



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BRCA1 VE BRCA2 GENLERİ METİLASYONU İLE
INFERTİL ERKEKLERDEKİ SPERM DNA
FRAGMENTASYONU ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Emel SEVGİLİ

**Samsun
Eylül-2017**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BRCA1 VE BRCA2 GENLERİ METASTAZI İLE
INFERTİL ERKEKLERDEKİ SPERM DNA
FRAGMENTASYONU ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Emel SEVGİLİ

**Danışman
Doç. Dr. Sezgin GÜNE
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Alper ARSLAN**

**Samsun
Eylül-2017**

T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Emel SEVGİLİ tarafından Doç. Dr. Sezgin GÜNE ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Alper ARSLAN Danışmanlığında hazırlanan “BRCA1 VE BRCA2 GENLERİ METASTAZLARI İLE İNFERTİL ERKEKLERDEKİ SPERM DNA FRAGMENTASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışmaya jürimiz tarafından 20 / 09 / 2017 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ramazan AÇI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Hasan BAĞCI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Sezgin GÜNE, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ertan ALTAYLI, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emre TAŞKIN, Karabük 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

TE EKKÜR

Maddi olanakların ötesinde, iki ehir arasındaki yorucu tempo ve ciddi salk sorunlarına ra men kendimi anslı hissettiren de erli insanların katkılarıyla tamamlanan çalı ma için, öncelikle ekibinde olmaktan gurur duydu um, ı ı m, sevgili danı manım Doç. Dr. Sezgin GÜNE 'e; tezimde yadsınamaz emekleri olan yardımcı danı manım Yrd. Doç. Dr. M. Alper ARSLAN ve emeklili inde dahi yanımızda olan büyük hocamız Prof. Dr. Hasan BA CI'ya; uzman yakla ımıyla çalı manın anlam kazanmasında önemli katkıları olan, sayın Prof. Dr. Ramazan A ÇI ile sperm analizlerini yaparak önemli verilerin elde edilmesini sa layan biyolog Gökhan ZENG N'e; Doç. Dr. Yurdanur SÜLLÜ ba ta olmak üzere laboratuvarlarını kullanımımıza açan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalı üyelerine; bölümde yürüttü üm çalı malarda her zaman destek olan sevgili arkadaş larım Ar . Gör. Aslı MET N MAHMUTO LU, Ar . Gör. G. Neslihan TA KURT HEK M ile yardımsever tüm personel ve ö rencilere; çalı manın planlanması a masında teknik bilgisini esirgemeyerek beni cesaretlendiren sevgili Doç. Dr. Leyla SATT'ya, tezin aksamaması için malzemelerini sunan biricik dostum Dr. Pınar ÜLKER KARADAMAR ve sevgili Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK'e; Katılımlarıyla çalı manın temel unsurunu olu turan tüm gönüllülere; Enstitümüzün yardımsever çalı anlarına; Samsun'da maddi-manevi varlı ıyla hep yanımda olan ablam Selcen KABARTAN CERRAHO LU ve dostlu uyla zor günleri tebessüme çeviren Gülden AVCI, Ar . Gör. rem EKER, Muzaffer BAYRAMO LU ve Samsun'u de erli kılan tüm arkadaş larıma; aksatmak zorunda kaldı ım i hayatımda deste ini esirgemeyen Ordu Üniversitesi akademik ve idari personeline; yazım sürecinde hep yanımda olan canım Ar . Gör. N. Sinem TURAN'a; arkadaş ve yol göstericilerim Dr. Esra Deniz CANDAN ve Dr. Selma CIRRIK'a;

En zor zamanlarda sabırla yanımda duran, hatta çalı manın istatistiksel sürecine büyük katkı sa layan, on yıllık hayat arkadaş ım Prof. Dr. Hasan SEVG L 'ye ve bilimin gücüne olan inançlarıyla var olmamı, dik durmamı sa layan ilk ö retmenlerim babam Muzaffer KABARTAN ve annem Neriman KABARTAN ba ta olmak üzere tüm aileme ne kadar te ekkür etsem azdır.

Çalı manın maddi deste i, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Projeleri Komisyonu Ba kanlı ı tarafından PYO.TIP.1904.13.002 projesi ile sa lanmı tır.

ÖZET

BRCA1 VE BRCA2 GENLER METİLYASYONU İLE İNFERTİL ERKEKLERDEKİ SPERM DNA FRAGMENTASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilen ve erkek infertilitesinde rolü olan sperm DNA fragmentasyonunun (SDF) *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin metilasyonu ile ilişkili olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: Çalışmaya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniğinde sperm analizi yapılan 73 oligoasthenoteratozoospermik (OAT) infertil erkek ve altı normozoospermik gönüllü dahil edildi. Semen örneklerinde TUNEL yöntemi ile SDF ve DNA izolasyonu sonrası metilasyona spesifik PCR (MSP) ile *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin metilasyon paterni incelendi. Sonuçlar SPSS Paket programında analiz edildi.

Bulgular: Sperm DNA fragmentasyonu ortalaması %21,79 olarak belirlendi. SDF oranının “hasarlı” olarak değerlendirilebilmesi için eşik değer %12,95 olarak hesaplandı. Normozoospermik ve anormal semen parametreleri sergileyen gruplar arasında SDF anlamlı farklılık gösterildi (T testi, $t=-3,70$, $df=77$, $p<0,001$). SDF'nin semen parametreleri üzerinde önemli etkisi olduğu görüldü. Oligoasthenoteratozoospermik grupta *BRCA1* geni metilasyonu ile SDF arasında negatif yönde bir ilişki saptandı.

Sonuç: İlk defa bu tez çalışmasıyla, infertil erkeklerdeki sperm DNA fragmentasyonunun *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin epigenetik düzenlenmesi arasındaki ilişki incelenmiştir. Bulgular, SDF sonuçları infertilite kapsamındaki önceki çalışmaları ile büyük ölçüde destekler niteliktedir. Yardımcı üreme teknikleri öncesinde sperm DNA bütünlüğü incelenmesi yararlı olacaktır. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin, SDF ile ilişkisini tam olarak ortaya koymak daha kapsamlı araştırmalar gerektirmektedir.

Anahtar Kelimeler: *BRCA1*; *BRCA2*; epigenetik; infertilite; sperm; TUNEL testi

Emel SEVGİLİ, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Eylül-2017

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN BRCA1, BRCA2 GENE METHYLATION AND SPERM DNA FRAGMENTATION IN INFERTILE MEN

Aim: The purpose of the study was to investigate whether the methylation status of *BRCA1* and *BRCA2* genes is associated with sperm DNA fragmentation (SDF) which emerges due to various reasons and is effective in male infertility.

Material and Method: Seventy three oligoasthenoteratozoospermic infertile men and six normozoospermic volunteers who were diagnosed in Department of Urology at Ondokuz Mayıs University, Faculty of Medicine were studied. To investigate SDF TUNEL assay was employed and methylation pattern of *BRCA1* and *BRCA2* genes were investigated by methylation-specific PCR (MSP) method after DNA isolation. The results of the study were analyzed by using.

Results: The average SDF was calculated 21.79%. The calculated threshold value for damaged SDF was 12.95%. Regarding SDF, there were statistically significant differences between normozoospermic and abnormal semen parameter groups (T test, $t = -3,70$, $df = 77$, $p < 0.001$). SDF had a significant effect on the semen parameters. Methylation of *BRCA1* gene in the idiopathic oligoasthenoteratozoospermic group had negative correlation with SDF.

Conclusion: This is the first report analysing the relationship between epigenetic regulation of *BRCA1* and *BRCA2* genes and sperm DNA fragmentation in infertile men. Our findings support those of the previous studies. To better understanding the relationship between different genes or diseases and infertility additional studies are warranted. In routine clinical practice, sperm DNA integrity must be investigated before applying assisted reproductive techniques.

Keywords: Infertility; sperm; TUNEL assay; *BRCA1*; *BRCA2*; epigenetics

Emel SEVG L , PhD Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, September-2017

S İMGELER VE KISALTMALAR

AR	: Androjen Reseptörü
AZF	: Azoospermik Faktör Bölgesi
BRCA1	: Breast Cancer gene 1
BRCA2	: Breast Cancer gene 2
MMR	: Base Excision Repair
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
ddH₂O	: Deiyonize su
dNTP	: Deoksinükleosid trifosfat
dUTP	: Deoksiüridin trifosfat
HR	: Homolog Rekombinasyon
IVD	: <i>In vitro</i> metillenmi DNA
MMR	: Hatalı ekleme onarımı (Mismatch Repair)
MSP	: Metilasyona Spesifik PCR
NOA	: Obstrüktif olmayan (Nonobstructive) Azoospermi
NS	: Normozoospermi
OAT	: Oligoastenoteratozoospermi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PCR	: Polimeraz Zincir (Chain) Reaksiyonu
PFA	: Paraformaldehit
ROS	: Reaktif oksijen species, Reaktif oksijen türevleri
RT-PCR	: Ters Transkripsiyon (Reverse transcription) Polimeraz Zincir (Chain) Reaksiyonu
SCD	: Sperm Kromatin Dağılımı (Sperm Chromatine Dispersion)
SCSA	: Sperm Kromatin Yapı Analizi (Sperm Chromatine Structure Assay)
SDF	: Sperm DNA Fragmentasyonu
SRY	: Cinsiyet belirleyici bölge (Sex determining Region Y)
µl	: Mikrolitre
TUNEL	: Thermal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

Ç NDEK LER	
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
S MGELER VE KISALTMALAR	vi
Ç NDEK LER	vii
1. G R	1
2.GENEL B LG LER	4
2.1. Erkek nfertilitesi.....	4
2.2. Erkek nfertilitesinin Genetik Temeli.....	4
2.2.1. Sayısal Kromozom Bozuklukları.....	6
2.2.2.Yapısal Kromozom Bozuklukları	6
2.2.3. X Kromozomuna Ba lı Bozukluklar	7
2.2.4. Y Kromozomu Yapısal Bozuklukları	8
2.2.5. nfertilitede Rol Alan Genler	10
2.3. Spermatogenez	10
2.3.1. Spermiyogenez	13
2.3.2. Kapasitasyon.....	14
2.3.3. Sperm Nükleusu.....	14
2.4. Sperm DNA Fragmentasyonu	16
2.4.1. Kromatin Paketlenmesinden Do an Hasar	17
2.4.2. Yarım Kalmı Apoptoz.....	17
2.4.3. Oksidatif Stres ve DNA Hasarı.....	18
2.4.4. Erkek Germ Hücrelerinde DNA Onarım Mekanizmaları.....	19
2.5. Sperm DNA Fragmentasyonu Tespit Yöntemleri	20
2.5.1. Sperm Kromatin Yapısı Testi	20
2.5.2. Sperm Kromatin Da ılım Testi	20
2.5.3. COMET	21
2.5.4. TUNEL Testi	21
2.6. Erkek nfertilitesinde Epigenetik Düzenlenmelerin Rolü	23
2.6.1. DNA Metilasyonu.....	24
2.6.2. Histon Modifikasyonları ve Kromozom Yeniden Düzenlenmesi	25

2.6.3. Kodlanmayan RNA'lar	26
2.7. DNA Metilasyonu Tespit Yöntemleri	27
2.7.1. Pirosekanslama	28
2.7.2. Metilasyona spesifik PCR.....	28
2.8. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genleri	29
2.8.1. Gen ve Protein Yapısı.....	32
2.8.2. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> için Epigenetik Düzenleme ve Hastalıklarla İlişkisi.....	34
2.8.3. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> 'nin Mayotik Önemi.....	34
3. MATERYAL VE METOT.....	37
3.1. MATERYAL.....	37
3.1.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması ve Özellikleri	37
3.2. METOT	38
3.2.1. TUNEL Testi	39
3.2.2. Spermde DNA Eldesi	41
3.2.3. İzolasyon.....	42
3.2.4. İzole Edilen DNA'ların Bisülfid Modifikasyonu	44
3.2.5. Metilasyona-Spesifik PCR.....	45
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi	48
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme	48
4. BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
EKLER	82
ÖZGEÇMİŞ	89

1. G R

Halk arasında kısırlık olarak tanımlanan infertilite, bir yıl korunmasız cinsel ili kiye ra men çocuk sahibi olunamamasıdır ve çiftlerin yaklaşık % 15'inde görülen önemli bir üreme sa lı ı sorunudur. nfertil çiftlerin yarısından erkek faktörü sorumludur (Wu ve ark., 2010) ve dünya genelinde en az 30 milyon erkek infertildir (Agarwal ve ark., 2015).

Erkek fertilitte potansiyelinin de erlendirilmesi için yapılan rutin klinik testlerde toplam sperm sayısı ve konsantrasyonu, morfolojisi, canlılı ı, semen pH'sı, seminal antikorlar gibi evrensel seminal faktörler incelenmektedir. Semen analizi, testis ve epididimis fonksiyonu, vazal açıklık ve üreme hormonlarının aktivitesi hakkında önemli veriler sa lar (Cooper ve ark., 2010). Genelde bu testler kalitatif ve kantitatif olarak anlamlı sonuçlar verse de infertil erkeklerin yaklaşık % 15'inde normal semen analizi görülmektedir (Tavalaee ve ark., 2009). Dünya Sa lık Örgütü (World Health Organization, WHO) verilerine göre, referans de erlerin (Tablo. 1) altında konsantrasyona sahip bireyler oligo-;referans de erlerin altında bir oranda hareketlili e sahip bireyler asteno-; referans de erlerin altında bir oranda normal morfoloji sergileyen bireyler terato-zoospermik olarak tanımlanır (WHO, 2010).

Tablo 1.WHO tarafından kabul edilen semen parametreleri alt referans de erleri (5. yüzdelik ve %95 güven aralı ı). Bu de erlerden motilite, morfoloji ve konsantrasyon veya sperm sayısının referans de erleri üstünde olan ki i, normozoospermik olarak kabul edilir (WHO, 2010).

Parametre	En dü ük referans de er
Semen volümü (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Toplam sperm sayısı (10 ⁶ /ejekulasyon)	39(33-46)
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Toplam motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progresif Motilite (PR,%)	32 (31-34)
Vitalite (canlı spermatozoa, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3,0-4,0)

Kısaltmalar: PR: progresif motilite; NP: nonprogresif motilite.

idiyopatik oligoastenoteratozoospermia (OAT), infertil erkeklerin %30'undan fazlasını etkileyen, en yaygın infertilite nedenlerinden birisi olup, rutin laboratuvar metotlarıyla açıklanamayan, etiyojisi karmaık bir spermatogenez hatası olarak tanımlanmaktadır (Cavallini, 2015). Güncel ara tırmalar, sperm fonksiyonunu düzenleyen moleküler mekanizmaların aydınlanmasıyla yeni tanısal testlerin geli mesinin mümkün olacağını ortaya koymaktadır (Ford, 2010).

iddetli erkek infertilitesi olgularının büyük kısmında etiyojide genetik de i ikliklerin sorumlu oldu u bilinmektedir. nfertilitenin bilinen genetik nedenleri arasında kromozomal anomaliler (ço unlukla delesyon ve cinsiyet kromozomu anöploidileri), Y kromozomu mikrodelesyonları ve gen mutasyonları vardır. Ayrıca, protaminasyon hataları, histon ve DNA'daki epigenetik de i iklikler, baz de i iklikleri ve DNA fragmentasyonu üzerinde çalı ılan di er önemli nedenler arasındadır (Hotaling ve Carrell, 2014). Bu mekanizmalar, idiyopatik infertilitenin etiyojisini anlamak ve yeni tanı/tedavi yöntemleri geli tirebilmek için oldukça önemlidir.

Oksidatif stres, karsinojenler ve bazı spermatogenez hatalarına ba lı olarak meydana gelen DNA fragmentasyonu, son yıllarda üzerinde durulan bir alandır. Sperm DNA fragmentasyonu (SDF), özellikle kırk ya üstü, toksik etkilere maruz kalan erkeklerde sık görölmektedir (Tamburrino ve ark., 2012).

Germ hücrelerinin olgunlaşma için testiste yüksek oranda proliferasyon ve özgün hücrel farklılaşma geçirmektedir. Spermatogenez süreci apoptoz ile kontrol edilmektedir (Sharma ve Agarwall, 2004; Hwang ve ark., 2011). Bu sırada sperm DNA'sında kırıklar olmaktadır. Bu fizyolojik kırıklar, spermatogenezin bir parçasıdır (Sharma ve Agarwall, 2004). Yarım kalan apoptozun sperm DNA fragmentasyonu ile bağlantılı oldu u gösterilmiştir, ancak apoptotik belirteçler ile SDF arasındaki korelasyon tam olarak açıklanamamıştır (Tamburrino, 2012).

Normalde zincir kırıkları, gama H2AX (gamma-H2AX; H2A histone family, member X) tarafından histon fosforilasyonu ile üretilir ve spermatozoa germinal epitelyum hücrelerinden salınmadan önce topoizomerez I ve II tarafından tek ve çift zincir kırıkları olarak gev etilir. E er tamir mekanizmaları herhangi bir nedenle

çalı mazsa, yüksek DNA hasarına sahip sperm ve infertiliteye neden olabilir (Aitken ve De Iuliis, 2010; Güne ve ark., 2015).

BRCA1 ve *BRCA2* de çift zincir kırıklarının tamirinde kritik proteinleri kodlayan iki önemli gendir. Bu tamir mekanizmasında çift zincir kırığı olan kromatid, replikasyon sırasında kırılmama karde kromatidin kalıp olarak ilerlemesiyle onarılır. Böyle bir rol için ilk kanıtlar, iki proteinin de homolog rekombinasyonun temel bileşeni olan RAD51 ile replikasyon çatallında hasar olan bölgeye taşındıktan sonra gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır (Christou ve Kyriacou, 2013). Buna ek olarak, *BRCA1* ve *BRCA2* nakavt hücrelerde, kromozomal çift zincir kırıklarının RAD51 aracılı homolog rekombinasyon tamirinde kusur ve çift zincir kırıklarını indükleyen DNA hasar ajanlarına karşı hassasiyet görülür (Cousineau ve ark., 2005).

Sperm DNA bütünlüğü ve paketlenmesi fertilité ile ilişkilidir (Sakkas ve ark., 1998; Aitken ve Krausz, 2001; Virro ve ark., 2004; Shamsi ve ark., 2008) ve spermde DNA hasarının ölçülmesinin doğrudan ve yardımcı üreme teknikleri ile çocuk sahibi olmada önemli prediktif etkisi vardır. Bundan dolayı hasar düzeylerindeki farklılıkların, fertilité potansiyelinin bir göstergesi olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir (Moskovtsev ve ark., 2009; Zini ve Sigman, 2009).

Spermde DNA fragmentasyonu SCSA, COMET, SCD, TUNEL gibi birçok farklı yöntemle tespit edilebilmektedir. Bütün bu yöntemlerin bir çok avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (Güne ve ark., 2013a). Son yıllarda TUNEL yöntemi birçok araştırmacı ve klinik gruplar tarafından altın standart yöntem olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çalışması ile *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin genom bütünlüğünü korumaya yönelik özellikleri göz önünde bulundurularak bu genlerin DNA metilasyonu ile susturulmasının TUNEL testi ile saptanan sperm DNA fragmentasyonu ile bağlantılı olup olmadığının araştırılması amaçlanmaktadır.

2.GENEL B LG LER

2.1.Erkek nfertilitesi

nfertilite, genel olarak bireyin de il çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin sorunu olarak ele alınmakta ve farklı disiplinlerden çok yönlü ara tırmalar gerektirmektedir. u anki bilgilerimiz, üretken ya taki çiftlerin %8-12'sinin infertil oldu unu ve infertil çiftlerin yarısında erkek infertilitesinin sorumlu oldu unu göstermektedir (Bisht ve ark., 2017). Ancak erkek infertilitesinin çocuk sahibi olmaya çalı lana kadar raporlanabilir bir hastalık olmaması, tanı ve tedavinin büyük ölçüde ayaktan yapıyor olması, yardımcı üreme teknikleriyle infertilite sorununun kısmen önüne geçilmesi ve hatta ülkemizde sosyo-kültürel baskılar gibi durumlar nedeniyle erkek infertilitesine yönelik çalı malar oldukça zor yürütülmektedir. Epidemiyolojik çalı malar ise hastalı ın co rafik bölgelere göre de i mekle birlikte son yıllarda artı gösterdi ini kaydetmektedir (Winters ve Walsh, 2014).

nfertilitenin çevresel, fizyolojik ve genetik birçok parametreden etkilendi ini dü ünürsek, bu faktörlerin etki mekanizmaları ve sonuçlarının ne oldu unun saptanması hastalı ın tanı ve tedavisinde hekimlere yol gösterici veriler sa layacaktır.

Erkek infertilitesinin varikosel, endokrin bozukluklar, obstrüksiyon, erektil disfonksiyon, enfeksiyonlar gibi bilinen yaygın nedenlerinin yanı sıra tez çalı masının temelini olu turan bir çok farklı genetik ve epigenetik nedeni de bulunmaktadır (Tahmasbpour ve ark., 2014). Tezin bütünselli i açısından, öncelikle infertilitede etkili genetik nedenler genel olarak tartı ldıktan sonra tezin esas konusunu olu turan sperm genom bütünlü ü ve epigenetik üzerinde durulacaktır.

2.2. Erkek nfertilitesinin Genetik Temeli

Erkek infertilitesi nedenlerinin %15-30'u genetik kaynaklıdır (Vogt, 2004). Bu genetik kusurlar, kromozomların sayısal ve yapısal bozuklukları yanı sıra tek gen de i imlerine ba lı olarak da ortaya çıkabilmektedir (Tablo 2). Kromozoma ba lı anomaliler genellikle cinsiyet kromozomlarının sayısal ve yapısal de i ikli inden etkilenir. Bu kromozomal bozuklukların sonucu olarak erkeklerde azospermiden normozoospermiye varan farklı sperm konsantrasyonları görülebilir (O'Flynn O'Brien ve ark., 2010). Kromozom anomalisi ta ıyan erkeklerin yalnızca %1'den azı normal sperm konsantrasyonuna sahiptir (Flannigan ve Schlegel, 2017).Olguların %3.8'i e ey

kromozomlarına ba lı anomali ta ırken %1.3'ü otozomal kromozomlara ba lı bir anomaliye sahiptir (Ferlin ve ark., 2007a).

Obstrüksiyonu olmayan testiküler bozukluklara ba lı azospermik ve iddetli oligozoospermik olgularda infertilite tanısında karyotip ve Y kromozomu mikrolelesyon analizleri gibi tetkikler yapılması önerilmektedir (Ferlin ve Foresta, 2014).

Tablo 2. nfertilitedeki yaygın genetik kusurlar. (NOA: nonobstrüktif azospermi, OA: Obstrüktif azospermi).

Genetik kusur	Fenotip	Prevalans
46,XY/47,XXY 47,XXY 48,XXXY ve türevleri	Jinekomasti, azospermi- iddetli oligozoospermi,	Tüm erkekler içinde 1/600, oligozoospermiklerde % 0,6 NOA, %11 infertil erkeklerde %1-2
46,YYY	SCO, maturasyon arest, azospermi- iddetli oligozoospermi,	Toplumda % 0,1
Translokasyon nversiyon	Azospermi	Yenido an 1/1000 infertil erkeklerde %0,9 infertil erkeklerde % 3-5
Y kromozomu mikrolelesyonları	SCO, maturasyon arest azospermi- iddetli oligozoospermi,	NOA %10 iddetli oligozoospermide %5
X Kromozomuna ba lı bozukluklar	OA, hipogonadotropik hipogonadizm, Azospermi	nfertil erkeklerde %2-7
Tek gen kusurları	OA, NOA, teratoospermi, azospermi	%0,03-0,2

Kısaltmalar:NOA: nonobstrüktif azospermi; OA: Obstrüktif azospermi).

2.2.1. Sayısal Kromozom Bozuklukları

Klinefelter sendromu, erkek infertilitesinde en sık görülen kromozom anöplöididir. Etkilenen erkeklerin %90'ı azospermiktir (Niesclag ve ark., 2014). Klinefelter sendromu, %60 oranında oogenezin mayoz I ve II evrelerinde veya %40 oranında spermatogenez mayoz I'deki hatalara bağlı olarak 47,XXY; 48,XXXYY; 48,XXYY; 47,iXqY ve bu takımlardan herhangi birinin tanıdığı mozaizm ile ortaya çıkmaktadır (Bonomi ve ark., 2017). Klinefelter sendromu prevalansı, iddetli oligozoospermiklerde %5 iken azospermiklerde %10'dur (O'flynn O'Brien, 2010). Bu hastalarda ekstra X kromozomuna bağlı olarak erkek cinsiyet gelişimi ve testis fonksiyonu normal gelişim gösteremediği için tamamlanmamış spermatogenezle ilgili olarak infertilite ortaya çıkar ve hastaların büyük çoğunluğu azospermiktir (Flannigan ve Schlegel, 2017; Tahmasbpour ve ark., 2014).

47,XYY karyotipe sahip bireyler, 1:1000 canlı doğumda ortaya çıkabilen ve fenotipik olarak normal görünümlü ancak infertil erkeklerdir (Walsh ve ark., 2009). Hastalarda çoğunlukla Sertoli Cell Only (SCO) sendromu veya maturasyon duraksaması ile ilgili olarak iddetli oligozoospermi veya azospermi görülür (Abdel-Razic ve ark., 2012, Maduro ve Lamb, 2002).

45,X/46,XY Miks Gonadal Disgenez, de iken fenotip göstermekle birlikte fenotipte tam belirlenmemiş, anormal genital yapıyla sonuçlanan bir mozaizmdir. Erkek veya kadın görünümlü hastalar olabilmektedir. Erkek bireylerde *SRY* geni ifade edilse de Y mikrodelsiyonu sık görülmektedir (Wu ve ark., 2017). Testiküler hatalar hormon replasman tedavisiyle önlenmeye çalışılabilir ancak hastaların hemen hepsi azospermi gösteren infertil bireylerdir (Flannigan ve Schlegel, 2017).

2.2.2. Yapısal Kromozom Bozuklukları

Resiprokal veya Robertsonian translokasyonlar gibi yapısal kromozom bozuklukları da infertilite ile sonuçlanabilmektedir. iddetli erkek infertilitesinin %0,9'undan, oligozoospermik vakaların %1,6'sından Robertsonian tip translokasyonlar sorumludur (Mau-Holzmann, 2005, O'flynn O'Brien, 2010) ve bu tip translokasyon infertil erkeklerde genel popülasyona göre dokuz kat daha fazla görülmektedir (Tahmasbpour ve ark., 2014). Bütün taşıyıcılarda resiprokal translokasyonlar, düşük sperm kalitesi ve sperm anöplöidisi ile spermatogenezini etkilemektedir (O'Flynn O'Brien, 2010).

Otozomal inversiyonlar, genetik materyal kaybına yol açmayan yapısal kromozomal bozulmalardır. infertil erkeklerin %3-5'inde bulunan, kromozom 9 inversiyonları erkek infertilitesi içinde en yaygın olanlarıdır. Kromozom 9 inversiyonlarının erkek ta iyıcıları, azoospermi, oligospermi, astenozoospermi veya normozoospermi gösterebilir ve bu ki ilerde sperm anöploidi insidansı daha yüksektir (Neto ve ark., 2016).

2.2.3. X Kromozomuna Ba lı Bozukluklar

Evrimsel süreç içerisinde spermatogenez ile ilgili genlerin birço u Y kromozomuna ta ınımı ken, bu genlerin bir kısmı da X kromozomunda konumlanmıştır (Silber ve ark., 2011). Farelerde RT-PCR çalışmaları, mayoz öncesi erkek germ hücrelerinde eksprese edilen genlerin büyük bir bölümünün X kromozomu orijinli olduğunu göstermiştir (Wang ve ark., 2001).

Fazla X kromozomları epigenetik mekanizmalarla büyük ölçüde inaktive olsa da inaktivasyondan kaçan ve mayozda Y kromozomu ile rekombinasyona açık psödootozomal bir bölge barındırmaktadır. Bu sebeple Klinefelter sendromundaki fazla X kromozomunun yanı sıra X kromozomundaki translokasyonlar, kopya sayısı varyasyonları ve nokta mutasyonları da erkek infertilitesine neden olabilmektedir.

