



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE DELETED İN AZOOSPERMİA LİKE
(DAZL), 5-METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR)
VE FOLLİKÜL UYARICI HORMON RESEPTÖR (FSHR)
GENLERİNİN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Zeynep KAVASOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2018



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE DELETED İN AZOOSPERMİA LİKE
(*DAZL*), 5-METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (*MTHFR*)
VE FOLLİKÜL UYARICI HORMON RESEPTÖR (*FSHR*)
GENLERİNİN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Zeynep KAVASOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FERİDE İFFET ŞAHİN**

ANKARA

2018



T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Zeynep Kavasoglu tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/12/2018

Tez Konusu: “Erkek Infertilitesinde Deleted in Azoospermia Like (DAZL), 5-Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) ve Follikül Uyarıcı Hormon Reseptör (FSHR) Genlerinin Polimorfizmlerinin Araştırılması”

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Feride İffet ŞAHİN

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Feride İffet Şahin

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Zerrin Çelik

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Şefik Güran

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun ...25... / ...12... / 2018 tarih ve ...59-10... Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ
Enstitü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 22 / 01 / 2019

Öğrencinin Adı, Soyadı : Zeynep Kavasoglu

Öğrencinin Numarası : 21520135

Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik

Programı : Tezli Yüksek Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Prof. Dr. Feride İffet Şahin

Tez Başlığı : Erkek İnfertilitesinde Deleted in Azoospermia Like (*DAZL*), 5-Metilentetrahidrofolat Redüktaz (*MTHFR*) ve Follikül Uyarıcı Hormon Reseptör (*FSHR*) Genlerinin Polimorfizmlerinin Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 43 sayfalık kısmına ilişkin, 22 / 01 / 2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından "Turnitin" adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

Onay
22 / 01 / 2019

Prof. Dr. Feride İffet Şahin

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad,

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çok değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, çalışmalarım boyunca göstermiş olduğu emek ve desteği için, Anabilim Dalı Başkanımız ve aynı zamanda tez danışmanım olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Feride İ. Şahin'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayatımın şekillenmeye başladığı bir dönemde bilgi birikimi ile gerek derslerde gerekse ders dışında, her konuda desteğini, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Zerrin Yılmaz Çelik ve Doç. Dr. Yunus Kasım Terzi'ye,

Yüksek lisans eğitimim boyunca derslerde bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan hocalarım Doç. Dr. Özlem Darcansoy İşeri ve Doç. Dr. Özgür Kütük'e,

Gösterdikleri destek ve özverileriyle bu yola girmemi, ilerlememi teşvik eden, her zaman örnek aldığım, ayrıca tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Dr. Özge Alper ve Prof. Dr. Özgül Alper'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında laboratuvar ile ilgili birçok şeyi öğrenip, tecrübe edinmemi sağlayan, çalışmalarım boyunca bana destek olan başta Uzm. Kim. Esra Başyigit olmak üzere tüm Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına ve tez çalışmam boyunca istatistik analizleri ile ilgili yardımını esirgemeyen Gözde Kubat'a teşekkür ederim.

Hayallerime ulaşabilmem için maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, hayatımın her döneminde desteklerini yanımda hissettiğim, haklarımı hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep KAVASOĞLU

ÖZET

Erkek infertilitesi; heterojendir, birden fazla nedeni vardır ve karmaşık gen çevre etkileşimlerinden kaynaklanması nedeniyle belirlenmesi zordur. İnfertilite vakalarının %50'den fazlası erkek kaynaklıdır. Bu nedenle erkek infertilitesi genetiği üzerinde yapılan çalışmalar özünde zor ve karmaşıktır. Erkek infertilite vakalarının %90'dan fazlasında düşük sperm sayısı, hiç sperm olmaması, kötü sperm kalitesi ya da hepsi birden mevcut olmakla birlikte anatomik problemler, hormonal dengesizlikler ve genetik defektler diğer sebepler arasında yer alabilmektedir. Genetik sebeplerin yanı sıra bir erkeğin genel sağlık durumu, yaşam tarzı seçimi, sosyal durumu, iş ortamı gibi etkenler de fertilitesi üzerinde yaygın olarak etki göstermektedir.

Erkek infertilitesinde genetik nedenler arasında yer alan *MTHFR*, *DAZL* ve *FSHR* gen polimorfizmleri farklı araştırmacılar tarafından çalışılmış, bu araştırma çalışmalarında hasta gruplarında genellikle bu polimorfizmlere ya da çeşitli tek nükleotit polimorfizmlerine (SNP'lere) rastlanmış ancak çok azında erkek infertilitesi ile bağlantılı sonuçlar elde edilmiştir. Ülkemizde de erkek infertilitesi üzerine moleküler genetik düzeyde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu nedenle *MTHFR* geni için 677C/T ([rs1801133](#)) ve 1298A/C ([rs1801131](#)), *DAZL* geni için 260A/G ve 386A/G ([rs121918346](#)), *FSHR* geni için ise -29G/A ([rs1394205](#)), 919A/G ([rs6165](#)) ve 2039A/G ([rs6166](#)) polimorfizmlerinin infertilite ve azospermi ön tanısına sahip hastalarda PZT-RFLP tekniği ile incelenerek spermatogenez ile ilişkisinin ve allel sıklıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tezde; 2014-2016 tarihleri arasında infertilite tanısıyla başvuran hastalardan; sitogenetik analizde normal karyotipe sahip, Y-delesyonu taraması sonucu delesyon saptanmayan ve hormon analiz sonuçlarında infertilite ile ilişkili bir bulguya rastlanmayan hastalar seçilmiştir. Hastalar spermiyogram sonuçlarına göre azospermi ya da oligospermi hastaları olarak gruplandırılmıştır. *FSHR*, *MTHFR* ve *DAZL* gen polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ile ilişkisi; 156 azospermik ve oligospermik bireyde incelenmiştir. Çalışma sonucunda yapılan istatistik analizler doğrultusunda, çalışmaya dahil edilen hiçbir polimorfizmin istatistiksel olarak erkek infertilitesi ile ilişkisi bulunmamıştır. Çalışılan polimorfizmlerin, çalışılan grupta erkek infertilitesine neden olabilecek genetik faktörler arasında bulunmadıkları sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: RFLP, Erkek infertilitesi, *DAZL*, *MTHFR*, *FSHR*, Azospermi

ABSTRACT

Male infertility is a genetically heterogeneous health condition and is difficult to identify due to the complexity of interactions between individuals and environmental factors. Genetic studies on male infertility are intrinsically difficult and complex since more than 50% of infertility cases are of male origin. Low sperm count, no sperm, poor sperm quality or all of them in addition to anatomical problems, hormonal imbalances and genetic defects of the affected individuals are among the causes of more than 90% of male infertility cases.

In addition to genetic causes, factors such as the general health status of a man, lifestyle selection, social status and work environment also have a widespread effect on fertility. Researchers have detected genetic polymorphisms in *MTHFR*, *DAZL* and *FSHR* genes or several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in patient groups, however, very few of them were related to male infertility. Limited number of studies have been published about male infertility at the molecular genetic level, in Turkey. In this study, we investigated the polymorphisms including 677C/T (rs1801133) and 1298A/C (rs1801131) for *MTHFR* gene, 260A/G and 386A/G (rs121918346) for *DAZL* gene, -29G/A (rs1394205), 919A/G (rs6165) and 2039A/G (rs6166) for *FSHR* gene using PCR-RFLP technique in patients diagnosed with infertility and azoospermia. We aimed to determine the relationship between spermatogenesis and allele frequencies.

In this thesis, we selected an infertile patient population diagnosed with normal karyotype, no deletion detected as a result of Y-deletion screening and no evidence of hormonal imbalances related to infertility and who has registered in between the years 2014 and 2016. Patients were grouped as azoospermia or oligospermia according to their spermiogram results. We investigated the association of *FSHR*, *MTHFR* and *DAZL* gene polymorphisms with male infertility in 156 azoospermic and oligospermic individuals. In this study, we did not detect any polymorphism that was statistically related to male infertility. We conclude that the *FSHR*, *MTHFR* and *DAZL* gene polymorphisms are not among the genetic factors that may cause male infertility.

Keywords: RFLP, Male infertility, *DAZL*, *MTHFR*, *FSHR*, Azoospermia

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Erkek Üreme Sisteminin Yapısı.....	3
2.1.1. Spermatogenez.....	4
2.2. Erkek üreme sisteminde görev alan hormonlar.....	6
2.3. Erkek İnfertilitesinin Etiyolojisi.....	7
2.4. Erkek İnfertilitesinin Sınıflandırılması	8
2.4.1. Sperm bulgularına göre.....	8
2.4.2. Kromozomal anomaliler.....	8
2.4.3. Y kromozom delesyonları.....	9
2.4.4. Gen Mutasyonları.....	11
2.4.5. Tek Nükleotit Polimorfizmleri (TNP).....	11
2.5. DAZL geni ve Erkek İnfertilitesi.....	15
2.6. MTHFR geni ve Erkek İnfertilitesi.....	16
2.7. FSHR geni ve Erkek İnfertilitesi.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Etik Kurul Onayı	20
3.2. Hasta Grubu	20
3.3. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	21
3.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	21
3.3 DNA Örnekleri.....	21
3.3.1. DNA'nın konsantrasyon ve saflığının ölçümü.....	22
3.4. PZT ve agaroz jelde görüntüleme	22
3.5. Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizm (RFLP) reaksiyonu ve Analizi...26	
3.6. İstatistiksel analiz.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. DAZL 260A/G ve 386A/G polimorfizmlerine ait bulgular.....	32
4.2. MTHFR 677C/T ve MTHFR 1298A/C polimorfizmlerine ait bulgular.....	33
4.3. FSHR -29G/A ve 2039 A/G polimorfizmlerine ait bulgular	34
4.4. FSHR 919 A/G polimorfizmine ait bulgular	35
5. TARTIŞMA.....	36

5. SONUÇ ve ÖNERİLER	43
7. KAYNAKLAR	44



KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

- DAZL: Deleted in AZoospermia Like
MTHFR: 5-Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
FSHR: Follikül Stimüle edici Hormon Reseptör
SNP/TNP: Tek nükleotit polimorfizmi
PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RFLP: Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi
bp/bç: Baz çifti
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
LH: Lüteinizan Hormon
FSH: Follikül Stimüle edici Hormon
ABP: Androjen Bağlayıcı Protein
GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
PGH: Primordial Germ Hücresi
OAT: Oligoastenoteratozoospermi
KS: Klinefelter Sendromu
CFTR/KFTR: Kistik Fibrozis Transmembran İletkenlik Düzenleyici
CBAVD: Konjenital Bilateral Vas Deferens Yokluğu
INSL3: İnsülin-benzeri faktör 3
LGR8: Lösin açısından zengin tekrar içeren G-protein bağlı reseptör
RLF: Dinin-benzeri faktör
Thr: Treonin
Ala: Alanin
Val: Valin
Asn: Asparajin
Ser: Serin
DNA: Deoksiribonükleik Asit
RNA: Ribonükleik Asit
TBE: Tris, Borik asit, EDTA çözeltisi
dNTP: Deoksiribonükleotit trifosfat
EtBr: Etidyum Bromür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Erkek üreme sistemi	4
Şekil 2. Spermatogenez.....	5
Şekil 3. Y kromozomunda yer alan <i>AZF</i> bölgelerinin şematik gösterimi ve yer alan bazı genler.....	10
Şekil 4. <i>DAZL</i> gen yapısı ve yer alan tek nükleotit polimorfizmleri	16
Şekil 5. <i>MTHFR</i> gen yapısı ve yer alan tek nükleotit polimorfizmleri	17
Şekil 6. <i>FSHR</i> gen yapısı ve yer alan tek nükleotit polimorfizmleri	19
Şekil 7. <i>DAZL</i> geni amplikasyon ürünlerinin jel görüntüsü	25
Şekil 8. <i>MTHFR</i> geni amplikasyon ürünlerinin jel görüntüsü.....	25
Şekil 9. <i>FSHR</i> geni amplikasyon ürünlerinin jel görüntüsü	25
Şekil 10. <i>DAZL</i> geninin ekzon 2'de yer alan 260A/G SNP'inin DNA fragmanının (150 bç) <i>DdeI</i> (<i>HpyF3I</i>) kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü.....	27
Şekil 11. <i>DAZL</i> geninin ekzon 3'te yer alan 386A/G SNP'inin DNA fragmanının (151 bç) <i>AluI</i> kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü	27
Şekil 12. <i>MTHFR</i> geninin ekzon 4 de yer alan 677 C/T SNP'inin DNA fragmanının (168 bç) <i>HinfI</i> kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü.....	28
Şekil 13. <i>MTHFR</i> geninin ekzon 7 de yer alan 1298A/C SNP'inin DNA fragmanının (163 bç) <i>MboII</i> kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü	28
Şekil 14. <i>FSHR</i> geninin promoter bölgesinde yer alan -29G/A SNP'inin DNA fragmanının (187 bç) <i>MboII</i> kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü.....	29
Şekil 15. <i>FSHR</i> geninin ekzon 10 da yer alan 919A/G SNP'inin DNA fragmanının (161 bç) <i>HpyI88I</i> kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü.....	29
Şekil 16. <i>FSHR</i> geninin ekzon 10 da yer alan 2039A/G SNP'inin DNA fragmanının (150 bç) <i>BsrI</i> (<i>BseNI</i>) kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü.....	30

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Erkek infertilitesinin çevresel ve yaşam tarzı etkenleri.....	7
Tablo 2. Erkek infertilitesiyle ilişkilendirilmiş genler	13
Tablo 3. <i>MTHFR</i> , <i>DAZL</i> ve <i>FSHR</i> genlerinin ilgili kodonları için kullanılan primer dizileri, amplicon büyüklükleri ve Tm dereceleri.....	22
Tablo 4. RFLP analizinde kullanılan enzimler, kesim paternleri, inkübasyon süre ve sıcaklık dereceleri.....	26
Tablo 5. <i>DAZL</i> 260A/G SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı	31
Tablo 6. <i>DAZL</i> 386A/G SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı	31
Tablo 7. <i>MTHFR</i> 677C/T SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.....	32
Tablo 8. <i>MTHFR</i> 1298A/C SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.....	32
Tablo 9. <i>FSHR</i> -29G/A SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.....	33
Tablo 10. <i>FSHR</i> 919A/G SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.....	33
Tablo 11. <i>FSHR</i> 2039A/G SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.....	34
Tablo 12. Hormon değerlerine göre hastaların <i>FSHR</i> -29G/A polimorfizmi için genotip dağılımları.....	34
Tablo 13. Hormon değerlerine göre hastaların <i>FSHR</i> 2039A/G polimorfizmi için genotip dağılımları.....	34
Tablo 14. Hormon değerlerine göre hastaların <i>FSHR</i> 919A/G polimorfizmi için genotip dağılımları.....	35

GİRİŞ

Fertilite, erkek ve kadın üreme sistemlerinin anatomik ve fonksiyonel olarak normal çalışması ile işleyen fizyolojik bir süreçtir. Eşlerden birinin, üreme sisteminde herhangi bir nedenle bozulma ortaya çıkması fertiliteyi olumsuz yönde etkileyerek infertiliteye yol açar (1). İnfertilite; Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, en az bir yıl boyunca korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olunamaması olarak tanımlanır. İnfertilite vakalarının yaklaşık %50'si erkek kaynaklıdır. Genom bazında yapılan çalışmalar, mutasyon taramaları, hayvan modelleri ve son yıllardaki temel araştırmalar, spermatogenez sürecindeki herhangi bir bozulma ve erkek infertilitesinin genetik nedenlerinin yüksek prevalansını (%10-15) açıkça göstermektedir. Erkek infertilitesi; heterojendir, birden fazla nedeni vardır ve karmaşık gen-çevre etkileşimlerinden kaynaklanması nedeniyle belirlenmesi zor olduğundan infertilitenin genetiği üzerine yapılan çalışmalar da özünde zor ve karmaşıktır (2,3).

İnfertilite vakaları genel olarak genetik temelli ya da olmayanlar olarak sınıflandırılır. Erkek infertilite vakalarının %15'i genetik kökenlidir. Genetik sebepler arasında kromozomal anomaliler, Y kromozomu delesyonları, gen mutasyonları ve tek nükleotit polimorfizmleri yer almaktadır. Sperm üretimi, fonksiyonu, testis fonksiyonu, hormonal düzenleme gibi fizyolojik süreçlerle ilişkili bazı genlerdeki tek nükleotit polimorfizmleri ve mutasyonların; çevresel etkenlerle bir araya geldiğinde sperm kalitesi, sayısı ve fonksiyonunda değişikliğe yol açtığı ve infertilite riski oluşturduğuna dair bulgular elde edilmiştir (1).

Erkek infertilite vakalarının %90'dan fazlasında düşük sperm sayısı, kötü sperm kalitesi ya da her ikisi birden mevcuttur. Anatomik problemler, hormonal dengesizlikler ve genetik defektler diğer sebeplerdendir. Genetik sebeplerin yanı sıra bir erkeğin genel sağlık durumu, yaşam tarzı seçimi, sosyal durumu, iş ortamı gibi etkenler de fertilitesi üzerinde yaygın olarak etki göstermektedir (1-4).

Son yıllarda infertilite genetiği üzerine yapılan araştırmalarda özellikle erkek infertilisinde *POLG*, *AR*, *FSHR*, *MTHFR* ve *DAZL* genlerinde yer alan SNP'ler ön plana çıkmakta olup çeşitli popülasyonlara ait genotip verilerinin infertilite ile ilişkileri yayınlanmıştır (1, 2, 3).

