgütü standartlarına göre) sonucuna göre non-obstruktif azospermik 48 ve oligozoospermik 54 olmak üzere toplam 102 (yüz iki) infertil erkek hasta dahil edildi. Kontrol grubuna ise Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarına HLA doku tiplemesi amacı ile başvuran erkek bireylerden son bir yıl içerisinde yardımcı üreme teknikleri kullanılmadan en az bir tane sağlıklı bebek sahibi olan, birbirileri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan 90 (doksan) kişi dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunda metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni promoter bölgesi metilasyon düzeyleri belirlendikten sonra istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol grubunun demografik verileri; sayı (n), %, χ^2 , mean, min, max değerler ve ortalama verilerek açıklanmıştır. Çalışmamızda ayrıca hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR geni üzerinde çalışılan bölgeye özgü metilasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın belirlenmesi amacıyla, örneklem grubu normal dağılıma uygun olmadığından dolayı, niteliksel ölçekli gözlemleri verilen iki örnekleme karşılaştırmak amacıyla non parametrik bir test olan Mann-Whitney U kullanılarak (n, mean, std deviation, U Değeri, z ve p) değerlendirilmiştir.

Hasta grubu (azospermik+oligozoospermik) yaş ortalaması 30.00 ± 6.3 (min:19, max:64), kontrol grubu yaş ortalaması 33.00 ± 5 (yaş aralığı 24 ile 63) olarak belirlendi. Azoospermik hasta grubu (n=48) yaş ortalaması 31.54 ± 5.6 (min:23, max:51), oligozoospermik hasta grubu (n=54) yaş ortalaması ise 31.39 ± 7.0 (min:19, max:64) olarak

saptandı. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubunda kullanılan kitin içeriğine uygun olarak MTHFR geni promotor bölgesinde bisülfid uygulamasından sonra sekans dizisinde de [GGTTATTGAGTTATYGATGGGGGYGAGGATAYGGGT] belirtildiği üzere üç CpG adacığının metilasyon düzeyleri değerlendirildi. MTHFR geni promotor bölgesine özgü metilasyon düzeyleri incelendiğinde, MTHFR geni promotor bölgesine özgü 1. CpG Adacığı, 2. CpG Adacığı, 3. CpG Adacığı ve 3 CpG adacığının metilasyon düzeyleri toplamı ile hasta grubu (Azoospermik+Oligozoospermik)-kontrol grubu arasında değerlendirildi. Azoospermik Hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Yine, Azoospermik hasta grubu ile kontrol grubu arasında ise MTHFR geni promotor bölgesine özgü 2. CpG Adacığı, 3. CpG Adacığı ve 3 CpG adacığının metilasyon düzeyleri toplamı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Çalışmamızda azoospermik ve oligozoospermik hasta grubunda FSH düzeyleri değerlendirildi. Azoospermik hasta grubunun FSH düzeyi ortalaması 21.22 ± 16.78 (IU/L) (min:2.00, max:91.70) olarak saptandı. Oligozoospermik hasta grubunun FSH düzeyi ortalaması ise 12.30 ± 8.08 (IU/L) (min:2.10, max:39.10) olarak belirlendi. Azoospermik hasta grubu ile oligozoospermik hasta grubu arasında FSH düzeyleri karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p \leq 0.05$).

Çalışmamızda azoospermik ve oligozoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyleri değerlendirildi. Azoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyi ortalaması 3.88 ± 1.61 pg/ml (min:0.46, max:7.14) olarak belirlendi. Oligozoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyi ortalaması 4.56 ± 1.73 pg/ml (min:1.90,max:10.69) olarak belirlendi. Azoospermik ve oligozoospermik hasta grupları arasında total testosteron düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).