46,XX testiküler bozukluk, infertil erkeklerin %2'sinde ve 20.000-25.000 erkekte bir görülen nadir bir kromozomal anomalidir (Bianco ve ark., 2011). Paternal mayoz sırasında hatalı krossover sonucu *SRY* geni Y kromozomundan X kromozomuna ta ınır, translokasyona u ryan parçanın büyüklü üne ba lı olarak normal genitalyadan ambigus genitalyaya kadar de i ken fenotip görülmesine neden olmaktadır. Bireylerde, azalmı testosteron seviyesi ve yüksek lüteinleştirici hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) seviyesi karakteristiktir. SCO sendrom ve azoospermi nedeniyle infertildirler (Wu ve ark., 2014).

X kromozomundaki 29 gen testiste yüksek oranda ifade edilmektedir. Bunlardan özellikle, *AKAP4*, *NXF2*, *NXF3*, *TEX11*, *H2BFWT*, *TAF7L*, *USP26*, *FATE1* genleri mayoz ve spermatogenez süreciyle yakından ilgili olduğu için infertilitede mercek altına alınmışlardır (Stouffs ve Lissen, 2012; Röpke ve Tüttelmann, 2017).

KALI, ekstrasellüler matristeki bir hücre adezyon proteinini (anosmin-1) kodlayan X kromozomuyla ba lantılı bir gendir. Bu gendeki kusurlar, hipogonadotropik

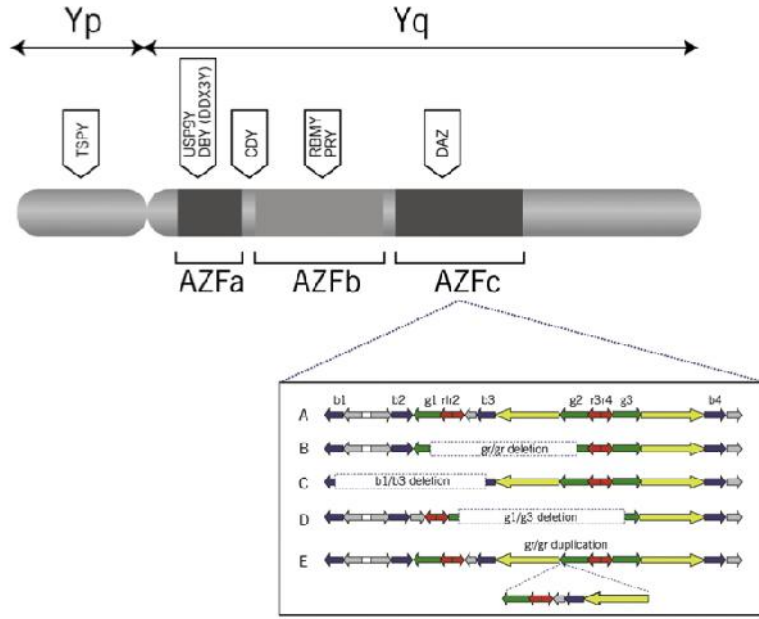
hipogonadizm, gecikmi puberte ve infertiliteyle sonuçlanan Kallman sendromuna neden olabilmektedir. Testiste eksprese edilen 11 (testis expressed 11, *TEX11*) geni de X kromozomunda bulunan yeni tanımlanmış germ hücresine spesifik bir genidir. Azoospermik erkeklerin %2-7'sinde bu gende mutasyon bulunmuş ve mutasyonların, apoptoz, maturasyon duraksaması ve azoospermi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Neto ve ark., 2016).

X bağlantılı genlerdeki defektlerin erkek infertilitesi için risk faktörleri olabileceği görüldüğü gibi alternatif olarak, farklı genlerdeki defektlerin bir kombinasyonu da erkek infertilitesini etkileyebilir (Stouffs ve ark., 2009). X kromozomunun bu yapısından dolayı, tek gen mutasyonları, kritik genleri etkileyen translokasyonlar ve kopya sayısı varyasyonları erkek infertilitesinde önemli yer tutar (Röpke ve Tüttelmann, 2017).

2.2.4. Y Kromozomu Yapısal Bozuklukları

Erkeklerde, cinsiyet gelişimi ve testis fonksiyonlarını kontrol eden genlerin büyük kısmı Y kromozomu üzerinde bulunmaktadır. Y kromozomunda iki psödotozomal bölge (pseudoautosomal region, PAR1 ve PAR2) ve üzerinde sekiz büyük palindrom tanımlanmış erkek spesifik bölge (Male Specific Y region, MSY) vardır. Bu bölgede protein kodlayan 54 gen vardır ancak, kromozomun yapısı, sekansı ve çok kopyalı genlerin tekrar sayısı oldukça defektli gösterebilmektedir (Krausz ve Casamonti, 2017).

MSY'de bulunan AZF bölgesi (Azoospermia factor, AZF), spermatogenezden sorumlu 14 gen kodlar ve bu genler a, b, c olarak tanımlanmış üç bölgede konumlanmıştır (Şekil 1). Bu bölgeler birbirinden bağımsız olarak delesyona uğrayabilir ve bu delesyonlar obstrüksiyonun olmadığı azoospermi olgularının %10'undan ve ciddi oligozoospermi olgularının %5'inden sorumludur (Hotelling ve Carrel, 2014).



ekil 1. Y kromozomu ematik gösterimi. Mikrodelesyona u rayan AZF bölgelerinin konumu ve burada bulunan genler ile olası delesyon ve duplikasyonlar ematize edilmi tir. (O’Flynn O’Brien, 2010).

Delesyonlar, AZFa, AZFb, AZFb+c ve AZFc ekinde olabilirken kısmi AZFa ve AZFb delesyonları daha az görülmektedir (Crausz ve Casamonti, 2017). AZFa ve AZFb delesyonlarının prevalansı %0,5-1 iken AZFc delesyonu prevalansı %6-12 arasındadır. Bu bölgenin kısmi delesyonu ise %3-5’tir(O’Flynn O’Brien, 2010).

AZFa delesyonu, spermatogenezde önemli rolü olan iki genin (*USP9Y* ve *DBY*) kaybı ile AZFb delesyonları ise primer spermatosit sürecinde olgunla mada etkili *RBMY1*’in kaybıyla sonuçlanır (Ferlin ve ark., 2007a, b). AZFc bölgesinde meydana gelen delesyonlar de i kendir ve bu delesyon sonucunda spermatogenezin her a amasında etkin olan *DAZ* geni etkilenebilir (Hotaling ve Carrel, 2014). AZFc delesyonları, gr/gr, b1/b3 ve g1/g3 olarak tanımlanmı tır (O’Flynn O’Brien, 2010). Bu delesyonlara ek olarak gr/gr duplikasyonu da görülebilmektedir ve tüm bu yeniden düzenlenmeler, farklı etnik kökenlere ait popülasyonlarda de i iklik göstermektedir (Ashadi ve ark., 2017; Ferlin ve Foresta,2014; Crausz ve Casamonti, 2017). Sperm konsantrasyonu, 5mil/ml den fazla oldu u durumlarda Y mikrodelesyon analizi yapılmaz (Ferlin ve Foresta, 2014). AZFc’nin kısmi delesyonlarından biri olan gr/gr delesyonları, normozoospermik ve fertil bireylerde de raporlanmı ancak spermatogenez hataları için artan risk olu turdu u bildirilmli tir (Stouffs ve ark., 2011).

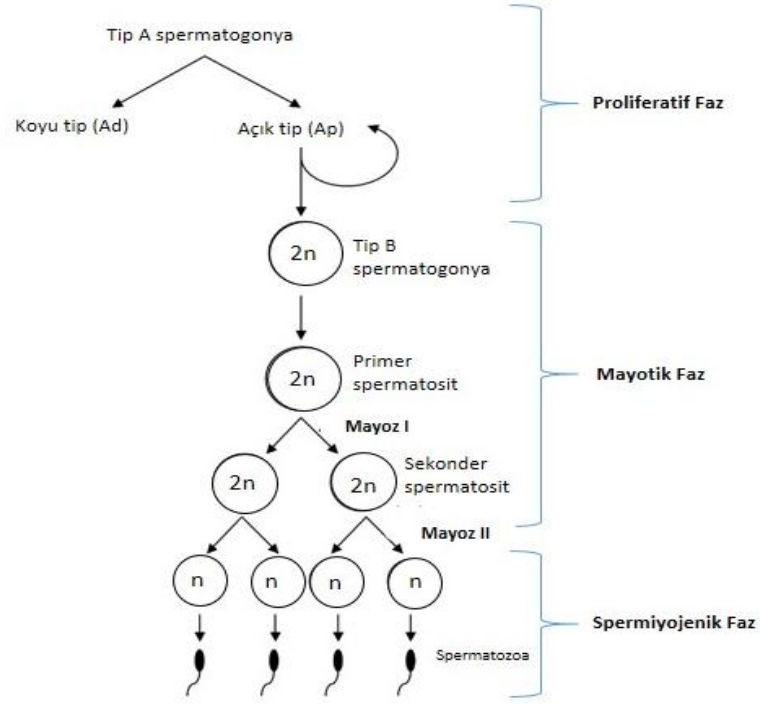
Görüldü ü gibi kromozom anomalilerinin ço u spermatogenezi etkileyerek infertiliteye neden olmaktadır. Özellikle obstrüksiyondan ba ımsız erkek infertilitesini daha iyi anlayabilmek için spermatogenez sürecinin detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir.

2.2.5. nfertilitede Rol Alan Genler

Kromozom anomalilerinin yanı sıra otozomal veya e ey kromozomları üzerinde ta ınan bir çok gen erkek infertilitesini etkileyebilmektedir. Örne in, otozomal resesif bir hastalık olan kistik fibrozda *CFTR* genindeki mutasyon sonucu erkeklerin %95'inde vas deferens geli iminin bozulmasına ba ılı olarak obstrüktif infertilite görülür (Sharma ve ark., 2008). Obstrüktif nedenler haricinde üreme, steroid metabolizması, mayoz, fertilizasyon, e ey farklılaşması, spermatogenez süreci gibi kritik yollarda rol alan *CDK*, *CYP*, *MMPLer*, *SERPINler*, *TIMPLer* ve *ADAM* gibi iki yüzden fazla gen tanımlanmış olup her geçen gün infertiliteyi etkileyebilece i dü ünülen aday genler listeye dahil edilmektedir (Ferlin ve ark., 2007a; Inoue ve ark., 2014; Fok ve ark., 2014; Miyamoto ve ark., 2015; Halder ve ark., 2017). Örne in, *SPATA16*, *PICK1* ve *DPY19L2* gen mutasyonlarının globozoospermiye neden oldu u bilinmektedir (Neto ve ark., 2016). Genlerin infertilitedeki etkisini de erlendirebilmek için spermatogenezdeki a amaların ve spermatozoanın çok iyi anlaşılması gerekmektedir.

2.3. Spermatogenez

Döllenmenin gerçekleşebilmesi için, erkek üreme hücresi olan sperm, di i üreme sistemi boyunca hareket edebilmeli, zona pellusidaya ba lanmalı ve oosit içerisine penetrasyonu ba armalıdır (Yamauchi ve ark., 2011). Sperm hücrelerinin bu i levleri yerine getirebilmesi için somatik hücrelerden oldukça farklı bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Erkekte germ hücresinin farklılaşarak dölleme yetene i kazandı ı bu süreç, spermatogenez olarak tanımlanır (ekil 2).



ekil 2. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonia olarak adlandırılan primitif germ hücrelerinin bir seri mitotik bölünme gerçekleştirdiği proliferatif faz, spermatisitlerin haploid spermatlara dönüştüğü mayotik faz ve spermatlardan olgun spermatozoaya farklılıkların spermiyogenez evrelerinden oluştuğu (Inoue ve ark., 2014).

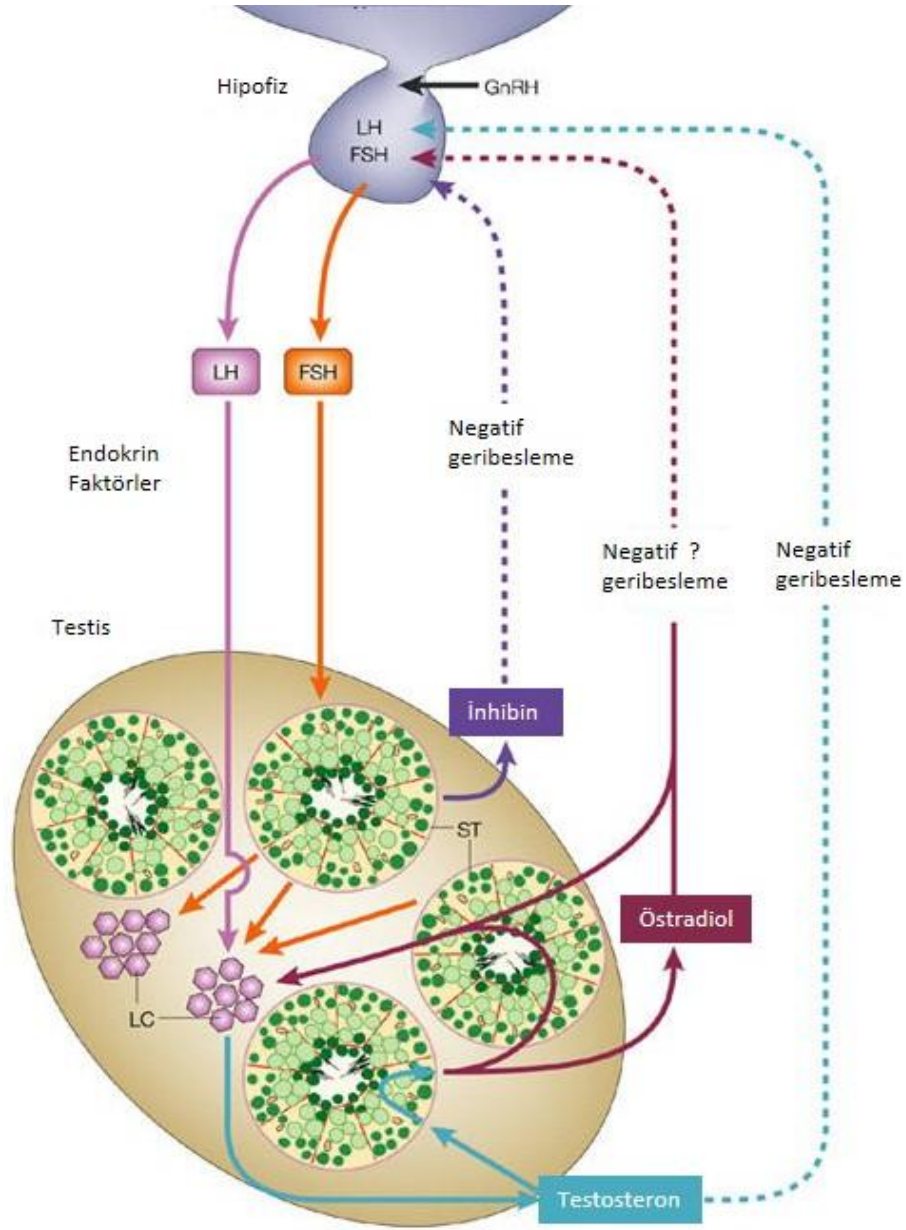
Spermatogonyalar, heterokromatin içeriğine göre üç tipe ayrılır: A tipi koyu, A tipi açık ve B tipi spermatogonyalar. A tipi koyu spermatogonyalar, spermatogenezin devamını sağlayan ve mitotik bölünmeyle A tipi açık spermatogonyalara dönüşür. A tipi açık spermatogonyaların iki çekirdeği vardır ve bunlar da mitozla B tipi spermatogonyaya dönüşür (Sigman ve Howards, 1998).

Primer spermatisitler, B tipi spermatogonyaların mitotik bölünmesiyle oluşan ve kan testis bariyerini aarak adluminal alana geçen ilk germ hücreleridir. Bundan sonra mayoz ve hücresel farklılaşmaları meydana gelir (Stanton, 2016).

Bütün bu süreç, testiste pretübular myoid hücreler, Leyding hücreleri, Sertoli hücreleri gibi yardımcı hücreler ile hormonal kontrol altında gerçekleşir (Neto ve ark., 2016). LH/Testosteron ve FSH, testiküler fonksiyonu kontrol eden ve normal

spermatogenez sürecinin gerçekleşmesi için kritik hormonlardır (Ramaswamy ve Weinbauer, 2015). İnsan primordial gonadlarının, gestasyonun 6. haftasından sonra Y kromozomu üzerinde yer alan *SRY* genleri varlığında oluşan Sertoli hücreleri, salgıladığı hormonlar ile testis gelişimini destekler (Neto ve ark., 2016).

Leyding hücreleri, puberteden sonra testiküler kökenli östrojenlerin temel kaynağıdır. Leyding hücrelerinden salınan testosteron ve östradiyol oranı spermatogenez başlangıcı açısından önemlidir (Lardone ve ark., 2010). FSH, Sertoli hücrelerinin fonksiyonunu düzenleyen hormon olması dolayısıyla spermatogenezde kritik rol alır. Anti Mülleryan Hormon (AMH), Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) ve germ hücrelerinin farklılaşması için gerekli ortamı sağlayan transferrin, vitamin taşıyıcıları, laktat, asetat, ekstraselüler matriks bileşenleri, GDNF, TGF- β , TGF- α ve interleükinler ise Sertoli hücresi kökenlidir. Sertoli hücreleri, salgıları yanı sıra fagosit yeteneği ile dejenerasyonu ramı germ hücrelerini ve spermatid artıklarını temizleyen makrofaj görevi yaptıkları gibi apoptoz sürecini de kontrol eder. Sertoli hücreleri kökenli Fas/FasL sistemi ve Bcl-2, Bax ve TNF- α yönlendirmesi ile germ hücrelerinin büyük bir kısmı apoptoza girerek farklılaşan germ hücrelerinin sayısı kontrol altında tutulur (Neto ve ark., 2016). Yolu hücre bölünmesinin ve apoptozun gerçekleştiği spermatogenezde hücre bölünmesi kontrol mekanizmaları oldukça kritik önem taşımaktadır.



ekil 2. Spermatogenezde hormonal kontrol. Hipofizden salgılanan LH ve TSH'ın testiste hedef hücrelere iletiminden sonra inhibin, östradiol ve testosteronun ileri ve geri yönde etkisiyle hspematogenez kontrol edilir (Cooke ve Saunders, 2002). Kısaltmalar: LC: Leyding hücreleri, ST: Sertoli Hücreleri

2.3.1. Spermiyogenez

Hücre bölünmelerinin tamamlanmasından sonra hücrelerin nükleus ve sitoplazmasında önemli de i ikliklerin meydana geldi i ve hücrelerin morfolojik olarak farklıla arak olgunla tı ı spermiyogenez süreci ba lar. Spermiyogenezin dört ana evreden olu tu u kabul edilmektedir. Bunlar, Golgi fazı, kep fazı, kamçı olu umu ve olgunla ma

evreleridir (Rex ve Luiz, 2009). Spermiyogenezin en önemli süreçlerden biri olan Golgi fazında spermatozoa DNA'sının transisyon proteinleri olarak tanımlanan nükleer proteinlerle sıkıca paketlenmesi, baş ve aksonem yapısı belirginleşir. Bundan sonra, spermatidin uzaması ve akrozomal kep yapısının oluşumu gerçekleşir. Kamçı oluşumu, sentriollerden birisinin manet yapısıyla uzayarak farklılaşmasıyla gerçekleşir, son faz ise Sertoli hücrelerinin rezidüel cisimcikleri fagosite etmesiyle tamamlanır (Gunes ve ark., 2015).

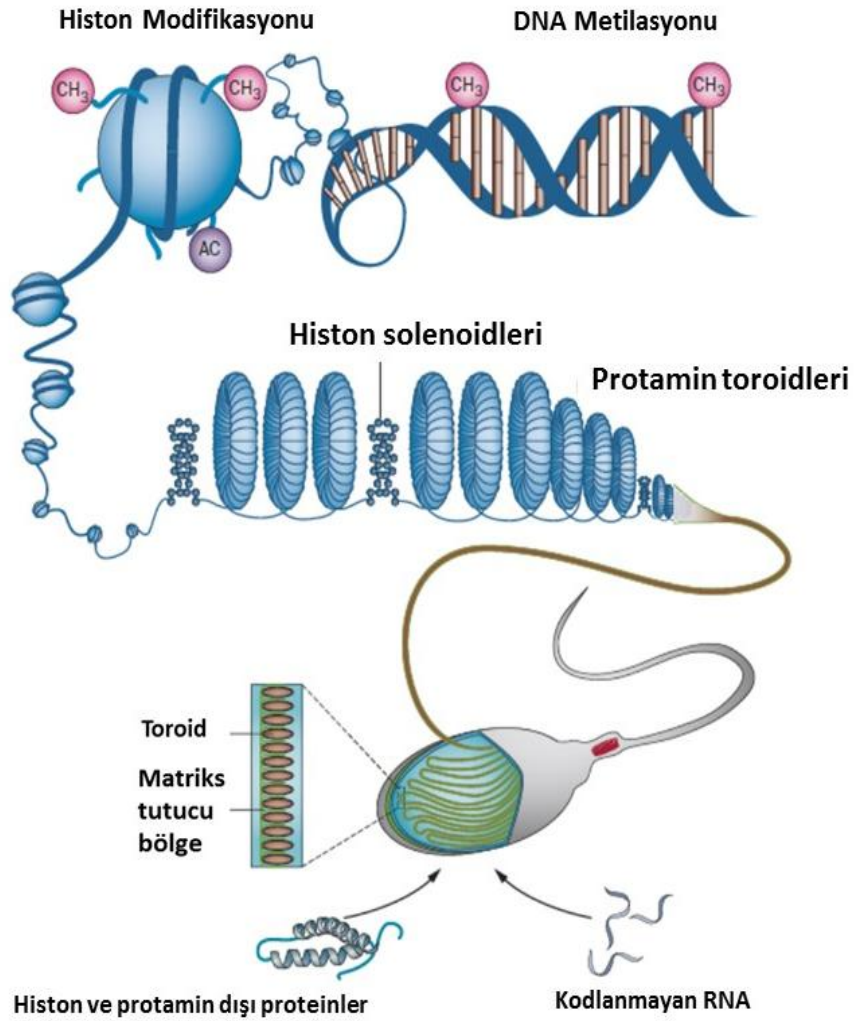
2.3.2. Kapasitasyon

Kapasitasyon, memeli sperm hücresinin önemli bir özelliğidir. Kapasitasyon sırasında sperm başı membranı biyokimyasal olarak modifiye edilir ve spermatozoon zona pellucidaya yaklaştığında akrozom reaksiyona girerek, uygun enzimin aktivasyonunu ve salınımını sağlar. Ayrıca kapasitasyon, kadın genital yolunda cereyan eden ve sperm hücresi oosite ulaşmaya kadar fizyolojik olarak tamamlanamayan bir süreç olarak ifade edilmektedir (Zaneveld ve ark., 1991). Bütün bu değişiklikler, spermilere hiperaktif, motilite, sperm-zona pellucidayı tanıma ve ekzositoz da dahil olmak üzere döllenmenin başlanması için gerekli olan bir dizi karakter sağlar (Aitken, 2017).

2.3.3. Sperm Nükleusu

Spermiyogenezdeki en önemli mekanizmalardan biri, histonlarla protaminlerin yer değiştirerek sperm kromozomlarının çok yoğun şekilde paketlenmesidir (Oliva, 2006; Schulte ve ark., 2010) (Şekil 3). Bu değişimden sonra somatik hücre nükleusuyla sperm nükleusu arasında önemli farklılıklar görülür.

Somatik hücrelerde DNA, nükleusun yalnızca bir bölümünü doldururken, sperm DNA'sı nükleusun neredeyse tamamını kaplamaktadır (Fuentes-Mascorro ve ark., 2000). Sperm DNA'sının bu şekilde düzenlenmesi yumurtaya aktarılabilecek olan genetik bilginin sıkıca paketlenmesine ve embriyonun gelişmesine olanak tanır (Poccia, 1986). Spermatozoon kromatininin paketlenmesi dört aşamada gerçekleşir. Bunlar DNA'nın çekirdek zarına bağlanması, DNA'nın çekirdeğe bağlandıktan sonra DNA halkalarının oluşumu, histonların yerini protaminlerin alması ve kromozomal pozisyon süreçleridir (Ward ve Coffey, 1991).



ekil 3. Sperm kromatinin paketlenmesi. Histonların yerini protaminler alarak kromatin daha kompakt bir yapıya dönü türülür (Schagdarsurengin ve ark., 2012)

Protaminler, spermatogenezin ileri evrelerinde sentezlenen ve histonlara oranla oldukça küçük proteinlerdir (Balhorn, 1982). Sperm hücresinde, somatik hücrelerde bulunan ve DNA'nın paketlenmesinde görev yapan histon proteinlerinin %90-95'i sperm nükleusuna özgü olan protaminlerle yer de i tirmektedir (Oliva, 2006). Sperm kromatinlerinin protaminasyonu, motilite için gerekli olan nükleus kompaktlı nı sa larken, sperm genomunu oksidasyon ve sıcaklık de i imi gibi çevresel stresten ve di i üreme sistemi içerisindeki zararlı moleküllerden de korur (Kosower ve ark., 1992).

Protaminler arasında kurulan molekül içi ve moleküller arası disülfit çapraz ba ları, sperm nükleusunun yo unla masında önemli yer tutar. Sperm kromatininin,

histonlarca paketlenen kromatin dizileri daha gevektir. Bu diziler, dölleme ve erken embriyo gelişiminde rol almaktadır (Gatewood ve ark., 1987; Gineitis ve ark., 2000). Histon proteinlerinin oranının olması gerekenden fazla olması, sperm kromatininin paketlenmesini zayıflatarak DNA hasarına yatkınlığı artırabilir (Aoki ve ark., 2005a; 2006).

2.4. Sperm DNA Fragmentasyonu

Genom instabilitesi, bütün hücrelerde mutasyonlardan daha sık meydana gelebilen bir durumdur ve somatik hücrelerde meydana gelmesi halinde kanser gibi ciddi hastalıklara yol açabilmektedir. X-ışınları, UV ve çeşitli kimyasallarla eksojen kaynaklı veya metabolik aktiviteler sonucu endojen kaynaklı olarak farklı dokülarda DNA hasarı ortaya çıkabilmektedir. En sık karşılaşılan durum (%75), metabolizmada veya baz hidrolizi sırasında oksidatif hasardan kaynaklanabilen tek zincir DNA (single stranded, ss) DNA kırıklarıdır. Bu kırıklar daha düşük olasılıkla ama daha tehlikeli şekilde çift zincir kırıklarına dönüşerek DNA'da ciddi fragmentasyona neden olabilmektedir (Tubbs ve Nussenzweig, 2017). Sperm DNA bütünlüğü ve paketlenmesi de sperm canlılığı, kapasitesi ve fertilite ile ilişkilidir (Belloc et al., 2014; Sakkas ve ark., 1998; Aitken ve Krausz, 2001; Virro ve ark., 2004; Shamsi ve ark., 2008; Aitken, 2017). Son 10 yılda sperm DNA bütünlüğüne yönelik moleküler mekanizmaların aydınlatılması için çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle, yaşlı, sigara kullanan, toksik etkilere maruz kalan erkeklerde sperm DNA bütünlüğünün bozulduğu ve fragmentasyon sıklığının arttığı görülmektedir (Tamburrino ve ark., 2012).

Sperm DNA hasarının infertil erkeklerde yaygın olduğu ve üreme potansiyelini, intrauterin inseminasyon başarısı ve IVF/ICSI sonrası fertilizasyon oranlarını olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Sharma ve ark., 2004; Zini ve ark., 2008; Agarwal ve Allamneni., 2004). Fertil ve infertil erkeklerde sperm DNA hasarı düzeylerindeki farklılıkların, fertilite potansiyelinin bir göstergesi olarak kullanılabilmesi ve hatta hasarın spermatogenez sırasında meydana gelen bir mutasyonun genetik belirteci olabileceği düşünülmüştür (Moskovtsev ve ark., 2009; Kong ve ark., 2012; Gregoire et al., 2013). Sperm DNA hasarının ölçülmesinin doğrudan ve yardımcı üreme teknikleri ile çocuk sahibi olmada önemli prediktif etkisi olduğu desteklenmiştir (Zini ve Sigman, 2009). DNA hasarı her ne kadar anormal sperm parametreleriyle ilişkili bulunmuştur (Moskovtsev et al, 2009;

Varshini et al., 2012) olsa da normal semen parametrelerine sahip normozoospermik erkeklerin %5'inde yüksek oranda sperm DNA fragmentasyonu oldu u da gösterilmi tir (Belloc ve ark., 2014).

