



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

**İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİNDE DNA
FRAGMENTASYONU İLE *MLH1* VE *MSH2* GENLERİNİN
PROMOTOR METİLASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gülgez Neslihan TAŞKURT HEKİM

**Samsun
Ekim-2019**



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

**İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİNDE DNA
FRAGMENTASYONU İLE *MLH1* VE *MSH2* GENLERİNİN
PROMOTOR METİLASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gülgez Neslihan TAŞKURT HEKİM

Danışman

Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Samsun

Ekim-2019

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Gülgez Neslihan Taşkurt Hekim tarafından, Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ Danışmanlığında hazırlanan 'İdiyopatik Erkek İnfertilitesinde DNA Fragmantasyonu ile *MLH1* ve *MSH2* Genlerinin Promotor Metilasyonu Arasındaki İlişkinin Araştırılması' başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 24/09/2019 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Sezgin GÜNEŞ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Ramazan AŞCI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ, Erciyes Üniversitesi

Üye : Dr.Öğr.Üyesi Mehmet Alper ARSLAN, Ondokuz Mayıs 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

Sadece tez çalışmamın değil tüm doktora sürecimin en başından itibaren yanımda olan, kıymetli deneyimlerini ve bilgi birikimini ne zaman ihtiyacım olsa benimle paylaşan, benden maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, kendisine son derece saygı duyduğum ve akademik hayatta kendime örnek aldığım sevgili danışmanım Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e; aktif çalışma hayatı sonrasında dahi kıymetli desteğini her zaman hissettiğim Prof. Dr. Hasan BAĞCI'ya, çalışmada bize klinik bir bakış açısı sağlayan ve ihtiyacımızın olduğu her zaman yanımda olan Prof. Dr. Ramazan AŞCI'ya; çalışmanın başındaki fikirleri ve yönlendirmeleri için Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Alper ARSLAN'a; çalışmanın görüntüleme kısmında teknik desteği ve kıymetli yardımları için Prof. Dr. Oğuz AYDIN'a; çalışmanın birçok aşamasında yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Ar. Gör. Aslı METİN MAHMUTOĞLU'na; katılımcıların semen analizlerini yaparak önemli verilerin elde edilmesini sağlayan Biyolog Gökhan ZENGİN'e; çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizlerini yaparak sonuçlanmalarını sağlayan ve bizden kıtalararası yardımını esirgemeyen Dr. Ralf HENKEL'e; doktora ders aşamasındaki katkıları için Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN ve Prof. Dr. Nurten KARA'ya; katılımlarıyla çalışmanın şekillenmesini sağlayan tüm gönüllülülere; idari süreçlerdeki kıymetli yönlendirmeleri için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Personel İşleri ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak her zaman nazımı çeken ve zor zamanlardaki dert ortağım sevgili hayat arkadaşım Alaaddin HEKİM'e, varlığıyla bana anlam ve denge katan biricik kızım İdil Ece HEKİM'e ve tüm aileme çok teşekkür ediyorum.

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

ÖZET

İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİNDE DNA FRAGMENTASYONU İLE *MLH1* VE *MSH2* GENLERİNİN PROMOTOR METİLASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Tez çalışmasında idiyopatik infertil hastalarda *MLH1* ve *MSH2* genlerinin promotor metilasyonları, sperm DNA fragmentasyonu ve histonca zengin sperm yüzdesinin belirlenmesi ve elde edilen sonuçların semen parametreleri, yaş ve sigara kullanımı verileriyle birlikte analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmaya katılan 52 kontrol ve 75 infertil erkekte alınan örneklerde sperm DNA fragmentasyonu TUNEL, histonca zengin sperm yüzdesi anilin mavisi boyama yöntemi, *MLH1* ve *MSH2*'nin promotor metilasyon (sırasıyla n=39 ve 40) yüzdeleri MethyLight yöntemi ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Çalışmada *MLH1* ve *MSH2* promotor metilasyon değişimlerinin DNA fragmentasyon indeksi (DFI) üzerine etkisi görülmemiştir. *MSH2* promotor metilasyonu ve DFI kontrol grubunda oligoastenoteratozoospermi (OAT) grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur. *MLH1* promotor metilasyonu ve anilin pozitif sperm yüzdesi arasında pozitif korelasyon (P=0,0188), *MSH2* promotor metilasyonu ile sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı arasında ise negatif korelasyon bulunmuştur (sırasıyla P=0,0068 ve P=0,009). Kontrol grubunun anilin pozitif sperm yüzdesi, OAT grubuna göre düşüktür (P<0,0001). Anilin pozitif sperm yüzdesi, yaş (P=0,0015), toplam sperm sayısı (P<0,0001), motilite (P<0,0001) ile negatif korelasyonludur. Sigara içiminin diğer parametreler üzerine etkisi görülmemiştir.

Sonuç: Çalışma sonuçları yanlış eşleşme onarımında kritik görevleri olan *MLH1* ve *MSH2* genlerindeki epigenetik değişikliklerin semen parametreleri üzerine etkili olabileceğini düşündürmüştür. Ancak, bu genlerin metilasyon değişikliklerinin infertilite, DFI ve protaminasyonla olan ilişkisinin anlaşılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: *MLH1*; *MSH2*; Sperm DNA fragmentasyonu; Sperm histon

Gülgez Neslihan TAŞKURT HEKİM, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Samsun, Ekim-2019

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN PROMOTER METHYLATION OF *MLH1* AND *MSH2* WITH DNA FRAGMENTATION IN IDIOPATHIC MALE INFERTILITY

Aim: In this study, we aimed to investigate the promoter methylation of *MLH1* and *MSH2* genes, sperm DNA fragmentation and percentage of histone-rich sperm in idiopathic infertile patients and to evaluate the results with semen parameters, age and smoking data.

Material and Method: The promoter methylation of *MLH1* and *MSH2* (n=39 and n=40, respectively) were analyzed by MethyLight method, sperm DNA fragmentation by TUNEL and the percentage of histone-rich sperm by aniline blue staining method in 52 control and 75 infertile men.

Results: In the study, no effect of the promoter methylation changes of *MLH1* and *MSH2* on DNA fragmentation index (DFI) was observed. *MSH2* promoter methylation and DFI were lower in the control group compared to the oligoasthenoteratozoospermic (OAT) group. There was a positive correlation between *MLH1* promoter methylation and percentage of aniline positive spermatozoa (P=0.0188) and a negative correlation between *MSH2* promoter methylation and sperm concentration and total sperm count (P=0.0068 and P=0.009, respectively). The percentage of aniline positive sperm of the control group was lower compared to the OAT group (P<0.0001). Aniline positive spermatozoa was negatively correlated with age (P=0.0015), total sperm count (P<0.0001) and motility (P<0.0001). No correlation was found between smoking and other parameters.

Conclusion: The results of the study suggest that methylation alterations in *MLH1* and *MSH2* genes, which have critical roles in mismatch repair, may have an effect on semen parameters. However, further studies are needed to understand the relationship between methylation changes of these genes and infertility, DFI and protamination.

Keywords: *MLH1*; *MSH2*; Sperm DNA fragmentation; Sperm histone

Gulgez Neslihan TASKURT HEKIM, Ph.D. Thesis
Ondokuz Mayıs University-Samsun, October-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

AZF	:	Azospermik faktör bölgesi
CBAVD	:	Konjenital bilateral vas deferens agenezi
CF	:	Kistik fibrozis
CFTR	:	Kistik fibrosiz transmembran regulator
CO	:	Krossover
DFI	:	DNA fragmantasyon indeksi
DSB	:	Çift zincir kırığı
HR	:	Homolog rekombinasyon
ICSI	:	Intrasitoplamik sperm enjeksiyonu
IVF	:	<i>In vitro</i> fertilizasyon
KS	:	Klinefelter sendromu
MLH1	:	mutL homolog 1
MMR	:	Yanlış eşleşme onarımı
MSH2	:	mutS homolog 2
MTHFR	:	Metilentetrahidrofolat redüktaz
NOA	:	Nonobstrüktif azospermi
OAT	:	Oligoastenoteratozoospermi
P1	:	Protamin 1
P2	:	Protamin 2
PBS	:	Fosfat tuz tamponu
PFA	:	Paraformaldehit
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SCLB	:	Somatik hücre lizis tamponu
SCO	:	Sertoli cell only sendromu
SO	:	Şiddetli oligozoospermi
TUNEL	:	Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP-çentik uç etiketleme
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.İnfertilite Epidemiyolojisi.....	3
2.2.Spermatogenez.....	4
2.3.Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri	7
2.3.1.Kromozom Bozuklukları	7
2.3.2.Gen Mutasyonları.....	11
2.3.3.Polimorfizmler	12
2.4.Erkek İnfertilitesinin Epigenetik Nedenleri.....	13
2.4.1.Protaminasyon.....	13
2.4.2.Genom Boyu ve Gen Spesifik Metilasyon.....	14
2.4.3.Kısa Kodlanmayan RNA'lar	16
2.5.Sperm DNA Hasarı.....	17
2.5.1.Reaktif Oksijen Türleri	17
2.5.2.Sperm Kromatin Paketlenmesi	18
2.5.3.Apoptoz.....	19
2.5.4.Sperm DNA Fragmantasyonu	19
2.6.Yanlış Eşleşme Onarımı.....	20
2.7.Yanlış Eşleşme Onarımı ve Erkek İnfertilitesi.....	24
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1.Materyal	27
3.1.1.Örneklerin Alınması.....	28
3.2.Metot	28
3.2.1.TUNEL Testi	30
3.2.2.Anilin Boyaması	31
3.2.3.Somatik Hücrelerin Lizisi	32
3.2.4.Sperm DNA Eldesi	32
3.2.5.Bisülfid Dönüşümü	33

3.2.6.Eş Zamanlı PCR ile Methylight Analizi	34
3.2.7.İstatiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1.TUNEL	38
4.2.Anilin Mavisi Boyaması	42
4.3. <i>MLH1</i> ve <i>MSH2</i> Genlerinin Promotor Bölgelerinin qPCR ile Analizi	45
4.4.Sigara Kullanımı ve Yaş	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
EKLER	73

1. GİRİŞ

Erkek infertilitesi dünya genelindeki çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkileyen önemli bir sağlık problemidir (Tahmasbpour ve ark., 2014). Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde ayrıntılı alınmış tıbbi geçmiş, fiziksel muayene ve iki ayrı semen analizi yer almaktadır (Jungwirth ve ark., 2012).

Semenin makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilmesinin önemine rağmen konvansiyonel semen analizleri erkeğin üreme potansiyelini doğru şekilde tahmin etmede yetersiz kalabilmektedir (Agarwal ve ark., 2019). İnfertil erkeklerin bir kısmının normal semen parametrelerine sahip olması erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde daha ileri tetkiklere gerek duyulduğunun bir göstergesidir (Saleh ve ark., 2002; Belloc ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar sperm DNA hasar ve fragmantasyon analizlerinin ileri testler arasında önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Sperm DNA bütünlüğünün bozulması paternal üreme potansiyelini negatif yönde etkiler (Aitken ve De Iuliis, 2010). Birçok çalışma infertil erkeklerde fertil erkeklere kıyasla daha fazla DNA hasarı gözlendiğini ve yüksek sperm DNA hasarının sıklıkla düşük sperm sayısı, azalmış motilite, anormal morfoloji ve ileri paternal yaş ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Muratori ve ark., 2000; Wyrobek ve ark., 2006; Erenpreiss ve ark., 2008; Boushaba ve Belaaloui, 2015). Sperm DNA hasarı ayrıca hem doğal yollarla hem de yardımcı üreme teknikleri ile meydana gelen hamileliklerde düşüklere, embriyoda gelişimsel bozukluklara, konjenital ve kromozomal anomalilere neden olabilmektedir (Schulte ve ark., 2010; Simon ve ark., 2017).

DNA onarım mekanizmalarından biri olan yanlış eşleşme onarımının (mismatch repair system, MMR) en iyi bilinen görevi replikasyon sırasında tek bazlık yanlış eşleşmeleri ve insersiyon/delesyonları düzelterek genomik kararlılığı korumaktır (Crouse, 2016; Peltomaki, 2016). MMR, ayrıca homolog rekombinasyonda da yer almaktadır (Spies ve Fishel, 2015). Homolog rekombinasyon somatik hücrelerde durmuş replikasyon çatalının yeniden fonksiyon kazanmasında ve DNA çift zincir kırıklarının (double strand breaks, DSB) onarımında görev alır. Mayozda homolog rekombinasyon profazın erken safhalarında genom boyu programlı DSB oluşumuyla başlayan krossover oluşumu için gereklidir (Manhart, 2016; Spies, 2015). MMR

rekombinasyon sırasında yanlış eşleşmeleri düzeltir ve mayozda homolog kromozomlar arası krosovera aracılık eder (Manhart, 2016). Hayvan modelleri ve spermatogenik bozukluğu olan hastalarla yapılan çalışmalar MMR genlerinin erkek infertilitesinde rol alabileceğini göstermektedir (Paul ve ark., 2007; Terribas ve ark., 2010).

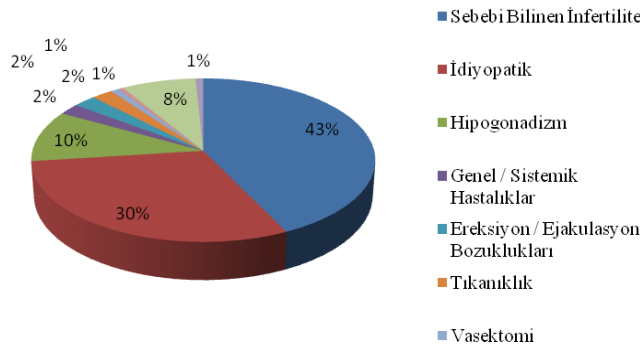
Tez çalışması için DSB onarımı, kromozomal sinaps ve genomik kararlılığın korunmasındaki görevleri göz önünde bulundurulduğunda, MMR genlerindeki epigenetik değişikliklerinin sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkili olabileceği düşünülmüştür. Çalışmada bu hipotez doğrultusunda *MLH1* ve *MSH2*'nin promotor bölgesi metilasyon yüzdeleri, sperm DNA fragmentasyonu ve histonca zengin sperm yüzdesi fertil/normozoospermiklerde ve OAT teşhisi alan kişilerde belirlenmiş, bu genlerin metilasyon değişikliklerinin DNA fragmentasyonu üzerinde etkisi olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite Epidemiyolojisi

Üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %8-12'ini etkileyen infertilite, çiftlerin en az bir yıl veya daha uzun sürede korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamamasıdır (Vander Borgh ve Wyns, 2018). Güney ve Orta Asya, Doğu ve Kuzey Afrika ve Doğu Avrupa'daki bazı popülasyonlarda insidansı %30'a kadar çıkmaktadır (Izzo ve ark., 2015). Yalnızca erkek faktörünün sorumlu olduğu infertilite olguları %20-30 civarındadır ancak erkek faktörü tüm olguların neredeyse %50'sini oluşturur (Murray ve ark., 2012; Dadhich ve ark., 2015; Vander Borgh ve Wyns, 2018).

Erkek fertilitesi, genetik ve epigenetik faktörler, konjenital ya da kazanılmış ürogenital anomaliler, kanserler, ürogenital enfeksiyonlar, skrotal ısının artışı, endokrin rahatsızlıklar, immunolojik faktörler ve toksik etkenler (ilaçlar, tütün, uyuşturucu, ağır metaller, alkol vb.) nedenleriyle azalabilmektedir (Krausz, 2011; Sabanegh, 2011). İnfertil erkeklerin yaklaşık %15'inde kromozom ya da tek gen mutasyonları gözlenmektedir. Karyotip analizi ve Y-kromozomu mikrodelsiyon analizleri sırasıyla <10 milyon sperm/ml ve <5 milyon sperm/ml olan hastalar için önerilmektedir (Krausz ve ark., 2015). İnfertil erkek olgularının yaklaşık %30'unda ise erkek infertilitesiyle ilişkilendirilen bir faktör tanımlanamamaktadır ve bu olgular idiyopatik olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1).



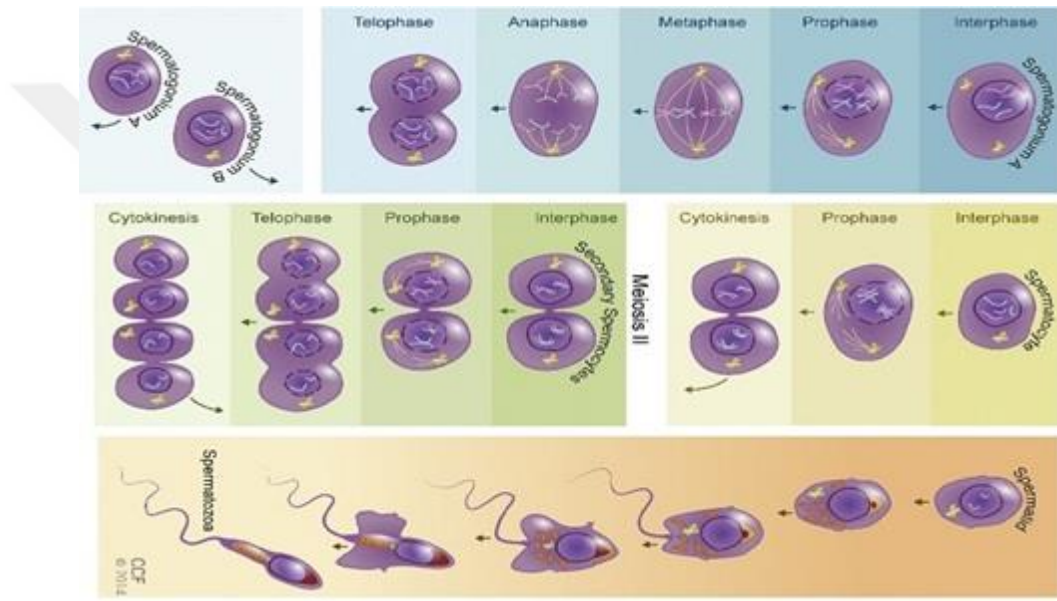
Şekil 1. Erkek infertilite sebepleri ve ilişkili faktörler (Jungwirth ve ark., 2012)

2.2. Spermatogenez

Spermatogenez bozukluklar erkek infertilitesinin en yaygın nedenidir ve birçok genetik ve epigenetik faktör bu duruma neden olabilmektedir (Song ve ark., 2016). Seminifer tübüllerde meydana gelen spermatogenez, çok sayıda hücre tipinin, hormonun, genetik ve epigenetik faktörlerin etki ettiği karmaşık bir süreçtir ve temelde üç aşamadan oluşur. Bu aşamalar sırasıyla spermatogoninin mitotik proliferasyonu ve primer spermatositlere farklılaşması, primer spermatositlerin mayozla spermatidleri oluşturması ve yuvarlak spermatidlerin spermatozoaya farklılaştığı spermiyogenez aşamasıdır (Stukenborg ve ark., 2014). Süreç yaklaşık 64 gün sürer ve sonuçta bir günde 150-275 milyon sperm üretilir (Song ve ark., 2016). Sağlıklı bir erkekte spermatogenez; ergenlikte hipotalamusun hormonal kontrolüyle başlar, bireyin tüm yaşamı boyunca devam eder ve süreç sırasında yaklaşık 2300 gen bir arada çalışır (Sharma, 2011; Hotaling ve Carrell, 2014).

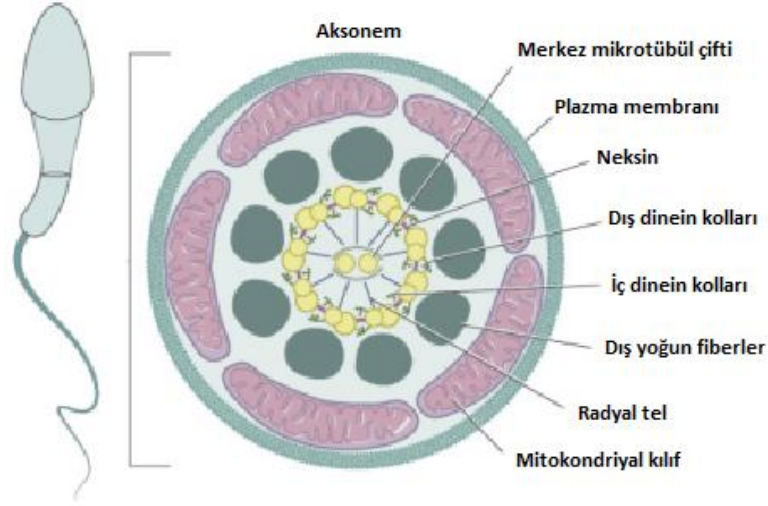
Spermatogenez sırasında testis mikroçevresinin sıkı kontrolü altında olan spermatogonia hem mitozla kök hücre havuzunun devamlılığını sağlar hem de mayozla spermatozoaya farklılaşır (Fok ve ark., 2014; Hai ve ark., 2014). Seminifer epitelin bazal laminasında tip A ve tip B spermatogonia bulunur. İnsanda tip A spermatogonia nükleuslarının boyanma özelliklerine göre iki gruba ayrılır: A koyu ve A soluk. İki grup A spermatogonia da farklılaşmamış kök hücredir, ancak bazı kaynaklarda oldukça nadir bölünen A koyu spermatogonia esas rezerv kök hücre, proliferasyonu önce tip B spermatogoniaya sonra da spermatositlere farklılaşarak germ hücre sayısını arttıran A soluk spermatogonia ise progenitor hücre olarak kabul edilir (Waheeb ve Hofmann, 2011; Stukenborg ve ark., 2014; Komeya ve Ogawa, 2015). Tip B spermatogoninin mitotik çoğalmasıyla oluşan primer spermatositler mayozla ilerlerler. Leptoten aşamasında DSB oluşumuyla başlayan genetik rekombinasyon pakiten aşamasında tamamlanır (Gunes ve ark., 2015). Mayoz 1'in sonunda her primer spermatositten bir çift haploid kromozomlu ve rekombinant DNA'lı sekonder spermatosit oluşur (Song ve ark., 2016). Spermatogonial bölünmeler sırasında sitokinez tamamlanmaz, hücreler birbirleriyle sitoplazmik köprüler aracılığıyla bağlı ve iletişimde kalırlar. Bölünmeler birbirlerine bağlı hücre kolonları oluşturur, iyonlar ve moleküller bu hücrelerarası köprülerden geçerek her hücre sırasının senkronize olarak olgunlaşmasına olanak sağlar (Gilbert, 2000).

Mayozun ikinci bölünmesinden sonra her bir sekonder spermatosit iki yuvarlak spermatide bölünür. İnsanda nükleer morfolojilerine bağlı olarak Sa-Sb1-Sb2-Sc-Sd1-Sd2 şeklinde altı spermatid tanımlanmıştır (De Vries ve ark., 2012). Haploid spermatidlerde de sitoplazmik köprüler korunur. Tip A spermatogoniumdan spermatide kadar olan bölünmeler sırasında hücreler seminifer tübüllerin bazal membranından lümenine doğru kademeli olarak yol alırlar. Böylece her hücre tipi tübülün belirli bir katmanında bulunur. Spermatidler lümenin sınırında bulunur ve burada sitoplazmik bağlantılarını kaybederek sperm hücrelerine farklılaşırlar (Gilbert, 2000).



Şekil 2. Spermatogenez (Gunes ve ark., 2015)

Spermiyogenez bir yuvarlak Sa spermatidin bir spermatozoona dönüştüğü olgunlaşma işlemidir (Şekil 2). Bu aşamada artık hücre bölünmesi meydana gelmez ancak bazı sitoplazmik ve nükleer değişiklikler oluşur. Akrozom, Golgi cisimciğinden hücre iskeletinin katılımıyla oluşur ve sperm nükleusunun etrafını kaplar (Gilbert, 2000; Neto ve ark., 2016). Nükleer histonların yaklaşık %85'i protaminlerle yer değiştirilerek nükleusun daha sıkı paketlenmesine yol açar. Spermatidin şekli kademeli olarak uzar ve mikrotübüller sperm flagellasını oluşturmak üzere 2+9 düzenini oluşturmaya başlar (Şekil 3) (Neto ve ark., 2016; Gunes ve ark., 2018).



