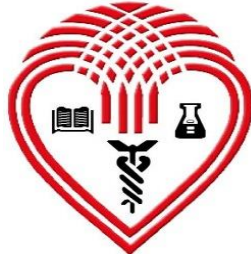


**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**AZOOSPERMİK HASTALARDA MAYOZ İNDİKATÖRÜ
OLARAK LİM 15 GEN EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Betül ÇAPAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2015

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**AZOOSPERMİK HASTALARDA MAYOZ İNDİKATÖRÜ
OLARAK LİM 15 GEN EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Betül ÇAPAR

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Volkan BALTACI

YÜKSEK LİSANS TEZ

İSTANBUL, 2015

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Betül ÇAPAR



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1.ÖZET.....	1
2.SUMMARY.....	3
3.GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4.GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. İNFERTİLİTE.....	7
4.1.1. Erkek faktörü.....	8
4.1.1.1. Hormonal Bozukluklar	9
4.1.1.2. Kromozom bozuklukları ve Tek gen hastalıkları	9
4.1.1.3. Gonadotoksinler	9
4.1.1.4. Çeşitli Metabolik Hastalıklar	10
4.1.1.5. Anormal Spermatogenez.....	10
4.1.2 Azospermi.....	11
4.1.2.1. Tedavi Amaçlı Testis Biyopsisi Yöntemleri.....	12
4.1.2.1.1. TESA Yöntemi	12
4.1.2.1.2. Konvansiyonel TESE Yöntemi.....	12
4.1.2.1.3. Mikrotese Yöntemi.....	12
4.1.3. Erkek İnfertilitesinde Genetik Faktörler.....	12
4.1.3.1. Y Kromozom Mikrodelesyonları.....	13
4.1.3.2. Kromozom Anomalileri.....	14
4.1.3.3. Konjenital Vaz Deferens Agenezisine Neden Olan Kisti Fibrozis Gen Mutasyonları.....	14
4.1.3.4. Sperm Fonksiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar.....	15
4.2. GAMETOGENEZ	15
4.3. GERMİNAL HÜCRELER VE SPERMATOGENEZ.....	17
4.4. LİM15 /DMC1 GENİ.....	20
4.5. GEN VE GEN İFADESİNİN DÜZENLENMESİ	21
4.5.1. Transkripsiyon	22
4.5.1.1. Zincir uzaması ve Sonlanması.....	23

4.5.1.2. RNA İşlenmesi.....	24
4.5.2. Translasyon.....	24
4.5.2.1. Başlama	24
4.5.2.1.1. Kodon Tanıma.....	26
4.5.2.1.2. Translokasyon.....	26
4.5.2.1.3. Transpeptidasyon.....	26
4.5.2.2. Bitiş (terminasyon).....	26
4.6. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	27
4.7. MAYOZ BÖLÜNME VE LİM15 /DMC1 GENİ.....	29
5.MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
5.1 HASTALAR VE KONTROL GRUBU.....	32
5.2. YÖNTEM.....	32
5.2.1. Dokuların Toplanması ve RNA İzolasyonu.....	32
5.2.2. cDNA Sentezi	33
5.2.3. Real – time PCR	35
6. BULGULAR.....	36
6.1.RNA İZOLASYONU SONRASI LİM 15 MİKTARI VE PCNA MİKTARLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	36
6.2. GEN EKSPRESYONU KARŞILAŞTIRILMALARI.....	40
7.TARTIŞMA.....	41
8.SONUÇ.....	44
9.TEŞEKKÜR.....	46
10.KAYNAKLAR.....	47

SİMGE VE KISALTMALAR

DNA	Deoksiribonükleik asit
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
LH	Luteinize Edici Hormon
NOA	Non Obstrüktif Azoospermili
IVF	In vitro Fertilizasyon
ICSI	Intra-Cytoplasmic Sperm Injection
MESA	Micro epididymal sperm aspiration
PESA	Perkutan Sperm Aspirasyonu
AZF	Azospermi Faktör
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CBAVD	Konjenital Bilateral Vazagenezi
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormonu
PWS	Prader-Willi Sendromu
CDC	Hücre-bölünme Siklus Genleri
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
UTR	Untranslated Aegion
TFII	Transkripsiyon Faktörü

MRNA	Mesajcı RNA
TRNA	Taşıyıcı RNA
RRNA	Ribozomal RNA
IF	Başlatma Faktörleri
EF	Uzatma Faktörleri
Aa	Aminoasit
UAG, UAA, UGA	Stop Kodonları
RT-PCR	Revers-Transkriptaz Polimeraz ZincirReaksiyonu
cDNA	Komplementer DNA
PZR	Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
C°	Santigrat
Mg	Miligram
µl	Mikrolitre
RPM	Dakika Başına Devir
Mm	Milimolar
ACTB	Beta-actin (Human Gene and Protein Symbol)

T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurul Tarafından 16.12.2014 tarih ve 26-187 numaralı karar ile onaylanmıştır.

T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından 2014-01/07 proje numarasıyla desteklenmesine karar verilmiştir.

Yüksek Lisans Tez Projesi No: TBG/YL/1922014

1. ÖZET

Sperm hücreleri mayoz bölünme ile çoğalan hücrelerdir. Mayoz bölünmenin testis dokusunda aktif olduğunun gösterilmesi azospermik hastalarda sperm oluşumunun olup olmadığıyla ilgili önemli bir süreçtir.

DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar. DNA tamir mekanizmasında görevli olan proteinlerden olan *Rec A* proteini rekombinasyonel bir değiş tokuş işlemi ile hasarsız komplementer zincirde bulunan sekansı transfer eder. Ökaryotlarda iki tip *Rec A* gibi rekombinaz yapan protein mevcuttur: *Lim15/Dmc1* ve *Rad51*. Bunlardan *Rad51* hem mayotik hem de somatik hücrelerde eksprese olur ve DNA tamir mekanizmasında fonksiyonu vardır. *Lim15* ise sadece mayoz aşamasında rekombinasyona dayalı DNA sentezinde görev alan bir proteindir. Ökaryotlarda yapılan çalışmalar *Lim15* proteininin sadece mayoz bölünmeye spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiş ve *Lim15* proteininin *RAD51* proteini ile mayoz aşamasında işbirliği yaptığını ortaya koymuştur. Bu iki proteinin ifadesi mayoz bölünme için kritik bir öneme sahiptir.

Bu çalışma ile azospermik hastalardaki testiküler dokulardan alınan materyalde *Lim15* geninin ekspresyon düzeyi incelenecektir. Söz konusu genin ekspresyonunun varlığı ile testis dokusunda spermatojenik aktivite (mayotik aktivite) arasında korelasyon araştırılacak, ayrıca ekspresyonun seviyesinin takibi ile hastanın tedaviye cevabı, yada tedavi ile spermatojenik aktivitesinde artış olup olmadığı araştırılacaktır. Çalışmada materyal olarak azospermi nedeniyle TESE operasyonu planlanan hastalardan alınan doku örnekleri kullanılacaktır. Dokulardan RNA izolasyonu yapıp, real time ekspresyon kiti kullanılarak PZR testleri kurulacaktır. Böylece *Lim15* geninin ekspresyon analizi testis dokusu içinde sperm yapımından sorumlu mayoz bölünmenin olup olmadığını ve dolayısıyla spermatogenez potansiyelinin var olup olmadığı ortaya koyabilecek ve azospermik hastalarda tekrarlayan TESE denemeleri yerine spermatojenik aktivitenin takip edilerek bu bilgiler ışığında elektif TESE yapılmasını sağlayabilecektir.

Böylece spermatogenezi sağlamak amacıyla tedavi verilen hastanın verilen tedaviye (hormonal tedavilere) cevabının takip edilerek buna göre TESE planlanması sağlanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Lim15* , azoospermi ,mayoz bölünme.



2.SUMMARY

Sperm cells proliferate by meiotic division. It is important to show that meiosis is active at the testis tissue. In order to determine whether there is spermatogenic activity in azospermic patients.

More than 100 genes take a role at the DNA repair mechanism. *REC A* protein, one of the proteins coded by these genes, works at the recombination switch and helps for a damage free transfer of complementary chain sequence. At eukaryotes, there are two *REC A* like proteins that work at recombinase stage: *Lim15* and *Rad51*. *Rad 51* is expressed at both meiotic and somatic cells and has a role at DNA repair mechanism. *Lim15* is a protein that has a role at DNA synthesis depended on recombination at meiosis stage. Studies conducted on eukaryotes showed that *Lim15* protein is expressed only at cells specific to meiotic division and showed that *Lim15* protein co-works with *RAD51* protein at meiosis stage. Expression of the both proteins has a critical importance during spermatogenesis.

With this project, the expression of *Lim15* at testicular tissue from azospermic patients will be researched. The correlation between the expression of this gene and the spermatogenic activity will be studied. Also, expression levels of the gene will be observed for the azoospermic patients who treated by hormone drugs, or if after the treatment is there an increase in the spermatogenic activity will be researched. At the study, testical tissue will be acquired from azospermic patients undergoing TESE operation.

RNA isolation will be done from tissue samples, PCR tests will be setup using real time expression kits. In this way, the presence of the gene responsible for the meiotic division for sperm production will be investigated. Also the potential for spermatogenesis will be studied. As a result, for azospermic patients, instead of recurrent TESE operations it could be possible to make an elective TESE operation follow the spermatogenic activity.

Therefore, by examining the responses to hormone replacement therapy of the patient for Sermatogenesis, it will be possible to schedule a TESE operation accordingly.

Key Words: *Lim15* , azoospermia ,meiosis.



3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, reproduktif çağda olan bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır (1). Çiftlerin yaklaşık olarak %25'i bir yıl içerisinde gebelik elde edememektedir. İnfertilite sadece kadın ya da erkek faktörlü olduğunda eşlerden biri bu durumu kompanse edebilmektedir. Ancak çoğu çiftte bunların ikisi bir arada bulunmaktadır (2).

İnfertiliteye kadın ve erkek faktörleri ya da her ikisi neden olabileceği gibi bir kısmı da açıklanamayan faktörlerdir. Bu faktörler yaklaşık olarak %10 'luk kısmı oluşturmaktadır. İnfertil çiftlerin %30 ila 40'ını erkek faktörü oluşturmaktadır. Erkek infertilitesi spermde şekil, sayı ve morfolojik bozukluk nedeniyle meydana gelebileceği gibi hormonal ve genetik faktörler de infertiliteye sebep olmaktadır. En önemli nedenler arasında azospermi görülmektedir. İnfertil erkeklerin %10'u azospermiktir. Azospermi menide hiç sperm görülememe durumudur. Bu hastalarda azospermi sebepleri; hormonal veya genetik bozukluklar, çocukluk çağında inmemiş testis veya fitik nedeniyle geçirilen ameliyatlara, çocukluk çağında geçirilen ateşli enfeksiyonlar (kabakulak, menenjit vb) tümör nedeniyle uygulanan kemoterapi veya radyoterapi, çeşitli travmalar (trafik kazası, spor yaralanmaları) olabileceği gibi sperm yollarının doğuştan olmaması, gelişmemesi veya tıkanıklığı olabilir. Sperm kanallarının doğuştan olmaması, en sık kistik fibrozis hastalığı taşıyıcılığında söz konusudur. Tıkanıklığa bağlı olmayan durumlarda testislerde sperm üretimi ya hiç yoktur ya da belirli alanlarda çok sınırlı sayıda olmaktadır. Testis dokusu içerisinde küçük tüp benzeri yapılar vardır ve bu yapılarda sperm üretimi değişik aşamalarda devam eder. Cerrahi sperm arama yöntemleri ile testisin değişik bölgelerinden alınan çok sayıda parça incelendiğinde sperm hücresi bulunabilmektedir. Mikroskopik TESE yöntemi böyle vakalarda sperm elde etme şansını büyük oranda arttırmaktadır. Menisinde sperm hücresi olmayan erkeklerde, ameliyat mikroskobu kullanılarak, sperm bulunan alanlar daha kolay tanımlanarak sperm elde edilebilmektedir.

Spermatogenezde, döllenme yeteneğine sahip olmayan olgunlaşmamış erkek cinsiyet hücreleri olan birincil spermatositler mayoz bölünme geçirerek ikincil spermatositlere dönüşürler. İkincil spermatositler ise ikinci kez mayoz bölünme geçirerek sperm hücresinin olgunlaşmayı tamamlamadan önceki halini alırlar. Farklılaşma aşamasıyla birlikte dölleme

yeteneğine sahip spermiler oluşur. Sperm hücreleri mayoz bölünmeyle çoğalan hücreler olduğundan mayoz bölünmenin testis dokusunda aktif olup olmaması sperm oluşumuyla ilgili önemli bir süreçtir. Bu nedenle mayoz bölünmede görev alan proteinlere bakarak bu oluşuma ait önemli bulgular tespit edilebilmesi mümkündür (3). *Lim15* proteini mayoz aşamasında DNA sentezinde ve mayotik rekombinasyonda görevli olan bir proteindir. Yapılan çalışmalar *Lim15* geninin mayoza spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiştir. Gen ifadesinin düzenlenmesi hücrelerdeki genetik bilginin gen ürünlerine çevrilmesi sürecidir. Gen anlatımını düzenleyen mekanizmalar, bir gen ürününe olan gereksinim doğrultusunda ilgili genin anlatımını arttıran ya da azaltan mekanizmalardır. Gen anlatımı çeşitli aşamalarda (transkripsiyon, RNA'ların işlenmesi, translasyon ve translasyon sonrası) düzenlenmektedir. Gen ürünleri RNA ya da protein olmaktadır.

Bu çalışma ile azospermik hastalardaki testiküler dokulardan elde edilen materyalde *Lim15* geninin ifadesine bakılacaktır. Hastanın testiküler dokusundan elde edilen materyalde *Lim15* geni ifadesinin varlığı ile testis dokusunda spermatojenik aktivite arasında korelasyon araştırılacak ve ekspresyon seviyesinin takibi ile hastanın tedaviye cevabı ya da spermatojenik aktivitede artış olup olmadığına bakılacaktır. Böylece spermatogenezi sağlamak amacıyla tedavi verilen hastanın tedaviye cevabı takip edilerek TESE operasyonu planlanabilecektir. Yöntem için sadece küçük miktarda TESE dokusu yeterli olacağından iğne aspirasyon biyopsisi TESE sırasında kullanılacak ve hasta açık cerrahi müdahale risklerinden korunmuş olacaktır. *Lim 15* gen ifadesinin varlığı daha önce sadece maya (*c.cinereus*) nın mayozunda çalışılmış ve insanda herhangi bir çalışma literatürde gözlenmemiştir (4). Çalışmayla ilgili klinik verinin olmayışı, sınırlı sayıda literatür olması bizim çalışmamızı özel kılmaktadır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. İNFERTİLİTE

İnfertilite, reproduktif çağda olan bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır (1). İnfertilite reproduktif çağdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Korunmasız geçen 12 aylık süre sonunda çiftlerin %80'i ilk 6 ay içinde, geri kalanların ancak %10'u takip eden 6 ay içinde gebe kalabilmektedir (5,6). Tüm infertil çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü tespit edilir. %20-25 çiftte hem erkek hem de kadına ait patolojiler birlikte gözlenir. Çiftlerin %15 'inde ise tüm tanısal tetkikler sonucunda herhangi bir infertilite nedeni tanımlanamaz. Bu durum açıklanamayan infertilite olarak tanımlanır (7). Fertilite oranları 20-25 yaş arasında maksimuma ulaşır. 30-32 yaşlar arasında kısmi bir azalma görülür ve 40 yaş sonrasında hızlı bir düşüşe geçer. Toplam fertilite oranları 25-29 yaşlarında %4-8 azalırken bu oran 30-34 yaş arasında %15-19, 35-39 yaşlarında %26-46 ve 40-45 yaşlarında % 95 şeklinde azalma gösterir (8).

