



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİNDE XRCC1 VE  
ERCC2 GENLERİ PROMOTOR METİLASYONLARI İLE  
SPERM DNA FRAGMENTASYONU ARASINDAKİ  
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Aslı METİN MAHMUTOĞLU**

Samsun  
Aralık, 2019





T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİNDE XRCC1 VE  
ERCC2 GENLERİ PROMOTOR METİLASYONLARI İLE  
SPERM DNA FRAGMENTASYONU ARASINDAKİ  
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Aslı METİN MAHMUTOĞLU**

**Danışman  
Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ**

**Samsun  
Aralık, 2019**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aslı METİN MAHMUTOĞLU tarafından Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ danışmanlığında hazırlanan “İdiyopatik Erkek İnfertilitesinde *XRCCI* ve *ERCC2* Genleri Promotor Metilasyonları ile Sperm DNA Fragmantasyonu Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 27/12/2019 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTARA tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ramazan AŞCI  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Pof. Dr. Sezgin GÜNEŞ  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Nurten KARA  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ  
Erciyes Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sercan ERGÜN  
Ordu Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / .... / .....

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi, tecrübe ve ilgisiyle her zaman yanımda olan, tez konumun belirlenmesi ve akademik kariyerimin gelişmesinde büyük katkısı olan, destek ve yardımlarını daima hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e çok teşekkür ederim.

Tanıdığım en değerli bilim insanlarından biri olan kıymetli hocam Prof. Dr. Hasan BAĞCI'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yer alan hastaların klinik değerlendirmesini yapan ve yoğun çalışma hayatında tezime ilgili her konularda zaman ayıran Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Üroloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ramazan AŞCI'ya teşekkür ederim. Patoloji Ana Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Oğuz AYDIN'a tezimin laboratuvar aşamasına verdiği katkıdan dolayı teşekkür ederim. Tez çalışmamın istatistiksel analizlerini yaparak tezime katkıda bulunan Prof. Dr. Ralf HENKEL'e teşekkür ederim. Tez izleme komitemde yer alan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Alper ARSLAN'a teşekkür ederim.

Tıbbi biyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN, Prof. Dr. Nurten KARA ve Doç. Dr. Şengül TURAL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yer alan hasta ve kontrollerin semen analizini yapan biyolog Gökhan ZENGİN'e teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince aynı çalışma ortamını paylaştığım değerli arkadaşım Araş. Gör. Neslihan HEKİM'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince her zaman yanımda olan ve her türlü sıkıntıya benimle birlikte katılan değerli eşim Fatih MAHMUTOĞLU'na, doktoramın son yıllarında bizimle birlikte olan biricik kızım Miray MAHMUTOĞLU'na ve desteğini her an hissettiğim kardeşim Gülnihal METİN'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.TIP.1901.18.005 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

### İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİNDE *XRCC1* VE *ERCC2* GENLERİ PROMOTOR METİLASYONLARI İLE SPERM DNA FRAGMENTASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** İdiyopatik infertilite olgularında baz ve nükleotit kesip çıkarma onarımında rol oynayan *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin promotor metilasyonu ile sperm DNA fragmentasyonu (SDF) ve kromatin kondensasyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlandı.

**Materyal ve Metot:** Oligoastenoteratozoospermi (OAT) tanısı konulmuş 77 infertil hasta ile 19 normospermik, 27 fertil ve 5 fertilitesi kanıtlanmış erkek bu çalışmada yer almıştır. *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin metilasyon analizi MethyLight, SDF TUNEL ve sperm çekirdeğinin kromatin kondensasyonu ise anilin mavisi ile boyama yöntemi ile analiz edilmiştir. *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin metilasyonu, SDF ve kromatin kondensasyon durumu ile kıyaslandı ve sonrasında çalışmada yer alan bireylerin semen analizi sonuçlarıyla ilişkilendirildi.

**Bulgular:** Çalışmamızda *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin metilasyonları ile SDF arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. *XRCC1* metilasyonu ile sperm kromatin kondensasyonu arasında negatif bir korelasyon olduğu belirlendi ( $p \leq 0,0125$ ). OAT'lı infertil erkekler normospermik/fertil/fertilitesi kanıtlanmış bireylerle karşılaştırıldığında; *XRCC1* metilasyonu, SDF ve sperm kromatin kondensasyon bozukluklarının infertil erkeklerde daha yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla  $p=0,005$ ;  $p=0,0011$ ;  $p<0,0001$ ). Eşik değeri %7,92 olarak belirlenen SDF'nin sperm kromatin kondensasyonu ve temel semen parametreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

**Sonuç:** *XRCC1* geninin promotor metilasyonu spermin genomik bütünlüğünde ve idiyopatik infertilitede rol oynayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *XRCC1*; *ERCC2*; infertilite; DNA fragmentasyonu; sperm

Ash METİN MAHMUTOĞLU, Doktora Tezi  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Samsun, Aralık-2019

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN PROMOTOR METHYLATION OF *XRCC1* AND *ERCC2* GENES AND SPERM DNA FRAGMENTATION IN IDIOPATHIC MALE INFERTILITY

**Aim:** In this study, we aimed to determine the association among promoter methylation of *XRCC1* and *ERCC2* genes which are involved in base and nucleotide excision repair, sperm DNA fragmentation (SDF) and chromatin condensation in base and nucleotide excision repair in idiopathic infertility cases.

**Material and Method:** Seventy-seven infertile men with oligoasthenoteratozoospermia (OAT) and 19 normozoospermic, 27 fertile and 5 proven fertile men were involved in this study. The methylation status of *XRCC1* and *ERCC2* gene was analyzed by Methylight method, SDF was determined by TUNEL assay and the sperm chromatin condensation was evaluated by aniline blue staining.

**Results:** In this study, we did not find a statistically significant association between the methylation of *XRCC1* and *ERCC2* and SDF. A negative correlation was determined between *XRCC1* methylation and sperm chromatin condensation ( $p \leq 0.0125$ ). *XRCC1* methylation, SDF and sperm chromatin condensation are found to be higher in men with OAT than normozoospermic/fertile/proven fertile men ( $p=0.005$ ;  $p=0.0011$ ;  $p < 0.0001$ , respectively). SDF with a threshold value of 7.92% as a statistically significant effect on sperm chromatin condensation and classical semen parameters.

**Conclusion:** The promotor methylation of *XRCC1* gene may have a role in the genomic integrity of spermatozoa and idiopathic male infertility.

**Keywords:** *XRCC1*; *ERCC2*; infertility; DNA fragmentation; spermatozoa

Ash METİN MAHMUTOĞLU, PhD Thesis

Ondokuz Mayıs University – Samsun, December-2019

## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

<b>AP</b>	: Apirimidik-Apurimidik
<b>APE1</b>	: AP endonükleaz 1
<b>APTX</b>	: Aprataksin
<b>AZF</b>	: Azospermik faktör
<b>BER</b>	: Baz kesip çıkarma onarımı
<b>BRCT</b>	: BRCA1 C-terminal
<b>CBAVD</b>	: Konjenital bilateral vas deferens yokluğu
<b>CFTR</b>	: Kistik fibrozis transmembran regülatör
<b>CMA<sub>3</sub></b>	: Kromomisin A <sub>3</sub>
<b>COMET</b>	: Tek hücre jel elektroforezi
<b>CpG</b>	: Sitozin fosfat guanin
<b>CS</b>	: Cockayne Syndrome
<b>CSA</b>	: Cockayne Sendrom proteini A
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DFI</b>	: DNA fragmantasyon indeksi
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DNMT</b>	: DNA metil transferaz
<b>DSB</b>	: Çift zincir kırığı
<b>DSD</b>	: Cinsiyet Gelişim Bozukluğu
<b>ERCC2</b>	: Kesip çıkarma onarımı çapraz-tamamlayıcı rodent onarım eksikliği komplementasyon grup 2
<b>FGF8</b>	: Fibroblast büyüme faktörü 8
<b>FGFR1</b>	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1
<b>FITC</b>	: Floresans izotiyosiyanat
<b>FITC-dUTP</b>	: Floresans izotiyosiyanat - deoksiüridin trifosfat
<b>GG-NER</b>	: Global kesip çıkarma onarımı
<b>γ-H2AX</b>	: Gama H2A histon aile üyesi X
<b>H3-K4</b>	: Histon 3 Lizin 4
<b>KAL</b>	: Kallmann sendromu
<b>KS</b>	: Klinefelter sendromu
<b>MSP</b>	: Metilasyon Spesifik PZR



<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>NCBI</b>	: Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi
<b>NEIL1</b>	: Nei benzeri DNA glikozilaz 1
<b>NER</b>	: Nükleotid kesip çıkarma onarımı
<b>NHEJ</b>	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
<b>NOA</b>	: Non-obstrüktif azospermi
<b>NTD</b>	: N-terminal domaini
<b>NTHL1</b>	: Nth benzeri DNA glikozilaz 1
<b>OAT</b>	: Oligoastenoteratozoospermi
<b>OGG1</b>	: 8-okzoguanin glikozilaz 1
<b>OS</b>	: Oksidatif stres
<b>P 1</b>	: Protamin 1
<b>P2</b>	: Protamin 2
<b>PBS</b>	: Fosfat tuz tamponu
<b>PCNA</b>	: Proliferating hücre nükleer antijen
<b>PhIP</b>	: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]pridine
<b>PIC</b>	: Kesim öncesi kompleks
<b>PMR</b>	: Percentage of methyligt reference
<b>PNKP</b>	: Polinükleotit kinaz-30-fosfataz
<b>PTM</b>	: Post translasyonel modifikasyon
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türü
<b>SCD</b>	: Sperm kromatin dağılımı
<b>SCGE</b>	: Tek hücre jel elektroforezi
<b>SCLB</b>	: Somatik hücre lizis tamponu
<b>SCOS</b>	: Sertoli Cell Only Syndrome
<b>SCSA</b>	: Sperm kromatin yapı analizi
<b>SDF</b>	: Sperm DNA fragmantasyonu
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>SSB</b>	: Tek zincir kırığı
<b>TC-NER</b>	: Transkripsiyonla bağlantılı kesip çıkarma onarımı
<b>TdT</b>	: Terminal deoksinükleotidil transferaz

<b>TFIIH</b>	: Transkripsyon faktörü II H
<b>TNP1-4</b>	: Geçiş proteinleri 1-4
<b>TUNEL</b>	: Terminal deoksinükleotid transferaz dUTP çentik uç işaretleme
<b>XPC</b>	: Kseroderma pigmentosum grup C
<b>XPB</b>	: Kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup D
<b>XPG</b>	: Kseroderma pigmentosum grup G
<b>XRCC1</b>	: X-ışını çapraz tamamlayıcı protein 1



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
2.1. Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri .....	5
2.1.1. Kromozomal Anomaliler .....	5
2.1.2. Y-kromozomu Mikrodelesyonları .....	9
2.1.3 Tek Gen Mutasyonları .....	10
2.2. Spermatogenez ve Evreleri .....	12
2.2.1. Mitotik Çoğalma Evresi .....	13
2.2.2. Mayotik Bölünme Evresi (Spermatositogenez).....	14
2.2.3. Spermiyogenez .....	14
2.3. Spermatogenez Sürecinde Meydana Gelen Epigenetik Modifikasyonlar.....	15
2.3.1. DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları .....	15
2.3.2. Histon-Protamin Değişimi .....	17
2.4. DNA Metilasyonu Analiz Yöntemleri .....	19
2.4.1. Metilasyon Spesifik PZR.....	19
2.4.2. Bisülfid-Pirosekanslama ile DNA Metilasyon Analizi .....	20
2.4.3. Methylight Yöntemi .....	20
2.5. Sperm Kromatin Yapısının Analiz Edildiği Yöntemler.....	21
2.5.1. Asidik Anilin Mavisi ile Boyama Yöntemi .....	21
2.5.2. Kromomisin A <sub>3</sub> (CMA <sub>3</sub> ) ile Boyama Yöntemi.....	22
2.5.3. Toluidin Mavisi ile Boyama Yöntemi .....	22
2.6. Epigenetik Değişiklikler ve Spermatogenez Bozuklukları .....	22

2.7. Spermatogenez ve DNA Hasarı .....	23
2.8. Sperm DNA Fragmantasyonu.....	24
2.9. DNA Fragmantasyonu Analiz Yöntemleri.....	25
2.9.1. TUNEL Analizi .....	25
2.9.2. COMET Analizi .....	25
2.9.3. Sperm Kromatin Yapı Analizi.....	26
2.9.4. Sperm Kromatin Dağılım Testi-Halo Testi .....	26
2.10. Erkek Germ Hücrelerindeki DNA Onarım Mekanizmaları .....	26
2.10.1. Baz Kesip Çıkarma Onarımı .....	29
2.10.2. Nükleotit Kesip Çıkarma Onarımı.....	38
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>47</b>
3.1. Çalışma Grubu ve Özellikleri.....	47
3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar .....	48
3.3. Kullanılan stok kimyasal maddeler .....	48
3.4. TUNEL Yöntemi.....	49
3.5. Anilin Mavisi ile Boyama Yöntemi .....	51
3.6. <i>XRCC1</i> ve <i>ERCC2</i> Genlerinin Metilasyon Profilinin Belirlenmesi.....	52
3.6.1. Semen Örneğinden Somatik Hücre Lizis Tamponu ile Somatik Hücrelerin Uzaklaştırılması.....	52
3.6.2. Sperm Hücrelerinden DNA İzolasyonu.....	53
3.6.3. İzole Edilen DNA'ların Konsantrasyon ve Safılıklarının Belirlenmesi .....	54
3.6.4. Bisülfid Modifikasyon Yöntemi.....	54
3.6.5. Methylight Yöntemi ile Metilasyon Analizi.....	55
3.7. Metilasyon Yüzdesinin Hesaplanması .....	57
3.8. İstatistiksel Analiz.....	57
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>58</b>

4.1. Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri.....	58
4.2. Semen Analizi.....	58
4.3. Sperm Kromatin Kondensasyonunun Belirlenmesi.....	59
4.4. TUNEL Analizi.....	64
4.5. XRCC1 ve ERCC2 Genlerinin Promotor Metilasyonu.....	66
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>70</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>76</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>77</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>95</b>
<b>ÖZ GEÇMİŞ.....</b>	<b>99</b>

## 1. GİRİŞ

İnfertilite, en az 1 yıl korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen çiftlerin başarılı bir gebelik elde edemediği üreme problemidir (Gunes ve Mahmutoglu, 2019). Genel popülasyonun %7'sini etkileyen (Krausz ve ark., 2018) bu üreme sorununun yarısından erkekler sorumludur (Trost ve ark., 2014). İnfertilite farklı nedenlerden dolayı ortaya çıkabilir. Bu nedenler arasında konjenital anomaliler, genetik faktörler, endokrin disfonksiyonu, inflamatuvar hastalıklar, genital sistem obstrüksiyonu, gametogenez fonksiyon bozuklukları ve ereksiyon ya da ejakulasyon problemleri yer alır (Kuang, 2011, Okutman ve ark., 2018).

Erkek infertilite vakalarının yaklaşık olarak %15'inden kromozomal anomaliler, Y-kromozomu mikrodelsyonları, X-bağılantılı mutasyonlar ve otozomal gen mutasyonları gibi bilinen genetik nedenler sorumludur (Flannigan ve Schlegel, 2017). İnfertil erkeklerin ~%30'unu oluşturan idiyopatik infertilite vakalarında ise sorunun genellikle genetik ya da epigenetik bir kökenden geldiği düşünülmektedir (Bracke ve ark., 2018, Neto ve ark., 2016a).

Spermatogenez üreme için oldukça önemli olan kompleks ve dinamik bir hücrel farklılaşma sürecidir (Hermann ve ark., 2018). Bu süreç germ ve somatik hücreler arasında güçlü bir etkileşim gerektirir (Cannarella ve ark., 2019b). Mitotik çoğalma (proliferasyon) evresi, mayoz bölünmeleri içeren spermatositogenez evresi ve farklılaşmanın gerçekleştiği spermiyogenez evresinden oluşan spermatogenez sürecinin tamamlanmasıyla olgun sperm hücreleri meydana gelir (Sharma ve Agarwal, 2011b).

Spermatogenez sırasında meydana gelen kromatin yeniden şekillenme süreciyle (protaminasyon) sperm hücreleri kendilerine özgü kromatin yapısına sahip olur (Hao ve ark., 2019). Protaminasyon süreciyle sperm DNA'sının büyük bölümü protaminlerle paketlenir. Spermin kendine özgü bu kromatin yapısı spermin hareketini kolaylaştırır ve dişi üreme kanalındaki olumsuz çevreden korunmaya yardım eder (Gannon ve ark., 2014). Kromatin kondensasyonundaki anomaliler, sperm DNA fragmantasyonu, düşük semen kalitesi, anormal epigenetik modifikasyonlar ve çeşitli infertilite fenotipleri ile ilişkilendirilmektedir (Muratori ve De Geyter, 2018).

Spermatozoaların kromatin yapısı dışında epigenomları da kendilerine özgüdür. Olgun spermatozoanın nükleusu diğer memeli somatik hücre tipleri ve hatlarına kıyasla daha az metiledir. Metilasyon ile gen transkripsiyonunun düzenlenmesi

genlerin düzenleyici bölgelerindeki sitozin fosfat guanin (CpG) yerlerinin metilasyonu aracılığıyla ve/veya histon kuyruklarının modifikasyonu ile yapılabilir (Gannon ve ark., 2014). Sperm epigenomundaki anomaliler embriyogenez üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilir ve bir nesilden diğerine aktarılabilme özelliğine sahiptir (Muratori ve De Geyter, 2018). Spermatogenez bozuklukları ile erkek germ hücre hattındaki epigenetik yeniden düzenlenmelerin ilişkili olduğu bildirilmektedir. Spermatogenezin epigenetik düzenlenmesindeki herhangi bir bozukluk erkek infertilitesine neden olabilir (Sharma ve ark., 2019).

Spermatogenez bozuklukları dolayısıyla da infertilite germ hücrelerinde hasarın artması sonucu meydana gelebilir. DNA onarım mekanizmasındaki eksiklikler ya da sorunlar germ hücrelerinde hasar artışına sebep olur. DNA onarımının doğru ve etkin bir şekilde gerçekleşmesi gelişen germ hücrelerin kalitesi ve genomik bütünlüğü için önemlidir (Singh ve ark., 2019c). Sperm DNA hasarları tek ve çift zincirler arasındaki çapraz bağlar ve kırıklar, baz içermeyen bölgeler ve baz modifikasyonları ile karakterize edilir. DNA hasarlarını gidermek ve genomik bütünlüğü sürdürmek için çeşitli onarım mekanizmaları spermatogenez sürecinde görev yapar. Baz ve nükleotit kesip çıkarma onarımı, yanlış eşleşme onarımı, çift zincir kırık onarımı ve homolog olmayan uç birleştirme mekanizmaları bu onarım yolları arasında yer alır (Sharma ve Agarwal, 2018, García-Rodríguez ve ark., 2019).

Baz kesip çıkarma onarımı (BER) oksidasyon, metilasyon, deaminasyon ve baz kayıpları gibi DNA'nın sarmal yapısında herhangi bir değişikliğe neden olmayan modifikasyonları gidermekle görevli onarım mekanizmasıdır (Olsen ve ark., 2005). BER yolağının insanların germ hücrelerinde oldukça etkili bir yolak olduğu bildirilmiştir (Olsen ve ark., 2001).

X-ışını çapraz tamamlayıcı protein 1 (X-Ray Repair Cross Complementing 1, *XRCC1*) geni tarafından kodlanan XRCC1 proteini BER yolağında rol alan bir proteindir (Caldecott, 2019). XRCC1 proteini farklı etkileşim bölgeleri aracılığıyla onarım yolağında görevli diğer proteinleri bir arada tutarak hem iskele proteini olarak görev yapar hem de DNA substratlarının bir enzimden diğer enzime geçişini optimize ederek onarımı hızlandırır (Nazarkina ve ark., 2007). Fare ve insanların testislerindeki XRCC1 ekspresyonunun yüksek olduğu bildirilmiştir (El-Domyati ve ark., 2010, Walter ve ark., 1994). XRCC1'in normal erişkinin testisi ve infertil erkeğin testisi arasında

farklı ekspresyon özelliği gösterdiği de bilinmektedir. *XRCC1* genindeki tek nükleotit polimorfizleri ile erkek faktör infertilitesi ve DNA onarım etkinliğindeki değişiklikler arasında bir korelasyon olduğu önerilmiştir (Zheng ve ark., 2012).

DNA'nın sarmal yapısını bozan lezyonların giderilmesinden sorumlu olan yolak nükleotit kesip çıkarma onarım (NER) yolağıdır (Kusakabe ve ark., 2019). NER yolağı UV tarafından indüklenen büyük DNA eklentileri (Kokic ve ark., 2019) ve çeşitli çevresel karsinojenler nedeniyle oluşan baz eklentileri gibi DNA lezyonlarını tanıyarak onları uzaklaştırır (Ferri ve ark., 2019, Kobaisi ve ark., 2019). NER onarım yolağında hasarın tanınması, doğrulanması, hasar içeren nükleotit dizisinin uzaklaştırılması ve oluşan boşluğun doldurulması gibi farklı aşamalarda görev yapan çok sayıda protein yer alır (Ferri ve ark., 2019, Sancar ve ark., 2004). Bu proteinlerden biri de aynı isimli gen tarafından kodlanan Xeroderma pigmentosum tamamlayıcı grup D/eksizyon onarımı çapraz-tamamlayıcı rodent onarım eksikliği, komplemantasyon grup 2 (XPD/ERCC2)'dir. ERCC2 proteini hasarın bulunması ve doğrulanmasından sorumludur (Vashisht ve Wohlschlegel, 2019). Haploid genomun  $3 \times 10^9$  bazdan oluştuğu düşünüldüğünde genomda bir lezyonun yerinin tam olarak bulunabilmesi hücre için oldukça önemlidir. Bu görev DNA onarım yolaklarında birçok adımda ve/veya çok sayıda protein tarafından gerçekleştirilir. Transkripsiyon faktörü II H (TFIIH) ile etkileşim içerisinde görev yapan ERCC2, NER onarım yolağında bu görevi yerine getiren esas proteindir (Sugasawa, 2016). Testisteki ekspresyonu yüksek olan *ERCC2* geninin bazı polimorfizleri erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmektedir (Gu ve ark., 2007, Singh ve ark., 2019a).

DNA fragmentasyonlu spermiler ile fragmentasyon içermeyen spermilerin yumurtayı aynı etkinlikte dölleyebildiği bilinmektedir. Ancak, DNA fragmentasyonu ile zigotun erken bölünmesi ve morfolojik anomaliler arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Tesarik ve ark., 2004). Sperm DNA fragmentasyonunun (SDF) doğuştan sakatlığa da neden olabileceği tahmin edilmektedir (Esteves ve ark., 2018). Sperm DNA fragmentasyon testlerinin rutin analizlerde kullanımı bazı androloji uzmanları tarafından önerilirken bazıları standart bir DNA fragmentasyon analiz yöntemi olmaması, farklı eşik değerlerine sahip SDF testlerinin varlığı, sperm DNA hasarının oositte belli oranda onarılıyor olması, test ücreti ve farklı laboratuvarlar arasında çeşitlilik olması gibi nedenlerden dolayı karşı çıkmaktadır (Majzoub ve ark., 2017,



Gunes ve Sertyel, 2018). Semen analizi rutin fertilitte değerlendirmelerinin temel taşı olmasına rağmen, tek başına erkek fertilitisini değerlendirmekte yetersiz kalmaktadır (Oehninger ve Ombelet, 2019). Bu nedenle bazı araştırmacılar erkek infertilitesinin genetik nedenleri ve bireylerin üreme kapasitesi hakkında daha fazla bilgi verebilecek ilave testlerin kullanımını araştırmaya başlamışlardır (Cheung ve ark., 2019).

SDF çeşitli nedenler sonucu meydana gelebilir. BER gibi onarım mekanizmalarının görevlerini tam olarak yerine getirememesinden dolayı oluşabileceği gibi, protaminasyon sürecinde topoizomerazlar tarafından oluşturulan geçici çentiklerin onarılmaması, oksidatif stres, ısı, radyasyon ve ilaçlar gibi çok çeşitli etkenler sonucunda da meydana gelebilir (Simon ve ark., 2019, Aitken ve De Iuliis, 2010, Caldecott, 2003).

İdiyopatik infertilite olgularında BER ve NER mekanizmalarında rol oynayan ve testis dokularında yüksek düzeyde eksprese edilen *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin promotor bölgelerindeki metilasyon durumu ve SDF arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi yapılan tez çalışmasının birincil amacını oluşturmaktadır. Ayrıca, idiyopatik infertilite olgularında hastalığın etyolojisinde rol oynayabilecek yeni hedef genler belirlenmeye çalışılmış ve bu genlerdeki metilasyon değişikleri ile sperm DNA fragmantasyonu, sperm kromatin bütünlüğü ve temel semen parametreleri arasındaki olası ilişkinin araştırılması da amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Üreme çağındaki çiftlerin %14-15'inde infertilite problemi görülür ve erkek faktörün bu orana katkısı ~%50'dir. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde çoğunlukla başvuru olan ilk yöntem semen analizidir. Semen analizi seminifer tübül, epididimis ve yardımcı cinsiyet bezlerinin fonksiyonel durumu hakkında bilgi verir. Ancak, klasik semen analizi ile erkek gametinin dölleme kapasitesi ya da fonksiyonu nadiren tahmin edebilirken, yardımcı üreme yöntemlerinin sonuçlarını tahmin etmek neredeyse imkansızdır. Özellikle hem kadın hem de erkek faktörünün rol oynadığı açıklanamayan infertilite vakalarında semen analizinin de dahil olduğu tüm standart test sonuçları normaldir. Bundan dolayı bazı araştırmacılar erkek infertilitesinin genetik nedenlerini ve bireylerin üreme kapasitesi hakkında daha fazla bilgi verebilecek ilave testlerin kullanımını araştırmaktadır (Cheung ve ark., 2019, Esteves, 2014).

### 2.1. Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri

Erkek infertilitesi birçok faktörün etkili olduğu patolojik bir durumdur. Erkek infertilitesinin genetik özellikleri, testisin histolojik fenotiplerinin ve semenin oldukça heterojen olması ve spermatogenez sürecinde 2000'den fazla genin görev almasından dolayı oldukça karmaşıktır (Krausz ve Riera-Escamilla, 2018). Genetik faktörler erkek infertilite vakalarının ~%15'inden (Cannarella ve ark., 2019a) ciddi oligospermik ve azospermik olguların ise ~%25'inden sorumludur (Krausz ve ark., 2018). Erkeklerde infertiliteye neden olan başlıca genetik faktörler: kromozomal anomaliler, Y-kromozomu mikrodelsiyonları ve gen mutasyonlarıdır (Neto ve ark., 2016a).

#### 2.1.1. Kromozomal Anomaliler

Erkeklerde infertilite sebeplerinin %5'ini kromozomal anomaliler oluşturur. İnfertil erkeklerin spermatogenez bozukluğunun şiddetine bağlı olarak daha yüksek kromozomal anomali insidansına (%2-15) sahip olduğu bildirilmektedir (O'Brien ve ark., 2010). Azospermik erkeklerdeki kromozomal anomali prevalansı %14,4'tür. Bu oran hipergonadotropik erkekler (%20,2; %95CI %17,8–22,7) normogonadotropik bireylerle (%4,9; %95CI %3,2–6,6;  $p < 0,001$ ) kıyaslandığında daha da yüksek bulunmuştur (Donker ve ark., 2017). Kromozomal anomaliler yapısal ve sayısal kromozom anomalileri olmak üzere iki çeşittir. Translokasyon, inversiyon ve insersiyon yapısal kromozom anomalileri iken öploidi ve anöplidiler ise sayısal kromozom

anomalileridir (Nussbaum ve ark., 2015). Cinsiyet kromozom anöploidisi, translokasyon ve inversiyon gibi kromozomal anomalilerin infertiliteye neden olduğu bilinmektedir. (Neto ve ark., 2016a).

### **Klinefelter Sendromu (47,XXY)**

Erkeklerde sıklığı ~1/660 olan Klinefelter sendromu (KS) en yaygın cinsiyet kromozom anomalisi ve azosperminin (özellikle non-obstrüktif azospermi) en yaygın genetik sebebidir. Azospermik erkeklerin %11'inde KS görülür (Aksklaede ve Juul, 2013). Klinefelter sendromlu erkeklerde 1 ya da daha fazla X kromozomu bulunur (Davis ve ark., 2015). KS'li erkeklerin ~90'ında 47,XXY karyotipi gözlenirken 48,XXXXY, 49,XXXXXY ve çeşitli mozaizimler (örneğin 46,XY/47,XXY) de görülebilen karyotipler arasında yer alır (O'Donovan ve Völm, 2018). KS'li erkeklerin neredeyse tamamında hipergonadotropik hipogonadizm ve infertilite (%99) görülmekle birlikte atrofik testis ve jinekomasti de yaygın görülen fenotipik özellikler arasındadır. KS'li erkeklerde görülen bu fenotipik heterojeniteye genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Davis ve ark., 2015, Hotaling, 2014, Herlihy ve McLachlan, 2015). X-kromozomuyla ilişkili kopya sayısı varyasyonlarının (özellikle duplikasyonların) KS'de gözlenen fenotipik çeşitliliğe katkı yapabileceği bildirilmektedir (Rocca ve ark., 2016). 47,XXY ve 46,XY/47,XXY karyotipine sahip olan erkeklerin sperm nükleuslarındaki cinsiyet kromozomu anöploidilerinin fertil ve normal karyotipe sahip olan infertil erkeklerinkiyle karşılaştırıldığı bir çalışmada; XX ve XY disomik, XY hiperhaploid ve diploid spermatozoa sıklığı 47,XXY karyotipine sahip olan bireyde kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. 46,XY/47,XXY karyotipine sahip olan birey kontrollerle kıyaslandığında ise YY dizomisi dışında benzer sonuç elde edilmiştir. 47,XXY ve 46,XY/47,XXY arasında XX dizomisi hariç diğer cinsiyet kromozom anöploidileri açısından anlamlı bir farklılık gözlenmediği belirtilmiştir. XX dizomik sperm nükleusunun 47,XXY karyotipli bireyde 46,XY/47,XXY mozaik karyotipine sahip olan bireye göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Oligospermili KS hastaların çocuklarının cinsiyet ve otozom anöploidileri açısından artmış riske sahip olduğu bildirilmiştir (Rives ve ark., 2000).

### **Diğer Cinsiyet Kromozom Anöploidileri**

47,XYY, her 1000 canlı doğumda bir görülen ikinci en sık cinsiyet kromozom

anöploidisidir. 47,XYY sendromundaki extra Y kromozomu mayoz II sırasındaki ayrılmamadan kaynaklanır. 47,XYY erkekler fenotipik olarak normal görünmekle birlikte uzun boy, klinodaktili, hipertelorizm, zihinsel bozukluk, agresif davranışlar ve infertilite ile karakterize edilirler. Spermatogenez bozukluğu gösteren, XYY erkekler yüksek folikül stimüle edici hormon seviyesine sahiptir ve sperm analizleri sonucu bu erkeklerde azospermi ya da ciddi oligospermi görüldüğü bildirilmektedir. 47,XYY sendromlu erkeklerin semenlerinde kromozomal olarak anormal spermatozoa (özellikle cinsiyet kromozom dizomileri) insidansı yüksektir (Neto ve ark., 2016a).

46,XX testiküler cinsiyet gelişim bozukluğu (DSD) 20000'de 1 görülen nadir bir cinsiyet kromozom anomalisidir (Berglund ve ark., 2017). Y-kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan sex-determining region Y (*SRY*) geni ile ilişkilendirilen bu sendromda görülen en yaygın klinik özellikler jinekomasti, ergenliğin gecikmesi ve infertilitedir. 46,XX testiküler DSD'ye sahip olan bireylerin %80-90'ında hastalığın nedeni *SRY* geninin X kromozomu ya da otozomal kromozomlardan birine translokasyonudur (Hotaling, 2014, Gunes ve ark., 2016).

45,X/46,XY mosaisizmi geniş fenotip spektrumuna sahip olan ve nadir görülen bir sendromdur. 45,X/46,XY erkekler genellikle gonadal gelişimin bozulması, intra-abdominal testis, infertilite ve hipospadiasla karakterize edilirler. Gonadoblastoma ve disgerminomalara yatkınlıkta bu karyotipe sahip olan bireylerde gözlenir. 45,X/46,XY karyotipini taşıyan oligospermik erkeklerin sperm analiz sonuçları bu bireylerin yüksek sperm anöploidi riskine sahip olduğunu göstermiştir (Neto ve ark., 2016a).

### **Translokasyonlar**

Yapısal kromozom anomalilerinden olan translokasyonların (Robertsonian ya da resiprokal translokasyonlar) farklı infertilite fenotipleri ile ilişkisi genellikle vaka-kontrol çalışmalarına dayanmaktadır. Azospermi ve oligoastenospermi ile ilişkilendirilen Y-otozom translokasyonları (Aftab ve ark., 2019, Jia ve ark., 2019, Mekkawy ve ark., 2018, Wang ve ark., 2017), şiddetli oligospermi ile ilişkilendirilen kompleks dengeli otozomal translokasyonlar (Sha ve ark., 2018), oligoastenospermi ile ilişkilendirilen dengesiz mozaik translokasyonlar (Liu ve ark., 2018) ve gestasyonel ve pregestasyonel infertilite ile ilişkilendirilen otozomal translokasyonlar (Wang ve ark., 2016, Yang ve ark., 2018) bu vaka kontrol çalışmalarında bildirilmektedir.