Sonuç olarak hasta grubu-kontrol grubu arasında, MTHFR geni promotor bölgesine özgü 1. CpG Adacığı, 2. CpG Adacığı, 3. CpG Adacığı ve 3 CpG adacığının metilasyon düzeyleri toplamı değerlendirildiğinde, azoospermik hasta grubu ile kontrol grubu arasında MTHFR geni promotor bölgesine özgü 2. CpG Adacığı, 3. CpG Adacığı ve 3 CpG adacığının metilasyon düzeyleri toplamı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.05$). Buna ek olarak çalışmamızda, azoospermik hasta grubu ile oligozoospermik hasta grubu arasında FSH düzeyleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p \leq 0.05$).

Genetik alışma sonuçları arasındaki farklılıklar populasyonlar arasındaki etnik farklılıklardan, çalışmalarda kullanılan materyal-metodlar arasındaki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Bu bağlamda çalışmamızın sonuçlarının, örneklem sayısının arttırılarak Türkiye’de farklı merkezlerde yapılacak yeni çalışmalar ile destenmesi gerektiği öngörüsünde yiz.

İNFERİL ERKEK HASTALARDA 5,10 METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) GEN METİLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Epigenetik, DNA dizisinde bir değişiklik yapılmaksızın DNA ve histon yapısının değiştirilmesiyle gen ifadesinde elde edilen modifikasyonlardan oluşur. Epigenetik işlemler arasında DNA metilasyonu, çevrim sonrası histon değişimleri ve kromatin şekillenmesi gibi uygulamalar vardır. CpG dinükleotidleri içindeki sitozin artıklarının metilasyon yapıları gen ifadesine ilişkin önemli epigenetik bilgiler sunar. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) folat metabolizmasında, DNA sentezinde ve remetilasyon tepkimelerinde temel düzenleyici olarak görev yapan bir enzimdir. MTHFR, 5,10-metiltetrahidrofolat'ın 5-metiltetrahidrofolat'a indirgendiği tepkimeyi katalize eder.

Bu çalışmada nedeni açıklanamayan erkek infertilitesi ile MTHFR geni metilasyon düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Hasta ve kontrol grubunun demografik verileri; sayı (n), %, χ^2 , mean, min, max değerler ve ortalama verilerek açıklanırken, MTHFR geni üzerinde çalışılan bölgeye özgü metilasyon düzeylerinin anlamlı düzeyde farklılaşp farklılaşmadığını belirlemek amacıyla Mann-Whitney U kullanılmıştır (n, mean, std deviation, U Değeri, z ve p).

Hasta grubu (azoospermik+oligozoospermik) yaş ortalaması 30.00 ± 6.3 , kontrol grubu yaş ortalaması 33.00 ± 5 olarak belirlenirken, Azoospermik hasta grubunun yaş ortalaması 31.54 ± 5.6 , oligozoospermik hasta grubunun yaş ortalaması ise 31.39 ± 7.0 olarak saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubunda kullanılan kitin içeriğine uygun olarak MTHFR geni promotor bölgesinde bisülfid uygulamasından sonra sekans dizisinde de [GGTTATTGAGTTATYGATGGGGGYGAGGATAYGGGT] belirtildiği üzere üç CpG adacığının metilasyon düzeyleri de değerlendirilmiştir. MTHFR geni promotor bölgesine özgü 1. CpG Adacığı, 2. CpG Adacığı, 3. CpG Adacığı ve 3 CpG adacığının metilasyon

düzeyleri toplamı değerlendirildi. Hasta Grubu (Azoospermik+Oligozoospermik) ile kontrol grubu arasında ve azoospermik hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.05$). Çalışmada azoospermik hasta grubu ile oligozoospermik hasta grubu arasında total testosteron ve FSH düzeyleri karşılaştırılmış olup, FSH düzeyleri arasında anlamlı bir fark olduğu ($p \leq 0.05$), total testosteron düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p > 0.05$).