Şekil 3: Sperm flagellası ve mikrotübül yerleşimi, aksonem kesiti (Gunes ve ark., 2018)

Mikrotübüllere ek olarak yoğun dış fiberler ve fibröz kılıf da flagellar hareket düzenine destek sağlayacak şekilde organize olur (Eddy ve ark., 2003). Mitokondria sayısını artırır ve orta cisimciği oluşturmak için kuyruk temelinin çevresine toplanır (Şekil 3). Spermatozoanın hareketliliğini en üst seviyeye çıkarmak için, Golgi cisimciğinin kalıntıları ve diğer organelleri içeren fazla sitoplazma atılarak Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir (Neto ve ark., 2016). Sonuçta oluşan spermatozoa tübül lümenine salınır (Gilbert, 2000).

Kapasitasyon spermatozanın fertilizasyona hazırlandığı aşamadır. Fertilizasyon sırasında kapasitasyonunu tamamlamış spermatozoon ovumun kümülüs ooforusuna penetre olur ve sonra zona pellusidaya plazma membranını birleştirerek bağlanır. Yumurtanın zona pellusidasına bağlandıktan sonra spermatozoon akrozom reaksiyonu adı verilen ekzositotik bir evreye girer. Akrozom reaksiyonu fertilizasyon için gereklidir, çünkü spermatozoonun zona pellusida içinden geçmesini ve yumurta oolesiyle füzyonuna olanak verir (Ickowicz ve ark., 2012). Kapasitasyonda bikarbonat konsantrasyonunun ve hücre içi pH'ın artmasına bağlı olarak kolesterolün plazma membranından akışı, lipid yataklarının anterior hareketi, hiyalüronidaz enzimi ve zona pellusida için reseptörlerin yüzey ekspresyonlarında değişiklikler, hücre içi siklik adenosin monofosfat seviyesinin artışı ve hiperaktif hareket gibi birçok biyokimyasal ve hücrel değişiklik meydana gelir (Aitken ve Nixon, 2013).

2.3. Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri

Erkek infertilitesi genetik ve epigenetik nedenlerden kaynaklanan karmaşık etiyolojili bir hastalıktır. Karyotip anormallikleri, Y-kromozomu mikrolelesyonları ve kistik fibrosiz transmembran regülatör (*CFTR*) geni mutasyonları azospermi ve şiddetli oligospermimin (severe oligospermia, SO) iyi bilinen genetik nedenleri arasında yer almaktadır. Bu nedenlerin yanı sıra infertil erkeklerin gamet kök hücrelerinde DNA metilasyonu, DNA'yı paketleyen histon proteinlerinin kuyruklarında yer alan epigenetik değişiklikler, histon protamin oranı, mutasyonlar, DNA hasarı ve fragmantasyonu sıklıkla görülebilmektedir.

2.3.1. Kromozom Bozuklukları

Karyotip analizi spermatogenik bozuklukları olan hastalarda ilk istenen genetik testtir. Kromozom bozuklukları infertil erkeklerin yaklaşık %6'sında görülür. Azospermik erkeklerde prevalans %15'e kadar çıkabilmektedir (Song ve ark., 2016).

Klinefelter Sendrom (47,XXY)

Erkeklerde nonobstrüktif azospermiye (NOA) neden olan, en yaygın görülen sayısal kromozom bozukluğu ve cinsiyet kromozomu anomalisidir (Wikstrom ve Dunkel, 2011). Prevalansı yaklaşık 2/1000'dir (Franik, Hoeijmakers ve ark. 2016). Klinefelter sendromlu (KS) erkeklerde normal kromozom kuruluşuna ek olarak bulunan ikinci X-kromozomu yüzünden primer testiküler yetmezlik vardır (Song ve ark., 2016). Fazla X-kromozomu paternal ya da maternal mayozda ayrılmama sonucu ortaya çıkar. KS'de olguların %10-20'si mozaik (46,XY/47,XXY) ya da daha yüksek dereceli X anöploidili (48,XXX, 48,XXYY, 49,XXXXY) olduğu için olgularda geniş bir fenotipik dağılım gözlenir (Wikstrom ve Dunkel, 2011; Franik ve ark., 2016; Song ve ark., 2016).

47,XYY

Yaklaşık 1/1000 canlı erkek doğumda görülen, KS'den sonraki en yaygın cinsiyet kromozomu anomalisidir. 47,XYY paternal mayozda ayrılmama yüzünden gerçekleşirken, postzigotik mitozlarda mozaik ayrılmama formlarına (46,XY/47,XYY) neden olur (Kim ve ark., 2013). XYY'li erkekler normalin üzerindeki boyları dışında fenotipik olarak normaldirler (Behre ve ark., 2000). Normozoospermiden azospermiye kadar değişken sperm sayılarına sahip olabilirler. Bu erkekler fertil olabilmelerine

rağmen yapılan çalışmalar bu erkeklerin semenlerinde anormal kromozomlu sperm insidansının arttığını bildirmiştir (Kim ve ark., 2013; Song ve ark., 2016).

46,XX Erkekler

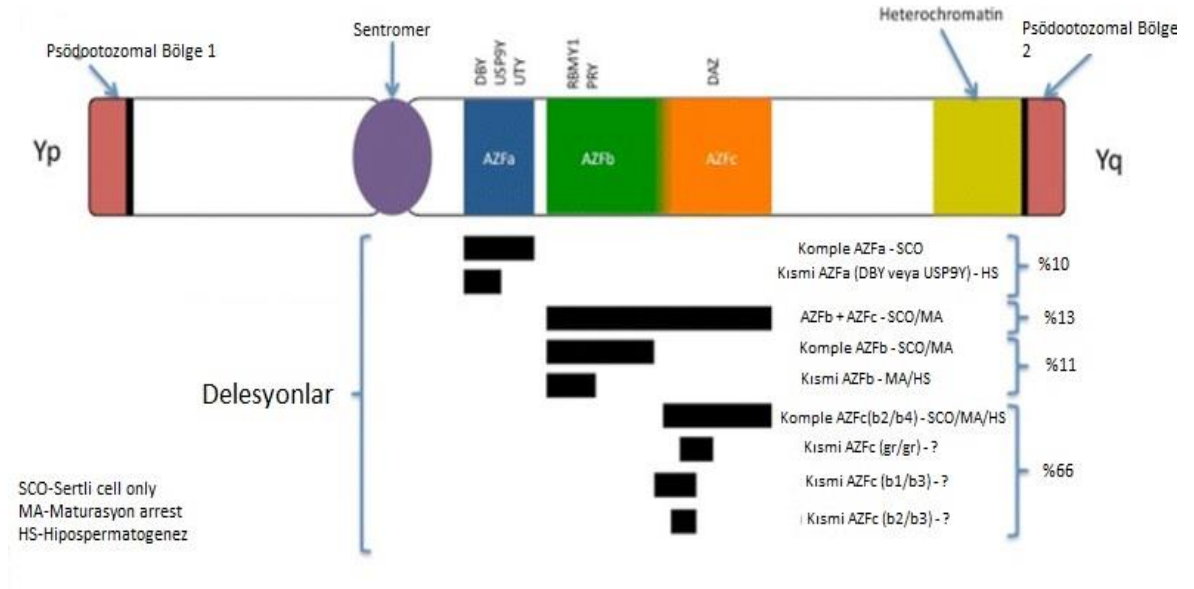
46,XX sendromu (Testicular Disorder of Sex Development, testiküler DSD), yaklaşık 20000 canlı erkek doğumda bir meydana gelen nadir bir genetik sendromdur (Gunes ve ark., 2013; Song ve ark., 2016).

Testiküler DSD sendromlu erkekler üç fenotipten birini gösterirler: Klasik 46,XX hastalar erkek internal ve eksternal genitalyaya sahiptir ve genellikle ergenlikten sonra infertilite tedavisinde tanı alırlar. 46,XX ambiguous genitalialı hastalar eksternal genitalyada belirsizlik (mikropenis ya da hiperklitoridi gibi) gösterirler. XX gerçek hermafroditler de internal ya da eksternal genital belirsizlik gösterir ve doğduklarında fark edilirler. Farklı fenotipler gözlense de testiküler DSD sendromlu erkekler AZF bölgeleri olmadığı için infertilidir. Yaklaşık %80'inde Y-kromozomu cinsiyet belirleyici bölgenin (sex-determining region Y, SRY) X-kromozomuna ya da bir otozoma translokasyonu görülür. Geriye kalanı SRY-negatif 46,XX erkeklerdir. *SRY*-negatif hastalarda, *SRY*'nin gizli gonadal mozaisizmi, bazı otozomal ya da X üzerinde erkek üreme sistemi yolaklarını baskılayan genlerdeki mutasyonlar ya da *SRY*'nin aşağı yolağındaki cinsiyet belirleyici genlerin ekspresyonunun değişmesinin testiküler doku oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir (Li ve ark., 2014).

Y-kromozomu bozuklukları

Erkek cinsiyet farklılaşması için gerekli olan Y-kromozomunun yapısı heterojendir ve beş farklı tip diziden oluşur. İlk bölge, psödootozomal bölge (PAR), Y- ve X-kromozomlarının uç bölgesinde bulunan ve X ve Y arasındaki homolog rekombinasyonun gerçekleştiği dizileri kapsar (PAR1 ve PAR2). Diğer bölgeler, psödootozomal bölgeler arasında kalan X-aktarılan, X-dejenere, amplikonik ve heterokromatik diziler bir arada Y-kromozomunun erkeğe özgü bölgesini (male specific region of Y chromosome, MSY) meydana getirir. Amplikonik diziler, diğer ökromatik dizilerden farklı olarak çok sayıda tekrar içeren ve genelde palindromik yerleşmiş duplike dizilerdir. Palindromik diziler, testis spesifik fonksiyonları olan dokuz farklı gen ailesinden 60 amplikonik gen taşırlar. Tekrar bölgelerinin birbirlerine oldukça benzer olması nedeniyle (>%99,9), bu bölgelerde inter ve intrakromatid resiprokal

rekombinasyon (ektopik rekombinasyon) oldukça fazla gözlenir. Ektopik rekombinasyon sperm sayısının azalması gibi şiddetli fenotipik etkileri olan delesyonlara, inversiyonlara ve duplikasyonlara neden olur (Hughes ve Rozen, 2012).



Şekil 4. Y-kromozomu mikrodelesyonları (Neto ve ark., 2016)

a. Y- kromozomundaki delesyonlar (Şekil 4) erkek infertilitesinin en iyi bilinen genetik nedenlerindendir. NOA ve SO hastalarının %10-15'inde gözlenirler. Spermatogenez bozukluklarıyla ilişkili olan mikrodelesyonlar Y-kromozomun uzun kolu (Yq) üzerindedir ve çoğunlukla *de novo* oluşur (Hotaling ve Carrell, 2014). İlk Y-kromozomu mikrodelesyonu 1976'da azospermik bir hastada tanımlanmıştır ve araştırmacılar o bölgede azospermi faktör (AZF) isimli bir genin varlığını ortaya koymuşlardır (Tiepolo ve Zuffardi, 1976). AZF bölgesi 3 alt bölge içerir: AZFa, AZFb ve AZFc (Song ve ark., 2016).

AZFa: Yq'nun proksimalinde 792 kb uzunluğunda bir bölgedir. AZFa içinde tekrarlı bölgeler bulunmaz. AZFa bölgesindeki delesyon sıklığı (NOA'lı erkeklerde %0,28), AZFb ve AZFc bölgelerine oranla daha düşüktür. İki önemli gen içerir: USP9Y ve DBY (DDX3Y). DBY, testiste lokalize olan ve premayotik germ hücrelerinin gelişiminde rol oynayan bir protein kodlar. USP9Y gen ürünü de spermatogenezde rol oynar. Bu genin delesyonu azospermi ya da oligozoospermiye neden olur. Bu iki genin

delesyonunun azospermi ya da Sertoli-cell only (SCO) sendromuyla sonuçlandığı bildirilmiştir (Song ve ark., 2016).

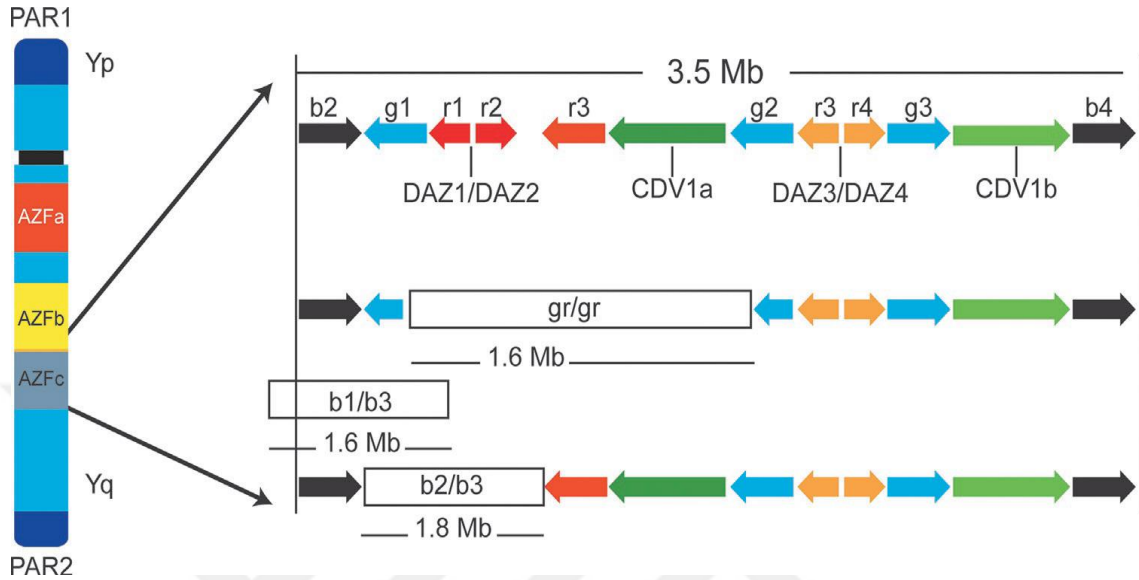
AZFb: Bu bölgede bulunan *RBMY* geninin Y-kromozomu üzerinde altı kopyası bulunur. *RBMY1* ve *PRY* genleri sırasıyla testis özgü kesme faktörü ve apoptotik yolda rol alan birer protein kodlar. Bu iki genin delesyonla kaybı spermatogenezde arreste yol açar (Hotaling ve Carrell, 2014).

AZFc: En yaygın görülen AZF delesyonudur; AZFc bölgesindeki delesyonlar NOA'lı erkeklerin %10'unda bulunur ve tüm erkeklerde 1/4000 sıklıkta gözlenir (Hotaling ve Carrell, 2014). Spermatogenezde rol oynayan önemli genler içerir. Y-kromozomunda 4 kopya olarak bulunan *DAZ* genleri iyi bilinen örneklerdendir. *DAZ* genleri germ hücre gelişiminin tüm aşamalarında eksprese edilirler. Bu genlerin delesyonları oligospermiden azospermiye kadar değişen fenotiplere neden olabilir. AZFc mikrodelesyonları parsiyel veya tam delesyonlar halinde olabilir (Abur ve ark., 2019). Parsiyel delesyonlardan en sık gözlenenler gr/gr ve b2/b4 delesyonlarıdır (Beyaz ve ark., 2017; Gunes, 2018) (Şekil 5).

AZF mikrodelesyonlarda çok kesin olmamakla birlikte genotip-fenotip korelasyonu bulunmaktadır. Genelde AZFa ve AZFb bölge delesyonu olan bir erkekte sperm gözlenmesi pek olası değilken, AZFc delesyonlu erkeklerde cerrahi sperm ekstraksiyonuyla sperm elde etme şansı çok daha yüksektir (%70'e kadar). Ancak, AZF bölgesindeki genlere ve delesyon tipine bağlı olarak çalışma sonuçlarında farklılıklar olabilmektedir (Song ve ark., 2016).

b. Y-kromozomunun amplikonik yapısı delesyonların yanı sıra Y-kromozomunun iki kardeş kromatidinin çeşitli noktalarında ektopik rekombinasyonla füzyonlara neden olur ve sonuçta izodisentrik Y-kromozomu meydana gelir. Kısa kolların kaybı ve iki Yq'nun birleşmesi (idicYq) *SRY*'nin kaybı yüzünden XY gonadal disgenezi ve cinsiyet dönüşümüne yol açar. XY gonadal disgenezi *SRY*'nin kaybı ya da *SRY*'deki nokta mutasyonlarla meydana gelir. Bu olgularda gonadlar testise farklılaşmaz ve ayrıca fonksiyonel ovaryumlar da oluşmaz. İki kısa kolun füzyonu daha sıklıkla gerçekleşir (idicYp) ve iki farklı klinik sonucu gözlenir. idicYp'nin mitotik olarak kararsız olması nedeniyle hücrelerde 45,X/46,X,idicYp mozaizmi gözlenir. idicYp kromozomunda spermatogenez için önemli genler taşıyan distal dizilerin yokluğu spermatogenik bozukluklara yol açar. Ayrıca, idicYp üzerinde iki PAR1 bölgesinin

bulunup PAR2 bölgesinin olmaması mayozda hatalara yol açabilir (Hughes ve Rozen, 2012).



Şekil 5. b2/b4 ve gr/gr delesyonlarının yerleşimi (Gunes, 2018)

2.3.2. Gen Mutasyonları

Kistik Fibroz (CF)

Konjenital bilateral vas deferens agenezi (CBAVD) infertil erkeklerin %1'inde bulunur ve vas deferens yokluğu (bazı olgularda epididimisin distal kısmı), hipoplastik seminal veziküller, seminal hipovolemi (<1 ml) ve sonuçta asidik ejakulat ve obstrüktif azospermi ile karakterizedir. CF hastalarının hepsinde CBAVD gözlenir. Kuzey Avrupalı ırkta 1/1600 görülme ve 1/25 taşıyıcı sıklığı bulunmaktadır (Song ve ark., 2016).

Kallman Sendromu

Anosmia ya da hiposmia ile birlikte görülen idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm olarak tanımlanır. Kallman Sendromlu erkekler X-kromozomu üzerindeki *KALI* geninde veya 8. kromozom üzerindeki fibroblast büyüme faktör reseptörü 1 (*FGFR1*) geninde delesyonlar taşırlar. *KALI* gonadotropin salgılatıcı hormon nöronlarının göçünden sorumlu olan anosmin 1 adı verilen bir adhezyon molekülü kodlar. *FGFR1* delesyonu ise sendromun anosmik veya hiposfik formlarına neden olur (Song ve ark., 2016).

Konjenital Hipopituitarizm

Testiküler yetmezlikle sonuçlanan hipogonadotropik hipogonadizmle ilişkilidir. Mutasyona uğrayan genler: *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *PROX1*, *POU1F1*, *SOX3* ve *SOX2*'dir (Song ve ark., 2016).

Leydig Hücre Hipoplazisi

Genetik temelli olan ve testiküler yetmezliğe yol açan nadir bir durumdur. LH reseptörü genindeki mutasyonlar Leydig hücre hipoplazisine sebep olur. Hastalığın hafif formunda hipogonadizm gözlenirken, şiddetli formda psödohermafrodizm gözlenir (Song ve ark., 2016).

2.3.3. Polimorfizmler

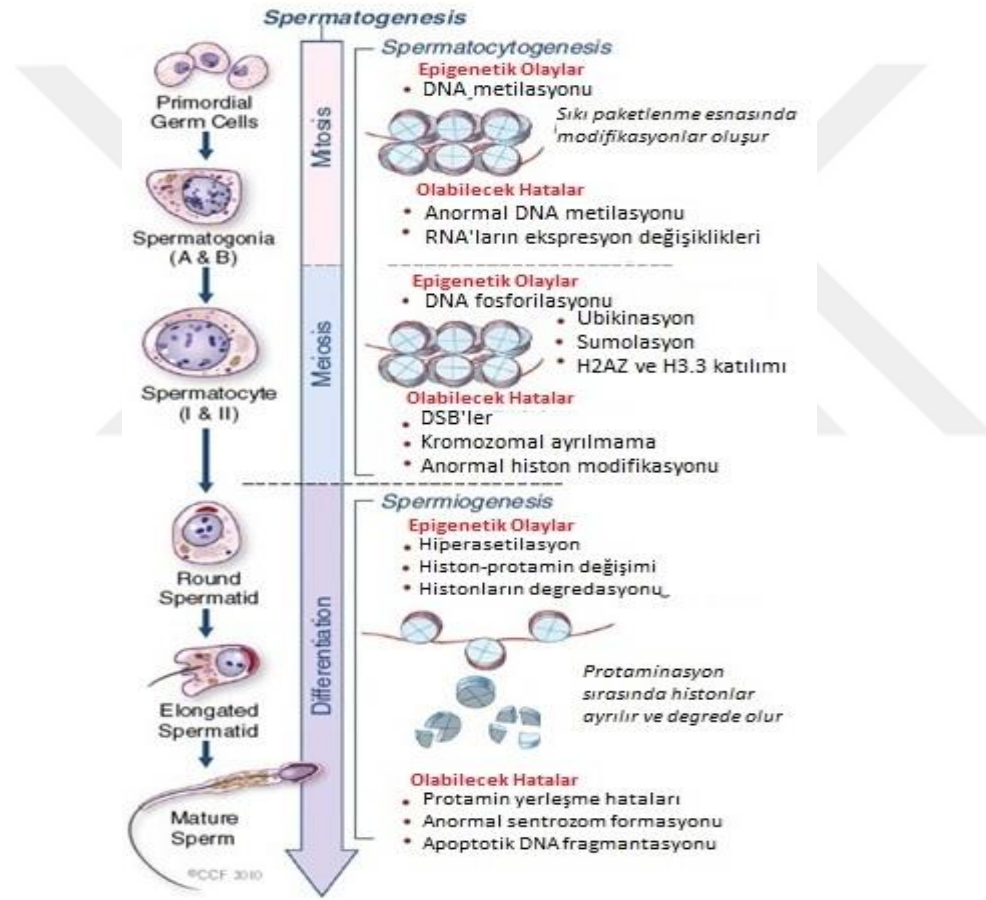
Bilinen mutasyonların değerlendirilmesinden sonra primer testiküler yetmezliğin yaklaşık %40'ı idiyopatik olarak kalır (Krausz ve ark., 2015). 2000'li yılların başından itibaren geliştirilen yeni yöntemlerle erkek infertilitesinde tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), değişken sayıda bitişik tekrarlar (VNTR) ve kopya sayısı varyasyonları (CNV) araştırılmaya başlanmıştır. Literatürdeki polimorfizm araştırmalarının sonuçları çeşitlilik göstermektedir. Çalışmalar arasındaki farklılık etnik/coğrafik, fenotipik ve örneklem büyüklüğü farklarından kaynaklanmaktadır (Hotelling ve Carrell, 2014; Krausz ve ark., 2015).