Translokasyon taşıyıcısı 144 erkeğin (81'i resiprokal translokasyon taşıyıcısı,

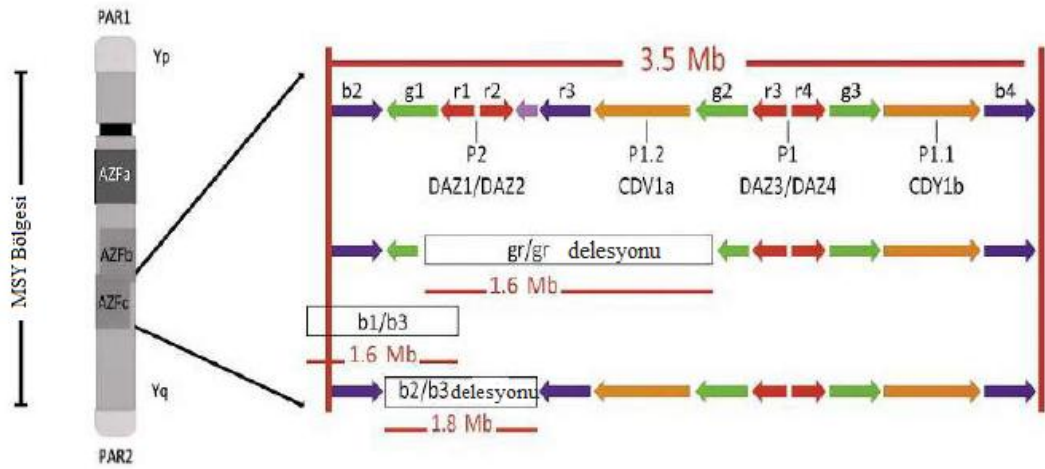
63'ü Robertsonian translokasyon taşıyıcısı) ve 105 fertil erkeğin semen kalitesi bakımından değerlendirildiği retrospektif bir çalışma sonucunda özellikle Robertsonian translokasyon taşıyıcısı erkeklerin semen kalitesinin kötü olduğu rapor edilmiştir. Resiprokal translokasyon taşıyıcılarının %39,5'inde, Robertsonian translokasyon taşıyıcılarının %14,3'ünde ve fertil erkeklerin %95'inde sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi normal bulunmuştur (Mayeur ve ark., 2019) Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Tran ve ark. (2019), resiprokal translokasyon 46,XY, t(7;13) (p12;q12.1) taşıyıcısı bir erkekten elde ettikleri 31 sperm hücresi ve normospermik bir erkekten elde ettikleri 6 sperm hücresini floresans-activated hücre ölçümü ve yeni nesil dizileme yöntemlerini kullanarak analiz etmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucu normospermik bireye ait sperm hücrelerinin tamamının normal haploid 23 kromozom profilini gösterdiğini ancak resiprokal translokasyon taşıyıcısına ait sperm hücrelerinin %64,5'inde farklı kromozom anomalisi varyantlarının bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu anomaliler dengeli kromozom taşıyıcılarından beklenen ayrılma paterni ile uyumlu bulunan 7p ya da 7q'nun delesyonu ve 7p ile 13q'nun duplikasyonudur. Sadece bir örnekte 9q duplikasyonunun da saptanıldığı belirtilmiştir (Tran ve ark., 2019).

### **İnversiyonlar**

Otozomal inversiyonlar, genetik materyal kaybına sebep olabilen yapısal kromozom yeniden düzenlemelerinden biridir (Neto ve ark., 2016a). İnsan karyotipinde görülen en yaygın inversiyon 9 nolu kromozomun perisentrik inversiyonudur [inv(9)]. Genel popülasyonda %1-3 oranında gözlenen inv(9) (Dana and Stoian, 2012) erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmektedir (Chantot-Bastaraud ve ark., 2007). Inv(9) taşıyıcısı 421 bireyi içeren epidemiyolojik bir çalışmada, inv(9) taşıyıcılarında gözlenen en sık klinik endikasyonun idyopatik üreme başarısızlığı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca inv(9) taşıyıcısı olan erkeklerin %2,6'sında spermatogenez bozukluğu olduğu da bildirilmiştir (Neto ve ark., 2016a). Kromozom 9 inversiyonu taşıyıcılarında normospermi, azospermi ve astenospermi görülebilir (Collodel ve ark., 2006). Dokuz nolu kromozom dışında 1ve 12 nolu kromozomun perisentrik inversiyonları (Balasar ve ark., 2017, Chantot-Bastaraud ve ark., 2007, Ghorbel ve ark., 2013) ve 7 nolu kromozomun parasentrik inversiyonu (Ichioka ve ark., 2005) da farklı infertilite fenotipleri ile ilişkilendirilmektedir.

### 2.1.2. Y-kromozomu Mikrodelesyonları

Genomdaki en küçük kromozomlardan biri olan Y-kromozomu psödo-otozomal, ökromatin ve heterokromatin olmak üzere 3 bölgeden oluşur. Y kromozomunun kısa ve uzun kolunun (Yp ve Yq sırasıyla) uç kısımlarında yer alan psedo-otozomal bölgeler (PAR1 ve PAR2) X-kromozomunda homologu bulunan ve 1. mayotik bölünme sırasında X-kromozomuyla eşlenmenin gerçekleşmesini sağlayan bölgelerdir. Y-kromozomunun PAR1 ve PAR2 bölgeleri dışında kalan kısımlarında fertilité ile ilişkilendirilen birçok gen bulunur (Şekil 1) (Ayensu-Coker ve ark., 2007, Rives, 2014).



Şekil 1. Y kromozomu AZF delesyonları ve AZFc kısmi delesyonları (Beyaz et al., 2017)

Y-kromozomunun uzun kolunda meydana gelen mikrodelesyonlar erkek infertilitesinin en yaygın görülen genetik sebeplerinden biridir (Ferlin ve ark., 2019). Azospermik ya da şiddetli oligospermik infertil erkeklerde Yq mikrodelesyonlarının global prevalansının %7,5 olduğu tahmin edilmektedir. Bu oranın Türkiye'deki değerinin ise %7-9 olduğu tahmin edilmektedir (Colaco ve Modi, 2018). Y-kromozomunun uzun kolunda azospermik faktör a, b ve c (AZFa, AZFb, AZFc) alt bölgelerini içeren azospermik faktör bölgesi (AZF) bulunur. AZFa, AZFb ve AZFc bölgeleri spermatogenezle ilişkili genleri içerir, bu nedenle bu bölge(ler)de meydana gelen çeşitli delesyonlar özellikle spermatogenez bozuklukları ile ilişkilendirilmektedir (Thirumavalavan ve ark., 2019).

AZFa: AZFa lokusunda tek kopya olarak bulunan 4 gen vardır. Bu genler

ubukitine özgü peptidaz 9 (*USP9Y*), cansız [asp-glu-ala-asp] kutu RNA helikazlar kutu 3 Y-bağlantılı (*DBY*, *DDX3Y*), ubukitin ile transkribe edilen tetratrikoptit tekrarı içeren Y-bağlantılı (*UTY*) ve timosin beta 4 Y-bağlantılı (*TB4Y*) genidir. Germ hücre gelişiminde rol oynayan *USP9Y* geninin mutasyonu infertilite ile ilişkilendirilmektedir. *DBY* geni sadece pre-mayotik erkek germ hücrelerinde eksprese edilir ve spermatogenezde rol oynar. *DBY* geninin delesyonu germinal aplazi (Sertoli Cell Only Syndrome, SCOS) ya da şiddetli hipospermatogenezle sonuçlanır. *UTY* ve *TB4Y* genlerinin testiküler fonksiyonu bilinmemektedir (Colaco ve Modi, 2018).

AZFb: AZFb bölgesi spermatogenez sürecinde etkili olan ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 1A Y-bağlantılı (*EIF1AY*), ribosomal protein S4 Y-bağlantılı 2 (*RPS4Y2*), *SMCY*, ısı-şok transkripsiyon faktörü Y-ilişkili (*HSFY*), Y kromozomu üzerindeki XK-ilişkili protein, (*XKRY*), PTPN13 benzeri Y-bağlantılı (*PRY*) ve RNA bağlayıcı motif protein Y kromozom (*RBMY*) genlerini içermektedir. AZFb bölgesinde homolog ve non-homolog rekombinasyondan kaynaklandığı düşünülen büyük delesyonlar meydana gelir. Y-kromozomu mikrolelesyonlarının %15'inden sorumlu olan AZFb delesyonları azospermiden, SCOS ve maturasyon arrestine kadar farklı fenotiplere yol açabilir (Ferlin ve ark., 2019).

AZFc: AZFc bölgesindeki delesyonlar çeşitli fenotiplere neden olur ve bu delesyonların çoğu spermatogenezin azalmasından kaynaklanan düşük sperm konsantrasyonu ile ilişkilendirilmektedir. AZFc delesyonları non-obstrüktif azospermilerin (NOA) yaklaşık olarak %12'sinden ve şiddetli oligospermiklerin ise %6'sından sorumludur. AZFa ve AZFb bölgeleri spermatogenez başlatmak için yeterli olmasına rağmen AZFc bölgesinin varlığı da spermatogenezin normal tamamlanması için gereklidir (O'Brien ve ark., 2010, Rives, 2014).

### 2.1.3 Tek Gen Mutasyonları

Spermatogenez sürecinde 2000'den fazla genin rol aldığı ve bunlardan 600-900 tanesinin özellikle erkek germ hattında eksprese edildiği bilinmektedir. Bu yüzden erkek infertilitesinin genetiğini çözmeye çalışmak oldukça zordur. Erkek infertilitesi çok sayıda genle ilişkilendirilmesine rağmen bu genlerden sadece bir kısmı fare modelleri ya da birbirinden bağımsız çalışmalarla tekrarlanmış ve patojenik olduğu fonksiyonel olarak kanıtlanmıştır (Tuttelmann ve ark., 2018).

### **CFTR Gen Mutasyonu**

Kistik fibrozis transmembran regülatör (*CFTR*) geni 7q31.2'de lokalize olan ve vas deferensin oluşumunda rol alan bir gendir. Yirmi yedi ekzondan oluşan *CFTR* geni için 1800'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. *CFTR* proteini sperm maturasyonu için gereklidir. *CFTR* genindeki bazı mutasyonlar kistik fibrozis ve konjenital bilateral vas deferens yokluğu (CBAVD) gibi rahatsızlıklara neden olur (Hamada ve ark., 2013). CBAVD sendromu infertil erkeklerin %1-2'sinde, obstrüktif azospermik erkeklerin ise %6'sında görülen konjenital bilateral vasdeferens yokluğu ile karakterize bir hastalıktır (de Souza ve ark., 2018). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada *CFTR* geninin promotor bölgesinde yeni bir mutasyon belirlenmiştir (c.-195C>A). Yapılan biyoinformatik analizler sonucu bu mutasyonun transkripsiyon faktörü SP1'in bağlanma yerinde meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır. c.-195C>A mutasyonunun *CFTR* gen ekspresyonunu aşağı yönlü olarak düzenleyen fonksiyonel bir hastalık varyantı olduğu ve CBAVD hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Feng ve ark., 2019).

### **Kallmann Sendromuna Neden Olan Mutasyonlar**

Kallmann sendromu başlıca hipogonadotropik hipogonadizm, infertilite ve anosmia ya da hiposmi ile karakterize bir rahatsızlıktır. Genetik ve fenotipik heterojeniteye sahip olan bu hastalık kallmann sendromu 1 (*KALI*), fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (*FGFR1*), fibroblast büyüme faktörü 8 (*FGF8*) ve anosmin 1 (*ANOS1*) genlerinin de dahil olduğu çok sayıda genle ilişkilendirilmektedir (Dode ve Hardelin, 2010, Lopategui ve ark., 2018). Extrasellüler glikoprotein anosmin-1 i kodlayan *KALI* geni hastalığın X kromozomuyla ilişkili resesif formundan (*KAL1*); *FGFR1* genindeki mutasyonlar otozomal dominant formundan (*KAL2*); gonadotropin-releasing hormone reseptör (*GNHR*) genindeki mutasyonlar ise hastalığın otozomal resesif formundan sorumludur (Mitchell ve ark., 2011). Prokinetisin reseptör 2 (*PROKR2*) ve prokinetisin 2 (*PROK2*) genlerindeki mutasyonlar homozigot, heterozigot ve bileşik heterozigot durumlarda bulunmuştur. Bu genler muhtemelen hem otozomal resesif monogenik kallmann sendromu-3 (*KAL3*) hem de digenik/oligogenik kallmann sendromu transmisyon formundan sorumludur (Neto ve ark., 2016a). Çeşitli genlerde meydana gelen mutasyonlar GnRH nöronlarının gelişimini ve migrasyonunu bozarak bu sendroma neden olur. Bu genlerden bazıları; NMDA reseptör sinaptonükleer sinyalizasyon ve nöronal migrasyon faktörü (*NSMF*), *FGF8*, *FGF1*, interlökin 17



reseptörü D (*IL17RD*), heparin sülfat 6 o sulfuttransferaz (*HS6ST1*), kromodomain helikaz DNA bağlanma proteini 7 (*CHD7*), WD tekrar içeren proteini 11 (*WDR11*), semaforin 3A (*SEMA3A*), tubulin beta 3 (*TUBB3*) ve SRY kutusu 10 (*SOX10*)' dur (Stamou ve Georgopoulos, 2018).

### **Testiste Eksprese Edilen 11 (*TEX 11*) ve Testiste Eksprese Edilen 15 (*TEX15*) Genlerinin Mutasyonu**

X-kromozomu üzerinde yer alan *TEX11* ve 8 nolu kromozom üzerinde yer alan *TEX15* genleri germ hücrelerine özgü genlerdir. Bu genlerin ekspresyon ve fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikler spermatogenik bozukluğa ve dolayısıyla erkek infertilitesine neden olabilir. *TEX11* geni mayotik kromozomlarda sinapsisin başlaması ve sürdürülmesinde önemlidir, ayrıca fertilité için de gereklidir. *TEX15* geni ise sinaptonemal kompleksin doğru birleşmesinde ve mayotik süreçte gereklidir (Boroujeni et al., 2018). *TEX15* geninde meydana gelen c.2130T>G, p.Y710 nonsense mutasyonun spermatogenik bozukluğa neden olduğu bulunmuştur (Okutman ve ark., 2015). *TEX15* geninde meydana gelen c.2419A>T, p.Lys807 nonsense mutasyonu NOA (Colombo ve ark., 2017) ile c.6934G>A (p.R2312X) nonsense mutasyonu ise kriptozoospermi ile ilişkilendirilmektedir (Wang ve ark., 2018). Non-obstrüktif azospermiye neden olan bir diğer *TEX15* mutasyonu da c.3040delT, p.Ser1014Leufs5'tir (Colombo ve ark., 2017). *TEX11* ve *TEX15* genlerinde meydana gelen mutasyonlar bu genlerin spermatogenezdeki rolünün önemini göstermektedir.

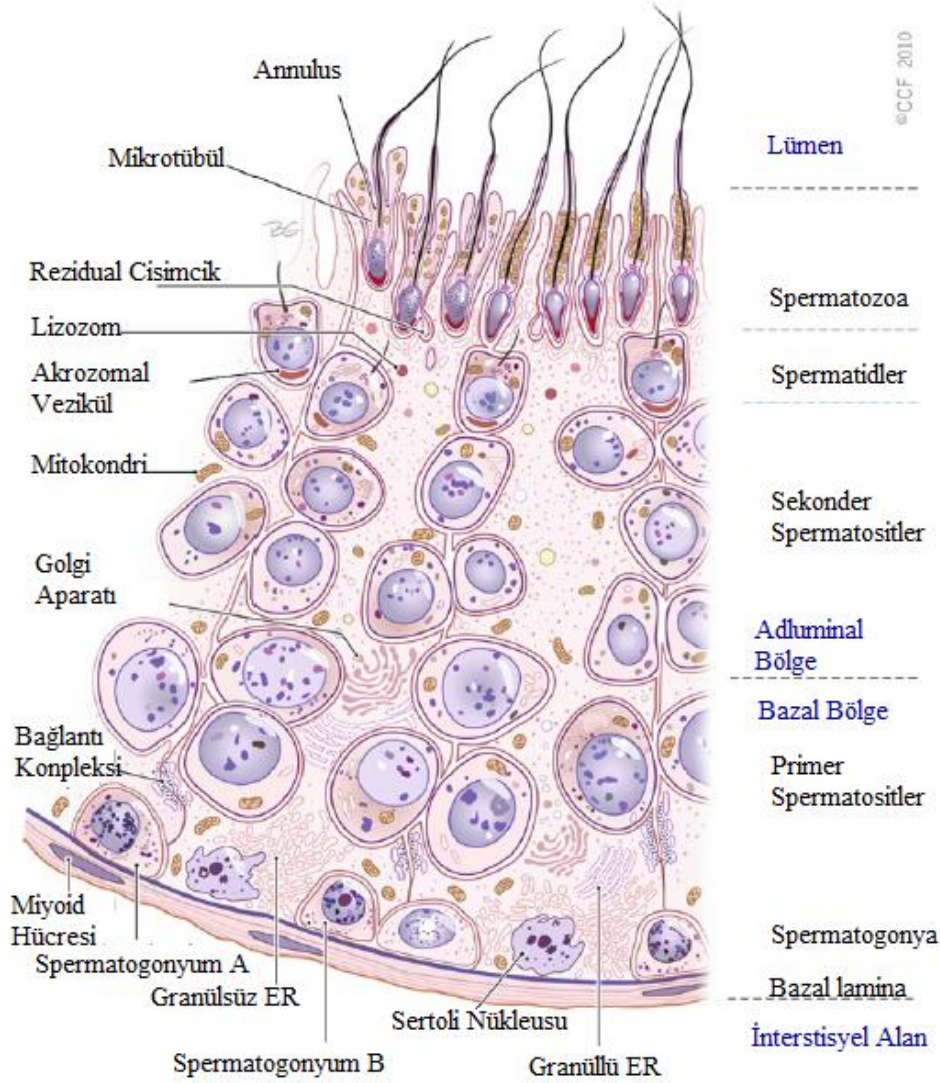
### ***DPY1912* ve *SPATA16* Gen Mutasyonları**

Globozoospermi oosite penetre olamayan ve aktive edilemeyen yuvarlak başlı spermatozoayla karakterize nadir bir infertilite durumudur. On iki nolu kromozom üzerinde lokalize olan Dpy-19 benzeri 2 (*DPY19L2*) geninde meydana gelen mutasyonlar globozoospermi ile ilişkilendirilmektedir (Neto ve ark., 2016a). Mutasyonu globozoospermiye neden olan diğer bir gen ise *SPATA16*'dır (ElInati ve ark., 2016). Spermatogenez ilişkili 16 (*SPATA16*) geninin CRISPR/Cas9 ile analizi bu genin fare ve insanlarda fertilité için önemi bir gen olduğunu ortaya çıkarmıştır (Fujihara ve ark., 2017).

## **2.2. Spermatogenez ve Evreleri**

Spermatogenez seminifer tübüllerde meydana gelen ve olgun erkek gametin

üretimi ile sonuçlanan oldukça kompleks ve dinamik bir süreçtir. Bu süreç mitotik çoğalma evresi, mayotik bölünme evresi ve spermatidlerin olgun sperm hücresine farklılaştığı spermiyogenez evresinden oluşur (Şekil 2) (Neto ve ark., 2016b, Sharma ve Agarwal, 2011b).



**Şekil 2.** Seminifer tübülde germinal epitelyum kesiti. Sertoli hücreleri germinal epitelyumu bazal ve adluminal bölgelere ayırır. Olgun sperm hücreleri lumene salınır (ER: Endoplazmik Retikulum) (Sharma ve Agarwal, 2011b)

### 2.2.1. Mitotik Çoğalma Evresi

Spermatogonyumların devamlılığını ve çoğalmasını mümkün kılan evredir. Spermatogenez fetal dönemde seminifer tübüllerin duvarında bulunan ve spermatogonyum olarak bilinen farklılaşmamış diploid (2n) hücrelerle başlar (Sharma

ve Agarwal, 2011b). Germinal epitelyumun bazal kısmındaki pozisyonlarına, morfolojilerine ve nükleuslarının boyanma durumlarına göre farklı tipte spermatogonyalar bulunur. Bunlar açık renk boyanan tip A, koyu renk boyanan tip A ve tip B spermatogonyalardır. Tam bir spermatogenez için gerekli olan tip A spermatogonyalar spermatogenezin kök hücre havuzuna aittir ve sperm hücrelerinin devamlılığını sağlar. B tip spermatogonyalar ise primer spermatidleri oluşturmak üzere büyüyüp olgunlaşır (Holstein ve ark., 2003).

### **2.2.2. Mayotik Bölünme Evresi (Spermatositogenez)**

Primer spermatositlerin (2n) haploid spermatidleri oluşturmak üzere birbiri ardına iki mayoz bölünme geçirdiği evredir. Sertoli hücrelerinin bazal kompartımanında bulunan primer spermatositler mayoz bölünmeler aracılığıyla 22,X ya da 22,Y kromozoma sahip olan sekonder spermatositleri (n) oluşturur. Bu süreç mayoz sırasında meydana gelen genetik rekombinasyon sayesinde sekonder spermatositlere ve bunlardan farklılaşan sperm hücrelerine özgün genetik özellikler kazandırır (Sharma ve Agarwal, 2011b).

### **2.2.3. Spermiyogenez**

Spermiyogenez germ hücre farklılaşmasının haploid fazıdır ve post mayotik spermatidlerin seminifer tübül lumenine olgun sperm hücresi olarak salınmasını kapsar. Spermiyogenez sırasında nükleer olaylarla ilişkili meydana gelen farklılaşma süreci somatik hücrelerde görülmeyen en radikal değişiklikler arasında yer alır. Spermiyogenezde ilk olarak Golgi aparatına bağlı bir süreçle akrozom (pro-akrozom) oluşur. Bu pro-akrozomal granül tam olarak gelişmiş akrozomu oluşturana kadar çeşitli değişikliklere uğrar ve sonuçta fertilizasyon için gerekli olan proteolitik enzimleri içeren akrozoma dönüşür. Bu sırada sentriol çiftlerinden flagellum gelişmeye başlar ve sentriol çifti akrozomun karşı tarafındaki kamçıya implante olmak için nükleus membranına göç eder. Olgun sperm hücrelerinin oldukça sıkı olan nükleus yapısına ulaşılabilmesi için spermatositlerde protaminasyon süreciyle kromatin yeniden şekillenir. Bu süreçte DNA'nın paketlenmesinde yer alan histonların büyük kısmı protaminlerle yer değiştirir. Protaminler DNA'ya bağlanarak çift sarmalın fosfodiester omurgasını nötralize eder ve kromatinin daha sıkı olan toroid yapısını oluşturur. Yuvarlak spermatidler çeşitli hücre spesifik transkripsiyon faktörlerinin kontrolünde

yoğun olarak mRNA'ları sentezler. Bu mRNA'lar sıkı kromatin yapısından dolayı transkripsiyonun durduğu zamanlarda tranlasyona uğramak için depolanır (Grégoire ve ark., 2011).

Erkek gametinin farklılaşması sırasında genom önemli değişikliklere maruz kalır. Bu değişiklikler sadece DNA sekansını ve homolog rekombinasyon aracılığıyla genetik bilgiyi etkilemekle kalmaz aynı zamanda spermin nükleer yapısını ve epigenetik bilgisini de etkiler. Erkek gametogenezi sırasında meydana gelen çeşitli epigenetik değişiklikler gametlerin uygun maturasyonu için gereklidir (Dada ve ark., 2012).

## **2.3. Spermatogenez Sürecinde Meydana Gelen Epigenetik Modifikasyonlar**

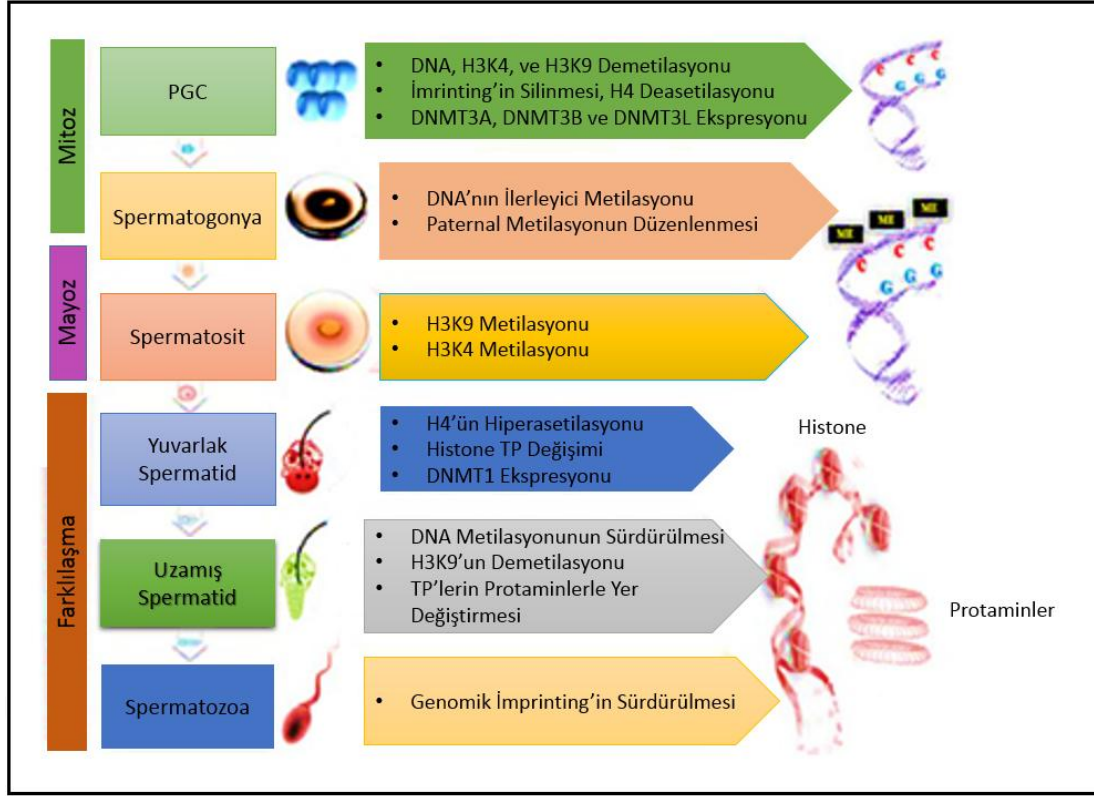
### **2.3.1. DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları**

DNA metilasyonu bu güne kadar en kapsamlı çalışılan epigenetik modifikasyondur (McSwiggin ve O'Doherty, 2018). DNA metilasyonu S-adenozil metioninden bir metil grubunun (CH<sub>3</sub>), CpG dinükleotitlerindeki sitozin halkasının beşinci pozisyonuna eklenmesidir. Kendine özgü DNA metilasyon profiline sahip olan testiküler DNA, somatik dokularla karşılaştırıldığında 8 kat daha az metiledir. Anormal semen parametreleri ve erkek infertilitesinin çeşitli durumlarıyla ilişkili DNA metilasyon değişiklikleri, genomda global olarak gerçekleşebileceği gibi spesifik bir lokusla ya da gen(ler)le de sınırlı olabilir. Erkek germ hattında sadece *Igf2/H19*, *Rasgrfl*, *Dlk1-Gt12* ve *Zdbf2* imprinting merkezleri metillenmektedir (Boissonnas ve ark., 2013, Rajender ve ark., 2011). Laqqan ve Hammadeh (2018), fertil erkeklerle karşılaştırıldığında subfertil erkeklerin sperm DNA'larının CpG adacıklarındaki metilasyon seviyesinin farklı olduğunu önermektedir (Laqqan ve Hammadeh, 2018). Normospermik ve oligospermik erkeklere ait sperm örnekleri imprinted genlerin DNA metilasyonu açısından tek hücre seviyesinde analiz edildiğinde; normospermik erkeklerin homojen bir DNA metilasyon seviyesine sahip iken oligospermik erkeklerin heterojen bir DNA metilasyon seviyesine sahip olduğu bildirilmiştir. Oligospermik bireylerin semenlerinde epigenetik mozaizm belirlenmiştir (Laurentino ve ark., 2015). Global sperm DNA metilasyon seviyesi sperm kromatini, DNA bütünlüğü ve klasik semen parametreleriyle ilişkilendirilmektedir. Semen parametrelerinden sperm konsantrasyonu ve hareketliliği global DNA metilasyonu ile pozitif korelasyon

gösterirken, sperm canlılığı ve morfolojisi ile böyle bir ilişki gözlenmemiştir (Montjean ve ark., 2015). Spermatogenez sırasında mikrotübül fonksiyonlarını düzenleyen translasyon sonrası modifikasyon (poliglutamilasyon) sürecinde görev yapan deglutamilaz sitotoksik hücre proteinaz 5 (CCP5, AGLB5) enziminin kaybının spermatogenezin birçok basamağını bozarak erkek infertilitesine neden olduğu gösterilmiştir (Giordano ve ark., 2019).

Spermatogenez sırasında mayozdan önce meydana gelen ilk epigenetik olay DNA'nın ilerleyici demetilasyon-remetilasyonudur. Mayoz sırasında DNA metil transferaz 3A (DNMT3A), DNA metil transferaz 3B (DNMT3B) ve kofaktör DNA metil transferaz 3L (DNMT3L) aktivitesi de novo DNA metilasyon seviyesini düzenler ve bu süreç doğumdan sonra pakiten spermatosit aşamasında tamamlanır. Ardından metilasyon profili DNA metil transferaz 1 (DNMT1) aktivitesi ile sürdürülür. Bu modifikasyonlara ek olarak DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin erişimini düzenleyen histon modifikasyonları (metilasyon ve asetilasyon) da meydana gelir. Histon metilaz ve histon demetilaz gibi spesifik enzimler histon 3'ün 9. lizini ve 4. lizininin (H3-K9 ve H3-K4) metilasyon paternlerini düzenler. Genellikle, H3-K9 metilasyon seviyesi mayozda yüksektir fakat bu sürecin sonunda azalır (Şekil 3). Mayoz sırasında azaltılan H3-K4 metilasyonu DNA'nın sessizleştirilmesi ile ilişkilendirilmektedir. Spermatogenez sırasında histon asetilaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) gibi çeşitli enzimler H3 ve H4 lizin rezidülerinin asetilasyon ve deasetilasyon süreçlerini düzenler. Spermiyogenez sırasında meydana gelen H4 hiperasetilasyonu ise doğru histon-protamin geçişinde önemli bir rol oynar ve uzayan spermatidlerde nükleozom dağılmasına izin verir (Gunes ve Kulac, 2013, Stuppia ve ark., 2015). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Schon ve ark. (2019), normospermik bireyler ile astenospermik, teratospermik ve astenoteratospermik bireyleri translasyon sonrası histon modifikasyonları açısından analiz etmiştir. Astenoteratospermik örnekleri normospermiklerle (n=8) karşılaştırdıklarında H4K20 ve H3K9 metilasyonunda ve H4 asetilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendiğini bildirmişlerdir. Astenospermik örneklerin H4 asetilasyonunda azalma gözlenirken; H4K20 ve H3K9 metilasyonunda değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (p<0.04). Anormal progresyona sahip örneklerde H4 asetilasyonunda azalma olduğu (p<0.02) bildirilirken, teratozoospermik örneklerde normospermik örneklerdekine benzer bir sonuç elde edildiği bildirilmiştir.

Araştırmacılar post translasyonel modifikasyonlardaki (PTM) bu değişikliklerin normal sperm fonksiyonu ve fertilitesi için önemli olabileceğini öne sürmüşlerdir (Schon ve ark., 2019).



**Şekil 3.** Spermatogenez sırasındaki epigenetik modifikasyonlar. Spermatogenezin farklı aşamaları süresince DNA metilasyonları ve histon modifikasyonlarının da dahil olduğu çeşitli epigenetik modifikasyonlar meydana gelir. (1) primordial germ hücreleri DNA ve histonların (H3'ün K4 ve K9 rezidülerinde) demetilasyon sürecine (genomik imprinting'in silinmesi ile) maruz kalır. H4 deasetilasyon süreci de meydana gelir. DNMT3A, DNMT3b VE DNMT3L bu süreçte eksprese edilir. (2) Spermatogonyada ilerleyici DNA metilasyonu meydana gelir. (3) Spermatositlerde H3K9 ve H3K4 metilasyonu gözlenir. (4) Yuvarlak spermatidlerde H4 hiperasetile olur, DNMT1 eksprese edilir ve histonların geçiş proteinleriyle yer değiştirmesi gerçekleşir. (5) Uzamış spermatidler H3K9 metilasyonu ile birlikte DNA metilasyonunun devamlılığını gösterir. Bu aşamada geçiş proteinleri protaminlerle yer değiştirir. (6) Spermatozoada genomik imprinting sürdürülür (Stuppia ve ark., 2015)

### 2.3.2. Histon-Protamin Değişimi

Spermatozoa morfoloji ve motilitesine ek olarak oldukça iyi organize olmuş kromatin yapısı ile de karakterizedir. Spermogenez sırasında histonların %85-90'lık

bir kısmının protaminlerle yer değiştirmesi sonucu sperm hücresi somatik hücrelerden 6-20 kat daha sıkı kromatin yapısına ulaşır (Gunes ve Kulac, 2013, Hammadh ve ark., 2010).

Histonların protaminlerle yer değiştirmesi sırasında meydana gelen modifikasyonlar disülfid bağlarının oluşumunu indükler. Disülfid bağları sperm nükleusunun stabilitesini artırmanın yanısıra, sperm motilitesini iyileştirme, oksidatif stresten ve dişi üreme kanallarında var olan toksik ajanlardan korunma ve sperm DNA'sının transkripsiyonel aktivitesini durdurma gibi bir takım etkiler de sağlamaktadır. Histon protamin değişim süreci birkaç basamakta gerçekleştirilir. Bunlardan ilki histonların testis spesifik histon varyantları ile yer değiştirmesiyken; ikinci basamak histon varyantlarının geçiş proteinleri 1-4 (TNP1-4) ile yer değiştirmesidir. Son olarak uzamış spermatid aşamasında ise geçiş proteinleri ile protaminler yer değiştirmektedir. Olgun spermatid nükleusunda protamin 1 ve 2 (P1 ve P2) olmak üzere iki çeşit protamin bulunur ki bu protaminler uygun sperm kromatin kondensasyonu ve dolayısıyla da erkek fertilitesi için gereklidir (Oliva, 2006, Rajender ve ark., 2011, Yu ve ark., 2014). İnfertil erkeklerde sperm çekirdek proteinlerinde değişiklikler gözlenmiştir (Hamad ve ark., 2014). İnsanlardaki normal P1/P2 oranı 0,8-1,2'dir. Anormal P1/P2 oranları ve düşük protamin seviyesi artmış DNA fragmantasyonu ve erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiştir. DNA fragmantasyonunun P1 ve P2 konsantrasyonu ile ters ilişkili olması protaminlerin sperm DNA hasarına karşı koruyucu rolü hakkında bilgi vermektedir. P1 ve P2 oranındaki değişiklikler infertil erkeklerde fertil erkeklerden daha yaygındır. Anormal protamin ekspresyonunun sebepleri hala araştırılmaktadır (Boissonnas ve ark., 2013, Yu ve ark., 2014). Protaminlerin kromatin yapısına eklenmesi sperm motilitesi için gereklidir. Ayrıca sperm DNA'sının oksidasyon ve fragmantasyondan korumasında etkin bir rol oynar (Jenkins ve ark., 2017). Ni ve ark. (2016), P1/P2 oranının erkek infertilitesine olan etkisini meta-analize dahil edilen 9 çalışmayı değerlendirerek analiz ederken; protamin eksikliğinin DNA hasarı üzerine olan etkisini ise konuyla ilgili 12 çalışmayı inceleyerek değerlendirmişlerdir. Yapılan meta-analiz sonucunda araştırmacılar subfertil erkeklerin kontrollere kıyasla daha yüksek P1/P2 oranına sahip olduğunu ve sperm DNA hasarının protamin eksikliği ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Sperm DNA hasarı ile P1/P2 arasında anlamlı bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir.