Sperm DNA'sındaki hasarın kayna ı olarak üç mekanizma öne sürülmü tür: kromatin paketlenmesi gibi bazı do al süreçlerde bozukluk, hatalı apoptoz ve oksidatif stres (Aitken ve De Iuliis, 2010).

2.4.1. Kromatin Paketlenmesinden Do an Hasar

Çift zincir kırıkları, erkek germ hattında DNA'nın yo un paketlenmesi sürecinde do al olarak olu maktadır ve spermatogenezin bir parçasıdır (Sharma ve Agarwall, 2004). Spermiyogenez sırasında, hiperasetile olan histonlar nedeniyle kromatin yapısının gev emesine neden olur. Kromatinin gev emesi, topoizomerez kaynaklı zincir kırıklarını uyararak histonların ayrılmasını ve önce geçi proteinleri (Transition proteins: TP) ve daha sonrasında da protaminlerle yer de i tirmesini kolayla tırmaktadır (Rousseaux ve ark., 2011; Song ve ark., 2011; Güne ve Kulaç, 2013). Spermatozoada topoizomerez kaynaklı kırıkların bulunması spermiyogenez sırasındaki bozuklukları ve tamamlanmamı maturasyonu göstermektedir (Manicardi ve ark., 1995). Normalde bu süreçte meydana gelen zincir kırıkları, gama H2AX (gammaH2A Histone Family Member X) tarafından histonların fosforilasyonu ile i aretlenir ve spermatozoa germinal epitelyum hücrelerinden salınmadan önce topoizomerez I ve II tarafından tek ve çift zincir kırıkları olu turularak gev etilir. E er DNA tamir mekanizmaları herhangi bir nedenle çalı mazsa, yüksek DNA fargmenantasyonuna sahip sperm olu umu ortaya çıkabilir (Sakkas ve ark., 1999; Aitkeen ve De Luliis, 2010).

2.4.2. Yarım Kalmı Apoptoz

Germ hücreleri, maturasyon kazanmak için testiste yüksek oranda proliferasyon ve özgün hücresel farklılaşma geçirir. Bu a amalarda spermatogenez apoptoz ile kontrol edilmektedir (Hwang, 2011). Apoptoz, Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıda erkek germ hücre üretimini düzenler (Sinha and Swerdloff, 1999; Koçak ve ark., 2002). Bu durum daha çok spermatogoniya ve bölünen hücrelerde görülür. Ejakulattaki spermelerde sitoplazmik vakuoller gibi apoptotik belirteçlerinin yanı sıra Fas reseptörlerinin yüksek ifadesinin gösterildi i çalı malara dayanarak, Sakkas ve arkadaşları tarafından

(1999) “ba arısız apoptoz teorisi” ortaya atılmı tır. Semende tanımlanan, çekirdeksiz, yuvarlak yapılı M450 cisimcikleri, kısmen erkek genital sisteminin fizyolojik fagositik sürecindeki bozuklu u temsil eder. Sonuç olarak, normalde proliferasyon sırasında do al olan bu sürecin tam i lememesi sonucu yarım kalan apoptozun sperm DNA fragmentasyonu ile ba lantılı oldu u gösterilmi tir (Sharma ve ark., 2004; Tamburrino, 2012).

2.4.3. Oksidatif Stres ve DNA Hasarı

Di er aerobik hücreler gibi spermdeki oksijen metabolizması da hücre sinyalizasyonunda ve homeostazda önemli rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan oksitleyici moleküller üretir. Normal fizyolojik ko ullar altında, optimal sperm fonksiyonu için ROS gereklidir. Hafif oksidatif stres, sperm hücrelerinin kapasitasyonu için gerekli olan ve telomer uzunlu unun korunmasını destekleyen spermatozodaki tirozin fosforilasyonuna aracılık etmek için arttır (Aitken ve ark., 1997; Bisht ve ark., 2017). Ancak, çe itli çevresel toksinler veya patolojik süreçler tarafından genel olarak sa lık ve do urganlık üzerinde zararlı etkiler yaratabilecek düzeyde ROS birikebilir (Agarwal ve Majzoub, 2017). Oksidatif stres, sperm hücresi plazma zarında bulunan proteinlere ve lipidlere e zamanlı hasarın sonucu olarak, hücre zarı akı kanlı mını ve geçirgenli i etkileyen, sperm fonksiyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir (Bisht ve ark., 2017).

En yaygın reaktif oksijen türleri, O_2^{\bullet} ve H_2O_2 'dir ve mitokondri, memeli spermelerinde en önemli ROS kayna ı olarak tanımlanmı tır (Koppers ve ark., 2008; Aitken, 2017). ROS üretimi, aynı zamanda, sperm plazma zarının geçirgenli inin artmasıyla NADPH tarafından artabilmektedir. Olgunla mamı sperm hücrelerinde artmı NADPH oksidaz aktivitesinin varlı ı, ilerleyen a amalarda sperm DNA hasarıyla sonuçlanabilir (Said ve ark., 2005). Mitokondriyal DNA, histonlar tarafından korunmadı ı ve nükleotid-eksizyon onarım yollarının eksikli inden ötürü DNA onarımı için çok sınırlı bir kapasiteye sahiptir. Çok sayıda hasar görmü mitokondri içeren sperm hücreleri, bu hasardan ötürü apoptozu tamamlayamazlar, bu yüzden ejakülatta hasar görmü DNA bulunan sperm sıklıkla bulunabilir (Bisht ve ark., 2017).

ROS'un fazlalı ı, kromozom çapraz ba ları, kromozom delesyonları, baz modifikasyonları, yüksek sıklıktaki tek ve çift zincir kırıkları ve apoptozu da yol açabilmektedir. Yüksek ROS seviyeleri erkek faktörlü infertilitenin önde gelen

nedenlerinden birisi olup zayıf semen parametrelerine, sperm canlılığının azalmasına, bozulmuş sperm fonksiyonu ve DNA hasarına katkıda bulunur (Homa ve ark., 2015). Oksidatif stres hem mitokondriyal hem de nükleer DNA'ya zarar verir ve ayrıca infertilite, tekrarlayan gebelik kaybı, düşük gebelik sonuçları ve yavrularda artmış bir hastalık yükü ile sonuçlanan sperm epigenomunu etkiler. ROS ile indüklenen DNA hasarı germ hücreli apoptoz sürecini hızlandırabilir, bu da erkek infertilitesiyle ilişkili sperm sayısının azalmasına neden olabilir (Bisht ve ark., 2017).

2.4.4. Erkek Germ Hücrelerinde DNA Onarım Mekanizmaları

DNA hasarı, yukarıda bahsedildiği gibi farklı kaynaklardan köken alsa da bu doğal süreçler çerçevesinde hasarın yüksek miktarda birikiminin önlenmesi ve hücrelerin normal bir şekilde varlığını koruması için DNA onarım mekanizmaları da bulunmaktadır (Tubbs ve Nussenzweig, 2017). Sonuçta spermde tespit edilen hasar, spermiyogenez tamamlanana kadar onarım mekanizmaları tarafından onarılamayan hasarlardır.

DNA onarım mekanizmaları, erkek ve kadın germ hücrelerinde mitoz, mayoz ve mayoz sonrası süreç boyunca DNA bütünlüğünü korumak için önemli rol alırlar. Üç temel DNA tamir yolu bilinmektedir: nükleotit eksizyon tamiri (NER), baz eksizyon tamiri (BER) ve DNA yanlış eşleşme tamiri (MMR). Ancak bunların yanı sıra tek ve çift zincir DNA kırıklarının onarımı da özellikle infertilitede önemli yer tutmaktadır. Somatik hücrelerde DNA hasarlarının en zararlı türü çift zincir kırıklarıdır. Mayotik rekombinasyon, DNA'nın endojen olarak kırılmasını ve yeniden birleşmesini gerektirir. Bu çift zincir kırıkları, mayotik profazda kontrollü bir biçimde gerçekleşir. Onarılmamış çift zincir kırıkları, genetik anomali veya hücre ölümü ile sonuçlanabilecek genomik kararsızlığa yol açabilir (Mukherjee ve ark., 2010).

Spermatozoa, bir BER enzimi olan N-glikozilaz/DNA lityaz (ayrıca 8-okso-guanin DNA glikozilazı (OGG1) olarak da bilinir) ile sınırlı DNA hasar tespiti ve onarımı yapabilmesi nedeniyle apurinik-apirimidinik endonükleaz 1 (APEX1) ve XPC-HHR23F onarım çapraz tamamlayıcı protein 1'i (XRCC1) ifade eden oosit ile birlikte çalışması gerekmektedir. Bununla birlikte, hasarının derecesi ve oosit yaşı, sperm DNA hasarını onarma kapasitesini belirleyecektir. Bu hasarın ve hasarlı bazların varlığını sürdürmesi, spermilerin *de novo* germ hattı mutasyonları geliştirmesine neden olabilir. Ayrıca, çocuklarda lösemi ve retinoblastoma gibi bazı kanserlerin sebebi olabilir (Bisht ve ark.,

2017). Onarılmamış çift zincir kırıkları, genetik anomali veya hücre ölümü ile sonuçlanan genomik kararsızlık yoluyla açılabilir (Mukherjee ve ark., 2010).

2.5. Sperm DNA Fragmentasyonu Tespit Yöntemleri

En sık kullanılan DNA hasarı tespit yöntemleri, sperm kromatin yapısı testi (Sperm chromatin Structure Assay, SCSA), TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), sperm kromatin dağılım testi (Sperm Chromatin Dispersion, SCD) ve COMET'dir.

2.5.1. Sperm Kromatin Yapısı Testi

Sperm Kromatin yapısı Testi (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA), Evenson tarafından 1980'de ortaya konan akım sitometrisi temelli bir yöntemdir. Çalımanın temeli Darzynkiewicz ve arkadaşlarının (1975) ısı ile denatüre edilen timus hücresi DNA'sının akridin orange ile boyanması ve florimetrik analizine dayanmaktadır. Bu çalıma akridin orange belirtecini çift zincirli DNA'ya bağımlı olarak (515-575 nm), tek zincirli DNA'ya bağımlı olarak kırmızı (600-650 nm) floresan ışıması yaptı ve gösterilmiştir. Önemli olan verilerden biri DNA fragmentasyon indeksi (DNA Fragmentation Index: DFI) (kırmızı/kırmızı+yeşil) de eridir. Birçok araştırmacı, %30 DFI'ni eşik olarak de er olarak kabul eder. Yöntemin tekrarlanabilirliği %98-99 oranında olup farklı laboratuvar sonuçları arasında yüksek benzerlik görülmektedir ancak, SCSA özel ekipman ve deneyimli personel gerektiren oldukça maliyetli bir yöntemdir (Evenson, 2016; Rex ve ark., 2017).

2.5.2. Sperm Kromatin Dağılım Testi

Sperm kromatin dağılım testi (sperm chromatin dispersion assay: SCD), ilk kez Fernandez ve arkadaşları tarafından 2003'te sperm DNA fragmentasyonun de erlendirilmesi için kullanılan bir test olarak tanımlanmıştır. Test, denatüre edilmiş hasarlı DNA'nın oluşturu karakteristیک hale (halo) yapısının normalden daha küçük çaplı görüntülenmesi prensibine dayanır (Chohan ve ark. 2006). Tekniğin uygulamasında 5-10 milyon/ml sperm olacak şekilde hazırlanan sperm örnekleri düşük erime sıcaklığına sahip agarozla kaplanmış lam üzerine ekilerek slaytlar hazırlanır. Kısa bir süre düşük ısıda bekledikten sonra kimyasal i leme uygulanır (Agarwal ve Said, 2004). Sperm DNA dağılımını gözlemek için spermler denature edici asit çözeltisinden sonra lizis tamponuyla

muamele edilir (Fernandez ve ark., 2003). DNA’da nüklear proteinler uzakla tırıldıktan sonra halelerin çapı, floresan veya ışık mikroskopunda skorlama yapılarak incelenir. Statistikselsel analizler kullanılarak skorlanan örneklerde DNA fragmentasyon oranı hesaplanır (Agarwal ve Said, 2004). SCD, karma ışık ekipmanlara gerek duymayan, basit, hızlı, kesin ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (Fernandez ve ark. 2003).

2.5.3. COMET

COMET, klinik ara tırmalarda aynı anda tek ve çift zincir kırıklarını ölçmek amacıyla sıklıkla kullanılan, nispeten basit bir tek hücre elektroforez yöntemidir. . Bu yöntem hücrelerin agaroz gömülmesi, nötral veya alkali koşullarda lizisi, lizise uğrayan hücrelerin elektroforezi, DNA’nın floresan bir belirteç ile işaretlendikten sonra mikroskopta analizini kapsar (Shen ve Ong, 2000). Fragmente DNA’ya sahip hücreler mikroskop altında kuyruklu yıldız görünümüne sahiptir. Kuyruğun uzunluğu, DNA fragmentasyonu ile orantılı olarak artar. Hızlı ve hassas bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Tamburino ve ark., 2012).

2.5.4. TUNEL Testi

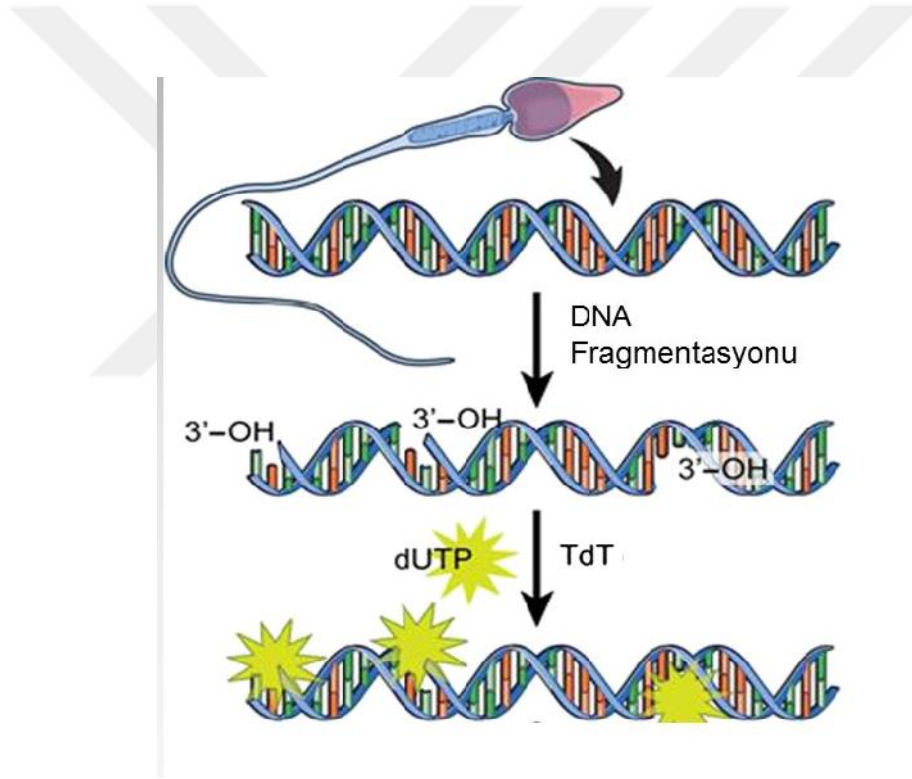
TUNEL testi, apoptotik hücrelerdeki tek ve çift zincir DNA kırıklarını, DNA’yı denatüre etmeden, akım sitometrisi veya mikroskop aracılığı ile doğrudan ölçen oldukça hassas ve kesin bir yöntemdir (Gavrieli ve ark., 1992; Muratori ve ark., 2010).

Kalıptan bağımsız çalışın bir enzim olan terminal nükleotidil transferaz (TdT) katalizörlü şekilde, tek ve çift zincir DNA kırıklarına katılan dUTP’nin ölçülmesi prensibine dayanır (Gorczyza, 1993b). Floresan etiketli dUTPler (genellikle Br- dUTP), etiketlenmiş DNA uçlarına bağlanarak DNA kırıklarını yansıtır. İmanının yoğunluğu, doğrudan dUTP’lere yani DNA’daki çentik sayısına karşılık gelir (ekil 4). Uygun bir protokolle pozitif hücrelerde yüksek yoğunlukta sinyal alınabilir. Bu protokollerde FITC, DAPI, PI gibi floresan belirteçlerden de yararlanılmaktadır. Böylelikle pozitif ve negatif hücreleri ayırt etmek kolaylaşır. TUNEL pozitif hücrelerin sayısı, toplam sperm sayısına bölünerek hasar oranı kolaylıkla hesaplanabilir.

Geçmiş yıllarda TUNEL testi ile yapılan çalışmalarda, artan DNA fragmentasyonu ile anormal sperm paketlenmesi arasında korelasyon gösterilmiştir.

(Sakkas ve ark., 1999). TUNEL, SCSA, ve SCD testleri arasında sperm DNA hasarı ölçüm hassasiyeti bakımından yüksek korelasyon oldu u da gösterilmi tir (Chohan ve ark., 2006).

TUNEL testinin birçok avantajı vardır. Bu metod, bir referans örnek gerektirmez çünkü her bir numune kendisi için kontrol i levi görebilir. Az sayıda sperm yeterlidir, 200'den az sperm bile %5'den az de i im katsayısı ile sonuç vermek için yeterli olabilmektedir. Analizler antifloresankromojenik antikorlar kullanılarak ık mikroskopunda yapılabilir. Bir çok androloji laboratuvarında epifloresan mikroskop ve yüksek kalitede ık mikroskopları donanımına ula ım imkanı vardır. Böylelikle TUNEL, fazla ek maliyet gerektirmeden androloji laboratuvarı testlerine dahil edilebilir (Schlegel ve Paduch, 2005; Darzynkiewicz ve ark. , 2008).



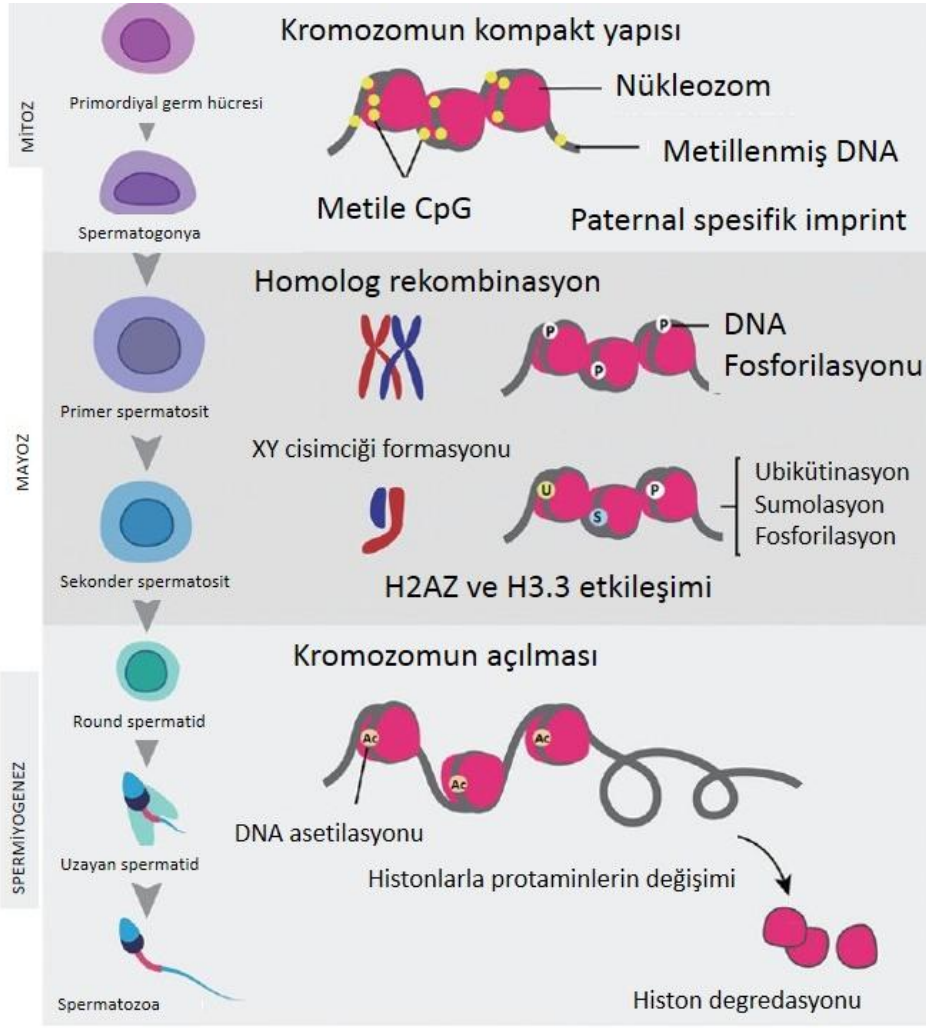
ekil 4. TUNEL Testi çalı ma prensibi.

COMET oldukça uzun ve zahmetli bir süreç olmasının yanında yalnızca tek tip zincir kırımı ölçen bir yöntemdir. Aynı anda tek ve çift zincir kırıklarının ölçülememesi önemli bir dezavantajdır. SCD testinde DNA hasarını belirleyen “hale” çaplarına ilişkin belirli bir standart ölçüt yoktur ve yüksek sayıda hücreyle çalışmak gerekmektedir. SCSA testi de özel ekipman ve deneyimli personel gerektiren pahalı bir yöntemdir. Diğer

metotlarda görülen bu dezavantajlar ve TUNEL testi sonuçları ile yardımcı üreme tekniklerindeki başarı arasındaki dikkat çekici ilişki (Lopes ve ark. 1998; Duran ve ark. 2002; Benchaib ve ark. 2003) neticesinde bu tez çalışmasında DNA hasar oranlarının tespiti için TUNEL testinin kullanılması uygun bulunmuştur.

2.6. Erkek infertilitesinde Epigenetik Düzenlenmelerin Rolü

Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan DNA'da meydana gelen ve gen ifadesini etkileyen değişikliklerdir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, kromatin yeniden düzenlenmesi ve kodlamayan RNA düzenlemeleri, spermatogenez sırasında oluşan önemli epigenetik modifikasyonlardır (Rajender ve ark., 2011; Flannigan ve Schlegel, 2017). Bu tip modifikasyonlar erkek infertilitesini gonad gelişimi, primordiyal germ hücrelerinin oluşması, puberte, spermatogenez ve fertilizasyon amaçlarını farklı şekillerde etkileyebilmektedir (Mukherjee ve ark., 2010; Schagdarsurengin ve ark., 2012; Güneş ve Kulaç, 2013, Güneş ve ark., 2016; Halder, 2017) (ekil 5).



ekil 5. Spermatogenez sırasında epigenetik düzenlenmeler. DNA metilasyonu, mitotik germ hücrelerinde olur ve paternal spesifik izler taşır. Fosforilasyon, mayotik hücrelerde meydana gelir ve hem rekombinasyon hem de XY cisimciğinin oluşumuna yardımcı olur. H2AZ ve H3.3 varyantlarının ubiquütinasyonu, sumolasyonu ve fosforilasyonu XY cisimciği formasyonu ile ilgilidir. Spermioyenez sırasında, histon-protamin değişimine yardımcı olmak için hiperasetilasyon olur (Ding ve ark., 2015).

2.6.1. DNA Metilasyonu

Metilasyon, DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından yönlendirilen biyokimyasal bir süreçtir. CpG dinükleotitlerindeki sitozinlerin 5' pozisyonundaki karbon atomuna s-adenozil metilasyonundan bir metil grubu bağlanmasıyla olur. Bu CpG adacıklarındaki metillenme baskı bulunduran promotörün inaktivitesine neden olur ve gen ekspresyonunun susturulmasına sebep olur (Turek-Plewa ve Jagodziński, 2005).

Germ hücrelerinde DNA metilasyonunun, genin susturulmasından ziyade sperme özgü kromatin organizasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Rajendran ve ark.,

2011). Primordiyal germ hücrelerinin (PGC) tümü, embriyo geli iminin 8 ila 13,5 gününde demetile duruma geçer. Sperm DNA metilasyonu spermatid farklılaşmasından önce ve sonra meydana gelebilir (Bahrenian ve ark., 2015). Mayozun erken dönemlerinde de, spermatozoidlerde DNMT1 seviyeleri yükselirken, pakiten safhasında DNMT1 enzimi seviyesi azalır. Mayozdan önce, tip A spermatogonia basama nda ve spermatozoidin erken profaz I sürecinde DNMT3a ve DNMT3b aktivitesiyle *de novo* metilasyon ve demetilasyon gerçekleşir. Ço unlukla tekrarlı dizi içermeyen bölgeler metillenir (Oakes ve ark., 2007b).

Somatik dokuyla karşılaştırıldığında testisler DNA, sekiz kat daha hipometile durumdadır (Oakes ve ark., 2007a) ve sperm hücrelerinde de geli imden sorumlu genler büyük ölçüde hipometiledir (Cui ve ark., 2016). Sperm morfolojisi ile DNA metilasyonunun yoğunluğundaki korelasyon, spermiyogenez sırasında ortaya çıkan anomalilerin DNA metilasyonunu etkilediğini düşündürmektedir (Bahrenian ve ark., 2015).

cAMP yanıt elementi modülatörü (*CREAM*) ve mezoderm spesifik transkript (*MEST*) hiper metilasyonunun, semen parametreleri ve doğurganlık üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Flannigan ve Schlegel, 2017). Birçok çalışmada spesifik genlerde ve/veya imprint lokuslarda metilasyon örüntüsünün belirlenmesine odaklanmıştır. Bu bulgular, DNA metilasyon belirteçlerinin klinik uygulamalarda tanısal ve prognostik testler olarak faydalı olabileceğini göstermektedir. *CREM*, *OCT4*, *SOX2*, *ZAC*, *PEG3*, *IGF2*, *H19*, *GTL2*, *MTHFR*, *DDRI*, *SNRPN*, *DAZL* ve *MEST* genlerindeki metilasyon düzeyliklerinin \pm Oliogo \pm Astheno \pm Terato-zoospermi (OAT) ve infertilite ile ilişkili olduğu çetli çalışmaları gösterilmiştir (Gunes ve ark., 2016). H19, MEST, RHOX ve DAZL promotörlerinin anormal DNA metilasyon durumunun, idiyopatik erkek infertilitesinin epigenetik belirteçleri olarak yakın gelecekte klinik uygulamaya sokulabileceği düşünülmektedir (Ferlin ve Foresta, 2014).

2.6.2. Histon Modifikasyonları ve Kromozom Yeniden Düzenlenmesi

Nükleozomlarla ilgili histon protein ailesi H2A, H2B, H3 ve H4'ten oluşur. Bunlar spermiyogenezde sperm kromatininin sıkıca paketlenmesi sırasında yerini büyük ölçüde protaminlere bırakır. Bu dört protein yanı sıra bir histon proteini varyantı olan testis spesifik histon H2B (tH2B), histon kuyruklarında bulunan lizin (K) ve serin (S)

rezidülerinden çe itli kimyasal modifikasyonlara u rayarak gen aktivitesini etkileyebilir (Jenkins ve ark., 2017). Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, übikitinasyon gibi histon modifikasyonları bu bakımdan epigenetik süreçte kritik rol oynar (ekil 3). Genel olarak histon asetilasyonu transkripsiyonel olarak aktif bölgelerde olur ve hipoasetilasyon inaktif bölgelerdedir (Dada ve ark., 2012). Benzer bir ekilde, H3 ve H4'ün asetilasyonu, H2A'nın übikitilasyonu ve H3K9 ve H3K27'nin metilasyonundan sonra inaktivasyon meydana gelebilir (Carrel, 2012).