Anahtar Kelimeler: Azoospermi, oligozoospermi, MTHFR, erkek infertilitesi

A STUDY OF 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) GENE METHYLATION IN INFERTILE MALE PATIENTS

SUMMARY

Epigenetics is characterized with modifications in gene expressions through changes in DNA and histone structure without changing DNA lineage. Epigenetic procedures include DNA methylation, posttranslational modification, and chromatin formation. Methylation patterns of cytosine residues in CpG dinucleotides provide substantial data about gene expression. methy-lenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) is a basic regulatory enzyme in DNA synthesis, remetyhlation reactions, and folate metabolism. MTHFR catalyzes the reaction which reduces 5,10-methyltetrahydrofolate to 5- methyltetrahydrofolate.

This study was conducted to investigate the correlation between unexplained male infertility and MTHFR gene methylation levels. The demographic data of the patients and the control group were analyzed with number (n), %, χ^2 , mean, min, max values and median values. Mann-Whitney U test was used to determine whether or not MTHFR gene methylation levels significantly differ (n, mean, std deviation, U values, z and p).

The average age of the patient group (azoospermic+oligozoospermic) was 30.00 ± 6.3 while that of the control group was noted to be 33.00 ± 5 . The average age was found to be 31.54 ± 5.6 for the former and 31.39 ± 7.0 for the latter. Methylation levels of CpG islands were also evaluated following bisulfite sequencing [GGTTATTGAGTTATYGATGGGGGYGAGGATAYGGGT] in MTHFR gene promotor region in the patient group and the control group zone. The results indicated that there was a statistically significant difference between the MTHFR gene promotor region methylation levels of 1. CgG Island, 2. CgG Island, 3. CgG Island and the total meythlation levels of three

groups in the patient group (Azoospermic+Oligozoospermikc) and the control group (Azoospermic) ($p < 0.05$). total testosterone and FSH levels were also compared in azoospermic patient group and oligozoospermic patient group and a significant difference was reported in relation to FSH levels ($p \leq 0.05$) while no difference was noted in regard to total testosterone levels ($p > 0.05$).

Keywords: Azoospermia, oligozoospermia, MTHFR, male infertility

KAYNAKLAR

1. Rajender S, Avery K, Agarwal A, Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research*; 2011; 727:62–71.
2. Takai D, Jones P A, Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* 99; 2002: 3740–3745.
3. Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhane M, Pujol P, MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Hum. Reprod*; 2009; 24: 2361–2364.
4. Kuşcu K N, Fertil ve İnfertil Erkeklerin Seminal Plazma ve Kan Serum Leptin Değerlerinin Araştırılması. Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi, 2007, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Manisa:1-35.
5. Jadova D, İnfertil Erkeklerde Sperm Mitokondriyal DNA Mutasyonları İle Sperm Parametrleri ve Genetik Test Sonuçları İle İlişkisi. Yayınlanmamış Doktora Tezi, 2008, Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul: 1-106.
6. Satar D A, Gençdal S, Sperm Değerlendirmesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*; (2013; 22(4):532-542.
7. Balkan M, İnfertil Erkeklerde Genetik Araştırmalar. Yayınlanmamış Doktora Tezi, 2006, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır: 1-89.
8. Gedikli S, Özbek E, Demirci T, Fertilizasyonun Moleküler Temeli. *Van Tıp Dergisi*; 2013; 20(4):294-301.