Ülkemizde erkek infertilitesi üzerine moleküler genetik düzeyde yapılan araştırmalar oldukça sınırlıdır. Dolayısıyla, gerçekleştirmiş olduğumuz bu tez çalışmasında, *FSHR*, *MTHFR* ve *DAZL* gen polimorfizmlerinin 156 azospermik ve oligospermik bireyde PZT-RFLP yöntemi ile incelenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda; *MTHFR* geni için 677C/T (rs1801133) ve 1298A/C (rs1801131), *DAZL* geni için 260A/G ve 386A/G (rs121918346), *FSHR* geni için ise -29G/A (rs1394205), 919A/G (rs6165) ve 2039A/G (rs6166) polimorfizmlerinin azospermi ve oligospermi tanısına sahip hastalarda incelenerek spermatogenez ile ilişkisinin belirlenmesi ve erkek infertilitesine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ancak alışma sonucunda yapılan istatistik analizler doğrultusunda (Pearson ki-kare testi ve Fischer-Exact testi), çalışmaya dahil edilen hiçbir polimorfizmin istatistiksel olarak erkek infertilitesi ile ilişkisi bulunmamıştır. Çalışılan polimorfizmlerin, çalışılan grupta erkek infertilitesine neden olabilecek genetik faktörler arasında bulunmadıkları sonucuna varılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

İnfertilite; Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, en az bir yıl boyunca korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olunamaması olarak tanımlanır. İnfertilite vakalarının yaklaşık %50'si erkek kaynaklıdır (1). İnfertilite vakaları genel olarak genetik temelli ya da genetik temelli olmayan olarak sınıflandırılır. Genetik köken infertilite vakalarının %15'ini oluşturmakta ve bu vakalarda sıklıkla düşük sperm sayısı, kötü sperm kalitesi görülmektedir. Ayrıca ağır vakaların çoğu genetik mutasyon ya da seksüel gelişim bozukluğuna sahip olunmasıyla ilişkilendirilir (1,2) .

Genetik sebepler arasında kromozomal anomaliler, Y kromozomu delesyonları, gen mutasyonları ve tek nükleotit polimorfizmleri yer alır. Sperm üretimi, fonksiyonu, testis fonksiyonu, hormonal düzenleme gibi fizyolojik süreçlerle ilişkili bazı genlerdeki tek nükleotit polimorfizmleri; çevresel etkenlerle bir araya geldiğinde sperm kalitesi, sayısı ve fonksiyonunda değişikliğe yol açtığı ve infertilite riski oluşturduğuna dair bulgular elde edilmiştir (2).

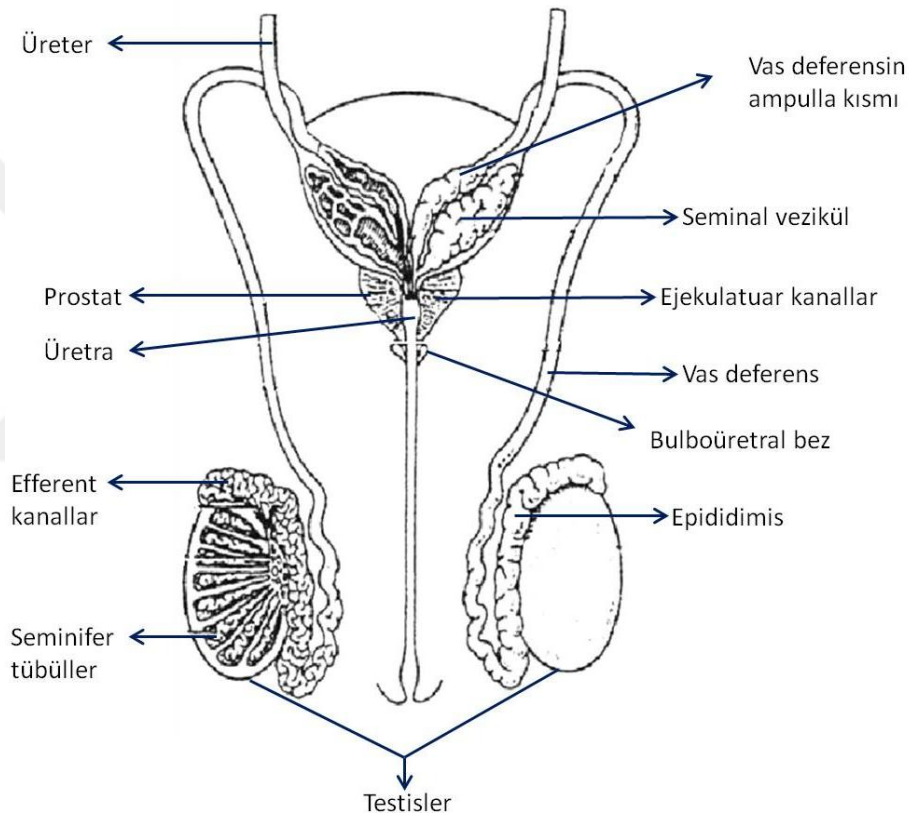
2.1. Erkek Üreme Sisteminin Yapısı

Erkek üreme sisteminin fizyolojisi ve anatomisini anlamak, erkek infertilitesinin tanı ve tedavisi için önemlidir.

Erkek üreme sistemi; üreme hücreleri olan spermleri üreten testisler, bu hücreleri kadın üreme sistemine ileten kanallar ve ek olarak yardımcı bezlerden oluşur. Testisler iki önemli işlevi yerine getirmek üzere özelleşmiştir: (i) seminifer tübüllerde spermatogenez ile sperm oluşumunu sağlamak, (ii) Leydig hücrelerinden steroid hormonlar olan androjenlerin salgılanmasını sağlamak (5, 6, 7, 8). Testisler skrotum içinde yer alır ve olgun sperm öncülleri olan spermatozoon ve androjen hormonlarını üretmekte görev alır. Her bir testiste, spermatozoonların üretildiği, yaklaşık 1000 kadar seminifer tübül bulunur. Bu tübüller birbirinden kan damarları ve leydig hücrelerini içeren bağ dokusu ile ayrılır. Leydig hücreleri; puberte dönemine girilmesiyle birlikte hipofiz bezi kontrolünde androjenlerin salgılanmasını sağlayan endokrin hücrelerdir. Tübül epitelinde, puberteden sonra çoğalma işlevini kaybeden, tübüllerin yapısal organizasyonundan ve germ hücrelerinin beslenmesinden sorumlu sertoli hücreleri bulunur. Sertoli hücreleri de follikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron

reseptörlerini içerir. Ayrıca, testosteron hormonunu konsantre eden androjen bağlayıcı protein (ABP) ve FSH salınımını inhibe eden inhibin hormonu sentezlerler.

Leydig hücrelerinde testosteron üretimi temel olarak Lüteinizan Hormon'a (LH) bağlıdır (5, 9, 39). Bununla birlikte, iletici (genital) kanallar vas deferens, epididimis, ejakulatuar kanallar ve üretradan oluşur. Testislerden çıkan sperm immotildir ve epididimis kanalı boyunca hareket yeteneği kazanır. Testosteron hormonu kontrolünde salgılarını genital yollara boşaltarak meni oluşumuna katkıda bulunan bezler ise seminal vezikül, prostat ve bulboüretal bezlerdir (5, 45).

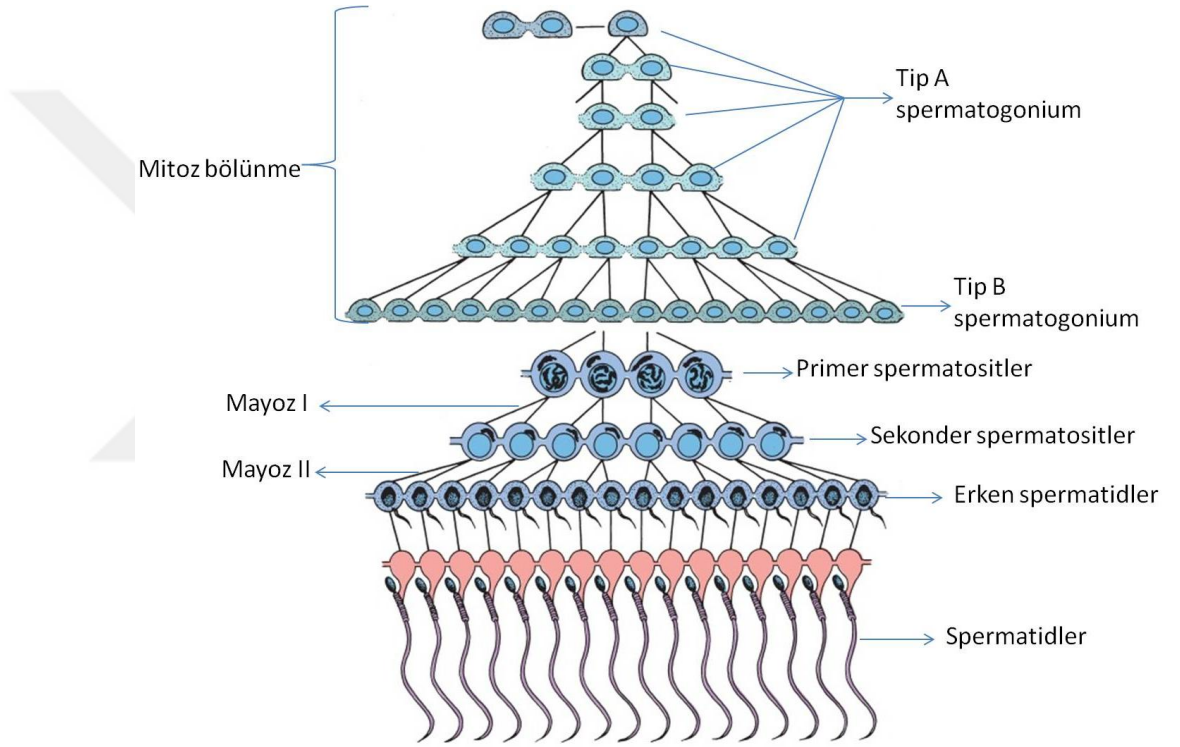


Şekil 1. Erkek üreme sistemi (83) (Şekil 1'den değiştirilerek hazırlanmıştır.)

2.1.1. Spermatogenez

Erkeklerde farklılaşmamış germ hücrelerinin yani spermatogoniaların belirli aşamalardan geçtikten sonra olgun sperm hücresi haline gelme süreci 'spermatogenez' olarak adlandırılır. Spermatogenez; mitotik, mayotik ve post-mayotik (spermiyogenez) olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. Spermatogenez sürecinde diploid spermatogonium haploid spermatozoona dönüşür ve süreç yaklaşık 70-75 gün sürer. Fetal dönemde

testiste primordial germ hücreleri (PGH) tip A spermatogoniuma farklılaşır ve pubertede seminifer tübüllerde mitoz bölünme geçirmeye başlayarak sayıca artış gösterirler. Her bir mitoz bölünme sonucunda primer spermatosit-tip A spermatogonium ve primer spermatosit-tip B spermatogonium olmak üzere iki hücre (çift kromatid, 23 kromozom) oluşur. Tip B spermatogonium iki mayoz bölünme geçirerek iki adet sekonder spermatosit (çift kromatid, 23 kromozom) oluşturur. Oluşan her bir spermatosit de tekrar mayoz bölünme geçirerek tek kromatid ve 23 kromozom içeren erken spermatid oluşturur (5, 41, 42).



Şekil 2. Spermatogenez (84) (Şekil 22.9'dan değiştirilerek hazırlanmıştır.)

Spermiyogenez, spermatidin oositi dölleyebilecek kapasitede olan spermatozoona dönüşmesi amacıyla geçirdiği süreçtir. Hücre bölünmesi görülmez, akrozom oluşumu, nüklear kondensasyon, flagella oluşumu ve sitoplazmik yeniden düzenlenme gerçekleşir (5, 41).

Golgi fazı, cap fazı, akrozomal faz ve matürasyon fazı olmak üzere temel olarak dört aşamada gerçekleşir (5, 41).

- a. Golgi fazı: Golgi kompleksleri birleşerek glikoproteince zengin proakrozomal granüller oluşturulur. Akrozomal vezikül oluşur ve genişleyerek içeriğini artırır. Sentioller, sperm kuyruğundaki aksonem yapısını oluşturmaya başlar.
- b. Cap fazı: Akrozomal cap yapısı şekillenir, nüklear zar kalınlaşır ve nüklear içerik kondanse olur.
- c. Akrozomal faz: Bu aşamada spermatid başı sertoli hücreleri içinde kalırken flagella seminifer tübül lümenine doğru uzanır. Flagella oluşumunu başlatan sentioller boyun kısmını oluşturmak üzere yukarı göç eder. Sitoplazmadaki mitokondriler boyun ve kuyruk kısmına doğru hareket eder.
- d. Matürasyon fazı: Flagella çevresindeki fazla sitoplazma uzaklaştırılır. Olgun spermatozoon Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümene gönderilir.
- Bütün bu aşamalardan geçen sperm hücresi, epididimis boyunca ilerleyerek hareket yeteneği kazanır ve dölemeyi sağlayabilecek olgun sperm hücresi haline dönüşür.

2.2. Erkek üreme sisteminde görev alan hormonlar

Sertoli hücreleri, FSH reseptörleri içermeleri nedeniyle FSH'nın hedef hücreleridir. Bu nedenle FSH ve testosteron seminifer tübüle yönlendirilen hormonlardır. Puberte döneminde spermatogenezin başlamasında; sertoli hücrelerini uyarak süreci başlattığı için FSH daha çok yerde görev alırken, Leydig hücrelerini uyarak testosteron salgısını stimüle eden LH daha az işlev görür. Erişkin erkeklerde spermatogenezin devam ettirilmesinde LH'in etkisiyle salınan testosteron önemli rol oynar. Spermatogenezin kantitatif olarak devam ettirilmesinde ise FSH önemli rol oynar (39, 40).

Testosteron; sperm üretiminin yanı sıra sekonder cinsiyet özelliklerinin gelişmesi ve normal cinsel aktivitenin sürdürülebilmesi için önemli bir hormondur. Testosteron erkeklerde LH salgılanmasının öncelikli inhibitörü olmakla birlikte; androjenler ve östrojenler, LH salgılanmasını düzenler. Testosteronun başlıca fonksiyonları; (i) gonadotropin salgılanmasının düzenlenmesi, (ii) spermatogenezin başlatılması, (iii) fetüs gelişiminde erkek genital sisteminin farklılaşması, (iv) pubertede cinsel gelişimin uyarılması şeklindedir. Testosteronun bu işlevlerini yerine getirebilmesi; ön hipofizden gonadotropin adı verilen Lüteinizan Hormon (LH) ve Follikül Stimüle Edici Hormon (FSH) salgılanması ile kontrol edilmektedir. Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH)

hipotalamustan salgılanarak hipofiz hormonlarını düzenler ve ön hipofizden LH ve FSH salgılanmasını kontrol eder. Bu hormonların salınımının kontrolü ise hipotalamus-hipofiz arasındaki geribildirim (feedback) mekanizmasının kontrolünde gerçekleşmektedir (5, 43, 45). Ayrıca sertoli hücre faktörü olan İnhibin; FSH'ın geri dönüş mekanizmasında önemli role sahiptir. Spermatojenik aktivitenin düşmesi, İnhibin konsantrasyonunda düşüşe neden olurken serum FSH düzeyinde artışa neden olabilmektedir (5, 45).

2.3. Erkek İnfertilitesinin Etiyolojisi

Erkek infertilitesi üzerine yapılan çalışmalar ışığında, infertiliteye neden olan genetik sebeplerin yanı sıra çevresel faktörlerin, yaşam tarzı gibi etkenlerin de üreme fonksiyonları üzerinde etkisi olduğu ve infertilitenin multifaktöriyel bir hastalık olduğu ortaya koyulmuştur.

Erkek infertilitesinin etiyojisinin; %32,6'sını idiyopatik sebepler, %26,6'sını varikozel, %15,3'ünü obstrüksiyon, %10,7'sini normal sperm değerlerine rağmen açıklanamayan infertilite, kalan %14,8'lik kısmını kriptorşidizm, endokrin sebepler, enfeksiyon, torsiyon gibi nedenler oluşturmaktadır (46).

Tablo 1. Erkek infertilitesinin çevresel ve yaşam tarzı etkenleri (4).

Çevresel ve Yaşam Tarzı Etkenleri
Sperm yoğunluğunu düşüren etkenler:
❖ Sigara
❖ Uyuşturucu
❖ Anabolik steroidler
❖ Alkol
❖ Duygusal stres
❖ Yüksek ısı maruziyeti
❖ Dar ve sıkı kıyafet giyilmesi
❖ Uzun süre oturma
❖ Uzun süre bisiklet kullanımı
Çevresel etkenler:
❖ Pestisit ve toksin maruziyeti
❖ Radyasyon ve sitotoksik ilaç maruziyeti
❖ Kurşun maruziyeti

Günümüzde erkek infertilitesine neden olan pek çok etken olduğu bilinmektedir. Bu etkenlerden en önemlileri 2.4 kısmında alt başlıklar halinde belirtilmiştir.

2.4. Erkek İnfertilitesinin Sınıflandırılması

2.4.1. Sperm bulgularına göre

İnfertilite tanısı ile gelen erkeklere çeşitli parametreleri içeren sperm analizleri yapılmaktadır. Bu analizlerin sonuçlarına göre sperm morfolojisi, sayısal değerleri ve hareketlilik oranları gibi parametreler değerlendirilmektedir. Klinikte en sık karşılaşılan gruplar aşağıda sunulmuştur (45,47).

Aspermi: Bireyin; psikolojik bozukluklar, vasküler, hormonal ve ereksiyon bozuklukları nedeniyle semen sıvısının olmaması.

Hipospermi: Enfeksiyonlar, tümörler, kanal tıkanıkları ve androjen eksikliği gibi nedenler sonucu toplam semen hacminin 2 ml'den az olması.

Hiperspermi: Prostat enfeksiyonu sebebi ile semen hacminin 8 ml'den fazla olması.

Azoospermi: Bireyin sperm bulunmayan semen üretmesi.

Oligozoospermi(Oligospermi): Semendeki sperm konsantrasyonunun 15 milyondan az olması.