Histonların protaminlerle yer de i tirmesinden önce büyük ölçüde (%90-95) hiperasetilasyonu söz konusudur (Olivia, 2006). Hiperasetilasyondan kısa bir süre sonra histonlar geçi proteinleri (TP1 ve TP2) ile yer de i tirir. Spermiyogenezin son a amasında da bu geçi proteinlerin yerini protaminler alır (Dada ve ark., 2012). Kromatinin yeniden düzenlenmesi, spermiyogenezde dolayısıyla da infertilitede önemli bir süreçtir (Olivia, 2006; Rajendwer ve ark., 2011). Sperm kromatin modellenmesinde rol alan iki tip protaminin birbirine oranının semen kalitesi ve sperm DNA hasarında önemli oldu u bulunmu tur (De Yebra ve ark., 1993; Aoki ve ark., 2005a; Aoki ve ark., 2005b, Aoki ve ark., 2006). Protamin 2 (P2) yoklu u azalmı sperm kapasitasyonu ile ili kilendirilmi ken infertil erkeklerin % 17'sinde P2 bulunmadı ı ve fertil erkeklerde P1/P2 oranının yarı yarıya oldu u gösterilmi tir (Flannigan ve Schlegel, 2017). Heterojen histon modifikasyonları ve H3K4Me1, H3K9Me2, H3K4Me3, H3K79Me2, H3K36Me3 yoklu unun azalmı sperm fonksiyonlarıyla ili kisi gösterilmi tir (La Spina ve ark., 2014, Gunes ve ark., 2016).

2.6.3. Kodlanmayan RNA'lar

Mikro RNA'lar (miRNA'lar), protein kodlayan genin ekspresyonunu de i tiren, kısa (20-23 nükleotid), tek sarmal ve kodlamayan oligonükleotidlerdir. mRNA'ları hedefleyerek translasyonun baskılanmasını sa larlar. Spesifik ifade ekilleri, spesifik patolojilerle ba lantılı olabilir ve bu nedenle tanısal ve terapötik araçlar olarak kullanılabilirler.

Kodlamayan miRNA'lardan özellikle apoptoz ve hücre döngüsünün kontrolünde rol alanlar, spermatogenezin düzenlenmesinde biyolojik belirteç olarak yeni bir odak noktası olmu tur (Neto ve ark., 2016). Birçok çalı ma, bu perspektiften miRNA'ların potansiyelini de erlendirmi tir. Sa lıklı kontrollerle kar ıla tırıldı ında miRNA34b, miR-

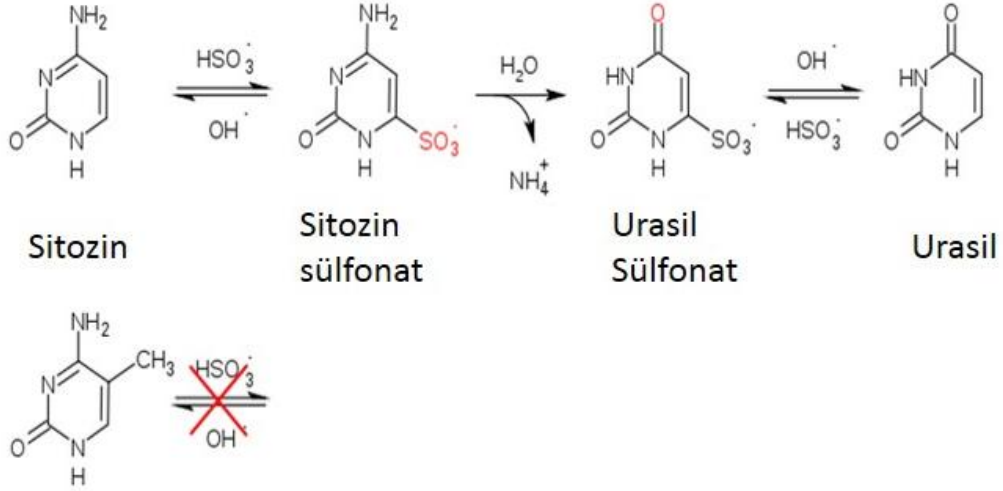
34c-5p ve miR-122'in subfertil erkeklerde dü ük seviyelerde oldu u bulunmu tur (Flannigan ve Schlegel, 2017). Bunların haricinde ikiyüzden fazla miRNA'nın spermatogenez sürecinde etkili oldu u, astenozoospermi, OAT ve normozoospermik infertil olgularda etkili oldu u gösterilmi tir. Biyoinformatik verilerle miRNA hedefleri üzerinde çalı ılarak açıklanamayan infertilite olgularında yeni yakla ımlar geli tirilebilir (Gunes ve ark., 2016).

Çevresel ajanlar ve özellikle intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) gibi yardımcı üreme teknikleri, epigenetik anormalliklere neden olabilir. Spermatogenez sırasında mitotik veya mayotik epigenetik yeniden programlama, normal döllenme ve embriyonik geli im üzerinde önemli etkiye sahiptir ve bu düzenlemelerdeki bozukluklar kısırlık, dü ük, malformasyon, geli im bozuklu u ve kanser gibi sorunlara neden olabilmektedir (Halder ve ark., 2017).

2.7. DNA Metilasyonu Tespit Yöntemleri

Geçmi te, DNA metilasyonu orijinal olarak Southern blot yöntemi ve PCR amplifikasyonunu takip eden bir metilasyona özgü restriksiyon endonükleaz i lemi ile incelenmekteydi (Razin ve Riggs, 1980). Günümüzde ise amaca uygun DNA metilasyonu analizi yapmanın çok de i ik yöntemleri vardır. Tüm genomda metilasyon profili incelenecekse PCR temelli dizileme, fragment polimorfizmleri ve ELISA bazlı yöntemler yanında kromatografik ve spektroskopik teknolojilerden de yararlanır (Kurdyukov ve Bullock, 2016).

Belirli bir bölgenin metilasyon analizi genellikle PCR ve dizileme tekniklerine dayalı yöntemlerdir. Sensitif ve kantitatif yöntemler olarak sınıflandırılabilir (Shen ve Waterland, 2007). Analizlerin yapılması için genellikle ilk olarak metillenmi ve metillenmemi dizinin ayırt edilmesini kolayla tıran bisülfid modifikasyonu yapılır (Laird, 2010). Bu modifikasyon, metillenmemi sitozinlerin urasile dönü ümünü (ekil 6) sa larken metillenmi sitozinlerde herhangi bir de i ikli e neden olmamaktadır. Böylece metillenmi ve metillenmemi diziler ayırt edilebilir. Duyarlı yöntemlerde metillenmi ve metillenmemi alleller için iki ayrı çift primer dizayn edilirken, kantitatif yöntemlerde ortak primer kullanılır (Shen ve Waterland, 2007, Li ve Dahiya, 2002). Bunlardan pirosekans ve metilasyona spesifik PCR (MSP) en sık kullanılan yöntemlerdir.



ekil 6. Bisülfid modifikasyonu.

2.7.1. Pirosekanslama

Kapalı sistem içerisinde dört enzimin kullanıldığı, tek nükleotid ekleme sırasında çıkan pirofosfatların saptanmasıyla dizi analizi yapan kantitatif bir yöntemdir. Kalıp olarak tek sarmal DNA kullanılır, her bir primer çifti biotin ile 5' ucundan işaretlenir. Sekans analizi deoksiribonükleotid trifosfatlardan (dNTP) ilkinin reaksiyona girmesiyle başlar. Her bir nükleotid eklenirken bir pirofosfat serbest kalır. Açığa çıkan pirofosfat, ATP'ye çevrilir. Oluşan ATP kullanılarak, ATP miktarıyla orantılı olarak oluşan sinyalin oksifosforlu oluşumu sağlanır. Bu sinyalin grafiksel olarak bilgisayar ortamına aktarılmasıyla analiz tamamlanır (França ve ark, 2002). Hassasiyeti bakımından heterojen örneklerde avantajlı bir yöntem olsa da özel ekipman gerektirmesi ve yalnızca 100 bazlık bölgenin analizini mümkün kılması gibi kısıtlılıkları vardır (Kurdyukov ve Bullock, 2016).

2.7.2. Metilasyona Spesifik PCR

MSP, ilk olarak Herman tarafından tanımlanmış sensitivitesi yüksek bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Yöntemde, bisülfid muamelesi sonrası metillenmiş ve metillenmemiş DNA arasındaki dizi farklılıklarından yararlanılmaktadır. Bisülfid modifikasyonu sonrasında biri metilasyona spesifik, diğeri metillenmemiş DNA bölgesi için iki farklı set primer kullanılarak kullanılan iki farklı reaksiyon yapılır. Sitozinin deaminasyonu olan urasiller MSP sırasında timine dönüşür (Herman et al., 1996).

Farklı uzunluktaki ampliconlar, elektroforetik yöntemlerle izlenmesiyle veya geli tirilen real-time PCR analizleri ile de erlendirilebilir. Oldukça hızlı, kolay ve hassas bir yöntemdir ancak metilasyon, kantitatif olarak ölçülemez yalnızca tamamen metillenmi ve metillenmemi olarak de erlendirme yapılabilir (Shen ve Waterland,2007)

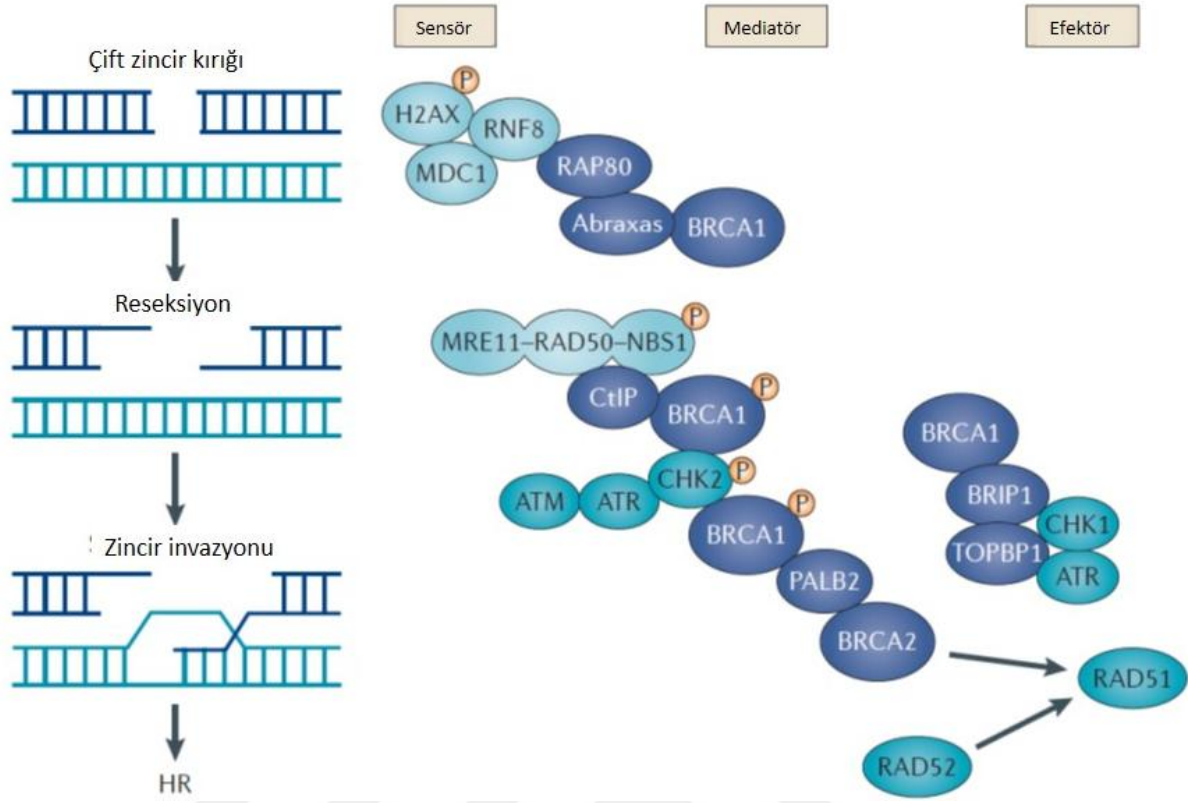
2.8. BRCA1 ve BRCA2 Genleri

Yukarıda bahsedildi i gibi farklı nedenlerle DNA'da tek ve çift zincir kırıkları ve çapraz ba lar gibi lezyonlar meydana gelebilmektedir. Bu lezyonlardan çift zincir kırıkları oldukça tehlikelidir ve tamir edilememesi durumunda kromozom translokasyonları, genetik kusurlar ve hücre ölümüne yol açabilmektedir (Krejci ve ark., 2012).

DNA lezyonlarının tamirinde lezyonun türüne göre homolog rekombinasyon (HR), BER, NER, MMR homolog olmayan uç tamamlama (Nonhomolog End Joining Repair; NHEJ), gen konversiyonu (Gene Conversion; GC) ve tek zincir ba lanması (Single Strand Annealing; SSA) gibi mekanizmalar etkindir (Gudmundsdottir ve Ashworth 2006; Huen ve ark., 2010). Bu mekanizmalarda BRCA1 ve BRCA2 etkile ime girdi i di er proteinlerle (ekil 7), genom bütünlü ünün korunması ve hücre döngüsü kontrolünde önemli roller üstlenir (Roy ve ark., 2012).

HR, mitozda DNA çift zincir kırıklarının tamirinde ve mayozda kromozom ayrılması ve parça de i iminde rol oynamaktadır. BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin her ikisi de homolog rekombinasyon mekanizması ile DNA tamirinde rol alır (Narod ve Foulkes 2004; Gudmundsdottir ve Ashworth 2006; Krejci ve ark., 2012).

BRCA1 ve *BRCA2*, rekombinasyon sırasında olu an çift zincir kırıklarının tamirinde devreye girer (ekil 7). Bu süreçte çift zincir kırığı olan kromatid, replikasyon sırasında kırılmamı karde kromatidin kalıp olarak i lev görmesiyle onarılır. Böyle bir rol için ilk kanıtlar, iki proteinin de homolog rekombinasyonun temel bile eni olan RAD51 ile replikasyon çatalında hasar olan bölgeye ta ındı ının gözlenmesi ile ortaya çıkmı tır. Buna ek olarak, *BRCA1* ve *BRCA2* -nakavt hücrelerde bölgeye özgü kromozomal çift zincir kırıklarının RAD51 aracılı HR tamirinde eksiklik ve çift zincir kırıklarını indükleyen DNA hasarı ajanlarına kar ı a ırı hassasiyet görülür (Cousineau ve ark., 2005).



ekil 7. DNA Hasarının moleküler cevabı. Hasar durumunda sensör proteinler hasarı tespit ederken ortama çekilen aracı proteinler efektör proteinleri aktive ederek hücre döngüsü kontrol noktalarını uyarır. BRCA1'in dahil olduğu makro kompleks (koyu renkle gösterilmiştir) DNA hasarına yakın bölgeden ubikütinasyonu ile ilgilidir. Bu durum H2AX'in fosforilasyonuna bağlıdır. BRCA1-CtBP interacting protein (CtIP) kompleksi, çift zincir kırığına duyarlı MRN Kompleksi (MRE11, RAD51 ve NBS1) ile ilişkilidir. CHK2 ile BRCA1 fosforilasyonu, RAD51 yönlendirmeli HR'da önemli BRCA1-PALB2-BRCA2 kompleksinin oluşumunu sağlar. BRCA1-BRCA1 interacting protein C terminal helikase 1 (BRIP1)- DNA topoisomerez 2 bağlama proteini 1 (TOPBP1) kompleksi, replikasyon boyunca DNA onarımı ile ilişkilidir ve Ataxia Telangiectasia (AT) and Rad3-related (ATR)-CHK1 sinyaline yardımcı olur (Roy ve ark., 2012).

BRCA1 ve *BRCA2* proteinleri hücre döngüsünün G1/S ve G2/M kontrol noktalarında da önemli bulunmuştur. *BRCA1* ve *BRCA2* en çok timus ve testiste ifade edilir. Fare embriyolarında her iki genin ifadesi de en yüksek oranda hızlı bölünen ve farklı dokularda bulunmuştur. *BRCA1* ve *BRCA2*'nin oluştuğu kompleksler genom bütünlüğünü koruyacakları nedeniyle tümör baskılayıcı özelliktedirler (Welsh ve ark. 2000).

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinin herhangi birinde tek bir kopyanın germ-hattı mutasyonuna uğraması kalıtsal meme ve over kanseri sendromu ile sonuçlanır. Bu

sendrom yalnızca erken ba langıçlı meme kanseri ile ili kili olmayıp aynı zamanda over, pankreas, mide, fallop tüpü ve prostat kanseri riskini de artırır (Roy ve ark., 2012).

BRCA1'in farklı kinazlarla de i ik bölgelerden fosforlanması hücre döngüsünün farklı kontrol mekanizmalarını yönetmektedir (Christou ve Kyriacou, 2013). G1/S kontrol noktası, BRCA1'in Ataxia telangiectasia mutated (ATM) ve Ataxia telangectasia and Rad3 related (ATR) tarafından fosforlanmasına ba lıdır. BRCA1-BRIP1-TOPBP1 makrokompleksinin S fazı kontrol noktasında replikasyon çatalının geciktirilmesi veya yıkılması a amasında önemli görülmektedir. BRCA1-Abraxas-RAP80 makro kompleksinin ise G2/M kontrol noktasında iyonize radyasyon sonucu olu an DNA hasarında cevap olu turdu u bildirilmi tir (Kim ve ark., 2007; Roy ve ark., 2012).

BRCA1, NHEJ'nin farklı tiplerinde de i ik roller üstlenir. BRCA1'in amino terminal ucunun NHEJ proteini KU80 ile etkile imi DNA çift zincir tamir mekanizmasını tetikler. Bir ba ka kritik görevi p53 ba layıcı protein 53BP1 gibi NHEJ proteinlerini çift zincir kırımı ndan uzakla tırarak HR ve NHEJ arasındaki seçimi düzenler (Gudmundsdottir ve Ashwort, 2006; Roy ve ark., 2012).

DNA hasarı oldu u zaman MRE11-RAD50-Nbs1 kompleksi (MRN) çift zincir kırımı nın oldu u bölgeye ba lanır ve DNA hasarı sensörü ATM proteinini bölgeye çeker. ATM'nin rolü H2AX'i fosforlayarak BRCA1 ve RAD51 gibi tamir proteinlerini bölgeye çekmektir. Bundan sonra ATR proteini BRCA1'i fosforlar. Bu kaskatta Chk2, BRCA1'in hiperfosforilasyonundan sorumludur. Chk2'nin aksine Chk1 BRCA1'i fosforlamadan BRCT bölgesine ba lanır. BRCA1 Chk1'in aktivasyonunu düzenleyerek G2/M kontrol noktasında DNA hasarına kar ı bir yanıt olu turur (Christou ve Kyriacou, 2013; Caesteker ve Walle,2013).

BRCA1 aynı zamanda PALB2 ve BRCA2 etkile imi ile RAD51'in hasarlı bölgeye çekilmesi için gereklidir. Bu etkile im, Chk2 yönlendirmeli fosforilasyon ile ba lantılıdır (Roy ve ark., 2012). HR için anahtar protein RAD51'dir. DNA hasarı olu tu u zaman BRCA1 ve RAD51 hasarlı bölgede konumlanır. BRCA1 bu süreçte fosforlanır ve BRCA2, hasarlı DNA'ya kalıp olacak homolog zinciri bulan RAD51 ile etkile erek onarım mekanizmasını aktive eder (Narod ve Foulkes, 2004; Krejci ve ark., 2012; Jensen, 2013). BRCA1'in DNA hasarı onarım i Levinin E3 ligaz aktivitesine ba lı olmadı ı gösterilmi tir (Reid ve ark., 2008).

BRCA1'in farklı mekanizmalarda etkin bir çok fonksiyonu oldu u görölürken (Caestecker ve Walle, 2013) primer görevinin HR oldu u ve ikincil rolünün ise replikasyon çatalının korunması oldu u vurgulanmaktadır (Roy ve ark., 2012).

BRCA2'nin RAD51 ile etkile iminin iki sonucu vardır. Birincisi, RAD51'in BRC tekrar bölgeleri ile tek ve çift zincir kırır ı içeren DNA'ya yönlendirilmesidir. kincisi, BRCA2'nin C-terminal ucu ile RAD51 filamentleri arasında kurulan ba sonucu çatalın korunmasıdır. BRCA2 eksikli i, HR etkinli ini önemli ölçüde azaltır. BRCA2'nin etkinli inin artmasında PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2) ve mikrocefalin (microcephalin; MCPH) gibi proteinlerin de destekleyici rolü vardır (Krejci ve ark., 2012). PALB2, BRCA1 ve BRCA2 arasında köprü konumundadır böylelikle bu iki önemli protein arasında fiziksel bir ba kurulmu olur (Zhang ve ark., 2009; Roy ve ark., 2012; Christou ve Kyriacou, 2013).

2.8.1. Gen ve Protein Yapısı

BRCA1, 1990 yılında 17. kromozomun uzun koluna haritalanmı ve 1994 yılında da klonlanmı tır. DNA hasarı onarımı, sinyal iletimi ve tümör baskılayıcı görevleri olan 24 ekzonlu ve 1863 amino asitlik proteini kodlayan gen, memelilerde büyük ölçüde korunmu tur (Caestecker ve Walle,2013; Hall ve ark., 1990; Miki ve ark., 1994). Yüksek yo unlukta (%41,5) *Alu* elementi içeren genin 3 CpG adacı ı bulunmaktadır. Ekzon 1a ve ekzon 1b olmak üzere iki ekzonu bulunmakta ve ekzonların ikisi de TATA kutusu içermemektedir (Smith ve ark., 1996).

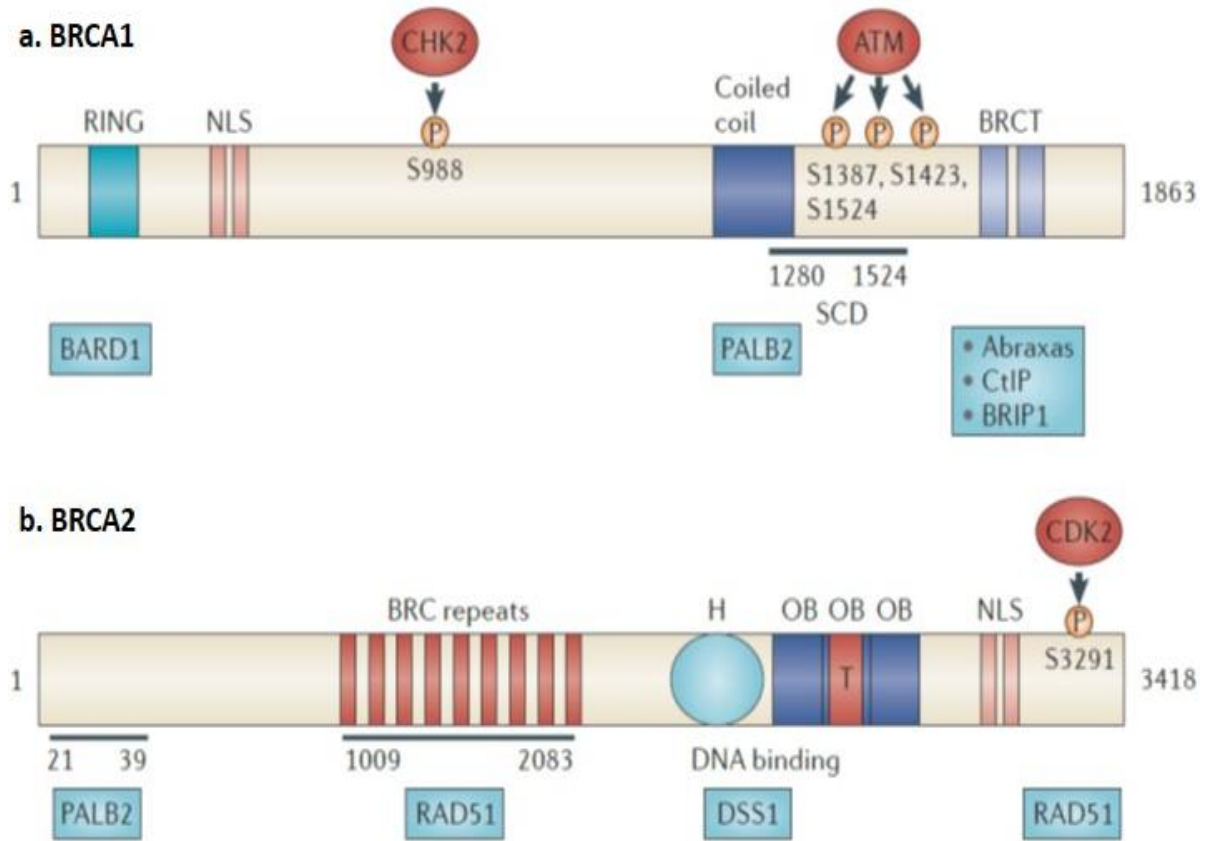
BRCA1, E3 ubiquitin ligaz aktivitesi olan bir amino-terminal RING bölümüne ve fosfo-protein ba layan BRCT bölümü ile iki nükleer lokalizasyon sinyaline sahiptir (ekil 8) (Scully ve ark., 1996; Christou ve Kyriacou, 2013).

BRCA1 ili kili RING bölgesi (BRCA1-associated RING domain; BARD1) proteini, BRCA1 ile ili kisi bulunan ilk proteindir. Bu iki proteinin RING parmak ile olu turdu u heterodimer übikitin ligaz özelli i göstermektedir. Otoübikitilasyon özelli i olan bu kompleksin spesifik substratları histon proteinleri H2A, H2B, H3 ve H4'dür (Christou ve Kyriacou, 2013).

BRCA2 geni, 13. kromozomun uzun kolunda yer alır ve 27 ekzondan olu maktadır. 5' ucunda bir adet CpG adacı ı bulunmaktadır. Di er birçok genden farklı olarak kodlayan bölge %60'dan fazla AT ta ımaktadır (Tavtigian ve ark., 1996). *BRCA2*, 3418

aminoasitten olu an oldukça büyük bir proteindir (Wong ve ark., 1997; Narod ve Foulkes 2004).

BRCA2, di er proteinlerle etkile ime giren BRC olarak tanımlanan tekrarlarına ve iki nükleer lokalizasyon bölgesine ve çift zincir DNA'ya ba lanmasını kolayla tıran H bölgesi yanında üç adet oligonükleotit ba lanma bölgesine sahiptir (ekil 8).



ekil 8. BRCA1 ve BRCA2 fonksiyonel domeynleri ve bu bölgelere ba lanan bazı proteinler. (a) BRCA1, 1863 amino asitten olu ur. Amino terminalinde BARD1 ile ili ki kuran bir RING bölgesi ve iki nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) bulunur. Merkezi bölgede CHK2 fosforilasyonuna açık S988 amino asiti vardır. Karboksil uç ise PALB2 ile etkile en bir coiled-coil bölgesi; ATM ile fosforillenme potansiyeli olan 10 bölgeyi içine alan bir SQ/TQ küme bölgesi (SQ/TQ cluster domaini, SCD) ve ATM tarafından fosforillenmi Abraxas, CtIP, BIRP1 ba layan BRCT bölgesi vardır. (b) 3418 amino asitlik BRCA2 proteini. Amino terminal ucunda, 21-39. amino asitler arasında PALB2'yi ba layan bölge bulunur. BRCA2 proteininin, RAD51'i ba layan sekizli BRC tekrar bölgesi vardır. BRCA2 DNA ba lanma bölgesi, tek ve çift zincirli DNA'ya ba lanmayı kolayla tıran bir helikal bölge (H), üç oligonükleotit ba lanma (OB) ve bir çekici (tower) bölge (T) bulundurur. BRCA2'nin karboksil ucu nükleer Lokalizasyon sinyali (NLS) ve yine RAD51'i ba layan CDK2 fosforlama bölgesi S3291'den olu maktadır (Gudmundsdottir ve Ashworth 2006'dan düzenlemeyle Roy ve ark., 2012).

2.8.2. BRCA1 ve BRCA2 için Epigenetik Düzenlenme ve Hastalıklarla İlişkisi

Genom bütünlüğünün korunması ve hücre döngüsünde önemli olan genlerin epigenetik olarak susturulmasının HR sürecini aksatması nedeniyle çeşitli kanser tiplerinde önemli olduğu bulunmuştur (Abkevich ve ark., 2012; Heyn ve Esteller, 2012). *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki epigenetik baskılanma ailesel kanserlerde “ikinci vuru a” yol açarak hastalığın ortaya çıkmasını sağlayabilmektedir ve bu durum kişiye özgü tedavide önem arz etmektedir (Stefansson ve Esteller, 2013).

Akciğer adenokarsinomunda *BRCA1* ve *BRCA2* mRNA ve protein ifadesinin azalmasının altında yatan mekanizma DNA metilasyonudur (Lee ve ark., 2007). Over kanserli hastalar üzerinde yapılan çalışmada göstermiştir ki *BRCA1* metilasyonuna bağlı olarak *BRCA1* gen ifadesinde önemli ölçüde azalma vardır ve bilateral tümör gelişimi olan hastalarda DNA metilasyon seviyesi daha yüksektir (Bai ve ark., 2014).