Farklı meta-analizlerde metilentetrahidrofolat redüktaz (*MTHFR*) genindeki c.677C>T polimorfizmi erkek infertilitesiyle ilişkili bulunmuştur (Tuttelmann ve ark., 2007; Gupta ve ark., 2011). *MTHFR*, 1p.36.22'de bulunur ve folat metabolizmasıyla ilişkili bir gen kodlar. Folat, genom bütünlüğünün devamı ile DNA'nın sentezi, onarımı ve metilasyonu için gereklidir. Östrojen reseptörü 1 ve 2 (*ESR1* ve 2) genleri, nitrik oksit sentaz 3 (*NOS3*) geni, *DAZL*, *CYP11A1*, androjen reseptörü (*AR*) geni, *TP53* ve *USP26* de aday gen yaklaşımı içerisinde polimorfizmleri çalışılan diğer genlerdendir (Krausz ve ark., 2015). Farklı populasyonlarda yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında ise farklı genlerdeki (*PMRT6*, *PEX10*, *SOX5*, *HLA-DRA*, *C6orf10/BTNL2* gibi) SNP'ler erkek infertilitesiyle ilişkili bulunmuş ancak ortak bir SNP saptanamamıştır (Aston ve Carrell, 2009; Hu ve ark., 2012; Zhao ve ark., 2012). CNV'ler arasında ise spermatogenez bozukluklarıyla ilişkili olduğu kesinleşen tek varyant AZF mikrodelsyonlarıdır (Krausz ve ark., 2015).

2.4. Erkek İnfertilitesinin Epigenetik Nedenleri

Erkeklerde gametlerin farklılaşması sırasında homolog rekombinasyonla genetik bilgi değişir, ayrıca epigenetik bilgi de değişikliğe uğrar. Bu epigenetik değişimler sperm genomunun global/gen-spesifik metilasyonu, histon/protamin değişikliği ve histon modifikasyonları ile kromatinin yeniden şekillenmesi ve kısa kodlanmayan RNA'lar yoluyla meydana gelir (Dada ve ark., 2012; Gunes ve ark., 2016).

Spermatogenez sırasındaki epigenetik değişimler Şekil 6'da özetlenmiştir.



Şekil 6. Spermatogenez sırasındaki epigenetik olaylar (Dada ve ark., 2012)

2.4.1. Protaminasyon

Fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için spermin oldukça özelleşmiş bir yapı kazanması gerekir (Şekil 7). Spermiyogenezde sperm kromatinindeki histonların %85-

95'inin protaminlerle yer değiştirmesi bu özelleşmeye bir örnektir (Gunes ve Kulac, 2013; Gunes ve ark., 2016). Protaminasyon sperme özel bir epigenetik düzenlenmedir ve paternal DNA'nın sıkıştırılmasını sağlar. Kromatin yapısının değişmesi hem sperm motilitesi için gereklidir hem de genomu oksidasyondan, mutajenlerden, nükleazlardan ve kadın üreme sistemindeki diğer zararlı moleküllerden korur (Carrell, 2012; Francis ve ark., 2014).

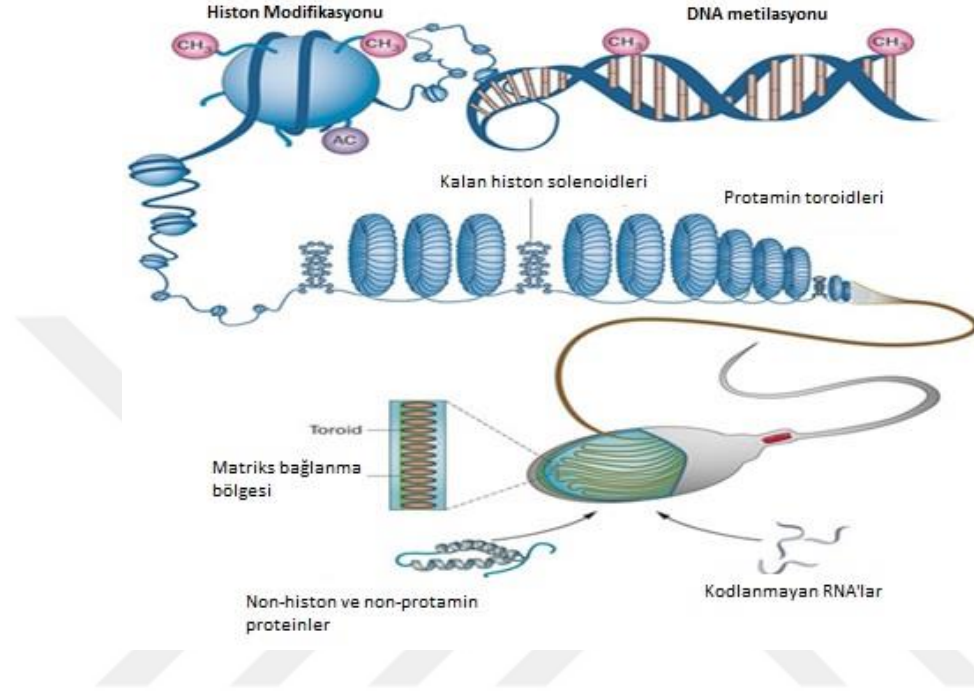
Sperm kromatinin yeniden düzenlenmesinde önce kromatin yapısına katılan testis spesifik histon 2B (TH2B) gibi histon varyantları hiperasetile olur. Bu şekilde kromatin daha gevşek bir yapı kazanır ve topoizomerazlar DNA sarmalına girebilir. Topoizomerazlar DNA'da zincir kırıkları oluşturur ve böylece histonlar geçiş proteinleriyle (Transition proteins, TP1 ve TP2) yer değiştirir (Gunes ve Kulac, 2013; Francis ve ark., 2014). TP'lerin tamamı daha sonra protaminlerle (protamin1 ve protamin2, P1 ve P2) yer değiştirir ve paternal DNA toroid formuna ulaşır. P1 ve P2 farklı bölgelerindeki serin rezidülerinden fosforillenir ve epididimiste sistein rezidülerinin arasında disülfid bağları ve çinko köprüleri oluşarak toroidal yapının stabilizasyonu sağlanır (Carrell, 2012; Francis ve ark., 2014; Castillo ve ark., 2015)

İnsanlarda P1:P2 oranı yaklaşık olarak 1'dir (0,8-1,2). Nükleoprotamin yapısındaki bir hata ya da P1:P2 oranındaki sapmalar paternal DNA'yı nükleaz ve ROS'lara karşı daha savunmasız hale getirerek spermatogenez hatalarına ve infertiliteye neden olabilmektedir (Aoki ve ark., 2005; Aoki ve ark., 2006; Carrell ve ark., 2008; Carrell, 2012; Dada ve ark., 2012; Francis ve ark., 2014; Gunes ve ark., 2016). P1:P2 oranındaki sapmalara protaminlerin ekspresyonunun düzenlenmesindeki ve histon yer değişimindeki hatalar, protamin kodlayan genlerdeki SNP'ler, metal ve pestisitlerle etkileşimler neden olabilir (Francis ve ark., 2014).

2.4.2. Genom Boyu ve Gen Spesifik Metilasyon

Spermatozoa kendine özgü DNA metilasyon özelliğine sahiptir. Bazı genler maternal ya da paternal kalıtlı olmalarına bağlı olarak metillenir. İmprintlenme denilen bu olay gen ekspresyonunu, allelin parental orijinine göre değiştirir (Gunes ve ark., 2016). Embriyonun erken evrelerinde primordial germ hücrelerinde (PGC) gerçekleşen genom boyu demetilasyon, epigenetik hafızayı siler ve böylece epigenetik işaretlerin ve epimutasyonların sonraki nesle taşınmasını önler (Laurentino ve ark., 2015, Eguizabal ve ark., 2016). Aktif DNA demetilasyonu için gerekli olan TET 1-3

(ten-eleven translocation) enzimleri spermatogenezin farklı aşamalarında eksprese olurlar ve ekspresyon seviyeleri erkek infertilitesiyle ilişkili bulunmuştur (Ni ve ark., 2016). Demetilasyondan sonra DNA metil transferazlarca (DNMT) remetilasyon işlemi başlar, böylece spermatozoa paternal olarak imprintlenir (Gunes ve ark., 2016).



Şekil 7. Spermde kromatinin yeniden yapılanması (Schagdarsurengin ve ark., 2012)

İmprint bölgelerindeki hatalı DNA metilasyonu ve DNMT'lerdeki mutasyonlar ve polimorfizmler erkeklerde infertiliteyle ilişkili bulunmuştur (El Hajj ve ark., 2011; Niles ve ark., 2013; Kitamura ve ark., 2015; Laurentino ve ark., 2015; Gunes ve ark., 2016).

İmprint genleri dışında, birçok çalışmada, tekrar dizilerinin genom boyu metilasyon değişiklikleri ve non-imprint genlerin hatalı metilasyonları ile anormal sperm parametreleri arasında ilişki belirtilmiştir (Kitamura ve ark., 2015; Gunes ve ark., 2016).

Kromatin yapısındaki histonlar somatik hücrelerde histon varyantlarıyla yer değiştirir ya da kuyruklarındaki amino asit rezidülerinden kimyasal modifikasyona uğrar. Böylece hücrenin doku spesifik gen ekspresyonunun kontrolüne katkıda bulunurlar (Miller ve ark., 2010). Genel olarak H3'ün 9. lizininin metilasyonu (H3K9me) transkripsiyonel olarak inaktif DNA ile ilişkilidir. H3'ün 4. lizininin metilasyonu (H3K4me) ise tersine aktif genlerin promotorlarında yoğun olarak bulunur.

Germ hücrelerinin histon modifikasyonları gelişmeleri esnasında sürekli değişir (Dada ve ark., 2012). Premayotik primordial germ hücrelerinde ve spermatogoniada H3K9me ve H3K4me seviyesi düşüktür, gen baskılayıcı H3K27me3 seviyesi yüksektir ve H4 deasetiledir (Dada ve ark., 2012; Stuppia ve ark., 2015; Eguizabal ve ark., 2016). Mayoz sırasında *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *DNMT3L* eksprese olur ve onların aktiviteleri *de novo* DNA metilasyonunu düzenler. Sonrasında metilasyon profili DNMT1 aktivitesiyle devam ettirilir. Spermatogoniada paternal metilasyonu oluşturmak için kademeli bir DNA metilasyonu meydana gelir. Spermatozoidlerde H3K4 ve H3K9 metilasyonu gözlenir. Yuvarlak spermatidlerde H4 hiperasetile hale gelir. DNMT1 eksprese olur ve histonlardan TP'lere geçiş gözlenir. Spermioyogenez aşamasındaki uzamış olan spermatidlerde H3K9 demetile olur ancak DNA metilasyonu devamlılığını sürdürür. Bu aşamada TP'lerden protaminlere geçiş olur. Spermatozoada genomik imprinting korunur (Stuppia ve ark., 2015).

2.4.3. Kısa Kodlanmayan RNA'lar

Erkek germ hücre hattındaki kodlanmayan RNA'lar üç temel grupta incelenebilirler: mikro RNAlar (miRNA), küçük etkileşimli RNAlar (siRNA) ve P-element induced wimpy testis (PIWI) etkileşimli RNAlar (piRNA) (Luo ve ark., 2016). Kısa kodlanmayan RNA'lar evrimsel olarak korunmuş protein ailelerine bağlanırlar. Bu protein ailelerinden olan Argonat proteinleri miRNA ve siRNA'lara bağlanır ve hem somatik hücrelerde hem de germ hücrelerinde bulunurlar. PIWI proteinler ise piRNA'lara bağlanır ve çoğunlukla germ hücrelerinde bulunurlar (de Mateo ve Sassone-Corsi, 2014). miRNA'lar, endojen siRNAlar ve piRNAların üçü de erkek germ hücrelerinde eksprese olur ve spermatogenez için gereklidirler. miRNA'lar ve siRNA'lar spermatogenez boyunca sıklıkla eksprese olurken, piRNA'lar sadece yuvarlak spermatidlerde ve pakiten aşamasındaki spermatozoidlerde bulunur (Gunes ve ark., 2016).

Spermatogenezde miRNA ve endojen siRNA yolları arasındaki fonksiyonel farklılıkları araştırmak için, bu iki kodlanmayan RNA'nın biyogenezinde rol alan Drosha ve Dicer nakavt fareleri kullanılmıştır (Yadav ve Kotaja, 2014). Drosha ve Dicer nakavt fareler spermatogenez hatalarından kaynaklı infertildir (de Mateo ve Sassone-Corsi, 2014; Gunes ve ark., 2016). Dicer nakavt modellerine kıyasla Drosha nakavt modelleri daha ciddi hasarlar almışlardır. Bu durum miRNAların spermatogenez ve

fertilite için daha önemli olduklarını düşündürür (Yadav ve Kotaja, 2014; Gunes ve ark., 2016). Ekspresyon çalışmalarının yanı sıra bu enzimleri kodlayan genlerdeki SNP'ler de erkek infertilitesiyle ilişkili bulunmuştur (Gunes ve ark., 2016).

Erkek germ hücrelerinde toplam 73 endojen siRNA tanımlanmıştır (Kotaja, 2014; Yadav ve Kotaja, 2014). Bu endojen siRNA'ların hedefleri çoğunlukla mRNA'dır. Ayrıca psödogenlere, retrotranspozonlara ve kodlanmayan RNA'lara da bağlanırlar (Yadav ve Kotaja, 2014).

piRNA'lar ise kısa kodlanmayan RNA'ların daha spesifik bir üyesidir ve susturma işlevini PIWI proteinleriyle (fare ortologları MIWI, MIWI2, MILI) beraber gerçekleştirir. Biyogenezleri tam olarak bilinmemekle birlikte Dicer'dan bağımsızdır. piRNA'lar ve PIWI proteinler, yer değiştirebilen genetik elementlerin susturulması, translasyonun düzenlenmesi, PGC'lerin yeterliliği ve göçü, RNA'ların parçalanması ve hücrel savunmada rol oynar. MIWI mutasyonlu farelerde spermatogenez erken yuvarlak spermatid evresinde durur (de Mateo ve Sassone-Corsi, 2014; Luo ve ark., 2016). PIWI genlerindeki polimorfizmler insanda spermatogenetik hata riskini arttırıcı etki yapabilir (Luo ve ark., 2016). PIWI genlerinin anormal metilasyonu spermatogenez hatalarıyla ilişkili bulunmuştur (Heyn ve ark., 2012).

2.5. Sperm DNA Hasarı

DNA hasarı, DNA fragmantasyonu (tek ve çift zincir kırıkları), baz modifikasyonları, delesyon ve insersiyonlar gibi DNA'nın yapısındaki değişimlerdir (Sharma ve ark., 2013). Literatürde sperm DNA hasarının nedeninin tanımlanmasında üç temel teori önerilmiştir: ROS, sperm kromatin paketlenmesi ve tamamlanmamış apoptoz (Gunes ve ark., 2015).

2.5.1. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species, ROS) dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron(lar) içeren oksijen metabolitleridir. Eşleşmemiş elektronları nedeniyle yüksek derecede reaktiftirler ve lipidler, proteinler, kompleks karbonhidratlar ve nükleik asitlerle kimyasal reaksiyona girebilirler (Aprioku, 2013). Süperoksit anyonları(O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^\bullet) iyonları ile nitrik oksit (NO) en iyi bilinen ROS'lardandır (Molteni ve ark., 2014).

Spermatozoada ROS üretimi normal fizyolojik bir süreçtir. ROS'lar sinyal iletim mekanizmalarında önemli araçlardır, sperm kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-oosit birleşiminin düzenlenmesinde rol oynarlar (Koksal ve ark., 2003; de Lamirande ve Lamothe, 2009). ROS insan spermatozoası tarafından NADPH oksidaz sistemiyle sperm plazma membranında ya da elektron transport zincirindeki elektron sızıntıların sonucunda mitokondride oluşur (Aprioku, 2013). Ayrıca toksinlere, biyolojik tehlikelere, radyasyona, aşırı ısıya, bazı ilaçlara ve ağır metallere maruz kalmak ve sigara içmek de eksternal olarak testis ve epididimiste ROS üretimine katkıda bulunabilir (Lavranos ve ark., 2012).

İnsan spermatozasi yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi içerdiğinden, ROS'ların aşırı birikimi sonucu oluşan oksidatif stresin ilk hedefi spermatozoanın lipid membranı, ikincil olarak da yapısal proteinler ve nükleik asitler gibi major biyomoleküllerdir (Lavranos ve ark., 2012). Spermde sitoplazma oranı oldukça azdır bu sebeple hem süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi koruyucu enzimler açısından fakirdir hem de rezidual sperm sitoplazması spermin orta bölgesinde yoğunlaşmış durumdadır, bu yüzden burada bulunan herhangi bir antioksidan, spermin başından kuyruğuna uzanan plazma membranına koruyuculuk sağlamamaktadır (Agarwal ve ark., 2005). Oksidatif stres DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, ve apoptoza yol açarak sperm canlılığı, hareketliliğini ve fertilizasyon potansiyelini azaltır (Koksal ve ark., 2003; Gunes ve ark., 2015).

2.5.2. Sperm Kromatin Paketlenmesi

Haploid sperm kromatini, histonların büyük çoğunluğunun önce geçiş proteinleriyle sonra da protaminlerle yer değiştirmesi sonucu oldukça sıkı paketlenir. Spermde kromatinin yeniden paketlenmesi sırasında topoizomerez II tarafından DNA zincir kırıkları meydana gelir. Bu şekilde sperm kromatinin yeniden modellenmesi sırasında ortaya çıkan torsional stres rahatlatılır (Ioannou ve ark., 2016).

Protaminin temel bileşeni olan arginin DNA zincirindeki fosfat gruplarının güçlü negatif yüklerini nötralize eder. Protaminlerde bulunan sisteinler ise disülfid çapraz bağlarla dayaklılığı artırır. Disülfid çapraz bağları spermatozoanın epididimisten geçişinde artar. Böylece protamin paketlenmesi sonrasında oluşan toroid formu daha kompakt hale gelir. Her kromozom toroid çelengi haline gelerek nükleer interiorda kromo-merkezleri oluşturan sentromerlerinden kümeleşirler. Telomerler de nükleer

periferde dimer ya da tetramer yapısı oluştururlar (Ioannou ve ark., 2016). Kompakt sperm DNA'sı *in vitro* olarak indirgeyici ajanlar olmadan dekondanse edilemez haldedir (Ward, 2010).

Normal olarak kromatinin yeniden paketlenmesi ve DNA bütünlüğünün yeniden sağlanması epididimal geçiş esnasında tamamlanmış olur. Ancak epididimal geçişten sonra spermatozoada endojen kırıkların bulunması spermiyogenezde kromatin paketlenmesindeki bir hatayı ve tamamlanmamış maturasyon aşamasını işaret eder (Andrabi, 2007).

2.5.3. Apoptoz

Apoptozun normal spermatogenezde iki rolü vardır: Sertoli hücreleri tarafından desteklenen germ hücre popülasyonunu sınırlandırmak ve anormal spermatozanın seçici olarak yok edilmesi (Gunes, ve ark., 2015).

Testislerde meydana gelen germ hücre apoptozunun araçlarından biri Fas/FasL sistemidir. Fas, Fas ligandına (FasL) bağlandığında apoptozu başlatır. FasL Sertoli hücreleri tarafından bol miktarda eksprese edilirken testiküler germ hücreleri de Fas mRNA ve proteini eksprese eder. Fas/FasL sistemi, normal spermatogenezdeki rolüne ek olarak testiküler yaralanmalarda da apoptozu artırır (Sakkas ve ark., 2004). Apoptotik belirteçler taşıyan spermatozoalar anormal morfoloji, bozulmuş biyokimyasal fonksiyon ya da nükleer DNA hasarı gösterebilirler (Gunes ve ark., 2015). Ejakulattaki spermatozoada Fas varlığı düşük sperm konsantrasyonu ve anormal morfoloji ile korelasyonlu bulunmuştur. Bcl-x, p53 ve annexin V gibi diğer apoptotik markerler da anormal semen parametreleriyle ilişkili bulunmuştur (Sakkas ve ark., 2004).

2.5.4. Sperm DNA Fragmentasyonu

DSB'ler kromozomal karasızlığı indüklemeleri ve kromozomal yeniden düzenlenmelerin artmasına yol açmaları nedeniyle en önemli DNA hasarı tipidir (Menezo ve ark., 2010). Erkek germ hücrelerinde DNA bütünlüğü belli bir aşamaya kadar aktif olarak korunur. Ancak onarımın etkinliği, sitoplazmik içeriğin azalması ve DNA'nın daha sıkı paketlenmesi nedeniyle spermiyogenez ile birlikte kaybolmaya başlamaktadır. Spermatozoanın, epididimisteki geçişinde ve depolanmasında ve ejakulasyon sonrasında meydana gelen DNA hasarlarını onarabilecek mekanizması bulunmaz (Gonzalez-Marin ve ark., 2012). Bu nedenle bu aşamadaki spermatozoa DNA

hasarının birikmesine oldukça müsaittir (Marchetti ve ark., 2015). Sperm DNA bütünlüğünün bozulması paternal üreme potansiyelini negatif yönde etkiler (Aitken ve De Iuliis, 2010). Çok sayıda çalışma infertil erkeklerdeki sperm DNA kırıklarının ya da farklı DNA hasarlarının, fertil erkeklerden daha fazla olduğunu göstermiştir (Giwerzman ve ark., 2010; Ramos-Ibeas ve ark., 2014). Semen analizinde düşük sperm sayısı, azalmış hareketlilik ve anormal morfoloji (OAT) sıklıkla yüksek sperm DNA hasarıyla birliktelik görülmektedir (Schulte ve ark., 2010; Gunes ve ark., 2015). Fertilizasyondan sonra hasarlı sperm DNA'sı bir ölçüde ovumun onarım mekanizmalarıyla onarılır (Menezo ve ark., 2010). Maternal olarak onarılamayan sperm DNA hasarı, özellikle DNA fragmentasyonu, infertilitenin yanı sıra, hem doğal yollarla hem de yardımcı üreme teknikleriyle meydana gelen gebeliklerde düşüklere, embriyonal gelişim bozukluklarına, doğumsal ve kromozomal anomalilere neden olur (Schulte ve ark., 2010; Fernandez-Diez ve ark., 2016; Zhang, Zhu ve ark., 2016; Simon ve ark., 2017). Sperm DNA hasarının etkisi yalnızca perinatal dönemde gözlenmez. Ayrıca, sigara kullanımıyla artan oksidatif sperm DNA hasarının çocukluk dönemi kanserleriyle de ilişkili olduğu bulunmuştur (Ji ve ark., 1997; Aitken ve Krausz, 2001; Wright ve ark., 2014; Kumar ve ark., 2015).

2.6. Yanlış Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair, MMR)

DNA onarım mekanizmalarından biri olan MMR'nin görevi replikasyon esnasında meydana gelen yanlış baz eşleşmeleri ve genellikle replikasyon sırasındaki kaymalardan oluşan insersiyon/delesyon ilmeklerini düzelterek genomik kararlılığı korumaktır (Crouse, 2016; Peltomaki, 2016). Bu görevlerinin yanı sıra MMR, mayozda ve gametogenezde de görev alır (Tablo 1) (Manhart and Alani, 2016). MMR'daki mutasyonlar mikrosatellit kararsızlığına yol açarak Lynch Sendromu'na ve sporadik rahim, yumurtalık, serviks, meme, mide, idrar yolları ve deri tümörlerine (yaklaşık %15'ine) neden olur (Hu ve ark., 2016; Peltomaki, 2016). Mutasyonların yanında epigenetik değişimler, özellikle *MLH1* ve *MSH2*'nin promotor bölge hipermetilasyonları da kanser çalışmalarında sıkça hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Czerninski ve ark., 2009; Lee ve ark., 2011; Ling ve ark., 2011; Alkam ve ark., 2013; Su ve ark., 2014).

