

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

**NON-OBSTRÜKTİF AZOSPERMİK VE ŞİDDETLİ  
OLİGOSPERMİK İNFERTİL ERKEKLERDE *MTHFR* GENİ  
METİLASYON DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tuba KULAÇ**

**Samsun  
Eylül - 2013**

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

**NON-OBSTRÜKTİF AZOSPERMİK VE ŞİDDETLİ  
OLİGOSPERMİK İNFERTİL ERKEKLERDE *MTHFR* GENİ  
METİLASYON DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tuba KULAÇ**

**Danışman: Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ**

**Samsun  
Eylül - 2013**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında, yakın ilgi ve desteğini hep hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan BAĞCI'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda yardımını esirgemeyen, tıbbi genetik alanındaki bilgilerimin temellerinin atılmasında büyük emeği olan, ümitsiz olduğum anlarda motivasyonumu tazeleyen ve güleryüzüyle her zaman yanımda olduğunu hissettiğim değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e çok teşekkür ederim.

Hastalara tanı konulmasında ve hasta gruplarımın toparlanmasında büyük emeği geçen Sayın Prof. Dr. Ramazan AŞCI'ya sunduğu bilimsel destekten dolayı çok teşekkür ederim.

Hasta ve kontrol grupları için örneklerimin toparlanmasında emeği geçen Dr. Fatih ATAÇ, Dr. Cengiz BEYAZ, Bio. Gökhan ZENGİN ve Semanur DEMİR'e çok teşekkür ederim.

Tezimi destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Tezleri Destekleme Programına (PYO.TIP.1904.13.01) ve Proje Yönetim Ofisi çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Tefik SÜNTER ve Dr. Selçuk ORHAN'a istatistik konusunda sağladığı yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tez Değerlendirme Komisyon Üyeleri'nden asistan arkadaşım Süleyman Emre KOCACAN'a yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Her koşulda yanımda oldukları için arkadaşlarım Nilay GÜVEN, Tuğçe YAZAN, Emel SEVGİLİ'ye çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, eğitimim süresince yaşadığım tüm zorlukları aşmamda sabır ve özveriyle büyük destekleri olan anneme, babama ve kardeşim Tolga Mahir'e sonsuz teşekkürler...

Bu tez KULAÇ ailesi fertlerine ithaf edilmiştir.

**ÖZET**  
**NON-OBSTRÜKTİF AZOSPERMİK VE ŞİDDETLİ OLİGOSPERMİK**  
**İNFERTİL ERKEKLERDE *MTHFR* GENİ METİLASYON DEĞİŞİMLERİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Amaç:** Erkek infertilitesi, genlerin yanı sıra epigenetik faktörlerin de önemli rol oynadığı kompleks bir hastalıktır. Azospermik ve şiddetli oligospermik erkeklerde karyotip anomalileri, Y kromozomu mikrodelsiyonları ve *Kistik fibrozis transmembran düzenleyici* (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CFTR*) geni mutasyonları en iyi bilinen genetik nedenler arasındadır. Bazı spesifik mutasyonlar tespit edilmesine rağmen sperm kusurlarından sorumlu diğer nedenler bilinmemektedir. Çalışmamızda infertil erkeklerde *Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR)* geni promotor bölgesi metilasyon profillerini belirlemeyi amaçladık.

**Materyal ve Metot:** Çalışmamıza 31 azospermik, 46 oligospermik hastalar ve yaş açısından eşleneği olan 49 normospermik erkek dahil edildi. DNA, azospermik erkeklerin testis biyopsisi örneklerinden, oligospermik ve normospermik erkeklerin ejakulat sıvısından izole edildi. Örneklerin *MTHFR* geni metilasyon durumları metilasyona spesifik PCR (MSP) ile analiz edildi.

**Bulgular:** Azospermik ve oligospermik infertil hastalar ve normospermik erkekler arasında *MTHFR* geni promotor profilleri açısından ilişki gözlenmedi ( $p=0,625$ ). Metilasyon sıklığı azospermik hastalarda %48,4, oligospermik erkeklerde %58,7 normospermik erkeklerde ise %51,0 olarak tespit edildi.

**Sonuç:** Bizim verilerimiz, *MTHFR* geni promotor metilasyon değişimleri ve erkek infertilitesi arasında ilişki olmadığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** DNA metilasyonu; Epigenetik; Erkek İnfertilitesi; *MTHFR*.