9. Büyükpamukçu M, Bir Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezine 2006 Yılında Başvuran İnfertil Erkeklerde Bazı Risk Faktörleri, Yayınlanmamış Doktora Tezi, 2008, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İş Sağlığı, Ankara:1-74.
10. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO Press, 2010.
11. Altun A, Azospermik olgulardan alınan tese dokularının ultrastrüktürel incelenmesi ve nos izoformlarının etkisinin değerlendirilmesi, Yayınlanmamış Yüksek lisans Tezi, 2013, İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul:1-90.
12. Enatsu N, Yamaguchi K, Chiba K et al, İleri derecede oligozoospermisi olan infertil hastalarda mikrocerrahi varikosektomi klinik sonuçları. Urology; 2014; 83: 1071-1074.
13. Kırca N, Pasinlioğlu T, İnfertilite Tedavisinde Karşılaşılan Psikososyal Sorunlar, Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar. Current Approaches in Psychiatry; 2013; 5(2):162-178.
14. Soydan H ve ark, Ciddi Oligozoospermik ve Azoospermik İdiyopatik İnfertil Erkeklerde Y Kromozomu Mikrodelesyon Analiz Sonuçları, Türk Üroloji Dergisi; 2003; 29 (4): 414-423.
15. Şamlı M, Erkek İnfertilitesinde Genetik Bilgilendirme, Androloji; 2014; Mart, Sayı 56: 44-51.
16. Yumru A E, Öndeş A, İnfertilite ve IVF'e Hasta Seçimi. JAREM; 2011;1:57-60.
17. Pehlivan ve ark, Erkek İnfertilitesinde Anjiyotensin Konverting Enzim Polimorfizimleri. Gaziantep Tıp Dergisi; 2008; 14:15-17.
18. Erdemir ve ark, İdiyopatik erkek infertilitesinde klomifen sitratın Semen parametreleri ve gebelik oranları üzerine etkisi. Yeni Üroloji Dergisi 2011; 6 (1): 38-42.
19. Yağcı ve ark, Erkek İnfertilitesinde Transrektal Ultrasonografi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası; 2002; Cilt 55, Sayı 2:129-136.
20. Erkek İnfertilitesine Genetik Yaklaşım, www.burclab.com/.../infertilite/infertilite-burc-genetik-tani-merkezi, (Erişim Tarihi: 15.03.2015).
21. Gül T, Yılmaz G, Bayram S, Dolgun N Z, Ege S, Trakya Bölgesinde Sigara Alkol Kullanımı İle Meslek Gruplarının Semen Parametreleri Üzerine Etkisi. Turkish Medical Student Journal; 2014; May,1:13-17.

22. Koşar P A, Özçelik N, Erkek infertilitesinde genetik değerlendirme. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg; 2007; 14(3): 48-51.
23. Uluğ M, Duman B S, Uluğ A A, Çamlıbel T, Testiküler Azospermili Erkeklerde Y Kromozomunda Azospermi Faktör Mikrodelesyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Belirlenmesi. Cerrahpaşa Tıp Dergisi; 2006; 37:126-130.
24. Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Har-Vardi I, 6455 Sperm Örneğinde İnsan Sperm Hücrelerinin Mevsimsel Değişimi: Mevsimsel Doğum Paternlerinin Olası Açıklanması. Androloji Bülteni; 2013, (Cev:Aygin D,Marul F); Sayı:55: 271-272.
25. Aktan ve ark,İdiopatik erkek infertilitesinin gizemi: Oksidatif stres gerçek bir risk mi?. Fertil Steril; 2013; Apr;99(5):1211-1215.
26. Erkek İnfertilisinde Genetik Değerlendirme, Üreme sağlığı ve infertilite derneği, www.tsrn.org.tr/.../pdf/erkek_infertilitesinde_genetik_deg, ErişimTarihi: 17/05/2014)
27. Özpak L , Pazarbaşı A , Erkek İnfertilitesinin Sitogenetiği. Arşiv; 2011; 20:230.
28. Ocak Z, Özlü T, Tekrarlayan IVF Başarısızlıklarında Genetik Faktörlerin Klinik ve Prognostik Önemi. Turk Soc Obstet Gynecol; 2013;10: 181- 192.
29. Orcan S.(2006) Epigenetik ve Epigenomik, Hacettepe Üniversitesi,1-10, www.yunus.hacettepe.edu.tr: (Erişim Tarihi:26.08.2014)
30. Bora G, Yurter H E, Epigenetik Hastalıklar ve Tedavi Yaklaşımı. Hacettepe Tıp Dergisi; 2007; 38;48-54.
31. Kürtüncü M, Eraksoy M, Multipl Skleroz:Epigenetik Bir Hastalık Olabilir Mi?. Nöropsikiyatri Arşivi; 2008; 45,Özel Sayı:15-20.
32. Houshdaran S, Cortessis V K, Siegmund K, Yang A, Laird P W, Sokol R Z, Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. PloS One 2;2007;December-12: 1289.
33. Küçükaslan A Ş ve ark, Erkek İnfertilitesinde Metiyonin Sentaz A2756G ve Metiyonin Sentaz Redüktaz A66G Gen Polimorfizmlerin Etkisi. Türk Üroloji Dergisi; 2011; 37(1):38-42.
34. İzmirli M, Aldemir Ö, Göğebakan B, Alptekin D, MTHFR 677 C>T Polimorfizmi İle İlişkili Olduğu Düşünülen Hastalıklara Dair Türk Popülasyonundaki Çalışmalar. Dicle Tıp Dergisi; 2014; 41(1):244-256.