Astenozoospermi: Spermilerin %40'tan daha azının hareketli olması ve %32'den azının düzgün yüzme hareketi yapması, spermelerde hareket problemi gözlenmesi.

Teratozoospermi: Anormal sperm hücresi görülmesi, %4'ten azının normal şekilli olması.

Oligoastenoteratozoospermi (OAT): Kromozomal nedenler, inmemiş testis, genital enfeksiyonlar, stres, beslenme, ısı maruziyeti gibi nedenlere bağlı olarak sperm sayısının 20 milyon/ml'den az olması.

Nekrozoospermi: Bütün spermelerin ölü olması.

Pyospermi / lökospermi: Semende yüksek oranda (ml'de 1 milyondan fazla) akyuvar bulunması durumudur, genelde enfeksiyonla ilişkilidir.

Düşük canlılık: %58'den daha az sperm hücresinin canlılık göstermesi.

2.4.2. Kromozomal anomaliler

İnfertil erkeklerde kromozom anomalilerinin prevalansı daha yüksektir ve sperm sayısı ile ters orantılıdır. Kromozomal faktör insidansının %2 ile %8 arasında değiştiği ve ortalama %5 değerinde olduğu tahmin edilmektedir. Bu değer azoospermik erkeklerde yaklaşık %15'e çıkmaktadır ve büyük oranda 47,XXY anöploidisi olan hastalarla ilişkilendirilmektedir. Kromozom anomalileri içinde en yaygın olanı seks kromozomu anomalileri olmakla birlikte yapısal anomalilere de sıklıkla rastlanmaktadır.

Klinefelter Sendromu (KS); infertil erkeklerde KS prevalansı; şiddetli oligozoospermide %5'e ve azoospermide %10'a kadar çıkmaktadır ve infertil erkeklerde en sık görülen seks kromozom anomalisidir (9). KS, testiküler hipotrofi ve yükselmiş gonadotropin plazma seviyeleri ile primer testis yetmezliğinin bir formudur ve erkek hipogonadizminin en yaygın formunu temsil etmektedir (1,44).

Robertson tipi translokasyonlar; insanlarda en sık görülen yapısal kromozom anomalisidir ve erkeklerde spermelerde meydana gelen çeşitli değişikliklerle fertilitiyi etkileyebilmektedir. Robertson tipi translokasyonlar iki akrosentrik kromozomun birleşmesiyle ortaya çıkmaktadır ve insidansı yenidoğanlarda 1/1000'dir (1, 43). En yaygın görülen translokasyonlar 13;14 ile 14;21 numaralı kromozomlar arasında yer almaktadır. Robertson tipi translokasyon taşıyıcıları genellikle normal fenotipe sahiptir. Ancak translokasyon; bozulmuş gametogenez ve/veya dengesiz kombinasyona sahip gametlerin üretimi nedeniyle doğurganlığı ve/veya gebelik sonucunu etkileyebilir. Robertson tipi translokasyon taşıyıcılarında dengesiz sperm oluşumu yüzdesi %3 ile %40 arasında değişmektedir. Translokasyon taşıyıcısı erkeklerde fertilitate problemleri; mayoz bölünme sürecinin bozulması ile ilişkili olarak ortaya çıkan, spermatogenez sürecinde meydana gelen bozulmalara bağlıdır. İnfertil erkeklerin %0.8'i Robertson tipi translokasyon taşıyıcısı olarak rapor edilmiştir ve bu oran genel popülasyona göre dokuz kat daha yüksektir (1, 44, 53).

Resiprokal translokasyon; iki kromozom arasında parça değiş tokuşu sonucu oluşmaktadır. Translokasyon taşıyıcılarının fenotipinde genellikle bir değişiklik gözlenmez ancak anormal sperm oluşumu normal sperm oluşumuna göre daha fazladır. Özellikle tekrarlayan gebelik kayıplarında resiprokal translokasyon görülme sıklığı yüksektir. İnfertil, oligozoospermik ve azoospermik erkeklerde yapılan çalışmalar sonucunda, translokasyon varlığının spermatogenez sürecini değiştirdiği gözlenmiştir (10).

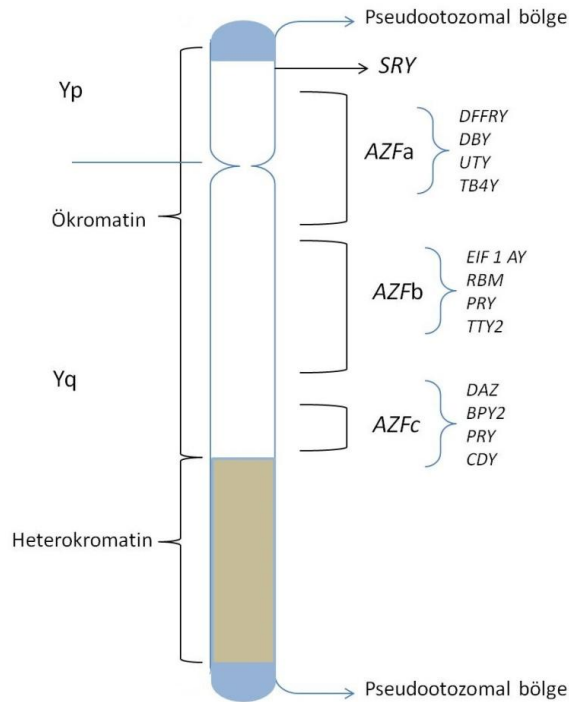
2.4.3. Y Kromozom Delesyonları

Y kromozomu yeniden düzenlemelerinin görülme sıklığının; infertil erkeklerde, özellikle azospermi ile arttığı gözlenmiştir. İnfertil fenotipin Yq11.23 (AZF bölgesi) bandını içeren yeniden düzenlemelerle (Yq'nin ökromatik kısmının inversiyonları, delesyonları) ilişkisi, yapılan genetik çalışmalarla kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir (11).

İlk kez 1976 yılında yapılan çalışma; şiddetli infertilitenin en sık görülen moleküler nedenlerinden birinin Y kromozomundaki mikrolelesyonlar olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışma sonucunda Y kromozomu mikrolelesyonlarının azospermi ve oligospermi vakalarında %10-15'lik bir prevalansa sahip olduğu ortaya koyulmuştur (12).

Y kromozomunda sırasıyla AZFa, b ve c bölgeleri "Azoospermi faktörleri" olarak adlandırılır ve spermatogenez lokusu olarak tanımlanır (13)(Şekil 3). Yq mikrolelesyonunun ve AZF genlerinin; spermatogenez üzerindeki etkisi ve delesyon olması durumunda değişen moleküler mekanizma tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Y mikrolelesyonlarının çoğunluğunu AZFb ve AZFc lokuslarındaki birkaç genin eş zamanlı delesyonu oluştururken, AZFa delesyonları daha az görülmektedir (14).

DAZ gen ailesinin tüm üyelerini içeren AZFc bölgesi delesyonları, spermatogenez bozulmasının en sık görülen moleküler nedenidir. AZFc delesyonunda, AZFc fenotipi oluşmasının en güçlü etkeni olan DAZ gen ailesinin tüm üyeleri dahil olmak üzere sekiz gen delesyona uğrayarak azospermi ya da şiddetli oligozoospermiye yol açar (14,15). AZFa bölgesindeki delesyonlar genellikle "Sertoli cell-only Sendromu"na yol açarken, AZFb ya da AZFb + AZFc delesyonları "Sertoli cell-only Sendromu ile ilişkili azospermi" ya da "pre-mayotik spermatogenez duraklama ile ilişkili azospermi"ye yol açmaktadır (15).



Şekil 3. Y kromozomunda yer alan AZF bölgelerinin şematik gösterimi ve yer alan bazı genler.

2.4.4. Gen Mutasyonları

İnsanlarda normal seksüel gelişim, spermatogenez, testis oluşumu ve işlevi için yüzlerce genin birlikte işlev görmesi gerekmektedir. Ancak birlikte işlev görmesi gereken pek çok gen içinde *CFTR* geni, androjen ve fonksiyonel bir androjen reseptörü genleri ile insülin-benzeri faktör 3 geni gibi bazı genlerin doğru bir biçimde işlev görmesi klinik açıdan daha fazla önem taşımaktadır.

Kistik Fibrozis Transmembran İletkenlik Düzenleyici (CFTR) geni, kromozom 7'nin q31.2 bölgesinde yer almaktadır. *CFTR* gen mutasyonları kistik fibroz hastalığına ve vas deferens yokluğuna neden olmaktadır. Kistik fibrozis hastalığına sahip erkeklerin %95'inde obstrüktif azospermiye bağlı infertilite görüldüğü ve konjenital bilateral vas deferens yokluğu (CBAVD) olan hastaların % 60-70'inde *CFTR* geninde mutasyonların saptandığı belirtilmektedir (1,43).

Androjenler ve fonksiyonel bir androjen reseptörü (AR); erkek fenotipinin oluşması, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesinde önemli role sahiptir (1,43). Androjen reseptör genindeki mutasyonlar, Androjen Duyarsızlık Sendromu'na (AIS) ve spermatogenik hasara neden olmaktadır (1,43,44).

Bunlara ek olarak, insülin-benzeri faktör 3 - Lössin açısından zengin tekrar içeren G-protein bağlı reseptör (*INSL3-LGR8*) genlerinde belirlenmiş mutasyonlar; testislerin inmesinde anomalilerle ve kriptorşidizm ile ilişkilendirilmiştir (1). Dinin-benzeri faktör (RLF) olarak da bilinen insülin-benzeri faktör 3 (*INSL3*); Leydig hücreleri tarafından üretilen relaksine benzer hormon ailesinin bir üyesidir. Testis inmesi ve kriptorşidizmdeki rolünün yanı sıra *INSL3* geninin henüz tam olarak tanımlanmamış endokrin ve parakrin işlevlerinin olabileceği ve bu hormonun eksikliğinin hipogonadizm sebebi olabileceği düşünülmektedir (1,9).

2.4.5. Tek Nükleotit Polimorfizmleri (TNP/SNP)

Genom bazında yapılan araştırmaların ilerlemesine ek olarak spermatogenezde rol oynayan genlerdeki polimorfizmlerin analizi, erkek infertilitesi genetiğinin önemli çalışma alanlarından birisi haline gelmiştir. Spermatogenezde rol oynayan genlerdeki polimorfizm veya genetik varyantlar, spermatogenez sürecinde ortaya çıkan bozulmalara ve sonucunda meydana gelebilecek defektlere etki edebilecek risk faktörleri olarak kabul edilmektedir.

Erkek infertilitesi ile ilişkili olarak birkaç polimorfik varyant tanımlanmıştır. Ancak yapılan ilişkilendirme çalışmalarından genellikle spesifik ve net sonuçlar elde edilememiştir.

Tek nükleotit polimorfizmleri temel olarak; çalışma popülasyonunun boyutu, analiz edilen polimorfizm türü ve kullanılan teknikler, erkek infertilite fenotipinin multifaktöriyel ve heterojen oluşu, etki eden faktörlerin fenotipik etkisinin bireyler arası değişkenlik göstermesi, testis seviyesi ve genetik varyasyonlara katkıda bulunan etnik ve coğrafi farklılıklardan kaynaklanmaktadır (1,2).

Gen polimorfizmlerinin fenotipik etkisi; diğer genetik faktörler, çevresel koşulların etkisi veya her ikisinin etkileşimi ile birlikte ortaya çıkmaktadır. Bu durum, gen ve çevre etkileşiminin fenotip üzerindeki etkisinin önemini vurgulayan durumlardan biridir. Bu nedenle, polimorfizmlerin, belirli bir genetik yapı ve/veya çevresel faktörlerle bağlantılı olarak spermatogenez sürecinde bozulmalara ya da testiküler disfonksiyona yol açtığı düşünülmektedir.

Farklı genlerdeki (*PARP1*, *TNF*, *AR*, *MTHFR*, *POLG*, *FSHR*, *DAZL*, vb.) polimorfizmlerin erkek infertilitesi üzerindeki olası etkileri 2008 yılından itibaren çeşitli çalışmalarda popülasyonlara özgü olarak araştırılmış; ancak çoğu çalışmada aydınlatıcı bir sonuca ulaşılamamış, kesin veriler elde edilememiştir. Bu nedenle en yaygın olarak tespit edilen polimorfizmler üzerinden çalışmalar halen devam etmektedir ve bu genler Tablo 2'de verilmiştir. (3,43).

Tablo 2. İnfertilite ile ilişkilendirilmiş genler (43)

Gen İsmi	Vaka ve Kontrol Grubu	Çalışmanın yapıldığı ülke	İlişki
(A) Genel hücre işlevi			
<i>ABCB1</i>	162+191	Polonya	Evet
<i>ABLIM1</i>	3608+5909	Çin	Evet
<i>AHR</i>	991+1256	Çin, Estonya, İran, Japonya	Evet
<i>AHRR</i>	235+324	Estonya, Japonya	Uyumsuz
<i>APOB</i>	604+501	Slovenya, Hindistan	Uyumsuz
<i>ARNTL</i>	589+444	Slovenya, Sırbistan	Hayır
<i>ATM</i>	809+816	Çin	Uyumsuz
<i>BCL2</i>	1653+2329	Çin	Evet
<i>BHMT</i>	153+184	İsveç	Hayır
<i>BRCA2</i>	820+830	Çin	Evet
<i>CAT</i>	885+839	Çin, Fransa, İran	Uyumsuz
<i>CDC42BPA</i>	3608+5909	Çin	Evet
<i>CHD2</i>	1653+2329	Çin	Hayır
<i>CLOCK</i>	517+444	Slovenya	Evet
<i>CRISP2</i>	92+176	Avustralya	Hayır
<i>CYP11A1</i>	1060+1225	Meta-analiz	Evet
<i>CYP17A1</i>	456+465	Kore	Evet
<i>CYP26B1</i>	719+383	Çin	Hayır
<i>EPSTII</i>	917+2015	Japonya	Uyumsuz
<i>ERCC1</i>	202+187	Çin	Hayır
<i>ERCC2</i>	202+187	Çin	Hayır
<i>ETV5</i>	204+296	Avustralya Amerika	Evet
<i>FAS</i>	547+571	Çin, Hindistan, Türkiye	Hayır
<i>FASLG</i>	447+532	Arnavutluk, Makedonya, Çin, Türkiye	Hayır
<i>FOLH1</i>	153+184	İsveç	Hayır
<i>GNAO1</i>	1653+2329	Çin	Evet
<i>GPX1</i>	690+649	Çin, Fransa	Hayır
<i>HLA-DRA</i>	4508+7588	Çin, Japonya	Evet

<i>JMJDIA</i>	136+161	Arnavutluk, Makedonya	Hayır
<i>KLK2</i>	218+220	Kore	Evet
<i>LIG4</i>	580+580	Çin	Evet
<i>LOC203413</i>	623+530	Arnavutluk, Makedonya, Japonya	Hayır
<i>LRWD1</i>	130+100	Japonya	Hayır
<i>MAS1LUBD</i>	917+2015	Japonya	Hayır
<i>MCT2</i>	471+265	Kore	Evet
<i>MDM2</i>	580+580	Çin	Evet
<i>MLH1</i>	1292+480	Çin	Hayır
<i>MLH3</i>	1454+640	Çin	Evet
<i>MSH4</i>	1292+480	Çin	Hayır
<i>MSH5</i>	1454+640	Çin	Evet
<i>MTHFD1</i>	428+533	İsveç, Rusya	Hayır
<i>MTHFR</i>	5575+5447	Meta-analiz	Evet
<i>MTR</i>	713+739	Brezilya, Çin, Polonya	Hayır
<i>MTRR</i>	1790+1622	Brezilya, Çin, Fransa, Kore, Polonya, İsveç, Ürdün	Uyumsuz
<i>NFE2L2</i>	336+295	Çin	Evet
<i>NOS1</i>	580+580	Çin	Hayır
<i>NOS2</i>	580+580	Çin	Hayır
<i>NOS3</i>	2019+1509	Meta-analiz	Uyumsuz
<i>NQO1</i>	580+580	Çin	Hayır
<i>OR2W3</i>	623+530	Arnavutluk, Makedonya, Japonya	Uyumsuz
<i>PACRG</i>	610+156	Avustralya	Evet
<i>PARP1</i>	317+231	Çin	Evet
<i>PCFT1</i>	153+184	İsveç	Hayır
<i>PEMT</i>	153+184	İsveç	Evet
<i>PEX10</i>	2369+2946	Çin, Japonya	Hayır
<i>PMS2</i>	1292+480	Çin	Evet
<i>POLG</i>	2463+1480	Meta-analiz	Hayır
<i>PONI</i>	1037+1094	Çin, Yunanistan, İran, Slovenya	Uyumsuz

<i>PON2</i>	270+320	Yunanistan, İran	Uyumsuz
<i>PSAT1</i>	917+2015	Japonya	Uyumsuz
<i>RAG1</i>	580+580	Çin	Evet
<i>RFC1</i>	153+184	İsveç	Hayır
<i>RGS9</i>	3608+5909	Çin	Hayır
<i>SHMT1</i>	153+184	Çin	Hayır
<i>SFRS1</i>	962+1931	Çin	Hayır
<i>SFRS2</i>	962+1931	Çin	Hayır
<i>SFRS3</i>	962+1932	Çin	Hayır
<i>SFRS4</i>	962+1933	Çin	Hayır
<i>SFRS5</i>	962+1934	Çin	Hayır
<i>SFRS6</i>	962+1935	Çin	Evet
<i>SFRS7</i>	962+1936	Çin	Hayır
<i>SFRS9</i>	962+1937	Çin	Hayır
<i>SIRPA</i>	1402+1172	Çin	Evet
<i>SIRPA-SIRPG</i>	490+1167	Çin	Hayır
<i>SIRPG</i>	1402+1172	Çin	Uyumsuz
<i>SOD2</i>	690+649	Çin, Fransa	Uyumsuz
<i>SOD3</i>	580+580	Çin	Hayır
<i>SOX5</i>	2987+3526	Çin, Japonya	Uyumsuz
<i>TAS2R38</i>	623+530	Makedonya, Arnavutluk, Japonya	Hayır
<i>TCbIR</i>	153+184	İsveç	Evet
<i>TCN2</i>	153+184	İsveç	Hayır
<i>TMEM132E</i>	3608+5909	Çin	Hayır
<i>TNF</i>	780+260	Hindistan	Evet
<i>TP53</i>	1134+1545	Meta-analiz	Hayır
<i>UBR2</i>	30+80	Japonya	Uyumsuz
<i>USP26</i>	1716+2597	Çin	Hayır
<i>USP8</i>	917+2015	Çin	Uyumsuz
<i>XPC</i>	252+288	Çin	Hayır
<i>XRCC2</i>	580+580	Çin	Hayır
<i>XRCC3</i>	580+581	Çin	Hayır
<i>XRCC4</i>	580+582	Çin	Hayır
<i>XRCC5</i>	580+583	Çin	Hayır