**Tuba KULAÇ, Yüksek Lisans Tezi**  
**Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Temmuz-2013**

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE METHYLATION PATTERNS OF *MTHFR* GENE IN INFERTILE MALES WITH NON-OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIA AND SEVERE OLIGOZOOSPERMIA

**Aim:** Infertility is a complex disorder with both genetic and environmental causes. Karyotypic abnormalities, microdeletions on Y chromosome and *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)* mutations are well known genetic causes in azoospermic and severely oligozoospermic men. Although some specific mutations have been identified, others responsible for sperm defects remain unknown. We aimed to investigate the methylation patterns of the promotor of *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* gene in infertile males.

**Material and Method:** Thirty one azoospermic and 46 oligozoospermic infertile patients constituted the study group and were compared with 49 age matched normospermic males. DNA was isolated from testicular tissue of azoospermic males and ejaculate samples of normospermic and oligozoospermic males. The methylation status of the *MTHFR* gene was analyzed by methylation spesific polymerase chain reaction (MSP) in samples.

**Results:** No association was observed in the methylation profile of the *MTHFR* promoter region among both azoospermic and oligozoospermic infertile patients and normospermic males ( $p=0.625$ ). Hypermethylation of *MTHFR* gene was detected in 48.4% and 58.7% of azoospermic and oligozoospermic patients, respectively. Additionally, hypermethylation was observed in 51.0 % of normospermic males.

**Conclusion:** Our data indicate that there was no association between the methylation pattern of *MTHFR* gene and male infertility.

**Keywords:** DNA methylation; Epigenetics; Male infertility; *MTHFR* gene.

**Tuba KULAÇ, Master Thesis  
Ondokuz Mayıs University - Samsun, July-2013**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

NOA: Obstrüktif olmayan azospermia

OAT: Oligoastenoteratospermia

PAR: Psödootozomal bölge

*SRY*: Cinsiyet belirleyici gen

AZF: Azospermik faktör bölgesi

*AR*: Androjen reseptörü geni

GNRH: Gonodotropin salıcı hormon

CBAVD: Konjenital bilateral vas deferens aganezi

*MTHFR* : Metilentetrahidrofolat redüktaz

*CFTR* : Kistik fibrozis transmembran düzenleyici gen

THF: Tetrahidrofolat

BHTM: Betain homosistein metiltransferaz

SAM: S-adenozilmetiyonin

SAH: S-adenozilhomosistein

TESE: Testiküler sperm ekstrasyonu

PGD: Primordiyal germ hücresi

µl: Mikrolitre

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

MSP: Metilasyona spesifik PCR

USP: Metilasyona spesifik olmayan PCR

IVD: *În vitro* metile DNA

ddH<sub>2</sub>O: deiyonize su

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	vii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri .....	3
2.1.1. Sayısal Kromozom Anomalileri .....	4
2.1.2. Yapısal Kromozom Anomalileri .....	5
2.1.3. Y Kromozomu Yapısal Bozuklukları .....	7
2.1.4. X Kromozomuna Bağlı Bozukluklar .....	8
2.1.5. <i>Kistik Fibrosiz Transmembran (CFTR)</i> Gen Mutasyonları .....	8
2.1.6. Mitokondriyal DNA Bozuklukları .....	9
2.2. <i>Metilentetrahidrofolat (MTHFR) Redüktaz</i> Geni .....	9
2.3. Spermatogenez .....	12
2.4. Spermiyogenez .....	13
2.5. Epigenetiğin Spermatogenezdeki Rolü .....	15
2.5.1. Sperm DNA Metilasyonu .....	15
2.5.2. Sperm Histon Modifikasyonları .....	16
2.5.3. Spermiyogenez Sırasında Kromatin Modifikasyonu .....	18
2.6. Çevresel Faktörler ve Epigenetik .....	19
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	21
3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Oluşturulması ve Özellikleri .....	21
3.2. Testis Biyopsisi Örneklerinden DNA İzolasyonu .....	22
3.3. Ejekulat Örneklerinden DNA İzolasyonu .....	23
3.4. Ekstrakte Edilen DNA'ların Bisülfid Modifikasyonu .....	24
3.5. Metilasyona-spesifik PCR .....	26
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi .....	28
3.7. İstatistiksel Analiz .....	28

<b>4. BULGULAR</b> .....	29
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	34
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	38
<b>KAYNAKLAR</b> .....	39
<b>EKLER</b> .....	50
<b>EK 1. ETİK KURUL ONAYI</b> .....	50
<b>EK 2. HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAY FORMU</b> .....	51
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	55