35. Dikmen M ve ark, Akut İnme Hastalarında Risk Faktörü Olan Homosistein Düzeyine MTHFR Gen Polimorfizmlerin Etkisi, Kocatepe Tıp Dergisi;2004;5: 55-61.
36. Koçak N, Özen F, Yıldırım M E, Özdemir Ö, Metilentetrahidrofolat Redüktaz (Mthfr) C677t ve A1298c Gen Polimorfizmleri. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi;2009; 16(3):157-161.
37. Chan et al, Strain-Specific Defects in testicular Development and sperm epigenetic patterns in 5-10 Methylene tetrahydrofolate Reductase-Deficient Mice. Endocrinology; 2010; July-151 (7):3363-3373.
38. Karatağ T, Kendirci M, Erkek İnfertilitesinde Antioksidan Tedavinin Yeri. Androloji Bülteni; 2013; Aralık-55:263-267.
39. Wu W, Shen O, Qin Y, Niu X, Lu C, Xia , Song L, Wang S, Wang X, Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). PLoS One 5 ;2010: e13884.
40. Küçükaslan A Ş ve ark, İnfertil Türk Erkeklerinde Y Kromozomu Mikrodelesyonlarının Saptanması. Turkish Journal Of Urology; 2013; 39(3):170-174.
41. Eloualid A, Abidi O, Charif M, El houate B, Benrahma H, Louanjli N et al, Association of the MTHFR A1298C Variant with Unexplained Severe Male Infertility. PLoS One. 2012; 7(3):34111.
42. Singh K, Singh S K, Raman R, MTHFR A1298C polymorphism and idiopathic male infertility. J Postgrad Med; 2010;56:267-269.
43. Gurkan H, Tozkır H, Göncü E, Ulusal S, Yazar M, The relationship between methylenetetrahydrofolate reductase c.677TT genotype and oligozoospermia in infertile male patients living in the Trakya region of Turkey. Andrologia, Article first published online: 26 NOV 2014 | DOI: 10.1111/and.12380
44. Rotondo J C, Bosi S, Bazzan E, Di Domenico M, De Mattei M R, Selvatici Patella A, Marci R, Tognon M, and Martini F, Methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples of infertile couples correlates with recurrent spontaneous abortion. Human Reproduction; 2012; Vol.0, No.0:1-7.
45. Ok E, Yaşlı Erkeklerde Spermatogenez ve Fertilizasyon. Turkish Journal Of Geriatrics; 2008;11(4):204-207

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa
Şekil 1: Spermatogenezin evreleri	4
Şekil 2: İnfertil erkek hastaların tanı algoritması	13
Şekil 3: Y kromozomunun uzun kolu	15
Şekil 4: Genetik etkileşimler	19
Şekil 5: Moleküler biyolojinin temel dogması	20
Şekil 6: Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu	24
Şekil 7: AZFa, b, c lokuslarına özgü 13 STS'in % 3 nusive agaroz jelde UV transilluminatör görüntüsü	32
Şekil 8: A, D, G: AZFa, AZFb ve AZFc mikrolelesyonu saptanmamış olan hasta, B ve C: sY134 [-], AZFb mikrolelesyonu saptanmış olan hastalar, E ve F: sY117 [-], sY125 [-], AZFb mikrolelesyonu saptanmış olan hastalar, H ve I: sY127 [-], AZFb mikrolelesyonu ve sY254 [-], sY255 [-], AZFc mikrolelesyonu saptanmış olan hastalar	33
Şekil 9: Azoospermik hasta grubunun FSH düzeyine göre dağılımı	43
Şekil 10: Oligozoospermik hasta grubunun FSH düzeyine göre dağılımı	43
Şekil 11: Azoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyine göre dağılımı	44
Şekil 12: Oligozoospermik hasta grubunun total testosteron düzeyine göre dağılımı	45