(B) Spesifik Spermatogenez İşlev			
<i>BRDT</i>	259+343	Arnavutluk, Makedonya, İsrail	Hayır
<i>DAZL</i>	2715+1835	Meta-analiz	Uyumsuz
<i>EPPIN</i>	473+198	Çin	Evet
<i>H2BFWT</i>	851+445	Çin, Kore	Evet
<i>HORMAD1</i>	391+448	Çin, Japonya	Evet
<i>HORMAD2</i>	361+368	Çin	Hayır
<i>MOV10L1</i>	30+70	İran	Hayır
<i>NANOS1</i>	719+383	Çin	Hayır
<i>PIWIL1</i>	490+468	Çin	Hayır
<i>PIWIL2</i>	490+469	Çin	Hayır
<i>PIWIL3</i>	490+470	Çin	Hayır
<i>PIWIL4</i>	490+471	Çin	Hayır
<i>PRDM9</i>	309+377	Çin	Hayır
<i>PRM1</i>	851+955	Çin, İran, Japonya, İspanya	Evet
<i>PRM2</i>	525+648	Çin, Japonya	Hayır
<i>PRMT6</i>	2369+2946	Çin, Japonya	Hayır
<i>REC8</i>	96+96	Amerika	Hayır
<i>SEPT12</i>	290+480	Japonya, Tayvan	Uyumsuz
<i>SPATA17</i>	38+96	Japonya	Evet
<i>SPO11</i>	186+167	Çin, İran	Uyumsuz
<i>STRA8</i>	719+383	Çin	Evet
<i>TEX15</i>	445+538	Arnavutluk, Makedonya, Çin	Hayır
<i>TSSK4</i>	372+220	Çin	Hayır
<i>TSSK6</i>	519+359	Çin	Hayır
<i>UBE2B</i>	568+612	Çin, Hindistan	Evet
<i>YBX2</i>	326+210	Çin	Evet
(C) Endokrin İşlev			
<i>AR</i>	2084+1831	Meta-analiz	Evet
<i>ESR1</i>	1576+1777	Meta-analiz	Uyumsuz
<i>ESR2</i>	2815+3178	Meta-analiz	Uyumsuz
<i>INSR</i>	624+530	Makedonya, Japonya	Hayır
<i>MSMB</i>	338+382	Çin	Evet
<i>SRD5A2</i>	132+111	Estonya	Hayır

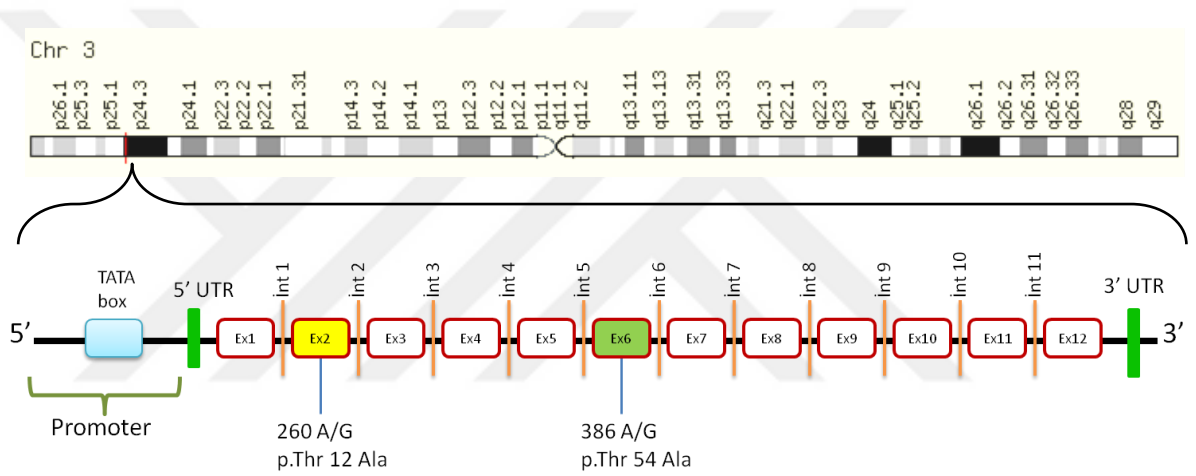
"Evet", belirtilen SNP bütün çalışmalarda ilişkili bulunmuştur; "Hayır", belirtilen SNP hiç bir çalışmada ilişkili bulunmamıştır; "Uyumsuz", aynı SNP farklı çalışmalarda analiz edilmiş ve birbirine uyumsuz sonuçlar elde edilmiştir.

2.5. *DAZL* Geni (Deleted in AZoospermia Like) ve Erkek İnfertilitesi

"Deleted in AZoospermia" olarak adlandırılan *DAZ* geni (OMIM 400003), insan Y-kromozomal azoospermi faktörü olan AZF bölgesi içinde yer alan genlerden biridir. *DAZ* geninin spermatogenez sürecinde, AZF delesyonları sonucu ortaya çıkan, defektler üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Saxena ve arkadaşları (1996) AZF bölgesinde toplanmış çok sayıda *DAZ* kopyası ve kromozom 3 üstünde *DAZL* olarak adlandırılan işlevsel bir *DAZ* homoloğu bulunduğunu rapor etmiştir (35). Tüm gen ailesinin eşey hücrelerinde eksprese olduğu belirlenmiştir. DNA dizileme analiz sonuçlarında ise, Y kromozomu *DAZ* kümelenmesinin primat evrimi sırasında otozomal bir genin Y kromozomuna transpozisyonu, transpoze olan gendeki ekzonların amplifikasyonu ve kırılması ve modifiye genin amplifikasyonu ile oluştuğunu göstermiştir. Saxena ve arkadaşları (1996) *DAZL* geninin *DAZ* gen ailesinin öncüsü olduğunu öne sürmüştür (35). Ayrıca, Yen ve arkadaşları (1996), *DAZL* geninin; *DAZ* geninde bulunan yedi tekrardan yalnızca bir tanesini içerdiğini ortaya çıkarmışlardır (49). *DAZL* geni (NC_000024.10); Y-bağlantılı *DAZ* geninin bir otozomal homoloğudur. RNA bağlama proteinini kodlayan germ/eşey hücrelerinde ifade olarak spermatogenezde rol oynamaktadır. Kromozom 3'ün p24.3 bölgesinde yer almakta ve 12 ekzondan meydana gelmektedir (Şekil 4) (16).

Reijo ve arkadaşları (1995), Yq'nun ökromatin bölgesinde *de novo* delesyonu olan azoospermik erkeklerde, sürekli olarak delesyona uğrayan tek transkripsiyon faktörünün *DAZ* olduğunu saptamışlardır (17). Bu gendeki mutasyonların, erkeklerde şiddetli spermatogenez başarısızlık ve infertiliteye neden olduğu saptanmıştır (18). RBM ve *DAZ/SPGY*; RNA bağlanma motifini de içeren proteinleri kodlayan ve Y kromozomu üzerinde yer alan iki gen ailesidir. Her iki gen de spermatogenezde etkili olan genlerdir (77). Ruggiu ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptığı çalışma ile *DAZL* proteininin erkek ve kadınlarda sitoplazmik olduğu, *DAZL* genindeki bozulmaların germ hücresi kaybı nedeniyle gamet üretiminin durmasına yol açtığı ve *DAZL* geninin germ hücre farklılaşmaları için esas etken olduğu ortaya koyulmuştur (78). Reynolds ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları immünopresipitasyon ve mikroarray çalışmaları ile *DAZL* proteinleri tarafından bağlanan spesifik transkriptleri tanımlamış; bu transkriptlerin bağlanma bölgelerinin evrimsel olarak korunmuş ve erkek gametogenez için kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur (79).

Bugüne kadar, *DAZL* geninde; ekzon 2'de yer alan 260 A/G ve ekzon 6'da yer alan 386 A/G (rs121918346) tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) bu genle ilgili en yaygın olarak çalışılan polimorfizmlerdir. Teng ve arkadaşları ise 2002 yılında, ilk olarak Tayvan orijinli şiddetli oligozoospermi ve non-obstrüktif azoospermi görülen 160 bireyde yaptıkları çalışma sonucunda; şiddetli spermatogenik yetmezliğe yatkınlık ile ilişkili *DAZL* geninde ekzon 3'te, proteinin RNA tanıma bölgesinde değişime neden olan 386 G/A değişimini tanımlamıştır (19). Bartoloni ve arkadaşlarının 2004 yılında İtalyan infertil bireylerle yaptığı çalışma sonucunda ise 386 G/A polimorfizmine rastlanmamış ve 386 G/A polimorfizminin yalnızca Tayvan ve Asya populasyonlarında infertilite sebebi olabileceği öne sürülmüştür (20).



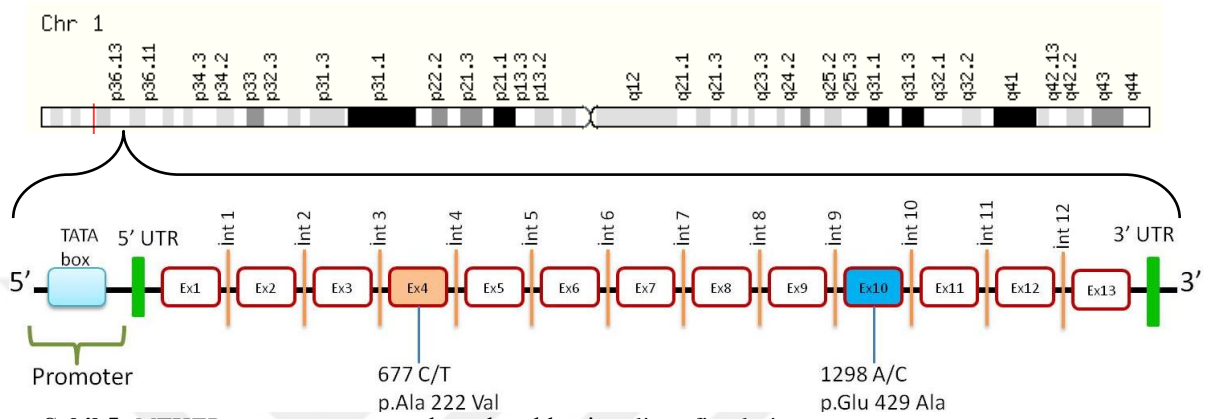
Şekil 4. *DAZL* gen yapısı ve yer alan tek nükleotit polimorfizmleri.

Tayvan orijinli infertil erkeklerde yapılan ilk SNP analiz çalışması sonucunda (19), 260 A/G tek nükleotit polimorfizminin infertil ve kontrol bireyleri arasında benzer oranlarda dağıldığı belirtilmiştir. Ancak 260A/G olarak düşünülen bu tek nükleotit polimorfizminin aslında 386. pozisyonda olduğu, bu polimorfizmin yüksek oranda korunmuş RNA tanıma motifi içinde yer aldığı ve 54. pozisyondaki Threonin aminoasitinin Alanin aminoasitine değişmesine neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda 386 A/G değişiminin erkek infertilitesi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu belirlenmiştir (19).

2.6. *MTHFR* Geni (5-metilentetrahidrofolat redüktaz) ve Erkek İnfertilitesi

Goyette ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptığı çalışma ile *MTHFR* geninin, kromozom 1'in p36.22 bölgesinde yer aldığı, 11 ekzondan oluşmuş olup 656 aminoasit

kodladığı ortaya koyulmuştur (**Şekil 5**)(50). 5-metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, homosisteinin metionine dönüştürülmesinde etkilidir. *MTHFR* geninde meydana gelen mutasyonların; spermatogenezde etkili olan genlerin ifadesinde metilasyona bağlı değişiklikler meydana getirebileceği ve bu şekilde erkek fertilitesi üzerinde olumsuz etkisinin olabileceği öne sürülmektedir. (51).



Şekil 5. *MTHFR* gen yapısı ve yer alan tek nükleotit polimorfizmleri.

Folat metabolizması; DNA sentezi, onarımı ve metilasyonundaki rolü nedeniyle genom bütünlüğü için önemli bir etkidir. İnsanlarda folat eksikliği sıklıkla gözlenmekte ve infertilite dahil çeşitli hastalıklar için risk faktörü olarak gösterilen hiperhomosisteinemi ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca sperm DNA'sında oluşan metilasyon anomalileri de erkek infertilitesi sebepleri arasında gösterilmektedir (24).

MTHFR geni ile bağdaştırılan infertilite çalışmalarında en yaygın olarak 677 C/T (rs1801133) ve 1298 A/C (rs1801131) polimorfizmine rastlanmaktadır. *MTHFR* geninde ekzon 4'te yer alan 677 C/T nükleotit değişimi 222.pozisyondaki Alanin aminoasitinin Valin aminoasitine değişmesine ve ekzon 11'de yer alan 1298 A/C nükleotit değişimi 429. pozisyondaki Glutamik asit aminoasitinin Alanin aminoasitine değişmesine neden olmaktadır.

Frost ve arkadaşları 1995 yılında; *MTHFR* geninin 677. nükleotitindeki polimorfizmin (607093.0003), alaninin valine dönüşmesine neden olarak termolabil bir *MTHFR* formunun oluştuğunu öne sürmüşlerdir (25). Heterozigot veya homozigot durumdaki bu varyantın, azalmış enzim aktivitesi ve artan termostabilite ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. 2008 yılından itibaren yapılan SNP araştırmalarında, *MTHFR* genindeki polimorfizmler nedeniyle ortaya çıkan düşük enzim aktivitesi; infertilite de dahil olmak üzere pek çok hastalık için risk faktörü olarak

değerlendirilmektedir (24,25). *MTHFR* geninin kodlayıcı bölgesinde yer alan 677C/T varyantının enzim aktivitesini heterozigotlarda (CT) %35, homozigotlarda (TT) %70 azalttığı belirlenmiştir (24,26,27). Bu varyantın en yaygın fenotipi, homosistinüri/homosisteinemiye yol açan homosistein birikmesidir. *MTHFR* 677C/T varyantının erkek fertilitesi üzerindeki olumsuz etkisinin, düşük metilasyon nedeniyle spermatogenezde etkin rol oynayan genlerin ekspresyonunda meydana gelen değişime bağlı olabileceği düşünülmektedir.

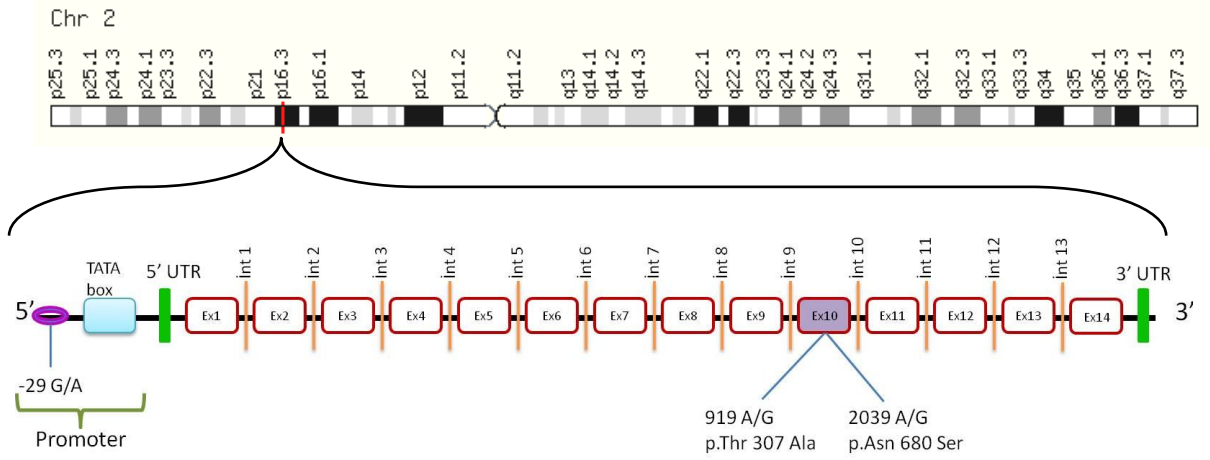
Alternatif görüşler; spermin, DNA hasarına neden olan toksik reaktif oksijen metabolitleri ile zarar görebileceği üzerinedir.

2.7. *FSHR* Geni (Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü) ve Erkek İnfertilitesi

FSH ve FSH reseptörü (*FSHR*) arasındaki etkileşim normal oogeneze ve spermatogenez için önemlidir. Follikül stimüle edici hormon; hipofiz bezinden salgılanan bir hormondur ve Luteinize edici hormonla (LH) beraber overlerin ve testislerin işlevine katkıda bulunur. Kadınlarda over folliküllerinin olgunlaşmasını, erkekte spermatozoonların üretimini ve olgunlaşmasını sağlar.