Tablo 1. MMR proteinleri ve fonksiyonları (Li, 2008)

Protein	Fonksiyon
hMutS α (MSH2-MSH6)	DNA yanlış eşleşme / hasar tanıma
hMutS β (MSH2-MSH3)	Moleküler aracı; endonukleaz, yanlış eşleşme aracılı kesiminin sonlandırılması
hMutL α (MLH1-PMS2)	?
hMutL β (MLH1-PMS1)	?
hMutL γ (MLH1- MLH3)	Onarımın minör yolağı, mayozda görevli
ExoI	DNA kesimi, yanlış eşleşme kesimi
Pol δ	DNA'nın yeniden sentezi
PCNA	MMR'ın başlaması, DNA'nın yeniden sentezi
RPA	ssDNA'ya bağlanma/koruma; yanlış eşleşme kesiminin uyarılması; DNA kesiminin sonlandırılması; DNA'nın yeniden sentezinin ilerletilmesi
HMGB1	Yanlış eşleşme aracılı kesim
RFC	PCNA'nın yüklenmesi; 3' çentik-yönlendirmeli onarım; MutL α endonukleazının aktivasyonu
DNA Ligaz I	Çentik ligasyonu

Bakterilerden insanlara oldukça korunmuş bir mekanizma olan MMR'da replikasyon eşlenikli onarımın temel aşamaları şu şekildedir:

1- MutS α (MSH2/MSH6) tek bazlık yanlış eşleşmeleri ve insersiyon/delesyonları tanırken, MutS β (MSH2/MSH3) esas olarak insersiyon/delesyon bölgelerini tanır (Li, 2008; Peltomaki, 2016). MMR'ın hedef bölgeyi tanınması bazı bakterilerde (*E.coli* gibi) hemimetilasyonla gerçekleşirken diğer birçok canlıda primer dizilerin RNaz ile kesilmesi sonucu oluşan çentik yardımıyla olur (Crouse, 2016). Ökaryotlarda MMR, ayrıca öncü iplikteki prolifer hücre nükleer antijenle (PCNA) ilişkidir (Schulte ve ark., 2010; Gunes ve ark., 2015).

2- Tanımadan sonra MutS kompleksi ATPaz aktivitesiyle konformasyonel bir değişikliğe uğrar ve kayan kelepçe konformasyonu oluşur. Böylece MutS proteinleri DNA sarmalına diffüze olur (Peltomaki, 2016; Tham ve ark., 2016).

3- Sonra bu yapı MutL kompleksi tarafından tanınır. MLH1/PMS2'den oluşan MutL α tek bazlık yanlış eşleşmeleri ve insersiyon/delesyon ilmeklerini tanırken, MutL γ heterodimeri (MLH1 ve MLH3) çoğunlukla mayozda görev alır ve MMR'ın minör yolağını oluşturarak daha çok insersiyon/delesyonların onarımında görev alır. MutL β

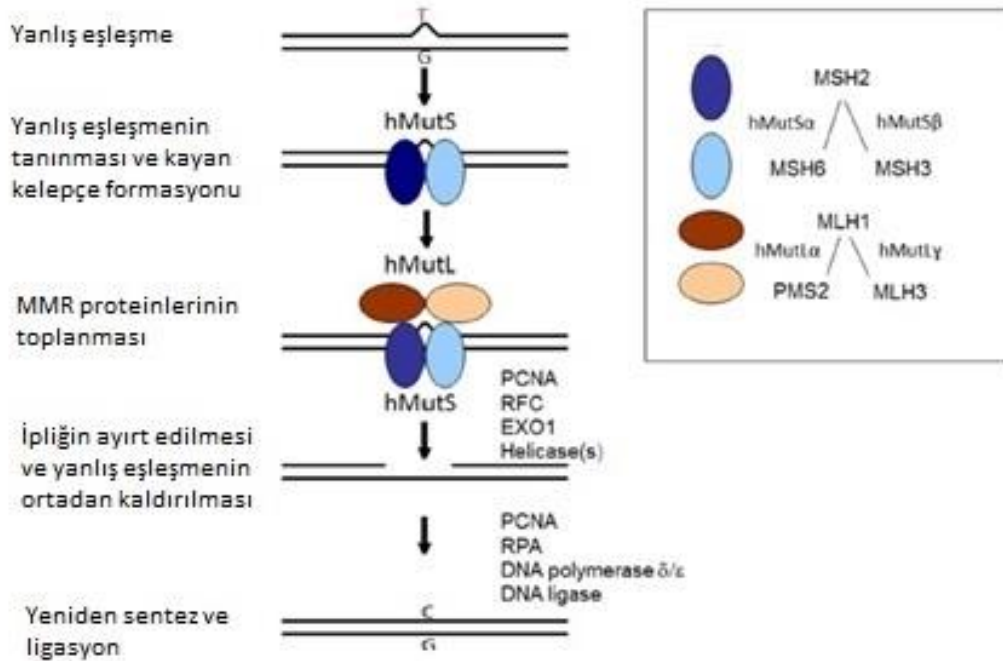
heterodimeri (MLH1 ve PMS1) MMR da görev almamaktadır (Li, 2008; Manhart ve Alani, 2016; Peltomaki, 2016).

4- MLH1'in endonukleaz aktivitesi yanlış eşleşmenin olduğu dizinin ayırt edilmesini sağlar.

5- Ökaryotlarda hatalı dizinin kesip çıkarılması helikaz aktivitesiyle gerçekleşmez. Kesip çıkarma işlemi ya ekzonukleaz I (EXO1) aktivitesine ya da replikatif polimerazın hatalı nükleotidi içeren diziyi ortadan kaldırmasına bağlıdır.

6- En son olarak DNA dizisi tekrar sentezlenir ve ligasyonla bağlanır (Peltomaki, 2016; Tham ve ark., 2016). MMR DNA polimerazın okuma kontrolörlüğünden (proofreading) kaçan yanlış eşleşmiş bazları, insersiyon ve delesyonları ve hatta sentez sırasında araya giren ribonükleotidleri tanıyıp onarması replikasyonun doğruluğunu büyük oranda artırır. Bu oran *E.coli* de yaklaşık 100 kat iken, ökaryotik organizmalarda çok daha yüksek bulunmuştur (Crouse, 2016) (Şekil 8).

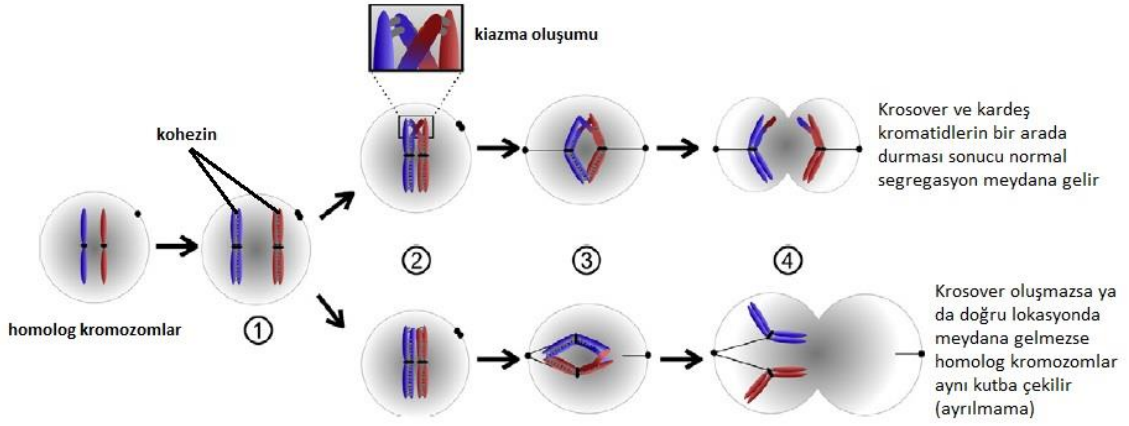
Replikasyon doğruluğunu arttırmasının yanı sıra, MMR oksidasyonla ya da alkilasyonla oluşan çeşitli ekzojen ve endojen hasarları tanır (Li ve ark., 2016). MMR yokluğunda, endojen ROS seviyesinin artması baz çifti mutasyon oranını önemli derecede arttırmaktadır (Crouse, 2016). MMR, eğer lezyonların onarımı mümkün değilse, hücre döngüsünün durmasına ya da apoptoza yol açar (Li, 2008; Li ve ark., 2016; Peltomaki, 2016). Yapılan çalışmalarda, MutS ve MutL hasarlı hücrelerde DNA hasarına cevaben hücre döngüsünün durdurulmasında kusurlar ortaya çıkmıştır. Bu hücrelerde p53 ve p73'ün fosforilasyonu gerçekleşmemektedir (Li, 2008). MutSα ve MutLα'nın p53 ve p73'ü fosforilleyen ATM, ATR ve c-Abl kinazlarıyla fiziksel olarak ilişkide olduğu belirtilmiştir. Bu gözlemler, MutSα ve MutLα'nın içinde bulunduğu sinyalizasyon basamaklarının hücre döngüsünün durdurulması ve/veya apoptozda rolü olduğunu düşündürmektedir (Li, 2008). MMR ayrıca somatik hipermutasyonda, immunglobulin lokuslarındaki sınıf değişiminde ve üçlü tekrar dizilerinin genişlemesinde de rol alır (Crouse, 2016; Manhart ve Alani, 2016).



Şekil 8. İnsanda MutS ve MutL kompleksleri ve yanlış eşleşme onarımı (Peltomaki, 2016)

MMR, homolog rekombinasyonda (HR) oldukça önemlidir (Spies ve Fishel, 2015). Somatik hücrelerdeki homolog rekombinasyon, durmuş replikasyon çatalının kurtarılmasında görev alan ve DSB'lerin oluşumunu ve onarımını içeren bir işlemdir. Mayozda HR, krossover için gereklidir ve profazın erken safhalarında genom boyunca programlı oluşan çok sayıda DSB ile başlar (Spies ve Fishel, 2015; Manhart ve Alani, 2016). DSB'lerin bir kısmı homolog kromozomlar arası krossoverla sonuçlanır (krossover ürün, CO), geri kalanı krossover olmayan ürünler (NCO) oluşturur ya da kardeş kromatid kalıp olarak kullanılarak onarılır (Rogacheva ve ark., 2014). MMR, mayozda rekombinasyonda meydana gelen yanlış eşleşmeleri düzelterek genetik rekombinasyonun düzenlenmesinde rol oynar ve homolog kromozomlar arasındaki krossovera aracılık eder (Manhart ve Alani, 2016).

Yanlış eşleşme onarımında hiç rol almayan MSH4/MSH5 heterodimeri ile onarımın minör yolağı olan MLH1/MLH3 heterodimeri spermatogenezin anahtar aşaması olan mayoz I deki krossover öncesi kromozomların doğru segregasyonu için gereklidir (Manhart ve Alani, 2016) (Şekil 9). Segregasyondaki hatalar anöloid gametlerin, fetal kayıpların oluşmasına sebep olur ya da kontrol noktalarının aktive olmasıyla mayotik arrest ve infertilite ile sonuçlanır (Terribas ve ark., 2010; Manhart ve Alani, 2016).



Şekil 9. Üstte mayozda homolog kromozomların düzgün hizalanması ve normal segregasyon; altta ise homolog kromozomların düzgün hizalanmaması ve anormal segregasyon şematize edilmiştir (Manhart ve Alani, 2016).

MSH4 ve MSH5, mayozun erken safhalarında homolog kromozom çiftlerinin arasında sinaptonemal kompleksi oluşturan fermuar benzeri proteinler olan ZMM proteinlerdendir. Bu proteinler özellikle krossover bölgelerinde lokalizedirler. MLH1 ve MLH3 de krossover formasyonundan sorumludur. MSH4/MSH5 mayozun erken safhalarında DSB bölgelerinde ortaya çıkar. MLH1 pakiten evresinin ortasında MSH4 ile kolokelize şekilde ortaya çıkar; MLH1/MLH3 ise sadece krossoverin çözülme bölgelerinde bulunur (Manhart ve Alani, 2016).

2.7. Yanlış Eşleşme Onarımı ve Erkek İnfertilitesi

Önemli fizyolojik fonksiyonları, model hayvanlar ve infertil erkeklerle yapılan çalışmalar MMR genlerinin ve proteinlerinin erkek infertilitesinde rol oynayabileceğini göstermiştir. *MLH1* geni 3p22.2'de lokalize olup 21 ekzonu vardır. Genin 23 transkripti (splays varyantı) bulunur. MLH1 proteini 756 amino asit uzunluğundadır. *MSH2* geni ise 2p21-p16.3'de lokalizedir ve 22 ekzonu ile 10 transkripti bulunur. MSH2 proteini 934 amino asit uzunluğundadır. MLH1 ve MSH2 proteini testis (sırasıyla RPKM 17.8 ve RPKM 3.4) başta olmak üzere birçok dokuda eksprese olur (Fagerberg ve ark., 2014). MMR knockout erkek farelerde spontan mutasyon artışı ve kanser gibi beklenen fenotiplere ilaveten infertilite de gözlenmektedir (Fischer ve ark., 2016).

MutL defektli erkek farelerde hiç olgun sperm gözlenmez. *Pms2*^{-/-} fareler ise mayozdaki anormal kromozomal sinapsis yüzünden infertildir (Fischer, Dudley ve ark. 2016). *Msh4* ve *Msh5* genlerinin yokluğunda da mayotik hatalardan dolayı infertilite

gözlenir (Terribas ve ark., 2010). Bu MMR proteinleri memeli testiküler dokusunda, özellikle spermatozoidlerde yüksek derecede ekspresyon olurlar. *MLH1*, *MLH3*, *PMS2*, *MSH4* ve *MSH5* genlerinin infertil erkeklerin testiküler dokularındaki mRNA ekspresyon seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada *PMS2* haricindeki diğer tüm genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri spermatogenik hataları olan infertil hastalarda daha düşük bulunmuştur (Terribas ve ark., 2010).

MLH1 odaklarının sayısı ile ölçülen krossover spermatozoid başına yaklaşık olarak 50'dir. İnfertil erkeklerde mayotik rekombinasyon sayısı anlamlı olarak daha düşüktür (Sun ve ark., 2007; Sanderson ve ark., 2008). Rekombinasyonun azalması aneuploid gametlerin oluşumunu artırır. Globozoospermi, teratozoospermi ve OAT vakalarında artmış aneuploidi ile ilgili faktörler bulunmuştur (Sanderson ve ark., 2008). İnfertil erkeklerde sinapsiste de hatalar gözlenir. Bu hastaların kromozomları sinaps yapabilseler bile sinaptonemal komplekslerinde boşluklar ve parçalar gözlenir (Sanderson ve ark., 2008). Sinapsisteki hatalar ve rekombinasyonun azalması, açıklanamayan infertilite olgularının bir kısmında rol oynayabilir (Sun ve ark., 2007).

MutS homologları hasarlı farelerde yanlış eşleşme onarımında hatalar gözlenmektedir. *Msh2* defektli erkek farelerde ayrıca spermatogenik hatalar tespit edilmiştir (Paul ve ark., 2007; Mukherjee ve ark., 2010).

Mutasyonların yanısıra DSB onarımı ve kromozomal sinapsiste görevli olan *MLH1*, *MLH3*, *TEX11*, *TEX15*, *PMS2* ve *MSH5* genlerindeki SNP'lerin erkek infertilitesi açısından risk faktörü oluşturabileceği saptanmıştır (Ferras ve ark., 2007; Ji ve ark., 2012; Markandona ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015).

DNA onarımı ve mayozdaki kritik rolleri düşünüldüğünde ve literatürdeki erkek infertilitesi ilişkilendirme çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda, MMR genlerinin sperm DNA'sı üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı şekilde inceleme merakı doğmaktadır. Bu doğrultuda özellikle DSB onarımı, sinapsis süreci ve genomik kararlılığın korunmasında önemli rolleri olan *MLH1* ve *MSH2*'deki epigenetik değişikliklerin sperm DNA fragmentasyonu ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu hipotez doğrultusunda OAT teşhisi almış infertil gruptan ve fertil ve/veya normozoospermik kontrol grubundan semen örnekleri alınmıştır. Bu örneklerde *MLH1* ve *MSH2*'nin promotor bölgesi metilasyon yüzdeleri MethyLight yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin sperm DNA fragmentasyonu TUNEL, histonca zengin

sperm yüzdesi de anilin mavisi boyama yöntemi ile belirlenmiştir. ıkan sonuçlar, semen parametreleri, yaş ve sigara kullanımı verileriyle birlikte istatistiksel olarak analiz edilmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmaya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Üroloji Polikliniğinde idiyopatik OAT tanısı alan infertil hastalar ve normal semen parametrelerine sahip (normozoospermik) ve fertil erkekler dahil edilmiştir. Semen analizi alt değerleri Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) 2010 kriterlerine göre semen volümü için 1,5 ml, toplam sperm sayısı için 39 milyon/ejakulat, sperm konsantrasyonu için 15 milyon/ml, vitalite için %58, progresif motilite için %32, total motilite (progresif ve non progresif) için %40 ve morfolojik olarak normal formlar için %4 olarak belirlenmiştir (Cooper ve ark., 2010). OAT tanısı WHO 2010 kılavuzuna göre yapılan iki adet semen analiziyle konulmuştur. Semen analizinde sperm konsantrasyonun 15 milyon/ml, sperm motilitesinin %32 ve normal sperm morfolojisinin %4'ün altında olması bu hastaların OAT olarak kabul edilmesini sağlamıştır (Jungwirth ve ark., 2012). Çalışma öncesinde dahil edilecek katılımcıların sayısı %80 güç ve %95 güven aralığı esas alınarak güç testi ile 70 hasta ve 58 kontrol olarak belirlenmiştir. Normal yoldan ve iki yaşından küçük çocuk sahibi olan fertil ve/veya normozoospermik erkeklerden 52 birey kontrol grubunu oluşturmuştur. Kontrol ve hasta grubundaki bireylerin ± 5 yaş eşlenik olmasına dikkat edilmiştir. Obstrüktif azospermik hastalar gibi klinik olarak veya karyotip anomalisi, Y-kromozomu mikrolelesyonu ve *CFTR* gen mutasyonu gibi genetik olarak tanı alan hastalar çalışma kapsamına dahil edilmemiştir. Yaşları 18-50 arasında olan 75 idiyopatik infertil hasta ise çalışma grubunu oluşturmuştur. Çalışmanın etik açıdan uygunluğunu gösteren Etik Kurul raporu Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun (KAEEK) 28.04.2016 tarih ve 2016/185 nolu kararı ile onaylanmıştır (Ek 1). Çalışmaya dahil edilecek hasta ve kontrollerin seçiminde kullanılan dahil edilme ve edilmeme kriterleri aşağıda verilmektedir (Tablo 2). Hastalar araştırma konusunda bilgilendirilmiş, kabul etmeleri durumunda araştırmaya dahil edilmişlerdir. Hasta ve kontrollerden yaş, meslek, sigara kullanımı ve infertilite öyküsünü kapsayan ayrıntılı bilgi alınmıştır (Ek 2 ve Ek 3).

Tablo 2. Hasta ve kontrollerin seçiminde kullanılan kriterler

Hasta ve kontrollerin seçiminde dahil edilme kriterleri

- OAT tanısı alma
- Kontrol grubunu oluşturan bireylerin normal yoldan ve iki yaşından küçük çocuk sahibi olması ve/veya normal semen parametlerine sahip olması
- Bireylerin yaşlarının 18-50 arasında olması
- Kontrol grubundaki bireylerin hasta grubundakilerin ± 5 yaş eşleniği olması

Hasta ve kontrollerin seçiminde dahil edilmeme kriterleri

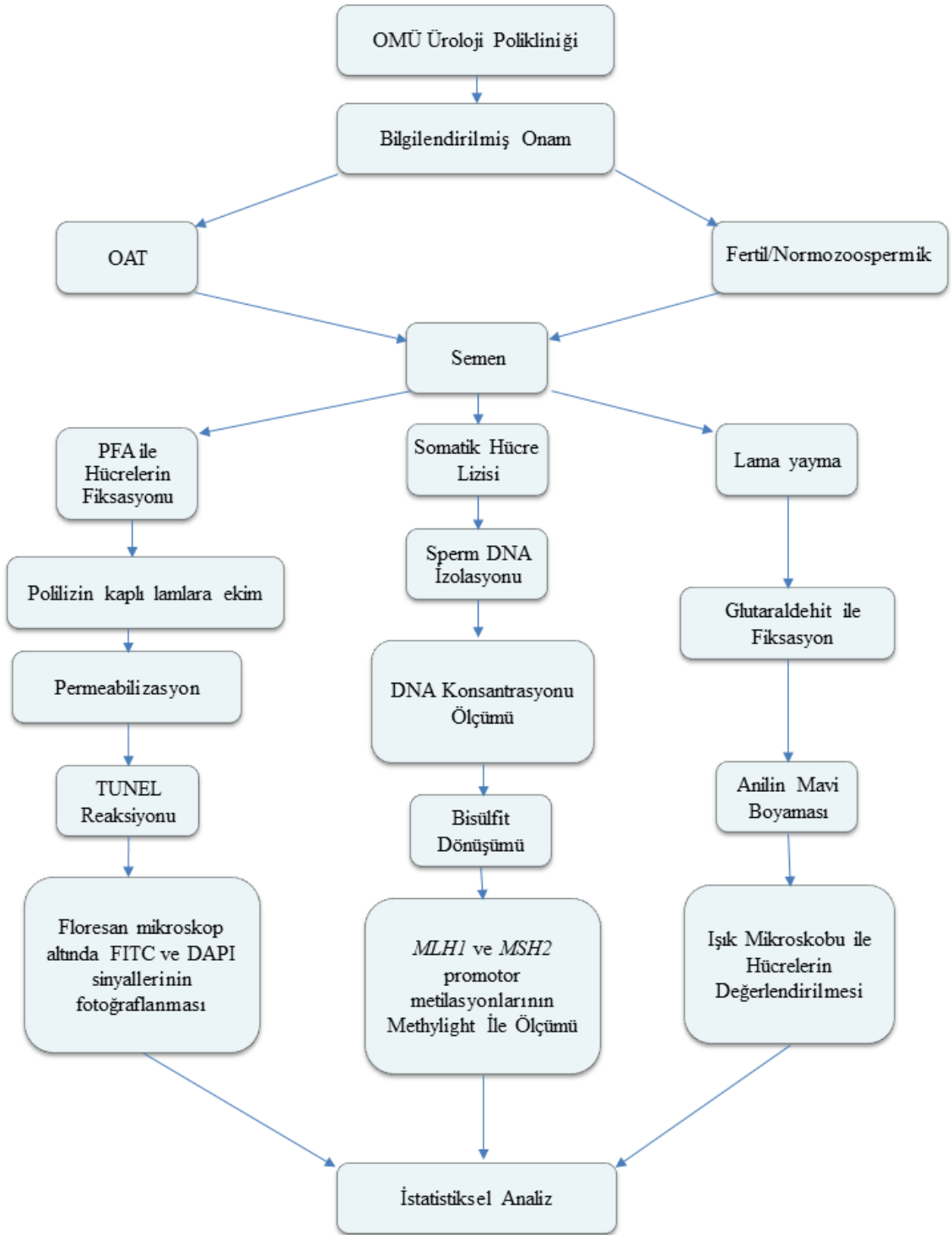
- Hastalarda karyotip anomalisi, Y-kromozomu mikrolelesyonu ve *CFTR* mutasyonu tanımlanması
- Kontrol grubundaki erkekler için yardımcı üreme teknikleri ile çocuk sahibi olma
- Hastaların 18 yaşından küçük ve 50 yaşından büyük olması

3.1.1. Örneklerin Alınması

OAT tanısı alan hastalardan ve kontrollerden semen örneği alınmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan tüm semen örnekleri 2-5 günlük cinsel perhizin ardından mastürbasyonla elde edilmiştir. Araştırmada hastalardan bir kez ejakülat alınmıştır. Örnekler 37°C'de 20-30 dakika inkübe edilerek sıvılaştırıldıktan sonra OMÜ Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Androloji laboratuvarlarında WHO 2010 kılavuzuna göre semen analizi yapılmıştır (WHO, 2010). Analizden sonra karanlıkta ve 37°C'de tutulmuştur. Semen bir kısmı TUNEL analizi ve anilin mavisi boyaması, diğer kısmı ise DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Örneklerden izole edilen DNA'nın bisülfid dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Bisülfid dönüşümü yapılan DNA ile *MLH1* ve *MSH2* genlerinin promotor bölge metilasyon yüzdeleri belirlenmiştir.