TABLÖLAR LİSTESİ

TABLÖLAR	Sayfa
Tablo 1: Semen karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri	6
Tablo 2: Semen analizinde normal ve patolojik bulguların isimlendirilmesi	7
Tablo 3: Erkek infertilitesini etkileyen faktörler	10
Tablo 4: Genetik açıdan risk taşıyan hasta grubu, mutlak gerekli ve önerilebilir incelemeler	13
Tablo 5: PCR reaksiyonu	35
Tablo 6: Pyro sekans reaksiyonu	36
Tablo 7: Hasta ve kontrol grubunun yaş demografik özelliğine göre dağılımı	38
Tablo 8: Hasta (azoospermik+oligozoospermik) ve kontrol grubunda MTHFR geni üç CpG adaçığının metilasyon düzeylerinin dağılımı	39
Tablo 9: Azoospermik hasta ve kontrol grubunda MTHFR geni üç CpG adaçığının metilasyon düzeylerinin dağılımı	40
Tablo 10: Oligozoospermik hasta ve kontrol grubunda MTHFR geni üç CpG adaçığının metilasyon düzeylerinin dağılımı	41
Tablo 11: Azoospermik ve Oligozoospermik hasta gruplarında MTHFR geni üç CpG adaçığının metilasyon düzeylerinin dağılımı	42
Tablo 12: Oligozoospermik ve azoospermik hasta gruplarının FSH düzeylerine göre dağılımı	44
Tablo 13: Oligozoospermik ve azoospermik hasta gruplarının total testosteron düzeylerine göre dağılımı	45

ÖZGEÇMİŞ

Fatih DİDİŞEN

Doğum Tarihi: 01.11.1980

EĞİTİM

1987-1992: İzmir, Bergama Zübeyde Hanım İlkokulu

1992-1995: İzmir, Bergama Lisesi Ortaokulu

1995-1997: İzmir, Bergama Lisesi

1998-2003: Yozgat, Erciyes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Lisans)

2012-2016 Edirne, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji (Yüksek Lisans)

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Girişimsel olmayan klinik araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi-TÜBAP) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün. Açık olmayan bir bölüm varsa ya da daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç duyuyorsanız ya da araştırmaya katılmaya gönüllü oluktan sonra soracağınız sorular varsa 0-533-2188005 numaralı cep telefonundan Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN'a başvurabilirsiniz.

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

a.Araştırmanın bilimsel adı: İnfertil Erkek Hastalarda 5,10 Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Metilasyonunun Araştırılması

b.Araştırmanın anlaşılabilir basit adı: Nedeni açıklanamayan erkek kısırlığının genetik olarak araştırılması.

c.Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri: Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN, Trakya Üniv. Tıp Fak. Tıbbi Genetik A.D. Balkan Yerleşkesi 22030 EDİRNE

Araştırmanın içeriği: Nedeni açıklanamamış, mililitredeki sperm sayısı 15 milyonun altında ve/veya hiç spermi olmayan bebek sahibi olamayan (kısır) erkek hastalarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) geni ifade düzeylerinin sperm üretimi üzerine etkisi araştırılacaktır.