FSHR (Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptör) geni (NM_000145.3) 2 numaralı kromozomun p16.3 bölgesinde yer alır, 54 kb'lık bir bölgeyi kapsar, 14 ekzon ve 9 introndan oluşur (Şekil 3). Spermatogenezde yer alan hücrelerin normal işlevi, FSH reseptörünün (*FSHR*) ekspresyonuna bağlıdır. *FSHR* gen polimorfizmlerinin; FSH artışı, progesteron düşüşü ve semende sperm konsantrasyonlarında azalma ile ilişkilendirilebileceği belirtilmiştir. Ancak tek nükleotit polimorfizmleri (SNP'ler) de dahil olmak üzere *FSHR* varyantlarının erkek fertilitesi üzerindeki etkisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır (34).

Tapanainen ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmada; inaktive edici bir mutasyona sahip erkeklerde, değişen derecelerde spermatogenik başarısızlık görülmesine rağmen azospermi ya da infertilite görülmediğini tespit etmişlerdir (35, 52). 1999 yılında Simoni ve arkadaşları ise; idiyopatik infertiliteye sahip 48 erkekte *FSHR* tüm gen analizi yaparak, çalışma sonucunda *FSHR* mutasyonlarının idiyopatik erkek infertilitesinde patojen bir role sahip olmadığını belirlemişlerdir (36,60).



Şekil 6. *FSHR* gen yapısı ve yer alan tek nükleotit polimorfizmleri

Son yıllarda, *FSHR* geninde yer alan tek nükleotit polimorfizmleri (SNP'ler) üzerine çeşitli araştırmalar yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda araştırılan SNP'ler, FSH'nin etkisini değiştiren farklı *FSHR* haplotiplerine yol açmaktadır.

FSHR geninde ekzon 10'da, proteinin 307. aminoasit pozisyonuna karşılık gelen 919 A/G (rs6165) polimorfizmi ve 680. aminoasit pozisyonuna karşılık gelen 2039 A/G (rs6166) polimorfizmi bulunmaktadır (**Şekil 6**).

FSHR geninde yer alan 919A/G ve 2039 A/G polimorfizmlerinin, kadınlarda serum FSH seviyelerini, menstruel döngü uzunluklarını, follikül büyümesini ve over stimülasyonunu etkilediği belirtilmektedir (**60, 63**). Ancak bu polimorfizmlerin erkek infertilitesi üzerindeki etkisine dair henüz net bir veri elde edilememiştir. Yalnızca *FSHR* genini inaktive olması durumunda, homozigot olan erkeklerde spermatogenez başarısının etkilendiği belirtilmiştir. Bu iki polimorfizm, Beyaz Avrupalı popülasyonunda erkek infertilitesinde en sık karşılaşılan polimorfizmlerdir (**60, 62, 63, 64**).

Başka bir SNP olan G-29A (NM_000145.3:c.-29G>A) (rs1394205) ise, tek başına veya ekzon 10'daki SNP'ler ile birlikte *FSHR* geninin 5'-translasyon olmayan bölge'de (5'UTR) yer almaktadır (**Şekil 6**). *FSHR* geninin promotör bölgesinde yer alan bu polimorfizm, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını etkilemektedir. Bunun sonucunda genin ifadenmesinde düşüşe neden olarak serum FSH seviyelerinin düşmesi ile sonuçlanmaktadır (**63, 82**).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma (Proje No: KA 17/86) Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir. 2014-2016 yılları arasında Anabilim Dalımıza genetik test için başvuran ve biyolojik materyalinin başka bir çalışmada kullanılması için onay formu bulunan 156 hasta birey araştırmamıza dahil edilmiştir.

3.2. Hasta Grubu

2014-2016 yılları arasında Anabilim Dalımıza başvuran olgular, yönlendirildikleri ön tanıya göre azoospermi ve oligospermi, olguları olarak iki gruba ayrılmıştır. Çalışma kapsamına daha sonraki çalışmalar için kalan biyolojik materyalinin kullanılmasına izin veren olguların DNA örnekleri dahil edilmiştir. Bu kapsamda oligospermi ön tanısı ile daha önce Y-mikrodelesyonu taranarak delesyon saptanmamış, karyotipi 46,XY normal olarak rapor edilmiş 72 oligospermi olgusuna ve aynı şekilde Y-mikrodelesyonu taraması sonucunda delesyon saptanmamış, karyotipi 46,XY normal olarak rapor edilmiş 84 azoospermi olgusuna ait DNA örnekleri çalışılmıştır. Ayrıca çalışmaya dahil edilen hastaların FSH sonuçları da incelenmiş, 25 hastanın hormon analizi sonuçlarına ulaşılmıştır. Bu hastalardan 18 tanesinin hormon değerlerinin normal aralıkta, 2 tanesinin normal aralıktan daha düşük ve 5 tanesinin normal aralıktan daha yüksek değerde olduğu belirlenmiştir.

Çalışma kapsamına alınan hastalardan *MTHFR* genine ait C677T (rs1801133) ve A1298C (rs1801131), *DAZL* genine ait A260G ve A386G (rs121918346), *FSHR* genine ait G-29A (rs1394205), A919G (rs6165) ve A2039G (rs6166) polimorfizmleri çalışılmıştır. Her genin ilgili ekzonik bölgesi, bölgeye özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir tepkimesi ile çoğaltılmış, DNA örnekleri SNP bölgesine özgül restriksiyon enzimi ile kesilerek polimorfizmlerin varlığı araştırılmıştır.

3.3. Kullanılan kimyasal malzemeler

- Bölgeye özgü primerler (7 çift)
- Bölgeye özgül restriksiyon enzimleri (*AluI*, *MboII*, *HinFI*, *DdeI*, *HpyI88I*, *BsrI*)
- 0,5X TBE
- DNA molekül ağırlık belirteci (50bç, 100bç)

3.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Yatay elektroforez tankı (Cleaver Scientific)
- Elektroforez güç kaynağı (Consort)
- Jel görüntüleme sistemi (Syngene InGenius LHR)
- Mikro Pipet takımı (Eppendorf)
- Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA)
- Buz makinesi (Elektrolux)
- Mini santrifüj (Biosan combispin FVL-2400N)
- Derin dondurucu (Arçelik)
- Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)
- PZR tüpleri (0,2 ml ve 0,5 ml)
- PZR cihazı
- Etüv

3.3. DNA Örnekleri

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda planlanmış ve yürütülmüştür. Hasta grubunun seçimi Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada genetik çalışmalar için rıza-onay formu imzalatılarak periferik kan örnekleri gönderilmiş 156 hastanın arşiv DNA'ları kullanılmıştır.

3.3.1. DNA'nın konsantrasyon ve saflığının ölçümü

Ependorf marka 10 µl'lik pipet ile hastaların daha önceden izole edilip -20°C'de saklanan DNA örneklerinden 2µl alınarak hasta DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflığı Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA) kullanılarak ölçülmüştür. DNA konsantrasyonları 50-150 ng olan örnekler kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyona sahip DNA'lar 50 ng olacak şekilde sulandırılmıştır.

3.4. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) ve agaroz jelde görüntüleme

PZT reaksiyonları için polimorfizmlerin ait oldukları gen bölgelerine özgü primerler kullanılmıştır. Liyofilize halde ticari olarak satın alınan primerler firmanın belirttiği koşullara uygun olarak 100 pmol skalasında ana stok olarak sulandırılmış, 20 pmol ara stoklar halinde kullanılmıştır. Hasta DNA'ları ile çalışmaya başlamadan önce, daha önceden çalıştığı bilinen bir kontrol DNA'sı ile bağlanma sıcaklığı optimize edilmiş, kullanılan kimyasal ve reaktiflerin çalıştığı belirlenmiştir. Bu basamaktan sonra çalışmaya dahil edilen 156 DNA örneği ile reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Her bir PZT reaksiyonu için uygun çalışma koşulları ve Tm dereceleri primerlerin özelliklerine göre belirlenmiş olup her bölgeye özgü primer dizileri ve koşullar **Tablo 3**'te verilmiştir.

Tablo 3. *MTHFR*, *DAZL* ve *FSHR* genlerinin ilgili kodonları için kullanılan primer dizileri, amplicon büyüklükleri ve Tm dereceleri

Gen/SNP Bölgesi	Forward/ Reverse Primer Dizileri	PZT Ürünü (bp)	Tm (°C)	MgCl ₂ 25mM
<i>MTHFR</i> 677C/T	FWD:5'-CTTTGAGGCTGACCTGAAGC-3' RV: 5'-CTCACCTGGATGGGAAAGAT-3'	168 bp	60°C	2 mM
<i>MTHFR</i> 1298A/C	FWD:5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA-3' RV: 5'-CACTTTGTGACCATTCCGGT-3'	163 bp	61 °C	1,5 mM
<i>DAZL</i> 260A/G	FWD:5'-TCACATTATGTATAGGTTTTTC-3' RV: 5'-ATATAGCCTTGGCTGGTTGC-3'	150 bp	55°C	2 mM
<i>DAZL</i> 386A/G	FWD:5'-GAATGCTGAATTTTTACTCTTGAAG-3' RV: 5'-TGATAAAATTACTCACCCTTTGGGA-3'	151 bp	59°C	2 mM
<i>FSHR</i> -29G/A	FWD:5'-TCATAAGGGCACTGTGTGGA-3' RV: 5'-TTGGCAGAGAAAAACCCTGT-3'	187 bp	58°C	1 mM
<i>FSHR</i> 919A/G	FWD:5'-TCATCCAATTTGCAACAAATCTAT-3' RV: 5'-CCACTTCATTGCATAAGTCATAGTC-3'	161 bp	60°C	1,5 mM
<i>FSHR</i> 2039A/G	FWD:5'-CTTCATCCACTGTCCACAACA-3' RV:5'-CATTCAATACTCAGATACATTTTCACA-3'	150 bp	60°C	1,5 mM

PZT'ler, son hacim 25 µl olacak şekilde 25mM MgCl₂, 10mM deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP, 2.5mM) ve 5 U/µl Taq DNA polimeraz kullanılarak hazırlanmıştır.

DAZL 260A/G için PZT koşulları;

95 °C	5 dk	
94 °C	1 dk	} 40 döngü
55 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	10 dk	
+4 °C	∞	

DAZL 386A/G için PZT koşulları;

95 °C	5 dk	
94 °C	1 dk	} 40 döngü
59 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	10 dk	
+4 °C	∞	

MTHFR 677C/T için PZT koşulları;

95 °C	5 dk	
94 °C	1 dk	} 40 döngü
60 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	10 dk	
+4 °C	∞	

MTHFR 1298A/C için PZT koşulları;

95 °C	5 dk	
94 °C	1 dk	} 40 döngü
61 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	10 dk	
+4 °C	∞	

FSHR -29G/A için PZT koşulları;

95 °C	5 dk	
94 °C	1 dk	} 40 döngü
58 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	10 dk	
+4 °C	∞	

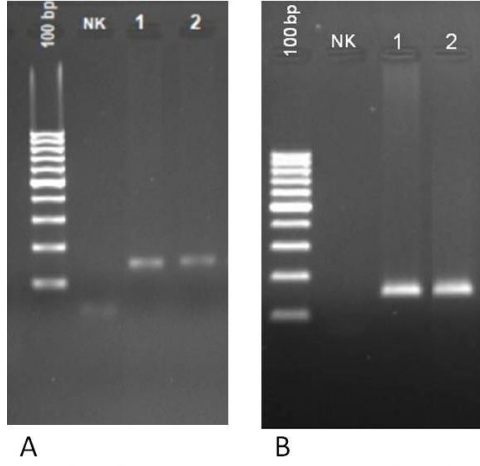
FSHR 919A/G için PZT koşulları;

95 °C	5 dk	
94 °C	1 dk	} 40 döngü
60 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	10 dk	
+4 °C	∞	

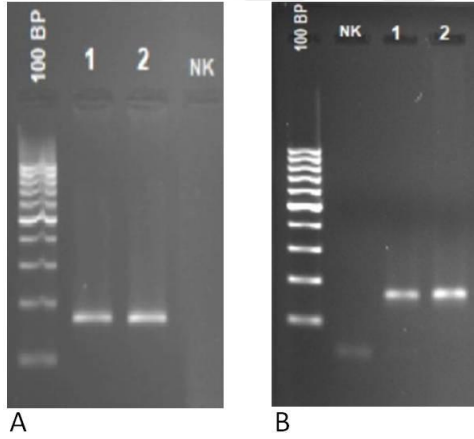
FSHR 2039A/G için PZT koşulları;

95 °C	5 dk	
94 °C	1 dk	} 40 döngü
60 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	10 dk	
+4 °C	∞	

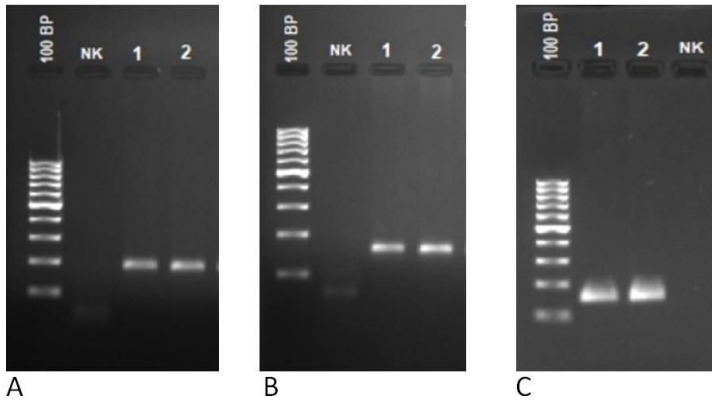
Tüm PZT ürünlerinin amplifikasyonu, etidyum bromür (EtBr) ile boyanmış %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 7-9).



Şekil 7. *DAZL* geni amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü. (A) *DAZL* 260A/G bölgesini içeren amplifikasyon ürünü (150 bç). (B) *DAZL* 386A/G bölgesini içeren amplifikasyon ürünü (151 bç). (100 bp: 100 bç molekül ağırlık belirteci, NK: negatif kontrol, 1-2: amplifikasyon ürünlerinin yüklendiği kuyular.)



Şekil 8. *MTHFR* geni amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü. (A) *MTHFR* 677C/T bölgesini içeren amplifikasyon ürünü (168 bç). (B) *MTHFR* 1298A/C bölgesini içeren amplifikasyon ürünü (163 bç). (100 bp: 100 bç molekül ağırlık belirteci, NK: negatif kontrol, 1-2: amplifikasyon ürünlerinin yüklendiği kuyular.)



Şekil 9. *FSHR* geni amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü (A) *FSHR* -29G/A bölgesini içeren amplifikasyon ürünü (187 bç). (B) *FSHR* 919A/G bölgesini içeren amplifikasyon ürünü (161 bç). (C) *FSHR* 2039A/G bölgesini içeren amplifikasyon ürünü (150bç). (100 bp: 100 bç molekül ağırlık belirteci, NK: negatif kontrol, 1-2: amplifikasyon ürünlerinin yüklendiği kuyular.)

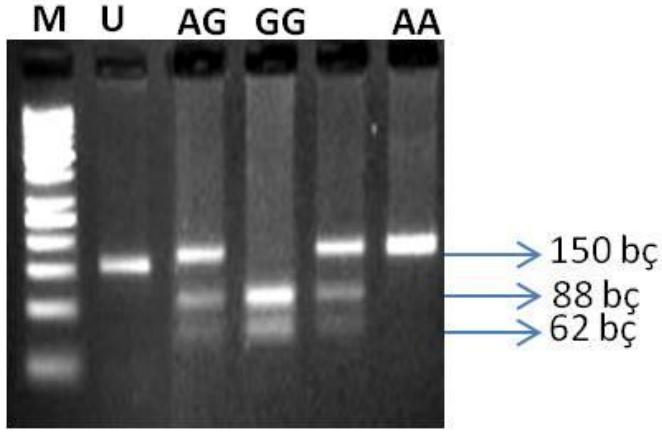
3.5. Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizm (RFLP) reaksiyonu ve Analizi

Her polimorfizm için, PZT ile çoğaltılan bölgeler; bölgeye özgü restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Enzimin kesim süresi ve sıcaklığı, enzimin veri sayfasındaki bilgilere göre uygulanmıştır (**Tablo 4**). Reaksiyonlar; 0,5 ml'lik tüplerde, 0,5µl enzim, 1µl tampon, 3,5µl distile su ve 5µl PZT ürünü eklenerek toplam 10 µl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. %3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülen restriksiyon enzim kesim ürünleri EtBr ile boyanarak, görüntülemesi Syngene InGenius LHR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

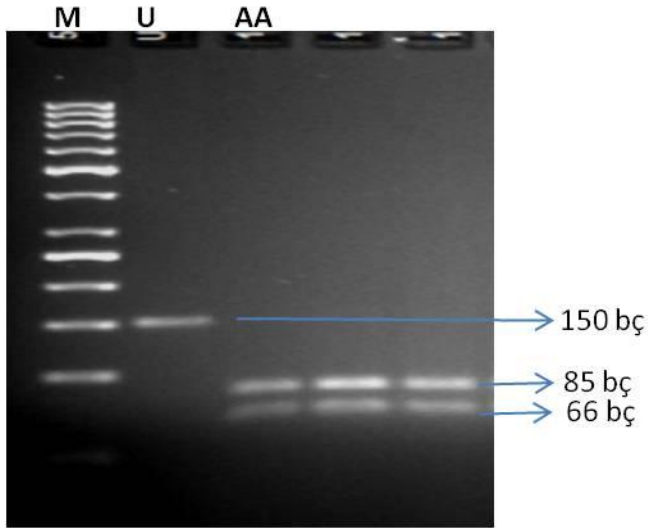
Tablo 4. RFLP analizinde kullanılan enzimler, kesim paternleri, inkübasyon süre ve sıcaklık dereceleri.