Bir başka çalışmada ileri evre over kanseri hastaların %11’inde *BRCA1* hipermetilasyonu görülürken, *BRCA2* geni metilasyonuna rastlanmamıştır (Artioli ve ark., 2013). Meme kanserinde de *BRCA2* geni metilasyonu açısından hasta ve kontrollerde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Hilton ve ark., 2002; Bosviel ve ark., 2012). Duktal karsinomada ise *BRCA2* geninin sıklıkla metilasyona uğrayan genler arasında olduğu gösterilmiştir (Moelans ve ark., 2011).

Laringeal skuamöz hücreli karsinomada *BRCA1* geni kontrollere göre hipometile iken *BRCA2* geni, yüksek oranda hipermetile durumdadır (Szaumkessel ve ark., 2011). Yüksek düzeydeki miRNA-155’in *BRCA1* defektleriyle ilişkili olduğu belirtilmektedir (Stefansson ve Esteller, 2012).

Kanserin yanı sıra bu iki genin mayotik süreçte etkili olduğu, kromozom anomalileri ve infertilite ile ilişkisine dair önemli bulgular vardır.

2.8.3. BRCA1 ve BRCA2’nin Mayotik Önemi

Fanconi anemisi, *BRCA2* ve *PALB2*’nin biallelik germ hattı mutasyonu sonucu oluşan ve artmış kanser riski, yanında infertilitenin de görüldüğü nadir bir hastalıktır. Hastalık belirtilerinden yola çıkarak *BRCA1* ve *BRCA2* genleriyle etkileşerek HR ile DNA hasarı onarımında etkin *PALB2*’nin knock-in mutasyonunun incelendiği bir çalışmada *BRCA-PALB2* kompleksinin mayotik çift zincir kırık tamirinde önemli olduğu gösterilmiştir (Simhadri ve ark., 2014).

BRCA2, mayotik rekombinasyonda kritik rol oynar (Krejci ve ark., 2012). Mitotik rekombinasyon, homolog diziyi bulmak ve bağlamak için yalnızca RAD51'e gereksinim duysa da mayotik rekombinasyonda mayoz spesifik DMC1 proteine ihtiyaç duyar. Bitki ve memelilerde BRCA2 direkt olarak RAD51 ve DMC1 ile etkileşime girer (Souquet ve ark., 2013). BRCA2'nin germ hattı hücrelerinde azalması farede mayotik duraksama artışına neden olmaktadır (Sharan ve ark., 2004).

Diğer taraftan, eski çalışmalarından derlenen bilgiye göre mayoz sırasında asinaptik XY cisimciğinin sessizleştirilmesinde (Meiotic Sex Chromosome Inactivation, MSCI) fosforlanmış CDK2 izoformu p-CDK2³⁹ etkilidir. Bu etki H2AX fosforlanması ile mümkündür. BRCA1'in bu mekanizmada XY kromozomlarına yakın konumlanarak ortama H2AX fosforilasyonu yapmak üzere ATR'yi çekmesi önemli bir etkinlik kazandırmaktadır (Wang ve ark., 2014). Ayrıca, mayozun düzenlenmesinde uydu DNA ve uzun terminal tekrarların (Long Terminal Repeat, LTR) BRCA1'in hedefi olabileceği de belirtilmektedir (Broering ve ark., 2014).

Poli-ADP riboz polimeraz (PARP), BRCA1'in BRCT bölümü ile etkileşime giren ve genom bütünlüğünün korunmasında önemli olan bir proteindir. PARP'ın spermatogenezde de rolü olduğu gösterilmiştir. Fertil erkeklerin olgun spermatozoalarında yüksek PARP seviyesi tespit edilmişken, PARP seviyesi düşük olan olgun spermelerde oksidatif strese bağlı DNA zinciri kırıkları, kromatinin yeniden modellenmesi ve hücre ölümü kaynaklı infertilite görülmektedir (Celik-Ozenci ve Tasatargil, 2013). Bu durum, BRCA1 ve onun bağlantıda olduğu proteinlerin infertilite üzerinde etkili olduğunun işaretlerinden biridir.

BRCA1'in mayozda çift zincir kırıklarının onarımında etkili olduğu ve kadınlarda ileri ya da *BRCA1* ifadesindeki düşünlüğü oositte anöploidide artışına neden olabileceği ve kadınlardaki *BRCA1* mutasyonlarının primer overyan yetmezliğe neden olabileceği belirtilmiştir (Oktay ve ark., 2010; Adelfalk ve ark., 2011).

Erkek farelerde *Sycp1*, *Syce2* gibi sinapsı veya *Dmc1*, *Msh5*, *Brca1* ve *H2afx* gibi rekombinasyonu düzenleyen genlerdeki mutasyonların spermatogenezde mayotik areste neden olduğu bilinmektedir (Royo ve ark., 2011). BRCA1 ile ilgili yapılan bir çalışmada BRCA1 "I26A homozigot" hayvanlarda kanser görülmezken infertilite sergilediklerine değinilmiştir (Patel ve ark., 2011). Xu ve arkadaşları mutant fareler üzerinde yaptıkları

çalı mada tam uzunlukta BRCA1'in spermatogenez için elzem oldu unu bulmu lar ve *BRCA1* mutasyonunda mayoz sırasında DNA onarım sürecindeki kusura ba lı olarak spermatogenezin ba arısız olaca ı hipotezini öne sürmü lerdir (Xu ve ark.,2003).

Özetle, gen ifadesi epigenetik mekanizmalarla kontrol edilen *BRCA1* ve *BRCA2* genleri, DNA bütünlü ünün korunmasının yanında hücrenin mitoz ve mayozu ba arılı bir ekilde tamamlaması için de gereklidir. Bütün bu bilgiler 11 inda, genlerin susturulmasının, özellikle DNA fragmentasyonu üzerinden spermatogenez ve sperm kalitesini etkileyebilece i dü ünülerek teze konu olan hipotez ortaya atılmı tır.



3. MATERYAL VE METOT

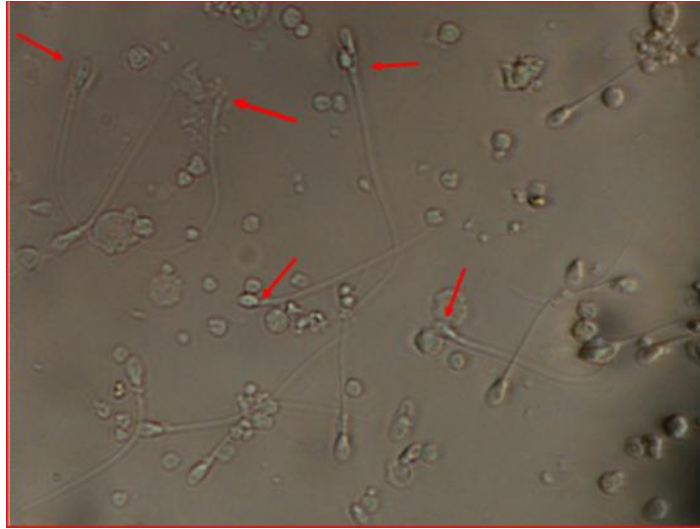
3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalı ma Grubunun Olu turulması ve Özellikleri

Çalı maya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi klinik ara tırmalar etik kurulundan alınan izin (KAEK 2012-78) ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Poliklini ine 2012-2016 yılları arasında infertilite nedeniyle ile ba vuran, gönüllü onam beyanında bulunmu 131 hasta ve fertilitte durumu belli olmayan 4 sa lıklı genç birey katıldı.

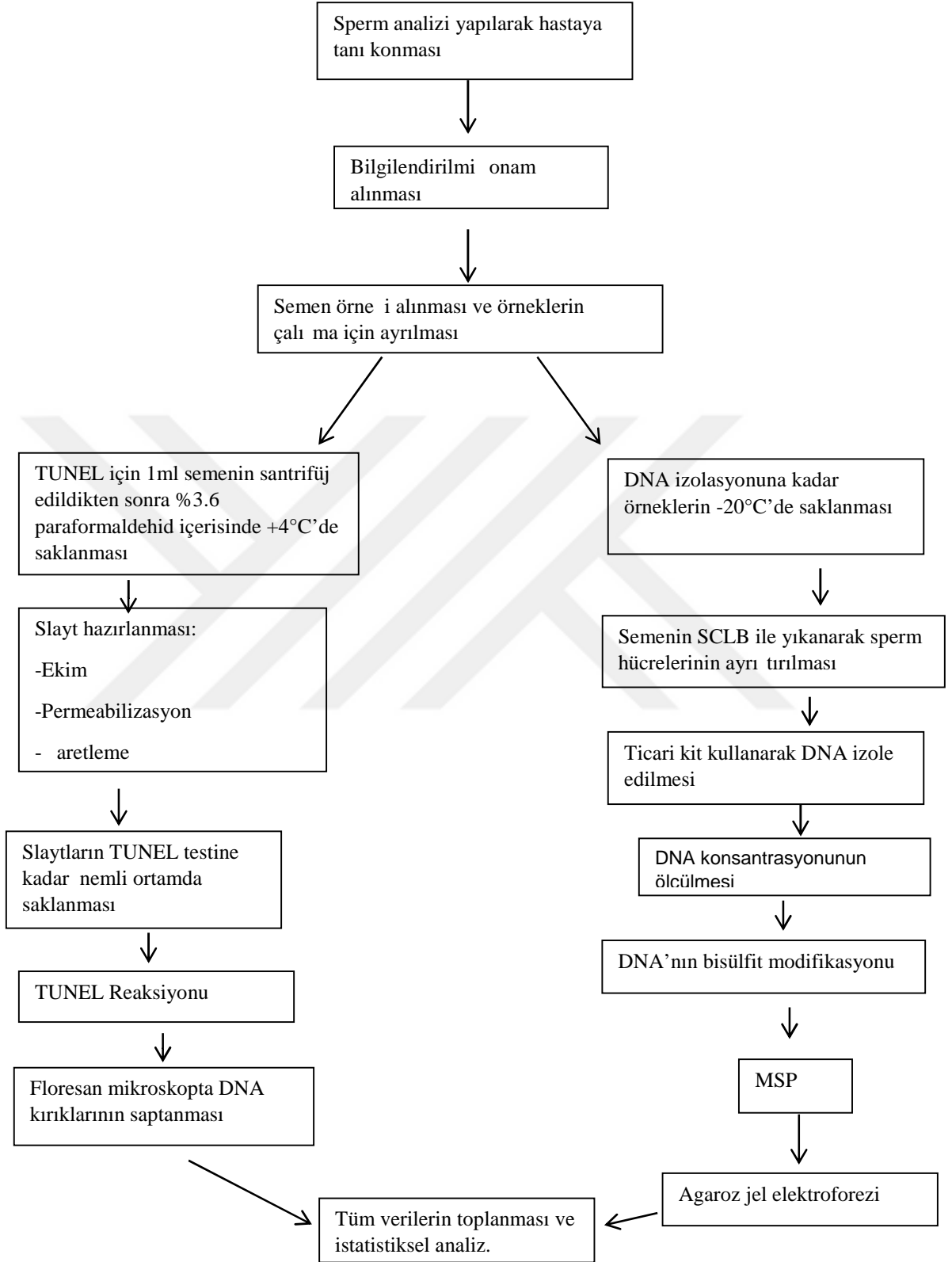
Gönüllülerden 2-5 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yoluyla semen alınarak Androloji Laboratuvarında WHO kriterlerine göre rutin semen analizi yapıldı. Semen analizinde (ekil 9) sperm konsantrasyonunun 15 milyon/ml'nin, sperm motilitesinin %32'nin ve sperm morfolojisinin %4'ün altında olması kriterlerine göre oligo-, terato- ve astheno- zoospermi özellikleri gösteren hastalar çalı maya dahil edildi. Lökositospermi gözlenen, obstrüktif ve azoospermik hastalar çalı ma dı ında tutuldu.

Hipotezimize göre, SDF oranı dü ük ve yüksek bireyler kar ıla tırılaca ı için ayrıca fertil kontrol grubu olu turulmadı. Semen örnekleri karanlık ortamda ve uygun ısıda semen analizini takip eden yarım saat içerisinde laboratuvara getirilerek TUNEL testi ve MSP için hazırlandı.



ekil 9. Anormal spermatozoolar. Gönüllü semenlerinden birinde sperm analizinde rastlanabilecek bazı morfolojik bozukluklar kırmızı oklarla i aret edilmi tir.

3.2. METOT



ekil 10. Metot akı eması

3.2.1. TUNEL Testi

SDF analizi, Insitu Cell Death Detection Kit, (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak kit protokolüne uygun ve daha önce yapılan optimizasyon çalışmaları doğrultusunda geliştirilerek uygulandı.

Ön hazırlık:

- 1) 1ml ejakülat örneği 1.5 ml santrifüj tüpüne alınarak 250 xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 2) Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet fosfat-tuz tamponu pH 7,4 (phosphatetamponlu saline, PBS) eklenerek resüspanse edildi.
- 3) Örnek tekrar 250 xg'de 10 dakika santrifüj edilip ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 4) Hücrelerin fiksasyonu için pelet 1 ml % 3,6 paraformaldehid (PFA) ile resüspanse edildi ve +4°C'de bir hafta saklandı.

Poli L-lizin kaplı lamaların hazırlanması

1. Temiz lamalar 1:9 distile su: poli L-lizin içerisinde 5 dakika bekletildi.
2. Lamlar süzildikten sonra 60°C'de 1 saat etüvde kurutularak kullanıma hazır hale getirildi.

Ekim işlemi

1. Lam üzerinde ekim yapılacak alanlar üç çeyrek ekleinde hidrofobik kalemle işaretlendi.
2. PFA içerisinde fiksasyon örneği 250 xg'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Pelet, 1-5 milyon/ml sperm olacak şekilde 1X PBS ile resüspanse edildi.
4. Ekim yapılacak alana 10 µl PB-sükroz damlatıldıktan sonra üzerine 300 µl resüspanse örneği yüklendi (ekim 11).
5. Lamlar nemli ortam kabı içerisinde gece boyu +4°C'de saklandı.
6. Ertesi gün slaytlar iki kez her dakika PBS ile yıkanarak ekim süreci tamamlandı.



ekil 11. Hücrelerin lama ekim i lemi.

Pozitif Kontrolün hazırlanması:

1. Slaytı hazırlanmı normozoospermik örneklerden birisi pozitif kontrol olarak kullanıldı.
2. Hasar olu turmak için 300 µl PBS içerisinde hazırlanmı 300 mM H₂O₂ lam üzerindeki i aretli alana damlatıldı.
3. Slayt 37 °C’de 1 saat etüvde bekletildi.
4. 1X PBS ile 2 kez 1-2 dakika yıkandı.

Permeabilizasyon:

1. % 0,1 sodyum sitrat, % 0,1 Triton X-100 çözeltisi ile +4°C’de 10 dakika inkübe edildi.
2. 1X PBS ile 2 kez 1-2 dakika yıkandı.

TUNEL Reaksiyonu: Karanlıkta ve dikkatlice yapıldı.

1. Nemli ortamda hücrelerin tutunmu oldu u slaytlar 2 kez 1-2 dakika 1XPBS ile yıkandı.
2. I ık mikroskopunda TUNEL için uygun alanlar belirlendi.
3. Lamlar kurutuldu.
4. 1:9:25 Enzim (TdT): Label (dUTP-FITC): Dilution tamponlu olacak ekilde TUNEL reaksiyon karı ımı hazırlandı.
5. Karı ıma kısa bir vorteks i lemi uygulandı.
6. aretli alanlara dikkatlice 40 µl TUNEL reaksiyon karı ımı damlatıldı.

7. Lamlar karanlıkta, nemli ortam kabında 37°C’de 1 saat reaksiyona bırakıldı.

Görüntüleme:

1. Reaksiyon sonrası slaytlar 1 kez 1-2 dakika 1XPBS ile yıkandı.
2. Slaytlar kurutuldu.
3. 10 µl kadar DAPI içeren antifade (Antifade Mountant with DAPI, Merck, Millipore, Almanya) damlatılmış lameller ile TUNEL alanları kapatıldı.
4. Floresan mikroskopta (Olympus BX-51) 40X büyütme ile slaytlar incelendi.
5. UV ışık altında uygun filtrelerle DAPI ve FITC sinyalleri görüntülendi.
6. Spesifik olarak işaretlenmiş bölgelerde her örnek için ortalama 500 hücreyi kapsayacak şekilde DAPI ve TUNEL için elektronik foto raflar çekildi.

Foto rafların analizi:

Floresan mikroskopta alınan görüntüler Image J programı kullanılarak her bir örnek için en az üç görüntü ve en az 500 hücreyi kapsayacak şekilde sperm hücrelerindeki DAPI ve TUNEL işaretlemeleri manuel olarak tek tek iki farklı kör gözlemci tarafından sayıldı. Farklı alanlardaki SDF oranları aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve Excel dosyasına kaydedilerek ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı.

SDF hesaplama formülü (% SDF) = (TUNEL/DAPI)X100

3.2.2. Sperm DNA Eldesi

Sperm analizi yapılmasını takiben laboratuvara getirilen semenin bir kısmı DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C’de saklandı. Çalışmaya başlamadan önce dondurulmuş örneğin 37°C’de çözünmesi sağlandı. Semendeki sperm hücrelerinden DNA izolasyonu yapılabilmesi için ilk olarak somatik hücreler uzaklaştırıldı. Uygulama sonrası lökosit varlığı değerlendirildi ve somatik hücre lizisi / sperm hücre eldesi verimi göz önüne alındığında iki kez yıkama yapmanın ideal olduğu belirlendi. Daha sonrasında her örnek için rutin olarak iki yıkama yapıldı.

Somatik Hücre Eliminasyonu:

Semendeki somatik hücrelerin ayıklanması için SCLB (Goodrich ve ark., 2005) kullanıldı.

SCLB: % 0,5 Triton X-100 % 0,1 SDS

1. Çözünmüş semen 250 µg’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant (seminal plazma) uzaklaştırıldı.

2. Pelet 1ml PBS ile pipetaj yapılarak çözüldü.

3. Tekrar 250 xg'de 10dakika santrifuj edilmi ve süpernatant uzakla tırıldı.
4. Pelet 1ml SCLB ile resüspanse edildi.
5. Karı ım 15ml'lik polipropilen tüpe alınarak 13ml'ye kadar SCLB ile tamamlandı.
6. Vorteks yardımı ile karı tırıldı.
7. Tüp buz içerisinde gömülerek 30 dakika inkübe edildi.
8. inkübasyondan sonra 200 xg'de 15 dakika santrifuj yapıldı.
9. Santrifuj sonrası süper natanın tamamen aspire edilerek uzakla tırıldı.
10. Pelet tekrar 13 ml SCLB içerisinde çözülerek 30 dakika daha buzda inkübe edildi.
11. inkübasyondan sonra 200 xg'de 15 dakika santrifuj yapıldı.
12. Santrifuj sonrası süpernatanın tamamen aspire edilerek uzakla tırılması sa landı.
13. Pelet 200 µl 1X PBS içerisinde çözülmü ve somatik hücrelerin tamamen uzakla tı ından emin olunduktan sonra DNA izolasyonuna hazır hale getirildi.

Somatik Hücre Varlı ı De erlendirmesi

Semende en bol bulunan somatik hücreler lökositlerdir. Lökositlerin henüz olgunlaşmamış spermatozoa ile karı tırılması muhtemel oldu u için, myeloperoksidaz aktivitesi ölçümüne dayalı bir test olan Endtz Testi ile lökosit varlı ı incelendi. (Endtz, 1972).

Endz Testin uygulanması

- 1) SCLB ile yıkanmı ve PBS içerisinde çözülmü 10 µl örnek temiz lam üzerine damlatıldı.
- 2) Örnek 10 µl Leucoscreen kit (FertiPro N.V., Belçika) ile karı tırılarak lamelle kapatılıp ı ık mikroskopunda görüntülendi.
- 3) Lökositleri i aret eden kahve renkli hücrelerin pembe renkte boyanan olgunlaşmamış yuvarlak spermatozoa hücrelerinden ayırt edilmesi sa landı.

3.2.3. DNA İzolasyonu

Sperm hücrelerinden DNA izolasyonu, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile vücut sıvılarına uygun olarak önerilmi protokol do rultusunda a a ıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1. 1,5 ml'lik mikrosantrifuj tüpü içerisine 20 µl proteinaz yüklendi.
2. Proteinaz içeren tüpe 200 µl PBS içinde resüspanse edilmiş sperm hücreleri eklendi.
3. Tüpe 200 µl AE tamponu eklendi ve vorteks ile 15 saniye karıştırıldı.
4. Karıştırım sıcak su banyosunda 56 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. Inkübasyon sonrası minifujde spin yapılarak çeperde toplanan damlaların çökmesi sağlandı.
6. Tüpe 200 µl % 100 etil alkol eklendi. 15 saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra tekrar spin yapıldı.
7. Karıştırım toplama tüpüne yerleştirilmiş olan steril kolonlara aktarılarak 8000rpm'de 1 dakika santrifuj yapılarak toplama tüpü de iştirildi.
8. Kolona 500 µl AW1 yıkama tamponu eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifuj yapıldı ve toplama tüpü de iştirildi.
9. Kolona 500 µl AW2 yıkama tamponu eklenerek 13000 rpm'de 4 dakika santrifuj yapıldı.
10. Yıkama tamponunun tamamen uzaklaştırılması için tekrar maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapıldı.
11. DNA'yı elde etmek için steril ve numaralandırılmış 1,5 ml'lik eppendorf tüplere alınan kolonun tam merkezine 50 µl AE elüsyon tamponu damlatıldı ve tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletildi.
12. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
13. Son kez 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak filtredeki DNA'nın tüpe alınması sağlandı.
14. Bir sonraki aşamaya kadar DNA içeren tüpler -20 °C'de saklandı.

DNA Miktar Tayini

Bisülfid modifikasyonuna geçilmeden DNA konsantrasyonu ölçüldü. Modifikasyon için kullanılacak DNA miktarları tespit edildi. Bu amaçla, Multiskan GO spektrofotometre (ThermoFisher Scientific) µDrop plate ile 260, 280 ve 230 nm'de spektrofotometrik ölçümler alınarak çift zincir DNA konsantrasyonu ve DNA saflığı ölçüldü. Bu aşamada DNA'yı kolondan ayrı tırp elde etmek için kullanılan AE tamponu kör olarak okutuldu.

3.2.4. zole Edilen DNA'ların Bisülfıt Modifikasyonu

MSP öncesinde bilimsel çalı malarla ba arısı desteklenmi ticari bir kit ile (EZ DNA, Zymoresearch, USA) bisülfıt modifikasyonu yapıldı. Bu modifikasyon, metillenmemi sitozinlerin urasile dönü ümünü sa lamaktadır (ekil 6). Modifikasyon sonrası, metillenmi sitozinlerde herhangi bir de i iklik olmaz ve böylece MSP sonrası metilenmi ve metillenmemi diziler ayırt edilebilir. Çalı mada DNA'ların bisülfıt modifikasyonu için 200-500 ng DNA ve pozitif kontrol olarak *in vitro* metillenmi DNA (IVD), Negatif kontrol olarak, *BRCA1* ve *BRCA2* geni için metillenmemi oldu u tespit edilmi insan DNA'sı ve null olarak da su kullanıldı.

Bisülfıt modifikasyonuna ba lamadan önce CT dönü üm reaktifi ve yıkama tamponu kitin protokolüne uygun ekilde a a ıdaki gibi hazırlandı. Modifiye edilmi DNA'lar PCR i leminde kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

Protokol:

1. Numaralandırılmı steril 0,5ml'lik PCR tüplerine 250 ng DNA ve 5µl M-Dilution tampon eklendi ve hacim su ile 50 µl'ye tamamlanarak pipetaj yardımıyla iyice karı tırıldı.

2. Tüpler, 37°C etüvde 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve bu sırada CT Dönü üm reaktifi hazırlandı.

CT Dönü üm Reaktifinin hazırlanı ı: Reaktifin bulundu u ı ık geçirmez kahverengi tüpe 750µl DNAz RNAz içermeyen su ve 210 µl M-Dilüsyon tampon eklenerek 10 dakika boyunca vortex yardımıyla karı tırıldı.

3. 37°C'den alınan tüplere hazırlanan reaktiften 100'er µl eklendi ve karı tırıldı. Bu i lemin karanlıkta yapılmasına dikkat edildi.

4. Karı ım tüpleri etüve alınarak 50°C'de karanlıkta gece boyu (12-16 saat) bekletildi.

5. Sabah etüvden alınan örnekler buz içerisinde 10 dakika buzla temas edecek ekilde inkübasyona bırakıldı.

6. Numaralandırılmı kolonlar toplama tüpüne takılarak içine 400µl M-Binding tamponu yüklendi.

7. M-Binding tampon yüklenmi kolonların üzerine inkübe edilen örnekler eklenerek tüplerin 15 saniye kadar ters-düz edilmesi suretiyle karı tırılması sa landı.

8. 10000 xg maksimum hızda (10000 xg) 30 saniye santrifuj yapılarak toplama tüpü yenilendi.

9. Kolona 100 µl M-Yıkama tamponu yüklendi ve 30 saniye maksimum hızda santrifuj yapıldı.

10. 200 µl M-Desülfonasyon tamponu yüklenen kolonlar en az 20 dakika oda sıcaklığı nda inkübe edildi.

11. inkübasyon sonunda maksimum hızda 30 saniye santrifuj yapıldı.

12. Kolonlara 200 µl M-Wash tampon yüklendi ve maksimum hızda 30 saniye santrifuj yapıldı.

13. Yıkama işlemi 200 µl M-wash tampon ile 30 saniye maksimum hızda santrifuj yapılarak tekrarlandı ve ardından herhangi bir tampon eklenmeden tekrar 30 saniye daha maksimum hızda santrifuj yapılarak yıkama tamponunun tamamen uzaklaştırılması sağlandı.

14. Steril ve numaralandırılmış Eppendorf tüplere yerleştirilen kolonların tam ortasına 11µl M-elution tampon yüklendi ve 20 dakika oda sıcaklığı nda bekletildi.

15. inkübasyonun ardından tüpler maksimum hızda 30 saniye santrifuj edilerek modifiye edilmiş DNA'nın elue edilmesi sağlandı.

16. Ürünler PCR yapılana kadar kısa süre için +4 °C'de, uzun süre için -20 °C'de saklandı.

3.2.5. Metilasyona-Spesifik PCR

Bisülfid modifikasyonu sonrasında biri metilasyona spesifik primer kullanılarak diğeri ise metilasyona spesifik olmayan primerler kullanılarak iki farklı reaksiyon yapıldı.

Reaksiyon, önceki çalışmalarından edinilen deneyimler doğrultusunda (Yeşil ve ark., 2013) standardize edildi. PCR için pozitif kontrol olarak tam olarak metillenmiş insan DNA standardı IVD, negatif kontrol olarak ise deiyonize su (ddH₂O) kullanıldı.

Kullanılan Primerler

1. *BRCA1* geni için metilasyona spesifik primer çiftleri: 5'-F: TCG TGG TAA CGG AAA AGC GC-3' ve 5'-R: AAA TCT CAA CGA ACT CAC GCC G-3';

2. *BRCA1* geni için metilasyona spesifik olmayan primer çiftleri 5'-F: TTG GTT TTT GTG GTA ATG GAA AAG TGT-3' ve 5'-R: CAA AAA ATC TCA ACA AAC TCA CAC CA-3' (Esteller ve ark., 2000).

3. *BRCA2* geni için ise metilasyona spesifik primer çiftleri: 5'-F: GAC GGT TGG GAT GTT TGA TAA GG-3' ve 5'-R: AAT CTA TCC CCT CAC GCT TCT CC-3';

4. *BRCA2* geni için metilasyona spesifik olmayan primer çiftleri: 5'-F: AGG GTG GTT TGG GAT TTT TAA GG-3' ve 5'-R: TCA CAC TTC TCC CAA CAA CAA CC-3' (Hilton ve ark., 2002).

Ço altılan Bölgeler

Kullanılan primerler ile a a da ilgili gen bölgelerinin metillenmi ve metillenmemi olması durumunda FASTAformatında verilen dizilerde sarı ile i aretli bölgelerin ço altılması sa landı. Altı çizili olan diziler primer ba lanma bölgeleri, sarı ile i aretli alanlar ço altılan hedef bölgeyi göstermektedir.