Araştırmacılar protamin oranının sperm kalitesinin değerlendirilmesi için uygun bir biyomarkır olduğu ve protamin eksikliğinin sperm DNA hasarı ile yakın ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (Ni ve ark., 2016).

#### **2.4. DNA Metilasyonu Analiz Yöntemleri**

Günümüzde epigenetik alanında yapılan çalışmaların büyük kısmı DNA metilasyonunu içermektedir. Çok sayıda DNA metilasyon analiz yöntemi bulunur. Tüm genom metilasyon profilini analiz etmek için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), uzun interspersed nükleer element 1 (LINE-1) pirosekanslama, luminometrik metilasyon analizi ve ELISA-tabanlı yöntemler; farklı metillenmiş bölgelerin karakterizasyonu için bisülfid sekanslama ve array ya da bead hibridizasyonu yöntemleri; spesifik bir genin metilasyon durumunu belirlemek için ise polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve sekanslama, pirosekanslama, metilasyon spesifik PZR (MSP), bisülfid sekanslama ve methylight gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yapılacak çalışmanın amacı, gereksinimleri, maliyeti, iç gücü gereksinimi, çalışılacak DNA bölgesinin özelliği, kalitatif ya da kantitatif olması gibi özellikler dikkate alınarak yapılacak araştırma için en uygun olan yöntem seçilebilir (Kurduyukov ve Bullock, 2016, Redshaw ve ark., 2014).

##### **2.4.1. Metilasyon Spesifik PZR**

MSP yöntemi CpG adacıklarının metilasyon durumunu belirlemek için kullanılan PZR tabanlı bir yöntemdir. Bu yöntem hücre hatları ile taze ya da dondurulmuş dokularında dahil olduğu klinik örneklerde CpG adacıklarındaki promotor hipermetilasyonunun belirlenmesini kolaylaştırır. CpG adacıklarındaki DNA metilasyon durumunun haritalaması imprinted genlerin düzenlenmesi, X kromozom inaktivasyonu ve insan kanserlerinde tümör baskılayıcı genlerin susturulması gibi farklı biyolojik süreçlerin anlaşılması için gerekli olmaktadır. Herman ve ark. (1996), tarafından ilk kez 1996 yılında tanımlanan MSP yöntemi, CpG adacığı içinde yer alan herhangi bir CpG grubunun yerinin metilasyon durumunu hızlıca değerlendirebilen bir yöntemdir. Metilasyona sensitif kesim enzimlerinin kullanımını gerektirmez. Bu analiz başlangıç aşamasında DNA'nın sodyum bisülfid ile modifikasyonunu gerektirir. Sodyum bisülfid modifikasyonu ile metile olmayan tüm sitozinler urasile dönüşürken metile olanlar aynı kalır. Sonrasında araştırılan bölgeye özgü metile ve unmetile primerler kullanılarak PZR



amplifikasyonu gerçekleştirilir. MSP küçük miktarlarda DNA gerektiren oldukça hassas bir yöntem olmasına rağmen, metilasyon ile ilgili sadece metilasyonun varlığı ya da yokluğu hakkında bilgi vermesi ve metilasyonun miktarını belirleyememesi gibi dezavantajlara da sahip olan bir yöntemdir (Herman ve ark., 1996, Licchesi ve Herman, 2009).

#### **2.4.2. Bisülfıt-Pirosekanslama ile DNA Metilasyon Analizi**

Bisülfıt-pirosekanslama bisülfıt dönüşümü ve PZR amplifikasyonuna dayanan bir yöntemdir. PZR’da bir tane biotinlenmiş primer ya da aynı reaksiyonda biotinle işaretlenmiş bir primer ile kombine tailed primer kullanılarak PZR ürününün tek zincirli DNA’ya dönüşümü ve pirosekanslama kolaylaştırılır. PZR sırasında sekans primerleri tek zincirli DNA’ya bağlanır ve böylece örnekler pirosekanslama analizi için hazır hale gelir. Pirosekanslama kısıdan orta uzunluğa kadar olan DNA sekanslarının analizi için bir primer uzama metodudur. Nükleotidin kalıp zincire eklenmesi lusiferaz reaksiyonu ile ölçülen pirofosfotaz salınımına neden olur. Üretilen sinyal miktarı ile salınan pirofosfat miktarı orantılıdır ve bu yüzden her bir CpG yerindeki dönüşmemiş C ve dönüşmüş T nükleotitlerinin yüzdesi belirlenebilir. Fakat bir reaksiyonda sadece 25-30 baz çiftinin sekanslanabilmesi sınırlı sayıda CpG yerinin değerlendirilmesine neden olur (Shen ve Waterland, 2007).

#### **2.4.3. Methylight Yöntemi**

Methylight yöntemi metilasyon durumunun belirlenmesinde kullanılan en yaygın PZR esaslı uygulamalardan biridir. Bu yöntem çok düşük miktardaki DNA ile gerçekleştirilebilen yüksek çıktılı, hassas, tekrarlanabilir ve doğru sonuç verebilen bir metilasyon analiz yöntemidir. Methylight yönteminde DNA'nın sodyum bisülfıt dönüşümünün ardından metile ya da unmetile primerler ve hidroliz prob(lar)ı kullanılarak eş zamanlı kantitatif PZR işlemi gerçekleştirilir (Ogino ve ark., 2006, Redshaw ve ark., 2014). Sodyum bisülfıt dönüşümü ile genomik DNA'daki metile olmayan sitozinler urasile dönüşürken metile olanlarda herhangi bir değişiklik olmaz ve bu sayede genomik DNA'da metilasyon-bağımlı sekans farklılıkları meydana gelir. Bu sekans farklılıkları floresans tabanlı kantitatif bir PZR analizi olan methylight yöntemi ile belirlenir. Methylight analizi tek ya da çift prob kullanımına bağlı olarak yarı-kantitatif ya da kantitatif olabilir (Eads ve ark., 2000). Methylight yönteminin esası orijinal

genomik DNA'nın metilasyon durumuna göre DNA oligonükleotitlerinin bisülfid dönüşümü yapılmış DNA'ya farklı şekilde bağlanmasına ve/veya amplifikasyonuna dayanır. Kullanılan oligonükleotitler metile ya da unmetile sekansa göre dizayn edilmiş ileri ve geri primerler ile bu primerler arasında yer alan çift işaretli (florofor ve quencher işaretli) prop(lar)dan oluşur. Yarı-kantitatif metyiligt analizinde PZR sırasında Taq polimeraz enzimi 5' ekzonükleaz aktivitesi ile florojenik hibridizasyon probunu parçalayarak quencher'dan floroforun fiziksel olarak ayrılmasını sağlar. Floroforun ayrılması ile ortaya çıkan floresans ölçülür ve metilasyon miktarının hesaplanmasında kullanılır (Eads ve ark., 2000, Trinh ve ark., 2001).

## **2.5. Sperm Kromatin Yapısının Analiz Edildiği Yöntemler**

Sperm kromatininin olgunluğu spermin fertilizasyon kapasitesi ve embriyonik gelişim için gereklidir. Ejakulatta anormal kromatin kondensasyonuna sahip olan sperm oranı fertilizasyon ve hamilelik şansının değerlendirilmesi için prognostik bir faktör olabilir. Kromatin yeniden şekillenme sürecinde spermatozooanın çekirdeğindeki histon ve protaminlerin yer değiştirerek yeniden organize olduğundan ve bu sayede oldukça sıkı bir kromatin yapısına ulaştığından yukarıda bahsedilmiştir. Kromatin kondensasyonundaki anomaliler erkek infertilitesi ile ilişkilendirilen DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu gibi nükleer hasarlara sebep olabilir (Sellami ve ark., 2013). Kromatin kondensasyonunun erkek fertilitésinin değerlendirilmesinde klasik semen parametrelerinden tamamen bağımsız olan önemli bir parametre olduğu bildirilmektedir (Hammadeh ve ark., 2001). Kromatin kondensasyonu kullanılan boya ve analiz yapılan mikroskobun özelliğine göre asidik anilin mavisi, kromomisin A<sub>3</sub> ve toluidin mavisi ile boyama yöntemleri gibi farklı yöntemler ile analiz edilebilir (Agarwal ve ark., 2017).

### **2.5.1. Asidik Anilin Mavisi ile Boyama Yöntemi**

Kromatin kondensasyonu asidik anilin mavisi ile boyama yöntemi kullanarak değerlendirilebilir. Bu boyama yöntemi lizin bakımından zengin olan histonları, arjinin ve sistein bakımından zengin olan protaminlerden ayırır. Bu teknik lizin için spesifik pozitif bir reaksiyon verir ve ejaküle insan spermatozooasının temel nükleer protein kompozisyonundaki farklılıkları ortaya çıkarır. Olgunlaşmamış spermatozooanın histon bakımından zengin olan nükleusu lizin açısından zengindir ve sonuç olarak mavi boyayı

alır. Diğer taraftan olgun spermatozanın protamin açısından zengin olan nükleusu arjinin ve sistein bakımından zengindir ve oldukça düşük miktarda lizin içerir, dolayısıyla anilin mavisi ile boyanmaz (Hammadeh ve ark., 2001). Sperm olgunlaşmaması ile akrozom anomalileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Sellami ve ark., 2013).

### **2.5.2. Kromomisin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) ile Boyama Yöntemi**

Kromomisin A<sub>3</sub> sperm kromatininin yapısındaki protaminlerin eksikliğini belirlemek için kullanılan güvenilir bir markırdır. CMA<sub>3</sub> guanin-sitozin spesifik bir florokromdur ve DNA üzerindeki bağlanma yerleri protaminlerle aynıdır. Bu nedenle sperm hücrelerinden yüksek CMA<sub>3</sub> floresansının alınması sperm nükleusunun düşük protaminasyon durumu için güçlü bir göstergedir. CMA<sub>3</sub> boyanması ile sperm kalitesi ve fertilizasyon kapasitesi arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Agarwal ve ark., 2017, Lolis ve ark., 1996).

### **2.5.3. Toluidin Mavisi ile Boyama Yöntemi**

Toluidin mavisi sperm DNA'sının fosfat rezidüleri için yüksek afiniteye sahip tiyazin metakromatik bir boyadır. Hasarlı kromatine bağlandığında sperm menekşe mavisi bir renk almasına sebep olur. Toluidin mavisi ile boyanan örnekler standart mikroskoplarla analiz edilebilir ancak örneğin orta derecede boya alması değerlendirme sırasında bireyler arası farklılıklara neden olabilir (Agarwal ve ark., 2016).

## **2.6. Epigenetik Değişiklikler ve Spermatogenez Bozuklukları**

Spermatogenez bozuklukları erkek infertilitesinin en yaygın görülen sebebi olmasına rağmen, vakaların %50'sinde anormal spermatogenezin sebebi bilinmemektedir (Chen ve ark., 2014, Gu ve ark., 2010a). Germ hattı genlerindeki epigenetik işaretler normal bir spermatogenez süreci için oldukça önemlidir ve testiste eksprese edilen genlerin anormal epigenetik modifikasyonları erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiştir. Germ hattı düzenleyici *DAZL* genindeki metilasyon defektleri oligoasteno-teratospermili (OAT) hastalarda normospermik erkeklere göre daha fazla bulunmuştur. Ancak normospermik ve OAT'lı hastalar arasında *DAZL* geninin promotor metilasyon durumu açısından bir varyasyon gözlenmediği bildirilmiştir. Oligospermik hastalarda *LIT1*, *MEST*, *SNRPN*, *PLAGL1*, *PEG3*, *H19* ve *IGF2* imprinting lokuslarının metilasyon durumları ile abnormal protamin seviyesi arasında bir ilişki bulunduğu

bildirilmiştir. Histon-protamin geçişinde yer alan genlerin mRNA seviyelerindeki değişiklikler normal ve oligospermik hastaların global testis transkriptomlarını mikroarray analizi ile araştıran çalışmalarla da doğrulanmıştır (Stuppia ve ark., 2015). Çeşitli genlerin epimutasyonu özellikle hipermetilasyonu erkek infertilitesinde önemlidir. *NTF3*, *MTHFR*, *HRAS*, *PAX8*, *SFN*, *PLAG1*, *RASGF1*, *GTL2*, *DIRAS3*, *SNRPN*, *MEST*, *KCNQ1*, *LTI* genlerinin promotor DNA hipermetilasyonu semen parametrelerinde bozulma ya da erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmektedir (Rajender ve ark., 2011).

## 2.7. Spermatogenez ve DNA Hasarı

İç ve dış faktörler tarafından düzenlenen spermatogenez sürecinde çeşitli DNA hasarları meydana gelebilir. Erkek germ hattında meydana gelen DNA hasarı infertiliteye, düşüklere ve fetüste doğum defektlerine sebep olabilir (Aitken ve De Iuliis, 2010). Sperm kromatini oldukça sıkı olan yapısı nedeniyle somatik hücre kromatininden farklıdır (Boissonnas ve ark., 2013). Sperm kromatininin bu sıkı yapısı sperm DNA'sını dış kaynaklı saldırılara karşı korur. Ancak, bu korumaya rağmen bazal sperm DNA hasarı seviyesinin infertil erkeklerde daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Testiküler, epididimal ve ejakulat sperminde hasarlı DNA'nın bulunduğu bilinmektedir (González-Marín ve ark., 2012). Spermatogenez sırasında meydana gelen DNA hasarına, DNA onarımının yanı sıra apoptoz ve kromatinin yeniden şekillenmesi sırasında meydana gelen sorunlar ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına bağlı oksidatif stresin (OS) neden olduğu düşünülmektedir (Lipshultz ve ark., 2009).

Apoptoz erkeklerde germ hücre gelişiminin en önemli özelliğidir. Gonadal farklılaşmanın erken aşamalarından fertilizasyon anına kadar bu hücrelerin üretimini ve fonksiyonunu yönlendirir. Gelişimin erken evrelerinde apoptoz germ hücrelerinin Sertoli hücrelerine oranını düzenleyerek germ hattı ontogenezinde önemli bir rol oynar. Erişkin dönemde ise çeşitli fizyolojik ve çevresel faktörlere cevap olarak hasar görmüş germ hücrelerin seminifer epitelyumlardan kaldırılması işlevini yerine getirir. Apoptoz sürecinde meydana gelen bozulmalar spermatogenezin durmasına sebep olabilir. Olgun sperm hücrelerinde apoptotik süreç oksidatif hasarlı DNA taşıyan sperm hücrelerinin fonksiyonel ölümünü hızlandırır. Spermatozoadaki DNA hasarı subfertilite, preimplantasyon gelişimin bozulması ve düşükle sonuçlanabilir. Canlı hücrelerdeki DNA hasarının büyük kısmı oksidatif hasarın sonucu olarak apoptozun erken aşamaları

sırasında meydana gelir (Aitken ve Baker, 2013).

ROS spermatozoanın işlevselliği üzerinde hem fizyolojik hem de patofizyolojik role sahiptir. ROS seviyesi erkek genital sistemi ve seminal sıvıdaki antioksidant seviyesinin temizleme kapasitesinin üzerine çıkarsa OS meydana gelir. Spermatozoa membranının yüksek konsantrasyonda doymamış yağ asiti içermesinden dolayı sperm hücreleri ROS'a karşı oldukça hassastır. ROS'dan kaynaklanan OS sperm DNA hasarına, apoptozun hızlanmasına ve motilitenin değişmesine sebep olabilir (Tadros ve Vij, 2019, Solomon Jr ve ark., 2019). DNA baz eklentileri (8-OHdG gibi) ve DNA fragmentasyonu OS'den kaynaklanan DNA hasar tipleri arasında yer alır (Singh ve Agarwal, 2011).

Kromatinin yeniden şekillenmesi sırasında oluşan kıvrılmaları azaltmak için topoizomerazlar tarafından DNA zincirinde fizyolojik kırıklar meydana getirilir. Bu zincir kırıkları onarım için histon fosforilasyonu yoluyla H2A histon aile üyesi X (H2A Histon Family Member X,  $\gamma$ -H2AX) ile işaretlenir. Çeşitli nedenlerden dolayı onarım süreci bozulursa DNA'daki hasar seviyesinin göstergesi olan  $\gamma$ -H2AX seviyesinde artış olması beklenir. Bu sürecin kontrolündeki değişiklikler kromatin paketlemesinde anomaliler ya da onarılmayan DNA çentikleri/kırıkları ile sonuçlanabilir (Aitken ve De Iuliis, 2010).

## **2.8. Sperm DNA Fragmentasyonu**

DNA fragmentasyonu sperm hücrelerinde yaygın olarak görülen DNA hasar tiplerinden biri olup DNA'da meydana gelen tek ve çift zincir kırıklarını (sırasıyla SSB ve DSB) kapsamaktadır. Sperm hücrelerinde serbest radikallerin antioksidant seviyesini aşması oksidatif stres ve sonrasında da DNA fragmentasyonu ile sonuçlanabilir (Simon ve ark., 2019). DNA fragmentasyonuna neden olan faktörler iç ya da dış kaynaklı olabilir. Fragmentasyona neden olan iç kaynaklı faktörler: kromatin yeniden şekillenmesi sırasında meydana gelen fizyolojik kırıkların onarılmaması, yarım kalmış apoptoz, rekombinasyonda eksiklikler/bozukluklar, spermatidlerin Sertoli hücrelerinden erken salınması ve post-testiküler OS'dir. Dış kaynaklı faktörler ise enfeksiyonlar, kullanılan ilaçlara karşı geliştirilen reaksiyon(lar), iyatrojenik hasar, semenin elde edilme koşulları ve ejakulasyondan sonra geçen sürenin fazla olmasıdır (Gonzalez-Marin ve ark., 2012).

İnfertil erkeklerin fertil erkeklerden daha yüksek sperm DNA fragmentasyon

oranına sahip olduğu bildirilmiştir (Zini ve ark., 2001). Sperm DNA fragmentasyonu düşük ve tekrarlayan hamilelik kayıplarına (Bungum ve ark., 2007, McQueen ve ark., 2019), pronükleusun epigenetik özelliklerinde (Rajabi ve ark., 2018) ve sperm protein profilinde değişikliklere neden olabilir (Bounartzi ve ark., 2016, Intasqui ve ark., 2013a, Intasqui ve ark., 2013b).

DNA lezyonunun tipi ve kompleksliği embriyonik gelişimi etkileyebilir. SSB'ler oosit tarafından kolayca onarılabilir iken; DSB'lerin büyük bölümü oositin onarım kapasitesini aştığından dolayı onarılamaz (García-Rodríguez ve ark., 2019). Onarılmayan çift zincir kırıklarının kromozomal anomaliye sahip zigot sıklığında artışa neden olabileceği bildirilmiştir (Marchetti ve ark., 2007).

## **2.9. DNA Fragmentasyonu Analiz Yöntemleri**

Sperm DNA hasarının ölçülmesi erkek infertilitesinin değerlendirilmesi için kullanışlı bir uygulamadır (Simon ve Carrell, 2013). Spermdeki DNA fragmentasyonu farklı yöntemler kullanılarak ölçülebilir. Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP çentik uç işaretleme (TUNEL), tek hücre jel elektroforezi (COMET), sperm kromatin yapı analizi (SCSA) ve sperm kromatin dağılım testi (SCD) bu yöntemler arasında yer alır.

### **2.9.1. TUNEL Analizi**

Sperm DNA fragmentasyonu genellikle genetik bilginin kaybı ya da değişikliği ile sonuçlanan nükleer DNA'daki tek ve/veya çift zincir kırıklarıdır (Evenson, 2016). TUNEL analizi hasar yerindeki modifiye nükleotitlere direk olarak bağlanıp gerçek tek ve çift zincir kırıklarını ölçebildiğinden dolayı avantajlı bir tekniktir (Sharma ve ark., 2016). TUNEL analizinde terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) olarak adlandırılan kalıba bağlı olmayan bir DNA polimeraz kullanır. TdT enzimi DNA'nın serbest 3' hidroksil (OH) uçlarına floresans izotiyosiyanat (FITC) işaretli deoksiüridin trifosfatları (FITC-dUTP) kalıba bağlı olmayan biçimde ekler. DNA'da ne kadar çok zincir kırığı varsa o kadar çok işaretli dUTP katılımı vardır. FITC-dUTP'lerin DNA uçlarına eklenmesinden sonra flow sitometri ya da floresans mikroskopla analiz yapılabilir (Sharma ve Agarwal, 2011a, Sharma ve ark., 2016).

### **2.9.2. COMET Analizi**

Tek hücre jel elektroforez (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) analizi

olarak da bilinen comet analizi (alkali comet) sperm DNA'sındaki tek ve çift zincir kırıklarını ölçmek için kullanılan kolay ve hassas bir yöntemdir. Comet analizinde sperm hücreleri mikroskop slaytı üzerinde ince bir agaroz tabakasının içine yerleştirilir ve yüksek tuz koşulları altında deterjan ile parçalanması sağlanır. Bu sayede DNA'nın sıkı bir yapı kazanmasını sağlayan protaminler ve az miktarda bulunan histonlar kaldırılmış olur. Alkali pH koşulları çift zincirli DNA'nın açılmasını sağlar ve ardından elektroforezle anot boyunca kırılan zincirlerin göçü meydana gelir. Kırılan zincirlerin anot boyunca olan hareketi floresan mikroskop altında comet kuyruğu oluşturur. Baş ve kuyruktaki DNA miktarı onun floresan yoğunluğu ile yansıtılır. Spermin baş kısmındaki rölatif floresan ile kuyruğundaki floresanın karşılaştırılmasıyla DNA hasar seviyesi belirlenir (Simon ve Carrell, 2013).

### **2.9.3. Sperm Kromatin Yapı Analizi**

Sperm DNA'sının ısı ya da asite maruz bırakıldığında denaturasyona karşı hassaslığını ölçen bir metottur. Flow sitometri temelli bir analiz olup çok sayıda hücreyi (10000) hızlı ve doğru bir şekilde değerlendirebilir. SCSA için standardize edilmiş bir protokol bulunur ve bu sayede laboratuvarlar arasındaki farklılıklar minimize edilir. SCSA için patolojik eşik değeri %30'dur (Agarwal ve ark., 2016).

### **2.9.4. Sperm Kromatin Dağılım Testi-Halo Testi**

Sperm kromatin dağılım testi sperm DNA fragmentasyonunu tespit etmek için uygulanan basit, kesin, ucuz ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Halo testi olarak da bilinen SCD testi fragmente olamamış DNA'da asit denatürasyonu ve nükleer proteinlerin uzaklaştırılmasının ardından dağılmış DNA ilmeklerinin karakteristik halo yapısını üretmesi prensibine dayanır. Eğer sperm DNA'sı fragmente olmuşsa halo yapısının oluşmasında başarısızlık gözlenir. Meydana gelen halo'lar mikroskop altında analiz edilir (Fernández ve ark., 2003).

## **2.10. Erkek Germ Hücrelerindeki DNA Onarım Mekanizmaları**

Hücreler DNA hasarı ile karşılaştıklarında 3 seçenekleri vardır. Bunlardan birincisi apoptotik yolağı aktive ederek hücre ölümüne sebep olmak, ikincisi lezyonu tolere ederek gelecek nesillere hasarlı olarak aktarılmasına neden olmak, üçüncü ve en iyi seçenek ise hasarı onarmaktır (González-Marín ve ark., 2012). Germ hücreleri, oosit ve sperm, yeni bireyin temelini oluşturur ve bunların genomik bütünlüğü genetik

bilginin gelecek nesillere doğru aktarılması için önemlidir. Erkek germ hattı hücrelerinde genomik bütünlüğü ve stabiliteyi korumak için çeşitli DNA onarım mekanizmaları bulunur (Baarends ve ark., 2001). DNA onarım mekanizmaları, DNA omurgası ve bazlarda meydana gelen hasarlarında dahil olduğu çeşitli hasarları saptayan ve sonrasında bu hasarları kısmen ya da tamamen onaran mekanizmalardır (Menezo ve ark., 2010). Erkek germ hücre gelişimi sırasındaki DNA onarım genlerinin transkriptomunun çalışılması amacıyla, 181 DNA onarım genini ve/veya 45 zorunlu yaşam geni içeren bir mikroarray çipi geliştirilmiştir. Bu çip kullanılarak üç insan testis örneğinin mRNA ekspresyon seviyeleri fibroblast RNA havuzu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Atmış dört DNA onarım geninin ve hücre siklusu ilişkili genlerin ekspresyonunun testiküler hücrelerde fibroblastlara göre daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Ekspresyonun testiküler hücrelerde daha yüksek olmasının nedeninin mayoz spesifik fonksiyonlardan kaynaklandığı bildirilmektedir. *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *MLH1*, *MSH2*, *BRCA2*, *ERCC3*, *ERCC4*, *LIG3* ve *MBD4* genleri insan testiküler hücrelerinde fibroblastlara göre en az  $\geq 1,5$  kat daha fazla ekspresyon özelliği gösteren DNA onarımı ve hücre siklusu ilişkili genler arasında yer almaktadır (Galetzka ve ark., 2007). Erkek germ hattı hücrelerinde görev yapan onarım mekanizmaları yanlış eşleşme onarımı (MMR), BER, NER, replikasyon sonrası onarım ve çift zincir kırık onarımıdır. Germ hattı hücrelerinde bu onarım mekanizmaları bazı açılardan spesifik özellik ve aktiviteler gösterebilir (González-Marín ve ark., 2012). MMR mayoz sırasında meydana gelen crossing-over da görev alan *MLH1* ve *MSH2* genlerinin metilasyon durumu ile oligospermi ve ROS arasındaki olası ilişki Gunes ve ark. (2018), tarafından araştırılmıştır. Yüksek ROS seviyesi spermde DNA hasarına ve MMR genlerinin sessizleştirilmesine sebep olabilir. İnfertil erkeklerin yaklaşık olarak yarısında ROS seviyesi yüksektir. Oligospermik erkeklerde *MLH1* promotor metilasyon yüzdesinin normospermik erkeklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir. *MLH1* metilasyonu ile ROS seviyesi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Ancak, *MSH2* promotor metilasyonu ile oligospermi ve ROS arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadığı bildirilmiştir. *MLH1*'in metilasyon paterninin oligospermi de rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Gunes ve ark., 2018a). Singh ve ark. (2019b), azospermik erkeklerde farklı DNA onarım mekanizmalarında rol alan bazı genlerin ekspresyonlarının değiştiğini bildirmiştir. Seksen dört DNA onarım



geninin ekspresyon profillemesini yapan araştırmacılar, ekspresyon farklılığı gösteren ve fonksiyonel olarak önemli olan 10 geni (*MSH2*, *BRIP1*, *CCNH*, *LIG4*, *MGMT*, *NTHL1*, *PMS1*, *DMC1*, *POL $\beta$* , ve *XPA*) transkripsiyon seviyesinde doğrulamış ve bunların arasından seştikleri 4 geni (*MSH2*, *LIG4*, *PMS1*, *DMC1*) protein seviyesinde doğrulamak amacıyla immunohistokimya ile analiz etmişlerdir. Testisteki DNA onarım genlerinin ekspresyon kaybının apoptoz seviyesinde artış, azospermi ve infertilite ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Singh ve ark., 2019b).

Erkeklerde germ hücre mitozu ve mayozu sırasında DNA onarımı oldukça etkindir (Marchetti ve ark., 2015). Ancak spermatogenezin daha sonraki aşamalarında sperm DNA'sının protaminlerle sıkı bir şekilde paketlenmesi ve spermin olgunlaşmasıyla birlikte transkripsiyonun sonlanması gibi nedenlerden dolayı, olgun spermde DNA onarım mekanizmasının olmadığı düşünülüyordu (García-Rodríguez ve ark., 2019). Ancak Smith ve ark. (2013), sperm hücrelerinin BER onarım yolağının ilk aşamalarında yer alan ve hasarın tanınması ve uzaklaştırılmasında görevli olan 8-okzoguanin glikozilaz 1 (OGG1) enzimini işerdiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla olgun sperm hücresinin sınırlı bir onarım kapasitesine sahip olduğu düşünölmektedir. Bu yüzden spermatogenez sırasında etkili olan DNA onarım mekanizmaları paternal genomun bütönlüğünün korunması ve genetik bilginin gelecek nesillere doğru bir şekilde aktarılması için çok önemlidir (Smith ve ark., 2013).

Spermiyogenez sırasında çeşitli DNA onarım sistemleri görev yapar. Rat ve insanların da dahil olduğu farklı organizmalara ait spermatozit ve yuvarlak spermatozitlerde BER gibi DNA onarım mekanizmalarının oldukça etkin olduğu bildirilmektedir (Olsen ve ark., 2001, Singh ve ark., 2019c).

### **Kesip Çıkarma Onarımı**

Kesip çıkarma onarım yolağları temel olarak DNA zincirindeki hasar görmüş segmentleri tanır, onları uzaklaştırır ve hasar görmemiş DNA zincirini kalıp olarak kullanarak DNA sentezini gerçekteştirir. Kesip çıkarma onarımı baz ve nükleotit kesip çıkarma onarımı olmak üzere iki çeşitlidir (Memisoglu ve Samson, 2000). NER mekanizması DNA sarmalında bükölme ve kıvrılmalara neden olan timin dimerleri gibi bozuklukların giderilmesinde görevli iken; BER DNA sarmalında bükölme ve kıvrılmalara neden olmayan baz lezyonlarının ortadan kaldırılmasında görevlidir (Gunes ve ark., 2015).

### 2.10.1. Baz Kesip Çıkarma Onarımı

BER yolağı, DNA sarmalında bozulmalara neden olmayan oksitlenmiş ya da alkillenmiş bazlar gibi lezyonlarının ortadan kaldırılmasında görevlidir (Krokan ve Bjoras, 2013). En iyi bilinen ve en iyi tanımlanan baz lezyonu çoğunlukla OS'den kaynaklanan 8-oxo-2'deoksiguanozindir (8-oxo-dG). 8-oxo-dG lezyonu onarılmazsa DNA replikasyonu sırasında A ya da C ile eşleşir ve G:C → T:A transversiyon mutasyonuna neden olur. Ayrıca mutant RNA transkriptlerine de sebep olabilir (Gunes ve ark., 2015).

BER insan ve ratların germ hücrelerinde oldukça etkili bir onarım yolağıdır. İnsan ve ratların pre- ve post-mayotik germ hücrelerinde BER proteinlerinin varlığı ve bu proteinlerin fonksiyonel olduğu saptanmıştır. BER spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde, hepatositlere göre daha etkin bir onarım yolağıdır (Bellacosa ve Drohat, 2015). Olgun spermatozoada BER onarım mekanizması sınırlıdır (Smith ve ark., 2013). BER onarım yolağı, kendiliğinden oluşan ya da çevresel ajanların indüklemesiyle meydana gelen DNA lezyonlarını uzaklaştırdığından dolayı gelecek nesillere aktarılma ihtimali olan mutasyonların sayısını azaltır (Olsen ve ark., 2001). BER yolağının genomik kararlılık ve CpG yerlerinin metilasyon durumunun sürdürülmesi için de önemli olduğu bildirilmektedir (Bellacosa and Drohat, 2015).

BER yolağı izole bir yolak değil diğer onarım yolakları ile etkileşim içerisinde olan bir yolaktır (Limpose ve ark., 2017). Bir onarım yolağının sadece spesifik bir hasarı onarmadığı aynı zamanda diğer onarım yolakları ile etkileşime girerek farklı hasar tiplerini de onarabildiği bildirilmektedir. Örneğin BER yolağında görevli enzimlerden biri olan mediator kompleks subunit 1 (MED1, MBD4 olarak da bilinir) MMR sisteminin bütünlüğünün korunmasıyla da ilişkilendirilmektedir (Cortellino ve ark., 2003). BER yolağı fonksiyonlarını koordine ve modüle etmek için diğer DNA onarım yolaklarının bileşenleri ile etkileşime girer. Çok sayıda BER proteini BER'in aktivitesini etkileyebilen çeşitli PTM'lerle modifiye edilir. PTM'ler yolakların birbirleri ile etkileşimini etkileyebilir. NER bileşenleri BER'i başlatan çeşitli N-glikozilazlar ile etkileşimleri aracılığıyla BER substratlarının etkili bir şekilde onarımını sağlayabilir. DNA yapısındaki G:T yanlış eşleşmelerini tanıyan TDG (timin DNA glikozilaz) enzimi NER yolağında rol alan kseroderma pigmentosum grup C (XPC) proteini ile etkileşim içerisinde. XPC proteini TGD glikozilazların AP yerlerden ayrılmasını uyarır. XPC

ve Cockayne syndrome (CS) Group B (CSB) proteinleri OS'nin indüklediği DNA hasarının BER yolağı ile onarılmasını etkileyebilir. CSB proteinleri BER glikozilazlardan biri olan nei benzeri DNA glikozilaz 1'in (NEIL1) etkili bir onarım yapabilmesi için de gereklidir. Timin glisol gibi okside baz hasarlarını tanıyan nth benzeri DNA glikozilaz 1 (NTHL1) enzimleri ise NER yolağındaki proteinlerden biri olan kseroderma pigmentosum grup G (XPG) proteini ile etkileşim içerisinde (Limpose ve ark., 2017).