İnfertilitenin en sık sebepleri; ovulatuvar bozukluk, tubal ve peritoneal patoloji ve erkek faktörleridir; uterin patoloji genellikle seyrek görülmektedir ve geri kalanı ise nedeni açıklanamayan infertilitedir. Her birisinin sıklığı yaşla birlikte değişmektedir. Genç kadınlarda ovulasyon bozuklukları daha siktir, tubal ve peritoneal patoloji genç ve yaşlılarda eşit sıklıktadır (9). Erkek infertilitesinde testislerin doğuştan bulunması, gereken yere inmemesi, karın içinde veya kasık kanalında kalması da sperm bozukluğuna yol açar. Bunun haricinde kromozomal anormallikler, bazı genetik bozukluklar, hormonal nedenler, yani beynin alt kısmında bulunan hipofiz bezi tarafından üretilen FSH ve LH hormonlarına ait bozukluklar da sperm üretimini olumsuz yönde etkiler. Ayrıca geçirilmiş enfeksiyonel hastalıklar, çok sıcak ortamlarda bulunma zorunluluğu, bir takım petro kimyasalların ürettiği dumanı, çeşitli boyaları, tineri ve bu tip kimyasalları uzun süre solumak durumunda kalmış olmak, kötü beslenme, stres, aşırı alkol, kafein ve sigara tüketimi, vücut geliştirme amacıyla alınan doping, morfin, eroin gibi maddelerin kullanımı sonucu da vücudun hormonal üretimi bozulur ve bu da kısırlığa yol açabilir (10). Erkek faktörü ve

açıklanamayan infertilite yaşlı çiftlerde daha sık görülmektedir. Kadına ve erkeğe ait infertilite nedenleri arasındaki bazı benzerlikler gösterilmekle birlikte farklı nedenler ve farklı oranlarda karşımıza çıkmaktadır (Tablo 1) (10).

1-Kadına ait nedenler (% 40-45)
• Ovulatuvar (% 30-40)
• Tubal/Peritoneal Faktör (% 20-40)
• Servikal ve İmmünolojik Faktörler (% 1-2)
• Diğer
2. Erkeğe ait nedenler (% 30-40)
3. Açıklanamayan (% 10-15)

Tablo 1: İnfertilite nedenleri (10).

Çalışmanın temel konusu azospermik olgular (erkek faktörü)olması nedeniyle sadece erkek infertilitesine yönelik sebepler aşağıda yer verilmiştir.

4.1.1. Erkek Faktörü

Bir yıl içerisinde korunma olmaksızın yapılan normal cinsel ilişkiye rağmen gebe kalmayan çiftlerin oranı yaklaşık % 15 kadardır. Erkeğin bu durumdaki oranı saf olarak yaklaşık % 20 iken, kadın ile beraber ve açıklanamayan grup da içine alındığında bu oran % 50'lere varmaktadır (11,12).

Reproduktif yaştaki erkeklerin % 6'sında infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Bu olguların yaklaşık % 90'ında da bozulmuş spermatogenez vardır (11,13).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 7273 evli infertil çift üzerinde, infertilite nedenine göre yapılan bir çalışmada infertil çiftlerde, % 41 oranında kadın, % 24 oranında erkek, % 24 kadın ile erkek beraber ve % 11'inde ise bir neden gösterilememiştir (13,14). Buradan

da anlaşılacağı gibi evli infertil çiftlerin % 48'inde mutlaka erkek faktörü için içine girmektedir.

Erkek İnfertilitesinin Başlıca Nedenleri:

4.1.1.1. Hormonal bozukluklar

- İzole gonadotropin yetmezliği (Kallman sendromu),
- İzole LH ve FSH yetmezliği,
- Hiperprolaktinemi,
- Tiroid hastalıkları,
- Konjenital hipogonadotropik hastalık,
- Hipofizer yetersizlik (tümörler, ameliyat, radyasyon),
- Ekzojen hormonlar (androjen- estrogen, glukokortikoid fazla verilmesi) (15,16,17)

4.1.1.2. Kromozom bozuklukları ve Tek gen hastalıkları

- Klinefelter Sendromu, XX erkek , XYY sendromu,
- Y kromozom mikrolelesyonları,
- Myotonik distrofi,
- Hemokromatozis,
- Orak hücre anemisi,
- Germ hücre aplazisi (SCOS: Sertoli cell only sendromu).

4.1.1.3. Gonadotoksinler

- İlaçlar, insektisitler,
- Radyasyon, manyetik alanlar,
- Alkol, sigara ve uyuşturucu maddeler,
- Gıda katkı maddeleri.

4.1.1.4. Çeşitli metabolik hastalıklar

- Testislere travma ve omurilik zedelenmesi,
- Böbrek yetmezliği, karaciğer hastalığı,
- İmmünolojik hastalıklar, enfeksiyonlar.

4.1.1.5. Anormal spermatogenez

- Kriptorşitizm (inmemiş testis),
- Varikosel,
- Sperm kanallarında tıkanıklık,
- Sperm motilite ve fonksiyon bozukluğu,
- Sperm morfoloji defekti (baş, kuyruk, akrozom vs),
- Maturasyon defekti (1516,17,18).

Erkek infertilitesini anatomik olarak 3 ana başlıkta toplamak mümkündür (19):

Pretestiküler nedenler: Kromozomal (Klinefelter sendromu, Kallman sendromu, Y mikrodelesyonu, Kistik Fibroz), hormonal (hipogonadotropik hipogonadizm, hiperprolaktinemi), koital (erektile disfonksiyon, endokrin, noral, ejakulatuvar yetmezlik (psikoseksüel, ilaç, cerrahi) nedenler bu gruptandır (10,19).

Testiküler nedenler: Konjenital (inmemiş testis, immotil silia, vas deferens yokluğu), enfeksiyon (orşitis), vasküler (torsiyon, varikosel), antispermatojenik ilaçlar (kemoterapi, x-ray), immunolojik, tumor (germ hücreli tumorler, testiküler mikrolithiazis), idiyopatik nedenler bu gruptandır (10,19).

Posttestiküler nedenler: Obstrüktif (epididimal, vazal) ve aksesuar bez enfeksiyonları bu gruba dahildir. Post testiküler nedenler aşağıda belirtilmiştir (10,19).

1) Obstrüktif

a)Epididimal

i)Konjenital

ii)Enfeksiyon

b)Vasal

i)Konjenital

ii)Akkiz

2) Epididimal geçiŖe bağlı: (Astenozoospermia)

3) Aksesuar bez enfeksiyonları

4) İmmünoloji

4.1.2 Azoospermi

Azoospermi; menide hiç sperm grlememe durumudur. Bu hastalarda azospermiye sebep; hormonal veya genetik bozukluklar, çocukluk çağında geçirilen ateŖli enfeksiyonlar (kabakulak, menenjit vb) tümör nedeniyle alınan kemoterapi veya radyoterapi, eŖitli travmalar (trafik kazası, spor yaralanmaları) olabileceği gibi sperm yollarının dođuŖtan olmaması, geliŖmemesi veya tıkanıklığı da azospermiye neden olabilmektedir (20,21).

Azoospermi, testis sonrası sperm kanallarının tıklalı yada açık olmasına göre 2 gruba ayrılır. Kanallar kapalı olduğunda (%40), sperm üretimi olmasına rağmen ejakulatta sperm bulunmaz. DođuŖtan ve cerrahi komplikasyonu yada travma nedeniyle sonradan oluŖabilir. DođuŖtan olan vakalar sıklıkla kistik fibrozis mutasyon taŖıyıcılarıdır. Kanallar açık olduğunda azospermi varsa, bu durum testis yetmezliğine bağlıdır. Sperm retimi, testis kusuru yada hormon eksikliği nedeniyle gerekleŖmemektedir (22).

Ejaklatta sperm yokluğu olarak tanımlanan azospermi, tüm erkeklerin % 1'inde, infertil erkeklerin ise % 10-15'inde görülür (23). Son 10 yıla kadar azospermik olguların ocuk sahibi olmasından söz etmek olanak dıŖı iken IVF ve ICSI yöntemleri testiküler sperm varlığında infertil erkeklere baba olma Ŗansı tanımaktadır.

İlk kez 1993'te perkütan sperm aspirasyonu tanısalsamalı olarak kullanılmıŖtır (24). Aynı yıl Schoysman ve arkadaşları, obstrüktif azospermili bir olguda testis biyopsisi ile sperm elde ederek ICSI ile gebelik bildirmiŖlerdir (25). Non obstrüktif azospermili olgularda, testiste sperm matür ya da immatür halde bulunabilir. Dolayısıyla bu olgularda TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu) ya da TESA (Testiküler Sperm Aspirasyonu) iŖlemine baŖvurulur. Obstrüktif azospermide ise, MESA (Micro epididimal sperm aspirasyonu) veya PESA (Perkutan Sperm Aspirasyonu) yöntemi ile sperm elde edilir. Testis biyopsisinin infertil erkeklerin incelenmesindeki önemi, 1940 lardan sonra dikkat

çekmeye başlamıştır (26). Testis biyopsisi cerrahi bir girişim olduğundan, ancak diğer yöntemler ile tanı konulamayan infertil erkeklerde diagnostik amaçlı uygulanmıştır. Testis biyopsisi normo-gonodotropik, normal büyüklük ve kıvamda testisi ve vas deferensi olan azospermisi izah edilemeyen infertil hastaların etyolojinin aydınlatılması amacıyla yapılmaktadır (27).

4.1.2.1. Tedavi amaçlı Testis biyopsisi yöntemleri:

4.1.2.1.1. TESA yöntemi: Obstrüktif azospermide sperm elde etme şansı yüksektir. Planlanan aspirasyon noktaları işaretlenip, aspirasyon işlemi yapılır (28).

4.1.2.1.2. Konvansiyonel TESE yöntemi: Non Obstrüktif Azoospermili (NOA) özellikle testiküler yetmezlikli olgularda tercih edilmelidir. Genel yada lokal anestezi altında skrotal kesi ile testis ve epididim incelenir. Yaklaşık 50 mg ağırlığında testis dokusu çıkarılır. Alınan testis dokusunda sperm saptanırsa aynı yerden 2 kat doku daha alınarak işleme son verilir (28,29).

4.1.2.1.3 Mikrotese yöntemi: Schlegel ve arkadaşları, ilk kez 1998'de tanımladıkları yönteme göre ameliyat mikroskobu ile 8-15× büyütme altında testisten 1-5 mg ağırlığında testis dokusu çıkarılır (30). Avantajları, daha az testis dokusunda daha yüksek sayıda sperm elde edilmesi, devaskularizasyon ve dolayısıyla testiküler hasar riskinin düşük olmasıdır. Dezavantajları ise ameliyat mikroskobu gerektirmesi ve girişimin uzun sürmesidir. Testisten elde edilen sperm ile gebeliğin 10 yıllık bir geçmişi mevcuttur (31). Bu süre içerisinde teknikte önemli gelişmelerle birlikte, testise zarar vermeden mümkün oldukça çok sayıda sperm elde etmek amaçlanmıştır. En son gelinen noktada mikrodiseksiyon TESE'nin diğer tekniklere üstünlüğü test edilmektedir (32).

4.1.3. Erkek İnfertilitesinde Genetik Faktörler

Erkek infertilitesinin % 40'nın nedeni bilinmemekle birlikte, genetik faktörler bu nedenler arasında önemli bir yer tutmaktadır (33). Sayısal ve yapısal kromozomal düzensizliklere, sebebi bilinmeyen oligozoospermik ve azospermik olgularda sık rastlandığı bilinmektedir (34). Yapılan çok sayıda çalışmada oligozoospermik ve

azoospermik olgularda kromozomal düzensizlik oranı % 2,1-10,3 arasında verilmektedir (35,36).

94465 yenidoğan erkek çocukta yapılan sitogenetik analiz sonucunda kromozomal düzensizlik oranı % 0,38 (% 0,14 gonozomal, % 0,25 otozomal) olarak bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise oligozoospermik olgularda kromozomal düzensizlik oranı % 6 verilirken, azoospermik olgularda bu oran % 19,6 olarak bildirilmiştir (37). Erkek infertilitesi genetik faktörleri şunlardır:

4.1.3.1. Y Kromozom mikrodelesyonları:

En önemli erkek infertilite nedenlerinden birisi olan Y kromozom mikrodelesyonları spermatogenetik yetmezliğin en sık görülen sebeplerinden biridir. İdiyopatik azospermide %15–20, idiyopatik oligozoospermide %7–10 oranında görülmektedir (33,38). Bu delesyonları taşıyan kişiler genellikle fizik muayenede normal olup, bazı vakalarda küçük testis ve/veya kriptorşidizm görülebilmektedir. Semen analizinde azospermi ve hafif/ilımlı/şiddetli oligozoospermi saptanabilmektedir. Y kromozomunun uzun kolunda AZFa, AZFb, AZFc, AZFd bölgelerinde spermatogenez ile ilgili genler yer almaktadır. Tiepolo ve Zufardi 1976 yılında karyotip analiz çalışmaları sırasında Y kromozomunun sperm üretiminde belirgin bir rol oynadığını saptamışlardır (39). Aynı araştırmacılar, karyotip analizi ile azospermili 6 hastada Y kromozomunun uzun kolunda geniş bir terminal delesyon bulmuş ve bu bölgenin spermatogenez için gerekli olduğunu bildirmişlerdir (40,41).

Tespit edilen bu bölge “Azospermi Faktör” (AZF) bölgesidir. Bu bölge spermatogenez için gerekli olan genleri taşımaktadır. Normal fenotipik görünüme sahip olduğu halde idiyopatik infertiliteli erkeklerin % 10-20'sinde Y kromozomunun uzun kolunda bulunan ve fertilitate için gerekli olan AZF bölgelerinden bazıları bulunmamaktadır. Sitogenetik olarak teşhis edilemeyen bu bölgeler AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd olarak adlandırılır. AZF bölgesi, Y kromozomunun uzun kolunun 11.23 bölgesinde bulunur. Sitogenetik ve moleküler çalışmalar, Y kromozomundaki delesyonların anormal spermatogenez ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (38,40,41).

AZFc bölgesi mikrodelesyonları, tüm delesyonların %79 unu oluşturmakta; AZFb %9, AZFbc %6, AZFa ve AZFabc bölgesi delesyonları % 3 oranında görülmektedir.

AZFb ve AZFb+c bölgelerinin tamamında delesyon olması, spermatogenetik duraklama ile karakterize olmakta ve bu hastalarda TESE ile sperm eldesi mümkün olmamaktadır (38,39,40,41).

4.1.3.2. Kromozom anomalileri:

Tüm infertil erkek hastalarda yaklaşık %5,1 oranında kromozom anomalisi gözlemlenirken, bu oran azospermik erkek hastalarda %13,7 ve oligozoospermik erkek hastalarda %4,6 civarında saptanmıştır. Yapısal kromozom bozukluğu olan translokasyonlar infertil erkeklerde normal populasyona göre 8.5 kat, inversiyonlar ise 8 kat daha fazla görülmektedir (41,42).

Klinefelter sendromunu da içeren sayısal seks kromozom bozukluklarına da infertil erkek vakalarda sık rastlanmaktadır. Azospermik vakalarda %14 oranında gözlemlenen Klinefelter sendromu, infertil vakalarda normal populasyona göre 30 kat daha fazla görülmektedir (39,42).

ICSI'den sonraki hamileliklerde otozomal trizomi ve seks kromozom anöploidileri yüksek oranda ortaya çıkmaktadır, bunun sebebi kromozomal varyasyon veya dengeli kromozomal yapısal değişiklik (translokasyon vs) taşıyıcısı olguların infertil populasyonda daha yüksek oranda bulunmalarıdır (39,42).

4.1.3.3. Konjenital vaz deferens agenezisine neden olan kistik fibrozis gen mutasyonları:

Kistik fibrozis, kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) genindeki mutasyonlara bağlı, otozomal resesif geçişli genetik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (37,42).

CFTR geni iyon kanalı olarak fonksiyon gören bir membran proteinini kodlamakta ve ejakülatör kanal, seminal vezikül, vaz deferens ve epididimisin distal 2/3'ünün oluşumunu etkilemektedir. Bu nedenle CFTR genindeki mutasyonlar konjenital unilateral ve konjenital bilateral vaz deferens agenezisi ile sonuçlanmaktadır (37,43).

Azospermik olguların %1,4'ünü oluşturan konjenital vaz deferens agenezili hastaların %85' inde CFTR gen mutasyonu tanımlanmıştır (44). Kistik fibrozis hastalarının %65-95'inde vaz deferens agenezisi bulunmuş ve bu hastaların sadece %2-3'ünün fertil olduğu saptanmıştır (45,46).

CFTR geninde meydana gelen ve infertil erkeklerde %19,6 oranında bulunan 5T mutasyonları fonksiyonel olmayan CFTR protein sentezine neden olmaktadır (37,39,46).

5T ve diğer CFTR mutasyonları sperm taşıyan kanalların (vaz deferens) mukusla tıkanmasında ya da tam olarak gelişmemesinde (CBAVD, Konjenital Vaz Deferens Agenezisi) rol oynamaktadır (37,46). CBAVD olan hastaların sekonder cinsiyet karakter gelişimlerinin ve fiziksel görünümünün normal olduğu gözlenmektedir.