3.2. Metot

Tez çalışmasının akış şeması aşağıda gösterilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Tezin akış şeması

3.2.1. TUNEL Testi

En sık kullanılan DNA fragmentasyon tespit yöntemlerinden biri olan TUNEL, klinik açıdan uygun, yüksek hassasiyet ve özgünlüğü olan bir testtir. TUNEL testi, kalıba bağımsız çalışan bir enzim olan terminal nükleotidil transferaz (TdT) katalizörlüğünde, tek ve çift zincir DNA kırıklarına dahil olan floresan etiketli dUTP'nin belirlenmesiyle gerçekleştirilir. DNA fragmentasyonu sonrasında akım sitometrisi ya da floresan mikroskopla, denatürasyona gerek kalmadan ölçülebilir (Kabartan ve ark., 2019). Tezde In Situ Cell Death Detection kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Protokol aşağıdaki gibidir:

Örnek Materyalin Fiksasyonu

- a) Semen örneğinden 1 ml Ependorf tüpe alınarak 1500 rpm'de 7,5 dakika santrifüj edildi.
- b) Pellet üzerine 1 ml fosfat-tuz tamponu (phosphate-buffer saline, PBS) eklenerek yıkandı.
- c) Pellet üzerine %3,6'lık 1 ml paraformaldehit (PFA) eklendi.

Polilizin Kaplı Lamların Hazırlanması

- a) Lamlar distile su:poli L-lizin (1:9) karışımı içerisinde 5 dakika, oda sıcaklığında bekletildi.
- b) 60 °C'lik etüvde bir saat inkübe edildi.

Ekim İşlemi

- a) PFA'da bekleyen örnekler 250 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- b) Pellet 1-5 milyon/ml sperm olacak şekilde 1xPBS ile resüspanse edildi.
- c) Polilizin kaplı lamlara 10 µl PB sükröz damlatıldı.
- d) PB sükrözün üzerine resüspanse edilen örneklerden 200-250 µl ilave edildi.
- e) Ekilen örnekler nemli ve karanlık ortamda ve 4 °C'de bir gece bekletildi.

Permeabilizasyon

- a) Slaytlar 2 kez 1xPBS ile yıkandı.
- b) Ekim alanının üzerine 200 µl permeabilizasyon solüsyonu eklendi.
- c) Kapalı kapta, buz üzerinde ve 4 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- d) İnkübasyon sonrası 1xPBS ile yıkandı.

Permeabilizasyon solüsyonu %0,1 sodyum sitrat ve %0,1 Triton X-100 çözeltisinin karıştırılmasıyla, 100 ml'lik cam şişe içerisinde, her seferinde taze olarak hazırlandı.

TUNEL Reaksiyonu

TUNEL reaksiyonu karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Hazırlama

- a) Mor kapaklı etiket solüsyonunun içinden 100 µl çıkarıldı.
- b) Etiket solüsyonunun üzerine mavi kapaklı enzim solüsyonunun tamamı ilave edildi. Pipetaj yaparak iyice karıştırıldı. İşlemler arasında mor kapaklı tüp buz üstünde bekletildi.
- c) Seçilen alanlara 45 µl reaksiyon karışımı kondu.
- d) Slaytlar karanlık ve nemli ortam içinde 37 °C'de bir saat inkübe edildi.
- e) İnkübasyon sonunda slaytlar 3 kez 1xPBS ile yıkandı.

Görüntüleme

Görüntüleme OMÜ Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda bulunan floresan mikroskopta (Olympus BX-51) ve 40X büyütme altında yapıldı. Slaytlarda aynı alanların uygun filtrelerle hem DAPI hem FITC sinyallerinin fotoğrafları çekildi.

Fotoğrafların Analizi

Her örnek için ortalama 500 hücre ve en az üç ayrı alanın fotoğrafı çekildi. Bu fotoğraflar Image J programı ile bilgisayar ortamında her alan için DAPI ve FITC sinyalleri ayrı ayrı olacak şekilde sayıldı. DFI (DNA fragmentasyon indeksi) (FITC / DAPI) x 100 formülüne göre hesaplandı.

3.2.2. Anilin Boyaması

Anilin mavisi ile boyama yöntemi histon-protamin değişimindeki hatalarla karakterize edilen olgunlaşmamış spermatozoanın tespitinde kullanılmaktadır. Asidik bir boya olan anilin mavisi sperm kromatininde lizince zengin histonlara bağlanır. Böylece olgunlaşmamış sperm mikroskop altında arjinin ve sisteince zengin olan protaminle paketlenmiş olgun sperme kıyasla koyu mavi olarak ayırt edilir (Mostafa ve ark., 2018).

Anilin Boya Solüsyonunun ve Fiksatifin Hazırlanması

%5'lik anilin solüsyonu için, cam şale içinde hazırlandı. Boya solüsyonu ışık almayacak şekilde oda ısısında bekletildi (Emirzeoğlu, 2019).

Örneklerin Hazırlanması

- a) 1 ml taze semen örneği 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.
- b) Pellet 1 ml 1xPBS solüsyonu ile yıkandı.
- c) 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.
- d) Pellet slaytlara yayıldı.

Fiksasyon ve Boyama

- a) Slaytlar %3'lük glutaraldehit ile fikse edildi.
- b) Fikse edilen lamlara %5'lik anilin boyası uygulandı.

Hücrelerin İncelenmesi

Sperm hücreleri 100x büyütme altında ve immersiyon yağı ile anilin ile boyanma özelliklerine göre koyu lacivert olarak tam boyanmışsa ya da sadece bir kısmı koyu lacivert olarak boyanmışsa anilin pozitif (histonca zengin), boyanmamış ya da soluk mavi olarak boyanmışsa anilin negatif (protamine zengin) olarak değerlendirildi. Her örnek için ortalama 200 hücre sayıldı.

3.2.3. Somatik Hücrelerin Lizisi

Semenin somatik hücrelerden elimine edilmesi amacıyla aşağıdaki protokole göre somatik hücre lizisi uygulandı:

- a) Semen örneği 8 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı (Goodrich ve ark., 2007).
- b) Pellet 1 ml 1xPBS ile 2 kez yıkandı.
- c) Pellet 15 ml somatik hücre lizis tamponu (SCLB) ile resüspanse edildi.
- d) Örnekler buz üzerinde 25 dakika inkübe edildi.
- e) 15 dakika 1200 rpm'de santrifüj edilerek pellet ileriki işlemler için saklandı.

3.2.4. Sperm DNA Eldesi

Sperm DNA'larının izolasyonu için Quick-gDNA Miniprep Kit (Zymo Research, ABD) aşağıdaki protokole göre kullanıldı (Gunes ve ark., 2018):

- a) 100 µl seminal plazma üzerine 400 µl genomik lizis tamponu ilave edildi. Karışım 4-6 saniye vorteksenerek tamamen homojenize edildi. Sonrasında 5-10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- b) Karışım toplama tüpü içindeki Zymo-Spin kolona alındı ve 10,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı.
- c) Zymo-Spin kolon yeni bir toplama tüpüne alındı ve kolona 200 µl DNA Önyıkama Tamponu ilave edildi. 10,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- d) Kolona 500 µl g-DNA Yıkama Tamponu konuldu ve 10,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- e) Kolon 1,5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 40 µl DNA elüsyon tamponu ilave edildi. Sonrasında oda ısısında 5 dakika inkübe edildi ve en yüksek hızda 30 saniye santrifüj edildi.

DNA Konsantrasyonun Ölçülmesi

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu Multiscan Go spektrofotometrede (ThermoFisher Scientific, Finlandiya) bisülfıt dönüşümü öncesinde ölçülerek 200 ng/µl olarak ayarlandı.

3.2.5. Bisülfıt Dönüşümü

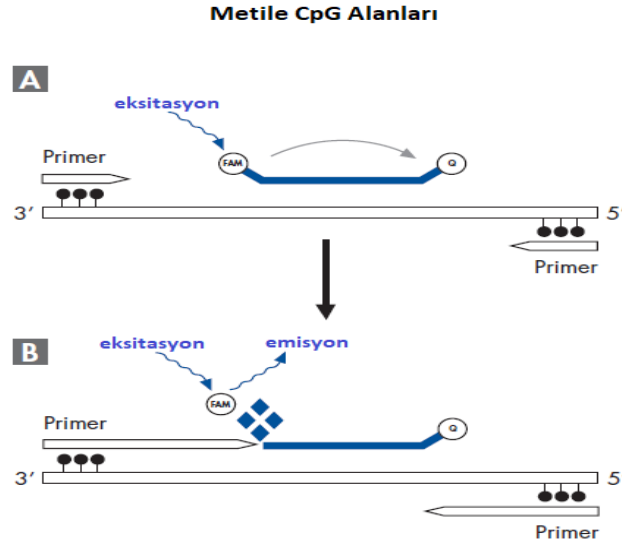
İzole edilen ve konsantrasyonları belirlenen sperm DNA'larının bisülfıt dönüşümü için EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, ABD) kullanılmıştır (Gunes ve ark., 2018). Protokolü aşağıdaki gibidir:

- a) Protokol öncesinde CT dönüşüm reaktifi hazırlandı. Bunun için kitin içinde bulunan CT dönüşüm reaktifi üzerine 900 µl steril deiyonize su, 300 µl M-Dilüsyon Tamponu ve M-Eritici Tamponu ilave edildi. Tamamen çözündürülene kadar, arada vorteks yapılarak, 15 dakika oda ısısında bekletildi.
- b) 20 µl DNA örneği üzerine hazırlanan CT dönüşüm reaktifinden 130 µl ilave edildi ve vorteks yapılarak iyice karıştırıldı.
- c) Karışım 98 °C'de 10 dakika, 64°C'de 2,5 saat bekletildi. Bu aşamada eğer diğer aşamalara geçilmeyecekse, örnek 4°C'de saklandı.
- d) Zymo-spin kolonlar içine 600 µl M-Bağlayıcı tampondan konuldu. Sonra kolona örneğin tamamı ilave edildi.

- e) Kolonun kapağı kapatılarak alt üst etme yoluyla karıştırıldı.
- f) Kolon 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı atıldı.
- g) Kolona 100 µl M-Yıkama solüsyonu ilave edildi ve 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- h) Kolona 200 µl Desülfonasyon tamponu ilave edilerek oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı atıldı.
- i) Kolona 200 µl M-Yıkama solüsyonu ilave edildi ve 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu aşama bir kere daha tekrar edildi.
- j) Yıkama aşaması sonunda kolonlar bir kez daha 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek, yıkama solüsyonunun iyice akıtılması sağlandı.
- k) Kolonlar 1,5 ml'lik tüplere alınarak içlerine 10 µl M-Elüsyon tamponu ilave edildi. Tüpler 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- l) Elde edilen bisülfid dönüşümü tamamlanmış DNA'lar metilasyon analizinde kullanılana kadar -20°C'de saklandı.

3.2.6. Eş Zamanlı PCR ile MethyLight Analizi

MLH1 ve *MSH2* genlerinin promotor bölgelerinin metilasyon analizi semikantitatif MethyLight yöntemi ile değerlendirildi. MethyLight yöntemi, prob bazlı eş zamanlı PCR metilasyon analizidir. Bu yöntem metilasyon miktarını belirlemek için kullanılmaktadır (Eads ve ark., 2000). Metilasyon spesifik Taqman proplar bir florofofor ve bir susturucu (quencher) parça içeren oligonükleotidlerdir. Florofofor probun 5' ucunda bulunurken, susturucu parça çoğunlukla 3' ucunda ya da probun içinde bulunur. PCR'ın uzama fazında prop Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonukleaz aktivitesi ile kesilir ve böylece florofofor ve susturucu parça ayrılır. Bu durum biriken PCR ürünü miktarıyla orantılı olarak tespit edilebilen floresan ile sonuçlanır (Şekil 11).



Şekil 11. Kantitatif eş zamanlı PCR yönteminde metilasyon spesifik primerlerin ve probun kullanılma prensibi (Qiagen, 2011'den uyarlanmıştır)

Methylight analizi EpiTect Methylight PCR Kit kullanılarak (Qiagen) Rotor Gene-Q eş zamanlı PCR cihazında (Qiagen, CA, USA) gerçekleştirilmiştir. *MLH1* geninin promotor bölge dizisine özgü primerler ve prop dizileri Perez-Carbonell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan alınmıştır (Perez-Carbonell ve ark., 2010). *MSH2* geninin bisülfid dönüşümü yapılmış promotor bölge dizisine özgü primer ve prob dizaynı Beacon Designer 8.2 programı ile yapılmıştır. *MLH1* ve *MSH2* genlerinin promotor bölge dizilerinin (Şekil 12) metile primer ve prop dizileri ile internal referans geni olarak kullanılan *ACTB* geninin için metilasyondan bağımsız primerleri ve probu (Kahn ve ark., 2008) Tablo 3'te verildiği gibidir.

Tablo 3. Tezde kullanılan primer ve prop dizileri

<i>MLH1</i> forward primer	AGGAAGAGCGGATAGCGATTT
<i>MLH1</i> reverse primer	TCTTCGTCCCTCCCTAAAACG
<i>MLH1</i> prop	6FAM5'-CCCGCTACCTAAAAAATATACGCTTACGCG-3'BHQ-1
<i>MSH2</i> forward primer	GGGATTATGGCGTGTGATATTACG
<i>MSH2</i> reverse primer	AAAATCGAAACTACGATAAACCGTAAA
<i>MSH2</i> prop	6FAM5'-ACCACTACACTCCAACGTAAACGACAAATT-3'BHQ-1
<i>ACTB</i> forward primer	TGGTGATGGAGGAGTTTAGTAAGT
<i>ACTB</i> reverse primer	AACCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA
<i>ACTB</i> prop	6FAM5'-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-3'BHQ-1

MLH1

Kromozom 3 (uzunluk: 84 bç)

36993271 AGGA AGAGCGGATA GCGATTTTTA ACGCGTAAGC
GTATATTTTT TTAGGTAGCG GGTAGTAGTC GTTTtaggga
GGGACGAAGA 36993354

MSH2

Kromozom 2 (uzunluk: 147 bç)

47402094 GGGATTATGG CGTGTGATAT TACGTTTGGC GTTAAACGTT
TGTTTTTTTA TTTATTTTAT TTTGTATTTT TTGAGATAGG GTTTTTAATT
TGTGTTTTAC GTTGGAGTGT AGTGGTATAA TTTACGTTT
ATCGTAGTTT CGATTTT 47402240

Şekil 12. *MLH1* ve *MSH2* genlerinde çoğaltılan diziler, primerler ve metilasyon bölgeleri. Primer dizileri altı çizili şekilde, metilasyon bölgeleri sarı renkli vurguyla belirtilmiştir

Methylight yöntemi için kullanılan PCR reaksiyon karışımı her bir örnek için 20 µl toplam hacim için 1X EpiTect Methylight master mix, 0,4 µM forward primer, 0,4 µM reverse primer, 0,2 µM prop, bisulfit dönüşümü yapılmış DNA (≤ 100 ng) ve RNase free su içermektedir. *MLH1* PCR için döngü koşulları; 95°C’de başlangıç PCR aktivasyon aşamasını takiben 95°C’de 15 saniye denatürasyon ve 55°C’de 60 saniye bağlanma/uzama aşamalarını içeren 45 döngüden oluşmaktadır. *MSH2* PCR için döngü koşulları; 95°C’de başlangıç PCR aktivasyon aşaması, 95°C’de 15 saniye denatürasyon ve 60°C’de 60 saniye bağlanma/uzama aşamalarını içeren 45 döngüden oluşmaktadır.

Metilasyon Seviyesinin Hesaplanması

Metilasyon miktarının relatif kuantifikasyonu Ct değerleri üzerinden elde edilmiştir. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu (Winer ve ark. 1999; Schmittgen ve ark., 2000; Livak ve Schmittgen, 2001) kullanılarak kontrol ve infertil gruptaki erkeklerin sperm DNA’larındaki *MLH1* ve *MSH2* genlerinin metilasyon düzeyleri referans gen (*ACTB*) ile hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodundaki $\Delta\Delta Ct = [(CT_{Hedef\ Gen} - CT_{Referans\ gen})_{örnek} - (CT_{Hedef\ Gen} - CT_{Referans\ gen})_{tamamen\ metillenmiş\ DNA}]$ ’yı belirtmektedir. Hedef bölgelerin metilasyon yüzdeleri (percentage of fully methylated reference; PMR) $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$ formülü ile hesaplanmıştır (Kaur ve ark., 2016; Wu ve ark., 2016).

3.2.7. İstatiksel Analiz

Çalışmalardan elde edilen veriler IBM SPSS Statistics Version 22.0 (Armonk, NY, ABD) programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Normal dağılıma uyan parametrelerin arasındaki ilişki bağımsız grup t-testi ile değerlendirildi. Kontrol ve OAT gruplarının arasında normal dağılıma uygunlukluk göstermeyen parametreler Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Değerler arasındaki korelasyonlar Spearman korelasyon analizi ile test edildi. Spearman'ın sıralama korelasyon katsayısı (r) iki sıralı değişkenin arasındaki ilişkinin gücü ve yönelimini belirlemede kullanıldı. Eşik değerleri ROC analizi ile belirlendi. P değeri 0,05'in altındaki değerler ($P<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

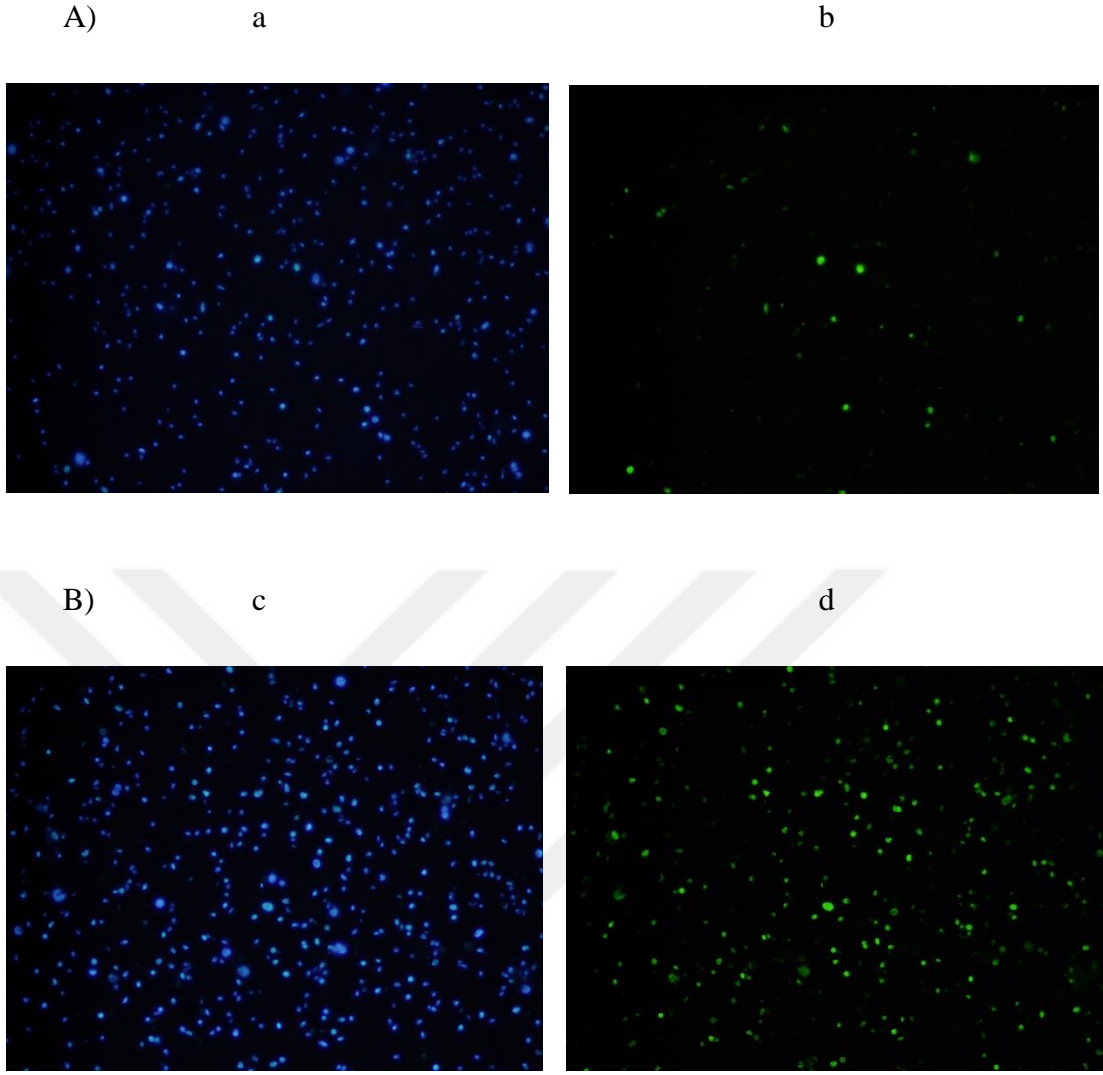
Tez çalışmasında 2018-2019 yılları arasında yaşları 18-50 arasında değişen toplam 127 kişiden semen örneği alındı. İki yaşından küçük çocuğu olan ve/veya normozoospermik olan 52 kişi kontrol grubunu, oligoastenoteratozoospermi (OAT) tanısı alan 75 infertil erkek ise hasta grubunu oluşturdu. Kontrol ve hasta gruplarını oluşturan kişilerin yaşları arasında farklılık görülmedi ($P=0,55$) (Tablo 4). Yaş grupları arası normal dağılım gösterdiği için parametrik olarak analiz edildi (Kontrol ve OAT grupları için sırasıyla, çarpıklık $0,452 \pm 0,330$ ve $0,713 \pm 0,277$, basıklık $0,415 \pm 0,650$ ve $0,917 \pm 0,548$). İki grubun semen parametreleri açısından karşılaştırılması Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Gruplar arası semen parametrelerinin karşılaştırılması ^a Mann-Whitney test

	Kontrol			OAT			P ^a
	n	Ortanca	Ortalama Sıra	n	Ortanca	Ortalama Sıra	
Volüm (ml)	52	3,0	54,36	75	3,0	66,28	0,3656
Sperm Konsantrasyonu (milyon/ml)	52	34,5	86,50	75	4,0	38,00	<0,0001
Total Sperm Sayısı (milyon/ejakulat)	52	123,0	86,37	75	15,0	38,09	<0,0001
Total Progresif Motil Sperm Sayısı (milyon)	52	48,0	86,46	75	1,0	38,03	<0,0001
İleri Hareketli (Progresif) Sperm (A) %	52	47,0	85,66	75	10,0	38,71	<0,0001
Yerinde Hareketli Sperm (B) %	52	5,0	59,52	75	5,0	61,31	0,2076
Immotil Sperm (C) %	52	48,0	27,37	75	85,0	89,27	<0,0001
Motilite (A+B) %	52	52,0	85,63	75	15,0	38,73	<0,0001
Normal Morfoloji %	52	7,0	86,50	75	2,0	38,00	<0,0001

4.1. TUNEL

Çalışmaya dahil olan 100 erkeğin semen örneği DNA fragmentasyonu TUNEL yöntemi ile analiz edildi (Şekil 13). Kontrol grubunun DFI değerleri, istatistiksel olarak tam anlamlı olmamakla birlikte, OAT grubuna kıyasla daha düşük olarak bulundu ($P=0,0554$). Grupların DFI açısından karşılaştırmaları Tablo 5’de verildi.