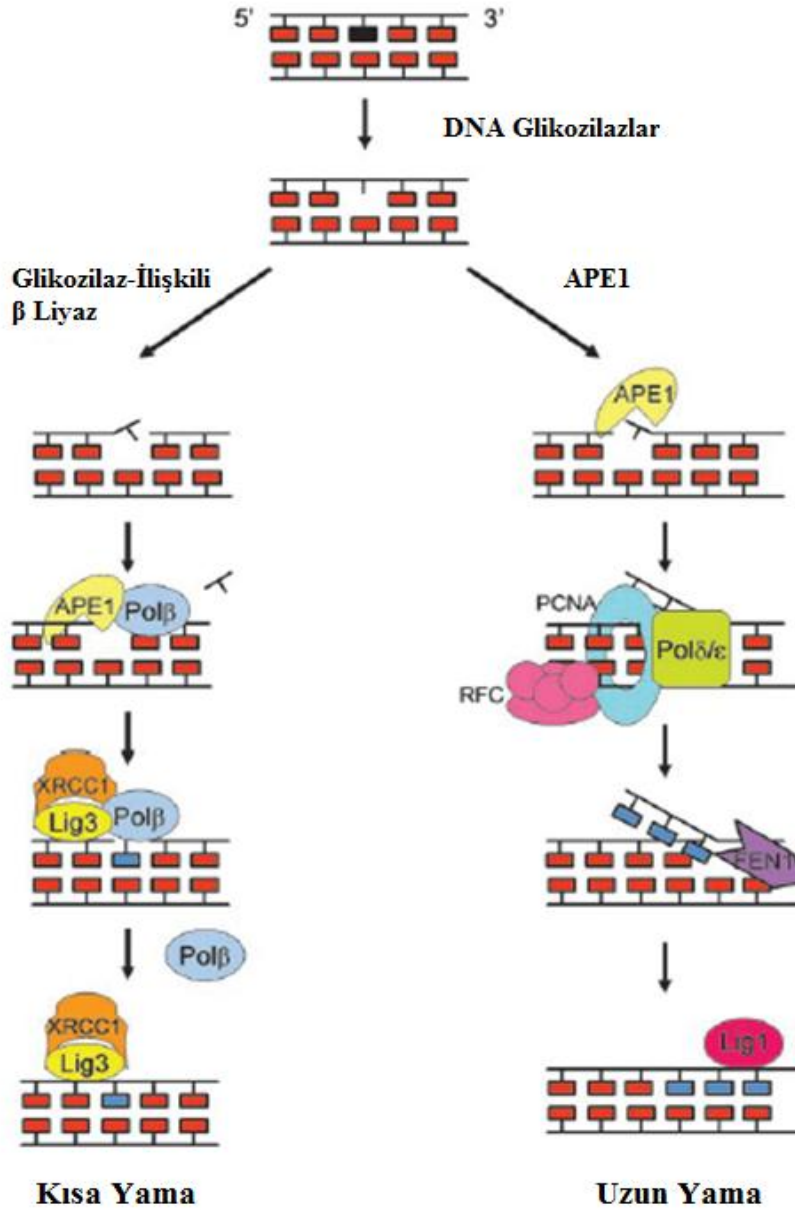
BER çok sayıda enzim ve kofaktörün görev yaptığı bir onarım yolağıdır. Bu yolak ile baz lezyonlarının onarılması 5 farklı enzim çeşidinin aktivitesini gerektirir. Bu enzim çeşitleri glikozilaz, endonükleaz, liyaz, polimeraz ve ligazdır (Beard ve ark., 2019). BER mekanizmasında görev alan faktörler uzayan ve uzamış spermatidlerde belirlenmiştir (Leduc ve ark., 2008).

### **Baz Kesip Çıkarma Onarım Mekanizması**

BER yolağı DNA glikozilazlar tarafından hasarın tanınması ve hasarlı bölgenin kesilip çıkarılması ile başlar (Sancar ve ark., 2004). İnsanlarda her biri çok az sayıdaki lezyonun uzaklaştırılması için spesifiteye sahip olan 11 farklı glikozilaz tanımlanmıştır (Kennedy ve ark., 2018). Monofonksiyonel glikozilazlar sadece baz ekzisionunu katalizleme yeteneğine sahip iken; bifonksiyonel glikozilazlar apirimidik-apurimidik (AP) yerde omurgayı 3' uçtan kesebilen liyaz aktivitesini de sahiptir ve fosfodiester omurgada tek zincir kırığı ile sonuçlanan kesim yapar (Brooks ve ark., 2013).

DNA glikozilazlar değişikliğe uğramış DNA bazını tanır ve hasarlı bazı deoksiriboza bağlayan N-glikozidik bağı keser. Bu bağı kesmesi AP yer oluşumuna neden olur (AP yer, DNA şeker fosfat omurgasında bazın olmaması) (Sancar ve ark., 2004). DNA'da çeşitli glikozilaz enzimlerinin glikozidik bağı kesmesi ile oluşan AP yerler spontan olarak da meydana gelebilir (Nazarkina ve ark., 2007). Tek zincirde oluşan çentik ya DNA ligaz III tarafından kısa yamalı (short-patch) yolak aracılığıyla ya da DNA ligaz I tarafından uzun yamalı yolak (long-patch) aracılığıyla işlenir. Bazın uzaklaştırılmasındaki başlangıç olayına ve doku tipine bağlı olarak onarım yolağı kısa ya da uzun yamalı alt onarım yolaklarından biri ile devam eder. Kısa yamalı onarım yolağında hasarlı baz glikozilaz/AP liyazla uzaklaştırıldıktan sonra AP endonükleaz 1 (APE1) hasar yerindeki 5' bağı keser ve 1 nükleotitlik arayı doldurmak için Polβ'nın hasar yerine gelmesini sağlar. Polβ'nın DNA sentezini gerçekleştirmesinin ardından

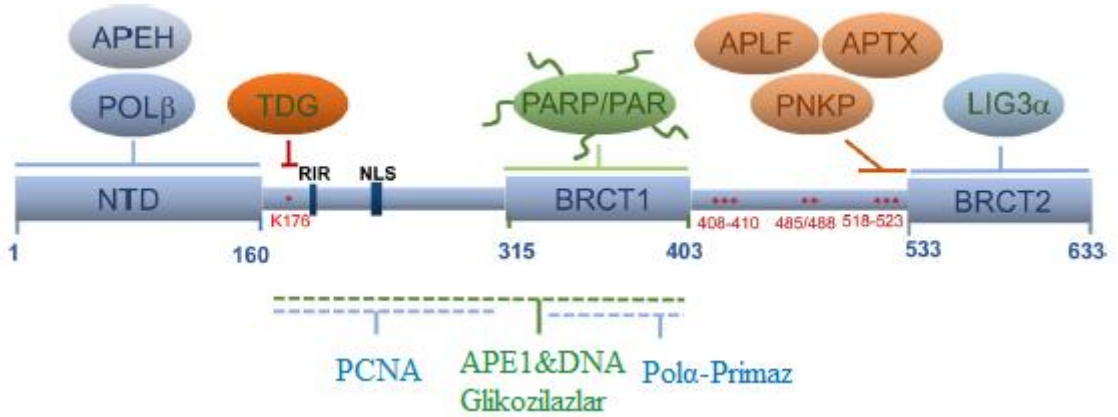
Lig3/XRCC1 kompleksi boşluğu doldurur. AP yer hidrolitik glikozilazlar ya da spontan hidroliz ile oluşturulduğunda ise onarım genellikle uzun yamalı yolak aracılığıyla devam eder. Bu yolakta da APE1 5' fosfodiester bağı keser fakat bu defa RFC/PCNA-Pol $\delta/\epsilon$  kompleksi DNA sentezini gerçekleştirir. Flap yapısı flap endonükleaz 1 (FEN1) tarafından uzaklaştırıldıktan sonra meydana gelen çentiği ligaz I kapatır ve böylece hasar ortadan kaldırılmış olur (Şekil 4) (Sancar ve ark., 2004).



Şekil 4. Baz kesip çıkarma onarım mekanizması (Sancar ve ark., 2004)

## XRCC1

Kromozomal lokasyonu 19q13.2 olan *XRCC1* geni 633 aminoasitten oluşan kendisiyle aynı isimli XRCC proteinini kodlar. Moleküler iskele proteini olarak sınıflandırılan XRCC1 proteini BER, NER, tek zincir kırık onarımı (single strand break repair, SSBR) ve NHEJ onarımında görevlidir (Caldecott, 2019, Moser ve ark., 2007, Nazarkina ve ark., 2007, Saribasak ve ark., 2011). XRCC1 proteini bir takım protein ve/veya moleküllerle etkileşime girdiği çeşitli bölgelerden oluşur. Bu bölgeler Pol $\beta$  ile etkileşimde olan ve 160 aminoasitten oluşan N-terminal domaini (NTD); poly(ADP-riboz), PARP1, PARP2 ve DNA ile etkileşimde olan ve 90 aminoasitten oluşan merkez BRCA1 C-terminal (BRCT) bölgeleri ve DNA ligaz III'e bağlanan 100 aminoasitlik C-terminal BRCT bölgeleridir. Bu üç bölge 2 bağlayıcı bölgeyle (linker 1 ve linker 2) birbirinden ayrılır (Şekil 5) (Caldecott, 2019). XRCC1 farklı etkileşim bölgeleri aracılığıyla yolakta görevli olan diğer proteinleri bir arada tutarak DNA substratlarının bir enzimden sonraki enzime geçişini optimize eder (Nazarkina ve ark., 2007).



**Şekil 5.** XRCC1 protein bölgelerinin pozisyonları ve bunların moleküler etkileşimleri Şekilde XRCC1 ile doğrudan etkileşimde olan protein ve moleküller gösterilmektedir. NTD amino terminal bölgesi: doğrudan POLB ve APEH'ye bağlanır. Bağlayıcı (linker) bölge: SUMOlasyon yerini içerir ve burası TDG'ye bağlanır, RIR-benzeri motif polinükleotit kinaz-30-fosfataz (PNKP) için düşük afinite etkileşim yerini ve nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLS) bir kısmını içerir. Poli (ADP-riboz) (PARP1/2) ve DNA ile etkileşimdeki merkez BRCT bölgesi (BRCT1), CK2 fosforilasyon yerlerinin 3 kümesini içeren linker bölge, bu bölgelerden biri PNKP, aprataksin (APTX) ve APLF ile etkileşimdedir, C-terminal BRCT bölgesi (BRCT2) LIG3 alfa ile etkileşimdedir (Caldecott, 2019)

XRCC1 enziminin BER ara elemanlarına bağlanması hasarlı bazların, AP yerlerin ya da SSB'lerin doğru onarılması için gereklidir. XRCC1 proteini AP yer içeren substratlar gibi DNA substratları için yüksek afiniteye sahiptir. XRCC1'in DNA hasar onarımındaki rolü çoğunlukla yolakta yer alan diğer proteinlerle etkileşimlerine dayanır. Hem SSB onarımı hem de BER sırasında XRCC1 proteini yolakta görevli tüm proteinlerle etkileşim içerisindedir ve onların aktivitesini düzenler. XRCC1 çeşitli DNA glikozilazların ve APE1'in 3'RPaz aktivitesini uyarır. Fonksiyonel XRCC1 SSB onarımında rol alan polinükleotit kinaz, poly(ADP-riboz), polimeraz I ve II ve pol $\beta$  gibi enzimlerle etkileşimi ve özellikle de DNA ligaz III'ün kararlılığı aracılığıyla BER'in post-insizyonu için oldukça önemlidir (Nazarkina ve ark., 2007). XRCC1 aktivitesinin ise transkripsiyon faktörü E2F1 tarafından düzenlendiği ve E2F1'in DNA onarımını yönlendirdiği rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2008).

XRCC1 proteini BER kompleksinin nükleer matrikste belirli bir lokasyonda toplanmasını sağlar. Kubota ve ark. (2016), hasarlı kromatin içeren BER kompleksinin onarım için nükleer matrikste spesifik bir lokasyonda toplandığını ve bu toplanmanın XRCC1-SNF2H etkileşimi aracılığıyla yapıldığını bildirmiştir. SNF2H/SMARCA5 kromatin yeniden şekillenme faktörüdür (Kubota ve ark., 2016).

DNA yapısında oksidatif olarak indüklenmiş hasarların da dahil olduğu baz hasarlarını ve zincir kırıklarını indükleyen lazer (355 nm, 0,165  $\mu$ J) maruziyeti sonrasında XRCC1 proteininin pol $\beta$ 'nin hasar yerine gelmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Beard ve ark., 2019). XRCC1 baz kesip çıkarma onarımında LIG3'ü stabilize ederek ligasyonu artırıcı etki yapar. XRCC1'den yoksun olan memeli hücreleri, BER tarafından onarılan baz lezyonlarına neden olan DNA alkilleyici ajanlara karşı çok hassastır (Krokan ve Bjoras, 2013, Shannon ve Stubbs, 1998). XRCC1 geninin susturulmasının embriyonik letalite ile sonuçlandığı dolayısıyla XRCC1'in embriyonik gelişim için gerekli olduğu bilinmektedir (Tebbs ve ark., 2003). Walter ve ark. (1994), normal genç erişkin farelerin testislerinde, pakiten spermatozoid ve yuvarlak spermatozoidlerde *Xrcc-1* ekspresyonunun fare somatik dokularındaki ekspresyona göre anlamlı ölçüde yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Walter ve ark., 1994). Uzayan spermatozoidlerde erken aşamalarda eksprese edilen *XRCC1*, bu hücrelerde kromatinin yeniden şekillenmesinde görev alır ve bu süreçte DNA onarım kapasitesine sahiptir (Zheng ve ark., 2012). XRCC1 insan testisinde Sertoli hücreleri, spermatogonyum,

spermatozoid ve yuvarlak spermatidlerde yüksek düzeyde ekspresyon edilirken uzamış spermatidler ve olgun sperm hücrelerinde ekspresyon edilmez. Genç bireyler, varikoseli bulunan infertil hastalar ve yaşlı bireylerle karşılaştırıldığında XRCC1, PARP-1, aktif kaspaz 3 ve çatal ağızlı PARP-1'in spermatozoidteki ekspresyonunun daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Bu durum infertil hastalar ve yaşlı bireylerde DNA onarımı ve apoptozun spermatogenezin erken aşamalarında daha yüksek olduğunu bildirmektedir (El-Domyati ve ark., 2010).

XRCC1'in testisteki ekspresyonunun diğer dokulardan daha yüksek olması ve pre- ve post-mayotik hücrelerde BER yolağının oldukça etkin bir yolak olması XRCC1'in spermiyogenez sırasında önemli bir faktör olduğunu gösterir (Garcia-Rodriguez ve ark., 2018). Yetişkin insan testisinde özellikle spermatozoid ve yuvarlak spermatidlerde XRCC1 ekspresyonu yüksektir. Normal yetişkin testisi ve infertil testisi arasında *XRCC1* geninin farklı ekspresyon özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Şiddetli oligospermik ve oligoastenospermik bireylerin normospermik ve fertil kontrollere kıyasla daha düşük XRCC1 transkript ve protein seviyesine sahip olduğu ancak daha yüksek  $\gamma$ H2AX seviyesine sahip oldukları belirlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Azospermik erkeklerin spermatozoid ve yuvarlak spermatidlerinde XRCC1 mRNA ve protein seviyesinin azaldığı bulunmuştur. XRCC1 ekspresyonundaki bu azalmanın DNA hasarı, apoptoz ve germ hücre kaybındaki artışla ilişkili olabileceği bildirilmektedir. XRCC1 ekspresyon seviyesinin infertilite fenotipinin ciddiyeti ile ilişkili olduğu önerilmektedir (Singh ve ark., 2019c). İnsanlarda olgun sperm hücreleri oksidatif strese kaynaklanan DNA hasarına karşı sınırlı bir onarım kapasitesine sahiptir. Bu hücrelerde 8-OHdG eklentisini tanıyan OGG1 glikozilaz enzimi aracılı tamamlanmayan yarım kalmış bir BER onarım mekanizması vardır. Olgun sperm hücreleri BER onarım yolağının aşağı yöndeki elemanları olan XRCC1 ve APE1 enzimlerine sahip değildir. Dolayısıyla spermatozoal DNA'da oksidatif strese kaynaklanan 8-OHdG baz eklentisi gibi baz lezyonları bifonksiyonel OGG1 enzimi ile uzaklaştırılır ve onarım bu aşamada sonlanır (Smith ve ark., 2013). Bu yüzden spermatogenez sürecinde germ hücrelerinde etkili bir baz kesip çıkarma onarımının olması gerekir. BER yolağının uygun ve doğru fonksiyon göstermesi; (i) olgun spermatozoada 8-OHdG seviyesinin mümkün olan en düşük seviyede olmasını sağlayacak, (ii) tek zincir kırığı gibi BER ara elemanlarının birikerek gelecek nesillere mutasyon olarak aktarılma olasılığını azaltacak ve (iii) bu tek zincir

kırıklarının hücre için daha tehlikeli bir hasar tipi olan çift zincir kırıklarına dönüşmesine engel olabilecektir (Garcia-Rodriguez ve ark., 2018, García-Rodríguez ve ark., 2019). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada insan spermatozoasında düşük seviyede XRCC1 transkript ve proteininin bulunduğu bildirilmiştir. Bu durumun nedeninin spermatogenez sırasındaki bol miktarda bulunan XRCC1 transkript ve proteinlerinden geriye kalanların olduğu tahmin edilmektedir. Farklı infertilite fenotipine sahip bireylerin testislerindeki XRCC1 mRNA seviyesi ile olgun sperm hücrelerindeki mRNA seviyesinin birbiriyle örtüşmesi de bu fikri destekler niteliktedir (Singh ve ark., 2019c).

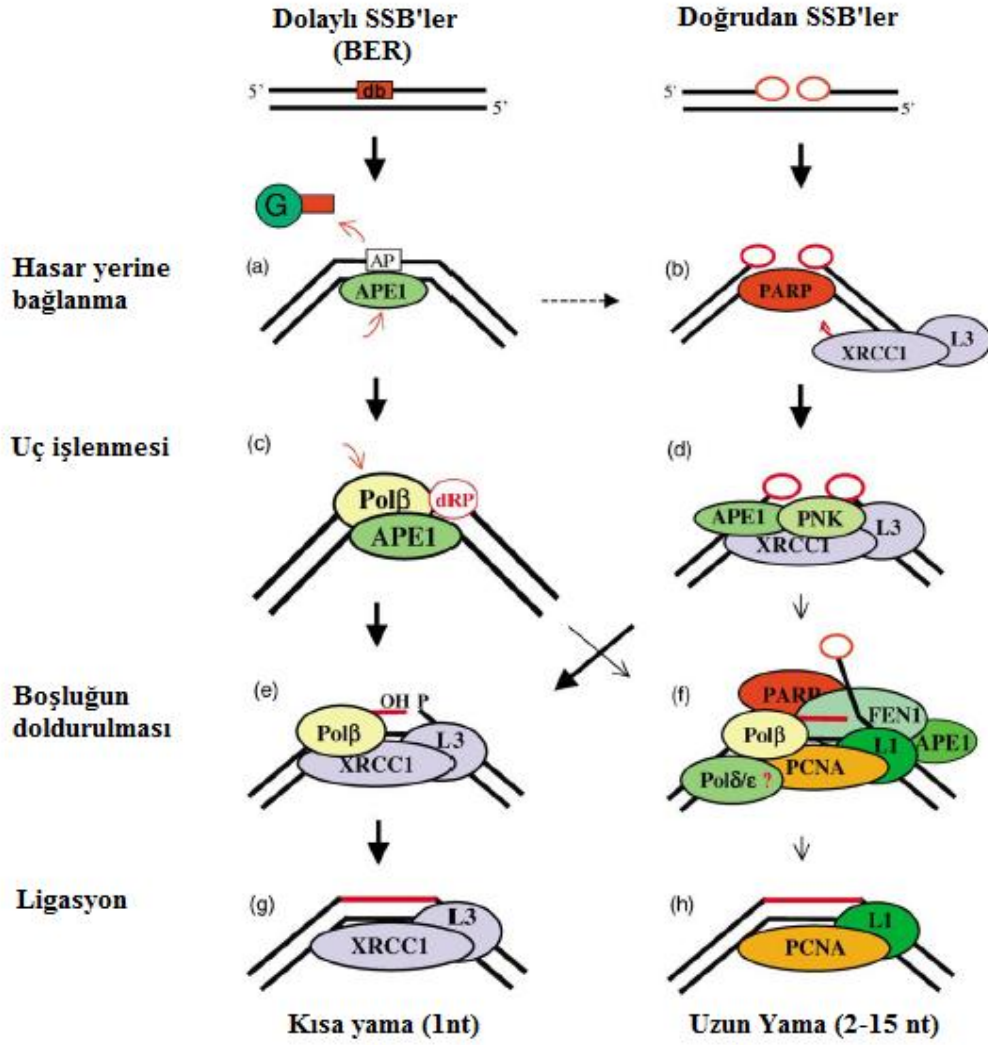
*XRCC1* genindeki tek nükleotit polimorfizmleri DNA onarım kapasitesindeki değişiklikler ve erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmektedir. Bu değişiklikler kompleks hastalıklara hassasiyeti ve bireylerin tedaviye verdikleri cevabı etkileyebilir. Zheng ve ark. (2012), Kuzey Çin Han popülasyonunda PZR-RFLP yöntemini kullanarak *XRCC1* geni rs25487 (Arg399Gln) polimorfizmi ile idiyopatik azospermi arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmıştır. *XRCC1*'in rs25487 polimorfizminin idiyopatik azospermiye genetik yatkınlık için bir marker ve A allelinin bu popülasyonda idiyopatik azospermi için risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir (Zheng ve ark., 2012). *XRCC1* polimorfizmi, erkek infertilitesi ya da SDF üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan çok küçük bir etkiye sahiptir. Ancak, polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) maruziyeti ve *XRCC1* polimorfizminin erkek infertilite riski üzerine anlamlı bir etkisi olduğu belirtilmektedir (Ji ve ark., 2010). İdiyopatik erkek infertilitesi ile DNA onarım genleri *XRCC1* ve *LIG4* gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada ise *LIG4* Thr9Ile polimorfizmi ile erkek infertilitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkili bulunurken, *XRCC1* Arg399Gln polimorfizmi ile infertilite arasında böyle bir ilişki bulunamamıştır. Fakat, aynı çalışmada GG/CT ve GA/CT genotip kombinasyonunun infertilite riskini sırasıyla 3,5 ve 4 kat artırdığı bildirilmiştir (Ghasemi ve ark., 2017). Üç yüz doksan dokuzuncu kodon tarafından kodlanan arjinin aminoasitinin glutamine dönüşmesine neden olan Arg399Gln polimorfizmi PARP bağlayıcı bölgede meydana gelir. *XRCC1* Arg399Gln ve *OGG1* Ser326Cys polimorfizmleri ile erkek infertilitesi ve seminal parametreler arasındaki ilişkiyi değerlendiren Garcia-Rodriguez ve ark. (2018), DNA onarım genlerindeki polimorfizmlerin düşük enzim aktivitesi, anormal semen parametreleri ve erkek



infertilitesi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, XRCC1 enziminin olgun spermatozoada aktivite göstermemesinden dolayı *XRCC1* geninde meydana gelen genetik değişikliklerin (polimorfizmler) OGG1 enzimini kodlayan gende meydana gelen değişikliklerden daha önemli olduğunu vurgulamışlardır (Garcia-Rodriguez ve ark., 2018).

### **XRCC1 ve Tek Zincir Kırık Onarımı**

İnsan hücrelerinde XRCC1 proteini baz kesip çıkarma onarımının yanı sıra SSB onarımının etkili bir şekilde gerçekleşmesi ve genomik kararlılığın korunması için de gereklidir. SSB ve BER onarım yolları, SSB lezyonunun doğasına ve orijinine bağlı olarak birbiriyle örtüşen oldukça koordine enzimatik basamaklar gerektirir. SSB'ler DNA'nın maruz kaldığı bir hasar sonrasında doğrudan ortaya çıkabileceği gibi BER yolağı sırasında oluşan ara elemanlar ya da deoksiriboz şekerin hasara uğraması yoluyla dolaylı olarak da ortaya çıkabilir. En yaygın DNA lezyonlarından olan tek zincir kırıkları etkili bir şekilde onarılmadıklarında mutasyonların birikmesine ve/veya çift zincir kırıklarına neden olarak hücrelerin hayatta kalması ve genetik stabilitesi için çok önemli bir tehdit olabilir. *XRCC1* ekspresyonundan yoksun hücre hatları DNA hasar ajanlarına karşı çok hassastır. XRCC1 proteininin SSB onarımında rol alan çeşitli enzimlerle fiziksel etkileşime girdiği ve onarımı kolaylaştırdığı bilinmektedir. SSB hasarını indükleyen faktör(ler)e (alkilleyici ajanlar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi) bağlı olarak XRCC1-bağımlı SSB onarımı hücre siklusunun tüm fazlarında meydana gelebileceği gibi sadece S/G2 fazında da meydana gelebilir (Brem ve Hall, 2005, Caldecott, 2003, Chen ve ark., 2008). XRCC1 proteini Pol $\beta$ , LigIII- $\alpha$ , PNKP ve APTX proteinlerinin hasar yerinde toplanması için iskele protein görevi yaparak DNA tek zincir kırıklarının onarılmasını hızlandırır (Şekil 6). XRCC1 enziminin merkez BRCT domaininin poly(ADP riboz) ve DNA için eş zamanlı olarak bağlanabilecekleri, birbiriyle örtüşmeyen farklı bağlanma yerlerini içermektedir. DNA bağlanma yerlerindeki mutasyonlar *in vitro* da XRCC1'in DNA hasar yerine gelmesini ve burada kalmasını etkilerken *in vivo* da SSB onarımının bozulmasına sebep olur (Polo ve ark., 2019).



**Şekil 6.** S/G2'ye özgü XRCC1-bağımlı SSBR. Kalıp zincirdeki (siyah) onarılmamış SSB DNA replikasyon mekanizması ile (sarı oval) karşılaşır ve çatalın önünde onarılır. (A) Alternatif olarak SSB replikasyon çatalını bozar ve DSB kırığı oluşturur. (B ve C) Bu durumda homolog rekombinasyon reaksiyonları Holliday bağlantısı ve replikasyon çatalının restorasyonu ile sonuçlanır. (D) SSB restore edilmiş replikasyon çatalının (alttaki zincir) alt tarafında hala vardır, eğer onarılmazsa replikasyon devam ederken DSB yeniden meydana gelir. Noktalı kutular SSBR'nin yapıldığı varsayılan yerleri belirtir. Kırmızı halkalar olası hasarın varlığını, konvensiyonel olmayan ucu belirtir (Caldecott, 2003)

### XRCC1 ve Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) Onarımı

XRCC1 proteini homolog olmayan uç birleştirme onarım yolağında rol alır ve DNA çift zincir kırıklarının onarımından sorumludur. NHEJ yolağı onarım için homolog bir kalıp gerektirmediği için hücre siklusu boyunca aktiftir. NHEJ yolağı klasik ve alternatif NHEJ (alt-NHEJ) olmak üzere 2 çeşittir. Klasik NHEJ (c-NHEJ)

genel olarak çift zincir kırığının Ku70 ve Ku80 alt ünitelerini içeren Ku heterodimeri (Ku) tarafından tanınması ve hasar yerine bağlanması ile başlar. Bu heterodimer NHEJ mekanizmasında rol alan diğer faktörlerin DNA lezyonuna toplanmasını ve kararlılığını sağlar. Ayrıca DNA uçlarını birbirine bağlayarak uç kararlılığını artırır ve DNA bağımlı protein kinazın (DNA-PKcs) aktivasyonunu sağlar. Kırık uçların ligasyonu XRCC4/Lig4 kompleksi ve XRCC4 benzeri faktör (XLF) ile sağlanır. Ligasyonun ardından NHEJ kompleksi çözülür ve böylece onarım süreci tamamlanır (Davis ve ark., 2014). C-NHEJ mekanizmasında rol alan Ku70, Ku80, XRCC4 ve Lig 4 yolağın esas bileşenleridir. Bu faktörlerden bir ya da birkaçının bulunmaması durumunda DSB'lerin onarımı etkinliği daha az olan alternatif NHEJ ile yapılır (Boboila ve ark., 2012). Alt-NHEJ mekanizmasına özgü bir faktör karakterize edilmemiştir. Bu mekanizma birden çok DNA onarım yolağında görevli olan proteinlerle yürütülüyor gibi görünmektedir. Baz kesip çıkarma onarımında rol alan PARP1, XRCC1, LIG3 ve zincirler arasındaki çapraz bağların onarımından sorumlu BRCA1 ve fankoni anemi grup D2 (FANCD2) proteinleri bu proteinler arasında yer almaktadır (Kang ve Yan, 2018).

Erkek germ hücrelerindeki çift zincir kırık onarımı somatik hücrelerdekine göre daha yavaştır. Farelerin yuvarlak spermatidlerinde Parp1 ve XRCC1 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bu hücrelerde alternatif Parp1/XRCC1 bağımlı NHEJ yolağının aktif olup olmadığı Ahmed ve ark. (2010), tarafından araştırılmıştır. Araştırmacılar bu amaçla DNA-PKcs'den yoksun olan SCID farede DNA onarımını değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda Parp1/XRCC1 yolağının yuvarlak spermatidlerde aktif olduğu fakat spermatogenezin ilerleyen aşamalarında onarım kapasitesinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca yuvarlak spermatidlerin yanı sıra geç spermatositlerde de Parp1 ve XRCC1 ekspresyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumun sebebinin ise BER ile ilişkili olabileceği önerilmiştir (Ahmed ve ark., 2010).

### **2.10.2. Nükleotit Kesip Çıkarma Onarımı**

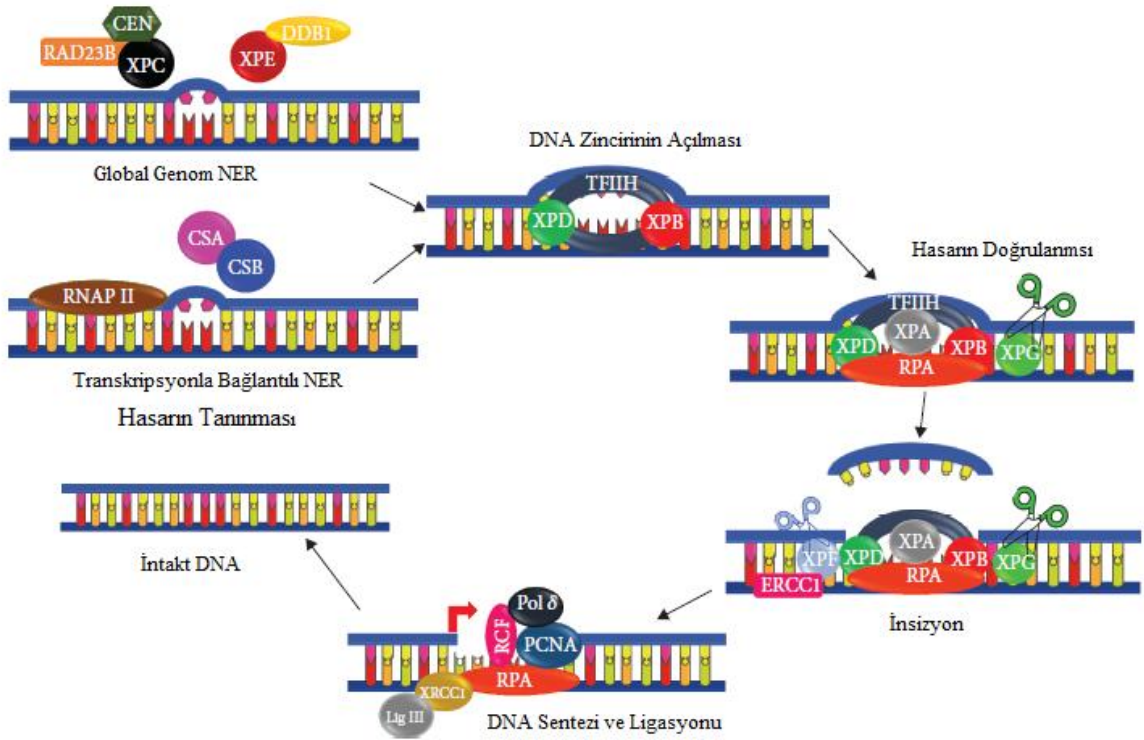
Nükleotit kesip çıkarma onarım süreci insanlarda 40'dan fazla gen tarafından kodlanan çeşitli proteinlerin birbirini izleyen faaliyetleriyle gerçekleşir. Bu genlerden bazılarında meydana gelen mutasyonlar Xeroderma pigmentosum (XP), cockayne sendromu, fankoni anemisi, XFE progeroid sendromu, serebro-okülo-fasiyo-skeletal sendromu ve trikotiyodistrofin gibi hastalıklara neden olur (Ferri ve ark., 2019, Kokic ve ark., 2019). NER yolağı DNA'nın heliks yapısını bozan lezyonların ortadan

kaldırılmasından sorumludur (Kusakabe ve ark., 2019). Siklobütan pirimidin-primidin dimerleri ve benzo(a)piren-guanin gibi DNA baz eklentileri NER tarafından onarılan lezyonlar arasında yer alır. Bu lezyonlar UV, kemoterapik ajanlar (örneğin cisplatin), sigara ve radyasyon ile indüklenebilir (Sancar ve ark., 2004). NER mekanizması genomik DNA'nın yapısına katılan ribonükleotit monofosfatların genomdan uzaklaştırılmasında da rol oynar. Fakat insanlarda NER mekanizması aracılığıyla genomik DNA'dan ribonükleotit monofosfatların uzaklaştırıldığına dair bir kanıt bulunamamıştır (Lindsey-Boltz ve ark., 2015).

DNA'daki kimyasal olarak heterojen AP lezyonlarından bazıları endonükleaz AP1'e dolayısıyla BER mekanizması ile onarıma karşı dayanıklıdır. NER yolağının BER tarafından onarılamayan AP yerlerin giderilmesinde rol oynadığı ve APE1'e duyarlı olanların da onarımını artırdığı bildirilmektedir (Kitsera ve ark., 2019).