4.1.3.4.Sperm fonksiyonlarını direkt olarak etkileyen genetik sendromlar:

Spermatogenezi ve dolayısıyla sperm aktivitesini etkileyen diğer faktörler; Primer Silier Diskinezi, Myotonik Distrofi, Noonan Sendromu, Orak Hücre Anemisi, Genetik Endokrinopatiler, Gonadotropin-Releasing Hormonun (GnRH) üretim veya sekresyon bozuklukları, Prader-Willi Sendromu, Kallman Sendromu, LH ve FSH fonksiyon bozuklukları, Androjen sentez ve fonksiyon bozuklukları olarak sıralanmaktadır (47).

Prader-Willi Sendromu (PWS) şiddetli hipotoni ve erken bebeklik döneminde beslenme zorluğu, bebekliğin son evresi ve erken çocukluk döneminde aşırı beslenme ve obezite ile karakterize edilmektedir. PWS olan erkek ve kadın bireylerde hipogonadizm, genital hipoplasi, eksik pubertal gelişme ve sıklıkla infertilite gözlenmektedir (48).

Kallman sendromu izole hipogonadotropik hipogonadizm ve anosmia ile ilişkili olarak karakterize edilmektedir. Erkek bebeklerde mikropenis ve kriptorşidizm, yetişkinlerde ise hipogonadizm ve seksüel gelişim geriliği gözlenmektedir. Kallman sendromlu yetişkin erkek bireyler, erektil bozukluklara, azalmış libidoya ve infertilite gibi rahatsızlıklara eğilim göstermektedirler (49).

4.2. GAMETOGENEZ

Canlı organizmalarda üreme süreci, anne ve babaya ait kromozomların birleşmesini takiben kendi genetik özelliklerini kazanan zigot ile başlar. Oluşan diploid kromozoma sahip zigot formunun arka arkaya geçirdiği mitoz bölünmeler embriyo denilen ilk canlı taslağının oluşumu ile devam eder. Embriyonik gelişimin ilk aşamalarında, somatik ve germ hücre soyları birbirinden ayrılırlar. Germ hücreleri, embriyonik gelişim sırasında farklılaşmamış gonadlara göç ederek, mitoz ve mayoz bölünme süreçlerine girer. Germ

hücrelerinin olgunlaşması ve kromozom sayılarının indirgenmesi sürecine dişilerde oogenez, erkeklerde ise spermatogenez adı verilir. Sonuç olarak, gelişimin devamlılığında mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri ökaryotik hücrelerde her hücre bölünmesi, DNA sentezinin olduğu ve yaklaşık 8 saat süren bir sentez fazıyla (S) başlar. Bunu yaklaşık 4 saat süren Gap2 (G2) fazı izler. Bu fazda kromozom yapısı diploiddir. Ardından yaklaşık 1 saat süren mitoz fazı (M) gelir. Bu fazda kromozomların görünür hale geldiği profaz ve mitotik iğciğin oluşturduğu metafaz evreleri gerçekleşir. Bunu sürekli bir değişimin olduğu interfaz izler (G1). Bu evrelerin dışında her hücre tipinde görülmeyen ancak, üreme hücrelerinde izlenen G0 fazı vardır. Hücre siklusunun bütün fazları hücre-bölünme siklus genlerinin (cdc), bir grubu tarafından kodlanan özgün proteinler tarafından düzenlenmektedir. Bu proteinler özellikle, G1'den S'ye ve G2'den M'ye geçiş sırasında etkindir (50,51).

Erkek üreme hücrelerinin oluşturduğu spermatogenezin ilk hücresi, diploid kromozoma sahip spermatogoniumdur. Pubertenin başlangıcında spermatogonium, testislerdeki seminifer tubüllerde proliferasyon olarak, spermatosit oluşumuna doğru farklılaşır. Oluşan primer spermatositin mayoz bölünme geçirmesiyle iki adet sekonder spermatosit oluşur. Geçirilen 2. bir mayoz bölünme sonrasında da dört adet spermatid hücresi oluşur. Spermatid geçirdiği matürasyon aşamasından sonra spermatozoa halini alır. İnsanlarda birinci mayozun başlangıcından primer spermatosite kadar olan farklılaşma ve olgun spermatositin oluşumu yaklaşık altı hafta sürer. Bir spermatozoanın matürasyonu ancak dişi üreme kanallarında tamamlanabilmektedir (50).

Gametogenesis ilkel erkek ve dişi hücrelerinin gelişip olgunlaşmasıdır. İkel erkek cins hücrelerinin gelişip olgunlaşmasına spermatogenesis adı verilir. Spermatogenesis bir gelişme olgusu olup farklılaşmamış ilkel erkek cins hücrelerinin ileri derecede farklılaşmış spermiumlara dönüşmesi olayıdır. Spermatogenesis üç aşamada gerçekleşir: Spermatositogenesis, mayoz, spermogenesisdir.

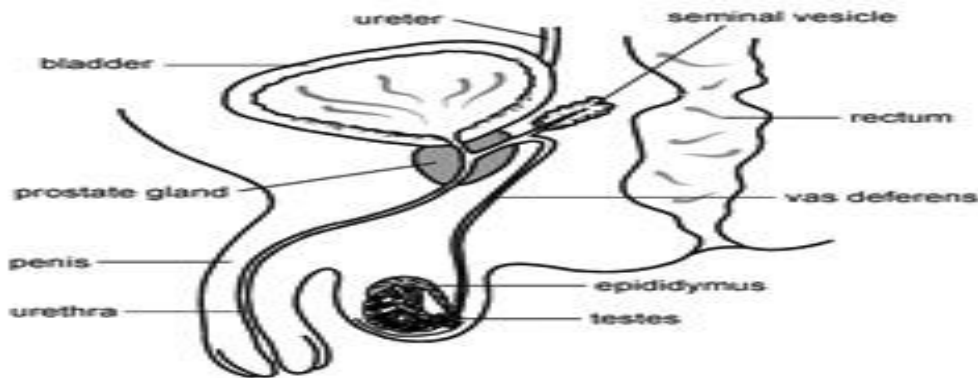
Seminiferüs tubullerin alt tabakasında bulunan spermatogonial kök hücreleri bulunur ve puberta öncesinde spermatogonia olarak ifade edilir. Puberta sonrasında üç temel kategoride sınıflandırılır. Bu sınıflandırma spermatogonia olarak ifade edilir. İlk ikisi farklılaşmamış spermatogonia olarak tanımlanırken diğeri ise olgun spermatozoa oluşturmak üzere spermatogenesis döngüsüne girer (50,51).

Gametogenezde germ hücreleri önce proliferasyon, arkasından hücre siklusunda bir müddet duraklama ve devamında hücre farklılaşması aşamalarını geçirir (52). Doğumdan sonra yeniden çoğalma başlayarak, spermatogonial stem cell'leri oluşturur ve bunlar arasında da bazıları 10. günden itibaren aktifleşerek farklılaşır ve mayoza girer (53).

4.3. GERMİNAL HÜCRELER VE SPERMATOGENEZ

Sperm üretimi oldukça uzun ve karmaşık bir süreçtir. 72 günlük sikluslar halindeki insan spermatogenezi pubertede başlar, yaşam boyunca sürer. Germ hücrelerinin çeşitli aşamalardan geçtikten sonra sperm hücresi haline gelmesi "spermatogenez" olarak adlandırılır. Bu süreç içinde germ hücreleri mayoz bölünme sonrası 46 kromozumlu diploid halden 23 kromozumlu haploid hale gelirler ve yine 23 kromozom içeren haploid yumurta hücresi ile birleşerek yine 46 kromozumlu yeni bir bireyin oluşmasına olanak sağlar. Spermatogenez proliferasyon fazı, redüksiyon-bölünme fazı ve farklılaşma fazı olmak üzere üç aşamada incelenir. Her aşamada hücreler spermatogonia, spermatosit, spermatid gibi farklı isimler alırlar (54, 55,56,57).

Testis dokusu, içinde kan damarları, sinir lifleri ve kas hücreleri içeren bir kapsül tarafından çevrelenmiş (skrotum) bir yapının içindedir. Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerin içinde gerçekleşir. Her bir testis içinde yaklaşık 500 seminifer tübül bulunur ve tek bir tübülün uzunluğu 30-70 santimetredir. Seminifer tübüller testis hacminin yaklaşık %80-90'ını oluştururlar. Bu nedenle testis hacmi kabaca sperm üretim potansiyeli hakkında fikir verir (58,59,60, 61).



Sekil 1-Erkek üreme sistemi anatomik yapısı (54).

Seminifer epitel farklı tip hücre grupları içermektedir. Germ hücreleri sperm yapımından sorumluyken sertoli hücreleri germ hücrelerinin etrafında destek dokusunu oluştururlar. Testislerde bulunan bir diğer hücre türü de erkek seks hormonu olan testosteron yapımını sağlayan Leydig hücreleridir. Seminifer tübül içinde spermatogenezin tüm aşamalarındaki öncül hücreleri bulunur. Farklılaşma fazını tamamlayan hücreler seminifer tübül içine salınırlar. Bu nedenle testisin farklı kesimlerindeki alanlarda gelişimin değişik evrelerindeki sperm üretimi devam eder.

Germinal hücreler; spermatogonyum, spermatosit, spermatid ve spermatozoonlardır (56, 58,61).

Bunlar primordial germ hücrelerinden köken alan gonositlerden kaynağını alırlar. Hem dişide hem de erkekte ilk primordial germ hücreleri 4. haftada endodermal duvarda gelişerek gonad taslaklarına doğru yol alır. Gonadların oluşmasını işaret eden ilk belirtiler 5. haftada başlar. Seminifer tübül bazal membranı üzerinde oturan spermatogonyumlar, küçük diploid germ hücreleridir, puberteye kadar bölünmezler (61,62,63,64). Doğumdan önceki dönemde ortaya çıkan germ hücrelerinde üç tür spermatogonyum gelişir. Bunlar açık tip A (Ap), koyu tip A (Ad) ve B tipi spermatogonyumlardır. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlerle süreklilik sağlar. Yani tip B spermatogonyumların son mitoz bölünmesinden sonra primer spermatositler ortaya çıkar. Gonositlerden üreyen ilkel spermatogonyumun ileri derecede özelleşmiş spermatozoon haline gelinceye kadar geçirdiği sürece spermatogenez denir.

Spermatogonyumlar, açık veya soluk A tipi spermatogonyumlar B tiplerinden daha azdır. Oval veya yuvarlak şekilli bu hücreler her zaman bazal lamina üzerine otururlar. Hücre şekline uyum gösteren yuvarlak veya oval çekirdeği ince kromatinlidir. Genelde tek bir nukleolus görülür. A tipi spermatogonyumların sitoplazmasında organeller dağınıktır. Açık A tipi spermatogonyumlar yedek hücrelerdir. Gerekliğinde spermatogenez başlatmak için devreye girerler (55,56,58,64).

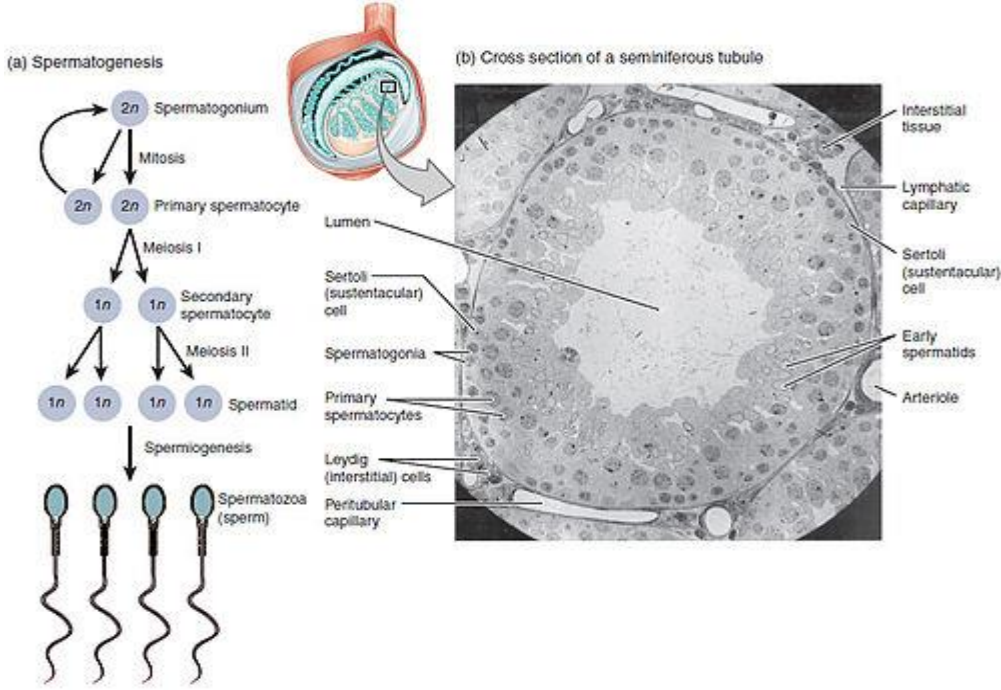
Koyu A tipi spermatogonyumların bir türü de bazal lamina ile bağlantıları en çok olan, uzamış spermatogonyumlar olarak tarif edilmiştir. Bunlar koyu bazofilik boyanan, oval heterokromatik nukleuslara sahip, küçük hücrelerdir (63,64). Seminifer epitelyumun kök ya da rezerv hücreleri olarak değerlendirilirler (63,64,65). Düzensiz aralıklarla bölünerek, hem yeni tip A spermatogonyumları, hem de açık tip A hücreleri meydana getirirler (63,64,65). Sitoplazmik organeller açık tiplerden pek farklı değildir.

Spermatogonyumların en çok bulunan tipi B tipi spermatogonyumlardır. Bunlar da bazal lamina üzerine otururlar. Fakat bazal lamina ile bağlantıları daha azdır. Hücrelerin çekirdeği merkezi olarak yerleşmiş ve yuvarlak şekillidir. Çekirdekte bir ya da iki koyu boyanan çekirdekcik bulunur. Sitoplazmada diğer A tiplerine göre daha fazla ribozom bulunur. Oval yerine yuvarlak olan nukleusları dışında açık tip A spermatogonyumlara benzerler. Mitozla bölünerek primer spermatositleri meydana getirirler. Soluk veya açık A tipi spermatogonyumlar kök hücrelerdir. Bunlar bölünerek hem yeni soluk A tipi spermatogonyumları yaparlar hem de koyu tip hücreleri oluştururlar. Koyu A tipi hücrelerde B tipi hücreleri oluşturmak için bölünürler. B tipi spermatogonyumların son mitotik bölünmelerinden sonra primer spermatositler ortaya çıkarlar. İlk ortaya çıkan primer spermatositlerin uzun profaz dönemleri olduğundan artan bir yoğunlaşma gösterirler. Bu hücreler mayoz bölünmenin preleptoten, leptoten, zigoten, pakiten ve diploten safhalarını geçirerek sekonder spermatositlere dönüşürler. Bunlar da ikinci bir mayoz bölünme geçirerek haploid kromozom setine sahip olan spermatidleri oluştururlar. Spermatidler herhangi bir bölünme geçirmeden, bir seri değişiklikler geçirerek spermatozoonu, onlar da tipik şekilli eriskin spermleri meydana getirirler. Spermatositler de birbirleri ile sitoplazma köprüleri aracılığı ile bağlıdırlar. Bu özellikler spermatidlerde de devam eder. Böylece kardeş hücrelerle birlikte davranmak için fiziksel bir süreklilik sağlanır (55,57,63,64,65).

B tipi spermatogonyumlar, mayoz bölünme geçirecek olan spermatositlere dönüşürler. Spermatidler spermatositlerin ikinci mayoz bölünmelerinden sonra haploid kromozoma sahip spermatidler oluşur. Erken dönemde spermatidler nispeten küçük, küresel şekilli hücrelerdir. Nukleusları ince kromatinlidir, arada yoğun kromatin yumakları vardır. Nukleus kısa sürede daha da küçülür. Sitoplazmada dağınık düz endoplazmik retikulum, küçük ve periferde dizili, yuvarlak, kristası belirgin olmayan mitokondriyumlar ve iyi gelişmiş golgi kompleksi görülür. Granüllü endoplazmik retikulum azdır. Küçük ve hücre zarı altında dizilmiş mitokondriyumlar spermatid sitoplazmasının tanınmasını kolaylaştırır (55,56,57,63,64,65).

Nukleus yakınında tipik, kitle halinde kromatin cisimciği görülür. Bu yapı düzensiz, koyu, fibrilli ve granüllü sahalar içerir, ribonükleoproteinden zengindir. Çekirdek ve sitoplazmasında bir seri değişiklikler gösteren spermatidde, birbirini takip eden fazlar izlenir. Spermatid olgunlaşması sırasındaki değişiklikler türlere göre farklılıklar gösterse

de genel özellikleri ile hemen hemen aynıdır. Spermatiddeki değişiklikler sonucu oluşan türe özgü genetik özellikleri taşıyan hücre spermiumdur (55,58,64,65).