Şekil 13. DNA fragmantasyonu az (A) ve fazla (B) olan örneklerin DAPI (a,c) ve FITC (b,d) görüntüsü

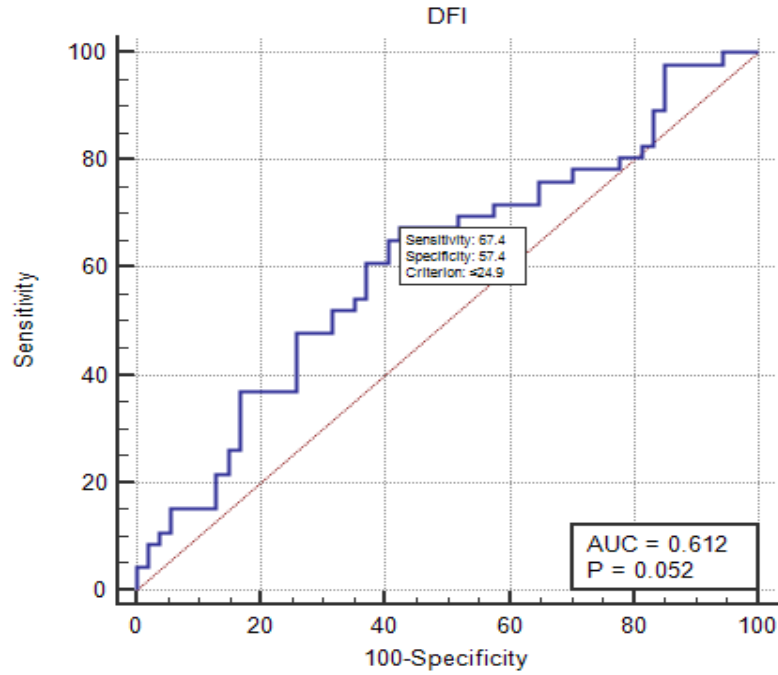
Tablo 5. Gruplar arası DFI karşılaştırması

DFI	Kontrol	OAT
n	46	54
En düşük değer	1,50	3,64
En yüksek değer	54,48	64,10
Ortanca	21,68	25,88
Ortanca için %95 CI	18,0266 - 23,8791	22,4501 - 30,5011
Çeyrekler arası aralık	15,14 - 31,84	19,82 - 34,09

Tablo 5 (devam). Gruplar arası DFI karşılaştırması

Hodges-Lehmann Ortanca Ayrımı	4,62
%95 CI	-0,15 - 9,62
Kontrol grubu ortalama sıra	44,478
OAT grubu ortalama sıra	55,630
Mann-Whitney U	965
	P = 0,0554

DFI'nin infertil ve kontrol grubundaki bireyleri ayırt etme gücü AUC (area under the ROC curve)=0,612 ve P=0,052 olarak belirlendi. %67,4 duyarlılık (sensitivite) ve %57,4 özgüllük (spesifite) ile DFI'nin hasta ve kontrol grupları arasındaki eşik değeri %24,9 olarak hesaplandı (Şekil 14). DFI'nin sperm konsantrasyonu ($r=-0,266$, $P=0,007$) toplam sperm sayısı ($r=-0,299$, $P=0,002$) ve toplam progresif motil sperm sayısı ($r=-0,253$, $P=0,011$) negatif korelasyonlu olduğu belirlendi (Tablo 6).



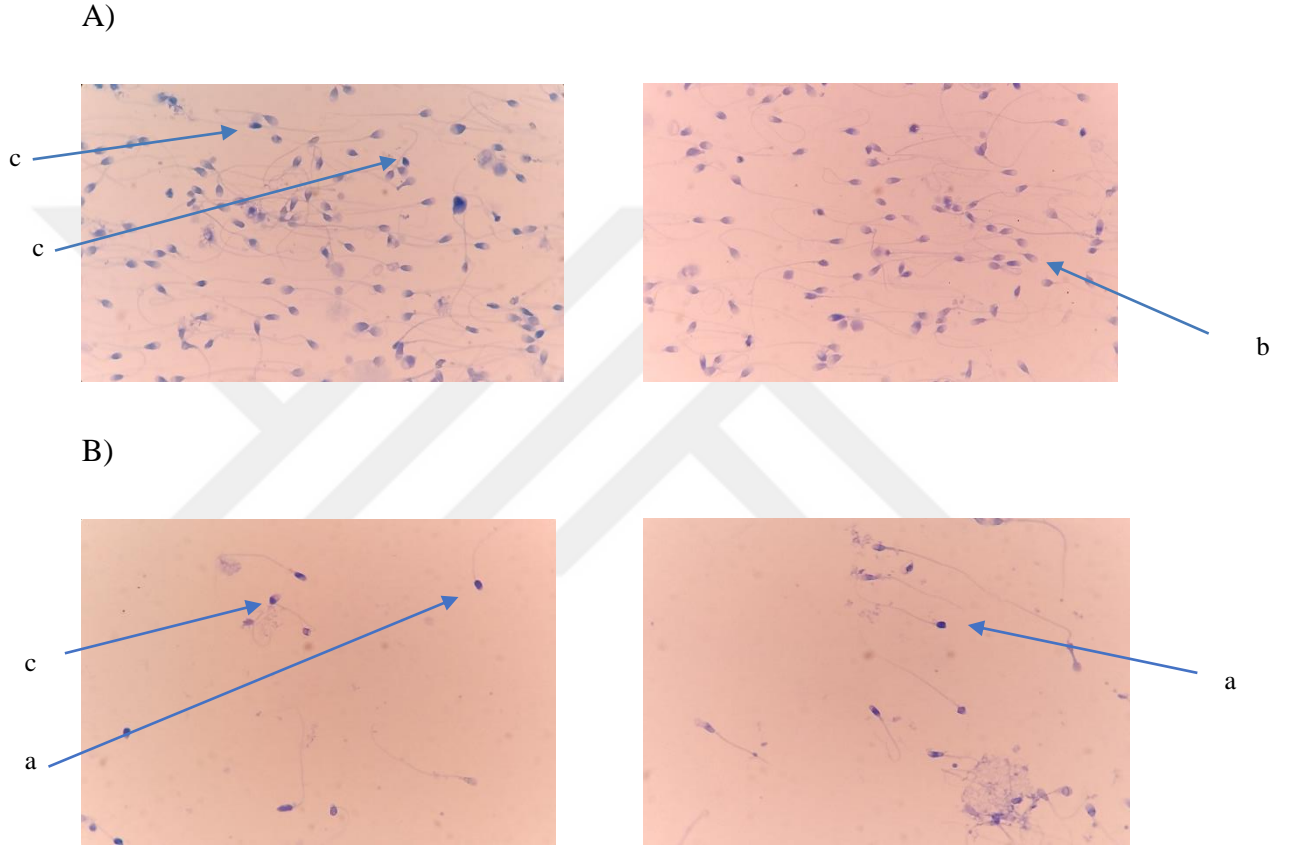
Şekil 14. DFI'nin ROC eğrisi

Tablo 6. DFI'nin yaş, anilin pozitif sperm yüzdesi, promotor metilasyon yüzdeleri ve semen parametreleri ile ilişkisi **r**: Spearman korelasyon katsayısı

	Yaş	Anilin (+) Sperm	<i>MLH1</i> PMR	<i>MSH2</i> PMR	Volüm	Sperm Kons.	Toplam Sperm Sayısı	Toplam Prog. Motil Sp. Sayısı	İleri Hareketli Sperm	Yerinde Hareketli Sperm	Immotil Sperm	Motilite	Normal Morfoloji	Vitalite
r	-0,008	0,164	-0,145	0,042	-0,137	-0,266	-0,299	-0,253	-0,183	0,044	0,180	-0,185	-0,195	0,014
DFI	P	0,935	0,126	0,407	0,806	0,007	0,002	0,011	0,069	0,663	0,073	0,066	0,052	0,918
	N	100	88	35	36	100	100	100	100	100	100	100	100	54

4.2. Anilin Mavisi Boyaması

Çalışmaya katılan kişilerin 114'ünün anilin boyaması sonucunda anilin pozitif sperm yüzdesi hesaplandı (Şekil 15). Kontrol grubunun anilin pozitif sperm yüzdesi, OAT grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($P<0,0001$) (Tablo 7).



Şekil 15. Kontrol (A) ve OAT (B) grubuna ait spermelerin anilin mavisi boyaması görüntüsü.

a) Anilin pozitif sperm b) Anilin negatif sperm c) Yarı boyanmış sperm

Tablo 7. Gruplar arası anilin pozitif sperm yüzdesi karşılaştırması

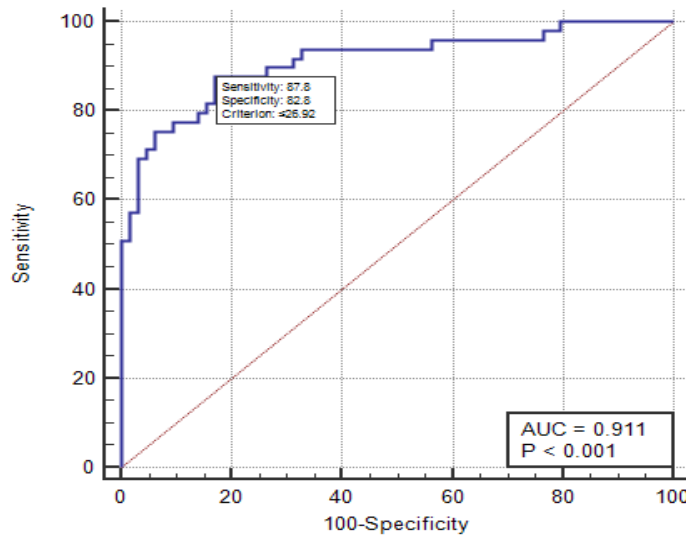
% Anilin (+) Sperm	Kontrol	OAT
n	49	65
En düşük değer	4,71	15,38
En yüksek değer	60,00	86,47
Ortanca	14,98	41,80
Ortanca için %95 CI	10,8515 - 18,0444	39,4292 - 49,8669

Tablo 7 (devam). Gruplar arası anilin pozitif sperm yüzdesi karşılaştırması

Çeyrekler arası aralık	9,2975 - 22,4975	28,2925 - 55,6950
Hodges-Lehmann Ortanca Ayrımı		26,41
%95 CI		20,26 - 32,49
Kontrol grubu ortalama sıra		30,674
OAT grubu ortalama sıra		77,723
Mann-Whitney U		278
		P < 0,0001

Anilin pozitif sperm yüzdesi, yaş ($r=-0,294$, $P=0,0015$), toplam sperm sayısı ($r=-0,683$, $P<0,0001$), sperm konsantrasyonu ($r=-0,658$, $P<0,0001$), progresif motil sperm yüzdesi ($r=-0,628$, $P<0,0001$), toplam motilite ($r=-0,639$, $P<0,0001$), toplam progresif motil sperm sayısı ($r=-0,682$, $P<0,0001$) ve normal morfoloji ($r=-0,668$, $P<0,0001$) ile negatif korelasyonlu, immotil sperm yüzdesi ile pozitif korelasyonlu bulunmuştur ($r=0,635$, $P<0,0001$). Anilin pozitif sperm yüzdesi ile DFI arasında bir ilişki bulunmamıştır ($P=0,2157$) (Tablo 8).

Anilin pozitif sperm yüzdesinin infertil ve kontrol grubundaki bireyleri ayırt etme gücü $AUC=0,911$ ve $P<0,001$ olarak belirlendi. Yüzde 87,8 duyarlılık ve %82,8 özgüllük ile anilin pozitif sperm yüzdesinin infertil ve fertil/normozoospermik bireyler arasındaki eşik değeri %26,92 olarak hesaplandı (Şekil 16).



Şekil 16. Anilin pozitif sperm yüzdesi için ROC eğrisi

Tablo 8. Anilin pozitif sperm yüzdesinin semen parametreleri, yaş ve DFI üzerine etkisi **r:** Spearman korelasyon katsayısı

	Yaş	Volüm	Sperm Kons.	Toplam Sperm Sayısı	Toplam Prog. Motil Sp. Sayısı	İleri Hareketli Sperm	Yerinde Hareketli Sperm	Immotil Sperm	Motilite	Normal Morfoloji	Vitalite	DFI	
r	-0,294	-0,0653	-0,658	-0,683	-0,682	-0,628	-0,108	0,635	-0,639	-0,668	-0,0206	0,164	
Anilin (+) sperm %	P	0,0015	0,4903	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,251	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8704	0,2157
n	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	65	88	

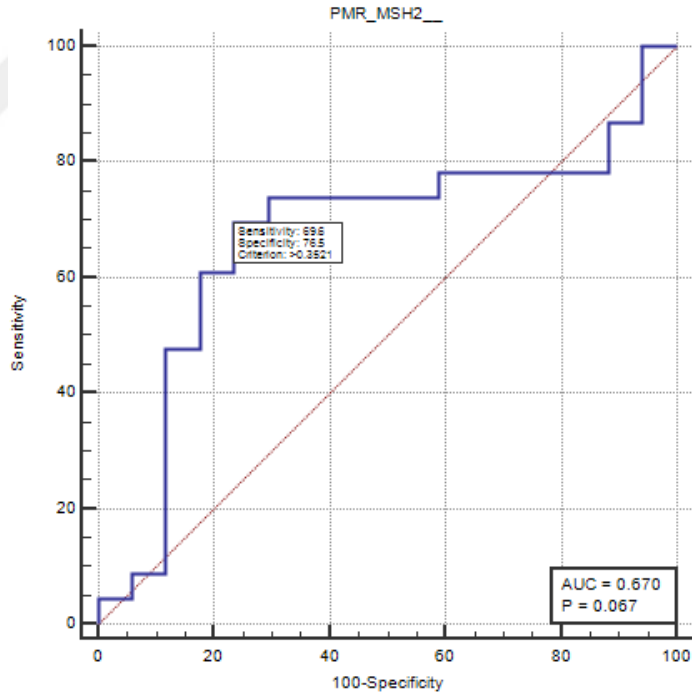
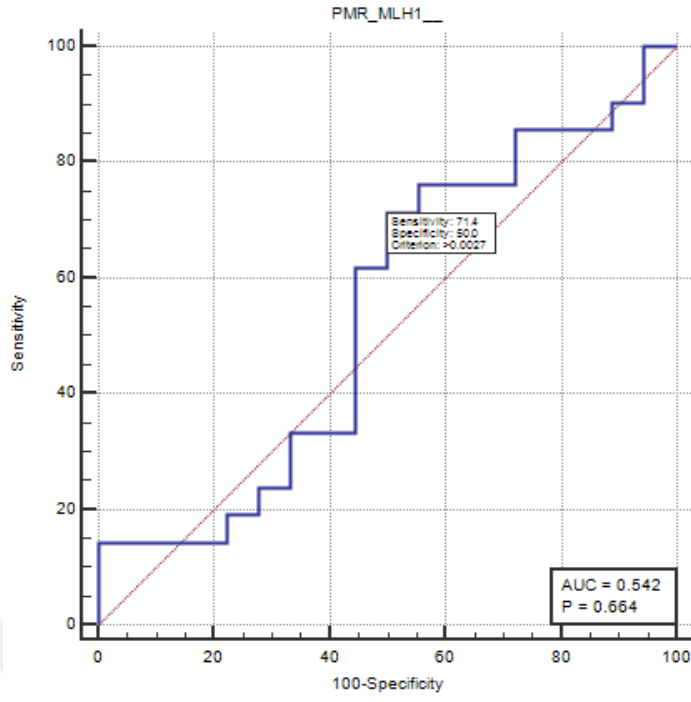
4.3. *MLH1* ve *MSH2* Genlerinin Promotor Bölgelerinin eş zamanlı PCR ile Analizi

MLH1 ve *MSH2* genlerinin promotor bölgelerinin metilasyon oranları sırasıyla 39 ve 40 katılımcıda semikantitatif MethyLight analizi ile ölçüldü.

Tablo 9. Gruplar arası *MLH1* ve *MSH2* promotor metilasyon yüzdelerinin karşılaştırması

	<i>MLH1</i> PMR		<i>MSH2</i> PMR	
	Kontrol	OAT	Kontrol	OAT
n	18	21	17	23
En düşük değer (%)	0,00002	0,00008	0,00020	0,00246
En yüksek değer (%)	0,04749	0,10760	27,93220	29,11830
Ortanca	0,00481	0,00964	0,09902	0,61300
Ortanca için %95 CI	0,0004962 - 0,02215	0,002473 - 0,01836	0,04397 - 0,3499	0,3227 - 1,0542
Çeyrekler arası aralık	0,0004600 - 0,02294	0,001690 - 0,01915	0,04209 - 0,3644	0,1464 - 1,3754
Hodges-Lehmann Ortanca Ayrımı	0,0005		0,3364	
%95 CI	-0,006873 - 0,009651		-0,005339 - 0,7587	
Kontrol grubu ortalama sıra	19,111		16,5882	
OAT grubu ortalama sıra	20,762		23,3913	
Mann-Whitney U	173		129	
	P = 0,6522		P = 0,0688	

MLH1 promotor metilasyonu kontrol ve OAT grupları arasında farklılık göstermemiştir (P=0,6522). İki grup arasındaki *MSH2* promotor metilasyonu kontrol grubunda OAT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük bulunmuştur (P=0,0688) (Tablo 9).



Şekil 17. *MLH1* ve *MSH2* promotor metilasyonları için ROC eğrileri

Tablo 10. *MLH1* ve *MSH2* promotor metilasyon yüzdelerinin diğer parametrelerle korelasyonu **r**: Spearman korelasyon katsayısı

		Yaş	Volüm	Sperm Kons.	Toplam Sperm Sayısı	Toplam Prog. Motil Sp. Sayısı	İleri Hareketli Sperm	Yerinde Hareketli Sperm	Immotil Sperm	Motilite	Normal Morfoloji	Vitalite	DFI	Anilin (+)
<i>MLH1</i> PMR	r	0,154	-0,034	0,024	0,018	-0,084	-0,129	-0,008	0,126	-0,126	0,021	-0,124	-0,145	0,401
	P	0,3480	0,8394	0,8841	0,9132	0,6102	0,4346	0,9597	0,4458	0,4458	0,8974	0,5911	0,4065	0,0188
	n	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	21	35	34
<i>MSH2</i> PMR	r	0,122	-0,060	-0,421	-0,408	-0,277	-0,201	-0,199	0,247	-0,247	-0,293	0,062	0,042	0,088
	P	0,4518	0,7118	0,0068	0,0090	0,0831	0,2141	0,2176	0,1248	0,1248	0,0661	0,7773	0,8063	0,6154
	n	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	23	36	35

MLH1 promotor metilasyonunun ROC analizi anlamlı bulunmamıştır (AUC=0,542, P=0,664). *MSH2* promotor metilasyonu için infertil ve kontrol grubundaki bireyler arasındaki ayırt etme gücü AUC=0,542 ve P=0,067 olarak hesaplanmıştır (Şekil 17). *MSH2* promotor metilasyon yüzdesinin %69,6 duyarlılık, %76,5 özgüllük ile eşik değeri %0,3621 olarak belirlenmiştir.

MLH1 ve *MSH2* promotor metilasyonları ile DFI arasında ilişki bulunmadı (sırasıyla P=0,4065 ve P= 0,8063). *MLH1* promotor metilasyonu ve anilin pozitif sperm yüzdesi arasında pozitif korelasyon bulundu (r=0,401, P=0,0188). *MSH2* promotor metilasyonu ile sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı arasında ise negatif korelasyon bulundu (sırasıyla r=-0,421 P=0,0068 ve r=-0,408, P=0,009) (Tablo 10).

4.4. Sigara Kullanımı ve Yaş

Yaşlanmanın *MLH1* ve *MSH2* promotor metilasyon yüzdelere ve DFI üzerine etkisi görülmedi (sırasıyla P=0,348, P=0,4518, P=0,9352) (Tablo 11). Kontrol ve OAT grupları arasında sigara kullanımı açısından istatistiksel bir farklılık bulunmadı (P=0,357). Sigara içen ve içmeyen kişiler arasında yaş, semen parametreleri, DFI, anilin pozitif sperm yüzdesi ve *MLH1* ve *MSH2* metilasyon yüzdelere dağılımı açısından bir farklılık bulunmadı (Tablo 12).

Tablo 11. Yaşın metilasyon ve DFI üzerine etkisi

Yaş	<i>MLH1</i> PMR	<i>MSH2</i> PMR	DFI
n	39	40	100
Spearman's katsayısı (rho)	0,154	0,122	-0,00823
Anlamlılık düzeyi	P=0,3480	P=0,4518	P=0,9352
95% CI (rho)	-0,169 - 0,448	-0,197 - 0,418	-0,204 - 0,188

Tablo 12. Sigara kullanımının diğer parametrelerin dağılımına etkisi ^a Mann-Whitney test

	Sigara İçenler			Sigara İçmeyenler			P ^a
	n	Ortanca	Ortalama Sıra	n	Ortanca	Ortalama Sıra	
Yaş	52	34	62,88	70	32	60,47	0,71
Volüm	52	3	58,23	70	3	63,93	0,3434
Sperm Kons.	52	7	58,38	70	9	63,81	0,4005
Toplam Sperm Sayısı	52	23	57,24	70	31	64,66	0,2512
Toplam Prog. Motil Sp. Sayısı	52	3	59,63	70	4	62,89	0,6136
İleri Hareketli (Progresif) Sperm	52	20	59,85	70	15	62,73	0,6553
Yerinde Hareketli Sperm	52	5	59,83	70	5	62,74	0,5719
Immotil Sperm	52	75	63,39	70	79	60,09	0,6093
Motilite	52	25	59,38	70	21	63,08	0,5664
Normal Morfoloji	52	3	59,60	70	3	62,91	0,6014
Vitalite	34	35	39,93	40	34	35,44	0,3695
DFI	41	25,13	48,46	54	23,62	47,65	0,8865
% Anilin (+) sp	50	39,49	59,85	60	25,56	51,88	0,1917
<i>MLH1</i> PMR	18	0,008735	18,78	18	0,00384	18,22	0,8743
<i>MSH2</i> PMR	19	0,357	19,18	18	0,4087	18,81	0,9153

5. TARTIŞMA

Erkek infertilitesi sperm üretimi ya da fonksiyonunda bozulmaya neden olan genetik, epigenetik, endokrin veya çevresel değişimlerin bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir (Agarwal ve ark., 2019). Hayvan modelleri ve spermatogenik bozukluğu olan hastalarla yapılan çalışmalar DNA onarım mekanizmalarında rol alan genlerin ve epigenetik faktörlerin erkek infertilitesinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Tez çalışmasında DNA onarım mekanizmalarından biri olan MMR'da görev alan genlerden *MLH1* ve *MSH2* genlerinin promotor bölge metilasyon değişikliklerinin sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca sperm DNA kondensasyonunun, yaşlanmanın ve sigara kullanımının etkileri incelenmiştir.

Çalışmada kontrol ve OAT grubunu oluşturan kişilerin yaşları arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır ($P=0,55$). Kontrol ve OAT grubundaki kişiler beklenildiği üzere sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, toplam progresif motil sperm sayısı, progresif hareketli sperm yüzdesi, sperm motilite yüzdesi, immotil sperm ve normal morfoloji açısından istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.