Nükleotit kesip çıkarma onarım mekanizması global NER (GG-NER) ve transkripsiyonla bağlantılı NER (TC-NER) olmak üzere 2 alt yoldan oluşur (Matsumoto ve ark., 2015). GG-NER genomun tamamındaki DNA lezyonlarının onarılmasından sorumlu iken TC-NER aktif olarak transkripsiyona uğrayan genlerin kodlayıcı zincirinde meydana gelen lezyonların giderilmesinden sorumludur (Olsen ve ark., 2005). GG-NER yolağındaki bozukluklar kansere yatkınlıkla sonuçlanır. TC-NER'deki bozukluklar ise XP ve cockayne sendromu gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilir (Marteijn ve ark., 2014). TC- ve GG-NER alt yolları hasarın tanınma aşamasında farklılıklar gösterir (Sabarinathan ve ark., 2016). DNA hasarının tanınması onarımın etkinliğini belirleyen oldukça kritik bir basamaktır. TC-NER'de DNA hasarı RNA polimerazın transkripsiyon sırasında bir lezyonla karşılaştığında durması ile saptanır. Duraklayan RNA polimeraz enzimi cockayne sendromu proteinleri A ve B'nin (CSA ve CSB) toplanmasına yardım eder (Kobaisi ve ark., 2019). GG-NER'de ise XPC, RAD23B ve Centrin2 proteinleri DNA sarmalındaki modifiye bazlardan kaynaklanan termodinamik destabilizasyonu ve/veya lokal bükülmeleri tanır (Şekil 7). XPC-RAD23B DNA'da rasgele bir sekansa bağlanır ve DNA boyunca sekme hareketleriyle yayılır. XPC-RAD23B'nin bu şekilde hareket etmesi DNA üzerindeki protein engelleri geçerek DNA lezyonunu hızlı bir şekilde aramasını sağlar. DNA zincirinde AT-zengin (AT-zengin bölgelerde sık sık geçici açılmalar meydana gelebilir) bölgelerle karşılaşıldığında XPC-RAD23B'nin hareketi geçici olarak sınırlanabilir.

XPC'nin siklobütan primidin dimerlerini saptama etkinliği oldukça düşüktür, bu yüzden UV-DDB siklobütan primidin dimerlerinin XPC ile tanınmasını kolaylaştırır (Cheon ve ark., 2019). Hasarın tanınmasının ardından meydana gelen aşamalar her iki alt yolak için de aynıdır (Kobaisi ve ark., 2019).

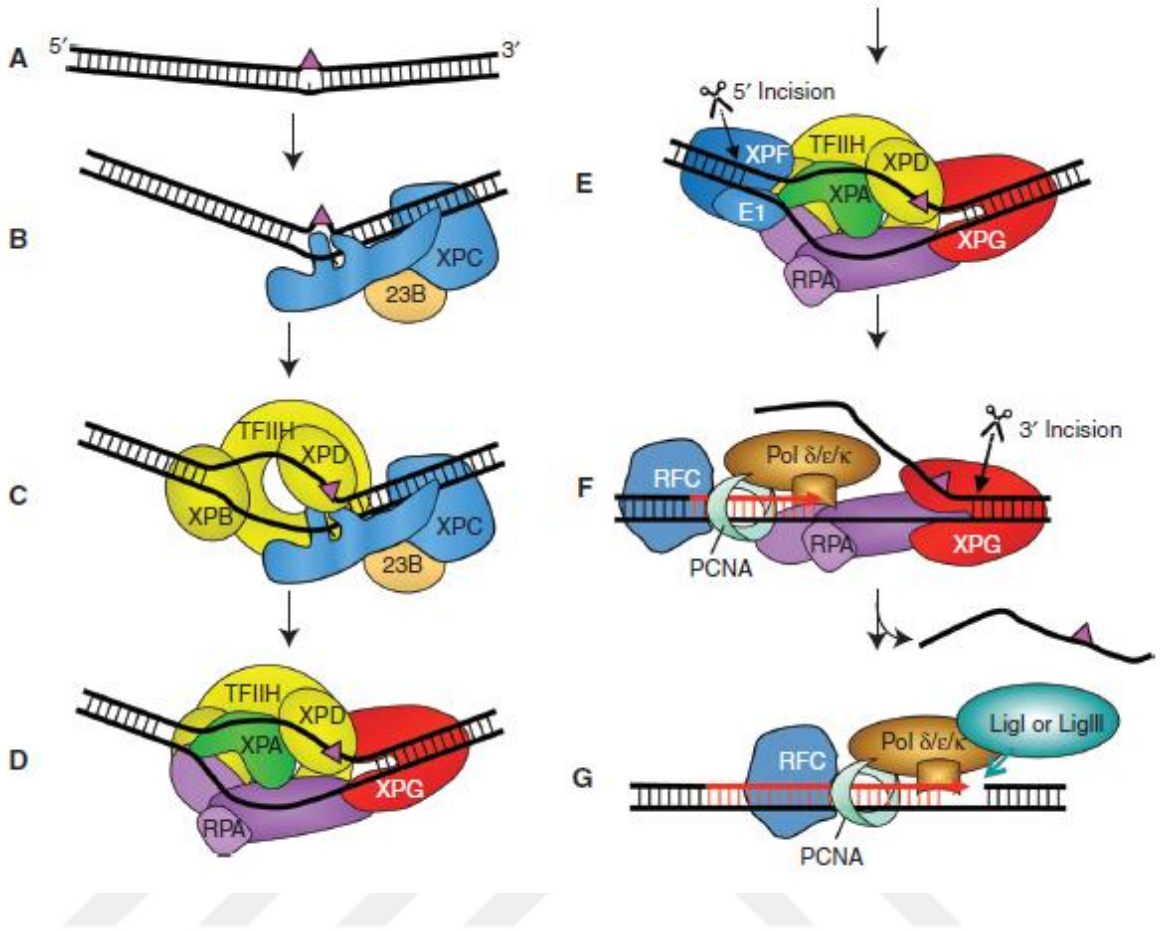


Şekil 7. GG- ve TC NER de hasarın tanınması (Kobaisi ve ark., 2019)

### Nükleotit Kesip Çıkarma Onarım Mekanizması

Nükleotit kesip çıkarma onarım mekanizması tek hücreli bakterilerden çok hücreli kompleks organizmalara kadar tüm canlılarda benzer basamaklardan oluşan bir onarım yolağıdır. NER yolağı genel olarak DNA'nın sarmal yapısını bozan lezyonun tanınması, lezyon içeren bölgenin kesilerek uzaklaştırılması, kesim sonrası oluşan boşluğun tamamlayıcı zincirin kalıp olarak kullanılmasıyla yeniden sentezlenmesi ve yeni sentezlenen DNA dizisi ile bitişiğindeki DNA dizisi arasında oluşan çentigin kapatılmasını içeren basamaklardan oluşur (Spivak, 2015). NER yolağında DNA lezyonunun tanınmasının ardından bu hasarın doğruluğunun saptanması önemlidir. Bu şekilde hasar içermeyen DNA bölgelerinin kesilmesi engellenir (Sugasawa, 2016). Hasarın doğrulanması sürecinde TFIIH ile birlikte XPD helikazı ve XPB proteini rol oynar. XPA ve XPG proteinleri de bu sürece yardımcı olan proteinlerdir. XBP proteini

çift zincirli DNA'ya bağlanırken XPD proteini tek zincirli DNA'nın 3' uzantısına bağlanır. XPA'nın varlığında XPD tarafından DNA çözülmesinin 4 kat, XPG varlığında ise 20 kat arttığı bildirilmiştir. XPA proteini onarım kabarcığının sınırlarını belirler ve bu kabarcığın 5' ucunun tanınmasına katkıda bulunur (Kokic ve ark., 2019). TFIIH ve diğer proteinlerin bağlanma yeri hasar içermiyorsa XPB ve XPD helikazlar ile ATP hidrolizi DNA üzerindeki kompleksi ayırır. Eğer bağlanılan yer lezyon içeriyorsa, ATP hidrolizi DNA lezyonunun etrafında yaklaşık 25 baz çiftlik (base pair, bp) bir açılmaya neden olur ve hasar yerinde kararlı bir kesim öncesi kompleks (PIC1) oluşturur. Bu noktada endonükleaz XPG kesim yapmaz. Lezyonda daha kararlı ikinci bir kesim öncesi kompleks (PIC2) oluşturmak amacıyla komplekste XPG, XPC ile yer değiştirir. XPG lezyonun 3' ucunda kesim yapar. Son olarak üçüncü bir kesim öncesi kompleks (PIC3) oluşturmak için XPA ile etkileşimdeki ERCC1-XPF komplekse katılır ve lezyonun 5' ucunda kesim yapılmasını sağlar. Hasarlı zincir  $6th \pm 3$  fosfodiester bağından kesilir ve kesim sonucu oluşan 24-32 nükleotitlik oligomer salınır. Oluşan boşluk replikasyon yardımcı proteinleri olan proliferating hücre nükleer antijen (PCNA) ve replikasyon faktör C'nin (RFC) yardımıyla Pol $\delta/\epsilon$  ve Pol  $\kappa$  tarafından doldurulur. DNA sentezinin tamamlanmasının ardından DNA ligaz III $\alpha$ /XRCC1 ya da DNA ligaz I ile çentik kapatılır (Şekil 8) (Sancar ve ark., 2004).



Şekil 8. NER onarım mekanizması (Schärer, 2013)

Yabani tip fareler ve NER mekanizması ile ilişkili homozigot/heterozigot gen mutasyonlarına sahip fareler arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla yapılan epidemiyolojik bir çalışma sonucunda homozigot ve/veya heterozigot nakavt farelerde üremenin bozulduğu sonucuna varılmıştır (Tsai ve ark., 2005). Fakat Andreassen ve ark. (2011), çoklu barsak tümürlü Min (Multiple Intestinal Neoplasia, Min) fare modelleri ile yaptıkları bir çalışma sonucunda büyük DNA eklentilerinin onarılmasının normal spermatogenez için gerekli olmadığını belirtmişlerdir. Min fare modelleri (B6Min<sup>+</sup>) yiyeceklerde bulunan mutajenik bileşiklere (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]pridine, PhIP gibi) karşı oldukça hassastır. Bu fareler spontan olarak tümör geliştirebilir ve PhIP'e maruziyet sonrasında tümör büyüklüğü ve sayısında artış gösterirler. NER yolğunun etkinliğindeki azalmanın (genetik eksiklik, Xpa<sup>-/-</sup>) PhIP ile indüklenen genotoksisite için bir risk faktörü olabileceği ve dolayısıyla B6Min<sup>+</sup> farede spermatogenezi bozabileceği düşüncesinden hareket eden araştırmacılar, farklı genotip

kombinasyonuna sahip fare modellerinde spermatogenezi çalışmışlardır. Çalışmaları sonucunda B6 Min<sup>+/+</sup> Xpa<sup>-/-</sup> farelerde B6Min<sup>+/+</sup>Xpa<sup>+/+</sup> olanlara göre daha az yavru elde edildiği bildirilmiştir. Normal spermatogenezin göstergesi olan farklı testiküler hücre tiplerinin dağılımının ve testis ağırlıklarının genotiplere bakılmaksızın PhIP'e maruz kalan ve kalmayan grup arasında farklılık göstermediği bulunmuştur (Andreassen ve ark., 2011). Bazı NER genlerindeki (*XPA*, *XPB*, *ERCC2*, *ERCC3*, *ERCC4* ve *DDB2* gibi) mutasyonlar sonucu oluşan XP hastalığı (Black, 2016) taşıyıcılarının %12'sinde seksüel gelişimin tamamlanmadığı bildirilmektedir. Spesifik patojen içermeyen koşullarda iki yıl süreyle tutulan XPA<sup>(-/-)</sup> farelerde testisin yaşa bağımlı olarak azaldığı ve seminifer tübüllerin bozulduğu rapor edilmiştir. Yirmi dört aylık XPA<sup>(-/-)</sup> farelerde spermatazoa bulunamamıştır. XPA<sup>(-/-)</sup> farelerde belirlenen spontan tümör oluşum insidansının XPA<sup>(+/+)</sup> farelere kıyasla daha yüksek olduğu önerilmiştir (Nakane ve ark., 2008). Farelerde inaktive edilen ilk NER geni olan *ercc1* kendisiyle aynı isimli ERCC2 proteinini kodlar. *ercc1* geninin normal spermatogenez ve oogenez için gerekli olduğu Hsia ve ark. (2003), tarafından yapılan çalışma sonucu ortaya konulmuştur. NER yolağının yanı sıra rekombinasyon onarımında da rol alan ERCC1'in ekspresyonu germ hücrelerinde mayotik kross-overin sonrasında en yüksek seviyededir. *Ercc1* geninin yokluğunda testiste oksidatif DNA hasarı seviyesi ve DNA fragmantasyonunda, erkek germ hücrelerinde ise apoptoz seviyesinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Hsia ve ark., 2003).

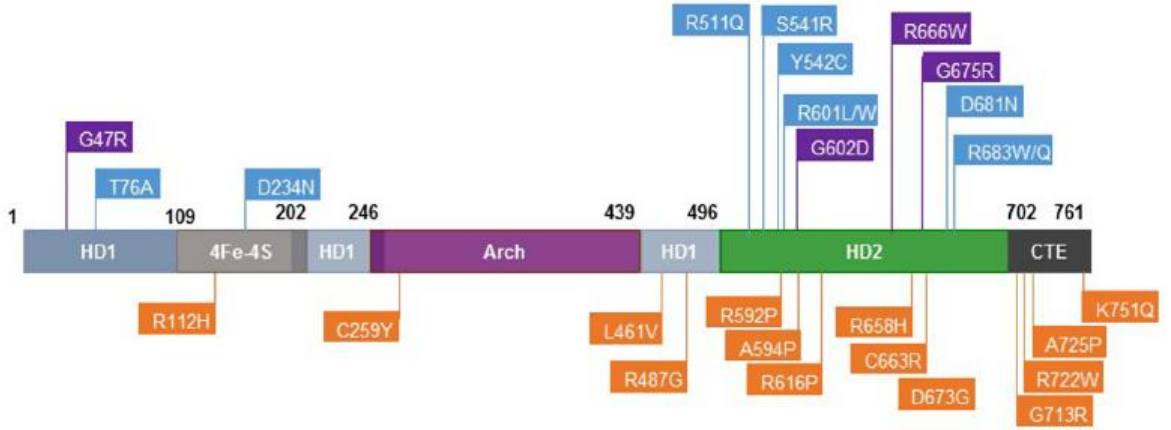
NER yolağında yer alan genlerin polimorfizmleri ile insanlarda erkek infertilitesi arasındaki ilişkinin değerlendirildiği birkaç çalışma bulunmaktadır. Gu ve ark. (2010a), farklı NER genlerine ait 4 polimorfizmin (*XPA*(-4) G/A, *ERCC1* C8092A, *XPD* Lys751Gln ve *XPB* Ser835Ser) sperm DNA hasarı ve erkek infertilitesi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Altı yüz yirmi infertil erkeğin dahil olduğu çalışmada *XPA*(-4) G/A polimorfizmi ve sperm DNA hasarı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. *XPA*(-4) A alleleine sahip bireylerin G alleli taşıyıcılarına göre daha fazla DNA hasarı ve daha düşük sperm konsantrasyonuna sahip olduğu rapor edilmiştir. Altı yüz yirmi infertil erkeğin yanı sıra 385 kontrolü de içeren kohortta, *XPA*(-4) AA genotipinin infertilite riskini 1.52 kat artırdığı belirtilmiştir. *XPA*(-4) A allelinin G allelinden daha düşük transkripsiyonel aktiviteye sahip olduğu dolayısıyla XPA promotorundaki -4G/A polimorfizminin XPA'nın transkripsiyonel aktivitesini



değiştirerek sperm DNA hasarı ve erkek infertilitesine katkı yapabileceği önerilmektedir (Gu ve ark., 2010a). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir çalışmada ise NER genetik polimorfizmleri, PAH maruziyeti ve bunların sperm DNA hasarı üzerine olan etkileri araştırılmıştır. XPA-4 AA genotipini taşıyan bireylerin XPA-4 GG genotip taşıyıcılarına göre daha fazla DNA hasarı bulundurduğu belirtilmiştir. XPA-4 G/A polimorfizmi ve PAH maruziyeti arasındaki etkileşimin sperm DNA hasarı üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Gu ve ark., 2010b). *ERCC1*, NER yolağında DNA'daki büyük eklentileri 5' tarafından kesmekle görevlidir ve testisteki ekspresyonu yüksektir. *ERCC1* 8092 CA+AA genotipleri idyopatik azospermi risk artışıyla ilişkilendirilmektedir (Ji ve ark., 2008).

### **ERCC2/XPD**

Yirmi dört ekzondan oluşan *ERCC2* (*XPD* olarak da bilinir) geni 19 numaralı kromozomun uzun kolunun 13.3 bölgesinde bulunur (Xu ve ark., 2016). *ERCC2* tarafından kodlanan XPD proteini multifonksiyonel bir proteindir ve TFIIH'nin temel bileşenidir. TFIIH transkripsiyon, NER ve hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi çeşitli hücrel süreçlerde görev alır. TFIIH iki alt kompleksten oluşur. Çekirdek kompleksini XPB, p62, p52, p44 ve p8 oluştururken; CDK-aktive edici kinaz kompleksini CDK7, siklin H ve MAT1 oluşturur. XPD ise CAK ile çekirdek kompleksi arasında köprü meydana getirir (Vashisht and Wohlschlegel, 2019). XPD protein-protein etkileşimleri TFIIH kompleksinin stabilitesi ve helikaz aktivitesi için önemlidir (Fan ve ark., 2008). XPD'nin 5'→ 3' helikaz aktivitesi DNA'nın yapısında çeşitli iç ve dış kaynaklı faktörler nedeniyle meydana gelen hasarlı baz ve/veya büyük DNA eklentilerinin saptanması, doğrulanması ve onarılması için mutlaka bulunması gereken bir proteindir. Yedi yüz atmış aminoasitten oluşan XPD proteini 5'→ 3' helikaz aktivitesine sahip olan SF2 helikaz ailesinin bir üyesidir ve 4 karakteristik helikaz bölgesini içerir. Bu bölgeler saç tokası (hairpin) domain 1 (HD1), HD2, 4Fe-4S ve arktır (Şekil 9) (Vashisht ve Wohlschlegel, 2019). XPD'nin karakteristik domainlerinden olan 4Fe4S kümesinin demir sülfür merkezi hücre döngüsünün düzenlenmesi, mitoz ve mitokondrial fonksiyonların da dahil olduğu farklı fonksiyonlara aracılık etmek için diğer proteinlerle etkileşime girebilir (Houten ve ark., 2016).



**Şekil 9.** XPD proteininin bölgelerinin organizasyonu. Şekilde dört karakteristik helikaz bölgesi (HD1, HD2, 4Fe-4S ve Arch) gösteriliyor. XPD proteininin karboksi terminal uzantısı (CTE) TFIIF'in p44 bileşeni ile etkileşim içindedir. XPD mutasyonları Xeroderma pigmentosum, trikodiyodistrofi ve CS ile ilişkilendirilmektedir. XP mutasyonları mavi, XP ve CS mutasyonları mor ve trikodiyodistrofi mutasyonları turuncu renkle gösterilmektedir (Vashisht ve Wohlschlegel, 2019)

*ERCC2* polimorfizmleri ve erkek infertilitesi arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalar literatürde bulunmaktadır. DNA onarım genleri *XRCC1*'in Arg194Trp ve Arg399Gln polimorfizmleri ile *ERCC2* (*XPB*) (Lys751Gln) polimorfizminin idiyopatik erkek infertilitesi ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda, *XPB* 751Gln allelinin azospermi için bir risk alleli olabileceği bildirilmiştir ( $p=0,004$ ). Lys/Lys genotipi *XPB* 751Lys/Gln + Gln/Gln genotipine kıyasla azospermi riskiyle orta derecede ilişkili bulunmuştur. *XPB* ve *XRCC1* polimorfizmlerinin Çin popülasyonunda idiyopatik azospermi geliştirme riskine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Gu ve ark., 2007). Ancak Ji ve ark. (2008), tarafından yapılan başka bir çalışmada *ERCC2* Lys751Gln ve Asp312Asn polimorfizmleri ve idiyopatik erkek infertilitesi arasında bir ilişki bulunamamıştır (Ji ve ark., 2008). *ERCC2* Lys751Gln polimorfizmi ile DNA fragmentasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamadığı ve bunun örneklem büyüklüğünden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Gu ve ark., 2010a, Gu ve ark., 2010b). Son zamanlarda Singh ve ark. (2019a), tarafından *ERCC1*, *ERCC2* ve *XRCC1* gen polimorfizmleri ve Asya kökenli erkeklerde infertilite riski arasındaki

ilişkiyi araştıran bir çalışmada meta-analiz, trial dizileme ve ilişki analizleri yapılmıştır. Araştırmacılar *ERCC2* 751A>C tek nükleotit polimorfizminin AA genotipinin yüksek infertilite riski ile ilişkili olduğunu ve Hindistanlı erkeklerde azospermi ve infertilite riskindeki artışa katkıda bulunduğunu bildirilmiştir (Singh ve ark., 2019a).

İdiyopatik oligoastenoteratospermi olgularında BER ve NER yollarında görev alan ve testisteki ekspresyonu yüksek olan *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin promotor metilasyonunun sperm DNA fragmentasyonu ile olan ilişkisinin normospermik, fertil ve fertilesi kanıtlanmış erkekler ile kıyaslanarak araştırılması yapılan tez çalışmasının amacını oluşturmuştur. Ayrıca, *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin promotor metilasyon değişiklikleri ile sperm kromatin bütünlüğü ve klasik semen parametreleri arasındaki muhtemel ilişkinin araştırılması da tezin amaçları arasında yer almıştır.

### 3. MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda, OAT'lı infertil bireyler ile normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerdeki DNA fragmantasyonu, sperm kromatin kondensasyonu ve DNA onarım genleri *XRCC1* ve *ERCC2*'nin metilasyon durumları arasındaki olası ilişki araştırıldı. Ayrıca, bu parametrelerin klasik semen analizi sonuçlarıyla olan ilişkisi de değerlendirildi. Çalışmada, semen hacmi ve/veya konsantrasyonu DNA izolasyonu, TUNEL ve sperm kromatin analizi için yeterli olmayan örneklerde analizlerin tamamı yapılamamıştır.

#### 3.1. Çalışma Grubu ve Özellikleri

Tez çalışmasına Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi, Üroloji Polikliniğinde OAT tanısı alan infertilite hastaları dahil edilmiştir. OAT tanısı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2010 kılavuzuna (World Health Organization, 2010) göre yapılan semen analiziyle konulmuştur. Semen örnekleri 2-5 günlük cinsel perhizin ardından mansturbasyon yoluyla elde edilmiştir. Semen analizinde sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml'nin, sperm motilitesi %32'nin ve sperm morfolojisi %4'ün altında olan hastalar OAT olarak kabul edilmiştir. Çalışmaya yaşları 19-51 arasında olan ve OAT tanısı konulan 77 infertil erkek katılmıştır. WHO 2010 kılavuzuna göre normal semen parametrelerine sahip erkekler ile fertil erkeklerden (fertil erkekler ve fertilitesi kanıtlanmış erkekler) oluşan toplam 51 birey ise kontrol grubunda yer almıştır. Fertil erkekler iki yaşından büyük bir ya da daha fazla çocuğu olan erkekler iken; fertilitesi kanıtlanmış erkekler 2 yaş ve altında çocuğa sahip olan erkeklerdir.

Tez çalışmasının etik açıdan uygunluğunu gösteren etik kurul raporu (OMÜ KAEK 2016/185) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na yapılan başvuru sonucu alınmıştır (Ek 1). Hasta ve kontroller araştırma konusunda bilgilendirilmiş, hasta onam formları (Ek 2) okutulmuş ve kabul edenler araştırmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan gönüllülerin seçiminde göz önüne alınan dahil edilme ve edilmeme kriterleri aşağıda verilmektedir.

Gönüllülerin seçiminde baz alınan dahil edilme kriterleri:

1. OAT'lı olan infertil erkekler
2. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin 19-51 yaş aralığının dışında olması
3. Kontrol grubunda yer alan bireylerin semen analizlerinin WHO 2010

klavuzuna göre normal aralıkta olması

4. Kontrol grubunu oluşturan erkekler ile hasta grubunu oluşturan erkekler arasındaki yaş farkının  $\pm 5$  olması

Gönüllülerin seçiminde baz alınan dahil edilmeme kriterleri:

1. Hastaların obstrüktif azospermi tanısı almış olması
2. Klinik analizler sonucu hastalarda herhangi bir karyotip anomalisi, Y kromozom mikrolelesyonu ve *CFTR* mutasyonunun tanımlanması
3. Hasta ve kontrollerin 19-51 yaş aralığında olmaması
4. Kontrol grubunu için erkelerin yardımcı üreme teknikleri ile çocuk sahibi olması
5. Kontrol grubunu oluşturan erkekler ile hasta grubunu oluşturan erkekler arasındaki yaş farkının  $\pm 5$ 'den fazla olması

Çalışma kapsamında hasta ve kontrollerden sadece semen örneği alınmış ve alınan semen örneği üç ependorf tüpüne paylaştırılmıştır. Tüplerden biri TUNEL analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış, diğeri taze olarak anilin mavisi ile boyama yönteminde kullanılmıştır. Son tüp ise DNA izolasyonunda kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır.

### 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

- Thermocycler, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Real-time PCR cihazı (Rotorgene Q, Almanya)
- MultiskanGo Spektrofotometre (Thermo Scientific, USA)
- Işık mikroskobu (Olympus CX31, Tokyo, Japonya)
- Floresan mikroskop (Olympus BX51)
- Mikrosantrifüj (Herolab MicroCen. 13D)
- Santrifüjler (Centaur 2, MSE, SANYO ve Jouan BR4)
- Vortex (VELP Scientifica)
- Buzdolabı
- Derin dondurucu

### 3.3. Kullanılan stok kimyasal maddeler

**500 ml %4'lük Paraformaldehit (pH:7.2)**

- 450 ml H<sub>2</sub>O
- 20 g paraformaldehit (PFA) (Merck, USA)
- 50 ml fosfat tuz tamponu (PBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
- NaOH (pH ayarlanmasında kullanılmak üzere) (Merck)

#### **Somatik hücre lizis tamponu**

- 1 ml Triton X-100 (Sigma-aldrich, USA)
- 2 ml %10 sodyum dodesil sülfat (SDS)
- 200 ml dH<sub>2</sub>O

#### **3.4. TUNEL Yöntemi**

DNA fragmentasyon analizinde kullanılan TUNEL yöntemi en yaygın kullanılan iki yöntemden biridir (Majzoub ve ark., 2017). TUNEL yöntemi örnek materyalin fiksasyonu, ekimi, permeabilizasyonu ve TUNEL reaksiyon karışımı ile yapılan etiketleme aşamasından sonra 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) içeren antifade ile (Temecula, California) boyama aşamalarını içeren bir yöntemdir (Kabartan ve ark., 2019). Aşağıda ayrıntıları verilen TUNEL analizi In Situ Cell Death Detection Kiti, Fluorescein (Roche, Almanya) kullanılarak, kitin protokolünde belirtilen bilgiler doğrultusunda yapılmıştır.

- Tunel analizi için ayrılan semen örneği 1500 rpm'de santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı.
- Pellet PBS içerisinde yeniden suspense edildikten sonra 1500 rpm'de santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırıldı ve fiksasyon aşamasına geçildi.

#### **Örnek Materyalin Fiksasyon**

- Pellet paraformaldehit solüsyonu içerisinde fikse edildi.
- PFA içerisine fiske olmuş örnek 2000 rpm'de santifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
- Konsantrasyonu 1-5 milyon/sperm olacak şekilde PBS ile yeniden suspense edilen pellet ekim için hazır hale geldi.

#### **Örnek Materyalin Ekimi**

1. Poli-L-lizin kaplı lamalar 3 eşit alana ayrıldı ve bu alanlara bir miktar PB-

sükroz damlatıldı.

2. Lam üzerindeki alanlara 200-300 µl örnek konuldu.
3. Hazırlanan slaytlar nemli ortam içerisinde bir gece bekletildi.
4. İnkübasyon süresinin sonunda slaytlar 3 kez PBS ile yıkandı ve ekim yapılan alanlardan en iyi olanı etiketleme aşamasında kullanılmak üzere ışık mikroskobu altında belirlendi.
5. Bu işlemler sırasında pozitif kontrol hazırlandı ve permeabilizasyon aşamasında geçildi.

### **Örnek Materyalin Permeabilizasyonu**

Permeabilizasyon solusyonu kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlandı.

1. Slayt üzerindeki seçili alanlara 200-300 µl permeabilizasyon solusyonu eklenerek karanlık ve nemli ortamda 10 dk bekletildi.
2. 10 dk'lık inkübasyon süresinin ardından slaytlar PBS ile yıkandı ve etiketleme aşamasına geçildi.

### **Etiketleme ve Boyama Aşaması**

Etiketleme işlemi TUNEL reaksiyon karışımı kullanılarak gerçekleştirildi.

### **TUNEL Reaksiyon Karışımının Hazırlanması:**

TUNEL reaksiyon karışımı kullanımdan hemen önce hazırlandı. Negatif kontroller için 100 µl label solüsyonu ayrıldı ve geri kalan 450 µl'lik label solüsyonu ile 50 µl enzim karıştırılarak TUNEL reaksiyon karışımı hazırlandı. Her çalışmada TdT enzimi konulmayan bir negatif kontrol ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin kullanılan bir pozitif kontrol yer almıştır. Etiketleme aşamasının ayrıntıları aşağıda verilmektedir.

1. Slayttaki örneğin etrafı kurulandı ve örneğin üzerine 50 µl TUNEL reaksiyon karışımı eklendi.
2. 37C<sup>0</sup>'de nemli ortamda ve karanlıkta 1 saat inkübe edildi.
3. Süre sonunda slaytlar 3 defa PBS ile yıkandı.
4. Slaytta yer alan örnekler üzerine DAPI içeren antifade damlatılarak lamelle kapatıldı ve floresan mikroskop ile incelendi.

Saytlar floresan mikroskopta (Olympus BX-51) 40x büyütme altında analiz edildi ve her bir örnek için farklı alanlara ait görüntülerden en az üç fotoğraf alındı. Fotoğraflama yapılırken farklı alanlara ait görüntülerin en az 500 sperm hücrelerini

kapsayacak şekilde olmasına dikkat edilmiştir. Fotoğraflama işlemi yapılırken uygun filtreler seçilerek aynı alan için hem TUNEL hem de DAPI sinyalleri için eşlenik fotoğraflar çekilmiştir.

### **Floresan Mikroskop Görüntülerinin Değerlendirilmesi**

Floresan mikroskop görüntülerine ait fotoğraflar Image J programı kullanılarak analiz edilmiştir. Program mikroskopta farklı filtreler kullanılarak çekilen fotoğrafların hem ayrı ayrı hem de merge edilerek görüntülenmesine olanak vermektedir. Fotoğrafta yer alan sperm hücrelerinden FITC (fluorescein) sinyal verenler TUNEL pozitif olarak kabul edilmiştir. TUNEL pozitif hücre sayısı ve toplam hücre sayısı kullanılarak DNA fragmentasyon indeksi (DFI) hesaplanmıştır. DNA bütünlüğü hakkında bilgi veren DFI, fragmentasyon içeren sperm hücrelerinin yüzdesini vermektedir ve eşik değeri %16,8 olarak bildirilmektedir (Sharma ve ark., 2016).

### **3.5. Anilin Mavisi ile Boyama Yöntemi**

Anilin mavisi ile boyama yöntemi sperm kromatin yapısındaki nükleer proteinlerin (histonlar ve protaminler) kompozisyonundaki farklılıklar hakkında bilgi veren bir yöntemdir. Anilin mavisi ile boyama sonucunda protamin bakımından zengin olan olgun spermatozoa anilin mavisi ile çok az boyanırken ya da hiç boyanmazken; histon bakımından zengin olan olgunlaşmamış spermatozoa anilin mavisi ile boyanır. Boyanma durumundaki bu farklılık ışık mikroskobu altında (Olympus CX31, Tokyo, Japonya) 1000x büyütme ile her bir örnek için en az 200 sperm hücresi sayılarak anilin (+), anilin (-) ve yarım boyanmış spermatozoa yüzdesi hesaplanır (Óvári ve ark., 2010). Anilin mavisi (Sigma Aldrich, USA) ile boyama yönteminin basamakları aşağıda verilmektedir.

1. Anilin mavisi ile boyama yöntemi için ayrılan 1 ml semen örneği 2000 rpm'de santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Pellet PBS içinde yeniden suspanse edilerek 2000 rpm'de santrifüj edildi.
4. Sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve sperm konsantrasyonuna bağlı olarak pelletten 5-10 µl lama yayıldı.
5. Lama yayılan preparatın kuruması sağlandıktan sonra slayt %3'lük glutaraldehit ile kaplandı ve bir süre kuruması beklendi.



6. Kuruyan slayt anilin mavisi ve glacial asitten oluşan solüsyonuna alınarak 15-20 dk beklendi.
7. Sürenin sonunda boyanın fazlası musluk suyu altında alındı ve slayt distile su ile yıkandı.
8. Bu aşamada hazır hale gelen slaytlar ışık mikroskopunda 100'lük objektif ile incelendi.
9. Her bir örnek için en az 200 sperm hücresi sayıldı. Sayılan hücrelerden anilin (+), anilin (-) ve yarım boyalı olanlar için ayrı ayrı yüzde hesabı yapıldı.

### **3.6. XRCC1 ve ERCC2 Genlerinin Metilasyon Profilinin Belirlenmesi**

TUNEL analizi ile DNA hasarı tespit edilen örneklerden yeterli (>100 ng) DNA konsantrasyonuna sahip olanların sperm DNA'ları kullanılarak *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin metilasyon durumu methylight yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu amaçla izlenen yöntemlerin ayrıntılarına aşağıda yer verilmektedir.

#### **3.6.1. Semen Örneğinden Somatik Hücre Lizis Tamponu ile Somatik Hücrelerin Uzaklaştırılması**

Semen örneğinde bulunan sperm hücrelerinden DNA izolasyonunu gerçekleştirebilmek amacıyla ilk olarak semen örneğinde bulunan farklı tipteki somatik hücreler (epitel hücreleri ve lökositler gibi) uzaklaştırılmıştır. Semenden bu hücreleri uzaklaştırmak ve yalnızca sperm hücrelerini elde etmek amacıyla somatik hücre lizis tamponu (somatic cell lysis buffer, SCLB) kullanılmıştır (Mao ve ark., 2013). SCLB ile semen örneğinden somatik hücrelerin uzaklaştırılması işleminin ayrıntılarına aşağıda yer verilmektedir (Gunes ve ark., 2018a).