d.Araştırmanın amacı: Araştırmada nedeni açıklanamayan erkek kısırlığı

[tkayıcı olmayan ve mililitredeki sperm sayısı 15 milyonun altında ve/veya hiç spermi olmayan] ile DNA yapımını ve yapısını düzenleyen metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi geni ifade farklılıkları ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

e.Araştırmanın niteliği (Klinik, Laboratuvar, Epidemiyolojik - Tez çalışması

vb....): Yüksek Lisans Tez çalışması

f.Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi: 01.09.2012. Öngörülen

süre 12 ay

g.Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı: 100 (yüz) gönüllü dahil edilmesi planlanmaktadır. Bunların 100 (yüz)'ünün hasta grubu, 100 (yüz)'ünün Tıbbi Genetik laboratuvarına farklı genetik analizler için başvuran erkek bireylerden son bir yıl içerisinde yardımcı üreme teknikleri kullanılmadan sağlıklı bebek sahibi olanlar tarafından oluşturulması planlanmaktadır.

i.Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:

-Nedeni açıklanamamış erkek kısırlığı birden fazla genetik nedene bağlıdır. Bu çalışmada katılımcılar (hasta grubuna dahil olanlar) bugüne kadar kendilerindeki nedeni açıklanamamış olan sperm sayısı düşüklüğünün veya sperm yokluğunun olası nedeninin araştırılmasına katkı sağlayacaklardır.

-Araştırmada uygulanacak yöntemler: Hasta grubuna nedeni açıklanamamış erkek kısırlığı (bebek sahibi olamayan) nedeni ile Tıbbi Genetik A.D. polikliniğine sitogenetik analiz ve/veya Y kromozom mikrodelesyon analizi amacı ile müracaat eden hastalar içerisinde: mililitredeki sperm sayısı 15 milyonun altında ve/veya hiç spermi olmayan hastalar dahil edilecektir. Bu hastalardan sitogenetik analiz ve/veya Y kromozom mikrodelesyon analizi amacı ile EDTA'lı tüpe alınacak olan 5 cc periferik venöz kandan 200 mikrolitre alınarak genomik DNA ayrıştırılacaktır. Genomik DNA'dan metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi geni birinci kodlayıcı bölgeden önce yer alan bölgedeki (promotor bölge) metillenme durumları/düzeyleri belirlenecektir.

-Kontrol grubuna Tıbbi Genetik laboratuvarına HLA doku tiplemesi analizi için başvuran erkek bireylerden son bir yıl içerisinde yardımcı üreme teknikleri kullanılmadan sağlıklı bebek sahibi olanlar dahil edilecektir. Bu bireylerden HLA doku tiplemesi analizi için EDTA'lı tüpe alınmış olan 5 cc periferik venöz kandan 200 mikrolitre alınarak genomik DNA ayrıştırılacaktır Genomik DNA'dan metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi geni birinci kodlayıcı

bölgeden önce yer alan bölgedeki (promotor bölge) metillenme durumları/düzeyleri belirlenecektir. Hasta ve kontrol grubunda metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi geni metillenme durumları/düzeyleri karşılaştırılarak olası farklılıklar belirlendikten sonra istatistiksel analiz yapılacaktır.

2.Uygulama Sırasında Karşılaşabileceğiniz Riskler ve Rahatsızlıklar:

Hasta ve kontrol grubuna dahil olan kişilerde periferik venöz kan alınırken enjektör iğnesinin battığı noktada duyulabilecek olan ağrı hissi, kan alınan bölgedeki doku hassasiyetine bağlı olarak gelişebilecek morarma olası risklerdir. Gönüllülere olası morarma gelişimini en aza indirmek için kan alınan bölgeye pamukla tampon uygulaması (en az 5 dakika) önerilecektir.

3.Gönüllü İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

-Çalışma sonucunda MTHFR geni metilasyon durumları/düzeyleri ile nedeni açıklanamayan erkek kısırlığı (bebek sahibi olamayan) arasında anlamlı bir ilişki saptanması durumunda erkek kısırlığının bilinmeyen bir nedeni açıklanmış olacaktır.

-Sağlıklı gönüllüler bilimsel çalışmaya ve evrensel bilime katkı sağlamış olacaktırlar.

4.Araştırmaya Seçenek Olan Diğer Girişimler: Yok.