BRCA1 metillenmi : 75bç

```
1441 gagccccgag agacgcttgg ctctttctgt ccctcccatc ctctgattgt accttgattt
1501 cgtattctga gaggctgctg cttagecggta gcccttgggt ttccgtggca acggaaaagc
1561 gcggaatta cagataaatt aaaactgcga ctgcgggcg tgagctcgt gagacttcct
1621 ggacggggga caggctgtgg ggtttctcag ataactgggc ccctgcgctc aggaggcct
```

BRCA1 metillenmemi : 86 bç

```
1441 gagccccgag agacgcttgg ctctttctgt ccctcccatc ctctgattgt accttgattt
1501 cgtattctga gaggctgctg cttagecggta gcccttgggt ttccgtggca acggaaaagc
1561 gcggaatta cagataaatt aaaactgcga ctgcgggcg tgagctcgt gagacttcct
1621 ggacggggga caggctgtgg ggtttctcag ataactgggc ccctgcgctc aggaggcct
1681 caccctctgc tctgggtaaa ggtagtagag tcccgggaaa gggacagggg gcccaagtga
```

BRCA2 metillenmemi : 337 bç

```
54481 tttcataggt cccaggctgt gtcccagggt cgcaccacca aacatgagct ggagcaaaaa
54541 gaaagggatg ggggacttgg agtaggcata ggggcgccc ctccaagcag ggtggcctgg
54601 gactcttaag ggtcagcgag aagagaacac acactccagc tcccgcttta ttcggtcaga
54661 tactgacggt tgggatgcct gacaaggaat ttcctttcgc cacactgaga aatacccgca
54721 gcggcccacc caggcctgac ttccgggtgg tgcgtgtgct gcgtgtcgcg tcacggcgtc
54781 acgtggccag cgcgggcttg tggcgcgagc ttctgaaact aggcggcaga ggcggagccg
54841 ctgtggcaact gctgcgcctc tgctgcgcct cgggtgtctt ttgcggcggg gggtcgccgc
54901 cgggagaagc gtgaggggac agatttgtga cggcgcgggt ttttgtcagc ttactccggc
54961 caaaaaagaa ctgcgcctct ggagcgggtt agtgggtggtg gtagtgggtt gggacgagcg
```

BRCA2 metillenmi : 250 bç

```
54601 gactcttaag ggtcagcgag aagagaacac acactccagc tcccgcttta ttcggtcaga
54661 tactgacggt tgggatgcct gacaaggaat ttcctttcgc cacactgaga aatacccgca
54721 gcggcccacc caggcctgac ttccgggtgg tgcgtgtgct gcgtgtcgcg tcacggcgtc
54781 acgtggccag cgcgggcttg tggcgcgagc ttctgaaact aggcggcaga ggcggagccg
54841 ctgtggcaact gctgcgcctc tgctgcgcct cgggtgtctt ttgcggcggg gggtcgccgc
54901 cgggagaagc gtgaggggac agatttgtga cggcgcgggt ttttgtcagc ttactccggc
54961 caaaaaagaa ctgcgcctct ggagcgggtt agtgggtggtg gtagtgggtt gggacgagcg
```

Reaksiyon Karı ımı:

Reaksiyon karı ımı, örnek ba ına toplam 25µl'lik hacimde a ıdaki gibi hazırlandı.

1. 1X PCR tamponu
2. 0,25 mM dNTP karı ımı (Zymo research, ABD)
3. 0,5 mM primer leri
4. 0,5 mM primer Geri
5. 2 unite Taq Polimeraz (Zymo research, ABD)
6. Su
7. 2 µl (Yakla ık 5-10 ng) bisülfite modifiye DNA

Reaksiyon Ko ulları

BRCA1 geni için metilasyona spesifik ve metilasyona spesifik olmayan primerlerle ayrı ayrı olmak üzere her iki reaksiyon için de a ıda belirtilen aynı ko ullar uygulandı. Ancak, *BRCA2* geninin amplifikasyonunda metilasyona spesifik ve metilasyona spesifik olmayan primerlerle yapılan reaksiyonların birle me sıcaklıkları farklı oldu u için ayrı reaksiyonlar kuruldu.

BRCA1 Metillenmi ve Metillenmemi bölge spesifik reaksiyon ko ulları:

94°C'de →4 dakika	}	38 döngü
94°C'de →30 saniye		
54°C'de → 45 saniye		
72°C'de →45 saniye		
72°C'de →5 dakika		

BRCA2 Metile Spesifik Reaksiyon Ko ulları:

94°C'de →5 dakika	}	40 döngü
94°C'de →30 saniye		
62°C'de → 30 saniye		
72°C'de →30 saniye		
72°C'de →7 dakika		

BRCA2 Metillenmemi bölge Spesifik:

94°C'de →5 dakika
94°C'de →30 saniye
56°C'de → 30 saniye
72°C'de →30 saniye
72°C'de →7 dakika

} 40 döngü

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

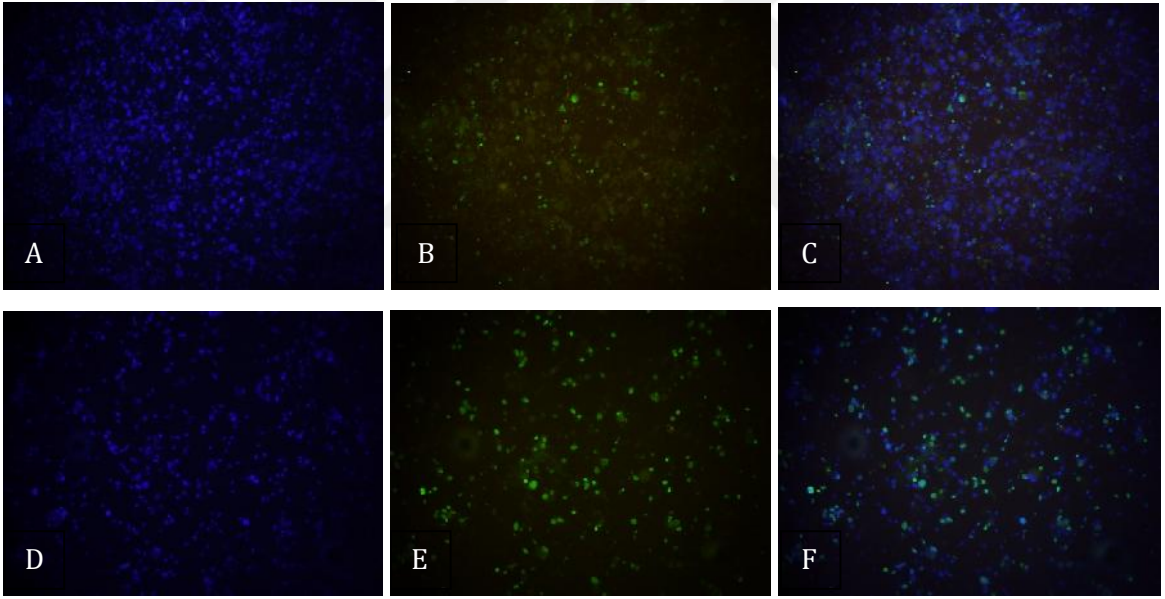
Metillenmi ve metillenmemi bölgeye spesifik primerlerle yapılan reaksiyonlarda amplifikasyon olup olmasına göre de erlendirme yapıldı. Bu amaçla Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponunda %0,1 Etidyum Bromür (EtBr) ile hazırlanmış %2'lik agaroz jel kullanıldı. Kuyucuklara yükleme boyası ile birlikte 30 µl PCR ürünü, negatif ve pozitif kontroller ile bir kuyucu a DNA standartı olarak kullanılan ve farklı uzunluklarda hazır DNA içeren belirteç (GenerULER 50bp Ladder, Thermo Fisher Scientific, ABD) yüklendi. 130 voltteki elektrik akımında 1 saat yürütüldükten sonra bantlar VILBER LOURMAT Quantum Jel görüntüleme sisteminde UV altında görüntülendi ve CAPT yazılımı ile bilgisayar ortamına aktarılarak analiz edildi. Metile primerin kullanıldığı reaksiyonda kuvvetli bir bantın olması, burada reaksiyon gerçekleştiğini ve genelde metilasyon olduğunu gösterdi.

3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadan elde edilen verilerin analizi istatistiksel paket programı SPSS kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıp dağılımadığı test edildikten sonra parametreler arasındaki asosiasyon X^2 veya Fisher exact test kullanılarak değerlendirildi. Farklı grupların parametrelerini karşılaştırmak için ANOVA, Mann-Whitney U testi ve kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel yöntemlerle değerlendirilerek hipoteze uygunluk bakımından test edildi.

4. BULGULAR

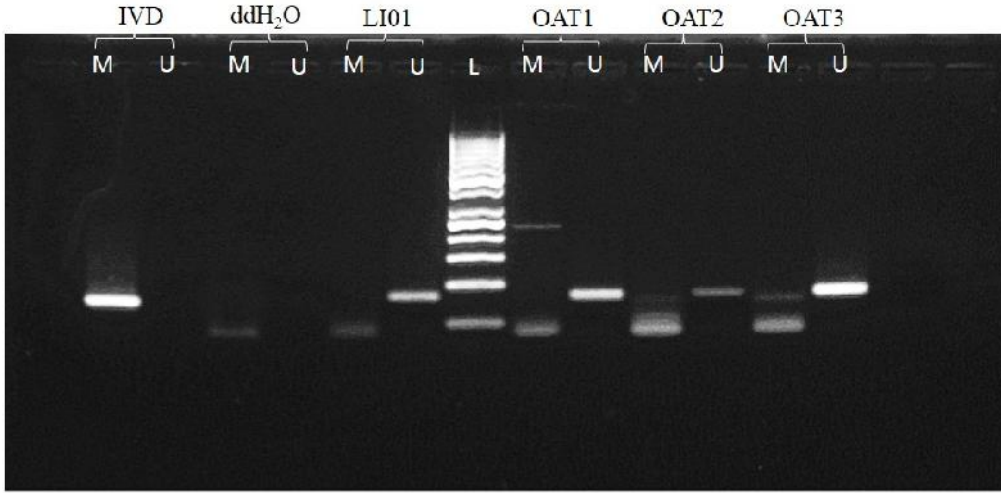
Tez çalıması kapsamında, 2012-2016 yılları arasında yaşları 23-47 arasında değişen 135 bireyden semen örneği alınmıştır. Bu semenlerden hazırlanan bazı örneklerin kontamine olması ve bazı hastalarda da yuvarlak spermatid sayısının çok yüksek olması dolayısıyla yanıltıcı sonuçlar elde edilebileceğinden sadece 79'unda TUNEL Testi ile SDF ölçülmüştü (ekil 10) ve bu bireyler çalımaya dahil edilmiştir. Çalıma grubundaki 79 bireyin altısı normozoospermik (NS), geri kalan 73 birey, idiyopatik \pm oligo \pm astheno \pm terato-zoospermiktir (IP). Normozoospermik bireylerden ikisi infertilite ikayetiyle kliniğe başvurmuş ancak kadın faktörü belli değildir. Kalan dört normozoospermik birey genç ve sağlıklı erkekler olup fertilité durumu belli değildir. Belirtilen iki temel grup için yaşlar farklılık göstermemiştir (T - testi, $t=-1,94$, $df=77$, $p=0,056$).



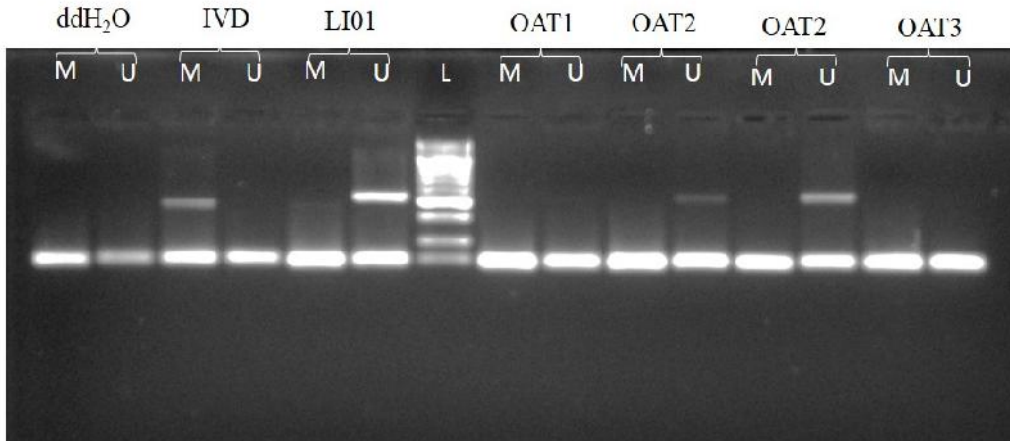
ekil 10. TUNEL FITC-DAPI görüntüsü. Mor renkli hücreler DAPI ile boyanmış hücrelerdir. Yeşil ile boyanmış hücreler, DNA'daki kırıkları boyayan FITC pozitif hücrelerdir (A: SDF oranı düşük (%15,6) olan bir örnekte (OAT63) DAPI ile boyanmış hücreler, B: A'daki preparatın uygun filtre ile FITC boyanmış hücreleri C: A ve B'nin örtülmüş (merge) görüntüsü. D: SDF oranı yüksek (%28,1) olan bir örnekte (OAT67) DAPI ile boyanmış hücreler, E: D'deki preparatın uygun filtre ile FITC boyanmış hücreleri F: D ve E'nin örtülmüş (merge) görüntüsü. 1X40 büyütme.

SDF ölçümü yapılan 79 bireyde yapılan moleküler çalımlar sonucunda, 64'ünün *BRCA1*, 56'sının *BRCA2* metilasyon durumu değerlendirilebilmiştir. *BRCA1* geni için yapılan MSP (ekil 11) sonuçlarına göre, 64 örneğin 44'ü (%68,75) metillenmiştir.

iken, 20'sinin (%31,25) metillenmemi oldu u görüldü. *BRCA2* geni için yapılan MSP (ekil 12) sonuçlarına göre ise 56 örne in 18'i (% 32,14) metillenmi , 38'i (% 67,86) metillenmemi olarak de erlendirildi. Ortak verisi olan 56 bireyin 31'inde (%55,36) genlerden biri metillenmi ken di eri metillenmemi , 14'ünde (%25) her iki genin de metillenmi ve 11 bireyde (%19,64) her iki genin de metillenmemi oldu u saptanmı tır.



ekil 11. *BRCA1* geni için MSP sonrası agaroz jel elektroforezi. Pozitif kontrol olarak in vitro metillenmi insan DNA'sı (IVD) Negatif kontrol olarak M: Metillenmi , U: Metillenmemi L: 50bç'lik leader. Metillenmi örnekler 75 bç, metillenmemi olanlar 86 bç. uzunluktadır.



ekil 12. *BRCA2* geni için MSP sonrası agaroz jel elektroforezi. Pozitif kontrol olarak in vitro metillenmi insan DNA'sı (IVD) Negatif kontrol olarak M: Metillenmi , U: Metillenmemi L: 50bç'lik leader. Metillenmi örnekler 250 bç, metillenmemi olanlar 337 bç. uzunluktadır.

Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde SDF, %6,7 ile %38,9 arasında değişmekte olup ortalama, %31,5'tir (Tablo3). NS ve OAT grupları arasında SDF güçlü bir şekilde farklılık göstermektedir (T - testi, t=-3,70, df=77, p<0,001).

Tablo 3. Tanımlayıcı istatistiksel veriler

Değişkenler	N	Min-Max	Ortalama	Std. Hata
Yaş	79	23-47	31,5	0,61
SDF	79	6.7-38,9	21,79	0,86
Volüm	79	1-8	2,93	0,13
Konsantrasyon	79	0.5-48,0	7,64	1,01
Motilite	79	2-65	29,29	1,81
Morfoloji	79	0-8	2,95	0,22
Vitalite	59	12-56	40,17	1,40

IP'leri kendi içinde astheno (A), oligo (O), oligoterato (OT), oligoastheno (OT) ve oligoasthenoteratozoospermik (OAT) olarak farklı gruplara ayrılarak da SDF açısından değerlendirildi (Tablo 4).

Tablo 4.Çalışma gruplarına göre SDF'nin durumunu gösteren tanımlayıcı veriler (N: Normozoospermik, A: Asthenozoospermik, O: Oligozoospermik, OA: Oligoasthenozoospermik, OT: Oligoteratozoospermik, OAT: Oligoasthenoteratozoospermik bireyler).

Gruplar	N (%)	Min-Max	Ortalama	Std. Hata
N	6 (7,6)	6,7-229	11,20	2,44
A	2 (2,5)	22,7-28,1	25,4	2,7
O	11 (13,9)	9-33,5	17,66	2,27
OA	5 (6,3)	20,5-36,8	26,29	2,81
OT	3 (3,8)	12,7-27,8	19,99	4,37
OAT	52 (65,8)	10,4-38,9	23,14	0,98

Kısaltmalar: N, Normozoospermik; A, Asthenozoospermik; O, Oligozoospermik; OA: Oligoasthenozoospermik; OT, Oligoteratozoospermik; OAT, Oligoasthenoteratozoospermik bireyler.

Semen parametrelerine göre SDF de erlendirildi inde, SDF'nin konsantrasyon, motilite ve morfoloji üzerinde önemli etkisi oldu u görüldü (Tablo 5). Sigara kullanım verileri istatisti e dahil edildi inde hiçbir parametreyle ili kili bulunamadı ı için tabloda yer verilmemi tir.

Tablo 5.SDF'nin semen parametreleriyle ve ya la olan ili kisi. Yalnızca Ya ve SDF normal dağılım gösterdiği için diğer parametreler, Spearman's rho korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

Değişkenler	Ya	SDF	Volum	Konsantrasyon	Motilite	Morfoloji	Vitalite
Ya * (79)							
SDF*(79)	r=0,13 p=0,240						
Volum(79)	r=0,09 p=0,454	r=0,20 p=0,074					
Konsantrasyon(79)	r=-0,10 p=0,378	r=-0,24 p=0,034	r=-0,10 p=0,394				
Motilite(79)	r=-0,27 p=0,017	r=-0,25 p=0,024	r=0,14 p=0,230	r=0,34 p=0,002			
Morfoloji(79)	r=-0,14 p=0,208	r=-0,24 p=0,030	r=-0,02 p=0,876	r=0,49 p<0,001	r=0,66 p<0,001		
Vitalite (59)	r=-0,04 P=0,741	r=0,07 p=0,610	r=0,10 p=0,436	r=0,28 p=0,032	r=0,96 p<0,001	r=0,39 p=0,002	

*Pearson Cor.

SDF üzerinde *BRCA1*, *BRCA2* ve her iki genin birlikte etkileiminin etkili olma durumları Genelleştirilmiş lineer Mixed Model (GLMM) analizi ile kontrol edildi. Bu analizde hastalar random faktör, genler ve her iki genin birlikte etkileimini fiksed faktör olarak analize dahil edilmiştir (Tablo 6). Bütün gruplar birlikte değerlendirildi inde metilasyonun SDF üzerinde bir etkisi olmadığı görüldü. Ancak, normozoospermik

bireyleri çalışmada bırakarak OAT grubu içerisinde bu testi uyguladığımızda *BRCA1* geni metilasyonunun SDF ile negatif yönde bir ili kisi olduğu görüldü.

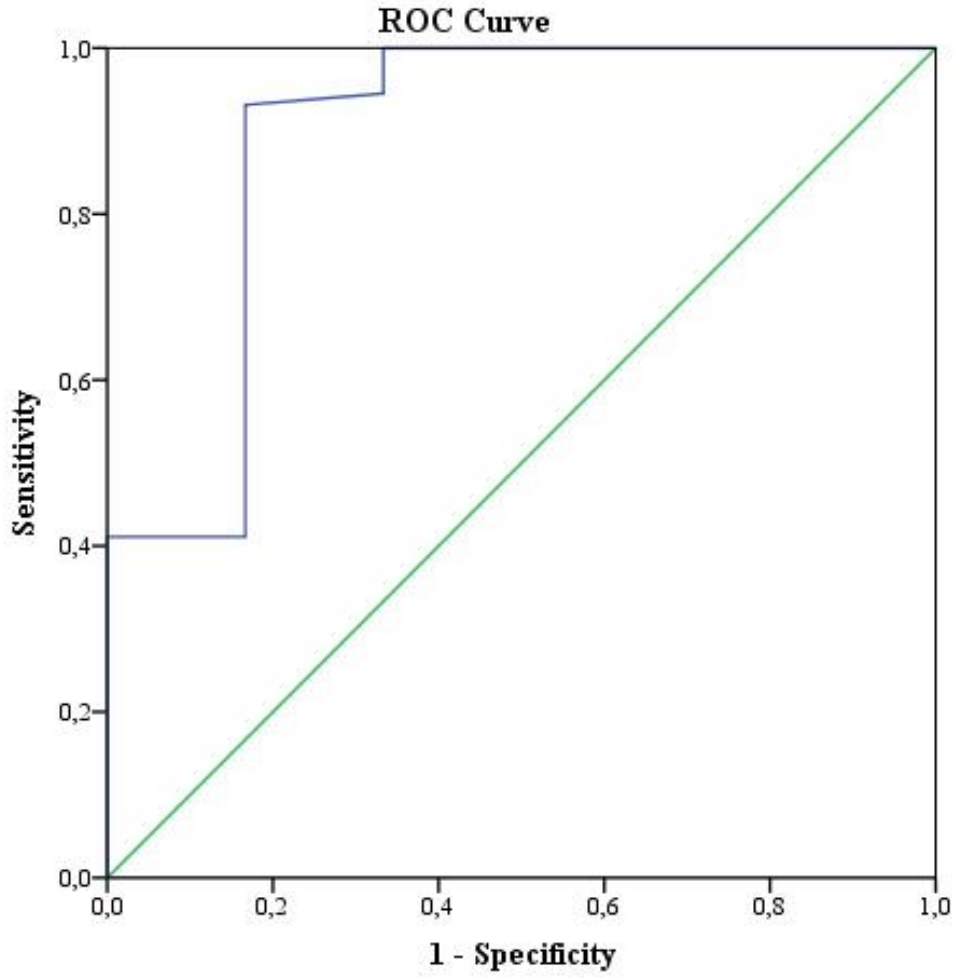
BRCA1 ve *BRCA2* genleri metilasyonu açısından semen parametreleri arasında herhangi bir fark görülmedi (T - test, sırasıyla $t=-1,65$, $df=62$, $p=0,103$; $t=0,86$, $df=54$, $p=0,396$).

Tablo 6. SDF ile *BRCA1* ve *BRCA2* genleri metilasyonunun ili kisi (GLMM Modeli).

Faktörler	Varyasyon katsayısı		Standart hata		t		p	
	N+OAT	OAT	N+OAT	OAT	N+OAT	OAT	N+OAT	OAT
Model	28,81	26,63	6,24	5,78	3,98	4,62	<0,001	<0,001
<i>BRCA1</i> (M)	-4,71	-5,61	2,78	2,66	-1,70	-2,11	0,094	0,039
<i>BRCA2</i> (M)	-0,89	-2,7	4,53	4,20	-1,20	-0,64	0,845	0,523
<i>BRCA1</i> * <i>BRCA2</i>	2,25	-0,70	5,21	6,04	0,74	-0,12	0,461	0,908

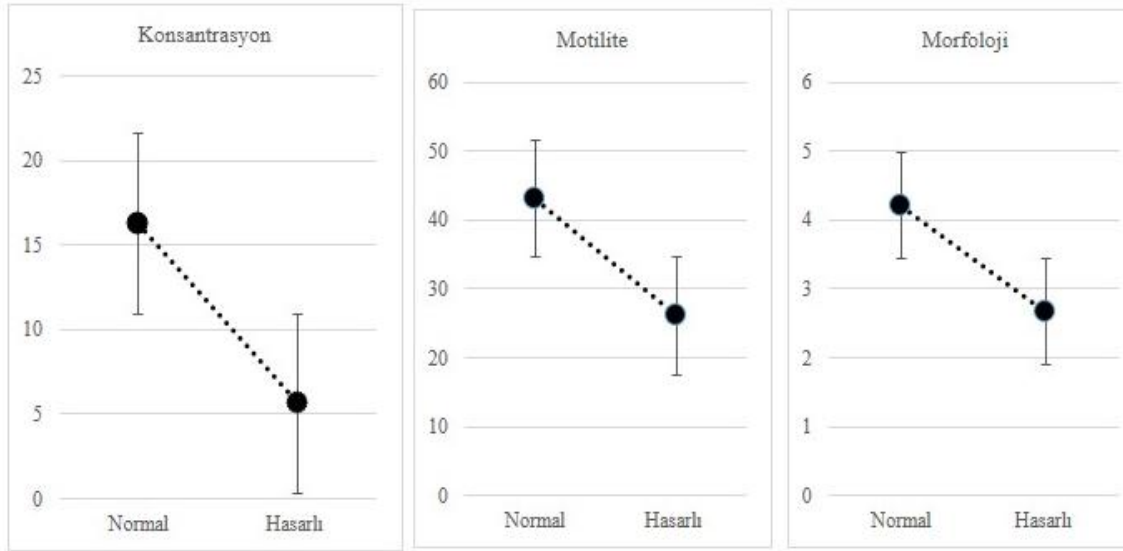
Kısaltmalar: N: Normozoospermik OAT: \pm Oliogo \pm Astheno \pm Terato-zoospermik

Testleri daha anlamlı kılmak üzere, belirli bir SDF oranının “hasarlı” olarak değerlendirilebilmesi için bir e ik de eri tespit etmek amacıyla ROC analizi yapıldı (ekil 13). Testin özgüllü ü (0,86) ve duyarlılı ı (0,83) de erlendirildi inde, SDF için e ik de eri (cut-off point) %12,95 olarak belirlendi. Bu e ik de erin altında SDF gösterenler “Normal”, üstünde SDF gösterenler “Hasarlı” olarak kabul edilmiştir. Bu gruplar arasında *BRCA1* ve *BRCA2* genleri metilasyonu açısından bir ili ki bulunamadı (sırasıyla Pearson Chi-square; *BRCA1*, $p= 0,884$; *BRCA2*, $p=0,199$). *BRCA1* metilasyon verileri olan 64 bireyden hasarlı olanların % 69,1’i (38 birey) metillenmi durumda iken normal kabul edilen bireylerin %9,4’ü (6 birey) metillenmi durumdadır. *BRCA2* metilasyon verileri olan 56 bireyden normallerin %12,5’i (1 birey) metile iken hasarlı grupta bireylerin %30,4’ü (17 birey) metillenmi olarak bulundu.



ekil 13. SDF testinin ROC e risi.

ROC e risine göre hasarlı ve normal grup semen parametreleri bakımından karşılaştırıldı. İnce hasarlı ve normal sperme sahip birey grupları arasında yaş faktörü etkili değildir (Kruskal Wallis testi, $p= 0,226$). Semen parametrelerinden volüm ve vitalite hasarlı ve normal gruplar arasında farklılık göstermemi ken konsantrasyon, motilite ve morfoloji iki grup arasında önemli derecede farklı olduğu görülmüştür (Kruskal Wallis testi sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,001$; $p=0,009$) (ekil 14).



ekil 14. Hasarlı ve normal grupta semen parametreleri arasındaki fark.

Normozoospermik grupta e ik de ere göre “hasarlı” kabul edilen uç de er (28,1) çıkarılarak yapılan linear regresyonda SDF ile volüm arasındaki pozitif ($R^2= 0.74$, $n=5$), motilite arasındaki negatif ili ki ($R^2 = -0,39$, $n=5$) dikkat çekicidir.

5. TARTI MA

Genetik ve epigenetik de i iklikler, infertilitenin önemli nedenleri arasındadır. diyopatik olgularda etiyojisi, ya , post testiküler organların fonksiyonu, infektif ajanlar, genetik faktörler, mitokondri yapısı, hormonal farklılıklar ve çevresel kirlilikten etkilenebilmektedir. Hastalı n patogeneğinde, artan reaktif oksijen türleri ve apoptoz süreci oldukça önemlidir (Cavallini, 2015).