Şekil 2: Spermatogenes ve Seminifer Tübül (64).

4.4. LİM15 /DMC1 GENİ

Sperm hücreleri mayoz bölünme ile çoğalan hücreler olup mayoz bölünmenin testis dokusunda aktif olduğunun gösterilmesi azospermik erkeklerde sperm oluşumunun olup olmadığı ile ilgili önemli bir belirteçtir. Bu anlamda mayoz bölünmede görev alan proteinlerin belirlenmesi sperm üretimi ile ilgili önemli bulgular vermektedir (66).

DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar (67). DNA tamir mekanizmasında görevli olan proteinlerden olan *RecA* proteini rekombinasyonel bir değiş tokuş işlemi ile hasarsız komplementer zincirde bulunan diziyi transfer eder. Ökaryotlarda iki tip *Rec A* gibi rekombinasyon yapan protein mevcuttur: *Lim15* ve *Rad51*. Bunlardan *Rad51* hem mayotik hem de somatik hücrelerde eksprese olur ve DNA tamir mekanizmasında fonksiyonu vardır. *Lim15* ise mayoz aşamasında rekombinasyona dayalı DNA sentezinde görev alan bir proteindir. Ökaryotlarda yapılan çalışmalar *Lim15*

proteinin sadece mayoz bölünmeye spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiş ve *Lim15* proteinin *RAD51* proteini ile mayoz aşamasında işbirliği yaptığını ortaya çıkarmıştır.(4,68,69).

Lim15 proteini mayoz aşamasında DNA sentezinde ve mayotik rekombinasyonda görevli olan bir proteindir. PCNA hem somatik hücrelerde hem de mayotik hücrelerde ifade edilmektedir. Bu iki proteinin ifadesi mayoz bölünme için kritik bir öneme sahiptir. PCNA ifadesi yeni bir çalışmada hastaların gonadotropin tedavisine cevap verip vermediğini tespit etmek için de kullanılmıştır. *Lim15* ve *Pcna* ifadesi incelenerek hastaların gonadotropin tedavisine tepki verip vermediği hakkında bir kaniya varılabilir (4,70).

4.5. GEN VE GEN İFADESİNİN DÜZENLENMESİ

Gen, bir kromozomun belirli bir kısmını oluşturan nükleotid dizisidir. Kromozomun kesitleri olan genler birbirinden çok farklı işlevlerde ve büyüklüklerde (uzunluklarda) olabilirler. Genlerin büyüklükleri ve işlevleri her zaman doğru orantılı değildir (71).

Gen, genom dizisinde yeri tanımlanabilen, transkripsiyonu yapılan, düzenleyici ve/veya fonksiyonel bölgeleri olan bir bölgedir (72,73). Gen regülasyonu ve transkripsiyonun karmaşıklıklarını içeren, yeni ve öz bir tanıma göre gen; aynı sınıftan (protein veya RNA) işlevsel ürünler şifreleyen, potansiyel olarak birbiriyle örtüşen, genom dizilerinin birleşimidir (74).

Gen yapısı; 5' translasyona uğramayan bölge açık okuma çerçevesi ve bir 3' translasyona uğramayan bölge içerir (75). 5' UTR bölgesinde bulunan promoter kısmı gelişimsel ve dokuya özel kontrol altındadır ve geni çalışır duruma getiren bölgedir. Yine 5' UTR bölgesindeki düzenleyici bölgenin geni aktive etmek, düzenlemek ve transkripsiyonu belirlemek gibi görevleri vardır.

Gen ifadesinin düzenlenmesi ya da gen ifadesinin denetimi, hücrelerin ve virüslerin genlerindeki bilgiyi gen ürünlerine çevirmesini kapsayan süreçler için kullanılan bir terimdir. İşlevsel bir genin ürünleri RNA veya protein olabilir. Bilinen mekanizmaların en temeli protein kodlayan genlerin düzenlenmesidir (76). Gen düzenlenmesi, hücrenin ihtiyacı olduğunda proteinlerin sentezlenmesine izin vererek bir

canlının değişkenliğini ve uyumunu artırabildiği için; virüsler, prokaryotlar ve ökaryotlar için gerekli bir işleyiştir.

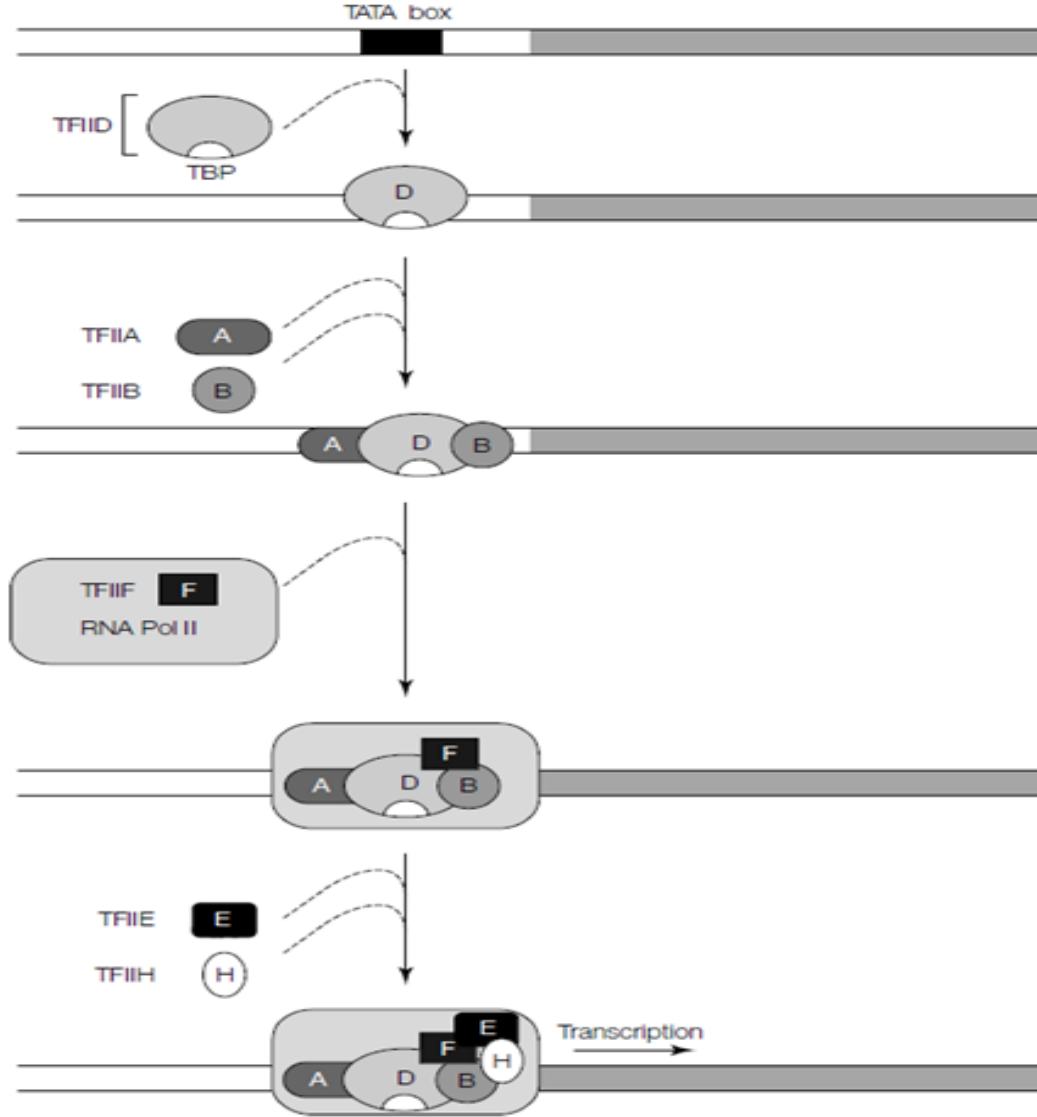
Genden polipeptide doğru birçok basamak bulunmaktadır. Bir genin transkripsiyonun başlaması regülatör elemanların promotör'ün ve bölgedeki özgül dizilerle ilişki kuran transkripsiyon faktörleri denilen proteinlerin etkisi altındadır. Bir genin transkripsiyonunu kodlayan dizinin 5' ucundaki kromozomal DNA da bulunan transkripsiyon başlangıç bölgesi ile başlar ve kromozomda ekzon ve intronlar boyunca kodlayan dizilerin sonuna kadar birkaç yüz baz çiftinden bir milyondan fazla baz çiftine kadar devam eder. Primer RNA transkriptinin 5' ve 3' modifikasyonlarından ve introna karşılık gelen kısımların çıkartılmasından sonra ekzona karşılık gelen parçalar birleştirilir. Buna splicing adı verilir. RNA splicing ten sonra oluşan mRNA nükleustan stoplazmaya taşınır ve kodlanmış olan polipeptidin aminoasit dizisine çevrilir. Bu karmaşık işlemin her evresi hataya açıktır. Ökaryotlarda gen anlatımı şu aşamalarda gerçekleşmektedir (76,77):

- Transkripsiyon
- Translasyon
- Translasyon sonrası modifikasyon

4.5.1. Transkripsiyon

Transkripsiyon (yazılma - yazılım), DNA'yı oluşturan nükleotit dizisinin RNA polimeraz enzimi tarafından bir RNA dizisi olarak kopyalanması sürecidir. Protein kodlayan DNA durumunda, transkripsiyon, DNA'da bulunan genetik bilginin (bir mesajcı RNA aracılığıyla) bir protein veya peptit dizisine çevirisinin ilk aşamasıdır. RNA'ya yazılan bir DNA parçasına "transkripsiyon birimi" denir (76,78). Transkripsiyonun başlaması için RNA polimeraz II genel transkripsiyon faktörleri adı verilen proteinlerin yardımına ihtiyaç duyar. Transkripsiyon faktörleri olmadan RNA polimeraz II ökaryotik promotör bölgesine doğrudan bağlanamaz ve transkripsiyonu başlatamaz. Transkripsiyon faktörleri TFII genel ismine sahiptirler ve TFIIA, TFIIIB ve TFIIID şeklinde adlandırılmışlardır. Transkripsiyonun başlamasındaki ilk olay TFIIID protein kompleksinin TATA kutusuna bağlanmasıdır. TFIIID bir multi-protein kompleksidir ve sadece kompleks içerisinde bir polipeptit olan TBP ,TATA kutusuna bağlanır (78,79). DNA ya TFIIID 'nin bağlanması gerçekleştikten sonra sırasıyla TFIIA ve TFIIIB ye bağlanır. Bu aşamada TFIIIF

ile kompleks oluşturmuş olan RNA polimeraz II bağlanır ve bu bağlanmayı TFIIE, H ve J gibi diğer üç transkripsiyon faktörü hızlı bir şekilde komplekse bağlanır. Bu protein kompleksi transkripsiyon başlama kompleksi olarak adlandırılır (76,79).



Şekil 3: Transkripsiyon ve Transkripsiyon faktörleri bağlanma aşamaları (76)

4.5.1.1.Zincir uzaması ve sonlanması

RNA zincirinin uzaması, sonlanma gerçekleşinceye kadar devam eder. RNA polimeraz II tarafından bir protein kodlayan genden sentezlenen RNA molekülü öncül transkript olarak adlandırılır. Prokaryotlardaki durumun aksine ökaryotik protein kodlayan genin

öncül transkripti translasyona hazır olgun mRNA oluşturmak için RNA işlenmesi işlemine tabi tutulur (80,81).

4.5.1.2. RNA işlenmesi

Transkripsiyon sonucu mRNA, tRNA ve rRNA gibi çeşitli tipte RNA molekülleri üretilir. Ökaryotlarda mRNA, RNA polimeraz II enzimi tarafından uzun bir öncül olarak (öncül-mRNA) sentezlenir. RNA işlenmesi öncül RNA'nın olgun RNA'ya dönüştürülmesi işlemidir. Bu işlem RNA ya başlık yapısının takılması, poliadenilasyon ve RNA splicing işlemlerini içerir (82).

4.5.2. Translasyon

Translasyon, transkripsiyon sonucu oluşan mRNA'lardaki koda uygun olarak ribozomlarda gerçekleştirilen aminoasit zinciri veya polipeptit sentezi sürecidir, daha sonra üretilen amino asit zinciri veya polipeptit uygun bir şekilde katlanarak etkin bir protein haline gelir. Translasyon, protein biyosentezinin ilk aşamasıdır (83).

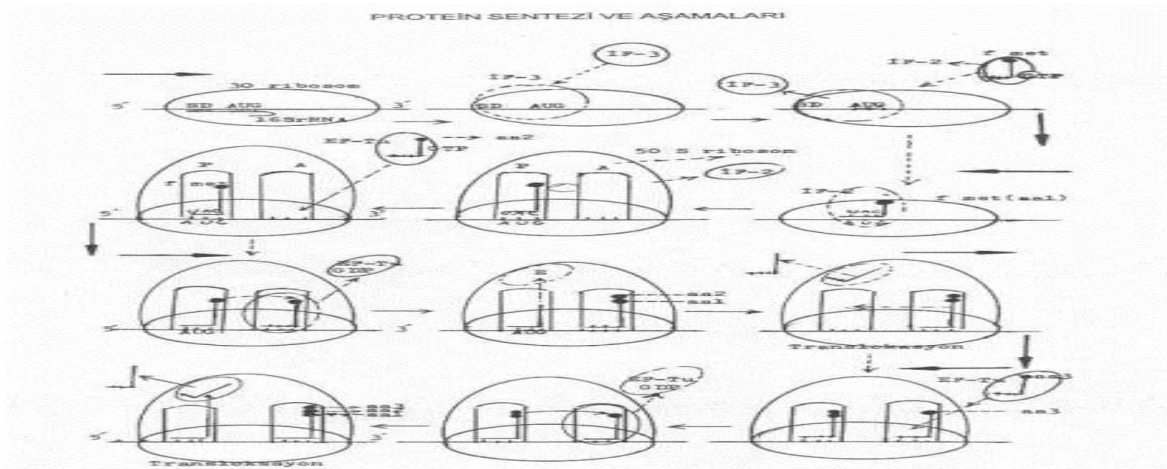
Translasyon hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir. Sitoplazmada bulunan iki ribozom alt birimi translasyon sırasında mRNA zincirinin 5' ucuna bağlanır. Ribozom üzerindeki bağlanma bölgelerinde, mRNA'daki baz üçlülerini (kodon) tRNA'daki tamamlayıcıları olan antikodonlara bağlar. mRNA'daki kodonlara karşılık gelen antikodonu bulunduran tRNA'ların art arda eklenmesi sırasında tRNA'nın 3' ucuna bağlanmış olan amino asitler birbirine bağlanarak polipeptit zincirini oluşturur. Translasyon üç aşamada gerçekleşir: başlama, uzama ve sonlanmadır (84).

4.5.2.1. Başlama

Translasyon (protein sentezi), ökaryotlarda metionin ile başlamaktadır. Protein sentezini başlatmada özel tek bir tRNA görev yapar ki o da formilize olmuş metionini taşıyan f-met tRNA'dır. Bu transfer RNA, aynı zamanda, kendi antikodon bölgesindeki bazlar (UAC) yardımıyla, mRNA üzerinde sırada bulunan ve metioninin kodonu olan AUG'yi tanıyarak kovalent olarak bağlanır. Hücrelerde, genellikle, iki tür tRNA, metionini spesifik eder. Bunlardan biri, internal pozisyonda bulunan metionini tanır ve onunla

bağlanır (met tRNA). Diğeri ise, formilize olmuş metioninle bağ kurar (f-met tRNA). Ancak, bunlardan sadece f-met tRNA başlatmada rol alır ve önem taşır. Aynı zamanda, başlatma faktörleri (IF), f-met tRNA'yı, ve uzatma faktörleri de (EF), met tRNA'ları tanırlar (85).