5.Zararların Tazmini ve Araştırma Konusundaki Diğer Soruların Cevaplandırılması:

a.Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile bir hasta olarak hakları konusunda bilgi almak için bağlantı kurulacak kişinin adı-soyadı, ünvanı, görev yeri ve telefon numarası. Hakan GÜRKAN, Yrd. Doç. Dr., Trakya Üniv. Tıp Fak. Tıbbi Genetik A.D. 22030 EDİRNE, 0-284-2357642-1442/1449, 0-533-2188005

6.Araştırma Giderleri ve Bütçesi: 10.000,00 TL

7.Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma: Var

8.Kimlik bilgilerinin ve elde edilen verilerin gizliliği nasıl sağlanacak? Kimlik bilgileri ve elde edilen veriler bilgisayar ortamında depolanarak ve şifre ile korunacaktır.

9.Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi? Evet verilecek

GÖNÜLLÜNÜN ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Gönüllü Bilgilendirme Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün; (El yazısı ile)

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

İmzası:

Tarih:

ETİK KURUL FORMU

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-GOKAEK 2012/125	
	PROTOKOL ADI	İnfertil Erkek Hastalarda 5,10 Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Metilasyonunun Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası

Karar No: 15/ 11

Tarih: 31.05.2012

KARAR
BİLGİLERİ

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Fatih DİDİŞEN'in tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllü ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-GOKAEK Yönergesi

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan UMIT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>izibli</i>
Prof. Dr. Üfey VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Mazaretli</i>
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>izibli</i>
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Burcu TOKUÇ Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Mazaretli</i>
Prof. Dr. Petek BALKANLI KAPLAN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Hast. A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>izibli</i>
Doç. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>izibli</i>
Avukat Gülden ATILLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Mazaretli</i>

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda BulunmaProf. Dr. Tufan EGE
Dekan

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ORJİNALLİK RAPORU

Öğrencinin Adı Soyadı: Fatih Didişen										
Numarası: 1038315101										
Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji										
Programı: <input checked="" type="radio"/> Yüksek Lisans <input type="radio"/> Doktora										
Tez başlığı/Konusu: infertil Erkek Hastalarda S ₁₀ Metilen tetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen metilasyonunun Araştırılması										
Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne										
<p>Yukarıda açık adı bulunan tezimin "Kapak Sayfası, Giriş ve Amaç, Genel Bilgiler, Bulgular, Tartışma, Sonuçlar, Özet ve Summary" bölümlerinden oluşan toplam67... sayfalık kısmına ilişkin ...22.../02.../2016... Tarihinde tez danışmanım tarafından <i>turnitin</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı % ..21..... olarak belirlenmiştir.</p> <p><u>Uygulanan filtrelemeler:</u></p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td>1-Kabul ve Onay Sayfası hariç</td> <td>6-Kaynaklar hariç</td> </tr> <tr> <td>2-Teşekkür hariç</td> <td>7-Şekiller Listesi hariç</td> </tr> <tr> <td>3-İçindekiler hariç</td> <td>8-Özgeçmiş hariç</td> </tr> <tr> <td>4-Simge ve Kısaltmalar hariç</td> <td>9-Ekler hariç</td> </tr> <tr> <td>5-Gereç ve Yöntemler Hariç</td> <td></td> </tr> </table> <p>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen maksimum benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin ispat edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğruluğunu beyan ederim. 24./02./2016</p> <p style="text-align: right;">Fatih Didişen <i>(İmza)</i></p> <p style="text-align: right;">Öğrencinin Adı Soyadı, İmza</p>	1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç	2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç	3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç	4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç	5-Gereç ve Yöntemler Hariç	
1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç									
2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç									
3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç									
4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç									
5-Gereç ve Yöntemler Hariç										
Ek:Orijinallik Raporu (.67.Sayfa)										
<p>UYGUNDUR 24./02./2016 Doç.Dr. Hakan Gürkan <i>(İmza)</i> Danışman Adı Soyadı, İmza</p>										