Çalışmada *MLH1* promotor metilasyonu iki grup arasında farklılık göstermemiştir ($P=0,6522$). *MSH2* promotor metilasyonu kontrol grubunda infertil grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük bulunmuştur ($P=0,0688$). Tez çalışmasında sperm *MLH1* promotor metilasyonunun OAT ve normozoospermik erkekleri ayırt etmedeki tahmin gücü anlamlı bulunmamıştır ($P=0,664$). *MSH2* promotor metilasyonu için ise %69,57 duyarlılık ve %76,47 özgüllük ile eşik değeri %0,3621 olarak hesaplanmıştır. *MLH1* ve *MSH2* genomik bütünlüğü korumada, DNA hasar sinyalizasyon yollarında, mayozda ve gametogenezde rol alan ve testiste yüksek derecede eksprese edilen MMR proteinleridir (Fagerberg ve ark., 2014; Crouse, 2016; Manhart ve Alani, 2016). MMR'daki hatalar bazı kanserlere yatkınlığın yanı sıra infertiliteyle de ilişkilendirilmiştir (Gunes ve ark., 2015). Literatürde bu iki gendeki mutasyonların erkek infertilitesiyle ilişkilendirildiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. *Mlh1* defektli farelerde mikrosatellit instabilitesiyle birlikte infertilite de gözlenir (Mukherjee ve ark., 2010). *Mlh1*^{-/-} erkek farelerde germinal farklılaşma pakiten aşamasında durur ve hiç olgun sperm üretilmez (Terribas ve ark., 2010). *MLH1*'in mRNA ekspresyon seviyesi spermatogenik hataları olan

infertil hastalarda daha düşük bulunmuştur (Terribas ve ark., 2010). İnfertil erkeklerde *MLH1* odaklarının sayısı ile değerlendirilen mayotik rekombinasyon sayısı anlamlı olarak daha düşük olarak bulunmuştur (Sun ve ark., 2007; Sanderson ve ark., 2008). İdiyopatik infertilite tanısı alan 1292 erkek hasta ve 480 fertil kontrolde *MLH1*'deki bir polimorfizmin azospermi veya oligospermide risk faktörü oluşturabileceği saptanmıştır. Araştırmacılar ayrıca *MLH1* polimorfizminin sperm DNA hasarının artışıyla ilişkili olabileceğini bulmuşlardır (Ji ve ark., 2012). *Msh2* knockoutlu erkek farelerin fertilitelerinin etkilenmediği bildirilmesine rağmen, bu farelerde spermatogenik hatalar gözlenmiştir (Paul ve ark., 2007; Mukherjee ve ark., 2010). Paul ve ark. (2007), knockout çalışmalarında *Msh2*^{-/-} farelerde apoptotik germ hücrelerinde artış ve epididimal sperm sayısında düşüş saptamışlardır.

Literatürde erkek infertilitesinde *MLH1* ve *MSH2* genlerinin promotor metilasyon değişimlerinin incelendiği bir çalışma bulunmaktadır. Güneş ve arkadaşlarının (2018) yaptığı bu pilot çalışmada, *MLH1* ve *MSH2*'nin promotor metilasyonu metilasyon spesifik PCR (MSP) ile 10 oligozoospermik ve 29 normozoospermik erkekte analiz edilmiştir. Araştırmacılar şiddetli oligozoospermik erkeklerin (<5 milyon sperm/ml) spermlerinde *MLH1*'in anlamlı şekilde daha fazla metile olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada *MSH2* promotor metilasyonu infertil erkeklerde daha yüksek bulunmasına karşın istatistiksel anlamlılık kazanmamıştır. ROC analizi *MLH1* metilasyonu %22,2 duyarlılık ve %100 özgüllük için pozitif tahmin değeri %100 ve negatif tahmin değeri %60 olarak belirlenmiştir (Gunes ve ark., 2018). Çalışma sonuçları arasındaki farklılık özellikle *MLH1* için seçilen promotor bölgeden ve hasta gruplarının farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Hücre hatları ile yapılan çalışmalar *MLH1* promotorunda CpG alanlarının yoğun olduğu bölgelerin bazılarının *MLH1* ekspresyonu üzerinde etkili olmadığı ya da o bölgelerin metilasyonunun genin ekspresyonu ile tam olarak korele olmadığını ortaya çıkarmıştır (Deng ve ark., 1999). Ancak, *MLH1* promotorunda transkripsiyon başlama alanına yakın lokalize olan kısa proksimal dizinin (C bölgesi, -248 ~ -178) metilasyonunun *MLH1* ekspresyonunun susturulması üzerinde kritik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Deng ve ark., 1999). Tez çalışmasında *MLH1*'in promotorunda C bölgesi metilasyon durumu kantitatif olarak analiz edilmiştir. İlaveten pilot çalışmada metilasyon durumunun kalitatif olarak değerlendirilmiş olması iki çalışmanın sonuçlarının paralel olmamasına neden olmuş

olabilir. Tez çalışmasında elde edilen sınırın biraz üstündeki anlamlılık değerleri, *MLH1* ve özellikle *MSH2* promotor metilasyon değişimlerinin daha fazla örnek üzerinde çalışılmasının önemini göstermektedir.

Çalışmada kontrol grubunda DNA fragmentasyon oranı, OAT grubuna kıyasla daha düşük olarak bulunmuştur ($P=0,0554$). Ancak bu farklılık istatistiksel olarak tam anlamlılık kazanmamıştır. Çalışmada DFI sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı ve toplam progresif motil sperm sayısı ile negatif korelasyonlu olarak bulunmuştur. Literatürde yüksek DNA fragmentasyonu sıklıkla infertiliteyle ilişkilendirilmiştir (Giwerzman ve ark., 2010; Ramos-Ibeas ve ark., 2014). Sharma ve ark (2010)., DNA fragmentasyonunu TUNEL yöntemini akım sitometrisi ile analiz ederek değerlendirmiştir. Araştırmacılar normozoospermik/fertil erkeklerden oluşan kontrol grubundaki DFI'ı infertil gruba göre daha düşük olarak belirlemişlerdir (Sharma ve ark., 2010). Aynı araştırmacılar ilerleyen yıllarda aynı yöntemle farklı çalışma grubunda paralel sonuçlar bulmuşlardır. Doksanbeş normozoospermik ve/veya fertil kontrol ile 261 infertil erkeğin TUNEL ile DNA fragmentasyonunun belirlendiği bu çalışmada infertil grupta DFI'nın fertil gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Sharma ve ark., 2016). Araştırmacılar yüksek özgüllük ve yüksek pozitif tahmin değeri ile DFI için eşik değerini %16,8 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarda akım sitometrisi sayesinde her örnek için ortalama 10,000 sperm sayımı gerçekleştirmişlerdir. Tez çalışmasında DFI TUNEL yöntemi ile immunofloresan mikroskop altında manuel sayımla analiz edilmiştir. Her örnek için ortalama sayılan sperm sayısı akım sitometrisine kıyasla çok daha azdır. Örnek başına değerlendirilen hücre sayısının artırılması çalışmanın istatistiksel gücünü arttırabilir. Kabartan ve ark. (2019), <10 milyon sperm/ml olan oligozoospermik hasta grubu ve TUNEL sonuçlarını floresan mikroskop ile değerlendirdikleri çalışmalarında DFI'nın infertil grupta kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada araştırmacılar, DFI için eşik değerini %17 olarak belirlemiş ve DFI'nın sperm konsantrasyonu, motilite ve normal morfoloji ile negatif korelasyonlu olduğunu bulmuşlardır (Kabartan ve ark., 2019). Bu çalışmayla tez çalışmasına dahil edilen infertil grup arasında farklılık bulunmaktadır. Tez çalışması için seçilen hasta grubunda sperm konsantrasyonu için alt sınır <15 milyon/ml olarak belirlenmiştir.

Tez çalışmamız infertilitede *MLH1* ve *MSH2*'nin promotor bölge metilasyonları ile DFI arasında ilişkinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Tez çalışmasında örneklerde *MLH1* ya da *MSH2*'nin promotor bölge metilasyonları ile DFI arasında bir ilişki bulunmamıştır (Sırasıyla $P=0,4065$ ve $P=0,8063$). Literatürdeki çalışmalar imprint genlerdeki metilasyon değişikliklerinin erkek infertilitesi ile ilişkisi üzerine yoğunlaşmıştır (Klaver ve ark., 2013; Xu ve ark., 2016). En güncel çalışmalardan birinde, imprint genlerdeki DNA metilasyon seviyesinin sperm DFI ile korelasyonlu olduğu ve bu genlerdeki anormal metilasyonun sperm DNA hasarıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Ni ve ark., 2019). Fertilizasyondan sonra hasarlı sperm DNA'sı bir ölçüde ovumun onarım mekanizmalarıyla onarılmaktadır (Gunes, 2018). Ovumun onarım kapasitesi maternal yaşlanmaya, hasar oranına ve hasar tipine göre değişiklik göstermektedir (Ahmadi ve Ng, 1999; Hamatani ve ark., 2004). Bu sebeple çalışmanın daha büyük bir kohort üzerinde tekrarlanması önem arz etmektedir.

Çalışma kapsamında ayrıca *MLH1* ve *MSH2* promotor metilasyonlarının semen parametreleri üzerine etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. *MLH1* promotor metilasyonu ile anilin pozitif sperm yüzdesi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0,401$, $P=0,0188$). *MSH2* promotor metilasyonu ile sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı arasında negatif korelasyon bulunmuştur (sırasıyla $r=-0,421$, $P=0,0068$ ve $r=-0,408$, $P=0,009$). *MSH2* metilasyon oranı ile normal morfoloji ve toplam progresif motil sperm sayısı arasında istatistiksel anlamlılığı olmayan korelasyon vardır. Bu korelasyonların anlamlılık kazanabilmesi için daha fazla örnek üzerinde çalışılması gerektiği istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Güneş ve ark. (2018), benzer şekilde *MLH1* ve *MSH2* metilasyonu ile sperm konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki bildirmişlerdir.

Tez çalışmasında kontrol grubunun anilin pozitif sperm yüzdesi, OAT grubuna göre daha düşük bulunmuştur ($P<0,0001$). Anilin mavisi boyaması sperm kromatin kondensasyonunun görüntülenmesi için kullanılmaktadır (Kim ve ark., 2013). Fertil erkekler sperm nükleer proteinlerden P1 ve P2'yi yaklaşık olarak aynı oranlarda eksprese ederler (Hammoud ve ark., 2009). P1:P2 oranındaki değişimler histonların protaminlerle anormal yer değişimlerine neden olabilmektedir (Zhang ve ark., 2006; Zini ve ark., 2007; Francis ve ark., 2014). Bu durum sperm DNA'sının paketlenmesinde yetersizliklere ve infertiliteye neden olabilmektedir (Carrell ve ark., 2008). Yapılan

çalışmalar histon protamin geçişindeki hataların erkek infertilitesiyle ve erken dönem düşüklerle ilişkili olabileceğini göstermektedir (Zhang ve ark., 2006; Zini ve ark., 2007; Yu ve ark., 2014; Jerre ve ark., 2019; Pourmasumi ve ark., 2019). Pourmasumi ve ark. (2019), 342 normozoospermik ve 1044 infertil bireyin semen örneklerini sperm kromatin kondensasyonu açısından değerlendirmiş ve anilin pozitif spermilerin infertil grupta daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (2006), daha küçük bir kohortta (10 fertil ve 20 infertil) benzer bir sonuç elde etmişler ve infertil erkeklerin pozitif ve orta şekilde boyanan spermatozoa oranının fertillere göre daha yüksek oranda olduğunu bulmuşlardır. Zini ve ark. (2007), astenospermik erkeklerde sperm nükleer histonun (H2B) protamine (P1+P2) oranını fertil erkeklere göre daha yüksek olarak bulmuşlardır. İnfertiliteyle ilişkisine ek olarak, bu yıl içinde yayınlanan bir çalışmada histonca zengin spermatozoa yüzdesinin artması erken dönem düşüklerle de ilişkili bulunmuştur (Jerre ve ark., 2019). Bu çalışmada araştırmacılar yaklaşık 5000 IVF ve ICSI siklusu üzerinde çalışmışlar ve yüksek histon oranının ICSI'de artmış düşük riskinin tahmin edilebilirliği açısından kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Tez çalışmasında anilin pozitif sperm sayısı toplam sperm sayısı, sperm konsantrasyonu, progresif motil sperm yüzdesi, toplam motilite yüzdesi, toplam progresif motil sperm sayısı ve normal morfoloji ile negatif korelasyonlu bulunmuştur. Anilin pozitif sperm sayısı ile immotil sperm yüzdesi arasında pozitif bir korelasyon vardır. Sperm kromatin kondensasyonundaki değişimlerin sperm sayısı, motilitesi ve normal morfoloji ile olan kuvvetli ilişkisi literatürle de desteklenmektedir (Kim ve ark., 2013; Pourmasumi ve ark., 2019). Protaminlerin histonlarla yerdeğişimi mayoz tamamlandıktan sonra spermiyogenezin uzayan spermatid aşamasında meydana gelir. Bu spermatidler protaminlerin yerleşmesi sırasında olgun spermin hareket ve fertilitate kabiliyeti üzerine etkili olan süreçler geçirirler (Garcia-Rodriguez ve ark., 2018). Bu durumun protaminasyondaki hataların ve dolayısıyla histon yüzdesindeki artışın semen parametreleri üzerinde etkili olabilmesine neden olabileceği düşünülmektedir (Carrell ve ark., 2008).

Çalışmada sigara içiminin infertilite ile ilişkisi bulunmamıştır ($P=0,357$). Sigara kullanımı semen parametreleri, DFI, anilin pozitif sperm sayısı ve *MLH1* ve *MSH2* metilasyon oranları üzerine etki göstermemiştir. Literatürde sigara içiminin erkek infertilitesine ve semen parametreleri etkisi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları

çeşitlilik göstermektedir (Gunes ve ark., 2018). Hamad ve ark. (2014), sigara içen erkeklerde sperm sayısının, motilitenin ve vitalitenin anlamlı şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca sigara içen grubun sperm örneklerinde histon oranını sigara içmeyenlere kıyasla anlamlı olarak yüksek bulmuştur (Hamad ve ark., 2014). Collodel ve ark. (2010) yaptığı çalışmada infertil sigara içen ve infertil sigara içmeyen hastalar semen parametreleri açısından benzerlik görülmüş, ancak sperm konsantrasyonu sigara içen infertil grupta sigara içme yoğunluğuna bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Araştırmacılar, bizim bulgularımızla paralel olarak idiyopatik infertil erkeklerde sigara içmenin semen parametreleri üzerine kritik bir etki göstermediğini bildirmiştir. İnfertil sigara içenler ve infertil sigara içmeyenler arasında yapılan bir çalışmada, iki grup arasında sperm sayısı, progresif motilite, normal morfoloji ve sperm kromatin kondensasyonu açısından farklılık bulunmuştur (Mostafa ve ark., 2018). Çalışmalar sigaranın konvansiyonel semen parametreleri ve sperm fonksiyon testleri üzerine olan etkisinin içilen sigara miktarı ve sigara içme süresiyle ilişkili olabileceğini göstermektedir (Collodel ve ark., 2010; Cui ve ark., 2016; Mostafa ve ark., 2018). Cui ve ark. (2016), 841 sigara içen ve 287 sigara içmeyen erkekle yaptıkları çalışmada içilen sigara miktarına bağlı olarak sperm motilitesinin azaldığını, uzun süre sigara içenlerde motilite ile birlikte sperm konsantrasyonu ve vitalitenin düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir. Sigara içen grupta DNA fragmantasyon oranı da artış göstermiştir. Yüzdoksan sekiz normozoospermik ve 124 infertil hasta ile yapılan bir çalışmada ağır içici olan grupta sigara içmeyen gruba kıyasla istatistiksel olarak daha fazla histon-protamin geçişi hataları gözlemlendiği bildirilmiştir (Yu ve ark., 2014). Benzer şekilde Hamad ve ark. (2014), sperm histon oranını sigara içenlerde sigara içmeyenlere kıyasla anlamlı olarak yüksek olarak bulmuştur. Beşbin sekizyüz altmışbeş katılımcının sonuçlarının değerlendirildiği bir meta-analizde sigara içiminin sperm sayısının, sperm hareketliliğinin ve normal morfolojinin azalması ile ilişkili olduğunu ve sigaranın bu etkisinin infertil erkeklerde genel popülasyona oranla ve ağır içicilerde az içenlere kıyasla daha fazla gözlemlendiği sonucuna varmıştır (Sharma ve ark., 2016). Sigara içiminin somatik hücrelerde DNA metilasyonunu değiştirdiği çalışmalarla gösterilmiştir (Word ve ark., 2013). Son yıllarda yapılan bir çalışmada sigara içiminin sperm DNA metilasyonunu etkilediğini, sigara içen ve içmeyen erkekler arasında genom boyu sperm DNA metilasyon farklılıkları bulunduğu bildirilmiştir (Jenkins ve ark. 2017).

Araştırmacılar, sigara içen grupta metilasyonu değişen 141 CpG tanımlamıştır. Aynı araştırmacılar yaşlanmanın da sperm DNA'sında genom boyu CpG metilasyon değişikliklerine neden olduğunu ancak farklı CpG'leri etkilediklerini göstermişlerdir (Jenkins ve ark. 2014). Tez çalışmasında istatistiksel değerlendirme sigara içenler ve içmeyenler üzerinden yapılmıştır. Sigara içme süresinin ve yoğunluğunun analiz edilmemesi ve infertil grubun tedavi sürecinde sigarayı bırakma ihtimali çalışmada sigara içimi ile semen parametreleri, sperm metilasyon oranları, DNA fragmentasyonu ve anilin pozitif sperm sayısı arasında ilişki olmamasını açıklayabilir.

Çalışmada yaşlanmanın *MLH1* ve *MSH2* promotor metilasyon oranlarına ve DFI üzerine etkisi görülmemiştir. Ancak yaşlanma ile spermde anilin pozitif sperm yüzdesi artışı ilişkili bulunmuştur ($r=-0,294$, $P=0,0015$). Kim ve ark. (2013), daha dar bir yaş aralığına sahip erkeklerden alınan semen örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada sperm kromatin kondensasyonu ile yaş arasında bir ilişki bulmamışlardır.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar erkeklerde fertilitenin erkeğin genel sağlık durumu hakkında bir belirteç olabileceğini göstermektedir. Literatür, spermatogenik bozuklukları olan erkeklerin başta testis kanseri olmak üzere daha yüksek kanser riski ile karşı karşıya olduğunu ortaya koymaktadır (Jacobsen ve ark., 2000; Walsh, 2009; Walsh ve ark., 2010; Eisenberg ve ark., 2013). Anormal semen parametreleri görülen erkeklerde testis kanseri riskinin 20 kat daha fazla ve bu kişilerin birinci derece akrabalarındaki riskin %52 daha yüksek olduğu bulunmuştur (Nagirnaja ve ark., 2018). Eisenberg ve ark. (2013), 2238 kişiyle yaptıkları çalışmada azospermik erkeklerin 2,2 kat daha fazla kanser riski taşıdıklarını göstermişlerdir. Son yıllarda yapılan büyük bir kohort çalışmasında oligospermi, çocukluk dönemi kanser riskinin iki kat artışıyla ilişkilendirilmiştir (Anderson ve ark., 2017). 2018'de yapılan bir çalışmada infertiliteyi kansere bağladığı düşünülen genetik faktörler araştırılmıştır (Nagirnaja ve ark., 2019). Bu çalışmada önce fare genomu veri bankalarından erkek infertilitesiyle ilişkilendirilen 666 gen ve kanserle ilişkilendirilen 1194 gen listelenmiş ve bu genlerin 64'ünün ortak olduğu belirlenmiştir. Sonra farede erkek infertilitesiyle ilişkilendirilen genlerin insan ortologları listelenmiştir. Bu liste insan kanser somatik mutasyon veri bankalarından elde edilen genlerle kıyaslanmıştır. Sonuç olarak aralarında *MLH1*'in de bulunduğu ve çoğunluğu tümör baskılayıcı ve onkogenlerden oluşan 25 genin insanlarda hem erkek infertilitesiyle hem de kanserle ilişkili olduğu belirlenmiştir.

MLH1 ve *MSH2*'deki mutasyon ve epimutasyonların başta herediter kolon kanseri olmak üzere birçok kanserle ilişkisi literatürde önceden bildirilmiştir (Ling ve ark., 2011; Alkam ve ark., 2013; Su ve ark., 2014; Hu ve ark., 2016;). Tez çalışmasında *MLH1* ve *MSH2*'deki epigenetik değişikliklerin infertilite ile olan ilişkisinin araştırılması, ilerleyen zamanlarda bu değişiklikleri taşıyan infertil bireylerin kanser risk değerlendirmeleri açısından da önem taşımaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çok sayıda laboratuvar ve radyolojik inceleme arasından en güncel WHO protokollerine göre standardize edilen semen analizi erkeğin fertilité durumunun değerlendirilmesinde kullanılan en önemli testlerden biridir. Ancak fertilité potansiyelinin temel testi olmasına rağmen, erkeğin gerçek üreme potansiyelini belirleme yetersiz kalabilmektedir. Bu durum semenin rutin değerlendirilmesine sperm DNA fragmantasyonu gibi ileri testlerin ilave edilmesi gereğini ortaya koymaktadır.

Son yıllarda sperm epigenetik çalışmaları artış göstermiş ve spermdeki epigenetik sapmaların spermatogenik bozukluklarla ilişkilendirildiği çok sayıda çalışma yapılmıştır. Tez çalışması *MLH1* ve *MSH2* genlerindeki epigenetik değişikliklerin sperm DNA fragmantasyonu üzerine olan etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Genomik bütünlüğü korumada, onarımda ve mayozdaki önemli görevleri yanı sıra infertil erkeklerle daha önceden yapılan çalışmalar bu iki genin sperm DNA'sı üzerine etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmada *MLH1* ve *MSH2* genlerinin promotor metilasyon değişikliklerinin sperm DNA fragmantasyonu üzerine etkisi bulunmamıştır. Ancak sonuçlar bu genlerin promotor metilasyon değişikliklerinin konvansiyonel semen parametreleri ve sperm DNA paketlenmesi üzerine etkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca *MSH2* promotor metilasyonu ve sperm DNA fragmantasyonu çalışmaya dahil edilen infertil grupta daha fazla olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonuçlarını doğrulamak için daha fazla örnek üzerinde tekrar edilmesine gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abur U, Gunes S, Ascı R, Altundag E, Akar OS, Ayas B, Karadag Alpaslan M, Ogur G. Chromosomal and Y-Chromosome Microdeletion Analysis in 1300 Infertile Males and the Fertility Outcome of Patients with AZFc Microdeletions. *Andrologia* (Baskıda)
- Agarwal A, Majzoub A, Parekh N, Henkel R. A Schematic Overview of the Current Status of Male Infertility Practice. *World J Mens Health* DOI: 10.5534/wjmh.190068.
- Agarwal A, Prabakaran S, Said T. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 2005; 26(6): 654-660.
- Ahmadi A, Ng S. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999; 284(6): 696-704.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(1): 3-13.
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122(4): 497-506.
- Aitken RJ, Nixon B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(12): 785-793.
- Alkam Y, Mitomi H, Nakai K, Himuro T, Saito T, Takahashi M, Arakawa A, Yao T, Saito M. Protein expression and methylation of DNA repair genes hMLH1, hMSH2, MGMT and BRCA1 and their correlation with clinicopathological parameters and prognosis in basal-like breast cancer. *Histopathology* 2013; 63(5): 713-725.
- Anderson RE, Hanson HA, Lowrance WT, Redshaw J, Oottamasathien S, Schaeffer A, Johnstone E, Aston KI, Carrell DT. Childhood Cancer Risk in the Siblings and Cousins of Men with Poor Semen Quality. *J Urol* 2017; 197(3 Pt 2): 898-905.
- Andrabi SM. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24(12): 561-569.
- Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 2005; 20(5): 1298-1306.
- Aoki VW, Liu L, Carrell DT. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol Hum Reprod* 2006; 12(1): 41-50.