1. Semen örneği 1500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
2. Pellet 1X PBS ile çözüldü ve hafif bir vorteks ile karışması sağlandı.
3. Vorteks sonrası tekrar santrifüj gerçekleştirildi.
4. Süpernatant atılarak pellet üzerine 1X PBS ilave edildi.
5. PBS ile pellet karıştırıldıktan sonra 1500 rpm'de santrifüj yapıldı.
6. Pellet aspire edildikten sonra SCLB (200 ml distile su içinde 1ml Triton x100+ 2ml %10 SDS) içerisinde iyice çözüldü.
7. SCLB içinde çözünen pellet 15ml'lik tüpe aktarılarak üzerine bir miktar

- daha SCLB eklendi ve vorteks ile karışması sağlandı.
8. Tüpler 25 dakika süreyle buzda bekletildi.
  9. 25 dakikanın sonunda buzdan çıkarılan tüpler 1200 rpm'de santrifüj edildi.
  10. Santrifüj sonrası pellet tamamen kuru kalacak şekilde süpernatant aspire edildi.
  11. Pelletin üzerine bir miktar SCLB eklenerek pelletin çözünmesi sağlandı.
  12. Tekrar buz içerisine gömülen örnekler 25 dakika daha buzda bekletildi.
  13. 1200 rpm'de santrifüj yapıldı.
  14. Süpernatant dikkatli bir şekilde tamamen uzaklaştırıldı.
  15. Pellet 1ml 1X PBS ile çözülüp eppendorf tüpe aktarıldı.
  16. Bu aşamada mikroskop altında somatik hücrelerin varlığı kontrol edilerek SCLB solüsyonu ile bir kez daha müdahale edilip edilmemesine karar verildi. Mikroskop ile inceleme sonucunda somatik hücreler görülüyorsa bir sonraki aşamaya geçildi. Somatik hücreler görülüyorsa SCLB solüsyonu ile bir kez daha lizis işlemi gerçekleştirildi.
  17. 1500 rpm'de santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı.
  18. Son olarak pellet 100 µl 1X PBS ile çözülerek DNA izolasyonu işlemine geçildi.

### **3.6.2. Sperm Hücrelerinden DNA İzolasyonu**

Sperm DNA izolasyonu Quick-gDNA Miniprep Kiti (Zymo Research, USA) kullanılarak kitte önerilen protokollere uygun olarak gerçekleştirildi (Gunes ve ark., 2018a).

Sperm DNA izolasyonunun aşamaları:

1. 100 µl PBS içerisindeki sperm örneğinin üzerine 4:1 oranında genomik lizis tamponu eklendi.
2. Genomik lizis tamponu ve sperm örneğini içeren karışım toplama tüpü içerisindeki kolona alınarak >10.000 g'de santrifüj edildi.
3. Kolon yeni bir toplama tüpüne alındı ve üzerine 200 µl yıkama öncesi tamponu eklendi.
4. >10.000 g'de santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası 500 µl yıkama tamponu eklenerek tekrar santrifüj edildi.
6. Sonrasında kolon bir eppendorf tüpe alınarak üzerine 50 µl elüsyon tamponu

eklendi.

7. Maksimum hızda 1-2 dk santrifüj edildi.

İzole edilen DNA örnekleri bisüfit modifikasyonunda kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

### **3.6.3. İzole Edilen DNA'ların Konsantrasyon ve Safliklarının Belirlenmesi**

DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA'ların miktar ve saflık tayini Multiskan Go Spektrofotometre (Thermo Scientific, USA) cihazıyla ölçüldü.

### **3.6.4. Bisüfit Modifikasyon Yöntemi**

İzole edilen DNA'ların bisüfit modifikasyonu, EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, USA) kullanılarak kitte belirtilen protokoller doğrultusunda yapılmıştır. Bisüfit modifikasyon yöntemi, DNA'nın bisüfitle muamele edilmesi ve metillenmemiş sitozinlerin deaminasyon ile urasile dönüştürülmesi esasına dayanır. Metillenmiş sitozinlerde böyle bir dönüşüm meydana gelmemektedir. Sodyum bisüfit ile sitozinlerin deaminasyonu sülfonasyon, hidrolitik deaminasyon ve alkali desülfonasyon olmak üzere üç aşamada gerçekleşir (Patterson ve ark., 2011).

Bisüfit modifikasyon işlemi aşağıda verilen basamaklardan oluşmaktadır:

1. DNA örnekleri 200 µl'lik PZR tüpleri içerisinde konsantrasyonları 200 ng olacak şekilde hazırlandı ve üzerine 130 µl CT dönüşüm reaktifi eklenerek alt üst edildi.

CT Dönüşüm Reaktifinin Hazırlanması: Toz halde bulunan CT dönüşüm reaktifinin üzerine 900 µl H<sub>2</sub>O, 300 µl M-dissolving tamponu eklendi. Kullanımdan hemen önce 10 dk süreyle sık sık karıştırılarak hazırlandı.

2. Hazırlan PZR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilerek aşağıdaki koşullarda reaksiyon gerçekleştirilmesi sağlandı.

- 98°C'de 10 dk denatürasyon
- 64°C'de iki buçuk saat
- 4°C'de ∞

3. PZR aşamasından sonra kolonlara 600 µl M-binding tamponu konuldu ve kolonlar toplama tüplerine yerleştirilerek birkaç kez alt üst edildi.

4. Maksimum hıza 30 saniye (sn) santrifüj edildi.

5. Santrifüj sonrasında kolona 100 µl M-yıkama tamponu konuldu ve tekrar 30

sn santrifüj yapıldı.

6. Santrifüjün ardından kolona 200 µl M-desülfasyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 20 dk süreyle inkübasyona bırakıldı.
7. Kolona 200 µl M-yıkama tamponu eklenerek maksimum hızda santrifüj edildi.
8. Yedinci aşama tekrarlandı.
9. Kolon bir ependorf tüpe alınarak üzerine 10 µl elüsyon tamponu eklendi ve santrifüj edildi.

Elde edilen bisülfid modifikasyonu yapılmış DNA'lar *XRCCI* ve *ERCC2* genlerinin metilasyon durumunu belirlemek için methylight analizinde kullanılmıştır.

### **3.6.5. Methylight Yöntemi ile Metilasyon Analizi**

Methylight yöntemiyle *XRCCI* ve *ERCC2* genlerinin promotor bölgelerinin metilasyon durumları belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak *XRCCI* ve *ERCC2* genlerinin nükleotid dizisi ulusal biyoteknoloji bilgi merkezinin (national center for biotechnology information, NCBI) “gene” sayfasından fasta formatında alınmış ve bu genlere ait promotor dizileri Gene2Promoter (Intrexon Bioinformatics, Almanya) programı yardımıyla belirlenmiştir. Gene2Promoter programı yaygın transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yerlerine göre birden çok promotor bölgesi belirleyen kullanımı oldukça kolay bir programdır. *XRCCI* ve *ERCC2* genleri için Gene2Promoter programı ile elde edilen promotor dizileri ENSEMBL ve ökaryotik promotor veri tabanından (Eukaryotic Promoter Database, EPD) alınan promotor dizileri ile NCBI'nin blast sayfasında benzerlik açısından değerlendirilmiş ve benzerlik oranı %100 olanlar arasından en uygun promotor dizisi primer ve prob dizaynı için seçilmiştir. Promotor dizilerine özgü primer ve prob dizaynı ise Beacon Designer 8.2 (Premier Biosoft, USA) programı ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan primer ve prob dizileri tablo 1'de verilmiştir. Program ilk olarak yüklenen promotor dizisini sodyum bisülfid dönüşümüne maruz kalınan durumdaki forma dönüştürmekte, sonrasında ise promotor dizisindeki CpG adacıklarını bularak istenilen parametrelere özgü primer ve prob dizaynını gerçekleştirmektedir. Sodyum bisulfid modifikasyonu yapılmış DNA dizisine özgü tasarlanan primer ve iki ucu floresans işaretli probun orijinal genomik DNA'daki metilasyon durumuna bağlı olarak DNA'ya bağlanmada farklılık göstermektedir (Olkhov-Mitsel ve ark., 2014). Methylight analizi Epiect methylight PCR+ROX vial kiti (Qiagen, Almanya)

kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Eads ve ark., 2000). Methylight analizinde her bir DNA onarım geni ve normalizasyon amacıyla kullanılacak aktin-beta (*ACTB*) geni için üç oligonükleotit kullanılmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan oligonükleotitler metillenmiş DNA'ya özgü tasarlanan lokusa özgü PZR primerleri ile 5' ucunda floresans bir boya (6FAM) ve 3' ucunda quencher (BHQ1) içeren probdur.

Methylight analizinde kullanılan PZR reaksiyon karışımının bileşenleri:

- 1X EpiTect Methylight master mix
- 0.4 µM ileri primer
- 0.4 µM geri primer
- 0.2 µM prob
- 100-200 ng bisulfit modifikasyonu gerçekleştirilmiş DNA
- RNaz/DNaz içermeyen H<sub>2</sub>O

Methylight analizi için uygulanan real time PZR döngü koşulları;

- 95°C'de başlangıç denatürasyonu
- 95°C'de 15 saniye denatürasyon
- 60°C'de 60 saniye bağlanma/uzama aşamalarını içeren 45 döngüden oluşmuştur.

Methylight analizinde pozitif kontrol olarak EpiTect metile insan kontrol DNA'sı (Qiagen, Almanya) ve negatif kontrol olarak ise DNA yerine DNaz/RNaz içermeyen H<sub>2</sub>O kullanılmıştır.

**Tablo 1.** Methylight analizinde kullanılan primer ve prob dizileri

Gen Adı	Baz Dizisi	Baz Sayısı	Tm (°C)	%GC	CpG miktarı	Ürün Büyüklüğü (bp)
<i>XRCC1</i> F	TTTGTTATCGGCGTAGGATGGTTT	24	59,8	41,7	2	
<i>XRCC1</i> R	CTTACCAACCACGACCAAATCTAAC	25	59,2	44	1	163
<i>XRCC1</i> Prob	6FAM-TACGCTACCCAAACGCTCCAAACCTAAAC-BHQ-1	29	66,9	48,3	2	
<i>ERCC2</i> F	GTATCGTTTTATTTCGAGAGTTAGTCG	26	57,4	38,5	3	
<i>ERCC2</i> R	CTCCACCTATATTACGAAACCATTAAC	27	57,5	37	1	122
<i>ERCC2</i> Prob	6FAM-CCTACCCGTCAATCCGCTAAAACAAAAC CA-BHQ-1	30	67,2	46,7	2	

### 3.7. Metilasyon Yüzdesinin Hesaplanması

Methylight analizi sonucu elde edilen Ct değerleri üzerinden metilasyon miktarı  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu (Livak ve Schmittgen, 2001) kullanılarak hesaplanmıştır. Normospermik, fertil ve infertil erkeklerin sperm DNA'larında *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin metilasyon düzeyleri referans gen (*ACTB*) ile kıyaslanarak bu genler için PMR (tamamen metillenmiş referans yüzdesi) değeri elde edilmiştir.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodundaki  $\Delta\Delta Ct = (CT_{Gen} - CT_{Referans\ gene})_{örnek} - (CT_{Gen} - CT_{Reference})$  tamamen metillenmiş DNA'yı ifade etmektedir (Livak ve Schmittgen, 2001).

### 3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS V21 programı (IBM software, Point Claire, Quebec, Kanada) kullanıldı. İstatistiksel verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro–Wilk testi ile analiz edildi. Çalışma kapsamında değerlendirilen veriler arasındaki korelasyon “Spearman rank correlation coefficient” testi ile; farklı gruplar arasındaki değişkenler ise Mann-Whitney testi ile değerlendirilerek korelasyon katsayısı ve p değeri ile ifade edildi. P değerinin 0,05 değerinden küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. SDF ve metilasyon analizlerinin hastaları kontrollerden ayırmadaki duyarlılık ve özgüllüğü işlem karakteristik eğrisi (Receiver Operator Characteristics Curve, ROC) analizi ile değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri

Tez çalışmasına, 2018-2019 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Üroloji polikliniğine başvuran adaylardan idiyopatik OAT tanısı alan ve çalışmaya katılma konusunda gönüllü 77 infertil hasta çalışma grubunda yer almak üzere dahil edilmiştir. Kontrol grubunda ise kadın faktörü nedeniyle polikliniğe başvurup, semen analizi yaptıran bireyler ve donörler yer almıştır. Kontrol grubunda yer alan bireylerin 19'u normospermik, 27'si fertil ve 5'i ise fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşmaktaydı. Çalışmaya katılan bireylerin yaşları 19-51 arasındaydı (ortalama  $33,547 \pm 6,07$ ;  $p=0,0445$ ). Çalışma kapsamında klasik semen parametrelerinin yanı sıra *XRCCI* ve *ERCC2* genlerinin metilasyonu, sperm çekirdeğinin kondensasyonu ve sperm DNA fragmentasyonu da değerlendirilmiştir. Bu parametrelere ait tanımlayıcı istatistik verilerinin yer aldığı tablo aşağıda verilmektedir (Tablo 2).

### 4.2. Semen Analizi

Çalışma ve kontrol grubundaki tüm bireyler için semen analizi Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Üroloji Anabilim Dalı, androloji laboratuvarında yapılmıştır. OAT'lı bireyler ile normospermik ve fertilitesi kanıtlanmış erkekler arasında semen parametrelerinden sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi farklılık gösterirken ( $p \leq 0,0002$ ); diğer parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. OAT'lı bireyler normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yine aynı semen parametrelerinde farklılık gözlenmiştir [motilite (%15, %95CI %15-52,  $p < 0,0001$ ), morfoloji (%2, %95CI %2-3,  $p < 0,0001$ ) ve sperm konsantrasyonunun (%4, %95CI %3-5,  $p < 0,0001$ )]. Ancak semen hacminde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p=0,8281$ ).

**Tablo 2.** Çalışmada yer alan değişkenlerin istatistik verileri

	N (H,K)	Min	Mak	Ortalama	Ortanca	Standart Sapma	Normal dağılım
Yaş	(77,51)	19	51	33,547	33	6,0742	0.0445
Semen hacmi	(77,51)	2	8	3,403	3	0,9884	<0.0001
Sperm konsantrasyonu	(77,52)	1	69	17,512	8	17,6684	<0.0001
Toplam sperm sayısı	(77,52)	2,5	260	57,298	27	58,0605	<0.0001
Normal morfoloji	(77,52)	0	13	4,194	3	2,8589	<0.0001
Anormal morfoloji	(77,52)	87	100	95,806	97	2,8589	<0.0001
Hareketli sperm	(77,51)	2	63	29,488	25	18,6406	<0.0001
Hareketsiz sperm	(77,51)	37	98	70,589	75	18,7177	<0.0001
Canlılık	(77,1)	12	56	34,526	35	9,3583	0.0222
XRCC1 PMR	(49,32)	0	18,56	4,005	2,19	4,2308	<0.0001
ERCC2 PMR	(49,32)	0	0,39	0,0527	0,04	0,05617	<0.0001
Anilin (+)	(72,49)	0	58,96	11,255	7,675	10,7702	<0.0001
Anilin (-)	(72,49)	0,8	100	78,518	83,205	19,2956	<0.0001
Anilin intermediate	(72,49)	0	84,91	10,226	6	13,1031	<0.0001
SDF	(62,49)	0,62	47,85	12,964	9,97	9,9465	<0.0001

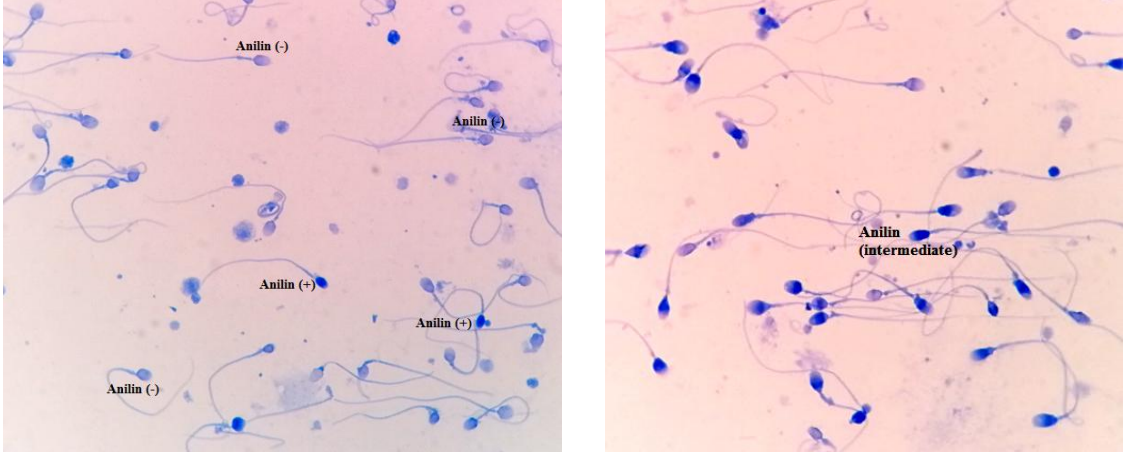
**Kısaltmalar:** H: hasta, K: kontrol

### 4.3. Sperm Kromatin Kondensasyonunun Belirlenmesi

Anilin mavisi ile boyama sonucunda elde edilen anilin (+), anilin (-) ve anilin (intermediate) sperm hücrelerine ait ışık mikroskobu görüntüleri şekil 10'da verilmektedir. Anilin mavisi ile boyama sonucunda, 72'si infertil ve 49'u normospermik/fertil/fertilitesi kanıtlanmış bireye ait olan toplamda 30348 spermatozoa değerlendirilmiştir. Anilin (+), anilin (-) ve anilin (intermediate) sperm yüzdesi sırasıyla %10,9; %79,2 ve %9,9 olarak bulundu. OAT'lı bireylerdeki anilin (+) sperm yüzdesi %16,4 iken normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşan kontrol grubunda %4,6'dır. OAT'lı bireyler ve fertilitesi kanıtlanmış erkekler arasında anilin (+) ve anilin (-) sperm yüzdesi açısından farklılık bulunmuştur (sırasıyla p=0,002;



p=0,003). OAT'lı erkekler ve normospermik bireyler arasında ise anilin (+) ve (-) sperm yüzdesinin (p<0,0001) yanı sıra anilin (intermediate) sperm yüzdesinin de istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir (p=0,0116). Anilin (+) sperm yüzdesi ile klasik semen parametrelerinden anormal morfoloji ve hareketsiz sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde güçlü bir korelasyon belirlenirken; sperm konsantrasyonu ve toplam sperm miktarı ile orta derecede negatif yönlü anlamlı bir korelasyon belirlenmiştir. Anilin (+) sperm yüzdesi ile orta derecede ancak pozitif bir korelasyon gösteren diğer parametreler ise SDF ve *XRCCI* metilasyonudur (sırasıyla p=0,0003 ve p=0,0017). Yaş ise anilin (+) sperm yüzdesi ile negatif korelasyon gösteren bir değişken olarak bulunmuştur. Anilin (-) sperm yüzdesi ve yaş arasında zayıf pozitif korelasyon; motilite, sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı ile orta derecede pozitif yönlü bir korelasyon; ve normal morfoloji ile de güçlü pozitif bir korelasyon olduğu bulunmuştur. SDF (r=-0,350; p<0,0002) ve *XRCCI* metilasyon yüzdesi (r=-0,290; p=0,0111) ile anilinle boyanmayan sperm yüzdesi arasında negatif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir. Anilin (intermediate) sperm yüzdesi ve SDF arasında pozitif korelasyon gözlenirken (p=0,0034); yaş, motilite, normal morfoloji, sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon belirlenmiştir. Semen hacmi ve sperm canlılığı ile kromatin kondensasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 3). Anilin (+) sperm yüzdesi OAT'lı infertil erkeklerde (%13,23, %95CI %10,8997-15,5073) normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşan kontrol grubuna (%3,14, %95CI %2,4260-4,7248) göre daha yüksek bulundu (p<0,0001). Anilin (-) sperm yüzdesi OAT'lı infertil erkeklerde (%75,645, %95CI %70,4108-79,7409) normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşan kontrol grubuna (%91,895, %95CI %89,0141-95,0133) göre daha yüksek bulundu (p<0,0001). Normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerdeki anilin (intermediate) sperm yüzdesi (%3,43, %95CI %2,4505-5,7679) ise, OAT'ı bulunan infertil erkeklerdekinden daha düşüktü (%9,73, %95CI %6,2366-12,5679, p<0,0001).



**Şekil 10.** Anilin mavisi ile boyanmış sperm hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü



**Tablo 3.** Çalışmada yer alan değişkenler arasındaki ilişki

Değişkenler (n)	Yaş	SDF	Anilin (+)	Anilin (-)	Anilin (orta)	<i>XRCCI</i> (PMR)	<i>ERCC2</i> (PMR)	Semen hcm	Sperm knstrsyn	Motilite	Morfolji	Vitalite
<b>Yaş</b> (77 H, 51 K)												
<b>SDF</b> (62 H, 49 K)	r=-0,009 p=0,9273											
<b>Anilin(+)</b> (72 H, 49 K)	r=-0,179 <b>p=0,0498</b>	r= 0,348 <b>p= 0,0003</b>										
<b>Anilin(-)</b> (72 H, 49 K)	r= 0,195 <b>p=0,0324</b>	r= -0,350 <b>p&lt;0,0002</b>	r= -0,875 <b>p&lt;0,0001</b>									
<b>Anilin (orta)</b> (72 H, 49 K)	r=-0,191 <b>p= 0,0361</b>	r= 0,282 <b>p=0,0034</b>	r=0,468 <b>p&lt;0,0001</b>	r=-0,799 <b>p&lt;0,0001</b>								
<b><i>XRCCI</i></b> (49 H, 32 K)	r=0,117 p= 0,2996	r= 0,01 p=0,9277	r= 0,354 <b>p=0,0017</b>	r= -0,290 <b>p=0,0111</b>	r= 0,181 p=0,1183							
<b><i>ERCC2</i></b> (49 H, 32 K)	r= 0,081 p=0,4755	r= 0,025 p=0,8257	r= 0,189 p=0,1018	r= -0,134 p=0,2477	r= 0,053 p=0,6470	r= 0,246 <b>p=0,027</b>						
<b>Semen Hcm</b> (77 H, 51 K)	r= -0,099 p=0,2664	r= -0,202 <b>p=0,0333</b>	r= 0,02 p=0,8230	r= -0,007 p=0,9351	r= 0,023 p=0,8006	r= -0,087 p=0,4374	r= 0,264 <b>p=0,0172</b>					
<b>Sperm knstrsyn</b> (77 H, 52 K)	r= 0,371 <b>p&lt;0,0001</b>	r= -0,345 <b>p=0,0002</b>	r= -0,524 <b>p&lt;0,0001</b>	r= 0,491 <b>p&lt;0,0001</b>	r= -0,280 <b>p=0,0018</b>	r= -0,318 <b>p=0,0039</b>	r= -0,012 p=0,9161	r= -0,022 p=0,8065				

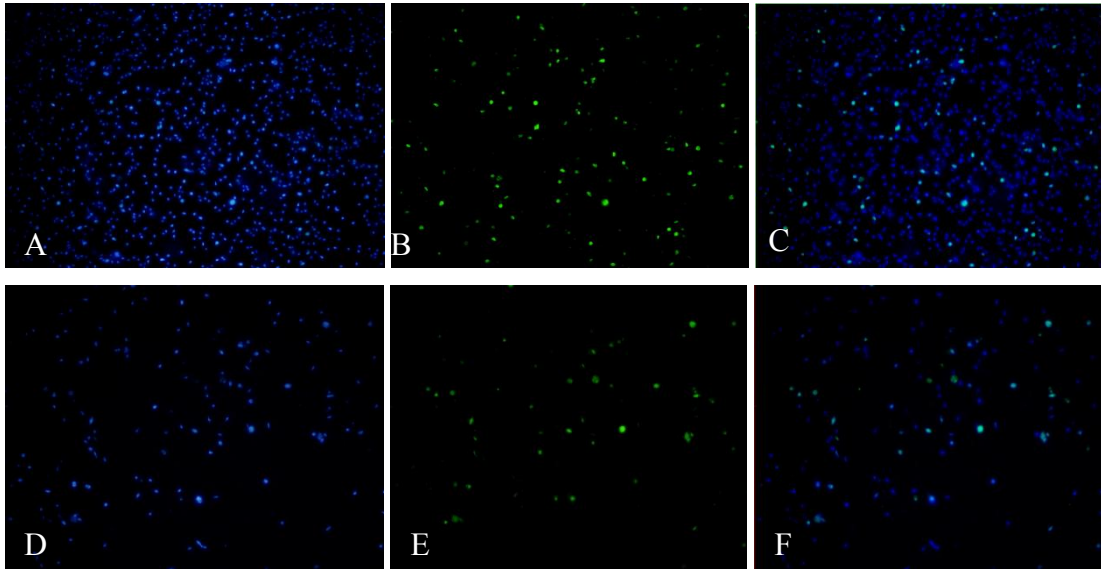
**Tablo 3.** Çalışmada yer alan değişkenler arasındaki ilişki (Devam)

<b>Değişkenler (n)</b>	<b>Yaş</b>	<b>SDF</b>	<b>Anilin (+)</b>	<b>Anilin (-)</b>	<b>Anilin (orta)</b>	<b>XRCC1 (PMR)</b>	<b>ERCC2 (PMR)</b>	<b>Semen hacmi</b>	<b>Sperm knstrsyn</b>	<b>Motilite</b>	<b>Morfolji</b>	<b>Vitalite</b>
<b>Motilite (77 H, 51 K)</b>	r= 0,259 <b>p=0,0031</b>	r= -0,330 <b>p=0,0004</b>	r= -0,564 <b>p&lt;0,0001</b>	r= 0,540 <b>p&lt;0,0001</b>	r= -0,307 <b>p=0,0006</b>	r= -0,181 p=0,1055	r= -0,128 p=0,2547	r= 0,005 p=0,9511	r= 0,757 <b>p&lt;0,0001</b>			
<b>Morfolji (77 H, 52 K)</b>	r= 0,352 <b>p&lt;0,0001</b>	r= -0,224 <b>p=0,0182</b>	r= -0,666 <b>p&lt;0,0001</b>	r= 0,615 <b>p&lt;0,0001</b>	r= -0,320 <b>p=0,0003</b>	r= -0,276 <b>p=0,0125</b>	r= -0,127 p=0,26	r= -0,006 p=0,9422	r= 0,796 <b>p&lt;0,0001</b>	r= 0,789 <b>p&lt;0,0001</b>		
<b>Vitalite (77 H, 1 K)</b>	r= -0,039 p=0,7368	r= 0,013 p=0,9204	r= -0,151 p=0,2011	r= 0,011 p=0,9266	r= 0,149 p=0,2096	r= 0,136 p=0,3453	r= 0,097 p=0,5029	r= 0,048 p=0,6749	r= 0,127 p=0,2697	r= 0,984 <b>p&lt;0,0001</b>	r= 0,246 <b>p=0,0301</b>	

Kısaltmalar: H: hasta, K: kontrol, hcm: hacim, knstrsyn: konsantrasyon

#### 4.4. TUNEL Analizi

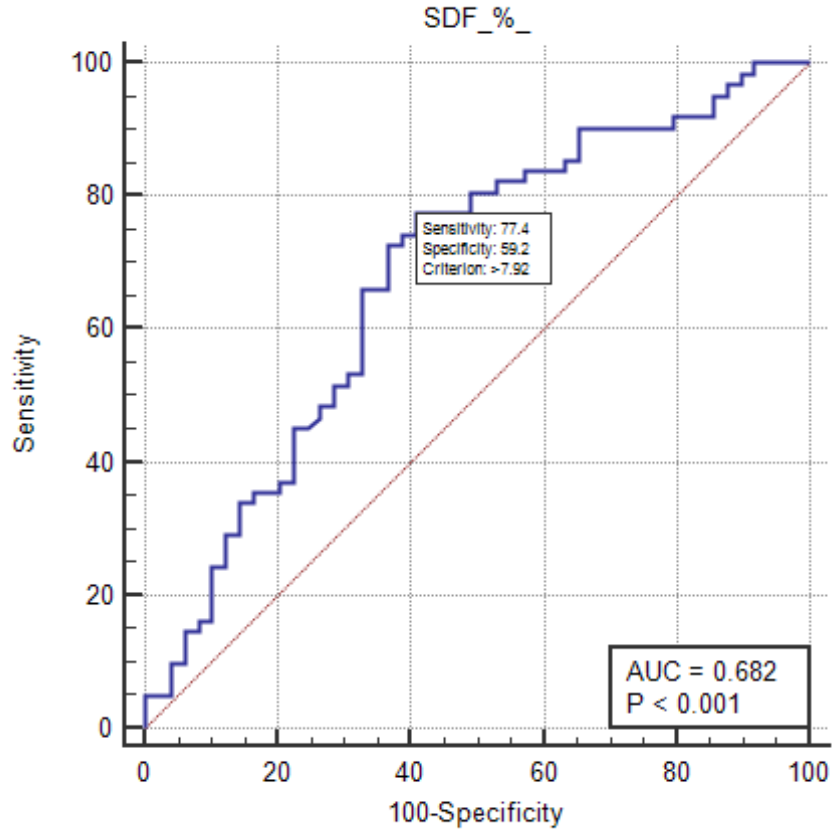
TUNEL analizi OAT'lı 62 bireye ait örnekte ve kontrol grubunda yer alan 26'sı fertil, 18'si normospermik ve 5'i kanıtlanmış fertil olmak üzere toplam 49 erkeğe ait örnekte gerçekleştirilmiştir. Şekil 11'de çalışma ve kontrol grubuna ait birer örneğin TUNEL analizi sonuçları (floresan mikroskop görüntüsü) verilmektedir. TUNEL analizi yapılan bireylerin tamamı için SDF sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen minimum değer %0,62 iken; maksimum değer %47,85 olarak bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Sperm DNA fragmentasyonu ile anilin (+), anilin (intermediate), anormol morfoloji ve hareketsiz sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönlü zayıf bir korelasyon belirlendi. Semen hacmi, sperm konsantrasyonu ve toplam sperm miktarı ile SDF arasında ise istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon bulundu. SDF değerinin fertilitesi kanıtlanmış erkeklerde normospermik erkeklere göre farklılık gösterdiği belirlendi ( $p=0,0109$ ). Bunlara ilave olarak OAT tanısı alan infertil erkeklerdeki SDF değerinin (%12,12, %95CI %10,22-16,32) normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşan kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu (%7,29, %95CI %4,93-9,37) ve iki grup arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya çıkarıldı ( $p=0,0011$ ).



**Şekil 11.** Çalışma ve kontrol grubuna ait bireylerin TUNEL analizi sonuçları (floresans mikroskop görüntüsü, 1X büyütme). Mavi renkli hücreleri DAPI ile boyanan sperm hücreleridir. Yeşil

renkli olanlar FITC ile işaretlenen DNA kırığı içeren sperm hücreleri A, B, C: Fertil bir bireye ait olan sperm hücreleri. A: DAPI işaretli sperm hücreleri, B: FITC işaretli sperm hücreleri, C: DAPI ve FITC işaretli A ve B fotoğraflarının örtüştürülmesiyle meydana gelen görüntü; D, E, F: Oligospermik bir bireye ait olan sperm hücreleri. D: DAPI işaretli sperm hücreleri, E: FITC işaretli sperm hücreleri, F: DAPI ve FITC işaretli C ve D fotoğraflarının örtüştürülmesiyle meydana gelen görüntü

Sperm DNA fragmantasyonunun oligospermik infertil erkekleri normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden ayırt etmekteki tahmin edici gücünü belirleyebilmek için ROC analizi yapıldı. ROC analizi sonuçlarına göre SDF'nin %,77,4 duyarlılık ve %59,2 özgüllükteki eşik değerinin 7,92 olduğu belirlendi (p=0,001) (Şekil 12).



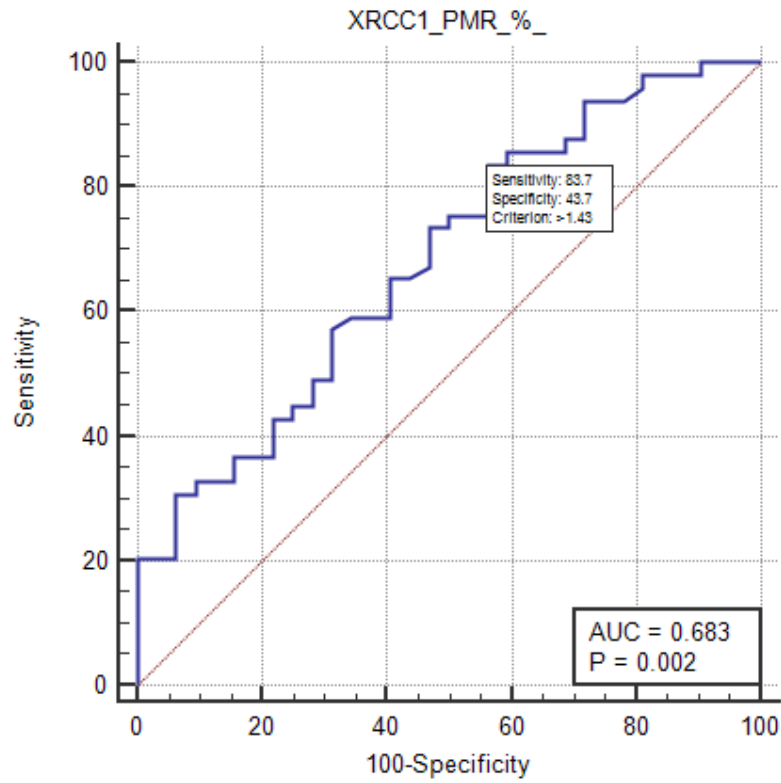
Şekil 12. SDF ROC eğrisi (oligospermik ve normospermik/fertil/fertilitesi kanıtlanmış erkekler)

#### 4.5. XRCC1 ve ERCC2 Genlerinin Promotor Metilasyonu

TUNEL analizi yapılan hasta ve kontrol grubuna ait 111 örneğin 81'inde (49 infertil birey, 32 normospermik/fertil/fertilitesi kanıtlanmış erkek) methylight yöntemi ile metilasyon durumu değerlendirildi. *XRCC1* geni için çalışılan 81 örneğin tamamında amplifikasyon gözlemlendi. Bu örnekler için hesaplanan en düşük *XRCC1* metilasyon yüzdesi "0" iken en yüksek metilasyon yüzdesi 18,56 olarak hesaplanmıştır. *XRCC1* geni metilasyonu anilin (-) sperm yüzdesi, normal morfoloji, sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı ile negatif korelasyon gösterirken ( $p \leq 0,002$ ); anilin (+) sperm yüzdesi ve *ERCC2* metilasyonu ile istatistiksel olarak anlamlı pozitif ve zayıf bir korelasyon gösterdi. OAT'lı infertil erkeklerdeki *XRCC1* metilasyon yüzdesi (%2,54, %95CI %1,85-5,12) normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşan kontrol grubuna (%1,63, %95CI %1,18-2,21) kıyasla daha yüksek olduğu bulundu ( $p=0,0056$ ).