Gen Bölgesi	Restriksiyon Endonükleaz	Kesim Paterni	İnkübasyon Süresi	İnkübasyon sıcaklığı
<i>MTHFR 677C/T</i>	<i>HinfI</i>	CC: 168 bp CT: 168 bp, 122 bp, 46 bp TT: 122 bp, 46 bp	16 saat	37 °C
<i>MTHFR1289A/C</i>	<i>MboII</i>	AA: 30 bp, 27 bp, 19 bp AC: 57 bp, 30 bp, 27 bp, 19 bp CC: 57 bp, 30 bp, 27 bp	16 saat	37 °C
<i>DAZL 260A/G</i>	<i>DdeI (HpyF3I)</i>	AA: 150 bp AG: 150 bp, 88 bp, 62 bp GG: 88 bp, 62 bp	16 saat	37 °C
<i>DAZL 386A/G</i>	<i>AluI</i>	AA: 85 bp, 66 bp AG: 85 bp, 66 bp, 53 bp, 13 bp GG: 85 bp, 53 bp, 13 bp	16 saat	37 °C
<i>FSHR -29G/A</i>	<i>MboII</i>	GG: 112 bp, 72 bp GA: 187 bp, 112 bp, 72 bp AA: 187 bp	16 saat	37 °C
<i>FSHR 919A/G</i>	<i>Hpy188I</i>	AA: 95 bp, 54 bp, 12 bp AG: 95 bp, 66 bp, 54 bp, 12 bp GG: 95 bp, 66 bp	1 saat	37 °C
<i>FSHR 2039A/G</i>	<i>BsrI (BseNI)</i>	AA: 150 bp AG: 150 bp, 86 bp, 64 bp GG: 86 bp, 64 bp	16 saat	65 °C

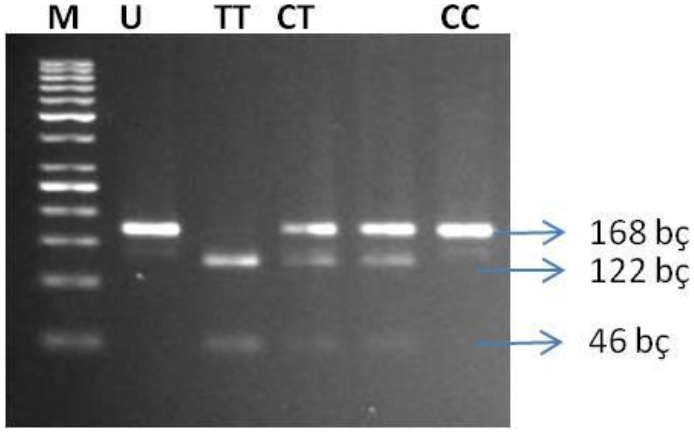
Çalışma kapsamına alınan hastaların ilgili gen bölgeleri için kesim paternleri aşağıdaki sunulan şekillerde (**Şekil 10-16**) genotipler belirlenerek, genotip ve allel frekansları grup içinde istatistiksel analize alınmıştır.



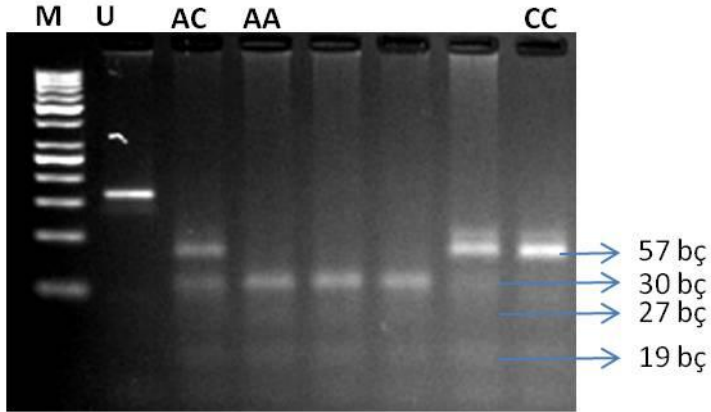
Şekil 10. *DAZL* geninin ekzon 2'de yer alan 260A/G tek nükleotit polimorfizminin DNA fragmanının (150 bç) *DdeI* (*HpyF3I*) kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü. (M: DNA molekül ağırlık belirteci (50bç), U: kesilmemiş PZT ürünü (150bç), AG: heterozigot genotip, GG: homozigot genotip, AA: yabancı tip genotip)



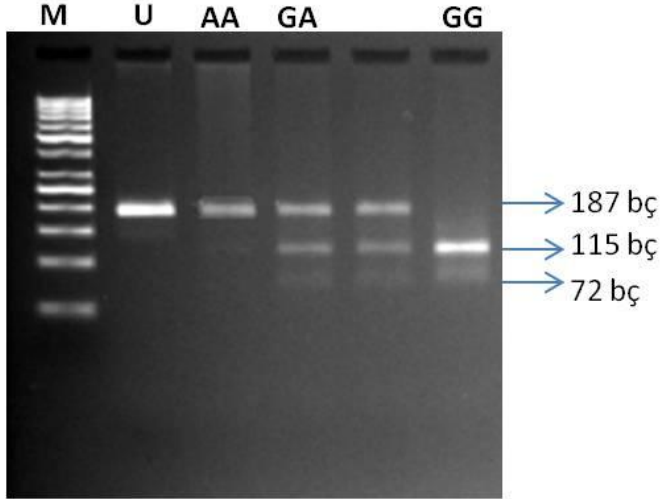
Şekil 11. *DAZL* geninin ekzon 3'te yer alan 386A/G tek nükleotit polimorfizminin DNA fragmanının (151 bç) *AluI* kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü. (M: DNA molekül ağırlık belirteci (50bç), U: kesilmemiş PZT ürünü (151bç), AA: yabancı tip genotip)



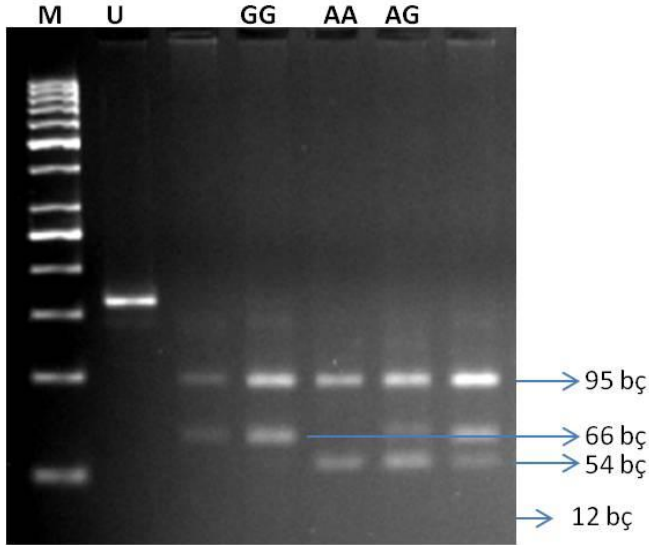
Şekil 12. *MTHFR* geninin ekzon 4'te yer alan 677 C/T tek nükleotit polimorfizminin DNA fragmanının (168 bç) *HinfI* kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü. (M: DNA molekül ağırlık belirteci (50bç), U: kesilmemiş PZT ürünü (168bç), TT: homozigot genotip, CT: heterozigot genotip, CC: yabancı tip genotip)



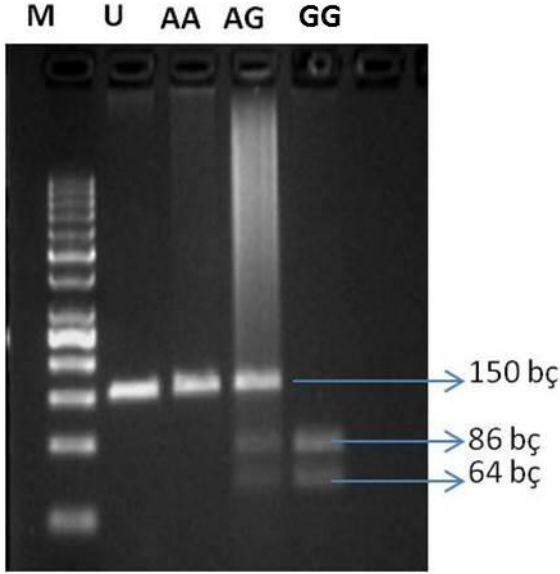
Şekil 13. *MTHFR* geninin ekzon 7'de yer alan 1298A/C tek nükleotit polimorfizminin DNA fragmanının (163 bç) *MboII* kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü. (M: DNA molekül ağırlık belirteci (50bç), U: kesilmemiş PZT ürünü (163bç) CC: homozigot genotip, AC: heterozigot genotip, AA: yabancı tip genotip)



Şekil 14. *FSHR* geninin promoter bölgesinde yer alan -29G/A tek nükleotit polimorfizminin DNA fragmanının (187 bç) *MboII* kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü. (M: DNA molekül ağırlık belirteci (50bç), U: kesilmemiş PZT ürünü (187bç) AA: homozigot genotip, GA: heterozigot genotip, GG: yabancı tip genotip)



Şekil 15. *FSHR* geninin ekzon 10'da yer alan 919A/G tek nükleotit polimorfizminin DNA fragmanının (161 bç) *HpyI88I* kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü. (M: DNA molekül ağırlık belirteci (50bç), U: kesilmemiş PZT ürünü (161bç) GG: homozigot genotip, AG: heterozigot genotip, AA: yabancı tip genotip)



Şekil 16. *FSHR* geninin ekzon 10'da yer alan 2039A/G tek nükleotit polimorfizminin DNA fragmanının (150bç) *BsrI* (*BseNI*) kesim enzimi ile kesim paterninin jel görüntüsü. (M: DNA molekül ağırlık belirteci (50bç), U: kesilmemiş PZT ürünü (150bç), GG: homozigot genotip, AG: heterozigot genotip, AA: yabancı tip genotip)

3.6. İstatistiksel analiz

Çalışma kapsamında değerlendirilen hastaların genotipleri ile çalışma grupları arasındaki ilişkinin analizinde Pearson ki-kare testi kullanılmıştır. Alleller ve çalışma grubu arasındaki ilişki Fischer-Exact testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelere ilişkin sonuçlar; n ve % oranı olarak ifade edilmiştir. $p < 0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS 17.0 yazılımı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan gruplar; aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, Başkent Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD ile Üroloji ABD’da azospermi tanısı almış 84 olgu ve oligospermi tanısı almış 72 olgu olmak üzere toplam 156 olgudan oluşturulmuştur.

Oligospermi ve azospermi grupları için tüm SNP genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı **Tablo 5 - 7**’de verilmiştir.

Tablo 5. DAZL 260A/G SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı

		Azoospermi (n=84)		Oligospermi (n=72)		Azoospermi & Oligospermi	
		Frekans	%	Frekans	%	p value	
DAZL 260A/G	Genotip						
	G/G	3	3,6	1	1,4	0,676	
	A/G	16	19,0	15	20,8		
	A/A	65	77,4	56	77,8		
	Total	84	100,0	72	100,0		
							p value & odd's ratio
	A/G+G/G	19	22,6	16	22,2	0,953	
	A/A	65	77,4	56	77,8	1,023 (0,481-2,177)	
	Allel						p value & odd's ratio
	A	146	86,9	127	88,2	0,731 0,888 (0,452 - 1,747)	
G	22	13,1	17	11,8			
Total	168	100,0	144	100,0			

Tablo 6. DAZL 386A/G SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı

		Azoospermi (n=84)		Oligospermi (n=72)		Azoospermi & Oligospermi	
		Frekans	%	Frekans	%	p value	
DAZL 386A/G	Genotip						
	G/G	0	0,0	0	0,0	-	
	A/G	0	0,0	0	0,0		
	A/A	84	100,0	72	100,0		
	Total	84	100,0	72	100,0		
							p value & odd's ratio
	A/G+G/G	0	0,0	0	0,0	-	
	A/A	84	100	72	100	-	
	Allel						
	A	168	100,0	144	100,0	-	
G	0	0,0	0	0,0			
Total	168	100,0	144	100,0			

4.1. DAZL 260A/G ve 386A/G polimorfizmlerine ait bulgular

Çalışma gruplarında DAZL 260A/G polimorfizmi; genotip ve allel dağılımı açısından $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). DAZL 260A/G polimorfizminin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi yoktur. DAZL 386A/G polimorfizmi için çalışma grubundaki tüm bireyler yabancı tipte genotipe sahip olmaları nedeniyle istatistiksel bir değerlendirmeye alınmamıştır.

Tablo 7. MTHFR 677C/T SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.

		Azoospermi (n=84)		Oligospermi (n=72)		Azoospermi & Oligospermi	
		Frekans	%	Frekans	%	p value	
MTHFR 677C/T	Genotip						
	T/T	11	13,1	7	9,7	0,329	
	C/T	42	50,0	30	41,7		
	C/C	31	36,9	35	48,6		
	Total	84	100,0	72	100,0		
							p value & odd's ratio
	C/T+T/T	53	63,1	37	51,4	0,140	
	C/C	31	36,9	35	48,6	1,617 (0,853 - 3,068)	
	Allel						
	C	104	61,9	90	62,5	0,403 1,223 (0,762 - 1,963)	
	T	64	38,1	54	37,5		
Total	168	100,0	144	100,0			

Tablo 8. MTHFR 1298A/C SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.

		Azoospermi (n=84)		Oligospermi (n=72)		Azoospermi & Oligospermi	
		Frekans	%	Frekans	%	p value	
MTHFR 1298A/C	Genotip						
	C/C	7	8,3	11	15,3	0,391	
	A/C	38	45,2	29	40,3		
	A/A	39	46,4	32	44,4		
	Total	84	100,0	72	100,0		
							p value & odd's ratio
	A/C+C/C	45	53,6	40	55,6	0,804	
	A/A	39	46,4	32	44,4	0,923 (0,490 - 1,737)	
	Allel						
	A	116	69,0	93	64,6	0,914 0,975 (0,616 - 1,543)	
	C	52	31,0	51	35,4		
Total	168	100,0	144	100,0			

4.2. *MTHFR* 677C/T ve *MTHFR* 1298A/C polimorfizmlerine ait bulgular

Çalışma gruplarında; *MTHFR* 677C/T ve *MTHFR* 1298A/C polimorfizmleri; genotip ve allel dağılımı açısından $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). *MTHFR* 677C/T ve *MTHFR* 1298A/C polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi yoktur.

Tablo 9. *FSHR* -29G/A SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.

		Azoospermi (n=84)		Oligospermi (n=72)		Azoospermi & Oligospermi	
		Frekans	%	Frekans	%	p value	
FSHR -29G/A	Genotip						
	A/A	8	9,5	5	6,9	0,844	
	G/A	35	41,7	31	43,1		
	G/G	41	48,8	36	50,0		
	Total	84	100,0	72	100,0		
							p value & odd's ratio
	G/A+A/A	43	51,2	36	50	0,882	
	G/G	41	48,8	36	50	1,049 (0,559 - 1,968)	
	Allel						
	G	117	69,6	103	71,5	0,716 0,913 (0,560 - 1,489)	
A	51	30,4	41	28,5			
Total	168	100,0	144	100,0			

Tablo 10. *FSHR* 919A/G SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.

		Azoospermi (n=84)		Oligospermi (n=72)		Azoospermi & Oligospermi	
		Frekans	%	Frekans	%	p value	
FSHR 919A/G	Genotip						
	G/G	24	28,6	14	19,4	0,264	
	A/G	47	56,0	41	57,0		
	A/A	13	15,5	17	23,6		
	Total	84	100,0	72	100,0		
							p value & odd's ratio
	A/G+G/G	71	89,3	55	76,4	0,031*	
	A/A	13	10,7	17	23,6	2,576 (1,069 - 6,208)	
	Allel						
	A	73	43,5	75	52,1	0,128 0,707 (0,452 - 1,106)	
G	95	56,5	69	47,9			
Total	168	100,0	144	100,0			

Tablo 11. *FSHR* 2039A/G SNP genotipinin ve allel frekanslarının gruplar arası dağılımı.

		Azoospermi (n=84)		Oligospermi (n=72)		Azoospermi & Oligospermi
		Frekans	%	Frekans	%	p value
<i>FSHR</i> 2039A/G	Genotip					
	G/G	25	29,8	13	18,1	0,17
	A/G	44	52,4	40	55,5	
	A/A	15	17,9	19	26,4	
	Total	84	100,0	72	100,0	
	p value & odd's ratio					
	A/G+G/G	69	82,1	53	73,6	0,198
	A/A	15	17,9	19	26,4	1,649 (0,767 - 3,547)
	Allel					
	A	74	44,0	78	54,2	0,075 0,666 (0,426 - 1,042)
	G	94	56,0	66	45,8	
Total	168	100,0	144	100,0		

4.3. *FSHR* -29G/A ve *FSHR* 2039A/G polimorfizmlerine ait bulgular

Çalışma gruplarında *FSHR* -29G/A ve *FSHR* 2039A/G polimorfizmleri; genotip ve allel dağılımı açısından $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). *FSHR* -29G/A ve *FSHR* 2039A/G polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi yoktur.

Tablo 12. Hormon değerlerine göre hastaların *FSHR* -29G/A polimorfizmi için genotip dağılımları.

FSH düzeyleri	Normal	Yüksek	Düşük
Genotip			
A/G	9	2	2
G/G	2	-	-
A/A	7	3	-

Tablo 13. Hormon değerlerine göre hastaların *FSHR* 2039A/G polimorfizmi için genotip dağılımları.

FSH düzeyleri	Normal	Yüksek	Düşük
Genotip			
A/G	12	-	2
G/G	3	4	-
A/A	3	1	-

4.4. *FSHR* 919A/G polimorfizmine ait bulgular

Çalışma gruplarında *FSHR* 919A/G polimorfizmi; genotip ve allel dağılımı açısından $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). *FSHR* 919A/G polimorfizminin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi yoktur. Ancak AG heterozigot ve GG homozigot genotipleri polimorfik grup içerisinde bir arada ele alınarak, AA wild type genotipi ile istatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde karşılaştırıldığında; *FSHR* 919A/G polimorfizminin polimorfik genotipleri ve yabancı tip genotipinin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkı vardır ($p < 0,05$; $p = 0,031$).