30 S ribozomal serbest alt ünite önce başlatma faktörü (IF-3) ile bağlanır. Bu faktör, 30 S'lik alt ünitenin, mRNA'nın 5' -ucuna ve AUG kodonuna bağlanmasını güven altına alır. IF-3 olmadan 30 S alt ünite mRNA ile bağlanamaz. Böylece, 30 S'lik alt ünite mRNA'nın 5' -ucundaki AUG kodonu ile bağlanmış ve protein sentezi için güvenli ilk adım atılmış olur. Bu aşamadan sonra, başlatma faktörlerinden olan IF-2, f-met tRNA ile bağlanarak bunu, ribozoma getirmede görev alır. Bununla beraber, reaksiyonda gerekli olan enerjiyi sağlayacak olan GTP'de ribozoma getirilir. F-met tRNA gelmeden ve 50 S'de birleşmeden önce, görevi sona eren IF3 ayrılır ve hidrolize olan GTP'de GDP'ye dönüştürülür. mRNA, 30 S'lik küçük alt ünite ile birleştikten sonra IF-3 hemen ayrılır. 30 S alt ünite de P-bölgesinde sırada bulunan ve IF-2 ile bağlanmış olan f-met tRNA'nın antikodon bölgesindeki bazlar (UAC), mRNA'da sırada bulunan kendine ait olan kodon (AUG) ile birleşir. Bu iki bölge birbirine komplementerdir. Böylece, P-bölgesinde f-met tRNA 1. amino asiti (aa1) ve A-bölgesini de 2. amino asiti (aa2) taşıyan tRNA işgal etmiş olur. Bundan sonra, P-bölgesindeki f-met ile, A-bölgesinde tRNA'ya bağlı bulunan 2. amino asit arasında peptid bağı kurularak P bölgesindeki aa1 (f-met) A-bölgesine transfer edilir ve aa1 ile aa2 birleşir. Bu suretle, A-bölgesinde tRNA'nın 3' -CCA ucunda iki amino asit bağlı bulunmuş olur. İki amino asit arasında peptid bağının kurulmasını peptidil transferase enzimi katalize eder (86).



Şekil 4: Protein sentez ve aşamaları (86).

Başlatma kompleksi oluştuktan sonra ikinci amino asitin kodonla birleşmesi, zincir uzamasının ilk adımını da oluşturur. Bu periyot başlıca 3 kısımdan meydana gelir (86).

4.5.2.1.1. Kodon tanıma: Bu aşamada, yukarıda belirtildiği gibi mRNA üzerinde sıraya giren ve üç bazdan oluşan kodonla bu kodonun temsil ettiği amino asitle birleşen tRNA'nın antikodon bölgesi arasında, bunların komplementer olması nedeniyle, karşılıklı bağlar kurulur (87).

4.5.2.1.2. Translokasyon: 70 S'lik ribosomda P- ve E-bölgeleri boşaldıktan sonra, A-bölgesinin de boşalması ve buraya 3. amino asiti bağlayan tRNA'nın gelmesi gerekir. Bunun için, A-bölgesinin serbest kalması lazımdır. İşte bu önemli olay, 70 S'lik ribozomun mRNA üzerinde bir kodon boyu kayması (5' - 3' yönde) ile gerçekleşir. 70 S'lik ribozom, mRNA üzerinde sadece bir kodon boyu kaydığında A bölgesi, mRNA üzerindeki bitişik, yeni bir amino asitin kodonuna gelmiş olur. Böyle bir hareket olurken, P bölgesindeki AUG kodonuna bağlı olan ve amino asit taşımayan tRNA dışarı itilerek serbest kalır ve AUG kodonundan ayrılır. Serbest kalan tRNA önce 50 S alt ünite üzerindeki E bölgesine gelir ve buradan da diğer bir amino asitle bağlanmak için tekrar sitosola döner. Bu kodona ait amino asitleri, aminoasıl sentetaz aktive ederek kendine ait tRNA ile bağlar. Bundan sonra, EF-Tu ve GTP ile bağlanan aminoasıl tRNA kompleksi, kodonla birleşir (88,89). Ribozomlar, aynı anda, hem EF-Tu ve hem de EF-G ile ilişkili kuramazlar. Bu faktörler ribozomlara sıra ile bağlanırlar. Birinin fonksiyonu bitip kompleksten ayrılırken diğeri, reaksiyona katılır (89).

4.5.2.1.3. Transpeptidasyon: Transpeptidasyon, peptidil bölgesindeki tRNA'ya bağlı amino asitler ile A-bölgesindeki yeni gelen, tRNA'daki amino asitin karboksil ve amino terminal uçları arasında peptid bağı kurulması olayıdır. Bu reaksiyonu peptidil transferase enzimi katalize eder. Bu reaksiyon sonunda, P-bölgesindeki amino asitler, A-bölgesindeki yeni gelen amino asitle birleşirler (90). Böylece zincir uzaması devam eder. Her translokasyonda sıraya bir amino asit katılmış olur.

4.5.2.2. Bitiş (terminasyon)

Protein sentezini sonlandırmada mRNA üzerinde 3 kodon etkili olur ve bunlara terminasyon kodonları (stop kodon) adı verilir (UAG, UAA ve UGA).

Eğer, mRNA üzerinde bulunan bu kodonlardan biri A-bölgesine gelirse, polipeptid zincirine herhangi bir amino asit ilave edilemez. Çünkü, bu kodonların karşılığı olan spesifik bir amino asit ve tRNA yoktur. Böylece sentez durur. Fakat, polipeptid henüz mRNA'dan ayrılmış değildir. Polipeptidin tRNA'dan ayrılması, moleküle suyun ilavesi ile (hidrolizasyon) gerçekleştirilir (91).

4.6. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntem ile çok az miktarda RNA ile oluşan mesajlar saptanabilir, ekspresyon miktarı da tesbit edilebilir. Oluşan RT-PCR ürünleri klonlamada vektör olarak kullanılabilir, bu ürünlerden cDNA kütüphaneleri oluşturulur ki bunlar daha sonra gen kütüphaneleri olarak değerlendirilir. RNA analiz tekniklerinden; RNA hibridizasyonu, RNaz koruma yöntemleri, in situ hibridizasyon ve SI nükleaz yöntemleri ile kıyaslandığında daha hassas, hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntemdir (92).

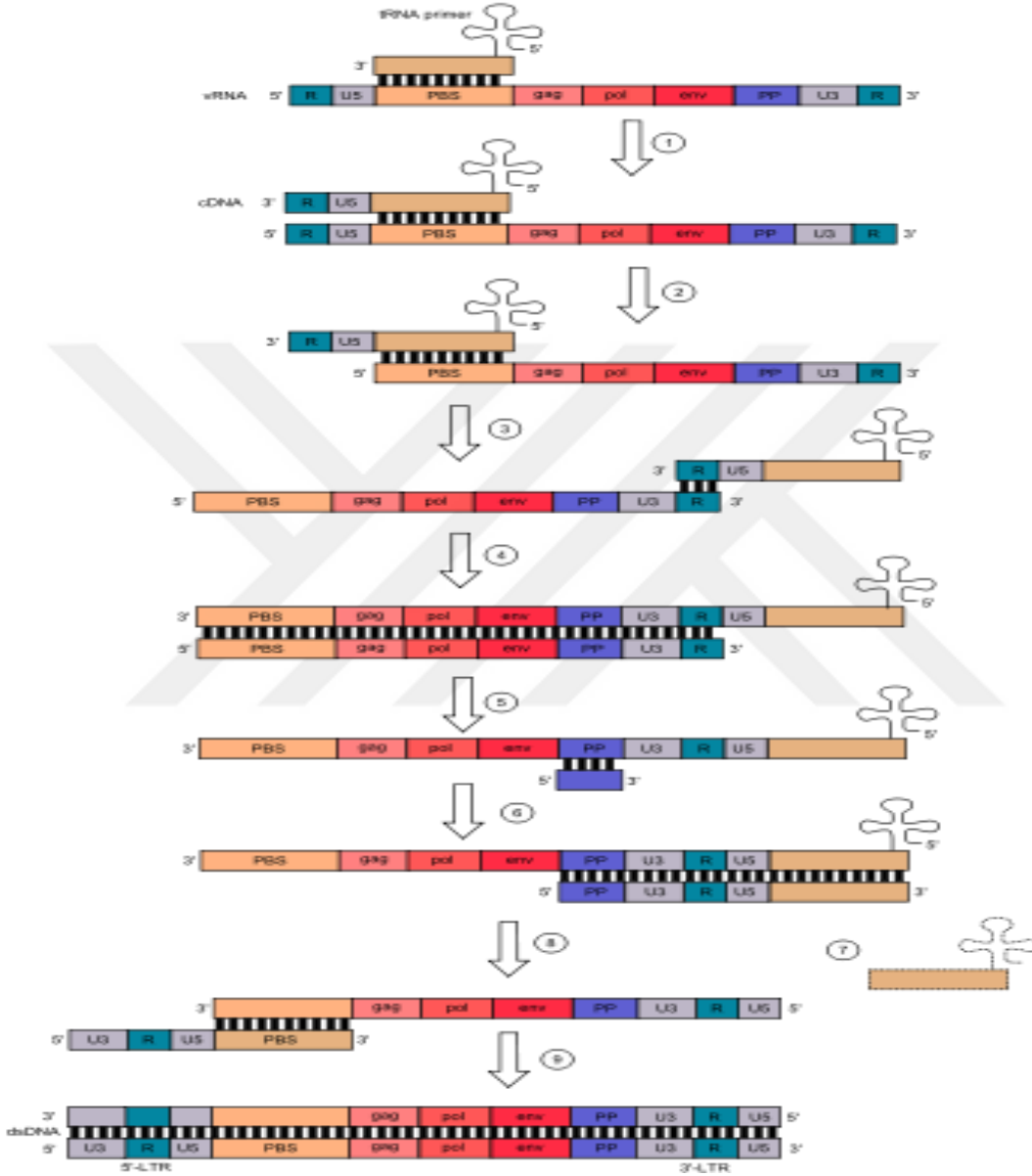
Ters transkriptaz RNA'nın çift sarmallı DNA'ya çevrilmesini katalize eden enzimdir. Bunun için DNA polimeraz ile beraber RNA'dan bir RNA-DNA hibritleşmesinden oluşan çift sarmallı molekülü sentez eder. Bu molekülden RNA ipliği ayrılır ve DNA kalıp ipliği oluşur. Ters transkriptaz bu kalıp ipliği çift sarmallı DNA'ya tamamlar (93,94,95).

mRNAlar tek iplikli yapılarından dolayı RNaz enzimlerince çok çabuk parçalanırlar. Bu nedenle DNA karşılıkları olan cDNA lara çevrilirler ve bu halde kullanılırlar. Bir hücreden izole edilmiş mRNA lar sentezlenen cDNA kopyaları klonlanarak cDNA kütüphaneleri oluşturulabilir (94,95).

Ters transkripsiyon bir RNA kalıptan tek zincirli bir DNA sentezlenmesidir, buna RNA yönlendirmeli DNA sentezi (RNA-directed DNA syntesis) de denir. Çoğu ters transkriptaz enziminde bu etkinliğe ek olarak DNA yönlendirmeli DNA sentez yeteneği de olur (95).

DNA'ya bağımlı DNA polimeraz etkinliği olmayan, ters transkriptazlı virüslerde iki iplikli DNA'nın oluşturulması konak hücre tarafından kodlanan DNA polimeraz tarafından

mümkün olur. Bu enzim, viral DNA-RNA kompleksindeki RNA'yı bir primere benzetip iki iplikli bir DNA sentezler, bu süreç sırasında yeni sentezlenen DNA orijinal RNA kalıbı yerinden çıkarır (96,97).



Şekil 5: Ters Transkriptaz ve aşamaları (95).

4.7. MAYOZ BÖLÜNME VE LİM15/DMC1 GENİ

Mayoz bölünme aşamasında birçok proteinin görev aldığı bilinmektedir. Bu proteinlerin en önemlilerinden biri olan *Lim15* mayoz aşamasında rekombinasyona dayalı DNA sentezinde görev alır. Ökaryotlarda Yapılan çalışmalar *Lim15* proteinin sadece mayoz bölünmeye spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiş ve *Lim15* proteinin *RAD51* proteini ile mayoz aşamasında işbirliği yaptığını ortaya çıkarmıştır. Bu iki proteinin ifadesi mayoz bölünme için kritik bir öneme sahiptir (4).

Mayoz diploid hücrelerin haploid gamet hücrelerini vermek üzere bölünmeleridir. Mayoz bir tur DNA sentezini takiben iki tur kromozom segregasyonu ve hücre bölünmelerinden oluşur. Mitozdan farklı olarak; kromozom sayısının yarıya düştüğü spesifik bir hücre döngüsüdür. Üreme hücrelerinde meydana gelir. Her bir kromozom çiftinden sadece bir tanesini taşıyan hücreler meydana gelir. Mayoz bölünmede bir diploid nükleusun birbirini takip eden 2 nükleer bölünmesi sonucu dört haploid nükleus oluşur (98). Mayoz birbirini izleyen 2 hücre döngüsünden ibarettir;

a. Mayoz I

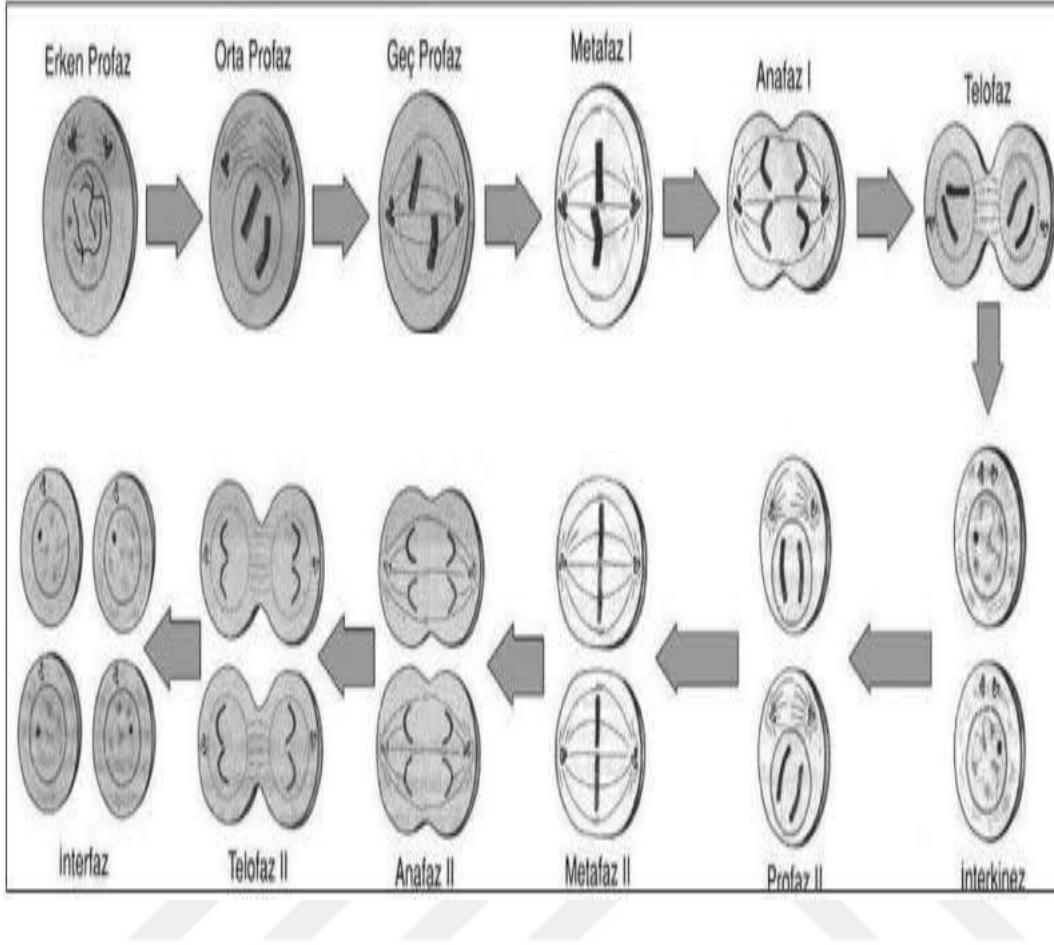
b. Mayoz II

Mayoz I, mitoz benzer şekilde S döneminden sonra başlar. Parental kromozomlar kardeş kromatidler oluşturmak üzere replike olurlar. Ancak mayoz I'de kromozom ayrılması mitozdan farklıdır. Homolog kromozomlar birbirleriyle çift oluştururlar ve ardından yavru hücrelere ayrılırlar. Oluşmuş olan kardeş kromatidlerde bir ayrılma gözlenmez. Mayoz I, her bir kromozom çiftinden bir tane olacak şekilde sonlanır. Mayoz I'i mayoz II izler. Bu dönem mitoz benzer. Kardeş kromatidler birbirinden ayrılır ve yavru hücrelere geçer. Mayoz II, 4 tane yavru hücre oluşumuyla sonlanır. DNA replikasyonunu takiben oluşan homolog kromozomların çift oluşturması mayotik kromozom ayrılmasının sadece anahtar olayı olmayıp paternal ve maternal kaynaklı kromozomlar arası rekombinasyona da olanak tanır (99). Bu olay mayoz I'in profaz döneminde meydana gelir. 5 döneme ayrılır;