*ERCC2* geni için çalışılan 81 örneğin (49 infertil birey, 32 normospermik/fertil/fertilitesi kanıtlanmış erkek) tamamında amplifikasyon gözlemlendi. *ERCC2* geni için belirlenen en düşük metilasyon yüzdesi "0" iken en yüksek metilasyon yüzdesi 0,39 olarak bulundu. *ERCC2* metilasyonu *XRCC1* metilasyonu ve semen hacmi arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir (sırasıyla  $p=0,027$  ve  $p=0,0172$ ). *ERCC2* metilasyonu çalışmada yer alan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi.

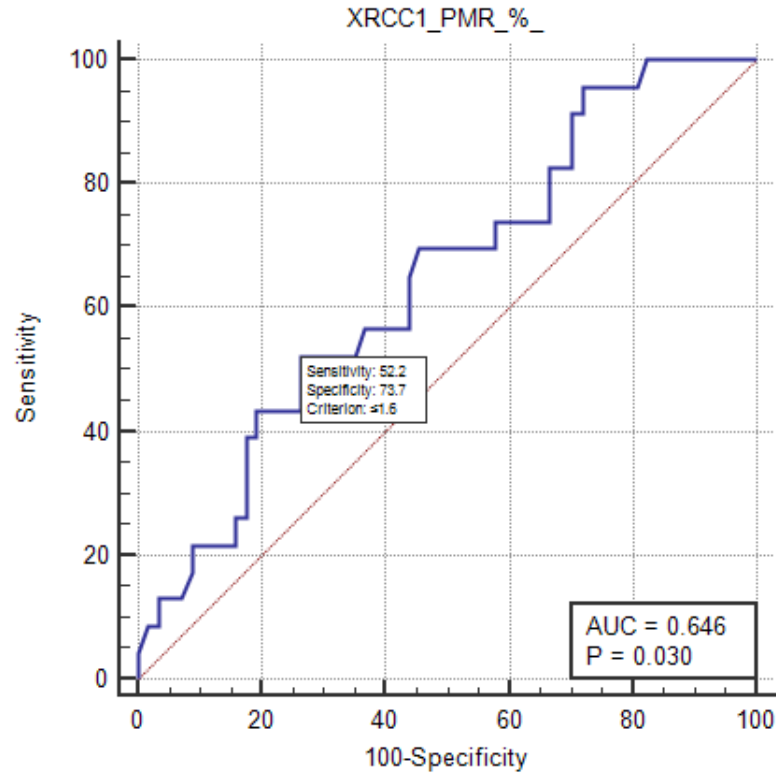
*XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin promotor metilasyonlarının oligoastenoteratopermik infertil erkekleri normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden ayırt etmekteki tahmin edici gücünü belirleyebilmek için ROC analizi yapıldı. ROC analizi sonuçlarına göre *XRCC1* metilasyonunun %83,7 duyarlılık ve %43,7 özgüllükteki eşik değerinin >1,43 olduğu belirlendi (p=0,002) (Şekil 13). *ERCC2* geni için yapılan ROC analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşılamadı (AUC= 0,579, p=0,2189).



**Şekil 13.** *XRCC1* promotor metilasyonu için ROC eğrisi (oligoastenoteratopermik ve normospermik/fertil/fertilitesi kanıtlanmış erkekler için)

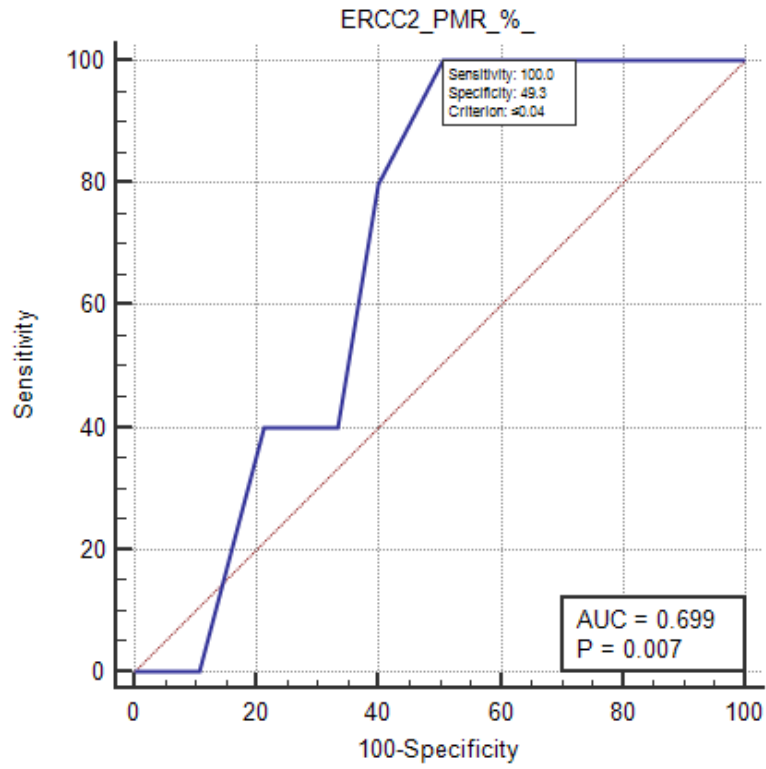


*XRCC1* metilasyonunun fertil ve normospermik erkekleri ayırt etmekteki tahmin edici gücü ROC analizi ile değerlendirildiğinde, *XRCC1* promotorunun metilasyon durumunun %52,2 duyarlılık ve %73,7 özgüllüğe sahip olduğu belirlendi (eşik değeri  $\leq 1,6$ ) ( $p=0,030$ ) (Şekil 14). *ERCC2* geni için yapılan ROC analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşılamadı ( $AUC= 0,593$ ,  $p=0,1677$ ).



Şekil 14. *XRCC1* promotor metilasyonu için ROC eğrisi (fertil ve normospermik erkekler için)

Normospermik ve fertilitesi kanıtlanmış erkekler arasındaki *XRCCI* ve *ERCC2* genlerinin promotor metilasyonunun ayırt edici gücünün ROC analizi ile değerlendirilmesi sonucu; *ERCC2* metilasyonu için %100 duyarlılık ve %49,3 özgüllükteki eşik değerin 0,04 olduğu belirlendi ( $p=0,007$ ) (Şekil 15). *XRCCI* geni için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşamadı ( $AUC= 0,661$ ,  $p=0,2825$ ).



Şekil 15. *ERCC2* promotor metilasyonu için ROC eğrisi (fertilitesi kanıtlanmış erkekler ve normospermikler için)

## 5. TARTIŞMA

Erkek fertilitesi son 50 yılda gelişmiş ve sanayileşmiş ülkelerde giderek azalmaktadır (Gunes ve ark., 2018b). Y-kromozomu mikrodelsiyonları, tek gen mutasyonları ve kromozomal anomaliler gibi genetik nedenlerin erkek infertilitesine neden olabileceği bilinmektedir. Ancak henüz keşfedilmeyen genetik ve epigenetik nedenlerin erkek infertilite olgularının azımsanmayacak bir yüzdesinden (%30) sorumlu olduğu düşünülmektedir (Neto ve ark., 2016a). Erkek infertilitesinin genetik nedenlerini belirleyebilmek testisin heterojen doğasından ve semenin epididimis, prostat ve seminal veziküller gibi farklı organların salgılarını içeren kompleks bir sıvı olmasından dolayı oldukça zordur (Krausz and Riera-Escamilla, 2018, Li ve ark., 2009). Erkeklerde infertilite tanısı genellikle semen analizi ile konulmaktadır, ancak semen analizinin erkek fertilitisini değerlendirmek için tek başına yeterli olmadığı bilinmektedir (Oehninger ve Ombet, 2019). Son yıllarda erkek fertilitésinin değerlendirildiği rutin uygulamalar arasında SDF analizlerinin de yer almasının faydalı olabileceğini belirten çalışmalar yayınlanmaktadır (Majzoub ve ark., 2017). SDF'nin spermatogenez sürecinde rol olan farklı onarım mekanizmalarının görevlerini tam olarak yerine getirememesi sonucunda oluşabileceği bildirilmektedir (Aitken ve De Iuliis, 2010, Caldecott, 2003). Ayrıca SDF gibi DNA hasar tiplerinin germ hücrelerindeki artışı spermatogenez bozukluklarına dolayısıyla da infertiliteye neden olabilir. Bu yüzden spermatogenez sürecinde DNA onarımının doğru ve etkin bir şekilde gerçekleşmesi gelişen germ hücrelerin kalitesi ve genomik bütünlüğü için oldukça önemlidir (Singh ve ark., 2019c).

Çalışmamızda OAT'lı bireylerin semen analizi sonuçları normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sperm konsantrasyonu, morfolojisi ve motilitesinin daha düşük olduğu ( $p < 0,0001$ ), diğer semen parametrelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi. Farklı infertilite fenotiplerine sahip olan bireyler ile normospermik, fertil ve/veya fertilitesi kanıtlanmış erkekler arasında semen analizi sonuçlarını değerlendiren çeşitli çalışmalara ait sonuçlar da bizim sonuçlarımız ile uyumludur (Bichara ve ark., 2019, Braham ve ark., 2019).

Kromatin kondensasyonundaki anomaliler; sperm DNA fragmantasyonu, düşük semen kalitesi, anormal epigenetik modifikasyonlar ve çeşitli infertilite

fenotipleri ile ilişkilendirilmektedir (Muratori ve De Geyter, 2018). Sperm kromatin kondensasyonunun anilin mavisi ile boyama yöntemi kullanılarak analiz edilmesinin erkeklerde fertilitenin değerlendirilmesine katkı sağlayabileceği bildirilmektedir (Auger ve ark., 1990). Sperm kromatin kondensasyonunun açıklanamayan erkek ve kadın infertilitesi ve/veya ılımlı erkek infertilitesi görülen çiftlerde hamilelik tahmininde kullanılabilmesi bildirilmektedir. Kromatin kondensasyon bozukluğunun [daha yüksek anilin (-) oranı] hamileliğin gerçekleştiği çiftlerden oluşan bir grupta, hamileliğin gerçekleşmediği gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Irez ve ark., 2018). Çalışmamızda OAT'lı 72 infertil bireye ait örneklerde anilin mavisi ile boyama sonucu toplamda 16454 spermatozoa değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucu anilin (+) sperm hücre yüzdesinin 16,4; anilin (intermediate) sperm hücre yüzdesinin 13,8 ve anilin (-) hücre yüzdesinin ise 69,8 olduğunu belirledik. Bu oranlar Ovari ve ark. (2010), tarafından oligospermili erkeklerde toplamda 58793 spermatozoanın sperm kromatin kondensasyonunu açısından değerlendirildiği çalışmanın bulguları ile uyumludur. Ovari ve ark. (2010)'nin çalışmalarında da en yüksek orana (%73,1) sahip olan spermatozoların anilin (-) spermatozolar ve en düşük orana (%5) sahip olanların ise anilin (+) sperm hücreleri olduğu bildirilmiştir (Óvári ve ark., 2010). OAT'lı bireylerden oluşan infertil hasta grubumuzda anilin mavisi ile boyanan sperm yüzdesi normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur ( $p=0,002$ ). İnfertil erkekler normospermik bireylere kıyasla sadece anilin (+) sperm hücrelerinin yüzdesinde değil anilin (-) ve anilin (intermediate) sperm yüzdesinde de istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir. Benzer sonuçlar, Braham ve ark. (2019), tarafından yapılan yakın tarihli bir çalışmadan da elde edilmiştir. Araştırmacılar teratozoospermik bireyleri içeren infertil hasta grubundaki sperm kromatin kondensasyon anamolilerinin fertil bireylerden oluşan kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Braham ve ark., 2019). Fertil kontrollerle karşılaştırıldığında intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) başarısızlığı gözlenen infertil hastaların daha yüksek sperm kromatin kondensasyon bozukluğuna sahip olduğu da Bichara ve ark. (2019), tarafından bildirilmiştir (Bichara ve ark., 2019). Bu sonuç da bizim çalışmamızdaki OAT'lı infertil hastaların fertilitesi kanıtlanmış erkeklere kıyasla daha yüksek kromatin kondensasyon bozukluğuna sahip olduğu sonucunu ( $p=0,002$ )

destekler niteliktedir. Çalışmamızda kromatin kondensasyon bozukluğu ile anormal morfoloji ve hareketsiz sperm yüzdesi arasında pozitif bir korelasyon belirlenirken; sperm konsantrasyonu ile negatif yönlü orta dereceli ve yaşla zayıf negatif bir korelasyon gözlenmiştir. Braham ve ark. (2019), klasik semen parametrelerinden sadece progresif motilite ve anilin (+) sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir; diğer semen parametreleri ve kromatin kondensasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulamadıklarını bildirmişlerdir (Braham ve ark., 2019). Bu durum araştırmacıların çalışma grubundaki erkeklerin infertilite fenotiplerinden sadece teratozoospermiyi içermesinden kaynaklanabilir olabilir, bizim çalışma grubumuzda oligospermi, astenospermi ve azospermi durumlarını birlikte barındıran OAT'lı infertil erkekler yer almıştır.

Sperm kromatin kondensasyon bozuklukların yanı sıra sperm DNA fragmantasyonu da infertil erkeklerde fertil erkeklerdekinden daha yüksektir (Atshan ve ark., 2019, Braham ve ark., 2019, Hassanen ve ark., 2019, Zini ve ark., 2001). Çalışmamızda OAT'lı infertil erkeklerdeki SDF değerinin normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkeklerden oluşan kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olması literatürü destekler niteliktedir. OAT'lı erkekler yalnızca normospermik erkeklerle karşılaştığında da SDF değeri infertil erkeklerde daha yüksek bulunmuştur ( $p=0,0001$ ). Fakat ilginç olarak normospermik erkeklerdeki SDF değeri fertilitesi kanıtlanmış erkeklerdekine göre daha düşük bulunmuştur ( $p=0,0109$ ). Fertilitesi kanıtlanmış erkeklerde SDF değerinin daha yüksek olması, bu bireylerin normospermiklerden farklı SDF nedenlerine sahip olma ihtimallerinden kaynaklanıyor olabilir. SDF ile klasik semen parametrelerinden motilite, vitalite, morfoloji ve konsantrasyonun ilişkili olduğu literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (Alargkof ve ark., 2019, Braham ve ark., 2019, Kabartan ve ark., 2019, Le ve ark., 2019, Zini ve ark., 2001). Çalışmamızda SDF ile anormal morfoloji ve hareketsiz sperm yüzdesi arasında pozitif korelasyon; semen hacmi, sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı arasında ise negatif bir korelasyon olduğunun bulunması literatürü destekler niteliktedir. Çalışmamızda SDF ile sperm kromatin kondensasyon bozukluğu arasında pozitif bir korelasyon olduğunun bulunması Atshan ve ark. (2019), tarafından yapılan çalışmayı tutarlı hale getirmektedir (Atshan ve ark., 2019). Sperm kromatin kondensasyonundaki bozukluğun bir göstergesi olan anilin (+) sperm yüzdesi SDF ile istatistiksel olarak

anlamalı pozitif yönde bir korelasyon göstermiştir.

Çalışmamızda SDF ve yaş arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan negatif bir ilişki olduğunun belirlenmesi Kabartan ve ark. (2019)'nin çalışmaları ile uyumlu iken; Colasente ve ark. (2019) ve Guo ve ark. (2019)'nin çalışmaları ile uyumlu değildir (Colasente ve ark., 2018, Guo ve ark., 2019, Kabartan ve ark., 2019). Bunun nedeni çalışma grubumuzun Kabartan ve ark. (2019)'nin çalışma grubuyla benzerlik gösterirken; Colasente ve ark. (2019) ve Guo ve ark. (2019)'nin çalışma gruplarından farklı özellikte olması olabilir.

DNA fragmentasyonunun imprinted genlerin (*IGF2* ve *KCNQ1*) metilasyon durumlarındaki değişiklikler ile ilişkili olduğu son zamanlarda yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (Ni ve ark., 2019). DNA yanlış eşleşme onarım genlerinin metilasyonunun erkek infertilitesine neden olabileceği daha önce yayınlanan bir çalışmamızda belirtilmiştir (Gunes ve ark., 2018a). Bu çalışmada DNA baz ve nükleotit kesip çıkarma onarımında rol oynayan *XRCCI* ve *ERCC2* genlerinin metilasyon durumlarının SDF ve kromatin kondensasyonu üzerine olan etkisini araştırdık. Fare ve insanların testis dokularında yüksek düzeyde eksprese edilen *XRCCI* geninin ekspresyonu normal yetişkin testisi ve infertil bireyin testisi arasında farklılık göstermektedir (Garcia-Rodriguez ve ark., 2018, Singh ve ark., 2019c, Walter ve ark., 1994). *XRCCI* genindeki tek nükleotit polimorfizmleri ile DNA onarım kapasitesi, SDF, semen parametreleri veya erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi değerlendiren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Garcia-Rodriguez ve ark., 2018, Ghasemi ve ark., 2017, Zheng ve ark., 2012, Ji ve ark., 2010). Bu çalışmalardan sadece birinde *XRCCI* polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ya da SDF üzerinde istatistiksel olmayan bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Zheng ve ark., 2012). *XRCCI* gen metilasyonunun erkek infertilitesi, SDF ve/veya kromatin kondensasyonu ile ilişkisini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamızda *XRCCI* geninin promotor metilasyonu ile klasik semen parametreleri, infertilite, SDF ve kromatin kondensasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. OAT'lı infertil erkekler kontrol grubuyla (normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkekler) karşılaştırıldığında *XRCCI* geninin promotor metilasyonunun infertil erkeklerde daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p=0,0056$ ). Fakat kontrol grubunda yer alan normospermik, fertil ve fertilitesi kanıtlanmış erkekler infertil erkeklerle ayrı ayrı karşılaştırıldığında elde edilen farklılık istatistiksel anlamlılığa

ulaşamamıştır. *XRCCI* geninin promotor metilasyonunun infertil grupta farklılık göstermesi Gunes ve ark. (2018), tarafından yapılan ve yanlış eşleşme onarım genlerinden *MLHI*'in promotor metilasyonunun oligospermiklerden oluşan infertil hasta grubunda farklılık gösterdiği çalışmayla tutarlılık göstermektedir (Gunes ve ark., 2018a). *XRCCI* metilasyonu ile normal morfoloji, sperm konsantrasyonu ve toplam sperm miktarı arasından istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon bulunmuştur. *MLHI* metilasyonu ile semen parametrelerinden sadece sperm konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Gunes ve ark., 2018a). Zheng ve ark. (2012), *XRCCI*'in uzayan spermatidlerin erken aşamalarında eksprese edildiği, bu hücrelerde kromatin yeniden şekillenmesinde görev aldığı ve bu sırada onarım kapasitesine sahip olduğunu bildirmektedir. Çalışmamızda elde edilen *XRCCI*'in sperm kondensasyon bozukluğu [anilin (+) sperm hücre yüzdesi] ile pozitif bir ilişkiye sahip olduğu bulgusu Zheng ve ark. (2012)'yi destekler niteliktedir (Zheng ve ark., 2012). İnfertil erkeklerin testislerinde *XRCCI* geninin ekspresyonunun azalması ve DNA hasarını belirten  $\gamma$ -H2 AX seviyesinin artmasından dolayı, *XRCCI*'in ekspresyonundaki artışın DNA hasarındaki artışla sonuçlanabileceği bildirilmektedir (Singh ve ark., 2019c). Çalışmamızda *XRCCI* geninin promotor metilasyonu ile SDF arasında anlamlı bir ilişki bulunamaması; *XRCCI* geni tek nükleotit polimorfizmlerinin SDF üzerinde bir etkiye sahip olmadığını belirten Zheng ve ark. (2012)'nin çalışması ve Kabartan ve ark. (2019)'nin DNA onarım genleri *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin metilasyonu ile SDF arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunmadığını belirttikleri çalışma ile uyumludur (Kabartan ve ark., 2019, Zheng ve ark., 2012). Çalışmamızda *XRCCI* gen metilasyonu ile yaş arasında bir ilişki bulunamamıştır. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin metilasyonu ile yaş arasında da bir ilişki bulunamamıştır (Kabartan ve ark., 2019).

Nükleotit kesip çıkarma onarımında rol oynayan *ERCC2* geni testiste ekspresyonu yüksek olan bir gendir. *ERCC2* geninin tek nükleotit polimorfizmleri ve idiyopatik erkek infertilitesi arasındaki ilişki genellikle aynı polimorfizm (Lys751Gln) için sınırlı sayıda çalışma ile araştırılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında idiyopatik infertilite riski ve *ERCC2* polimorfizm(ler)i ilişkili bulunurken, bazılarında bulunmamıştır (Gu ve ark., 2007, Ji ve ark., 2008). Gu ve ark. (2010), tarafından yapılan iki farklı çalışmada ise *ERCC2* Lys751Gln polimorfizmi ile SDF arasında bir ilişki bulunmadığı belirtilmiştir (Gu ve ark., 2010a, Gu ve ark., 2010b). Ancak son

zamanlarda Singh ve ark. (2019), tarafından yapılan bir çalışmada *ERCC2* 751A>C tek nükleotit polimorfizminin AA genotipinin Asya kökenli erkeklerde infertilite riskini (azospermi) artırdığı bildirilmiştir (Singh ve ark., 2019a). Bizim çalışmamızda infertil erkekler ve kontroller arasında *ERCC2* geninin promotor metilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. *ERCC2* metilasyonu ile semen hacmi ve *XRCC1* metilasyonu arasında pozitif yönde bir korelasyon bulunmuştur (sırasıyla  $p=0,0172$ ,  $p=0,027$ ). *ERCC2* metilasyonu ile SDF arasında bir ilişki bulunamaması Kabartan ve ark. (2019)'nin çalışmasını tutarlı hale getirmektedir (Kabartan ve ark., 2019). *XRCC1* geninin promotor metilasyonu ile infertilite ve SDF arasında bulunan anlamlı korelasyonun *ERCC2* geni için bulunamamasının nedeni; *XRCC1* genine ait sadece bir transkript varyantı bulunurken *ERCC2* genine ait 4'ü uzun 11'i trunkat olmak üzere toplam 15 transkript varyantı bulunmasından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda DNA onarım genlerinin metilasyon durumları ile erkek infertilitesi, sperm DNA fragmantasyonu, sperm çekirdeğinin kromatin kondensasyonu ve klasik semen parametreleri arasındaki ilişki ortaya konulmuştur.

Çalışmamızın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. DNA metilasyon analizinde kullanılan methylight yönteminin yarı-kantitatif bir yöntem olması, metilasyon analizlerinin duplike olarak gerçekleştirilememesi, TUNEL analizinin floresan mikroskopta sayımdan daha kesin ve doğru sonuç verebilecek flow sitometri ile yapılamaması, çalışmada yer alan örnek sayısının sınırlı olması bu sınırlılıklardan bazılarıdır. Diğer bir sınırlılık ise çalışma için sahip olduğumuz bütçenin yeterli olmamasından dolayı her bir onarım yolağı için sadece bir gen çalışabilmemizdir. Hem BER hem de NER'de yer alan çok sayıda gen bulunmaktadır. Bu yolaklarda rol alan daha fazla sayıda geni çalışmak daha bilgi verici olacaktır. Tüm bu sınırlılıklara rağmen çalışmamız baz ve nükleotit kesip çıkarma onarım yolaklarında yer alan *XRCC1* ve *ERCC2* genlerinin metilasyon durumları ile sperm DNA fragmantasyonu ve sperm kromatin kondensasyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile BER yolağında rol oynayan *XRCCI* ve NER yolağında rol oynayan *ERCC2* genlerinin promotor metilasyonu ile sperm DNA fragmentasyonu ve sperm kromatin kondensasyonu arasındaki ilişki ilk defa incelenmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen veriler *XRCCI* ve *ERCC2* genlerinin promotor bölgelerindeki metilasyon ile SDF arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir ( $p>0,05$ ). Ancak *XRCCI* gen metilasyonunun infertile ( $n=49$ ) ve normospermik/fertil bireylerde ( $n=27$ ) farklılık gösterdiği ve *XRCCI* metilasyonu ile sperm kromatin kondensasyonunun ilişkili olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ). Sperm kromatin kondensasyonunun hem *XRCCI* metilasyonu hem de SDF ile ilişkili olması ( $p<0,05$ ) daha fazla sayıda örnekle ve yarı-kantitatif bir yöntem yerine kantitatif bir yöntemle çalışmanın istatistiki olarak anlamlı bir sonuca ulaşmaya yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

Erkek infertilitesi alanında uzman olan androloglardan bazılarının SDF analizlerinin rutin uygulamalar arasında yer almasının faydalı olabileceği yönündeki önerilerine karşı görüşte olanlar da bulunmaktadır. DNA fragmentasyonu olan ve olmayan sperm hücrelerinin yumurtayı aynı etkinlikte dölleyebildiği bilinmektedir. Fakat hasarlı DNA taşıyan spermle dölleme sonucunda düşük ve embriyo gelişiminde azalma gibi olumsuz durumların yaşanabileceği de bildirilmektedir. SDF'in sperm kromatin kondensasyonu ile ilişkili olması ve sperm kromatin bütünlüğünün de germ hücrelerin gelişimi ve kalitesi için oldukça önemli olduğu düşünüldüğünde, SDF konusunda daha iyi tekniklerle ve daha fazla sınırlandırılmış çalışma gruplarında çalışmanın daha bilgi verici olacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Aftab A, Varma T. R, Kar B. A rare case of de novo balanced reciprocal Y:1 chromosomal translocation in patient presenting with azoospermia. *Andrologia*, 2019;51:e13246.
- Agarwal A, Majzoub A, Esteves S. C, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, 2016;5:935.
- Agarwal A, Sharma R, Ahmad G. Sperm chromatin assessment. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, Fifth Edition. CRC Press. 2017.
- Ahmed E. A, De Boer P, Philippens M. E, Kal H. B, De Rooij D. G. Parp1–XRCC1 and the repair of DNA double strand breaks in mouse round spermatids. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2010;683:84-90.
- Aitken R. J, Baker M. A. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol*, 2013;57:265-72.
- Aitken R. J, De Iuliis G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2010;16:3-13.
- Aksglaede L, Juul A. Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol*, 2013;168:R67-76.
- Alargkof V, Kersten L, Stanislavov R, Kamenov Z, Nikolinakos P. Relationships between sperm DNA integrity and bulk semen parameters in Bulgarian patients with varicocele. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*, 2019;91.
- Andreassen A, Steffensen I. L, Olsen A. K, Tanaka K, Wiger R. Spermatogenesis Is Not Impaired in a Nucleotide Excision Repair–Deficient Min Mouse Model With or Without Neonatal Mutagen Treatment. *Journal of Andrology*, 2011;32:541-549.
- Atshan M, Kakavand K, Hosseini S. H, Sadighi Gilani M. A. Mohseni Meybodi, A. Sabbaghian, M. Evaluation of sperm DNA fragmentation and chromatin structure in infertile men with immotile short-tail sperm defect. *Andrologia*, 2019; e13445.
- Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune J. P. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl*, 1990;13:452-62.
- Ayensu-Coker L, Bishop C, Rohozinski J. The Structure of the Y Chromosome and Its Role in Male Infertility. *The Genetics of Male Infertility*. Springer. 2007.
- Baarends W. M, Van Der Laan R, Grootegoed J. A. DNA repair mechanisms and

- gametogenesis. *Reproduction*, 2001;121:31-39.
- Balasar O, Zamani A. G, Balasar M. Acar H. Male infertility associated with de novo pericentric inversion of chromosome 1. *Turk J Urol*, 2017;43:560-562.
- Beard W. A, Horton J. K, Prasad R, Wilson S. H. Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism. *Annu Rev Biochem*, 2019;88:137-162.
- Bellacosa A. Drohat A. C. Role of base excision repair in maintaining the genetic and epigenetic integrity of CpG sites. *DNA Repair (Amst)*, 2015;32:33-42.
- Berglund A, Johannsen T. H, Stochholm K, Aksglaede L. Fedder, J., Viuff, M. H., Main, K. M. Gravholt, C. H. Incidence, prevalence, diagnostic delay, morbidity, mortality and socioeconomic status in males with 46,XX disorders of sex development: a nationwide study. *Hum Reprod*, 2017;32:1751-1760.
- Beyaz C. C, Gunes S, Onem K, Kulac T. Asci R. Partial Deletions of Y-Chromosome in Infertile Men with Non-obstructive Azoospermia and Oligoasthenoteratozoospermia in a Turkish Population. *In Vivo*, 2017;31:365-371.
- Bichara C, Berby B, Rives A, Jumeau F, Letailleur M, Setif V, Sibert L, Rondanino C, Rives N. Sperm chromatin condensation defects, but neither DNA fragmentation nor aneuploidy, are an independent predictor of clinical pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2019;36:1387-1399.
- Black J. O. Xeroderma pigmentosum. *Head and Neck Pathology*, 2016;10:139-144.
- Boboila C, Oksenysh V, Gostissa M, Wang J. H, Zha S, Zhang Y, Chai H, Lee C. S, Jankovic M. Saez L. M. A. Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012;109:2473-2478.
- Boissonnas C. C, Jouannet P. Jammes H. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertility and Sterility*, 2013;99:624-631.
- Boroujeni P. B, Sabbaghian M, Totonchi M, Sodeifi N, Sarkardeh H, Samadian A, Sadighi-Gilani M. A, Gourabi H. Expression analysis of genes encoding TEX11, TEX12, TEX14 and TEX15 in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia. *JBRA Assist Reprod*, 2018;22:185-192.
- Bounartzi T, Dafopoulos K, Anifandis G, Messini C. I, Koutsonikou C, Kouris S, Satra M, Sotiriou S, Vamvakopoulos N, Messinis I. E. Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI-ET patients. *Hum Fertil (Camb)*, 2016;19:56-62.
- Bracke A, Peeters K, Punjabi U, Hoogewijs D, Dewilde S. A search for molecular

- mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online*, 2018;36:327-339.
- Braham A, Ghedir H, Zidi I, Sallem A, Hajlaoui A, Ajina M, Saad A, Ibala-Romdhane S. Nuclear sperm quality in total polymorphic teratozoospermia and its impact on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Andrologia*, 2019;51:e13252.
- Brem R, Hall J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2005;33:2512-20.
- Brooks S. C, Adhikary S, Rubinson E. H, Eichman B. F. Recent advances in the structural mechanisms of DNA glycosylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2013;1834:247-271.
- Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod*, 2007;22:174-9.
- Caldecott K. W. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA repair*, 2003;2:955-969.
- Caldecott K. W. XRCC1 Protein; Form and Function. *DNA repair*, 2019;102664.
- Cannarella R, Condorelli R. A, Duca Y, La Vignera S, Calogero A. E. New insights into the genetics of spermatogenic failure: a review of the literature. *Hum Genet*, 2019a;138:125-140.
- Cannarella R, Condorelli R. A, Duca Y, La Vignera S, Calogero A. E. New insights into the genetics of spermatogenic failure: a review of the literature. *Human Genetics*, 2019b;138:125-140.
- Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, Siffroi J. P. Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod*, 2007;13:55-9.
- Chen D, Yu Z, Zhu Z, Lopez C. D. E2F1 regulates the base excision repair gene XRCC1 and promotes DNA repair. *J Biol Chem*, 2008;283:15381-9.
- Chen H, Pu X. Y, Zhang R. P, Zhou Cun A. Association of common SNP rs1136410 in PARP1 gene with the susceptibility to male infertility with oligospermia. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2014;31:1391-1395.
- Cheon N. Y, Kim H. S, Yeo J. E, Schärer O. D, Lee J. Y. Single-molecule visualization reveals the damage search mechanism for the human NER protein XPC-RAD23B. *Nucleic Acids Research*, 2019;47:8337-8347.
- Cheung S, Parrella A, Rosenwaks Z, Palermo G. D. Genetic and epigenetic profiling of the infertile male. *Plos One*, 2019;14:e0214275.

- Colaco S, Modi D, Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018;16:14.
- Colasante A, Minasi M. G, Scarselli F, Casciani V, Zazzaro V, Ruberti A, Greco P, Varricchio M. T, Greco E. The aging male: Relationship between male age, sperm quality and sperm DNA damage in an unselected population of 3124 men attending the fertility centre for the first time. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*, 2018;90:254-259.
- Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B. TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia*, 2006;38:122-7.
- Colombo R, Pontoglio A, Bini M. Two Novel TEX15 Mutations in a Family with Nonobstructive Azoospermia. *Gynecol Obstet Invest*, 2017;82:283-286.
- Cortellino S, Turner D, Masciullo V, Schepis F, Albino D, Daniel R, Skalka A. M, Meropol N. J, Alberti C, Larue L, Bellacosa A. The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003;100:15071-6.
- Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernandez J. L, Gosalvez J, Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet*, 2012;29:213-23.
- Dana M, Stoian V, Association of pericentric inversion of chromosome 9 and infertility in romanian population. *Maedica (Buchar)*, 2012;7:25-9.
- Davis A. J, Chen B. P, Chen D. J. DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA repair*, 2014;17:21-29.
- Davis S. M, Rogol A. D, Ross J. L. Testis Development and Fertility Potential in Boys with Klinefelter Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2015;44:843-65.
- De Souza D. A. S, Fauz F. R, Pereira-Ferrari L, Sotomaior V. S. Raskin S. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Andrology*, 2018;6:127-135.
- Dode C, Hardelin J. P. Clinical genetics of Kallmann syndrome. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2010;71:149-57.
- Donker R, Vloeberghs V, Groen H, Tournaye H, Van Ravenswaaij-Arts C, Land J. Chromosomal abnormalities in 1663 infertile men with azoospermia: the clinical consequences. *Human Reproduction*, 2017;32:2574-2580.
- Eads C. A, Danenberg K. D, Kawakami K, Saltz L. B, Blake C, Shibata D, Danenberg P. V, Laird P. W. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic acids research*, 2000;28:e32-00.