SDF, hastalı n etiyojisini anlamada ve konsepsiyon ba arısını artırmada önemli bir belirteçtir (Evgeni ve ark., 2014). Tez çalı masından elde edilen bulgular, önceki çalı maları büyük ölçüde destekler niteliktedir. nfertilitenin karma ık etiyojisinden dolayı, olgularının önemli bir kısmında asıl neden bilinmemektedir. Çalı mamızda, TUNEL Testi ile analiz edilen SDF'nin sperm kalitesini önemli ölçüde etkiledi i görülmektedir.

Alshahrani ve arkadaş ları tarafından yapılan çalı mada 40 ya üstü erkeklerde SDF'nin önemli ölçüde arttı ı sonucuna ula mı tır (Alshahrani ve ark., 2014). Bir ba ka çalı mada, ya ortalaması 36 ve 39 arasında de i en farklı gruplarda akım sitometri ile yapılan TUNEL teste “brighter SDF” olarak tanımlanan görece hafif SDF'nin ise ya tan ve semen parametrelerinden ba ımsız oldu u ve bu orana sahip hücrelerin canlılı nı korudu u için infertilite de erlendirmesinde önemli bir yeri oldu u vurgulanmı tır (Muratori ve ark., 2015a). Tez çalı masında, SDF'nun ya ile anlamlı bir ili kisi bulunmamı tır. Bu sonuçta, hastaların ya gruplarının birbirine oldukça yakın olmasının etkili olmu olabilece i dü ünülmektedir. Ayrıca, bu durum SDF'nin artı nda farklı toplumlarda ve kültürlerde çevresel faktörlerdeki farklılıkların ve ya a ba lı olarak olumsuz etkilenmesinde hangi ya aralı nın daha belirleyici oldu u konusunun oldukça varyasyonel olabilece i ekinde açıklanabilir. Öyle ki, ya , obezite, cep telefonu radyasyonu ve mesleki stresin sperm DNA hasarı üzerinde belirgin bir etkisi oldu u gösterilmi tir (Radwan ve ark., 2016).

leri ya yanı sıra çevresel toksinler ve kirleticiler, ilaçlar, kemoterapi veya radyasyon, ate li hastalık, varikosel, ve sigara kullanımı SDF'yi artırabilecek faktörler olarak önerilmi tir (Agarwal ve ark., 2016). Sigara kullanımının ROS'un olu umuna, epigenetik yollarla gen ifadesinde de i ikliklere ve germ hücrelerinin apoptozuna neden olması sebebiyle infertilite riskini artıraca ı dü ünülmektedir (Esakky ve Holey, 2016).

Yapılan bir meta analizde sigara kullanma, azalmı sperm sayısı, motilite ve morfoloji ile ili kili bulunmu tur (Sharma ve ark., 2016). Bir ba ka çalı mada, günde 10 sigaradan fazla içen gruptaki erkeklerde sperm motilitesinin sigara içmeyenlere göre anlamlı olarak azaldı ı gözlenmi tir. Ayrıca bu grupta, be yıldan daha kısa süredir sigara içen bireylerin semen parametrelerinde sigara içilmeyen grup ile kıyaslandı nda anlamlı bir fark gözlenmezken, 5-10 yıldır sigara içenlerin oldu u grupta spermlerin progresif motilitesinde belirgin azalmalar oldu u görülmü tür. On yıldan uzun süre sigara içenlerde ise semen konsantrasyonu, sperm sayısı ve motilitenin azaldı ı belirlenmi tir. Çalı mamızda sigara kullanan ve kullanmayan bireylerde SDF bakımından anlamlı bir fark olmamasının, hastaların sigara kullanım süresi ve sıklı ı hakkında yeterli veriye ula ılamaması ile ili kilidir. Toplumsal baskılar nedeniyle sigara ve alkol kullanımı gibi bilgilerin çok do ru elde edilemeyece i durumu göz önünde bulundurulmalıdır. Öyle ki semen örne i alınan bireylere uygulanan ankette katılımcıların hepsi alkol kullanmadı nı söylemi tir. Aynı zamanda bu ili kinin görülmemesi bu gruptaki bireylerde SDF'nin oksidatif stresten ziyade genetik mekanizmalarla da kontrol ediliyor olabilece ini dü ündürmelidir.

ROS, semen kalitesi ile ili kilidir ve ROS testlerinin idiyopatik infertilitesi olan hastalarda kullanılması önerilmektedir (Agarwal ve ark., 2014a). Sonuçlara göre semen volümü artı ı ile SDF arasında istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da pozitif yöndeki e ilim ($p=0,074$) semende artımı ROS'un bir ölçüde SDF'na neden olabilece i dü ündürmektedir. Yapılan çalı malar, %13 seviyelerine kadar "normal" olarak kabul etti imiz SDF'nin, semende do al olarak bulunan ROS olabilece ini dü ündürmektedir (Agarwal ve Majzoub,2017).

Son on yılda, anormal sperm morfolojisi ile DNA hasarının ili kili oldu unu gösteren birçok çalı ma yapılmı tir. Farklı semen parametrelerine göre gruplanmı , ya ları 20-40 arasında de i en 500'den fazla bireyin dahil edildi i çalı mada SDF ile sperm motilitesi, morfolojisi ve canlılı ının negatif yönde kuvvetli ili kisi gösterilmi tir (Varshini ve ark., 2012). Brahem ve arkadaş ları (2012) yaptıkları çalı mada büyük ba lı ve çok kuyruklu sperm olan örneklerde daha yüksek oranda DNA hasarı tespit etmi lerdir. Akridin turuncusu (Acridine orange, AO) ile tespit edilen sperm DNA hasarının bütün semen parametreleriyle ili kili oldu u, en kuvvetli etkinin de motilite ve morfoloji üzerinde oldu u dikkat çekicidir (Liu ve ark., 2013). Ancak, ba ka bir çalı mada

astenozoospermik olgularda, oligo- ve teratozoospermik olgulara göre istatistiksel olarak daha yüksek SDF saptanmışken anormal morfoloji ile SDF arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (Belloc ve ark., 2014b). Çalışmamızda, elde ettiğimiz bulgulara göre SDF en güçlü negatif ilişkiyi motilite üzerinde gösterirken morfoloji ve sperm konsantrasyonunun da önemli ilişkisi bu verilerle büyük ölçüde örtüşmektedir ve sperm konsepsiyon potansiyelini gösteren en anlamlı parametre olan spermatozoa morfolojisinin oksidatif denge ile arasında direkt bir ilişki olduğu savı (Agarwal ve ark., 2014b) da bulgularımızca desteklenmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, spermde herhangi bir şekilde meydana gelen DNA hasarının sperm parametrelerini etkileyebilecek şiddet ve infertiliteye neden olabileceği görülmektedir.

Çalışma grubumuz içerisinde kadın faktörü tanımlanmamış ve fertilité ikayeti olan bir normozoospermik birey yüksek SDF (%28,1) göstermiştir. Belloc ve arkadaşları (2014a) tarafından yapılan bir çalışmada normozoospermik bireyler içerisinde küçümsenmeyecek bir oranın (%5) yüksek SDF taşıdığını göstermiştir. Normozoospermik bireylerdeki durum, Simon ve arkadaşlarının (2014) çalışmasıyla detaylandırılmıştır. Grubun elde ettiği verilere göre, yardımcı üreme tekniklerinden yararlanan çiftlerde erkeklerin %59'u normozoospermiktir ve bireylerin COMET testine göre %24'ünde, TUNEL testine göre %40'ında yüksek sperm DNA hasarı vardır (Simon ve ark., 2014). Bungum ve arkadaşları (2011), idiyo patik infertilitenin %40'ının artmış DNA hasarı ile ilişkili olabileceğini ve SCSA ile ölçülen DNA fragmentasyon indeksinin (DFI) %30'dan büyük olan hastaların doğrudan IVF / ICSI tedavisine yönlendirilmesi gerektiğini öngörmektedir.

Yardımcı üreme tekniklerindeki başarıda da sperm DNA kalitesinin önemi tartışılmazdır. Yüksek SDF seviyelerinin, embriyonun blastosist evresine ulaşması için geçen zaman ile korelasyon gösterdiği ve ICSI prosedürüyle gebelik elde etme olasılığını ve embriyo gelişim dinamikleri, dolayısıyla da gebelik sonuçlarını olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Wdowiak ve ark., 2015). Bareh ve arkadaşları (2016) açıklanamayan tekrarlı düşüklerde erkeklerin kontrol grubuna göre oldukça yüksek sperm DNA hasarı olduğunu belirtirken aynı şekilde, Simon ve arkadaşları (2017) tarafından yardımcı üreme tekniklerinden yararlanan çiftlerin başarısında, düşük sperm DNA hasarının olumlu etkisi olduğu doğrulanmıştır.

Geni kapsamlı derlemelerinde, Gunes ve arkadaşları (2016) spermatozoa'daki epimutasyonların, oligozoospermi, anormal sperm morfolojisi ve azalmı ilerleyici hareketlilik ile ilişkili olabileceğini de inmiştir. Genom çapında demetilasyon ve remetilasyon süreci, germ hattında meydana gelir (Gunes ve ark., 2016). Erkek germ hücrelerinde, remetilasyon, prenatal mitozdan sonra başlatılır ve postnatal pakitte tamamlanır (Kuhtz ve ark., 2014). Sperm DNA'sının ve epigenetik bütünlüğün semen parametreleriyle birlikte değerlendirilmesi infertilite olgularında daha iyi tanı ve prognostik değer sağlayabilir. Bu dünceden yola çıkılarak varikoselli hastalarda yapılan çalışmada, varikoseli olan bireylerde semen parametrelerindeki düşüklüğün yanı sıra bu kişilerde ROS pozitif, protamin eksikliği olan, DNA hasarı yüksek spermlerin oranının daha çok, spermde global DNA metilasyonunun daha düşük olduğu gösterilmiştir (Bahrenian ve ark., 2015). Araştırmacılar, SDF ile negatif korelasyon gösteren DNA metilasyon oranını, metillenmiş DNA bölgelerinin DNA hasarına daha az eğilimli olmaları veya hasarlı bölgelerin daha az metillenebileceği hipotezleriyle açıklamışlardır (Bahrenian ve ark., 2015). İkinci hipotez, Tunc ve Tremellen'in (2009) sperm DNA metilasyonu ve sperm DNA fragmentasyonu ile seminal ROS üretimi arasında belirgin bir negatif korelasyon gözlemlenmiş çalışmaya dayandırılmıştır (Tunc ve Tremellen, 2009). Yeni bir çalışmada, kromozomal yeniden düzenlemesi tespit edilen erkeklerde global metilasyon düzeyinin kromatin deprotaminasyonu ve sperm DNA fragmentasyonu ile negatif ilişkili olduğu ve kontrol grubunda da kromatin instabilitesi arttıkça, hipermetile genomu sahip sperm sayısının arttığı gösterilmiştir (Olszewska ve ark., 2017). DNA metilasyon aracılı genomik imprinting, gametogenez sırasında döllenmeden önce yapılır. Erkek infertilitesi olan hastalarda paternal ve maternal imprintlenmiş genlerin metilasyon anormallikleri çeşitli çalışmalarıyla bildirilmiştir (Cui ve ark., 2016; Gunes ve ark., 2016). Spermatogenezle ilişkili genlerdeki metilasyon düzenlemelerine baktığımızda, Gunes ve arkadaşlarının (2016) derlemesine göre, *H19*, *DAZL*, *TDMR*, *MTHFR*, *CREM*, *MEST* genlerinin metilasyon farklılıklarının oligozoospermi, azoospermi ve OAT ile ilişkili olabildiği görülmektedir. Tez kapsamında elde edilen bulgulara göre de semen parametreleri, SDF'den olumsuz yönde etkilenmekte ve farklı genlerin farklı metilasyon paterni sergilediği ve *BRCA1* geni metilasyonunun anormal semen parametrelerine sahip grupta artan SDF ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur.

Akım sitometrisinde yapılan TUNEL testinde DNA fragmentasyon oranlarının kanser olan grupta kanser olmayanlara göre daha yüksek oldu u gibi ilginç bir bulgu da vardır (Tamburrino ve ark., 2015). Bu tez çalı masının di er önemli bir amacı, DNA bütünlü ünün korunmasında ve bir çok kanser tipinde etkin rol oynayan (Roy ve ark., 2012) *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin SDF üzerinde etkili olup olmadıklarını ara tırmaktır. Ara tırma sonucunda *BRCA2* ile ilgili negatif veya pozitif yönde herhangi bir etkiye rastlanmadı, ancak OAT infertil grupta *BRCA1* geni metilasyonunun SDF üzerinde negatif etkisi oldu u saptandı.

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinin spermatogenez sürecindeki etkisine ili kin literatürde açık bir bilgi yoktur. *BRCA2* geni farklı doku ve kanser tiplerinde farklı metilasyon profilleri sergilerken (Hilton ve ark., 2002; Lee ve ark., 2007; Moelans ve ark., 2011), infertiliteye ili kin bugüne de in yalnızca iki çalı ma vardır. Bunlardan biri, Sharan ve arkadaş ları (2004) tarafından mutant fare modeli üzerinde yapılan ve *BRCA2*'den yoksun spermatositlerin mayozun profaz I evresini tamamlayamadıklarını gösterdi i çalı madır. Bir ba ka çalı mada *BRCA2* N372H polimorfizminin iddetli oligozoospermi ve azospermi ile ili kili oldu u bulunmu tur (Zhoucun ve ark., 2006). *BRCA1*'in infertiliteyle olan ili kisine dair ilk bulgular yine mutant fareler üzerinde yapılmı ve büyüme gecikmesine ra men somatik dokuları normal olan *Brc1*, p53 nakavt farelerin spermatogenezideki bir kusur nedeniyle infertil oldu u bildirilmi tir (Cressman ve ark., 1999).

Çift zincir kırıkları, mayoz profaz I sırasında, tip II benzeri topoizomeraz SPO11 tarafından üretilir. Hasara yanıt olarak, ATM / ATR, DNA hasarını göstermek, birçok efektörü fosforillemek ve kromatin yapısını onarabilmek için sinyal olu turur. Sonra, TEX15, *BRCA1*, *BRCA2* ve PALB2, RAD51 ve DMC1, rekombinazların kırıklara yönelmesine aracılık eder (Scully ve ark., 1997; Simhadri ve ark., 2014). Yakın zamanda, Sertoli cell-specific AR nakavt fare spermatositlerinde p-ATM ve p-ATR düzeyleri normal seviyedeyken TEX15, *BRCA1*, *BRCA2* ve PALB2 seviyelerinin dü ük olmasının çift zincir kırıklarına normal yanıt verilirken etkin bir onarım gerçekleştirilemedi i gösterilmi tir (Chen ve ark., 2016). Ancak her iki genin de metilasyonla susturulmasının infertilite üzerindeki etkisine ili kin herhangi bir delile rastlanmamı tır. Farelerde *BRCA1*'in erkek mayotik germ hücrelerinde ve post-mayotik spermatidlerde yüksek

oranda ifade edildi i gösterilmi tir. Bu durum, *BRCA1*'in spermatogenezde önemli bir rolü oldu unu dü ündürmektedir (Giscard d'Estaing ve ark., 2005).

BRCA1'in 5' ucundaki büyük CpG adacı mın germ hücrelerinde ve preimplantasyon embriyolarında metillenmemi , somatik hücrelerde metillenmi oldu u ve bu bölgenin metilasyonunun somatik hücrelerde *BRCA1*'in azaltılmı ifadesi ile ili kili oldu u gösterilmi tir (Magdinier ve ark., 2000). Gametlerde de somatik dokuda oldu u gibi *BRCA1* metile durumdadır, kodlayıcı dizilerin metillenmi kalıntılarının önemli bir bölümünün, preimplantasyon geli im sırasında korunabilece ini dü ündürmektedir (Magdinier ve ark., 2002). Tulay ve arkadaş ları (2016) *BRCA1* transkriptlerinin insan embriyolarında farklı ekilde eksprese edildi ini göstermi tir. Bulgulara göre, paternal genomdan aktarılan *BRCA1* veya *BRCA2* mutasyonu, embriyonun geli imi üzerinde maternal genomdan aktarılan kıyasla daha büyük etkiye sahiptir (Tulay ve ark., 2016). Ancak Flanagan ve arkadaş ları (2006), *BRCA1*, *BRCA2*, *PSEN1*, *PSEN2*, *DM1* ve *HD*'nin metilasyon haritalamasında, her sperm hücresinin sadece DNA sekansı bakımından de il aynı zamanda epigenomik profilde de e siz oldu unu göstermi tir.

Semen parametreleri veya SDF ile herhangi bir ili ki göstermemelerine ra men çalı maya dahil olan tüm bireyler birlikte de erlendirildi inde *BRCA1* geninin, bireylerin ço unda metillenmi , *BRCA2* geninin ise metillenmemi oldu u sonucuna varılmı tir. *BRCA2* geninin spermdeki metilasyon durumu hakkında bir bilgimiz olmadı ı için bu konuda belirgin bir fikir yürütemezken yapılmı çalı malar ı ı nda sa lıklı spermlerde *BRCA1*'in metillenmemi olması beklenmi tir. Ancak, hatta ilginç ekilde, normospermik bireyleri analize dahil etmeden OAT olguları kendi içerisinde de erlendirdi imizde *BRCA1* metilasyonu ile yüksek SDF, negatif korelasyon göstermi tir. SDF'si yüksek, anormal semen parametrelerine sahip bireylerde metilasyon daha azdır. Metilasyonun gen ifadesini baskılaması ve DNA hasar onarım mekanizmasında aktif rolü olan *BRCA1*'in metillendi i durumda SDF'nin dü ük bulunmasının farklı nedenleri olabilece i dü ünülmektedir. Bu durumu açıklarken öncelikle *BRCA1*'in çok geni CpG bölgeleri oldu u göz önünde bulundurulmalıdır. Magdinier ve arkadaş ları (2000) -1714 ile -1023 arasındaki bölgeyi çalı mı ken, bu çalı mada -1561 ile -1501 dizisinde yer alan metilasyonun analizi gerçekleştirilmi tir. Farklı bölgelerin analizinin farklı sonuçlar do urabilece ine bahsi geçen çalı mada da de inilmi tir (Magdinier ve ark., 2000).

Bir di er nokta, tamamlanmamı spermatogenez sürecidir. SDF'nin de önemli kaynaklarından biri olan tamamlanmamı spermatogenez sonucu semende yüksek oranda olgula mamı germ hücresi bulunabilmektedir (Patil ve ark., 2013). Muratori ve arkadaşları (2015b) apoptozun spermde DNA fragmentasyonuna yol açan ana mekanizma oldu unu, kromatin immatüritesinin apoptotik yola ın aktivasyonu aracılı ıyla SDF'yi indükledi ini ve oksidatif stresin ise ço unlukla spermiyogenezden sonra atak yaparak zarar verici oldu unu belirtmi lerdir.

Tez kapsamında hipoteze uygun ekilde SDF oranını sa lıklı elde edebilmek için swim-up veya gradiyent santrifuj gibi yüksek kalitedeki spermatozoaları seçecek bir yöntem bilinçli olarak tercih edilmedi i için DNA izolasyonu sırasında bu olgunla mamı spermatidlerden de DNA elde edilmi tir. mmünhistokimya çalı malarından DNMT proteinlerinin, spermatogenik döngü boyunca mevcut oldu u ve spermatogenez a amalarına göre metilasyon seviyelerinin de i ti i bilinmektedir (Marques ve ark., 2011). Bu durumda beklenenin üstünde çıkan metilasyon oranının altında yatan nedenin kısmen olgunla mamı spermatid veya spermatogonyalar olabilece i öne sürülebilir. Her sperm hücresinin spesifik bir epigenomu oldu u (Flanagan ve ark., 2006) ve olgunla mamı spermilerin bulundu u bir örnekte DNA hasarının yüksek oldu unun bildirilmesi de bu hipotezi güçlendirmektedir (Palermo ve ark., 2016). Son olarak, Bahrenian'ın (2015) hipotezledi i gibi metillenmi DNA bölgelerinin DNA hasarına daha az e ilimli olaca ı hipotezinin de üzerinde durulması gerekti i dü ünülmü tür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

infertil erkeklerdeki sperm DNA fragmentasyonu ile *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin epigenetik düzenlenmesi arasındaki ilişkiyi ilk kez bu tez çalışmasıyla incelendi.

Elde edilen veriler, infertil erkeklerde sperm DNA'sının tek ve çift zincir kırıklarına yönelik hasarın yüksek olduğunu göstermiştir. TUNEL testi ile tespit edilebilen bu SDF oranları, anormal sperm sonuçlarıyla korelasyon gösterirken, normozoospermik bireylerde de "hasta" olarak nitelendirilebilecek ölçekte SDF ortaya çıkabilmektedir.

Çalışma, SDF'nin *BRCA1* ve *BRCA2* genleri metilasyonu ile ilişkisini göstermektedir. Metilasyon analizlerinden daha anlamlı sonuçlar elde edebilmek için örnek sayısının artırılması, semen fraksiyonlarının ayrı ayrı incelenmesi ve hatta hücrelerin tek başına ele alınması gerekmektedir. Yeni teknolojiler gerektirecek çalışmaların zaman içerisinde konunun aydınlatılmasında önemli rolü olacaktır.

Günümüzde, rutin uygulamada, infertilite nedeniyle kliniğe başvuran hastaya semen analizi yapılır. Analizin anormal olması ve hastada kromozomal bir anomali olmaması durumunda lökositospermi veya varikosel varlığına bağlı olarak tedavi uygulanır ve doğal yolla konsepsiyon gerçekleşir. Tez çalışmasından ortaya çıkan bulgular, infertilitede SDF'nin de önemli rolü olduğunu göstermektedir.

Artan SDF'nin sperm hareketliliğini ve morfolojisini etkilediğini gösteren bu çalışmamızın TUNEL testinin klinik uygulamaları ve standardizasyonu açısından ülkemizde yol gösterici olabileceği düşünülmektedir. SDF deşifre edilmesi için en uygun testin belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için benzer hasta gruplarında ve aynı örnekler üzerinde farklı tekniklerin sınanması gerekmektedir. Sperm DNA bütünlüğünü deşifre etmek için geniş ölçekli çalışmalar yapılmalı ve hastaların tedavisinde optimizasyon sağlanmalıdır.

Sperm DNA bütünlüğünü ölçen testler infertilite kliniklerinde kullanılmak üzere standartlaştırılması çok önemli olmakla birlikte, bu hastalar için etkili terapötik stratejiler geliştirmek için sperm DNA fragmentasyonunun etiyojisi hakkında daha geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Abkevich V1, Timms KM, Hennessy BT, Potter J, Carey MS, Meyer LA, Smith-McCune K, Broaddus R, Lu KH, Chen J, Tran TV, Williams D, Iliev D, Jammulapati S, FitzGerald LM, Krivak T, DeLoia JA, Gutin A, Mills GB, Lanchbury JS. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2012; 6;107(10):1776-82.
- Abdel-Razic MM, Abdel-Hamid IA, ElSobky ES. Nonmosaic 47,XYY syndrome presenting with male infertility: case series. *Andrologia* 2012; 44(3):200-4.
- Adelfalk C, Ahmed EA, Scherthan H. Reproductive Phenotypes of Mouse Models Illuminate Human Infertility. *J Reprod Med Endocrinol* 2011; 8 (6): 376-383.
- Agarwal A, Allamaneni SS. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* 2004; 56(3):235-45. Review.
- Agarwal A and Said T.M,. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2004; 9(4):331–345.
- Agarwal A, Sharma RK, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM, Alshahrani S, Durairajanayagam D, Sabanegh E. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reprod Biol Endocrinol* 2014a; 7;12:33.
- Agarwal A, Tvrda E, Sharma R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014b; 27;12:45.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR,. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol and Endocrinol* 2015; 26;13:37.
- Agarwal A, Majzoub A. Laboratory tests for oxidative stress. *Indian J Urol* 2017; 33(3):199-206.
- Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol* 2016; 5(6):935-950.
- Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 2017; 27. doi: 10.1002/mrd.22871.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Harkiss D, Paterson M, Fisher H, Irvine DS. The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 1;117(1):83-93.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2010; 16:3 – 13.
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited

- by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev* 1997; 47(4):468-82.
- Aitken R, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497-506.
- Allamaneni SS, Agarwal A, Rama S, Ranganathan P, Sharma RK. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. *Asian J Androl* 2005; 7(1):86-92.
- Alshahrani S, Agarwal A, Assidi M, Abuzenadah AM, Durairajanayagam D, Ayaz A, Sharma R, Sabanegh E. Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 20; 12:103.
- Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 2005a; 20:1298–1306.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JBM, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient humansperm. *J Androl* 2005b; 26:741–748.
- Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine Levels Vary Between Individual Sperm Cells of Infertile Human Males and Correlate With Viability and DNA Integrity. *J Androl* 2006; 27 (6):890-8.
- Artioli G, Borgato L, Cappetta A, Wabersich J, Mocellin S, Dalla Palma M, Nicoletto O. Overall survival in BRCA-associated ovarian cancer: case-control study of an Italian series. *Eur J Gynaecol Oncol* 2010; 31(6):658-61.
- Asadi, F., Sadighi Gilani, M. A., Ghaheri, A., Roodgar Saffari, J., & Zamanian, M. The Prevalence of Y Chromosome Microdeletions in Iranian Infertile Men with Azoospermia and Severe Oligospermia *Cell J*. 2017; 19(1):27-33.
- Bahreini M, Tavalaee M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. *Syst Biol Reprod Med* 2015; 61(4):179-86.
- Bai X, Fu Y, Xue H, Guo K, Song Z, Yu Z, Jia T, Yan Y, Zhao L, Mi X, Wang E, Zheng Z, Zhao H, Yao W, Wei M. BRCA1 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian carcinoma: Association with low expression of BRCA1, improved survival and co-expression of DNA methyltransferases. *Oncol Lett*. 2014; 7(4):1088-1096.
- Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982; 93 298–305.
- Bareh GM, Jacoby E, Binkley P, Chang TC, Schenken RS, Robinson RD. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation assessment in normozoospermic male partners of

- couples with unexplained recurrent pregnancy loss: a prospective study. *Fertil Steril* 2016; 105(2):329-36.e1.
- Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Chahine H, Amar E, Zini A, Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet* 2014a; 31:527–532.
- Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A1, Amar E, Zini A. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertil Steril* 2014b; 101(6):1588-93.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18: 1023-8.
- Bejarano I, Monllor F, Marchena AM, Ortiz A, Lozano G, Jiménez MI, Gaspar P, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB, Espino J. Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa. *J Pineal Res* 2014 Oct;57(3):333-9.
- Bianco, B, Christofolini, DM, Ghersel, FR, Gava, MM, & Barbosa, CP. XX testicular disorder of sex differentiation: case report. *Einstein (São Paulo)*, 2011; 9(3), 394-396.
- Biggiogera M, Muller S, Courtens JL, Fakin S, Romanini MGM Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines in the course of mouse spermiogenesis. *Microsc Res Tech*. 1992; 20: 259-267.
- Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol* 2017; 14(8):470-485.
- Bonomi M, Rochira V, Pasquali D, Balercia G, Jannini EA, Ferlin A; Klinefelter Italian Group (KING). Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *J Endocrinol Invest* 2017; 40(2):123-134.
- Bosviel R, Durif J, Déchelotte P, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Epigenetic modulation of BRCA1 and BRCA2 gene expression by equol in breast cancer cell lines. *Br J Nutr* 2012; 108(7):1187-93.
- Brahem S, Mehdi M, Landolsi H, Mougou S, Elghezel H, Saad A. Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology* 2011; 78(4):792-6.
- Broering TJ, Alavattam KG, Sadreyev RI, Ichijima Y, Kato Y, Hasegawa K, Camerini-Otero RD, Lee JT, Andreassen PR, Namekawa SH. BRCA1 establishes DNA damage signaling and pericentric heterochromatin of the X chromosome in male meiosis. *J Cell Biol* 2014; 9; 205(5):663-75.