1. Leptoten
2. Zigoten
3. Pakiten
4. Diploten

5. Diakinez

Bu dönemler kromozomların morfolojisine göre yapılmıştır. Homolog kromozomlar arası ilişkinin leptoten döneminde komplementer DNA dizileri arasındaki bazların çiftleşmesiyle sağlandığı düşünülmektedir. Zigoten döneminde ise homolog kromozomlar arası yakın bir ilişki başlar. Bu temas bölgesine sinapsis adı verilir. Bu dönemde çift oluşturmuş kromozomların uzunluğu boyunca fermuar benzeri sinaptomenal kompleks adı verilen bir protein yapısı meydana gelir (100,101). Bu kompleks homolog kromozomları birbirleriyle yakın ilişkiye sokar ve pakiten döneminde bunlar uzun bir süre devam edecek şekilde yan yana diziliş gösterirler. Homolog kromozomlar arasında rekombinasyon, pakiten döneminde meydana gelen bu yakın ilişki sayesinde gerçekleşir (102). Kromozomlar, çaprazlaşmaların olduğu kiazmata adı verilen noktalarda birbirlerine bağlı olarak kalırlar (103). Bu durum kromozomların metafazda doğru bir şekilde dizilmeleri için gereklidir. Bu dönemde her bir kromozom çifti (bivalent) 4 kromatidden ibarettir. Diakineзде metafaza geçiş olur ve kromozomlar tam olarak kondanse olurlar. Metafaz I'de bivalent kromozomlar iğsi iplikçikte dizilirler. Mitozun aksine kardeş kromatidlerin kinetokorları birbirine komşu durumdadırlar ve aynı doğrultuda yönelmişlerdir. Homolog kromozomların kinetokorları ise iğsi iplikçiğın zıt kutuplarına doğru yerleşiktir. Sonuçta; aynı kutuptan kaynaklanan mikrotübüller kardeş kromatidlerle temas ederken, zıt kutuplardan gelen mikrotübüller homolog kromozomlara temas ederler. Anafaz I, homolog kromozomların birleştiği kiazmatanın bozulmasıyla başlar. Bunu takiben homolog kromozomlar birbirlerinden ayrılırken, kardeş kromatidler sentromer kısımlarından bağlantılı olarak kalırlar. Mayoz I'in tamamlanmasında her bir yavru hücre kardeş kromatidlerinden ibaret bir çift homolog kromozomun bir tanesine sahip olur (104,105). Mayoz II, sitokinez sonrasında kromozomlar tamamen kondanse olmadan hemen başlar. Mayoz I'in tersine; mayoz II, mitozu benzer. Kromozomlar, metafaz II'de kardeş kromatidlerin kinetokorlarına temas edecek şekilde iğsi iplikçiğın zıt kutuplarından gelen mikrotübüllerle iğsi iplikçik üzerinde dizilirler. Kardeş kromatidlerin sentromerleri arasındaki bağlantı anafaz II'de bozulur ve kardeş kromatidler zıt kutuplara ayrılırlar. Bu olayı sitokinez izler ve haploid sayıda yavru hücre oluşur (106).



Şekil 6: Mayoz Bölünme ve Aşamaları (106).

5.METARYEL METHOD

5.1 HASTALAR VE KONTROL GRUPLARI

Bu çalışmada azospermi teşhisi koyulmuş 30 infertil hastadan TESE operasyonu sonucu alınan testis dokuları kullanılmıştır. Söz konusu hastalar TESE operasyonu geçirmiş fakat alınan testis dokusunda sperm hücresi bulunamamıştır. Diğer bir grubu ise kontrol grubu oluşturmaktadır. Kontrol grubu; obstrüktif azospermik bireylerdir. Bu gruptaki bireylerde TESE operasyonu geçirmiş ve alınan testis dokusunda sperm hücresi bulunan 4 erkek bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubunu oluşturmak için TESE operasyonu geçirecek olan obstrüktif azospermik bireyler seçilmesinin nedeni sağlıklı bireylere TESE operasyonu uygulanmak istenmemesidir. Bu nedenle tüp bebek kliniğine infertilite nedeniyle başvurmuş olan obstrüktif azospermi teşhisi konmuş erkek bireyler seçilmiştir. Her iki gruptan da TESE operasyonu üroloji uzmanı tarafından steril ortamda gerçekleştirilmiş ve alınan dokular -80 °C de saklanarak yeteri kadar örnek toplandığında RNA izolasyonu yapılmıştır.

5.2. YÖNTEM

5.2.1. Dokuların Toplanması ve RNA İzolasyonu

Azospermi teşhisi konmuş infertil hastalardan TESE operasyonu ile alınan dokular – 80 °C de bekletilip, yeteri sayıda örnek toplandığında RNA izolasyonu yapılmıştır. Yöntem dokuların lisis solüsyonu ile parçalanıp fenol yardımıyla RNA'nın ekstrakte edilmesine dayanır. RNA izolasyonunda kullanılan malzeme ve yöntemler aşağıda gösterilmiştir.

Malzemeler :

1.TESE dokusu: Yaklaşık 50 mg donmuş doku sıvı azot ile soğutulmuş havanda iyice dövülür. Üzerine 600 µl Lysis Buffer (içinde 1:100 2-mercaptoethanol olmalı) ekleyip homojenize edilir. Lysis bufferda homojenize edilmiş dokular dondurulabilir.

RNA Lysis Buffer	300 µl	600 µl
Hücre	5×10^6	$>5 \times 10^6$
Doku	< 20 mg	≤ 50 mg

Tablo 2: Hücre ve dokularda RNA liziz buffer miktarları.

2. Lysis bufferda olan örneğe 300 µl (%95-100) etanol eklenir ve karıştırılır.
3. Karışım kolona aktarılır ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
4. 400 µl RNA Wash Buffer kolona eklenir ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir. Tüpteki sıvı boşaltılır.
5. Hazırlanmış 80 µl Dnase karışımı (5 µl DNase 1, 8 µl 10x Buffer, 3 µl Dnasefree su, 64 µl RNA Wash Buffer) kolonun tam ortasına eklenir ve oda sıcaklığında 15 dakika inkube edilir.
6. 13000 rpm’de 1 dakika çevrilir. Tüpteki sıvı boşaltılır.
7. Kolona 400 µl RNA PrepBuffer eklenir, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir. Tüpteki sıvı boşaltılır.
8. Kolona 700 µl RNA Wash Buffer eklenir, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir. Tüpteki sıvı boşaltılır.
9. Kolona 400 µl RNA Wash Buffer eklenir, 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir. Tüpteki sıvı boşaltılır.
10. Kolon yeni bir 1.5 ml tüpe aktarılır ve kolonun tam ortasına 30 µl Dnase/ Rnase free su eklenir. 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir ve RNA -20 °C de saklanır.
11. cDNA sentezi öncesinde Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA) ile RNA miktarı ölçülür ve cDNA sentezinde yaklaşık olarak 500 ng RNA kullanılır.

5.2.2. cDNA Sentezi

RNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi için cDNA'ya çevrilmesi gereklidir. mRNA'lar tek iplikli yapılarından dolayı RNaz enzimlerince çok çabuk parçalanırlar. Bu nedenle laboratuvar şartlarında çalışılmaları daha zordur ve mRNA molekülleri DNA karşılıkları olan cDNA'lara çevrilirler. cDNA, mRNA'ların izole edildiği dönemde aktif olan genler hakkında bilgi verir. Komplementer DNA (cDNA), mRNA'dan sentezlenen DNA kopyasıdır. Bu reaksiyonda ters transkriptaz enzimi kullanılır. Ters transkriptaz RNA

bağımlı bir DNA polimerazdır. Yani diziyi bir RNA kalıbı olmadan sentezlemeye başlayamaz. RT-PCR yönteminde kalıp olarak kullanılan RNA, ters transkriptaz enzimi ile komplementer DNA'ya çevrilir.

Reaksiyon İçeriği :

	1x	6x
DEPC-treatedwater*	7 µl	42 µl
Oligodt	1 µl	6 µl
dNTP 10mm	1 µl	6 µl
5x RT Buffer	4 µl	24 µl
RibosafeRNaseInhibitor	1 µl	6 µl
TetroReverseTranscriptase (200u/µl)	1 µl	6 µl
RNA	5 µl	x µl
	20 µl	-

Tablo 3 : cDNA sentez reaksiyonunun bileşenleri

Bir adet tüpe enzim (Tetro Reverse Transcriptase) hariç diğer tüm bileşenler eklenir ve RT- olarak kullanılır.

DEPC- treatedwater : RNA ile kullanıma uygundur. % 0,1 ' lik DEPC ile birlikte hazırlanmıştır.

Program:

- 45 °C de 30 dakika
- 85 °C de 5 dakika
- 4 °C ∞

5.2.3. Real-Time PCR

Real-time PCR teknolojisi DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve çoğaltım ürünlerinin miktarının tek bir tüpte tespit edilebilmesini sağlayan bir yöntemdir. Floresan ışımaya teknikleri kullanılarak Konvansiyonel 'PCR' yöntemi geliştirilmiş ve oluşturulan bu yeni teknik gen fonksiyonlarının tespit edilmesi çalışmalarına hız kazandırmıştır.

Reaksiyon bileşenleri:

cDNA 1/4 oranında seyreltilir (5 µl cDNA + 20 µl PCR suyu).

Bileşenler	Hacim	Son konsantrasyon	10x
2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix	10 µl	1x	100 µl
10 µm Forward Primer	0.8 µl	400nm	8 µl
10 µm Forward Primer	0.8 µl	400nm	8 µl
cDNA	2 µl	x	x
H ₂ O	6,4 µl	x	64 µl

Tablo 4: Real-time PCR' de kullanılan bileşenler ve miktarları.

- 18 µl mix + 2 µl CDNA
- Her bölge için (Lim 15, PCNA ve ACTB) için 3x mix hazırlanır.

6. BULGULAR

6.1.RNA İZOLASYONU SONRASI LİM15 GEN MİKTARI VE PCNA MİKTARLARININ KARŞILAŞTIRILMALARI

Hasta ve kontrol grubundan alınan doku örneklerinden RNA izolasyonu yapılmış ve *Lim15* geninin ekspresyon miktarları hesaplanmıştır. Daha sonra PCNA dönüşümü yapıp her iki grupta da ekspresyon miktarları hesaplanmış ve karşılaştırma yapılmıştır. Hasta gruptaki *Lim15* ve PCNA karşılaştırmaları tablo 5'de gösterilmiştir.

Hasta no	Hasta grup	
	<i>Lim15</i>	PCNA
1.	0,00527	0,1328
2.	0,00046	0,0106
3.	0,000047	0,0484
4.	0,000153	0,0114
5.	0,00000249	0,00188
6.	0,00000469	0,000164
7.	0,0000126	0,000251
8.	0,000174	0,00998
9.	0,0000472	0,0154
10.	0,0000313	0,000892
11.	0,000576	0,0279
12.	0,00113	0,0141
13.	0,0000222	0,0017
14.	0,0017	0,027
15.	0	0,00658
16.	0,0012	0,0427

17.	0,0000591	0,0000825
18.	0,0000256	0,00502
19.	0	0,00765
20.	0	0,0993
21.	0,000153	0,00946
22.	0,000177	0,00717
23.	0,0000638	0,00639
24.	0,000769	0,00934
25.	0,00023	0,0142
26.	0	0,0129
27.	0,000177	0,00762
28.	0	0,0312
29.	0,000048	0,00449
30.	0,00121	0,00487

Tablo 5: Hasta grubunun *Lim15* ve PCNA miktarları.

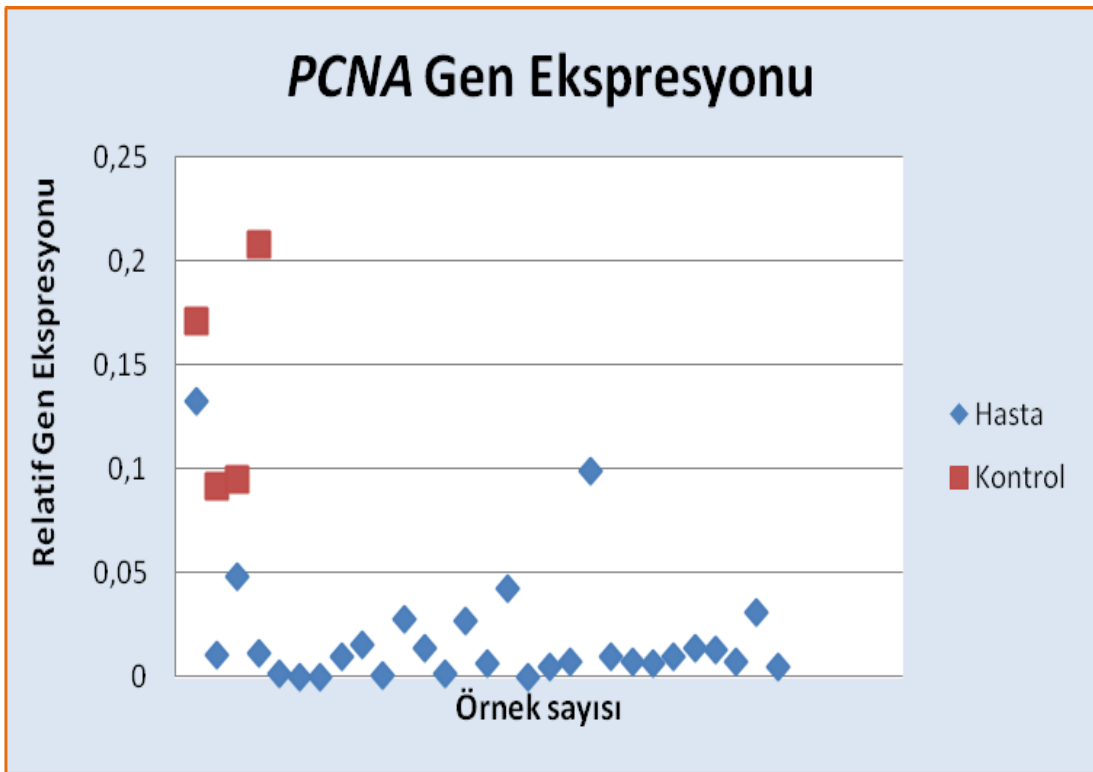
Hasta grubun *Lim15* ekspresyon miktarlarına bakıldığında 30 hastanında seviyelerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Sadece 5 hasta bireyde ekspresyon miktarı sıfır olarak kaydedilmiştir. Bu hastaların ekspresyon seviyeleri belirli bir eşik değerin altında olduğundan sıfır olarak kabul edilmiştir. PCNA dönüşümünde ekspresyon miktarlarında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Kontrol grubundaki *Lim15* ve PCNA karşılaştırmaları ise Tablo 6 'da gösterilmiştir.

Kontrol grubu :

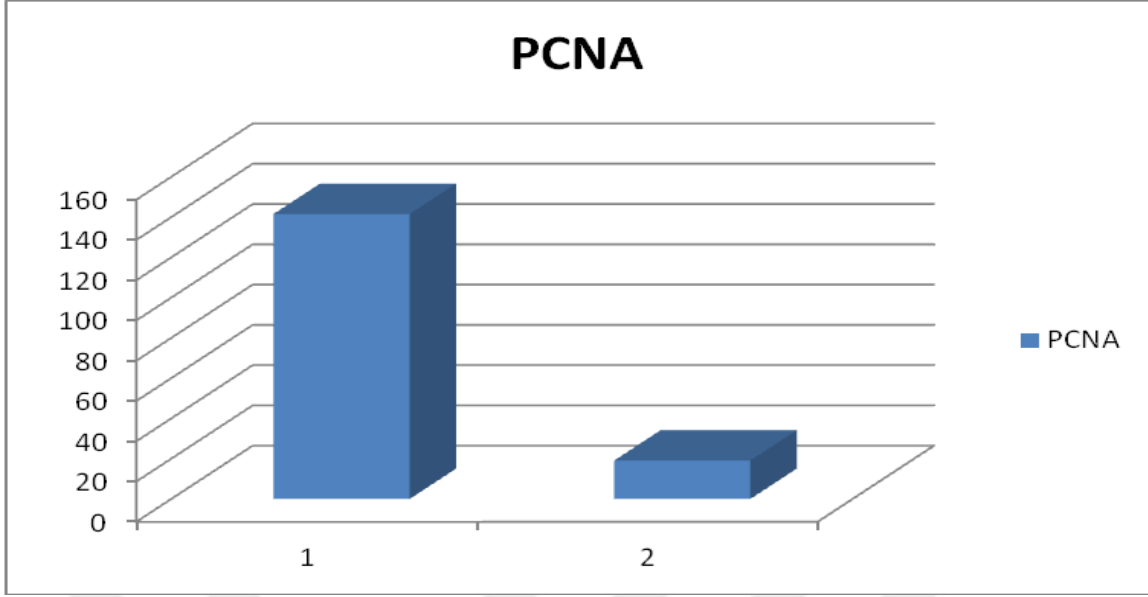
Hasta no	<i>lim15</i>	PCNA
1	0,00339	0,1714
2	0,00283	0,0918
3	0,00174	0,0948
4	0,00497	0,2081

Tablo 6: Kontrol grubunun *Lim 15* ve PCNA miktarları.