- Aprioku JS. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil* 2013; 14(4): 158-172.
- Aston KI, Carrell DT. Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. *J Androl* 2009; 30(6): 711-725.
- Behre HM, Bergmann M, Simoni M, Tuttelmann F. Primary Testicular Failure. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279076/>, 2000.
- Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Amar E, Zini A. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertil Steril* 2014; 101(6): 1588-1593.
- Beyaz CC, 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(3): 365-371.
- Boushaba S, Belaaloui G. Sperm DNA fragmentation and standard semen parameters in algerian infertile male partners. *World J Mens Health* 2015; 33(1): 1-7.
- Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril* 2012; 97(2): 267-274.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *Int J Androl* 2008; 31(6): 537-545.
- Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Oliva R. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl* 2015; 17(4): 601-609.
- Collodel G, Capitani S, Pammolli A, Giannerini V, Geminiani M, Moretti E. Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study. *J Androl* 2010; 31(2): 108-113.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16(3): 231-245.
- Crouse GF. Non-canonical actions of mismatch repair. *DNA Repair (Amst)* 2016; 38: 102-109.
- Cui X, Jing X, Wu X, Wang Z, Li Q. Potential effect of smoking on semen quality through DNA damage and the downregulation of Chk1 in sperm. *Mol Med Rep* 2016; 14(1): 753-761.

- Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2009; 15(3): 206-213.
- Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernandez JL, Gosalvez J, Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(3): 213-223.
- Dadhich P, Ramasamy R, Lipshultz LI. The male infertility office visit. *Minerva Urol Nefrol* 2015; 67(2): 157-168.
- de Lamirande E, Lamothe G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(4): 502-510.
- de Mateo S, Sassone-Corsi P. Regulation of spermatogenesis by small non-coding RNAs: role of the germ granule. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 29: 84-92.
- De Vries M, Ramos L, Housein Z, De Boer P. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biol Open* 2012; 1(5): 446-457.
- Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999; 59(9): 2029-2033.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(8): E32.
- Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 2003; 61(1): 103-115.
- Eguizabal C, Herrera L, De Onate L, Montserrat N, Hajkova P, Izpisua JC. Characterization of the Epigenetic Changes During Human Gonadal Primordial Germ Cells Reprogramming. *Stem Cells* DOI: 10.1002/stem.2422
- El Hajj N, Zechner U, Schneider E, Tresch A, Gromoll J, Hahn T, Schorsch M, Haaf T. Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sex Dev* 2011; 5(2): 60-69.
- Emirzeoğlu D. Sperm DNA Fragmantasyonu, Dna Hasarı ve Protamin Oranının Belirlenmesi ve Sperm Parametrelerine Etkisi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Yüksek Lisans Tezi, 2019; 27.
- Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 2008; 10(5): 786-790.
- Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjostedt E, Lundberg E, Szigyarto CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P,

- Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlen M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13(2): 397-406.
- Fernandez-Diez C, Gonzalez-Rojo S, Lombo M, Herraiz MP. Impact of sperm DNA damage and oocyte-repairing capacity on trout development. *Reproduction* 2016; 152(1): 57-67.
- Ferras C, Zhou XL, Sousa M, Lindblom A, Barros A. DNA mismatch repair gene hMLH3 variants in meiotic arrest. *Fertil Steril* 2007; 88(6): 1681-1684.
- Fischer JM, Dudley S, Miller AJ, Liskay RM. An intact Pms2 ATPase domain is not essential for male fertility. *DNA Repair (Amst)* 2016; 39: 46-51.
- Fok KL, Chen H, Ruan YC, Chan HC. Novel regulators of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 29: 31-42.
- Francis S, Yelumalai S, Jones C, Coward K. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertil (Camb)* 2014; 17(2): 80-89.
- Franik S, Hoeijmakers Y, D'Hauwers K, Braat DD, Nelen WL, Smeets D, Claahsen-van der Grinten HL, Ramos L, Fleischer K. Klinefelter syndrome and fertility: sperm preservation should not be offered to children with Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* DOI: 10.1093/humrep/dew179.
- Garcia-Rodriguez A, Gosalvez J, Agarwal A, Roy R, Johnston S. DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. *Int J Mol Sci* 2018; 20(1).
- Gilbert SF. Spermatogenesis. *Developmental Biology*. 6th edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/>, 2000.
- Giwerzman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, Rylander L. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 2010; 33(1): e221-227.
- Gonzalez-Marin C, Gosalvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci* 2012; 13(11): 14026-14052.
- Goodrich R, Johnson G, Krawetz SA. The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch Androl* 2007; 53(3): 161-167.
- Gunes S, Agarwal A, Henkel R, Mahmutoglu AM, Sharma R, Esteves SC, Aljowair A, Emirzeoglu D, Alkhani A, Pelegrini L, Joumah A, Sabanegh E. Association

- between promoter methylation of MLH1 and MSH2 and reactive oxygen species in oligozoospermic men-A pilot study. *Andrologia* 2018; 50(3).
- Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2015; 31(3): 309-319.
- Gunes S, Arslan MA, Hekim GN, Asci R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(5): 553-569.
- Gunes S, Asci R, Okten G, Atac F, Onat OE, Ogur G, Aydin O, Ozcelik T, Bagci H. Two males with SRY-positive 46,XX testicular disorder of sex development. *Syst Biol Reprod Med* 2013; 59(1): 42-47.
- Gunes S, Metin Mahmutoglu A, Arslan MA, Henkel R. Smoking-induced genetic and epigenetic alterations in infertile men. *Andrologia* 2018; 50(9): e13124.
- Gunes S, Sengupta P, Henkel R, Alguraigari A, Sinigaglia MM, Kayal M, Joumah A, Agarwal A. Microtubular Dysfunction and Male Infertility. *World J Mens Health* 2018 DOI: 10.5534/wjmh.180066
- Gunes S, Sertyel S. Sperm DNA Damage and Oocyte Repair Capability. *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*, Springer 2018; 321-346.
- Gupta N, Gupta S, Dama M, David A, Khanna G, Khanna A, Rajender S. Strong association of 677 C>T substitution in the MTHFR gene with male infertility-a study on an indian population and a meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6(7): e22277.
- Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, He Z. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 29: 66-75.
- Hamad MF, Shelko N, Kartarius S, Montenarh M, Hammadeh ME. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrology* 2014; 2(5): 666-677.
- Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Staggs CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 2004; 13(19): 2263-2278.
- Hammoud S, Liu L, Carrell DT. Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation. *Andrologia* 2009; 41(2): 88-94.
- Hao SL, Ni FD, Yang WX. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* 2019; 706: 201-210.

- Heyn H, Ferreira HJ, Bassas L, Bonache S, Sayols S, Sandoval J, Esteller M, Larriba S. Epigenetic disruption of the PIWI pathway in human spermatogenic disorders. *PLoS One* 2012; 7(10): e47892.
- Hotaling J, Carrell DT. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology* 2014; 2(3): 339-350.
- Hu MH, Liu SY, Wang N, Wu Y, Jin F. Impact of DNA mismatch repair system alterations on human fertility and related treatments. *J Zhejiang Univ Sci B* 2016; 17(1): 10-20.
- Hu Z, Xia Y, Guo X, Dai J, Li H, Hu H, Jiang Y, Lu F, Wu Y, Yang X, Li H, Yao B, Lu C, Xiong C, Li Z, Gui Y, Liu J, Zhou Z, Shen H, Wang X, Sha J. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia. *Nat Genet* 2012; 44(2): 183-186.
- Hughes JF, Rozen S. Genomics and genetics of human and primate y chromosomes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012; 13: 83-108.
- Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl* 2012; 14(6): 816-821.
- Ioannou D, Miller D, Griffin DK, Tempest HG. Impact of sperm DNA chromatin in the clinic. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(2): 157-166.
- Izzo CR, Monteleone PA, Serafini PC. Human reproduction: current status. *Rev Assoc Med Bras* 2015; 61(6): 557-559.
- Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, Hansen J, Olsen JH, Skakkebaek NE, Moller H. Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *BMJ* 2000; 321(7264): 789-792.
- Jenkins TG, Aston KI, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. *PLoS Genet* 2014; 10(7): e1004458.
- Jenkins TG, James ER, Alonso DF, Hoidal JR, Murphy PJ, Hotaling JM, Cairns BR, Carrell DT, Aston KI. Cigarette smoking significantly alters sperm DNA methylation patterns. *Andrology* 2017; 5(6): 1089-1099.
- Jerre E, Bungum M, Evenson D, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay high DNA stainability sperm as a marker of early miscarriage after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2019; 112(1): 46-53 e42.
- Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(3): 238-244.

- Ji G, Long Y, Zhou Y, Huang C, Gu A, Wang X. Common variants in mismatch repair genes associated with increased risk of sperm DNA damage and male infertility. *BMC Med* 2012; 10: 49.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C, I. European Association of Urology Working Group on Male. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012; 62(2): 324-332.
- Kabartan E, Gunes S, Arslan MA, Asci R. Investigating the relationship between BRCA1 and BRCA2 genes methylation profile and sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrologia* 2019; 51(7): e13308.
- Kahn SL, Ronnett BM, Gravitt PE, Gustafson KS. Quantitative methylation-specific PCR for the detection of aberrant DNA methylation in liquid-based Pap tests. *Cancer* 2008; 114(1): 57-64.
- Kaur M, Singh A, Singh K, Gupta S, Sachan M. Development of a multiplex MethyLight assay for the detection of DAPK1 and SOX1 methylation in epithelial ovarian cancer in a north Indian population. *Genes Genet Syst* 2016; 91(3): 175-181.
- Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, Kim SH, Moon SY, Choi YM. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med* 2013; 40(1): 23-28.
- Kim IW, Khadilkar AC, Ko EY, Sabanegh ES, Jr. 47,XXX Syndrome and Male Infertility. *Rev Urol* 2013; 15(4): 188-196.
- Kitamura A, Miyauchi N, Hamada H, Hiura H, Chiba H, Okae H, Sato A, John RM, Arima T. Epigenetic alterations in sperm associated with male infertility. *Congenit Anom (Kyoto)* 2015; 55(3): 133-144.
- Klaver R, Tuttelmann F, Bleiziffer A, Haaf T, Kliesch S, Gromoll J. DNA methylation in spermatozoa as a prospective marker in andrology. *Andrology* 2013; 1(5): 731-740.
- Koksal IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl* 2003; 5(2): 95-99.
- Komeya M, Ogawa T. Spermatogonial stem cells: Progress and prospects. *Asian J Androl* 2015; 17(5): 771-775.
- Kotaja N. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril* 2014; 101(6): 1552-1562.
- Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25(2): 271-285.

- Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction* 2015; 150(5): R159-174.
- Kumar SB, Chawla B, Bisht S, Yadav RK, Dada R. Tobacco Use Increases Oxidative DNA Damage in Sperm - Possible Etiology of Childhood Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(16): 6967-6972.
- 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(5): 1295-1304.
- Lavranos G, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V, Angelopoulou R. Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reprod Toxicol* 2012; 34(3): 298-307.
- Lee KH, Lee JS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Lee JH. Promoter methylation status of hMLH1, hMSH2, and MGMT genes in colorectal cancer associated with adenoma-carcinoma sequence. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396(7): 1017-1026.
- Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 2008; 18(1): 85-98.
- Li TF, Wu QY, Zhang C, Li WW, Zhou Q, Jiang WJ, Cui YX, Xia XY, Shi YC. 46,XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. *BMC Urol* 2014; 14: 104.
- Li Z, Pearlman AH, Hsieh P. DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 2016; 38: 94-101.
- Ling ZQ, Li P, Ge MH, Hu FJ, Fang XH, Dong ZM, Mao WM. Aberrant methylation of different DNA repair genes demonstrates distinct prognostic value for esophageal cancer. *Dig Dis Sci* 2011; 56(10): 2992-3004.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.
- Luo LF, Hou CC, Yang WX. Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis. *Gene* 2016; 578(2): 141-157.
- Manhart CM, Alani E. Roles for mismatch repair family proteins in promoting meiotic crossing over. *DNA Repair (Amst)* 2016; 38: 84-93.
- Marchetti F, Bishop J, Gingerich J, Wyrobek AJ. Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair. *Sci Rep* 2015; 5: 7689.

- Markandona O, Dafopoulos K, Anifandis G, Messini CI, Dimitraki M, Tsezou A, Georgoulas P, Messinis IE. Single-nucleotide polymorphism rs 175080 in the MLH3 gene and its relation to male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32(12): 1795-1799.
- Menezo Y, Dale B, Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes, embryos: a review. *Zygote* 2010; 18(4): 357-365.
- Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010; 139(2): 287-301.
- Molteni CG, Principi N, Esposito S. Reactive oxygen and nitrogen species during viral infections. *Free Radic Res* 2014; 48(10): 1163-1169.
- Mostafa RM, Nasrallah YS, Hassan MM, Farrag AF, Majzoub A, Agarwal A. The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation. *Andrologia* 2018; 50(3).
- Mukherjee S, Ridgeway AD, Lamb DJ. DNA mismatch repair and infertility. *Curr Opin Urol* 2010; 20(6): 525-532.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000; 21(6): 903-912.
- Murray KS, James A, McGeedy JB, Reed ML, Kuang WW, Nangia AK. The effect of the new 2010 World Health Organization criteria for semen analyses on male infertility. *Fertil Steril* 2012; 98(6): 1428-1431.
- Nagirnaja L, Aston KI, Conrad DF. Genetic intersection of male infertility and cancer. *Fertil Steril* 2018; 109(1): 20-26.
- Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Genetics of Male Infertility. *Curr Urol Rep* 2016; 17(10): 70.
- Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 59: 10-26.
- Ni K, Dansranjav T, Rogenhofer N, Oetzuerk N, Deuker J, Bergmann M, Schuppe HC, Wagenlehner F, Weidner W, Steger K, Schagdarsurengin U. TET enzymes are successively expressed during human spermatogenesis and their expression level is pivotal for male fertility. *Hum Reprod* 2016, 31(7): 1411-1424.
- 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(5): e13239.

- Niles KM, Yeh JR, Chan D, Landry M, Nagano MC, Trasler JM. Haploinsufficiency of the paternal-effect gene Dnmt3L results in transient DNA hypomethylation in progenitor cells of the male germline. *Hum Reprod* 2013; 28(2): 519-530.
- Paul C, Povey JE, Lawrence NJ, Selfridge J, Melton DW, Saunders PT. Deletion of genes implicated in protecting the integrity of male germ cells has differential effects on the incidence of DNA breaks and germ cell loss. *PLoS One* 2007; 2(10): e989.
- Peltomaki P. Update on Lynch syndrome genomics. *Fam Cancer* 2016; 15(3): 385-393.
- Perez-Carbonell L, Alenda C, Paya A, Castillejo A, Barbera VM, Guillen C, Rojas E, Acame N, Gutierrez-Avino FJ, Castells A, Llor X, Andreu M, Soto JL, Jover R. Methylation analysis of MLH1 improves the selection of patients for genetic testing in Lynch syndrome." *J Mol Diagn* 2010; 12(4): 498-504.
- Pourmasumi S, Khoradmehr A, Rahiminia T, Sabeti P, Talebi AR, Ghasemzadeh J. Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. *J Reprod Infertil* 2019; 20(2): 95-101.
- Qiagen 2011. EpiTect® MethyLight PCR Handbook. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/epigenetics/dna-methylation/methylation-specific-pcr/epitect-methylight-pcr-kits/#resources>. Erişim Tarihi: 01.05.2019.
- Rakesh S, Agarwal A. Spermatogenesis: An Overview. *Sperm Chromatin*, Springer 2011; 19-44.
- Ramos-Ibeas P, Calle A, Fernandez-Gonzalez R, Laguna-Barraza R, Pericuesta E, Calero A, Ramirez MA, Gutierrez-Adan A. Intracytoplasmic sperm injection using DNA-fragmented sperm in mice negatively affects embryo-derived embryonic stem cells, reduces the fertility of male offspring and induces heritable changes in epialleles. *PLoS One* 2014; 9(4): e95625.
- Rogacheva MV, Manhart CM, Chen C, Guarne A, Surtees J, Alani E. Mlh1-Mlh3, a meiotic crossover and DNA mismatch repair factor, is a Msh2-Msh3-stimulated endonuclease. *J Biol Chem* 2014; 289(9): 5664-5673.
- Sabanegh, E. S. Male infertility, First Edition. Springer 2011; 1-13.
- Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W, Bizzaro D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Hum Fertil (Camb)* 2004; 7(2): 99-103.

- Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Sharma RK. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002; 78(2): 313-318.
- Sanderson ML, Hassold TJ, Carrell DT. Proteins involved in meiotic recombination: a role in male infertility? *Syst Biol Reprod Med* 2008; 54(2): 57-74.
- Schagdarsurengin U, Paradowska A, Steger K. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol* 2012; 9(11): 609-619.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 2000; 285(2): 194-204.
- Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27(1): 3-12.
- Sharma R, Ahmad G, Esteves SC, 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. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(2): 291-300.
- Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *Eur Urol* DOI: 10.1016/j.eururo.2016.04.010
- Sharma R, Masaki J, Agarwal A. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. *Methods Mol Biol* 2013; 927: 121-136.
- Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 2010; 76(6): 1380-1386.
- Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl* 2017; 19(1): 80-90.
- Song SH, Chiba K, Ramasamy R, Lamb DJ. Recent advances in the genetics of testicular failure. *Asian J Androl* 2016; 18(3): 350-355.
- Spies M, Fishel R. Mismatch repair during homologous and homeologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(3): a022657.

- Stukenborg JB, Kjartansdottir KR, Reda A, Colon E, Albersmeier JP, Soder O. Male germ cell development in humans. *Horm Res Paediatr* 2014; 81(1): 2-12.
- 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.
- Su Y, Yin L, Liu R, Sheng J, Yang M, Wang Y, Pan E, Guo W, Pu Y, Zhang J, Liang G. Promoter methylation status of MGMT, hMSH2, and hMLH1 and its relationship to corresponding protein expression and TP53 mutations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 2014; 31(2): 784.
- Sun F, Turek P, Greene C, Ko E, Rademaker A, Martin RH. Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2007; 87(3): 565-571.
- Tahmasbpour E, Balasubramanian D, Agarwal A. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet* 2014; 31(9): 1115-1137.
- Terribas E, Bonache S, Garcia-Arevalo M, Sanchez J, Franco E, Bassas L, Larriba S. Changes in the expression profile of the meiosis-involved mismatch repair genes in impaired human spermatogenesis. *J Androl* 2010; 31(4): 346-357.
- Tham KC, Kanaar R, Lebbink JH. Mismatch repair and homeologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 2016; 38: 75-83.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34(2): 119-124.
- Tuttelmann F, Rajpert-De Meyts E, Nieschlag E, Simoni M. Gene polymorphisms and male infertility--a meta-analysis and literature review. *Reprod Biomed Online* 2007; 15(6): 643-658.
- Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 2018; 62: 2-10.
- Waheeb R, Hofmann MC. Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. *Int J Androl* 2011; 34(4 Pt 2): e296-305; discussion e305.
- Walsh TJ, Croughan MS, Schembri M, Chan JM, Turek PJ. Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. *Arch Intern Med* 2009; 169(4): 351-356.
- Walsh TJ, Schembri M, Turek PJ, Chan JM, Carroll PR, Smith JF, Eisenberg ML, Van Den Eeden SK, Croughan MS. Increased risk of high-grade prostate cancer among infertile men. *Cancer* 2010; 116(9): 2140-2147.

- Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(1): 30-36.
- WHO (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. Geneva, Switzerland, WHO Press, World Health Organization.
- Wikstrom AM, Dunkel L. Klinefelter syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25(2): 239-250.
- Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 1999; 270(1): 41-49.
- Word B, Lyn-Cook LE, Mwamba B, Wang H, Lyn-Cook B, Hammons G. Cigarette smoke condensate induces differential expression and promoter methylation profiles of critical genes involved in lung cancer in NL-20 lung cells in vitro: short-term and chronic exposure. *Int J Toxicol* 2013; 32(1): 23-31.
- Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2014; 28(6): 684-703.
- Wu C, Ding X, Tan H, Li H, Xiong C. Alterations of testis-specific promoter methylation in cell-free seminal deoxyribonucleic acid of idiopathic nonobstructive azoospermic men with different testicular phenotypes. *Fertil Steril* 2016; 106(6): 1331-1337.
- Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(25): 9601-9606.
- Xu J, Zhang A, Zhang Z, Wang P, Qian Y, He L, Shi H, Xing Q, Du J. DNA methylation levels of imprinted and nonimprinted genes DMRs associated with defective human spermatozoa. *Andrologia* 2016; 48(9): 939-947.
- Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382(1): 498-508.
- 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. *Fertil Steril* 2014; 101(1): 51-57 e51.
- Zhang X, Ding M, Ding X, Li T, Chen H. Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility. *Syst Biol Reprod Med* 2015; 61(4): 187-193.

- Zhang X, San Gabriel M, Zini A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl* 2006; 27(3): 414-420.
- Zhang Z, Zhu LL, Jiang HS, Chen H, Chen Y, Dai YT. Predictors of pregnancy outcome for infertile couples attending IVF and ICSI programmes. *Andrologia* 2016; 48(9): 874-881.
- Zhao H, Xu J, Zhang H, Sun J, Sun Y, Wang Z, Liu J, Ding Q, Lu S, Shi R, You L, Qin Y, Zhao X, Lin X, Li X, Feng J, Wang L, Trent JM, Xu C, Gao Y, Zhang B, Gao X, Hu J, Chen H, Li G, Zhao J, Zou S, Jiang H, Hao C, Zhao Y, Ma J, Zheng SL, Chen ZJ. A genome-wide association study reveals that variants within the HLA region are associated with risk for nonobstructive azoospermia. *Am J Hum Genet* 2012; 90(5): 900-906.
- Zini A, Gabriel MS, Zhang X. The histone to protamine ratio in human spermatozoa: comparative study of whole and processed semen. *Fertil Steril* 2007; 87(1): 217-219.

EKLER

Ek 1: Etik Kurul Belgesi



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 XRCCI Genleri Promotor Metilasyonları ile Sperm DNA Fragmentasyonu 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 sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr.Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ASLİGİDİR
Ar.Öz. T.Ü.K.
OMÜ Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Sekreteri

Ek 2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu Örneği

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ *

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

“İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİNDE *ERCC2*, *MLH1*, *MSH2* ve *XRCC1* GENLERİ PROMOTOR METİLYASYONLARI 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 erkeklerde 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 ayrılabileceğim bilincindeyim. Çalışmadan herhangi 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 sahibsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahibsiniz. 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

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

Gerekliyorsa Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

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

Ek 3: Katılımcı Anketi

KATILIMCI NO	
AD SOYAD	
YAŞ / CİNSİYET	
MEMLEKET	
TARİH	
MESLEK	
ADRES	
TEL NO	
MEDENİ HALİ	
ÇOCUK DURUMU	
SİĞARA KULLANIMI VE SIKLIĞI	
ALKOL KULLANIMI VE SIKLIĞI	
AİLESİ VE KENDİSİNDEKİ FERTİLİTE ÖYKÜSÜ	
EŞİNİN FERTİLİTE DURUMU	
HORMONAL BOZUKLUK ÖYKÜSÜ	
KANSER ÖYKÜSÜ	
PSİKİYATRİK HASTALIK ÖYKÜSÜ	
KALP HASTALIĞI ÖYKÜSÜ	
OBEZİTE ÖYKÜSÜ	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gülgez Neslihan Taşkurt Hekim

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 1982

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (KPDS 2012, 81,25)

Eğitim Durumu: Yüksek Lisans (Marmara Üniversitesi, 2008)

Çalıştığı Kurumlar: Ondokuz Mayıs Üniversitesi (2013-Devam ediyor)

Altay Reaktif (2009-2011)

Ene Medikal (2007-2009)

Erdem Hastanesi (2002-2006)

E-posta: neslihan.taskurt@omu.edu.tr, gntkurt@gmail.com