- El-Domyati M. M, Al-Din A-B. M, Barakat M. T, El-Fakahany H. M, Honig S, Xu J, Sakkas D. The expression and distribution of deoxyribonucleic acid repair and apoptosis markers in testicular germ cells of infertile varicocele patients resembles that of old fertile men. *Fertility and sterility*, 2010; 93:795-801.
- Elinati E, Fossard C, Okutman O, Ghedir H, Ibala-Romdhane S, Ray P. F, Saad A, Hennebicq S, Viville S. A new mutation identified in SPATA16 in two globozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet*, 2016;33:815-20.
- Esteves S. C. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *International braz j urol*, 2014;40:433-453.
- Esteves S. C. Roque M, Garrido N. Use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with high sperm DNA fragmentation: a SWOT analysis. *Asian J Androl*, 2018;20:1-8.
- Evenson D. P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal reproduction science*, 2016;169:56-75.
- Fan L, Fuss J. O, Cheng Q. J, Arvai A. S, Hammel M, Roberts V. A, Cooper P. K, Tainer J. A. XPD helicase structures and activities: insights into the cancer and aging phenotypes from XPD mutations. *Cell*, 2008;133:789-800.
- Feng J, Wu X, Zhang Y, Yang X, Ma G, Chen S, Luo S, Zhang Y. A novel mutation (-195C>A) in the promoter region of CFTR gene is associated with Chinese Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD). *Gene*, 201p;719:144007.
- Ferlin A, Dipresa S, Foresta C. *Genetic Testing in Male Infertility. Human Reproductive and Prenatal Genetics*. Elsevier, 2019.
- Fernández J. L, Muriel L, Rivero M. T, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez J. G. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, 2003;24:59-66.
- Ferri D, Orioli D, Botta E. Heterogeneity and overlaps in nucleotide excision repair disorders. *Clin Genet*, 2019.
- Flannigan R, Schlegel P. N. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017;44:26-37.
- Fujihara Y, Oji A, Larasati T, Kojima-Kita K, Ikawa M. Human Globozoospermia-Related Gene Spata16 Is Required for Sperm Formation Revealed by CRISPR/Cas9-Mediated Mouse Models. *Int J Mol Sci*, 2017;18.
- Galetzka D, Weis E, Kohlschmidt N, Bitz O, Stein R, Haaf T. Expression of somatic

- DNA repair genes in human testes. *J Cell Biochem*, 2007;100:1232-9.
- Gannon J. R, Emery B. R, Jenkins T. G, Carrell D. T. The sperm epigenome: implications for the embryo. *Genetic Damage in Human Spermatozoa*. Springer 2014.
- Garcia-Rodriguez A, De La Casa M, Serrano M, Gosálvez J. Roy Barcelona, R. Impact of polymorphism in DNA repair genes OGG1 and XRCC1 on seminal parameters and human male infertility. *Andrologia*, 2018;50:e13115.
- García-Rodríguez A, Gosálvez J, Agarwal A, Roy R. Johnston S. DNA Damage and repair in human reproductive cells. *International journal of molecular sciences*, 2019;20:31.
- Ghasemi H, Khodadadi I, Fattahi A, Moghimbeigi A, Tavailani H. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and LIG4 and idiopathic male infertility. *Syst Biol Reprod Med*, 2017;63:382-390.
- Ghorbel M, Baklouti-Gargouri S, Elghazel H, Zribi N, Ben Abdallah F, Cherif M, Fakhfakh F, Saad A, Ammar-Keskes L. Pericentric inversion of chromosom 12 [Inv (12) (p12q12)] associated with idiopathic azoospermia in one infertile Tunisian man. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013;432:472-4.
- Giordano T, Gadadhar S, Bodakuntla S, Straub J, Leboucher S, Martinez G, Chemlali W, Bosc C, Andrieux A, Bieche I, Arnoult C, Geime S, Janke C. Loss of the deglutamylase CCP5 perturbs multiple steps of spermatogenesis and leads to male infertility. *J Cell Sci*, 2019; 132.
- Gonzalez-Marin C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci*, 2012;13:14026-52.
- Grégoire M.C, Leduc F, Boissonneault G. Spermiogenesis in sperm genetic integrity. *Sperm Chromatin*. Springer; 2011.
- Gu A, Ji G, Liang J, Xia Y, Lu N, Wu B, Wang W, Song L, Wang S, Wang X. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and the risk of idiopathic azoospermia in a Chinese population. *International journal of molecular medicine*, 2007;20:743-747.
- Gu, A, Ji G, Zhou Y, Long Y, Shi X, Fu G, Wang S, Song L. Wang X. Polymorphisms of nucleotide-excision repair genes may contribute to sperm DNA fragmentation and male infertility. *Reprod Biomed Online*, 2010a;21:602-9.
- Gu A, Ji G, Zhu P, Zhou Y, Fu G, Xia Y, Song L, Wang S. Wang. X. Nucleotide excision repair polymorphisms, polycyclic aromatic hydrocarbon exposure, and their effects on sperm deoxyribonucleic acid damage and male factor infertility. *Fertil Steril*, 2010b;94:2620-5 e1-5.

- Gunes S, Agarwal A, Henkel R, Mahmutoglu A, Sharma R, Esteves S, Aljowair A, Emirzeoglu D, Alkhani A, Pelegrini L. Association between promoter methylation of MLH 1 and MSH 2 and reactive oxygen species in oligozoospermic men—A pilot study. *Andrologia*, 2018a;50:e12903.
- Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online*, 2015;31:309-19.
- Gunes S, Kulac T. The role of epigenetics in spermatogenesis. *Turk J Urol*, 2013;39:181-7.
- Gunes S, Metin Mahmutoglu A, Arslan M. A. Henkel, R. Smoking-induced genetic and epigenetic alterations in infertile men. *Andrologia*, 2018b; 50:e13124.
- Gunes S, Sertyel S. Sperm DNA Damage and Oocyte Repair Capability. *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Springer 2018.
- Gunes, S. O, Metin Mahmutoglu, A, Agarwal, A. Genetic and epigenetic effects in sex determination. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 2016;108(4):321-336.
- Gunes, S, Mahmutoglu, A. M. Transcriptomics and Oxidative Stress in Male Infertility. In *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction 2019*;249-260. Academic Press.
- Guo L. Y, Zhou H, Liu M, Li Q. Sun, X. F. Male age is more critical to sperm DNA integrity than routine semen parameters in Chinese infertile males. *Andrologia*, 2019; e13449.
- Hamad M. F, Shelko N, Kartarius S, Montenarh M. Hammadeh, M. E. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrology*, 2014;2:666-77.
- Hamada A. J, Esteves S. C, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*, 68 Suppl 2013;1:39-60.
- Hammadeh M, Hamad M, Montenarh M, Fischer-Hammadeh C. Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Human reproduction*, deq226 2010.
- Hammadeh M, Zeginiadv T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Archives of andrology*, 2001;46:99-104.
- Hao S. L, Ni F. D, Yang W. X. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, 2019;706:201-210.
- Hassanen E, Elqusi K, Zaki H, Henkel R, Agarwal A. TUNEL assay: Establishing a



- sperm DNA fragmentation cut-off value for Egyptian infertile men. *Andrologia*, 2019; e13375.
- Herlihy A. S, Melachlan R. I. Screening for Klinefelter syndrome. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*, 2015;22:224-229.
- Herman J. G, Graff J. R, Myöhänen S, Nelkin B. D, Baylin S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1996;93, 9821-9826.
- Hermann B. P, Cheng K, Singh A, Roa-De La Cruz L, Mutoji K. N, Chen I. C, Gildersleeve H, Lehle J. D, Mayo M, Westernstroer B, Law N. C, Oatley M. J, Velte E. K, Niedenberger B. A, Fritze D, Silber S, Geyer C. B, Oatley J. M, Mccarrey J. R. The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. *Cell Rep*, 2018;25:1650-1667 e8.
- Holstein A. F, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003;1:107.
- Hotaling J. M. Genetics of male infertility. *Urol Clin North Am*, 2014; 41:1-17.
- Houten B V, Kuper J, Kisker C. Role of XPD in cellular functions: To TFIIH and beyond. *DNA Repair (Amst)*, 2016;44:136-142.
- Hsia K. T., Millar M. R, King S, Selfridge J, Redhead N. J, Melton D. W. Saunders, P. T. DNA repair gene *Ercc1* is essential for normal spermatogenesis and oogenesis and for functional integrity of germ cell DNA in the mouse. *Development*, 2003;130:369-78.
- Ichioka K, Yoshimura K, Honda T, Takahashi A. Terai, A. Paracentric inversion of chromosome 7(q22-31) associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*, 2005;83:455-6.
- Intasqui P, Camargo M, Del Giudice P. T, Spaine D. M, Carvalho V. M, Cardozo K. H, Cedenho A. P, Bertolla R. P. Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet*, 2013a;30:1187-202.
- Intasqui P, Camargo M, Del Giudice P. T, Spaine D. M, Carvalho V. M, Cardozo K. H, Zylbersztejn D. S, Bertolla R. P. Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma. *BJU Int*, 2013b;112:835-43.
- Irez, T, Dayioglu N, Alagöz M, Karatas S, Güralp O. The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. *Andrologia*, 2018;50:e13111.
- Jenkins T. G, Aston K. I, James E. R, Carrell D. T. Sperm epigenetics in the study of

- male fertility, offspring health, and potential clinical applications. *Syst Biol Reprod Med*, 2017;63:69-76.
- Ji G, Gu A, Xia Y, Lu C, Liang J, Wang S, Ma J, Peng Y, Wang X. ERCC1 and ERCC2 polymorphisms and risk of idiopathic azoospermia in a Chinese population. *Reprod Biomed Online*, 2008;17:36-41.
- Ji G, Gu A, Zhu P, Xia Y, Zhou Y, Hu F, Song L, Wang S, Wang X. Joint effects of XRCC1 polymorphisms and polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on sperm DNA damage and male infertility. *Toxicol Sci*, 2010;116:92-8.
- Jia C, Li L, Chen S, Li D, Wang X, Liu R, Zhang H. Cytogenetic and molecular characterization of an oligoasthenozoospermia male carrier of an unbalanced Y;22 translocation: A case report. *Medicine (Baltimore)*, 2019;98: e15209.
- Kabartan E, Gunes S, Arslan M. A, Asci R. Investigating the relationship between BRCA1 and BRCA2 genes methylation profile and sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrologia*, 2019; e13308.
- Kang Y. J, Yan C. T. Regulation of DNA repair in the absence of classical non-homologous end joining. *DNA repair*, 2018;68:34-40.
- Kennedy E. E, Caffrey P. J, Delaney S. Initiating base excision repair in chromatin. *DNA Repair (Amst)*, 2018;71:87-92.
- Kitsera N, Rodriguez-Alvarez M, Emmert S, Carell T, Khobta A. Nucleotide excision repair of abasic DNA lesions. *Nucleic Acids Rs*, 2019..
- Kobaisi F, Fayyad N, Rezvani H, Fayyad-Kazan M, Sulpice E, Badran B, Fayyad-Kazan H, Gidrol X, Rachidi W. Signaling Pathways, Chemical and Biological Modulators of Nucleotide Excision Repair: The Faithful Shield against UV Genotoxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Kokic G, Chernev A, Tegunov D, Dienemann C, Urlaub H, Cramer P. Structural basis of TFIIH activation for nucleotide excision repair. *Nat Commun*, 2019;10: 2885.
- Krausz C, Cioppi F, Riera-Escamilla A. Testing for genetic contributions to infertility: potential clinical impact. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018;18:331-346.
- Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nature reviews Urology*, 2018;15:369.
- Krokan H. E, Bjoras M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013;5:a012583.
- Kuang W. The Initial Consultation for male infertility. *Male Infertility*. Springer 2011.
- Kubota Y, Shimizu S, Yasuhira S, Horiuchi S. SNF2H interacts with XRCC1 and is

- involved in repair of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage. *DNA repair*, 2016;43:69-77.
- Kurdyukov S, Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology*, 2016;5: 3.
- Kusakabe M, Onishi Y, Tada H, Kurihara F, Kusao K, Furukawa M, Iwai S, Yokoi M, Sakai W, Sugasawa K. Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair. *Genes Environ*, 2019; 41:2.
- Laqqan M, Hammadeh M. E. Aberrations in sperm DNA methylation patterns of males suffering from reduced fecundity. *Andrologia*, 2018; 50.
- Laurentino S, Beygo J, Nordhoff V, Kliesch S, Wistuba J, Borgmann J, Buiting K, Horsthemke B, Gromoll J. Epigenetic germline mosaicism in infertile men. *Hum Mol Genet*, 2015;24:1295-304.
- Le M. T., Nguyen, T. A. T., Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, V. T., Le, D. D., Nguyen, V. Q. H. Cao, N. T. Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reproductive medicine and biology*, 2019;18:390-396.
- Leduc, F, Nkoma G. B, Boissonneault G. Spermiogenesis and DNA repair: a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Systems biology in reproductive medicine*, 2008;54:3-10.
- Li H.G, Huang S.Y, Zhou H, Liao A.H, Xiong C.L. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. *Asian journal of andrology*, 2009;11:03.
- Licchesi J. D, Herman J. G. Methylation-specific PCR. *DNA Methylation*. Springer 2009.
- Limpose K. L, Corbett A. H. Doetsch P. W. BERing the burden of damage: Pathway crosstalk and posttranslational modification of base excision repair proteins regulate DNA damage management. *DNA Repair (Amst)*, 2017;56:51-64.
- Lindsey-Boltz L. A, Kemp M. G, Hu J. Sancar, A. Analysis of Ribonucleotide Removal from DNA by Human Nucleotide Excision Repair. *J Biol Chem*, 2015;290:29801-7.
- Lipshultz L. I, Howards S. S, Niederberger C. S. *Infertility in the Male*, 2009, Cambridge University Press.
- Liu Y, Zhu H, Zhang X, Hu T, Zhang Z, Wang J, Lai Y, Zheng J, Xie D, Xia B, Qin, L, Xie L, Liu S, Wang H. Sun, H. Infertility in a man with oligoasthenozoospermia associated with mosaic chromosome 22q11 deletion. *Mol Genet Genomic Med*, 2018;6:1249-1254.

- Livak K. J, Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods*, 2001;25:402-408.
- Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K, Konstantelli M, Messinis I. Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *International journal of andrology*, 1996;19:23-27.
- Lopategui D. M, Griswol, A. J, Arora H, Clavijo R. I, Tekin M, Ramasamy R. A rare ANOS1 variant in siblings with Kallmann syndrome identified by whole exome sequencing. *Andrology*, 2018;6:53-57.
- Majzoub A, Agarwal A, Cho C. L, Esteves S. C. Sperm DNA fragmentation testing: a cross sectional survey on current practices of fertility specialists. *Transl Androl Urol*, 2017;6:S710-S719.
- Mao S, Goodrich R. J, Hauser R, Schrader S. M, Chen Z, Krawetz S. A. Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling. *Syst Biol Reprod Med*, 2013;59:287-95.
- Marchetti F, Bishop J, Gingerich J, Wyrobek A. J. Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair. *Sci Rep*, 2015;5:7689.
- Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek A. J. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007;104:17725-17729.
- Marteijn J. A, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers J. H. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2014;15:465-481.
- Matsumoto S, Fischer E. S, Yasuda T, Dohmae N, Iwai S, Mori T, Nishi R, Yoshino K, Sakai W, Hanaoka F, Thoma N. H, Sugawara K. Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *Nucleic Acids Res*, 2015;43:1700-13.
- Mayeur A, Ahdad N, Hesters L, Brisset S, Romana S, Tosca L, Tachdjian G, Frydman N. Chromosomal translocations and semen quality: A study on 144 male translocation carriers. *Reprod Biomed Online*, 2019;38:46-55.
- Mcqueen, D. B, Zhang J, Robins J. C. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 2019;112:54-60e3.
- Mcswiggin H. M, O'doherty A. M. Epigenetic reprogramming during spermatogenesis and male factor infertility. *Reproduction*, 2018;156:R9-R21.
- Mekkawy M. K, El Guindi A. M, Mazen I. M, Fayez A. G, Mohamed A. M. Kamel A.

- K. An infertile azoospermic male with 45,X karyotype and a unique complex (Y;14); (Y;22) translocation: cytogenetic and molecular characterization. *J Assist Reprod Genet*, 2018;35:1503-1508.
- Memisoglu A, Samson L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2000;451: 39-51.
- Menezo Y, Dale B, Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*, 2010;18:357-65.
- Mitchell A. L, Dwyer A, Pitteloud N, Quinton R. Genetic basis and variable phenotypic expression of Kallmann syndrome: towards a unifying theory. *Trends Endocrinol Metab*, 2011;22:249-58.
- Montjean D, Zini A, Ravel C, Belloc S, Dalleac A, Copin H, Boyer P, Mcelreavey K, Benkhalifa M. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology*, 2015;3: 235-240.
- Moser J, Kool H, Giakzidis I, Caldecott K, Mullenders L. H, Fousteri, M. I. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III $\alpha$  in a cell-cycle-specific manner. *Molecular cell*, 2007;27:311-323.
- Muratori M, De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Practice Research Clinical Endocrinology Metabolism*, 2018.
- Nakane H, Hirota S, Brooks P. J, Nakabeppu Y, Nakatsu Y, Nishimune Y, Iino A, Tanaka K. Impaired spermatogenesis and elevated spontaneous tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (Xpa)-deficient mice. *DNA repair*, 2008;7:1938-1950.
- Nazarkina Z. K, Khodyreva S. N, Marsin S, Lavrik O. I, Radicella J. P. XRCC1 interactions with base excision repair DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)*, 2007;6: 254-64.
- Neto F. T, Bach P. V, Najari B. B, Li P. S, Goldstein M. Genetics of Male Infertility. *Curr Urol Rep*, 2016a;17:70.
- Neto F. T. L, Bach P. V, Najari B. B, Li P. S. Goldstein, M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in cell developmental biology*, Elsevier, 2016b;10-26.
- Ni K, Spiess A. N, Schuppe H. C, Steger K. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology*, 2016;4:789-99.

- Ni W, Pan C, Pan Q, Fei Q, Huang X, Zhang C. Methylation levels of IGF2 and KCNQ1 in spermatozoa from infertile men are associated with sperm DNA damage. *Andrologia*, 2019;51:e13239.
- Nussbaum R. L, McInnes R. R, Willard H. F. Thompson Thompson genetics in medicine e-book, Elsevier Health Sciences. 2015.
- O'brien K. L. F, Varghese A. C, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and sterility*, 2010;93:1-12.
- O'donovan R. Völlm B. Klinefelter's syndrome and sexual offending—a literature review. *Criminal Behaviour and Mental Health*, 2018;28:132-140.
- Oehninger S, Ombelet W. Limits of current male fertility testing. *Fertility and sterility*. 2019.
- Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Cantor M, Kirkner G. J, Spiegelman D, Makrigiorgos G. M, Weisenberger D. J, Laird P. W, Loda M. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *The Journal of molecular diagnostics*, 2006;8:209-217.
- Okutman O, Muller J, Baert Y, Serdarogullari M, Gultomruk M, Piton A, Rombaut C, Benkhalifa M, Teletin M, Skory V, Bakircioglu E, Goossens E, Bahceci M, Viville S. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet*, 2015;24:5581-8.
- Okutman O, Rhouma M. B, Benkhalifa M, Muller J, Viville S. Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2018;35:1939-1951.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Human reproduction update*, 2006;12:417-435.
- Olkhov-Mitsel E, Zdravic D, Kron K, Van Der Kwast T, Fleshner N, Bapat B. Novel multiplex MethyLight protocol for detection of DNA methylation in patient tissues and bodily fluids. *Sci Rep*, 2014;4:4432.
- Olsen, A.K, Bjørtuft H, Wiger R, Holme J, Seeberg E, Bjørås M, Brunborg G. Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells. *Nucleic acids research*, 2001;29:1781-1790.
- Olsen A.K, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicology and applied pharmacology*, 2005;207:521-531.
- Óvári L, Sati L, Stronk J, Borsos A, Ward D. C, Huszar G. Double probing individual human spermatozoa: aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies. *Fertility and sterility*, 2010;93:2255-2261.

- Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp* 2011.
- Polo L. M, Xu Y, Hornyak P, Garces F, Zeng Z, Hailstone R, Matthews S. J, Caldecott K. W, Oliver A. W, Pearl L. H. Efficient single-strand break repair requires binding to both poly (ADP-Ribose) and DNA by the central BRCT domain of XRCC1. *Cell reports*, 2019;26:573-581.e5.
- Rajabi, H, Mohseni-Kouchesfehani H, Eslami-Arshaghi T, Salehi M. Sperm DNA fragmentation affects epigenetic feature in human male pronucleus. *Andrologia*, 2018;50.
- Rajender, S., Avery, K. Agarwal, A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2011;727:62-71.
- Redshaw N, Huggett J. F, Taylor M. S, Foy C. A, Devonshire A. S. Quantification of epigenetic biomarkers: an evaluation of established and emerging methods for DNA methylation analysis. *BMC genomics*, 2014;15, 1174.
- Rives N. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis, patient approach and genetic counseling. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2014;75, 112-4.
- Rives N, Joly G, Machy A, Simeon N, Leclerc P, Mace B. Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comparison with fertile and infertile males with normal karyotype. *Mol Hum Reprod*, 2000;6:107-12.
- Rocca M. S, Pecile V, Cleva L, Speltra E, Selice R, Di Mambro A, Foresta, C. Ferlin A. The Klinefelter syndrome is associated with high recurrence of copy number variations on the X chromosome with a potential role in the clinical phenotype. *Andrology*, 2016;4:328-34.
- Sabarinathan R, Mularoni L, Deu-Pons J, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N. Nucleotide excision repair is impaired by binding of transcription factors to DNA. *Nature*, 2016;532:264-267.
- Sancar A, Lindsey-Boltz L. A, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 2004;73:39-85.
- Saribasak H, Maul R. W, Cao Z, McClure R L, Yang W, McNeill D. R, Wilson D. M, Gearhart P. J. XRCC1 suppresses somatic hypermutation and promotes alternative nonhomologous end joining in Igh genes. *Journal of Experimental Medicine*, 2011;08:2209-2216.
- Schärer O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2013;5, a012609.

- Schon S. B, Luense L. J, Wang X, Bartolomei M. S, Coutifaris C, Garcia B. A, Berger S. L. Histone modification signatures in human sperm distinguish clinical abnormalities. *J Assist Reprod Genet*, 2019;36:267-275.
- Sellami A, Chakroun N, Ben Zarrouk S, Sellami H, Kebaili S, Rebai T, Keskes L. Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. *Advances in urology*, 2013.
- Sha Y. W, Mei L. B, Ji Z. Y, Ding L, Ge Y, Wu Q, Kong H, Su Z. Y, Li P. Two cases of complex balanced autosomal translocations associated with severe oligozoospermia. *Gene*, 2018;663, 126-130.
- Shannon M. Stubbs L. Analysis of HomologousXRCC1-Linked Zinc-Finger Gene Families in Human and Mouse: Evidence for Orthologous Genes. *Genomics*, 1998;49, 112-121.
- Sharma P, Ghanghas P, Kaushal N, Kaur J, Kaur P. Epigenetics and oxidative stress: A twin-edged sword in spermatogenesis. 2019; *Andrologia*.
- Sharma R. Agarwal A. Measurement of DNA Damage in Spermatozoa by TUNEL Assay. *Sperm Chromatin*. 2011a; Springer.
- Sharma R, Agarwal A. Spermatogenesis: an overview. *Sperm Chromatin*. 2011b; Springer.
- Sharma R. Agarwal A. Defective Spermatogenesis and Sperm DNA Damage. *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. 2018; Springer.
- Sharma R, Ahmad G., Esteves S. C, Agarwal, A. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2016; 33:291-300.
- Shen L. Waterland R. A. Methods of DNA methylation analysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care*, 2007;10:576-581.
- Simon L, Carrell D. T. Sperm DNA damage measured by comet assay. *Spermatogenesis*. 2013; Springer.
- Simon L, Emery B, Carrell D. T. Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. *Adv Exp Med Biol*, 2019;1166:87-105.
- Singh A, Agarwal A. The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility. *Open Reprod Sci J*, 2011;3:65-71.
- Singh, V, Bansal S. K, Sudhakar D. V. S, Neelabh Chakraborty A, Trivedi S, Gupta G,



- Thangaraj K, Rajender S, Singh K. SNPs in ERCC1, ERCC2, and XRCC1 genes of the DNA repair pathway and risk of male infertility in the Asian populations: association study, meta-analysis, and trial sequential analysis. *J Assist Reprod Genet*, 2019a;36:79-90.
- Singh V, Jaiswal D, Singh K, Trivedi S, Agrawal N. K, Gupta G, Rajender S, Singh K. Azoospermic infertility is associated with altered expression of DNA repair genes. *DNA Repair (Amst)*, 2019b;75:39-47.
- Singh V, Mohanty S. K, Verma P, Chakraborty A, Trivedi S, Rajender S, Singh K. XRCC1 deficiency correlates with increased DNA damage and male infertility. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2019c;839:1-8.
- Smith T. B, Dun M. D, Smith N. D, Curry, B. J, Connaughton H. S, Aitken R. J. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *J Cell Sci*, 2013;126:1488-97.
- Solomon Jr M. C, Cho C-L, Henkel R. R. Basic Aspects of Oxidative Stress in Male Reproductive Health. Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction. 2019; Elsevier.
- Spivak G. Nucleotide excision repair in humans. *DNA repair*, 2015;36:13-18.
- Stamou M. I, Georgopoulos N. A. Kallmann syndrome: phenotype and genotype of hypogonadotropic hypogonadism. *Metabolism*, 2018; 86, 124-134.
- Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, Gatta V, Antonucci I. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clin Epigenetics*, 2015;7, 120.
- Sugasawa K. Molecular mechanisms of DNA damage recognition for mammalian nucleotide excision repair. *DNA repair*, 2016;44:110-117.
- Tadros N. N, Vij S. C. The Oxidant Paradox. Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction. 2019; Elsevier.
- Tebbs R. S, Thompson L. H, Cleaver J. E. Rescue of Xrcc1 knockout mouse embryo lethality by transgene-complementation. *DNA repair*, 2003;2:1405-1417.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction*, 2004;19:611-615.
- Thirumavalavan N, Gabrielsen J. S. Lamb D. J. Where are we going with gene screening for male infertility? *Fertility and sterility*, 2019;11:842-850.
- Tran Q. T, Jatsenko T, Poolamets O, Tsuiko O, Lubenets D, Reimand T, Punab M,

- Peters M, Salumets A. Chromosomal scan of single sperm cells by combining fluorescence-activated cell sorting and next-generation sequencing. *J Assist Reprod Genet*, 2019;36:91-97.
- Trinh B. N, Long T. I, Laird P. W. DNA methylation analysis by MethyLight technology. *Methods*, 2001; 25:456-462.
- Trost L. W, Gudeloglu A, Ko E. Y, Parekattil S. J. The importance of diet, vitamins, malnutrition, and nutrient deficiencies in male fertility. *Male Infertility*. 2014; Springer.
- Tsai P, Nielen M, Van Der Horst G, Colenbrander B, Heesterbeek J, Van Vlissingen J. F. The effect of DNA repair defects on reproductive performance in nucleotide excision repair (NER) mouse models: an epidemiological approach. *Transgenic research*, 2005;14:845-857.
- Tuttelmann F, Ruckert C, Ropke A. Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine. *Med Genet*, 2018;30:12-20.
- Vashisht A. A, Wohlschlege J. A. Role of Human Xeroderma Pigmentosum Group D (XPD) Helicase in Various Cellular Pathways. *Helicases from All Domains of Life*. 2019; Elsevier.
- Walter C. A, Lu J, Bhakta M, Zhou Z. Q, Thompson L. H, Mccarrey J. R. Testis and somatic Xrcc-1 DNA repair gene expression. *Somat Cell Mol Genet*, 1994; 20:451-461.
- Wang D, Chen R, Kong S, Pan Q. Y, Zheng Y. H, Qiu W. J, Fan Y, Sun X. F. Cytogenic and molecular studies of male infertility in cases of Y chromosome balanced reciprocal translocation. *Mol Med Rep*, 2017;16:2051-2054.
- Wang R. X, Zhang H. G, Pan Y, Zhu J. H, Yue F. G, Xue L. T, Liu R. Z. Chromosome 7 translocation breakpoints in male carriers: clinical features and implications for genetic counseling. *Genet Mol Res*, 2016;15.
- Wang X, Jin H. R, Cui Y. Q, Chen, J, Sha Y. W, Gao Z. L. Case study of a patient with cryptozoospermia associated with a recessive TEX15 nonsense mutation. *Asian J Androl*, 2018;20:101-102.
- World Health Organization WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 2010; 5th ed. Geneva: World Health Organization.
- Xu H, Feng Y, Jia Z, Yang J, Lu X, Li J, Xia M, Wu C, Zhang Y, Chen J. Association between ERCC1 rs3212986 and ERCC2 rs13181 gene polymorphisms in NER pathway and the risk of bladder cancer in a Chinese population. *International Journal Of Clinical And Experimental Pathology*, 2016;9:2295-2300.

- Yang X, Zhang H, Yu Y, Zhu H, Hu X, Jiang Y, Wang R, Liu R. Clinical Features of Chromosome 6 Translocation in Male Carriers: A Report of 10 Cases and Review of the Literature. *Med Sci Monit*, 2018;24:4162-4168.
- Yu B, Qi Y, Liu D, Gao X, Chen H, Bai C, Huang Z. Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertility and sterility*, 2014;101:51-57. e1.
- Zheng L. R, Wang X. F, Zhou D. X, Zhang J, Huo, Y. W, Tian H. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphisms and infertility with idiopathic azoospermia in northern Chinese Han males. *Reprod Biomed Online*, 2012;25, 402-7.
- Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes M. T. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*, 2001;75:674-7.

## EKLER

### Ek 1: Etik Kurul Raporu



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/272-443

15.08.2016

Sayın Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **İdiyopatik Erkek İnfertilitesinde ERCC2, MLH1, MSH2 ve XRCC1 Genleri Promotor Metilasyonları ile Sperm DNA Fragmantasyonu Arasındaki İlişkinin Araştırılması** başlıklı OMÜ KAEK 2016/185 Karar nolu nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 28.04.2016 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanmadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr.Dürsun AYGÜN  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

## Ek 2: Hasta Gönüllü Onam Formu

### **HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ**

#### **ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):**

**“İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİNDE *ERCC2*, *MLH1*, *MSH2* ve *XRCC1* GENLERİ PROMOTOR METİLASYONLARI İLE SPERM DNA FRAGMENTASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI”**

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

#### **BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?**

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz bilgilendirilecektir.

#### **ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?**

Çalışmada, non-obstrüktif azospermi ve oligoastenoteratospermi (OAT) tanısı almış çocuğu olmayan erkeklerden tanı amaçlı alınan kan, testis dokusu ve semen sıvısı örnekleri ile çocuk sahibi olan erkeklerden elde edilen semen sıvısı ve kan örneğinde; kalıtsal materyalin onarımında rol alan bazı genlerde meydana geldiği düşünülen değişiklikler araştırılacaktır. Bu çalışma sonucunda tespit edilebilecek bu değişikliklerin sebebi belirlenemeyen kısırlığın nedenlerini araştırmayı amaçlıyoruz.

#### **ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:**

Araştırma sırasında size tanı ve tedavi için uygulanacak işlemler haricinde ek bir ilaç uygulaması veya canınızı acıtacak girişimsel herhangi bir uygulama yapılmayacaktır. Bütün inceleme ve araştırma teşhis ve tedavi amacıyla canlı sperm aranması sırasında testisinizden küçük bir miktar doku alınacaktır. Ayrıca, kolunuzdan alınacak bir miktar kan ve 3-7 günlük cinsel perhizin ardından semen analizi yapılmak üzere verdiğiniz semen örneklerinden artanı çalışmaya dahil edilecektir.

Bu doku parçası, kan ve semen örneklerinden DNA (kalıtsal materyal) izole edilerek hastalığa sebep olabileceği düşünülen bazı genlerdeki değişimler araştırılacaktır. Sizden alınan kan, doku ve semen örnekleri daha sonra kullanılmayacaktır. Çocuğu olan erkelerde erkeklerden sadece kan ve semen örneği alınacaktır.

#### **BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?**

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Çalışma doktorunuzu ziyarete belirlenen günlerde gelmelisiniz ve bir sonraki ziyaretiniz de, ziyaretten ayrılmadan önce planlanmalıdır. Yine çalışmadan önce veya çalışma sırasında aldığınız başka herhangi bir tıbbi tedaviyi de çalışma doktoruna söylemeniz önemlidir. Semen örneğini 3-7 günlük cinsel perhizin ardından vermeniz önemlidir.

### **ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?**

Çalışmaya katılarak başvurmuş olduğunuz merkezde size uygulanacak olan ve sizin teşhis ve tedavi sürecinde uygulanacak işlemler haricinde herhangi bir uygulama yapılmayacağı için bu çalışmanın size bir yan etkisi söz konusu değildir.

### **GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ**

Çalışmaya bayanlar dahil edilmeyecektir.

### **ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR? (Varsa açıklayınız)**

Bu çalışma ile vermiş olduğunuz semen sıvısı ve testisinizden alınan dokuda daha önceden tanı amacıyla uygulanmamış ve henüz rutin testler dahilinde olmayan bir test uygulanacaktır. Testin sonuçları kısırlığa sebep olabileceği düşünülen bazı genlerde epigenetik değişikliklerin (DNA onarım genlerinde meydana gelen epigenetik değişiklikler) olup olmadığını gösterir.

Bu sayede tespit edilebilecek epigenetik değişiklikler bu hastalığın nasıl oluştuğuna dair bizlere ipuçları verebilecek ve hastalığın tedavisi için yeni hedefler bulunmasına yardımcı olacaktır.

### **GÖNÜLLÜ KATILIM**

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilirim. Çalışmadan her hangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

### **ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?**

Çalışma kapsamında katılımcılardan herhangi (yol dahil) bir ücret talep edilmeyecek ve hastaya da herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

### **KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?**

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi (“Çalışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, sigara ve alkol kullanma durumunuz, etnik kökeniniz ayrıca çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Doktorunuzdan toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahipsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahipsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

**ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:**

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Ramazan Aşçı'yı 0 (362) 3121919 / 2255 telefon numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji ABD'den arayabileceğimi biliyorum.

**ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:**

Yoktur.

**YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR**

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

**Çalışmaya Katılma Onayı**

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

**\* Açıklamalar hastanın anlayabileceği açıklıkta ve teknik terimlerden uzak bir şekilde belirtilmelidir.**

## ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı: Aslı METİN MAHMUTOĞLU

Doğum Yeri: Yozgat

Doğum Tarihi: 1984

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Erciyes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü-2009

Yüksek Lisans: Bozok Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü-2012

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2013-2014  
(Araştırma Görevlisi)

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı,  
2014 – Devam ediyor (Araştırma Görevlisi)

E-posta: aslmetin83@gmail.com, asli.metin@omu.edu.tr