Kontrol grubunda *Lim15* gen ekspresyon miktarı hasta grubun ekspresyon miktarına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca kontrol grubundaki ekspresyon miktarının da 4 bireyde de aynı düzeyde olduğu görülmektedir. PCNA dönüşümündeki ekspresyon miktarının da hasta grubunun ekspresyon miktarından fazla olduğu gözlenmiştir (Grafik 1).

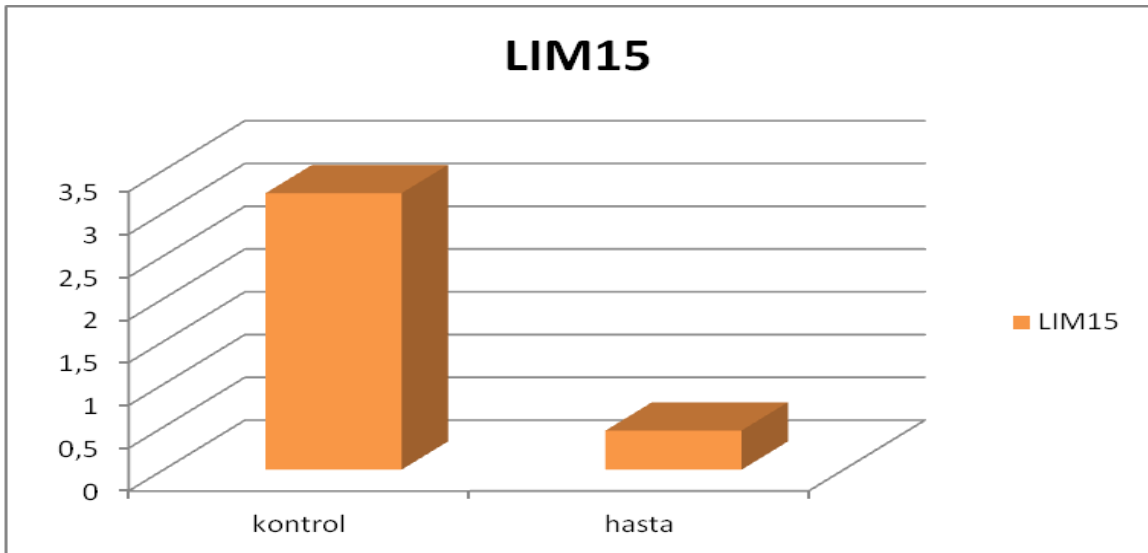


Grafik 1: Hasta ve kontrol grubunun PCNA gen ekspresyonu karşılaştırılmaları.



Grafik 2: Hasta ve kontrol grubunun PCNA miktarı karşılaştırılmaları.

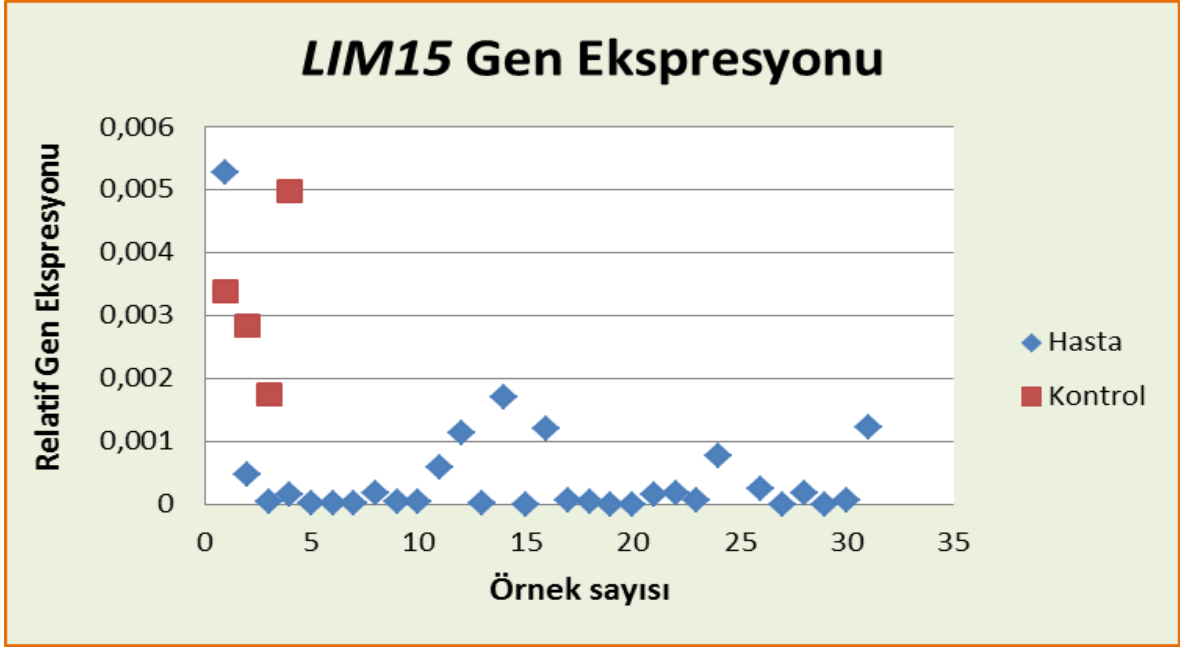
Grafik 1’de hasta grubun PCNA ekspresyon miktarları aynı / benzer seviyelerde görülmektedir. Kontrol grubunda relatif gen ekspresyon miktarı hasta bireylere oranla daha fazla ve kontrol grubundaki ekspresyon miktarlarının kendi aralarında anlamlı bir fark göstermediği tespit edilmiştir.



Grafik 3: Hasta ve kontrol grubunun *Lim15* gen ekspresyon (miktar) karşılaştırılmaları.

6.2. GEN EKSPRESYON KARŞILAŞTIRILMASI

Hasta ve kontrol doku örneklerin RNA izole edilmiş ve RT-PCR yöntemi ile cDNA elde edilmiş ve Real Time PCR ile gen ekspresyonu incelenmiştir. 30 Hasta ve 4 kontrolün gen ekspresyonu *ACTB* kontrol genine relatif olarak hesaplanmıştır.



Grafik 4: Hasta ve kontrol grubunda *Lim15* geni ekspresyonunun karşılaştırılması.

Grafikte 4’de hasta ve kontrol gruplarının *Lim15* gen ekspresyon miktarları gösterilmiştir. Burada dikkat çeken nokta kontrol grubundaki *Lim15* gen ekspresyon miktarının hasta gruba oranla daha fazla olmasıdır. *Lim15* geninin mayoz bölünmede spermatogenez sırasında görev almasından dolayı sperm üretimi gözlenen obstrüktif azospermik hastalarda *Lim15* gen ekspresyonunun fazla olması yapılan çalışmanın doğruluğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca hasta grubunda *Lim15* gen ekspresyonunun diğer gruba göre az olması ya da hiç olmaması çalışmanın dikkat çeken noktasıdır.

7.TARTIŞMA

İnfertilite tüm dünyada yıllardan beri evli çiftlerin en yaygın sorunu olarak bilinmektedir. Bu soruna çözüm bulmak için çok sayıda araştırma yapılmış ve önemli gelişmeler elde edilmiştir. İnfertilitenin kadın ve erkek kaynaklı olmasının yanında açıklanamayan sebepleri de vardır. Erkek kaynaklı infertilitenin en önemli sebeplerinden biri azospermidir. Azospermi, menide hiç sperm hücresi bulunmama halidir. Azospermi hormonal, çevresel ve genetik faktörlere bağlıdır.

Canlı organizmalarda üreme süreci, anne ve babaya ait kromozomların birleşmesiyle kendi genetik özelliklerini kazanan zigot ile başlar. Oluşan diploid kromozoma sahip zigot formunun arka arkaya geçirdiği mitoz bölünmeler embriyo denilen ilk canlı taslağının oluşumu ile devam eder. Mayoz diploid hücrelerin haploid gamet hücrelerini vermek üzere bölünmeleridir. Eşeyli olarak çoğalan canlılarda zigotu oluşturacak gamet hücrelerinin yapılması (gametogenez) ve üreme ana hücrelerinde kromozom sayısının yarıya inmesi olayı mayoz ile gerçekleşir. Sonuçta oluşan hücrelerle üreme hücresi (gamet) meydana getirir.

Mayoz bölünme aşamasında bazı proteinlerin önemli görevleri vardır. Bu proteinlerin en önemlilerinden biri olan *Lim15* mayoz aşamasında rekombinasyona dayalı DNA sentezinde görev alır. Ökaryotlarda yapılan çalışmalar *Lim15* proteinin sadece mayoz bölünmeye spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiş ve *Lim15* proteinin *RAD51* proteini ile mayoz aşamasında işbirliği yaptığını ortaya çıkarmıştır. Bu iki proteinin ifadesi mayoz bölünme için kritik bir öneme sahiptir. *Lim15* geninin spermatogenezde mayoz bölünme aşamasında görev alması, spermatogenezin olmadığı zamanlarda *Lim15* geninin az eksprese olması ya da hiç olmaması infertilitede önemli bir süreçtir. Böylece *Lim15* geninin ekspresyon analizi testis dokusu içinde sperm yapımından sorumlu mayoz bölünmenin olup olmadığını ve dolayısıyla spermatogenez potansiyelinin var olup olmadığını ortaya koyabilecektir. Bunun ortaya koyulabilmesi için çalışmamız aşağıdaki gibi dizayn edilmiştir.

Çalışmamızda, hasta ve kontrol grubu olarak iki grup oluşturulmuş ve gruplardan TESE operasyonu ile testis dokuları alınarak -80 C de saklanmıştır. İlk olarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra cDNA ya dönüşüm yapılmıştır. mRNA tek iplikli olduğundan ve Rnaz enzimlerince kolay parçalanabileceğinden bu yöntem uygulanmıştır.

Bu yöntemde, tek iplikli olan mRNA' lar çift iplikli DNA molekülüne çevrilerek (cDNA) izole edilen dokunun aktif olan genleri hakkında bilgi sahibi olmamızı kolaylaştırdı. Daha sonra real time PCR uygulanmıştır. Bu yöntem ile elde edilen DNA miktarının belirlenmesi için kullanılarak hasta ve kontrol grubundaki *Lim15* ve PCNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Böylelikle çalışmamız kontrol edilebilir, tekrarlanabilir ve sağlaması yapılabilir nitelikte dizayn edilmiştir.

Kontrol grubu olarak adlandırılan obstrüktif azoospermi hastalarındaki *Lim15* gen ekspresyon miktarı ve pcna dönüşümü hasta gruba oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu da *Lim15* geninin ekspresyon miktarının mayoz bölünmeyle ilişkili olduğunun göstergesidir. Spermatogenezde mayoz bölünmenin aktif olması ya da olmaması *Lim15* gen ekspresyon miktarıyla ölçülebilir. Diğer yandan *Lim15* ekspresyon miktarı yüksek olan bazı hastalarda Y kromozom mikrolelesyon testi yapıldığında AZF-c bölgesinde delesyon saptanmaktadır. AZF-a ve AZF-b bölgeleri spermatogenez üzerine hayati önemi varken AZF-c bölgesinin daha çok matürasyon arresti ile ilişkili olduğu bilinmektedir (39). AZF-a ve AZF-b bölgeleri normal iken yani spermatogenez varken AZF-c delesyonu nedeniyle meaturasyon arresti söz konusu olan hastalar mevcuttur. Bu nedenle hastalar azoospermik olarak değerlendirilmektedir. AZF-c delesyonu bulunan bu hastalarda ejakülata bazal olarak mikroskopta bakıldığında sperm hücresi görülememekte, TESE operasyonu sonrasında hastada sperm bulunabilmektedir.

Çalışmamızda 1 numaralı hastada *Lim15* gen ekspresyonunun artmış olduğu görülmektedir. Söz konusu vaka irdelendiğinde azoospermi olmasına rağmen *Lim15* gen ekspresyonunun çok yüksek bulunması tezat gibi görünmektedir. Bu hastanın ileri tetkikleri ve Y kromozom mikrolelesyon testi yapıldığında AZFc gen bölgesinde yoğun delesyon görülmüştür. Hastada AZFa ve AZFb normal olarak tespit edilmiştir. Söz konusu hastanın klinik anemnezi alındığında üroloji doktoru tarafından son 2 ay içerisinde GnRH analogları kullandığı anlaşılmıştır. Tüm bunlar göz önüne alındığında hastanın *Lim15* gen ekspresyonunun artması kendisine verilen tedavinin bir sonucudur ancak hastada AZFc gen bölgesindeki delesyonun varlığının ise olgun sperm yapımına engel olduğu anlaşılmıştır. Dolayısıyla hasta tedaviye cevap vermesine rağmen (*Lim15* gen ekspresyonunun artması ve mayoz bölünmenin gerçekleşmesi) azoosperminin devam etmesi AZFc gen bölgesi delesyonundan kaynaklanmaktadır.

Çalışmanın sonucunda *Lim15* geninin spermatogenezi predikte edip etmeyeceği verilen tedavilerin takip edilebilmesi gibi önemli avantajlar sağladığı gösterilmiştir. Vakaların bazıları açık TESE yerine iğne aspirasyon yöntemi (TESA) kullanıldığında testin sonuçlandırılması bakımından herhangi bir olumsuzlukla karşılaşmamıştır. Bu metaryelden de sonuç elde edilebilmiştir. Böylece Lim15 gen ekspresyonu hastada TESE operasyonu yerine daha basit yöntem olan iğne aspirasyonu ile alınarak büyük pratiklik ve kolaylık sağlanmıştır.



8.SONUÇ

Sonuç olarak, yaptığımız çalışma ile birlikte infertilite tedavisinde hastalara yol gösterme açısından önemli bir adım atılmış olacaktır. *Lim15* geninin ekspresyon analizi testis dokusu içinde sperm yapımından sorumlu mayoz bölünmenin olup olmadığını ve dolayısıyla spermatogenez potansiyelinin var olup olmadığını ortaya koyacaktır. Gamet hücre oluşumu mayoz bölünme ile gerçekleştirildiğinden *Lim15* gen ekspresyonunun testis dokusunda gerçekleştirilmesi gerekliliği söz konusudur. Bu durum geliştirdiğimiz test yönteminin uygulanabilirlik açısından en zor (hız kısıtlayıcı) aşamasını teşkil etmektedir, zira hastaya bir invaziv girişim yapılmasını gerektirmektedir. Buna karşın geliştirilen testle birlikte azosperm teşhisi koyulmuş her hasta doğrudan tese operasyonu yerine iğne aspirasyon biyopsisi yapıp takiben bu testler uygulanarak tedavi süreci daha bilinçli bir şekilde sürdürülebilecektir.

Çalışma; azospermik hastalarda sperm üretiminin olup olmayacağı konusunda tedaviye yön vermesi açısından çok önemlidir. Bu yöntem sayesinde hastada sperm üretiminin varlığı ve hastaya verilecek olan tedavinin etkin olup olmayacağı gözlenebilecektir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki şiddetli sperm yapım bozukluğu bulunan hastalarda ve azospermi hastalarında verilen hormonal tedaviler ve yanı sıra verilen antioksidan medikasyonlar ya da beslenme ve vitamin takviyeleri hastalarda sperm yapımını arttırabilmekte ve spermatogenezini indükleyebilmektedir. Yine yapılan histopatolojik incelemeler ile de bu hastaların testis dokularında spermatogenik odaklar stimule edilebilmektedir. Tüm bu tedavi yöntemlerinin hastada bir cevap bulup bulmadığı tedavi öncesi ve sonrası *Lim15* gen ekspresyon karşılaştırmaları ile anlaşılabilir.

Günümüz üreme tıbbında hastalarda tese operasyonu sonrası sperm bulunup bulunamayacağı veya üroloji uzmanı tarafından verilen tedavinin yarar sağlayıp sağlamayacağı ön görülemeyen konulardır. Buna ek olarak *Lim15* testi sperm fish ve Y mikrodelyasyon testleriyle birleştirildiğinde hastalar daha yakından değerlendirilmiş olunur. Böylece körlemesine değil kişiye özel bir tedavi gerçekleştirilmiş olacaktır. Ayrıca kök hücre tedavilerinde hız kazanmakta bu teknolojiye *Lim15* yardımcı faktör olarak kullanılabilir.