- Bungum M, Bungum L & Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* 2011; 13, 69–75.
- Caestecker KW, Van de Walle GR. The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: past and present. *Exp Cell Res*. 2013; 10; 319(5):575-87.
- Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril* 2012; 97(2):267-74.
- Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003; 49(1):49-55.
- Cavallini G, Beretta G. (eds.), *Clinical Management of Male Infertility*. Springer 2015; p75-87.
- Celik- Ozenci C, Tasatargil A. Role of poly(ADP-ribose) polymerases in male reproduction. *Spermatogenesis* 2013; 1;3(2):e24194.
- Chen SR, Hao XX, Zhang Y, Deng SL, Wang ZP, Wang YQ, Wang XX, Liu YX. Androgen receptor in Sertoli cells regulates DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis of spermatocytes partially through intercellular EGF-EGFR signaling. *Oncotarget* 2016; 5;7(14):18722-35.
- Chenlo PH, Curi SM, Pugliese MN, Ariagno JI, Sardi-Segovia M, Furlan MJ, Repetto HE, Zeitler E, Cohen M, Mendeluk GR. Fragmentation of sperm DNA using the TUNEL method. *Actas Urol Esp* 2014; 38(9):608-12.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, DeJonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; 27:53–59.
- Christou CM, Kyriacou K. BRCA1 and Its Network of Interacting Partners. *Biology (Basel)* 2013; 2;2(1):40-63.
- Cooke HJ ve Saunders PTK. Mouse models of male infertility. *Nat Rev Gen* 2002; 3, 790-801.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16:231–45.
- Cousineau I, Abaji C, Belmaaza A. BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis. *Cancer Res* 2005; 65(24):11384-91.
- Cressman VL, Backlund DC, Avrutskaya AV, Leadon SA, Godfrey V, Koller BH. Growth retardation, DNA repair defects, and lack of spermatogenesis in BRCA1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 1999; 19(10):7061-75.

- Cui X, Jing X, Wu X, Yan M, Li Q, Shen Y, Wang Z. DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Exp Ther Med* 2016(a); 12(4):1973-1979.
- 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(b); 14(1):753-61.
- Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernández JL, Gosálvez J, Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:213-23.
- Dadoune, J.P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Micros Res Tech* 2003; 61, 56–75.
- Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 1975; 90(2):411-28.
- Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* 2008; 44(3):250-4.
- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; 6, 245–250.
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken R. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009; 81(3):517-24.
- De Kretser DM, Burger HG. The Y chromosome and spermatogenesis. *N Engl J Med*. 1997; 20;336(8):576–8.
- De Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem*. 1993; 268:10553–10557.
- Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ, Huang HF. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian J Androl*. 2015; 17(6):948-53.
- Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, Briot P, Berthaut I, Levy V, Cedrin-Durnerin I, Benzacken B, Chavatte-Palmer P, Levy R. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl* 2013; 15(5):622-5.
- Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehringer S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination, outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002; 12: 3122-8.
- Endtz AW. A direct staining method for moist urinary sediment and moist human sperm. *Ned Tijdschr Geneesk* 1972; 22;116(17):681-5.

- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006; 8(1):11-29.
- Esakky P, Moley KH. Paternal smoking and germ cell death: A mechanistic link to the effects of cigarette smoke on spermatogenesis and possible long-term sequelae in offspring. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 5;435:85-93.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 5;92(7):564-9.
- Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci* 2016; 169:56-75.
- Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil* 2014; 15(1):2-14.
- Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a ten year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(3):762-70.
- Ferlin A, Foresta C. Testis cancer: genes, environment, hormones. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 21;5:172.
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 2007(b); 14:734-45.
- Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24(1):59-66.
- Flanagan JM, Pependikyte V, Pozdniakovaite N, Sobolev M, Assadzadeh A, Schumacher A, Zangeneh M, Lau L, Virtanen C, Wang SC, Petronis A. Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells. *Am J Hum Genet* 2006; 79(1):67-84.
- Flannigan R, Schlegel PN. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017; DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.05.002.
- Fok KL, Chen H, Ruan YC, Chan HC. Novel regulators of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 29:31-42.
- Ford WCL. Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl* 2010; 12:1, 59-63.

- França, L. T., Carrilho, E. ve Kist, T. B. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* 2002; 35(2):169-200.
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000; 45:215–225.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987; 22;236(4804):962-4.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3):493-501.
- Gineitis AA., Zalenskaya IA., Yau PM., Bradbury EM., Zalensky AO. *J. Cell Biol.* 2000; 151:1591–1598.
- Giscard d'Estaing S, Perrin D, Lenoir GM, Guérin JF, Dante R. Upregulation of the BRCA1 gene in human germ cells and in preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2005; 84(3):785-8.
- Goodrich R, Johnson G, Krawetz SA. The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch Androl.* 2007; 53(3):161-7.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; 53(8):1945-51.
- Gregoire MC1, Massonneau J, Simard O, Gouraud A, Brazeau MA, Arguin M, Leduc F, Boissonneault G. Male-driven de novo mutations in haploid germ cells. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(8):495-9.
- Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 2006; 25;25(43):5864-74.
- Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2015; 31(3):309-19.
- Gunes S, Arslan MA, Hekim GNT, Asci R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(5):553-569.
- Güne S, Kulaç T. Epigeneti in spermatogenezdeki rolü. *Turk J Urol* 2013; 39(3): 181-7.
- Güne S, Sevgili E, Açı R. Sperm DNA Hasarı Mekanizmaları ve Değerlendirme Yöntemleri. *Turk Klin J Urol* 2013; 4(3):107-14.
- Halder A, Kumar P, Jain M, Kalsi AK. Genomics: Tool to predict and prevent male infertility. *Front Biosci (Schol Ed).* 2017; Jun 1;9:448-508.
- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250:1684–1689.

- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 3;93(18):9821-6.
- Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012; 13(10):679-92.
- Hilton JL, Geisler JP, Rathe JA, Hattermann-Zogg MA, DeYoung B, Buller RE. Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 18;94(18):1396-406.
- Homa ST, Vessey W, Perez-Miranda A, Riyait T, Agarwal A. Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32(5):757-64.
- Hotaling J, Carrell DT. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology* 2014; (3):339-50.
- Huen MS, Sy SM, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(2):138-48.
- Hwang K, Walters RC, Lipshultz LI. Contemporary concepts in the evaluation and management of male infertility. *Nat Rev Urol* 2011; 8(2):86-94.
- Inoue S, Tomasini R, Rufini A, Elia AJ, Agostini M, Amelio I, Cescon D, Dinsdale D, Zhou L, Harris IS, Lac S, Silvester J, Li WY, Sasaki M, Haight J, Brüstle A, Wakeham A, McKerlie C, Jurisicova A, Melino G, Mak TW. TAp73 is required for spermatogenesis and the maintenance of male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 4;111(5):1843-8.
- Jenkins TG, Aston KI, James ER, Carrell DT. Sperm epigenetics in the study of male fertility, offspring health, and potential clinical applications. *Syst Biol Reprod Med* 2017; 63(2):69-76.
- Jensen RB. BRCA2: one small step for DNA repair, one giant protein purified. *Yale J Biol Med* 2013; 13;86(4):479-89.
- Kim H, Chen J, Yu X. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science* 2007; 25;316(5828):1202-5.
- Kocak I, Yenisey C, Dundar M, Okyay P, Serter M. Relationship between seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with semen parameters in fertile and infertile men. *Urol Res* 2002; 30: 263–7.
- Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 2012; 488:471–5.

- Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ.. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:3199-3207.
- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992; 13: 342–348.
- Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet.* 2017; 136(5):637-655.
- Krausz C, Degl'Innocenti S. Y chromosome and male infertility: update. *Front Biosci* 2006; 1;11:3049-61.
- Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(13):5795-818.
- Kuhtz J, Schneider E, El Hajj N, Zimmermann L, Fust O, Linek B, Seufert R, Hahn T, Schorsch M, Haaf T. Epigenetic heterogeneity of developmentally important genes in human sperm: Implications for assisted reproduction outcome. *Epigenetics* 2014; 9(12): 1648–1658.
- Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel)* 2016; 6;5(1).
- La Spina FA, Romanato M, Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Julianelli V, Rivera RM, Buffone MG. Heterogeneous distribution of histone methylation in mature human sperm. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31(1): 45–9.
- Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet* 2010; 11(3):191-203.
- Lardone, M.C., Castillo, P., Valdevenito, R., Ebensperger, M., Ronco, A.M., Pommer, R., Piottante, A., Castro, A. P450-aromatase activity and expression in human testicular tissues with severe spermatogenic failure. *Int J Androl* 2010; 33(4), 650-660.
- Lee MN, Tseng RC, Hsu HS, Chen JY, Tzao C, Ho WL, Wang YC. Epigenetic inactivation of the chromosomal stability control genes BRCA1, BRCA2, and XRCC5 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 1;13(3):832-8.
- Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002; 18(11):1427-31.
- Liu DY, Liu ML. Clinical value of sperm DNA damage should be assessed in motile sperm fraction rather than whole ejaculated sperm. *Fertil Steril* 2013; 99(2):367-71.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528-32.

- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995; 52(4):864-7.
- Maduro MR, Lamb DJ. Understanding the new genetics of male infertility. *J Urol* 2002; 168:2197–205.
- Magdinier F, Billard LM, Wittmann G, Frappart L, Benchaïb M, Lenoir GM, Guérin JF, Dante R. Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells. *FASEB J* 2000; 14(11):1585-94.
- Magdinier F, D'Estaing SG, Peinado C, Demirci B, Berthet C, Guérin JF, Dante R. Epigenetic marks at BRCA1 and p53 coding sequences in early human embryogenesis. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(7):630-5.
- Marques CJ, João Pinho M, Carvalho F, Bièche I, Barros A, Sousa M. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics* 2011; 6(11):1354-61.
- Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111(3-4):317-36.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 7;266(5182):66-71.
- Miyamoto T, Minase G, Okabe K, Ueda H, Sengoku K. Male infertility and its genetic causes. *J Obstet Gynaecol Res* 2015; 41(10):1501-5.
- Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol* 2011; 225(2):222-31.
- Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JBM. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril* 2006; 85:496–499.
- Moskovtsev, SI, Willis, J., White, J. and Mullen, JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 2009; 74: 789–793.
- Mukherjee S, Ridgeway AD, Lamb DJ. DNA mismatch repair and infertility. *Curr Opin Urol* 2010; 20(6):525-32.
- Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Guido C, Forti G, Baldi E. Critical aspects of detection of sperm DNA fragmentation by TUNEL/flow cytometry. *Syst Biol Reprod Med* 2010; 56(4):277-85.

- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Cambi M, Lotti F, Natali I, Filimberti E, Noci I, Forti G, Maggi M, Baldi E. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertil Steril* 2015a; 104(3):582-90.e4.
- Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med* 2015b; 30;21:109-22.
- Nanassy L, Carrell DT. Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation. *Fertil Steril* 2011; 95:2310–2314.
- Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(9):665-76.
- Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 59:10-26.
- Nieschlag E, Werler S, Wistuba J, Zitzmann M. New approaches to the Klinefelter syndrome. *Ann Endocrinol (Paris)* 2014; 75(2):88-97.
- Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B, Trasler JM., Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol* 2007a; 307: 368–379.
- Oakes CC, La Salle S., Smiraglia D.J., Robaire B., Trasler J.M., , A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007b; 104:228–233.
- Oktay K, Kim JY, Barad D, Babayev SN. Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. *J Clin Oncol* 2010; 10;28(2):240-4.
- Olivia R,2006. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; Vol.12, No.4: 417–435.
- Olszewska M, Barciszewska MZ, Fraczek M, Huleyuk N, Chernykh VB, Zastavna D, Barciszewski J, Kurpisz M. Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations. *Asian J Androl* 2017; 19(1): 117–124.
- O’Flynn O’Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* 2010; 93: 1–12.
- Pal R, Srivastava N, Chopra R, Gochhait S, Gupta P, Prakash N, Agarwal G, Bamezai RN. Investigation of DNA damage response and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology. *Mol Cancer* 2010; 9:303.

- Palermo GD, Neri QV, Cozzubbo T, Cheung S, Pereira N, Rosenwaks Z. Shedding Light on the Nature of Seminal Round Cells. *PLoS One* 2016; 16;11(3):e0151640.
- Patel KJ, Crossan GP, Hodskinson MR. "Ring-fencing" BRCA1 tumor suppressor activity. *Cancer Cell* 2011; 13;20(6):693-5.
- Patil PS, Humbarwadi RS, Patil AD, Gune AR. Immature germ cells in semen - correlation with total sperm count and sperm motility. *J Cytol* 2013; 30(3):185-9.
- Perrault SD. Chromatin remodeling in mammalian zygotes. *Mutat Res* 1992; 296: 43–55.
- Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 1986; 105:1-65.
- Prigent, Y, Muller, S, Dadoune, JP. Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1996; 2, 929–935.
- Radwan M, Jurewicz J, Merecz-Kot D, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Sperm DNA damage-the effect of stress and everyday life factors. *Int J Impot Res* 2016; 28(4):148-54.
- Rafael Oates RD, Amos JA. The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl* 1994; 15(1).
- Rajender S and Agarwal A. Aberrant Epigenetic Modifications in Male Infertility, *Open Reprod Sci J* 2011; 3, 57-64.
- Rajender S1, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res* 2011; 727(3):62-71.
- Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis* 2015; 26;4(2):e996025.
- Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science* 1980; 7;210(4470):604-10.
- Reid LJ, Shakya R, Modi AP, Lokshin M, Cheng JT, Jasin M, Baer R, Ludwig T. E3 ligase activity of BRCA1 is not essential for mammalian cell viability or homology-directed repair of double-strand DNA breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; Dec 30; 105(52):20876-81.
- Rex AS, Aagaard J, Fedder J. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology* 2017; 5(4):622-630.
- Rex AH and Luiz RF. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Cheng CY, editor. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. 1st Ed. New York, USA; Center for Biomedical Research, 2009; 1-10.

- Ribeiro SC, Muratori M, De Geyter M, De Geyter C. TUNEL labeling with BrdUTP/anti-BrdUTP greatly underestimates the level of sperm DNA fragmentation in semen evaluation. *PLoS One* 2017; 7;12(8):e0181802.
- Rousseaux S, Boussouar F, Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Curtet S, et al. Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. *Syst Biol Reprod Med* 2011; 57: 50-3.
- Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 2011; 23;12(1):68-78.
- Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah SK, Prosser H, Mitchell M, Bradley A, de Rooij DG, Burgoyne PS, Turner JM. Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol* 2010; 7;20(23):2117-23.
- Röpke A, Tüttelmann F. Mechanisms in Endocrinology: Aberrations of the X chromosome as cause of male infertility. *Eur J Endocrinol* 2017; 13. pii: EJE-17-0246.
- Said TM, Aziz N, Sharma RK, Lewis-Jones I, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian J Androl* 2005; 7(2):121-6.
- Sakkas D, Urner F, Bizzaro D et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998; 13(4):11-9.
- Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251:350-5.
- Schagdarsurengin U, Paradowska A, Steger K. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol* 2012; 9(11):609-19.
- Schlegel, PN and Paduch DA. Yet another test of sperm chromatin structure. *Fertil Steril* 2005; 84(4):854-9.
- 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.
- Scully R, Ganesan S, Brown M, De Caprio JA, Cannistra SA, Feunteun J, Schnitt S, Livingston DM. Location of BRCA1 in human breast and ovarian cancer cells. *Science* 1996; 5;272(5258):123-6.
- Sharan SK, Pyle A, Coppola V, Babus J, Swaminathan S, Benedict J, Swing D, Martin BK, Tessarollo L, Evans JP, Flaws JA, Handel MA. BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* 2004; 131(1):131-42.

- Shamsi MB, Kumar R, and Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 2008; 127:115-123.
- 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* 2016; 70(4):635-645.
- Sharma N, Singh M, Acharya N, Singh SK, Thapa BR, Kaur G, Prasad R. Implication of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in infertile family members of Indian CF patients. *Biochem Genet* 2008; 46(11-12):847-56.
- Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 2004; 6:139-148.
- Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 15;28(4):529-36.
- Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(5):576-81.
- Sigman M, Howards SS. Male infertility. In Campbell's Urology, PC Walsh, AB Retik, ED Vaughan, editors. 7th edition Philadelphia, W.B. Saunders, 1998;1287-9.
- Silber SJ, Blerkom J, Grerory L. Essential IVF: Basic Research and Clinical Applications. pringer Science & Business Media 2011; 85-141.
- Simhadri S, Peterson S, Patel DS, Huo Y, Cai H, Bowman-Colin C, Miller S, Ludwig T, Ganesan S, Bhaumik M, Bunting SF, Jasin M, Xia B. Male fertility defect associated with disrupted BRCA1-PALB2 interaction in mice. *J Biol Chem* 2014; 29; 289 (35):24617-29.
- Simon L, Aston KI, Emery BR, Hotaling J, Carrell DT. Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline Comet assay and their importance. *Andrologia* 2017; 49(2).
- Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, Emery B, Carrell DT. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2014;;29(5):904-17.
- Simoni M. Gene polymorphisms and male infertility – a meta-analysis and literature review. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; 15(6): 643-658.
- Sinha H, Swerdloff R. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction* 1999; 4(1):38–47.
- Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, Hood L, King MC. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res* 1996; 6(11):1029-49.

- Song N, Liu J, An S, Nishino T, Hishikawa Y, Koji T. Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta Histochem Cytochem* 2011; 44:183-90.
- Sonnack V., Failing K., Bergmann M., Steger K., Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis, *Andrologia* 2002; 34, 384–390.
- Souquet B, Abby E, Hervé R, Finsterbusch F, Tourpin S, Le Bouffant R, Duquenne C, Messiaen S, Martini E, Bernardino-Sgherri J, Toth A, Habert R, Livera G. MEIOB targets single-strand DNA and is necessary for meiotic recombination. *PLoS Genet* 2013; 9(9):e1003784.
- Stanton PG. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 59:166-173.
- Stefansson OA, Esteller M. Epigenetic modifications in breast cancer and their role in personalized medicine. *Am J Pathol* 2013; 183(4):1052-63.
- Stouffs K, Lissens WX. Chromosomal mutations and spermatogenic failure. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1822: 1864–1872.
- Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P. What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011; 17(2):197–209.
- Stouffs K, Tournaye H, Liebaers I, Lissens W. Male infertility and the involvement of the X chromosome. *Hum Reprod Update* 2009; 15(6):623-37.
- Szaumkessel M, Richter J, Giefing M, Jarmuz M, Kiwerska K, Tönnies H, Grenman R, Heidemann S, Szyfter K, Siebert R. Pyrosequencing-based DNA methylation profiling of Fanconi anemia/BRCA pathway genes in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2011; 39(2):505-14.
- 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):1115-37.
- Tamburrino L, Cambi M, Marchiani S, Manigrasso I, Degl'Innocenti S, Forti G, Maggi M, Baldi E, Muratori M. Sperm DNA fragmentation in cryopreserved samples from subjects with different cancers. *Reprod Fertil Dev* 2015; 14. DOI: 10.1071/RD15190.
- Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Marino FE, Natali I et al. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl* 2012; 14: 24–31.
- Tarín JJ, García-Pérez MA, Hamatani T, Cano A. Infertility etiologies are genetically and clinically linked with other diseases in single meta-diseases. *Reprod Biol Endocrinol* 2015 15;13:31.
- Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2009; 91(4):1119-26.

- Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 1996; 12(3):333-7.
- Tirabassi G, Vignini A, Tiano L, Buldreghini E, Brugè F, Silvestri S, Orlando P, D'Aniello A, Mazzanti L, Lenzi A, Balercia G. Protective effects of coenzyme Q10 and aspartic acid on oxidative stress and DNA damage in subjects affected by idiopathic asthenozoospermia. *Endocrine* 2015; 49(2):549-52.
- Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer Cell 2017; 9;168(4):644-656.
- Tulay P, Doshi A, Serhal P, SenGupta SB. Differential expression of parental alleles of BRCA1 in human preimplantation embryos. *Eur J Hum Genet* 2016; 25(1):37-42.
- Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26(9-10):537-44.
- Turek-Plewa J, Jagodzi ski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005;10(4):631-47.
- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 1996; 11: 1–24.
- Varshini J, Srinag BS, Kalthur G, Krishnamurthy H, Kumar P, Rao SB, et al. Poor sperm quality and advancing age are associated with increased sperm DNA damage in infertile men. *Andrologia* 2012; 44:642–9.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 81: 1289–1295.
- Vogt PH. Molecular genetic of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des* 2004; 10:1–29.
- Wang L, Liu W, Zhao W, Song G, Wang G, Wang X, Sun F. Phosphorylation of CDK2 on threonine 160 influences silencing of sex chromosome during male meiosis. *Biol Reprod* 2014; 90(6):138.
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 2001; 27, 422-426.
- Wang, R. Y.-H., Gehrke, CW, Ehrlich, M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* 1980; 8, 4777-4790.
- Ward WS and Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44, 569–574.

- Ward W. S. The structure of the sleeping genome: implications of sperm DNA organization for somatic cells *J. Cell. Biochem* 1994; 55, 77–82.
- Walsh TJ, Pera RR, Turek PJ. The genetics of male infertility. *Semin Reprod Med.* 2009; 27:124–36.
- Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biol.* 2015; 15(2):94-100.
- Welsh PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 2000; 16(2):69-74.
- WHO, WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th edition World Health Organization. 2010; 223-225.
- Winters BR, Walsh TJ. The epidemiology of male infertility. *Urol Clin North Am* 2014; 41(1):195-204.
- Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J Biol Chem* 1997; 19;272(51):31941-4.
- Wu QY, Li N, Li WW, Li TF, Zhang C, Cui YX, Xia XY, Zhai JS. Clinical, molecular and cytogenetic analysis of 46, XX testicular disorder of sex development with SRY-positive. *BMC Urol* 2014; 28;14:70.
- Wu Q, Wang C, Shi H, Kong X, Ren S, Jiang M. (2017). The Clinical Manifestation and Genetic Evaluation in Patients with 45,X/46,XY Mosaicism. *Sex Dev* 2017; 11(2):64-69.
- Wu W, Shen O, Qin Y, Niu X, Lu C, Xia Y, Song L, Wang S, Wang X. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *PLoS One* 2010; 5, e13884.
- Xu X, Aprelikova O, Moens P, Deng CX, Furth PA. Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full length isoform deficient mice. *Development* 2003; 130(9):2001-12.
- Yamauchi Y, Shaman JA, Ward WS. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J Androl* 2011; 13(1):31-5.
- Yegin Z, Gunes S, Buyukalpelli R., Hypermethylation of TWIST1 and NID2 in Tumor Tissues and Voided Urine in Urinary Bladder Cancer Patients. *DNA Cell Biol* 2013; 32(7):386-92.
- Zabludoff S.D, Wright W.W, Harshman K, Wold B.J. BRCA1 mRNA is expressed highly during meiosis and spermiogenesis but not during mitosis of male germ cells. *Oncogene* 1996; 13: 649–653.

Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 1991; 6(9):1265-74.

Zhang F, Fan Q, Ren K, Andreassen PR. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res* 2009; 7(7):1110-8.

Zhoucun A, Zhang S, Yang Y, Ma Y, Zhang W, Lin L. The common variant N372H in BRCA2 gene maybe associated with idiopathic maleinfertility with azoospermia or severe oligozoospermia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 1;124(1):61-4.

Zini A, Boman J, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23:2663 – 2668.

Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009; 30 : 219-29.

EKLER

Ek 1: Bilgilendirilmi Gönüllü Olur Formu Örne i

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

“BRCA1 VE BRCA2 GENLERİ METİLYASYONU İLE İNFERTİL ERKEKLERDEKİ 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?

Kısırlık günümüzde sık rastlanan bir sağlık sorunudur ve birçok sebebi olan bu sorunun tanısını kolaylaştıracak testlere ihtiyaç artmıştır. Çalışma, normal yollardan ocuk sahibi olamayarak Tüp Bebek merkezine başvuran, kromozomal bir bozukluk veya Y kromozomu mikrodelesyonu olmayan kısır erkeklerin sperminde DNA (Kalıtsal materyal) hasarı olup olmadığının tespit edilmesine dayalıdır. Çalışmanın ileriki aşamalarında bu kişilerin DNA'larındaki bazı değişiklikler (*BRCA1* ve *BRCA2* genleri) olup olmadığı araştırılacaktır.

Elde edilen veriler sayesinde merkeze başvuran erkek hastaların ocuk sahibi olabilme durumlarının ortaya konması için semen analizinin yanı sıra başka bir testin (TUNEL) güvenilirlik derecesi ortaya konmuş olacaktır.

ÇALIşMA İşLEMLERİ:

Araştırma sırasında size tedavi için uygulanacak işlemler haricinde ek bir ilaç uygulaması veya canınızı acıtacak girişimsel herhangi bir uygulama yapılmayacak olup tedavi ve teşhis amacıyla vermiş olduğunuz semen örneğinden bir miktar alınarak bütün inceleme ve araştırma bu semen üzerinde yapılacaktır. Semen örneğinin bir bölümü mikroskop altında özel boyalarla incelenerek hasar olup olmadığı belirlenecek, diğer bir bölümünden ise DNA (kalıtsal materyali) izole edilerek *BCRA1* ve *BCRA2* genlerindeki kimyasal değişimler araştırılacak ve bu hücreler daha sonra kullanılmayacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışmanın verimli sonuçlanabilmesi için öykünüzü aıkca anlatmalı, doktorunuzun talimatlarına uymalı, randevu ve vizitelere katılmalı 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.

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.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Bu çalışma ile kısırlıkla ilgili olarak vermiş olduğunuz semende daha önceden uygulanmamış ve henüz rutin testler dahilinde olmayan bir testtir. Testin sonuçları sperminizde kısırlığı önemli ölçüde etkileyen DNA hasarı (hücresinin moleküler düzeyde bir hasarı) olup olmadığını gösterir. Bu sayede tüp bebek tedavisinden elde ettiğiniz sonucu değerlendirmeniz kolay olacak ve tekrar çocuk sahibi olmayı düşündüğünüzde bu testin sonuçları sizin çocuk sahibi olma konusundaki olası başarı oranınızı gösterebilecektir.

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 her hangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma doktoru ziyaretleri ve çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyici tarafından karşılanacak ve size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir. Ayrıca çalışmaya bağlı makul miktardaki yol gideriniz makbuzları gösterildiği takdirde karşılanacaktır.

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, etnik kökeniniz ayrıca Çalışma verilerinizin kullanımı ile

İlgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışma destekleyicisi firma ile paylaşılan çalışma verileri size özel bir numara olan bir kod ("Kod") numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin çalışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma doktorunuzun denetimindedir. Denetim kurumları tarafından atanmış kişiler doktorunuz tarafından tutulan çalışma verilerinizi inceleyebilirler.

Doktorunuz çalışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Çalışma destekleyicisi firma; çalışmanın yürütülmesi, teşhis ve tıbbi yardım gereçlerinin geliştirilmesi için çalışma verilerinizi kullanabilir. Doktorunuzun çalıştığı kurum yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludur.

Doktorunuz çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer kişiler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Doktorunuz ya da çalışma destekleyicisi firmadan, toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkına sahiptir. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkına da sahiptir. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Yalnızca onayınızdan vazgeçmeden önceki çalışma verileriniz kullanılmaya devam edebilir.

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

ARAşTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAşILABİLECEK KİşİLER:

Ad, Soyadı ve telefon numaraları

ÇALIşMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR: Varsa açıklayınız

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

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

Çalışmaya Katılma Onayı

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

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

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

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

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Ek 2: Gönüllü Anket Formu

Hasta ve Kontrol Grupları için	
Hastanın Adı, Soyadı	
Dosya No	
Hastanın Yaşı	
Hastanın Mesleği	
Adres	
Tel	
Annenin Memleketi	
Babanın Memleketi	
Infertilite Süresi	
Sperm Sayısı	
Sigara kullanıp kullanmadığı	
Alkol kullanıp kullanmadığı	
In vitro fertilizasyon deneme sayısı	

Ek 3: Etik Kurul Kararı

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/ 173

03.11 .2012

Sayın Prof. Dr. Ramazan AŞCI

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz *BRCA1* ve *BRCA2* Genleri Metilasyonu ile İnfertil Erkeklerdeki Sperm DNA Hasarı Arasındaki İlişkinin Araştırılması başlıklı, OMÜ KAEK 2012/78 Karar nolu Genetik çalışma nitelikli araştırma projeniz: Amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre 28.09.2012 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.Abdülkerim BEDİR
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başkanı

ÖZGEÇM

Adı Soyadı: Emel SEVG L

Do um Yeri: Çar amba

Do um Tarihi: 01.03.1983

Medeni Hali: Evli

Bildi i Yabancı Diller: İngilizce (ÜDS:70)

E itim Durumu (Kurum ve Yıl): Yüksek lisans (Adnan Menderes Üniversitesi, 2009)

Çalı tı ı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ordu Üniversitesi, 2011-Halen

E-posta: emelsevgili@odu.edu.tr