Tablo 14. Hormon değerlerine göre hastaların *FSHR* 919A/G polimorfizmi için genotip dağılımları.

FSH düzeyleri	Normal	Yüksek	Düşük
Genotip			
A/G	13	-	2
G/G	4	4	-
A/A	1	1	-

5. TARTIŞMA

İnfertilite, en az bir yıl boyunca korunmasız ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamayan çiftlerin yaklaşık %15'ini etkileyen bir sağlık problemidir. İnfertilite vakalarının %50'den fazlası erkek kaynaklı, erkek infertilite vakalarının %10-15'i genetik temele dayalıdır. Günümüzde genom bazında yapılan çalışmaların artmasıyla, spermatogenez ve oogeneze rol oynayan genlerin araştırılmaya başlanması; infertilitenin tanı ve tedavi stratejileri için giderek önem kazanmaya başlamıştır. Bu çalışmalarla birlikte erkek infertilitesi ve genetik arasındaki ilişki giderek ortaya çıkarılmakta ve infertilite genetiğinin araştırılmasına dayalı çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Erkek infertilitesinin heterojen ve multifaktöriyel olması ve genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin de fertilitate üstünde büyük etkisinin olması infertiliteyi karmaşık bir süreç haline getirmektedir. Bu nedenle infertilite çalışmaları da karmaşık ve zor çalışmalardır.

Erkek infertilitesinin genetik temelini araştırmak üzere moleküler düzeyde yapılan çalışmalar ışığında; kromozomal anomaliler, Y kromozom delesyonları, translokasyonlar, bazı gen mutasyonları ve polimorfizmleri, diğer genetik ve moleküler etkenlerin yanında çevresel faktörlerin de (kimyasal maruziyeti, çalışma koşulları, sigara kullanımı, yaşam tarzı, vb.) infertilite için risk teşkil ettiği ortaya koyulmuştur.

Erkek fertilitesi üzerinde pek çok genin etkisi olmasına rağmen polimorfizm çalışmaları söz konusu olduğunda, 2008 yılından itibaren yapılan SNP analizlerinde, homosistein veya folat metabolizmasında yer alan enzimleri kodlayan genlerden biri olan *MTHFR* geni, gametogenezde etkili olan hormonlardan biri olan *FSH reseptör* geni ve mutasyonlarının erkeklerde şiddetli spermatogenik başarısızlığa neden olduğu belirlenen *DAZL* geni; erkek infertilitesi genetiğinin araştırılması için yapılan çalışmalarda etki mekanizmaları nedeniyle ön plana çıkan genlerdir.

Bu tez çalışmamızda *MTHFR*, *FSHR* ve *DAZL* genlerinin bazı polimorfizmlerini Türk popülasyonunda araştırmayı ve elde ettiğimiz sonuçları çalışmaya dahil edilen olguların klinik bulgularıyla ilişkilendirmeyi hedefledik.

Bu tez çalışmasında araştırılmış olan *DAZL*, *MTHFR* ve *FSHR* genlerine ait polimorfizmler farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarla da araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu genlerin yanısıra; sirkadyan ritim, hücre farklılaşması ve çoğalması, DNA hasarı ve onarımı gibi pek çok temel hücresel mekanizmada yer alan çeşitli genlerin polimorfizmlerinin de infertilite ile ilişkisi çeşitli

populasyonlarda çalışılmıştır (**Tablo 4**) (**43**). Sirkadyan ritim, embriyonik gelişim, DNA onarımı, transkripsiyon gibi genel hücrel işlevlerde görev alan *ARNTL*, *CHD2*, *CRISP2*, *POLG*, *TP53* gibi genlerin polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ile ilişkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır. *BCL2*, *BRCA2*, *CLOCK*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *HLA-DRA*, *MTHFR*, *PARP*, *TNF* gibi genlerin polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu ve infertilite etkeni olabileceği sonucuna varılırken; *ATM*, *CAT*, *MTRR*, *SIRPG*, *SOX* gibi genlerin polimorfizmlerinin erkek infertilitesi için etken olup olmadığına dair çelişkili sonuçlar elde edilmiş ve çalışmaların detaylandırılması gerektiği belirtilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda; spesifik olarak spermatogenez sürecinde görev alan genlerden *EPPIN*, *HORMAD1*, *PRM1*, *SPATA17*, *STRA8* ve endokrin işlevde görev alan *AR*, *MSMB* gibi genlerin polimorfizmleri infertilite ile ilişkili bulunurken; *BRDT*, *NANOS1*, *PIWIL1*, *PRDM9*, *PRM2*, *TEX15* ve *INSR* gibi genlerin polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerinde etkisinin olmadığı sonucu elde edilmiştir. Spermatogenezde görev alan *DAZL*, *SEPT12* ve *SPO11* genlerinin ve endokrin işlevde görev alan *ESR1*, *ESR2* genlerinin polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerindeki etkisinin olup olmadığına dair farklı çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiş ve daha detaylı verilerle araştırılması gerektiği vurgulanmıştır (**43**).

DAZL genine ait 260A/G ve 386A/G (rs121918346) polimorfizmleri; Çin (**54,18,56**), İtalya (**20,21,57**), Tayvan (**77**), Almanya (**22**), Japonya'da (**23**) ve Beyaz Avrupalı populasyonunda (**74**) yapılan çalışmaların yanı sıra çeşitli meta-analiz çalışmalarıyla (**12,18**) da araştırılmış ancak bu çalışma sonuçları "klinik açıdan önemi bilinmiyor", "infertilite ile bağlantılı değil" ya da "etnik köken ile birlikte araştırılması gerekmektedir" şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca, 386A/G polimorfizminin AZFc-delesyona uğramış erkeklerin fenotipini kötüleştirmediği ortaya koyulmuştur (**19**). Ülkemizde *DAZL* geninde yer alan SNP'lerin infertil erkek bireylerdeki rastlanma sıklığı bilinmemekle beraber ilk genotip verileri tez çalışmamızdan çıkmıştır. Ülkemizde *DAZL* genine ait herhangi bir genotip verisi bulunmazken araştırmamızda azospermi ve oligospermi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışmamızda 260A/G polimorfizmine ait yabancı tip (AA) genotip frekansı %77.8, heterozigot (AG) genotip frekansı %20.8 ve homozigot (GG) genotip frekansı %1.4 olarak bulunmuştur ve $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde *DAZL* geni 260A/G polimorfizminin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır.

Çalışmamızın verileri daha önce farklı ülke ve populasyonlarda yapılan çalışma sonuçlarıyla kıyaslandığında, *DAZL* 260A/G polimorfizminin erkek infertilitesi üzerinde etkisinin olmadığını destekler niteliktedir. Ancak *DAZL* 386 A/G polimorfizmine ait çalışma grubundaki tüm bireyler yabancı tipte genotipe sahip olmaları nedeniyle istatistiksel bir değerlendirmeye alınmamıştır.

MTHFR genine ait 677C/T (rs1801133) ve 1298A/C (rs1801131) polimorfizmleri; Kore (66), Pakistan (67), Polonya (68), Ürdün (69), İran (70) ve Türkiye (81) populasyonlarında yapılan genetik çalışmaları ve meta-analiz çalışmaları (51,71,72,73) ile araştırılmıştır. Bu araştırmaların sonuçları incelendiğinde; çoğunlukla 677C/T polimorfizminin erkek infertilitesi için risk oluşturabileceği bazı araştırmalarla desteklenmiş; ancak homojen olmayan popülasyon seçimi ve etnik farklılıklar nedeniyle kesin veriler elde edilememiştir. Diğer yandan, aynı populasyonlarda *MTHFR* geninde 1298A/C polimorfizmi için anlamlı bir sonuç bulunamadığı yayınlanmıştır. Almanya (28), Hindistan (29) ve Kore (30) çalışmaları, hem homozigot (TT) hem de heterozigot (CT) *MTHFR* polimorfizmi ve azoospermi-oligozoospermi arasında bir ilişki olduğunu gösterirken, Hollanda'dan (31) ve İtalya'dan (32,33) yapılan çalışmalardan çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.

Türkiye'de bu polimorfizmlere ait, ilk olarak 2014 yılında yapılan çalışmada 75 azoospermi, 62 oligozoospermi hastası ve 134 sağlıklı bireyden oluşan çalışma grubunda 677C/T ve 1298A/C polimorfizmleri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda; hasta ve kontrol grupları arasında, 677C/T polimorfizmi için anlamlı derecede fark olduğu ve infertilite için artmış risk oluşturduğu bulunurken, 1298A/C polimorfizmi için ilişki bulunmamıştır. Bu çalışma sonucunda infertil grupta; 677C/T polimorfizmine ait yabancı tip (CC) genotip frekansı %51.1, heterozigot (CT) genotip frekansı %35.8 ve homozigot (TT) genotip frekansı %13.1 olarak bulunurken; 1298A/C polimorfizmine ait yabancı tip (AA) genotip frekansı %46, heterozigot (AC) genotip frekansı %43.1 ve homozigot (CC) genotip frekansı %10.9 olarak bulunmuştur. Fertil grupta ise 677C/T polimorfizmine ait yabancı tip (CC) genotip frekansı %53, heterozigot (CT) genotip frekansı %41 ve homozigot (TT) genotip frekansı %6 olarak bulunurken; 1298A/C polimorfizmine ait yabancı tip (AA) genotip frekansı %36.6, heterozigot (AC) genotip frekansı %49.3 ve homozigot (CC) genotip frekansı %14.2 olarak bulunmuştur (80). Ayrıca yine 2014 yılında Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada 50 azoospermi, 50 oligozoospermi hastası ve

50 sağlıklı bireyden oluşan çalışma grubunda 677C/T ve 1298A/C polimorfizmleri ele alınmış; çalışma sonucunda, hasta ve kontrol grupları arasında, 677C/T polimorfizmi için anlamlı derecede fark olduğu ve infertilite için artmış risk oluşturduğu bulunurken, 1298A/C polimorfizmi için ilişki bulunmamıştır. Bu çalışma sonucunda infertil grupta; 677C/T polimorfizmine ait yabanıl tip (CC) genotip frekansı %44, heterozigot (CT) genotip frekansı %44 ve homozigot (TT) genotip frekansı %12 olarak bulunurken; 1298A/C polimorfizmine ait yabanıl tip (AA) genotip frekansı %45, heterozigot (AC) genotip frekansı %41 ve homozigot (CC) genotip frekansı %14 olarak bulunmuştur. Fertil grupta ise 677C/T polimorfizmine ait yabanıl tip (CC) genotip frekansı %60, heterozigot (CT) genotip frekansı %40 ve homozigot (TT) genotip frekansı %0 olarak bulunurken; 1298A/C polimorfizmine ait yabanıl tip (AA) genotip frekansı %38, heterozigot (AC) genotip frekansı %44 ve homozigot (CC) genotip frekansı %18 olarak bulunmuştur (81). Bu tez çalışmasının verilerine göre azospermi ve oligospermi grupları arasında *MTHFR* geni polimorfizmleri için anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışmamızın sonucunda; azospermik grupta 677C/T polimorfizmine ait yabanıl tip (CC) genotip frekansı %36.9, heterozigot (CT) genotip frekansı %50 ve homozigot (TT) genotip frekansı %13.1 olarak bulunurken; 1298A/C polimorfizmine ait yabanıl tip (AA) genotip frekansı %46.4, heterozigot (AC) genotip frekansı %45.2 ve homozigot (CC) genotip frekansı %8.3 olarak bulunmuştur. Oligospermik grupta ise 677C/T polimorfizmine ait yabanıl tip (CC) genotip frekansı %48.6, heterozigot (CT) genotip frekansı %41.7 ve homozigot (TT) genotip frekansı %9.7 olarak bulunurken; 1298A/C polimorfizmine ait yabanıl tip (AA) genotip frekansı %44.4, heterozigot (AC) genotip frekansı %40.3 ve homozigot (CC) genotip frekansı %15.3 olarak bulunmuştur. Çalışmamızın verilerine göre *MTHFR* geni 677C/T ve 1298A/C polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır. Çalışmamızın verileri daha önce farklı ülke ve populasyonlarda yapılan çalışma sonuçlarıyla kıyaslandığında, *MTHFR* 677C/T polimorfizmi için diğer ülkelerde yapılan çalışma sonuçlarıyla çelişir niteliktedir. Ancak *MTHFR* 1298A/C polimorfizmi farklı ülke ve populasyonlarda yapılan çalışma sonuçlarıyla kıyaslandığında benzer veriler elde edilmiştir ve erkek infertilitesi üzerinde etkisinin olmadığını destekler niteliktedir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler; *MTHFR* 677 C/T ve 1298 A/C polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerinde etkisinin olmadığını desteklemektedir.

FSHR genine ait -29G/A (rs1394205), 919A/G (rs6165) ve 2039A/G (rs6166) polimorfizmleri; Japonya'da (58), Türkiye'de (59), Çin'de (76), Ukrayna'da (34), İran'da (62), İtalya'da (65) yapılan çalışmalarla ve meta analizlerle (61,63,64) araştırılmış; "gen polimorfizmleri infertilite için artmış risk oluşturur", "bağlantılı değildir", "etnik kökenle birlikte çalışmalıdır", "farklı polimorfizmlerin kombinasyonları infertiliteyi etkileyebilir" gibi değişken sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Türkiye'de 2010 yılında yapılmış olan çalışmada; 150 azoospermi, 120 oligozoospermi hastası ve 240 sağlıklı bireyden oluşan çalışma grubunda -29G/A ve 2039A/G polimorfizmleri çalışılmış; ancak erkek infertilitesi ile bağlantılı anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (59). Bu çalışma sonucunda azoospermik grupta; -29G/A polimorfizmine ait yabanıl tip (GG) genotip frekansı %77.3, heterozigot (GA) genotip frekansı %17.3 ve homozigot (AA) genotip frekansı %5.3 olarak bulunurken; 2039A/G polimorfizmine ait yabanıl tip (AA) genotip frekansı %62.7, heterozigot (AG) genotip frekansı %30.7 ve homozigot (GG) genotip frekansı %6.6 olarak bulunmuştur. Oligospermik grupta; -29G/A polimorfizmine ait yabanıl tip (GG) genotip frekansı %72.5, heterozigot (GA) genotip frekansı %22.5 ve homozigot (AA) genotip frekansı %5 olarak bulunurken; 2039A/G polimorfizmine ait yabanıl tip (AA) genotip frekansı %68.2, heterozigot (AG) genotip frekansı %10.8 ve homozigot (GG) genotip frekansı %20.8 olarak bulunmuştur. Fertil grupta ise -29G/A polimorfizmine ait yabanıl tip (GG) genotip frekansı %74.2, heterozigot (GA) genotip frekansı %20.4 ve homozigot (AA) genotip frekansı %5.4 olarak bulunurken; 2039A/G polimorfizmine ait yabanıl tip (AA) genotip frekansı %64.2, heterozigot (AG) genotip frekansı %20.4 ve homozigot (GG) genotip frekansı %15.4 olarak bulunmuştur (59). Bu nedenle, *FSHR* haplotiplerinin, tek başına veya kombinasyon halinde bulunması durumunda, spermatogenezini etkileyebilecek gen polimorfizmlerini temsil etmesinin olası olmadığı belirtilmektedir. Bu polimorfizmlerin öneminin, muhtemelen farklı etnik kökenlerden gelen diğer popülasyonlarda yapılacak genetik tarama çalışmaları ile doğrulanması gerekli görülmektedir.

Araştırmamızda azoospermi ve oligospermi grupları arasında *FSHR* geni -29 G/A, 919 A/G ve 2039 A/G polimorfizmleri için anlamlı bir fark bulunamamıştır ve bu polimorfizmlerin erkek infertilitesi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca *FSHR* -29 G/A polimorfizmi için FSH değeri normal aralıktan daha yüksek çıkan 5 hastadan 2 tanesinin heterozigot (GA), 3 tanesinin

yabanıl tip (GG); normal aralıktan daha düşük çıkan 2 hasta heterozigot (GA); normal aralıkta çıkan 18 hastadan 9 tanesinin heterozigot (GA), 2 tanesinin homozigot (AA), 7 tanesinin ise yabanıl tip (GG) genotipe sahip olduğu belirlenmiştir. *FSHR* 2039 A/G polimorfizmi için FSH değeri normal aralıktan daha yüksek çıkan 5 hastadan 4 tanesinin homozigot (GG), 1 tanesinin yabanıl tip (AG); normal aralıktan daha düşük çıkan 2 hastanın heterozigot (AG); normal aralıkta çıkan 18 hastadan 12 tanesinin heterozigot (AG), 3 tanesinin homozigot (GG), 3 tanesinin ise yabanıl tip (AA) genotipe sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak 919 A/G polimorfizmi için AG heterozigot ve GG homozigot genotipleri polimorfik grup içerisinde bir arada ele alınarak, AA yabanıl tip genotip ile karşılaştırıldığında; *FSHR* 919 A/G polimorfizminin polimorfik genotipleri ve yabanıl tip genotipin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkının olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($p=0,031$, $p<0,05$). Ayrıca *FSHR* 919 A/G polimorfizmi için FSH değeri normal aralıktan daha yüksek çıkan 5 hastadan 4 tanesinin homozigot (GG), 1 tanesinin yabanıl tip (AG); normal aralıktan daha düşük çıkan 2 hasta heterozigot (GA); normal aralıkta çıkan 18 hastadan 13 tanesinin heterozigot (AG), 4 tanesinin homozigot (GG), 1 tanesinin ise yabanıl tip (AA) genotipe sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda -29G/A polimorfizmine ait yabanıl tip (GG) genotip frekansı %50.0, heterozigot (GA) genotip frekansı %43.1 ve homozigot (AA) genotip frekansı %6.9 olarak; 919A/G polimorfizmine ait yabanıl tip (AA) genotip frekansı %23.6, heterozigot (AG) genotip frekansı %57.0 ve homozigot (GG) genotip frekansı %19.4 olarak; 2039A/G polimorfizmine ait yabanıl tip (AA) genotip frekansı %26.4, heterozigot (AG) genotip frekansı %55.5 ve homozigot (GG) genotip frekansı %18.1 olarak bulunmuştur. Çalışmamızın verilerine göre *FSHR* geni -29 G/A, 919 A/G ve 2039 A/G polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmazken 919 A/G polimorfizmi için AG heterozigot ve GG homozigot polimorfik genotiplerinin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olabileceği, kontrol grubu ve daha fazla sayıda bireyle yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla test edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Son yıllarda infertilite ve infertilite genetiği alanında yapılan araştırma çalışmaları ve genetik bazlı meta-analiz çalışmaları göz önüne alındığında, populasyonlara özgü aday genlerin genotip verilerinin karşılaştırmalı çalışmalarının oldukça önemli olduğu görülmektedir. Literatürdeki tüm bu bilgiler bir arada ele

alındığında hem genetik hem de çevresel faktörlerin erkek infertilitesinin gelişim sürecini etkilediği görülmektedir. Sağlıklı fertil bireyler ile infertil gruptaki genotiplerin belirlenmesi ve olası risk allellerinin belirlenmesi toplum sağlığı açısından değerli olacaktır.