Lim15 ile ilgili daha önce sadece maya (*c.cinereus*) nın mayoz aşamasına bakılmış ve insan üzerinde herhangi bir çalışma lüteratürde gözlenmemiştir. Çalışmayla ilgili klinik verinin olmayışı, sınırlı sayıda literatür olması bizim çalışmamızı özel kılmaktadır.



9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi birikimini ve anlayışını benden hiç esirgemeyen, verdiği tüm destek ve emeklerinden dolayı çok değerli hocam ve danışmanım Prof.Dr.Volkan BALTACI 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doc.Dr.Veyssel Sabri HANÇER ,Yard.Doc.Dr. Şule ÖZDAŞ 'a emekleri için, bana desteklerini hiç esirgemeyen ve daima yanımda olan kuzenim sevgili Dr.Ömer Faruk ERBAY 'a ve dayım sevgili Fatih DUMAN'a, beni destekleyen tüm dostlarıma, son olarak haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim tüm hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayan canım annem ve kardeşlerime,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER.

10. KAYNAKLAR

1. Vayena E, Rowe P, Griffin P. Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction. Report of a meeting on Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction held at WHO Headquarters 17-21 September 2001, Geneva – Switzerland.
2. Takuro Y, Aiko S, Kazuki I, Akiyo K, Hiroko S, Takayuki N, Yoichi T, Kengo S. Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 390, 2009 Issue 1, 4 :82.
3. Kasuga, H.T. Aigaki, and M. Osanai. "Spermatogenesis, Overview." *Reproduction*. 1999 ;199-221,
4. Hamada FN et al. : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacts with a meiosis-specific RecA homologues, Lim15/Dmc1, but does not stimulate its strand transfer activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;352: 836–842.
5. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum Reprod* .2003;18: 1959-66.
6. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril*. 1991;56:192.
7. Gomel V, Urman B, Yarali H. Investigation of the infertile couple. In: Aksel S , Beksac S, editors.Reproductive Endocrinology and Infertility Medical Network, Ankara.pp 143-55,2003.
8. Maroulis GB. Effect of aging on fertility and pregnancy. *Semin Reprod Med*,1993; 9: 165-75.

9. Miller JH, Weinberg RK, Canino NL, Klein NA, Solues MR. The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecology*,1999; 181:952.
10. Miller JH, Weinberg RK, Canino NL, Klein NA, Solues MR. The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*.1999;181:952.
11. In Walsh PC, Retik BA, Vaughan Jr ED, Wein AJ (eds) Brooks JD: Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia.*Campbell's Urology,WB Saunders, Philadelphia*.1998; 89-130.
12. Boivin, J. Schmidt L. :Infertility-related stress in men and women predicts treatment outcome 1 year later. *Fertility and Sterility*. June 2008; 83(6):1745-1752.
13. Bernard Jegou, Charles Pineau, Jorna Toppari. Spermatogenesis in vitro in mammals. In Assisted Reproductive Technology. Jonge CD, Barrat CLR, eds. Cambridge University Pres :Cambridge; 3-25,2003.
14. World Health Organization: WHO manual for the standarized investigation and diagnosis of the infertile couple. P:7, Cambridge University , Cambridge,1993.
15. World Health Organization. WHO Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile Male. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
16. Krester DM, Baker HWG. Human Infertility: Tha male factor in reproductive endocrinology, surgery and technology. Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. Lippincott-Raven: New York,2031-66,1996.
17. Berek J.S. İnfertilite (In), Berek J.S: İnfertilite, Adashi E. Y, Hillard P.A Novak Jinekoloji,Nobel Kitabevi 12.Baskı; 918-925, İstanbul,1998 .
18. Dym M, Fawcett D W: Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* .1971,4:195–215.

19. Cerry, N. ve ark. Occupation and male infertility: Glycol ethers and other exposures. *Occup Environ Med.*2008, 65(10): 708-714.
20. Mendiola, J.Torres-Cantero, A. M., Agarwal, A. Lifestyle factors and male infertility: An evidence-based review. *Arch of Med Sci.*2009, 5(1A): S3–S12.
21. Infertility: Causes, diagnosis and treatment In: Soules M (ed), Problems in Reproductive Endocrinology and Infertility, New York, NY, 1989.
22. Schlegel PN Li Microdissection TESE: retrieval in non obstructive azoospermia. *Hum. Rep. Update.*1998; 4 :439.
23. Debraekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Rep.*1998; 6: 245-250.
24. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ: Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted(IVOS) sperm morphology readings. *Androl.*1999;31:163-168.
25. Cooper TG, Neuwinger J, Bahrs S, Nieschlag E. Internal quality control of semen analysis. *Fertil Steril.*1992;58:172-178.
26. Katz DF, Overstreet JW, Samuels SJ, Niswander PW, Bloom TD, Lewis EL: (1986) Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male infertility. *Journal of Andrology.*1986;7:203-210.
27. Barroso G, Mercan R, Ozgur K, Morshedi M, Kolm P, Coetze K, Kruger T, Oehninger S: Intra- and inter-laboratory variability in the assessment of sperm morphology by strict criteria: impact of semen preparation techniques and manual versus computerized analysis. *Human Reprod.*1999;14:2036-2040.
28. Turunc T, Gul U, Haydardedeoglu B, Bal N, Kuzgunbay B, Peskircioglu L, Ozkardes H. Conventional testicular sperm extraction combined with the microdissection technique in nonobstructive azoospermic patients: a prospective comparative study. *Fertil Steril Nov.*2010; 94(6): 2157-60.
29. Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Calamera JC, Urrutia F, Nodar F, Acosta A. Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.*2010; 76: 1124-9.

30. Okubo K, Ogura K, Ichioka K, Terada N, Matsuta Y, Yoshimura K, Arai Y, Honda T, Umeoka K, Nakahori T, Takahashi A, Umaoka Y. Testicular sperm extraction for non-obstructive azoospermia: results with conventional and microsurgical techniques. *Hinyokika Kyo*.2012; 48: 275-80.
31. Amer M, Ateyah A, Hany R, Zohdy W. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examination. *Hum Reprod*. 2000; 15: 653-6.
32. M. Simoni, E. Bakker, C. Krausz. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y chromosomal microdeletions. State of the art international journal of Andrology 2004.
33. Hopps C. V, Mielnik A, Goldstein M, Palermo G. D, Rosenwaks Z, & Schlegel P. N. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Human Reproduction*.2003;18: 1660–1665.
34. Van Asche E, Boundella M, Tournaye H. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod*. 1996; 11 (4): 1-24.
35. Quinzii C, Castellani C. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *Endocrinol Invest*.2003; 23: 684-90.
36. Hargreave T. Genetic basis of male infertility. *B Med Bul*.2000; 3: 650- 671
37. De Kretser DM. Male infertility. *Lancet*.1997;349 (9054):787-90.
38. Kent-First M, Muallem A, Shultz J. Defining regions of y chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection. *Molec Reprodand Develop*.1999; 53: 27- 41
39. Stansfield W.D: Theory and problems of genetics. Schumers outline series. McGraw-Hill, New York, 1958; 43-48.

- 40- Affara NA , Mitchell M J. The role of human and mouse Y chromosome genes in male infertility. *J Endocrinol Invest.*2000; 23: 630-645.
- 41- Tiepolo ve Zuffardi. Localization of factor controlling spermatogenesis in The nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.*1976;34: 119-24.
- 42-Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempes H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction.*2003;126:13-25.
- 43-Düzcan F, Atmaca M, Özcan ÇG, Bağcı H: Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta Obstet Gynecol Scand.*2003;82: 53-56.
- 44- Lamb DJ. Debate: Is ICSI a genetic time bomb Yes. *J Androl.*2001; 20:23-27
- 45-Johnson MD Genetic risks of YCSI in the treatment of male infertility. Recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril.*1998;70: 397.
- 46-Quinzii C, Castellani C: The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *J Endocrinol invest.*2000; 23: 684-90.
47. Carolyn Sue Richards, PhD, Chair, Linda A. Bradley, PhD, Jean Amos, Bernice Allitto, Wayne W. Grody, MD, Anne Maddalena, Matthew J McGinnis, Thomas W. Prior, Bradley W. Popovich, and Michael S. Watson Standards and Guidelines for CFTR Mutation Testing. *Genet Med.*2002;4(5):379–391.
48. Dayangac D, Erdem H, Yilmaz E, Sahin A, Sohn C, Ozguc M, Dork T. *Hum Reprod.* 2004 May;19(5):1094-100.
49. Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Miesusset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril.* 2009;74(6):1164-74.
- 50-Yanagamachi R: Mammalian fertilization. In Knobil E, O'Brien NJ (eds): The Physiology of Reproduction. New York,1994.

- 51-Edwards RG, Steptoe P.C ,Current status of in vitro fertilization and implatation of human embriyos,1998.
52. Ramasamy R, Yagan N, Schlegel PN.Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology*.2005; 65: 1190–1194.
53. Clermont Y :Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelial cycle and spermatogenial renewal. *Physiol*.1972 ;52:198-236.
54. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ :Predictive valueof normal sperm morphology a structured review. *Hum Reprod Update*.1998; 4:73- 82.
55. Talerman A, Roth LM (edr): Pathology of the Testis and its Adnexa. New York , Edinburg, London, Melbourne, Churchill Livingstone,1986.
56. Barratt CLR: Spermatogenesis. In Grudzinskas JG, Yovich JL (ed): Gametes The spermatozoon . Cambridge, Cambridge University , pp 250-267. 57,1995Weiss L:
57. Amann RP : Structure and function of the normal testis and epididymis. *Jam Coll Toxicol*.1989;8(3):457-71.
58. Nistal M, Paniaguair (eds) : Testicular and Epididymal Pathology New York , Thieme Stratton Inc ,1984.
59. Russel LD, Etlin RA, Hikim APS,Clegg ED : Histological and Histopathological Evaluation of the Testis,1990.
60. Junqueira LC, Carneiro J: Basic Histology.10th Edition.Mcgraw Hill,2003.
61. Histology.Cell and Tissue Biology.Fifth Ed . Elsevier Biomedical,1983.
62. Gartner LP, Hiatt JL: Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W.B. Saunders Company, pp 406-412,1997.
63. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W: Histology: a Text and Atlas, 4th edt, Lippincott Williams-Wilkins , Philedelphia, pp 689-696,2003.

64. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT: Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology*.2003;59:73-86.
65. Syed V, Hecht NB: Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. *Mol Cell Endocrinol (MCE)*.1995;186:144- 157.
66. Johnson L: Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl* 1986;7:331-354.
67. H. Ogata, S. Goto, K. Sato, W. Fujibuchi, H. Bono, and M. Kanehisa, "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes," *Nucleic Acids Research*.1999; vol. 27, no. 1, pp. 29–34.
68. J.Y. Masson, S.C. West, The Rad51 and Dmc1 recombinases: a nonidentical twin relationship, *Trends Biochem. Sci.* 2001; 26 ,131– 136.
69. M.E. Dresser, D.J. Ewing, M.N. Conrad, A.M. Dominguez, R. Barstead, H. Jiang, T. Kodadek: DMC1 functions in a *Saccharomyces cerevisiae* meiotic pathway that is largely independent of the RAD51 pathway. *Genetics*.1997; 147 ,533–544.
70. "Gene" Oxford Dictionary of English 2e, Oxford University Press, 2003.
71. Pearson H. :Genetics: what is a gene. *Nature* 441 (7092):398 401. PMID 16724031,2006.
72. Elizabeth Pennisi. :DNA Study Forces Rethink of What It Means to Be a Gene. *Science* 316 (5831): 1556-1557,2007.
- 73.Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, Zheng D, Du J, Korbel JO, Emanuelsson O, Zhang ZD, Weissman S, Snyder M . :What is a gene, post-ENCODE History and updated definition. *Genome Research* 17 (6): 669-681. PMID 17567988,2007.
74. Marians, K.J, Prokaryotic DNA Replication. *Annu. Rev. Biochem.*1992; 61, 673–719.
75. Coverley, D. Laskey, R.A. Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*1990; 63, 745–76.3. Moss, B.

76. Fairall L, Rhodes, D, Klug, A. Mapping of the sites of Protection on a 5 S RNA Gene by the Xenopus Transcription Factor IIIA, A model for the Interaction. *J. Mol. Biol.* 1996; 192, 577–591.
77. Rajkovic, L., Vilela C., Berthelot, K., Ramirez, C. V. & McCarthy, J. E. Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast. *Journal of Molecular Biology*. 2004; 335, 71–85.
78. Nabel G, Baltimore D: An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 1987; 326, 711–713.
79. Coleman, J.E. Zinc proteins: Enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1992; 61, (897–946.).
80. Moss, B. Regulation of Vaccinia virus Transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 1990; 59, 661–88.
81. Stryer, L. *Biochemistry* W.H. Freeman Company/New York. Third Ed 1998.
82. Van Holde, K.E. *Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc, 1990.
83. Zouridis H, Hatzimanikatis V : A Model for Protein Translation: Polysome Self-Organization Leads to Maximum Protein Synthesis Rates. *Biophys* .2007; 92:717–730.
84. Whitford PC, Blanchard SC, Cate JHD, Sanbonmatsu KY: Connecting the Kinetics and Energy Landscape of tRNA Translocation on the Ribosome. *PLoS Comp Biol*. 2013; 9: e1003003.
85. Bock LV, Blau C, Schröder CF, Davydov II, Fischer N, et al. Energy barriers and driving forces in tRNA translocation through the ribosome. *Nat Struct Mol Biol*. 2013; 20, 1390–1397.
86. Fluit A, Pienaar E, Viljoen H : Ribosome kinetics and aa-Trna competition determine rate and fidelity of peptide synthesis. *Comput Biol Chem*. 2007; 31: 335–346

- 87.** Karim AM, Thompson RC.:Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) as an analog of GTP in protein biosynthesis. The effects of temperature and polycations on the accuracy of initial recognition of aminoacyl-tRNA ternary complexes by ribosomes. *J Biol Chem.* Mar . 1986; 5;261(7):3238–3243.
- 88.** Dix D, Thompson RC :Codon choice and gene expression –Synonymous codons differ in translational accuracy. *Proc Natl Acad Sci.*1989;86: 6888–6892
- 89.** Thompson RC, Karim AM.: The accuracy of protein biosynthesis is limited by its speed: high fidelity selection by ribosomes of aminoacyl-tRNA ternary complexes containing GTP[gamma S]. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1982; Aug; 79(16):4922–4926.
- 90.** D. Steinberg, M. Vaughan, and C. B. Anfinsen, *Science*, 124, 389 ,1956.
- 91.** Adhin, M. R. & Van duin, J. Scanning model for translational reinitiation in eubacteria. *Journal of Molecular Biology.*1990; 213, 811–818.
- 92.**Aravind, L. & Koonin, E. V. Eukaryote-specific domains in translation initiation factors : implications for translation regulation and evolution of the translation system. *Genome Research.*2000; 10, 1172–1184.
- 93.** Shin HJ, Rajashekara G, Jirjis FF, Shaw DP, Goyal SM, Halvorson DA, Nagaraja KV : Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Arch Virol.*2005;145, 1239-1246.
- 94.**Hashimoto, N. N.Carnevalli, L. S. & Castilho, B.A. Translation initiation at non-AUG codons mediated by weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits. *Biochemical Journal.*2002; 367, 359–368.
- 95-**Klebe RJ, Grant GM, Grant AM, et al. RT-PCR without RNA isolation, *Biotechniques* 1996; 1094.
- 96-** Saygun I, Sahin S, Ozdemir A, Kurtis B, Yapar M, Kubar A, et al.Detection of human viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters. *J Periodontol* ,2002; Dec; 73(12): 1437-43.
- 97-** Spedding G, Ratty A, Middleton E.Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. *Antiviral Research.*1989; 12: 99- 110,

- 98-** Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC and Barre-Sinoussi F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur J Biochem.* 190: 469-476,1990.
- 99.** Aguilera A, Klein HL. Genetic control of intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations. *Genetics* 1988;119:779-90.
- 100.** Roeder GS. Meiotic chromosomes: It takes two to tango. *Genes Dev* 1997;11:2600-21.
- 101.** Zickler D, Kleckner N Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. *Annu Rev Genet* .1998;33: 603-754.
- 102.** Allers T, Lichten M. Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 2001;106:47-57.
- 103.** Page AW and Orr-Weaver TL Stopping and starting the meiotic cell cycle. *Current Opinion in Genetics and Development.* 1997; 7: 23–31.
- 104.** Solari AJ, Tandler CJ. Presence of a centromeric filament during meiosis. *Genome* 1991;34:888-94.
- 105** Orr-Weaver TL. Meiosis in *Drosophila*: Seeing is believing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10443-9.
- 106.** Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.*1995;63:349-404.