İnfertilitenin gelişim sürecinde belirlenen olası aday genlerdeki mutasyon ve polimorfizm profillerinin belirlenmesi biyolojik mekanizmaların aydınlatılmasına ve infertilitenin gelişimi, teşhisi ve tedavisine ışık tutacaktır.

Geçtiğimiz son 15 yılda, erkek infertilitesinin genetik, epigenetik ve çevresel etmenlerden kaynaklanabilen oldukça heterojen ve multifaktöriyel bir hastalık olduğu anlaşılmıştır. Bu sebeple, popülasyon bazında yapılabilecek SNP analizlerinin infertilite kapsamında değerli bilgiler sağlayacağına inanmaktayız.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışma kapsamına alınan gruplar; aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan azoospermi ve idiyopatik infertilite tanısı almış 84 azoospermili, 72 oligospermili olan toplam 156 olguda *DAZL* geninde A260G ve A386G; *MTHFR* geninde C677T ve A1298C; *FSHR* geninde G-29A, A919G ve A2039G SNP genotipleri belirlenerek allel frekanslarının gruplar arası dağılımı değerlendirilmiştir.
2. *DAZL* genine ait 260 A/G, *MTHFR* genine ait 677 C/T ve 1298 A/C, *FSHR* genine ait -29 G/A ve 2039 A/G tek nükleotit polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).
3. *DAZL* geninde 386A/G polimorfizmi çalışma grubundaki tüm bireylerin yabancı tip genotipe sahip olmaları nedeniyle istatistiksel bir değerlendirmeye alınmamıştır.
4. *FSHR* geninde 919 A/G polimorfizminin AG heterozigot ve GG homozigot genotipleri, AA yabancı tip genotip ile $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde incelendiğinde $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde ($p=0,031/p<0,05$) çıkmış olması nedeniyle, sağlıklı bireylerde de ilgili polimorfizmin çalışılması gruplar arası karşılaştırmada daha sağlıklı sonuçların alınmasına yardımcı olacaktır.
5. Erkek infertilitesinin multifaktöriyel olması ve gen-çevre etkileşiminin fertilité üzerinde etkisinin olması nedeniyle infertilite olguları; yaşam tarzı, yaşanan ve maruz kalınan çevre koşulları, sigara ve alkol kullanımı, kimyasal maruziyeti, bireylerin etnik kökeni gibi parametrelerle birlikte ele alınarak çalışılmalıdır.
6. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin; daha fazla sayıda hasta ve kontrol grubuyla birlikte genetik faktörler dışında çevresel etkenler ve etnik köken de dikkate alınarak daha kapsamlı olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.
7. Fertil ve infertil bireylerde ilgili polimorfizm profillerinin belirlenmesinin; infertilitenin biyolojik mekanizmasının aydınlatılmasına ve infertilitenin gelişimi, teşhisi ve tedavisine ışık tutacağı inancındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology* 2006 Aug;22(2):133-41. Epub 2006 Jun 27. PMID:16806807 doi:10.1016/j.reprotox.2006.04.016
2. Ferlin A, Foresta C. New genetic markers for male infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2014 Jun;26(3):193-8. PMID:24743183 doi: 10.1097/GCO.0000000000000061.
3. Krausz C, Chianese C. Genetic testing and counselling for male infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014 Jun; 21(3):244-50. PMID:24739313 doi:10.1097/MED.0000000000000058.
4. Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br J Nurs.* 2016 Oct 13;25(18):S35-S40. PMID:27734725 DOI:10.12968/bjon.2016.25.18.S35.
5. Agarwal A. Male reproductive system anatomy and physiology. Research Gate 259687319
6. Dada R, Thilagavathi J, Venkatesh S. Genetic Testing in Male Infertility. *The Open Reproductive Science Journal*, 2011, 3, 42- 56.
7. Kruger TF, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod. Update.* 1999 Mar- Apr; 5 (2): 172- 8. Review.
8. Carrell DT. *The Genetics of Male Infertility.* 2007, Humana Press Inc.
9. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 2002;10:303–12.
10. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;6:245–50.
11. Vogt PH, Edelmann A, Hirschmann P. The azoospermia factor [AZF] of the human Y chromosome in Yq11: function and analysis in spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:685–93.
12. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* 1976;34:119–24, 15.
13. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S. Human Y chromosome azoospermia factors [AZF] mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996;5:933–43.
14. Ferlin A, Moro E, Rossi A. The human Y chromosome's azoospermia factor b [AZFb] region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet* 2003;40:18–24.
15. Ferlin A, Garolla A, Foresta C. Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:310–6.
16. Tsui S, Dai T, Roettger S. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. *Genomics* 65: 266-273, 2000.
17. Reijo R, Lee TY, Salo P. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet.* 10: 383-393, 1995.

18. Chen P, Wang X, Xu C. Association of polymorphisms of A260G and A386G in DAZL gene with male infertility: a meta analysis and systemic review. 2016, Asian Journal of Andrology, 18, 96–101.
19. Teng YN, Lin YM, Lin YH. Association of a single-nucleotide polymorphism of the deleted-in-azoospermia-like gene with susceptibility to spermatogenic failure. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:5258–64.
20. Bartoloni L, Cazzadore C. Lack of the T54A polymorphism of the DAZL gene in infertile Italian patients. Mol Hum Reprod 2004;10:613–5.
21. Becherini L, Guarducci E, Degl’Innocenti S. DAZL polymorphisms and susceptibility to spermatogenic failure: an example of remarkable ethnic differences. Int J Androl 2004;27:375–81.
22. Tschanter P, Kostova E, Luetjens CM. No association of the A260G and A386G DAZL single nucleotide polymorphisms with male infertility in a Caucasian population. Hum Reprod 2004;19:2771–6.
23. Yang XJ, Shinka T, Nozawa S. Survey of the two polymorphisms in DAZL, an autosomal candidate for the azoospermic factor, in Japanese infertile men and implications for male infertility. Mol Hum Reprod 2005;11:513–5.
24. Mancheng G, Wenjing D, Tingyu H. *MTHFR* 677C>T polymorphism increases the male infertility risk: a meta-analysis involving 26 studies. PLoS One. 2015; 10(3): e0121147. doi: 10.1371/journal.pone.0121147
25. Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nature Genet. 10: 111-113, 1995.
26. Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between whites and blacks. Am J Hum Genet 1997;60:229–30.
27. Schneider JA, Rees DC, Liu YT. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. Am J Hum Genet 1998;62:1258–60.
28. Bezold G, Lange M, Peter RU. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. N Engl J Med 2001;344:1172–3
29. Singh K, Singh SK, Sah R. Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population. Int J Androl 2005;28:115-9.
30. Park JH, Lee HC, Jeong YM. *MTHFR* C677T polymorphism associates with unexplained infertile male factors. J Assist Reprod Genet 2005;22:361–8.
31. Ebisch IM, Van Heerde WL, Thomas CM. C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. Fertil Steril 2003;80:1190–4.
32. Stuppia L, Gatta V, Scarciolla O. The methylenetetrahydrofolate reductase [*MTHFR*] C677T polymorphism and male infertility in Italy. J Endocrinol Invest 2003;26:620–2.

33. Paracchini V, Garte S, Taioli E. MTHFR C677T polymorphism, GSTM1 deletion and male infertility: a possible suggestion of a gene-gene interaction? *Biomarkers* 2006;11:53–60.
34. Zhylkova I, Feskov O, Fedota O. FSHR Gene Polymorphisms Causes Male Infertility, 2016, *Open Journal of Genetics*, 6, 1-8.
35. Saxena R, Brown LG, Hawkins T. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet.* 1996 Nov;14(3):292-9.
36. Simoni M, Gromoll J, Hoppner W. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone [FSH] receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84: 751–5.
37. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:368–73.
38. Ahda Y, Gromoll J. Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotype distribution in normozoospermic and azoospermic men. *J Androl* 2005;26:494–9.
39. Casarini L, Santi D, Marino M. Impact of gene polymorphisms of gonadotropins and their receptors on human reproductive success 2015, *Reproduction* 150 R175–R184.
40. Wu QY, Shui YC, Xia XY. FSH and FSHR gene polymorphisms and male infertility: An update, 2015;21(11):1031-4.
41. Gençdal S, Aka Satar D. Sperm Değerlendirmesi. *Archive Med Rev journal*, 2013; 22 (4):532-542. DOI: 10.17827/aktd.29343.
42. Krausz C, Chianese C. Genetic testing and counselling for male infertility. 2014, 1752-296X *Wolters Kluwer Health* DOI:10.1097/MED.0000000000000058.
43. Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic, *Reproduction* 2015, 150 R159–R174.
44. Neto FTL, Bach PV, Najari BB. Genetics of Male Infertility. *Curr Urol Rep* 2016, DOI 10.1007/s11934-016-0627-x.
45. Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. 2016, *British Journal of Nursing*, (Urology Supplement) Vol 25, No 18.
46. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Unexplained male infertility: potential causes and management. *Human Andrology* 2011; 1: 2-16.
47. Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N. *Temel Üroloji*, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara (1998).
48. Shan Z, Hirschmann P, Seebacher T. A SPGY copy homologous to the mouse gene DAZLA and the Drosophila gene boule is autosomal and expressed only in the human male gonad. *Hum. Molec. Genet.* 5: 2005-2011, 1996. [PubMed: 8968755]

49. Yen PH, Chai NN, Salido EC. The human autosomal gene DAZLA: testis specificity and a candidate for male infertility. *Hum. Molec. Genet.* 5: 2013-2017, 1996. [PubMed: 8968756]
50. Goyette P, Pai A, Milos R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome* 9: 652-656, 1998. Note: Erratum: *Mammalian Genome* 10: 204 only, 1999. [PubMed: 9680386]
51. Yang Y, Luo YY, Wu S. Association between C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene and risk of male infertility: a meta-analysis, 2015, *Genet. Mol. Res.* 15 (2): gmr.15027631, doi.10.4238/gmr.15027631.
52. Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nature Genet.* 15: 205-206, 1997. [PubMed: 9020851]
53. Ferlin A, Foresta C. New genetic markers for male infertility. 2014, 1040-872X Wolters Kluwer Health, DOI:10.1097/GCO.0000000000000061.
54. Zhu Y, Ma M, Wan L. Analysis of *DAZL* SNP260 and SNP386 in infertile Chinese males using multi-analyte suspension array. 2014. *Molecular Medicine Reports* 10: 2949-2954, DOI: 10.3892/mmr.2014.2634.
55. Xue ZNK. Association of *DAZL* A260G and A386G polymorphisms with oligozoospermia-orazoospermia-induced male infertility: a meta-analysis. 2015, 21(4):345-56.
56. Xue ZNK. A260G and A386G single nucleotide polymorphisms of the *DAZL* gene are not correlated with male infertility in the Chinese population of Zhejiang Province. 2015, 21(8):713-6.
57. Bartoloni L, Cazzadore C, Ferlin A. Lack of the T54A polymorphism of the *DAZL* gene in infertile Italian patients. 2004, *Molecular Human Reproduction* Vol.10, No.8 pp. 613–615, doi:10.1093/molehr/gah073.
58. Shimoda C, Koh E, Yamamoto K. Single nucleotide polymorphism analysis of the follicle stimulating hormone (FSH) receptor in Japanese with male infertility: identification of codon combination with heterozygous variations of the two discrete FSH receptor gene. 2009, *Endocrine Journal* 56(7), 859-865.
59. Balkan M, Gedik A, Akkoc H. FSHR single nucleotide polymorphism frequencies in proven fathers and infertile men in southeast Turkey. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Vol 2010. doi:10.1155/2010/640318.
60. Levallet J, Pakarinen P, Huhtaniemi IT. Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. 1999, *Archives of Medical Research* 30: 486–494.
61. Wu XQ, Xu SM, Wang YQ. FSHR gene Thr307Ala and Asn680Ser polymorphisms in infertile men: an association study in North China and meta-analysis. 2015, *Genet. Mol. Res.* 14 (2): 5592-5601, DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.May.25.11>.

62. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. Evaluating the role of the FSH receptor gene Thr307-Ala and Asn680-Ser polymorphisms in male infertility and their association with semen quality and reproductive hormones. 2010, *Bju International*, 108 , E117 – E125. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09890.x.
63. Wu W, Cai H, Sun H. Follicle stimulating hormone receptor G-29A, 919A>G, 2039A>G polymorphism and the risk of male infertility: A meta-analysis, 2012 doi:10.1016/j.gene.2012.02.023.
64. Li Y, Gu A, Yang H. FSH receptor gene polymorphisms in fertile and infertile Han-Chinese males. 2011.
65. Pengo M, Ferlin A, Arredi B. FSH receptor gene polymorphisms in fertile and infertile Italian men. 2006, Vol 13 No 6. 795-800 *Reproductive Bio Medicine Online*.
66. Kim SY, Lim JW, Kim JW. Association between genetic polymorphisms in folate-related enzyme genes and infertile men with non-obstructive azoospermia. 2015, *Systems Biology in Reproductive Medicine Cheil General Hospital*. DOI: 10.3109/19396368.2015.1049752.
67. Irfan M, Ismail M, AzharBeg M. Association of the *MTHFR* C677T (rs1801133) polymorphism with idiopathic male infertility in a local Pakistani population. 2016 , *BJMG*,19 (1), 1 51-62. DOI: 10.1515/bjmg-2016-0007.
68. Kurzawski M, Wajda A, Malinowski D, Kazienko. Association study of folate-related enzymes (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*) genetic variants with non-obstructive male infertility in a Polish population. 2015, *Genetics and Molecular Biology*, 38, 1, 42-47, DOI: 10.1590/S1415-475738120140179.
69. Doaa SM, May FS, Omar FK. Associations of variants in *MTHFR* and *MTRR* genes with male infertility in the Jordanian population. 2014, *Gene* 536 40–44 doi.org/10.1016/j.gene.2013.12.001.
70. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. Relationship between genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (C677T, A1298C, and G1793A) as risk factors for idiopathic male infertility. 2011, *Reproductive Sciences* 18(3) 304-315, DOI: 10.1177/1933719110385135.
71. Liu K, Zhao R, Shen M. Role of genetic mutations in folate-related enzyme genes on male infertility. *Scientific Reports*, 5:15548. DOI: 10.1038/srep15548.
72. Hui-hui H, Yan H, Xiao-qing Y. Associations of C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene with male infertility risk: a meta-analysis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* doi:10.1016/j.ejogrb.2017.03.004
73. Mancheng G, Wenjing D, Tingyu H. *MTHFR* 677C>T polymorphism increases the male infertility risk: a meta-analysis involving 26 studies. *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0121147
74. Tschanter P, Kostova E, Luetjens CM. No association of the A260G and A386G *DAZL* single nucleotide polymorphisms with male infertility in a Caucasian population. *Human Reproduction* Vol.19, No.12 pp. 2771–2776, 2004 doi:10.1093/humrep/deh522

75. Wu QY, Shui YC, Xia XY. FSH and FSHR gene polymorphisms and male infertility: An update. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2015 Nov;21(11):1031-4.
76. Teng YN, Lin YM, Lin YH. Association of a single-nucleotide polymorphism of the Deleted-in-Azoospermia-Like gene with susceptibility to spermatogenic failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(11):5258–5264 doi: 10.1210/jc.2002-020016
77. Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. *Nature* 381: 783-785, 1996
78. Ruggiu M, Speed R, Taggart M. The mouse DAZLA gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389: 73-77, 1997. [PubMed: 9288969]
79. Reynolds N, Collier B, Maratou K. DAZL binds in vivo to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of MVH in germ cells. *Hum. Molec. Genet.* 14: 3899-3909, 2005. [PubMed: 16278232]
80. Gurkan H, Tozkır H, Ulusal S. The relationship between methylenetetrahydrofolate reductase c.677TT genotype and oligozoospermia in infertile male patients living in the Trakya region of Turkey. *Andrologia* 2015, 47, 1068–1074 doi: 10.1111/and.12380
81. Vardarlı AT, Bozok Çetintaş V, Eroğlu Z. Determination of the association between the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene and the development risk of azoospermia and oligozoospermia in Turkish infertile men. *Ege Journal of Medicine* 2014; 53(3):124-18
82. Wu Q, Zhang J, Zhu P. The susceptibility of FSHB -211G > T and FSHR G-29A, 919A > G, 2039A > G polymorphisms to men infertility: an association study and meta-analysis. *BMC Medical Genetics* (2017) 18:81 DOI 10.1186/s12881-017-0441-4
83. Balkan M. İnfertil Erkeklerde Genetik Araştırmalar. Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 2006.
84. Ross M, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. (2011, 6.Baskı). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.