## 1. GİRİŞ

İnfertilite, genetik ve epigenetik nedenlerden kaynaklanan karmaşık etiyojili bir hastalıktır. İnfertilite, evli çiftlerin yaklaşık % 15'inde görülen üreme sağlığı sorunu olup olguların yarısı erkektir (Kretser, 1997). Şiddetli infertilite olgularının büyük kısmından genetik değişimlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Rucker GB ve ark., 1998). Kromozom anomalileri ve Y kromozomu mikrodelsyonları başlıca genetik etkenlerdendir (Huynh ve ark., 2002; O'Flynn O'Brien ve ark., 2010). Ancak, erkek infertilitesinin altında yatan nedenlerin sadece bir bölümünü genetik nedenlerle açıklayabiliriz. Son yıllarda yapılan çalışmalar erkek infertilitesinde genetik faktörlerin yanı sıra epigenetik faktörlerin de rol oynadığını göstermektedir (Rajender ve ark., 2011). Bu alanda geniş araştırmalar yapılmasına rağmen olguların %40'nın nedeni açıklanamamaktadır. Erkek germ hücrelerinde, sperm anomalilerine ve sayısal azalmaya neden olabilen anormal epigenetik yeniden düzenlenmelerin erkek infertilitesi üzerine etkisi olabileceği bildirilmiştir (Dada ve ark., 2012).

Epigenetik değişiklikler, DNA dizisinde değişim olmadığı halde gen ifadesinin kalıtılabilir değişimleridir (Carrell, 2012). DNA metilasyonu epigenetik değişikliklerden biridir (Rajender ve ark., 2011). CpG dizisindeki sitozinin 5. karbonuna DNA metil transferazların katalizlemesiyle bir metil grubunun eklenmesiyle meydana gelen biyokimyasal bir işlemdir (Talbert ve ark., 2006). DNA metilasyon değişimleri hipo veya hipermetilasyon şeklinde oluşabilir (Issa, 2000).

Hipometilasyon transkripsiyonu ve genin etkinliğini artırırken hipermetilasyon transkripsiyonu baskılamaktadır (Rajender ve ark., 2011).

*Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR)* geni 1p36.3'de yer almaktadır (Frosst ve ark., 1995). Bu gen 656 amino asitten oluşan MTHFR enzimini kodlamaktadır. MTHFR enzimi folat metabolizması, DNA sentezi ve metilasyon reaksiyonlarının temel düzenleyicisidir (Wu ve ark., 2010). MTHFR enzimi 5,10-metilen tetrahidrofolatın 5-metil tetrahidrofolata indirgenmesini kataliz eder (Goyette ve ark., 1994). 5-metil tetrahidrofolat, homosisteinin metiyonine yeniden metilasyonu için metil grubu sağlar. MTHFR, metil gruplarının, DNA sentezi ve DNA metilasyonunda dengelenmesinde önemli rol oynar (Wu ve ark., 2010). *MTHFR* geni inaktive olan erkek farelerde hiperhomosisteinemi ve infertilite gözlenmiştir. Yapılan testis biyopsisi testis histolojisinin anormal olduğunu ve spermatogenezin bozulduğunu göstermiştir (Kelly

ve ark., 2005). *MTHFR* gen aktivitesi, erişkin fare testislerinde diğer organlarla karşılaştırıldığında 5 kat daha yüksektir (Chen ve ark., 2001) ve bu artış spermatojenezdeki rolüyle ilişkilendirilebilir. Erkek faredeki DNA metilasyon değişimleri vaz deferens yokluğu ve azospermi ile ilişkilendirilmiştir (Doerksen ve ark., 2000).

Son zamanlarda insanlarda yapılan bazı çalışmalarda bazı infertil erkeklerde görülen *MTHFR* geni polimorfizimleri azalan sperm sayısıyla ilişkilendirilmiştir (Wu ve ark., 2010). Testis biyopsisi alınan non-obstrüktif azospermik olgularda *MTHFR* geni promotor bölgesindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu gözlemlenmiştir (Khazamipour ve ark., 2009). Diğer yandan Wu ve arkadaşları da *MTHFR* geni promotor bölgesinin hipermetilasyonu ile idiopatik erkek infertilitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlemişlerdir (Wu ve ark., 2010).

Çalışmamızda non-obstrüktif azospermik ve şiddetli oligospermik infertil erkeklerin ve yaşları aynı olan normospermik erkeklerin *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profillerini karşılaştırmayı amaçladık. şu anki bilgilerimiz doğrultusunda Türkiye’de ilk kez yapılan bu çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi’nde yaşayan non-obstrüktif azospermik ve şiddetli oligospermik infertil erkek popülasyonunda *MTHFR* geni promotor bölgesinde metilasyon değişiklerinin olup olmadığını ve bu metilasyon değişikliklerinin sperm sayısı, sperm morfolojisi ve sperm motilitesiyle korelasyonunu belirlemeyi hedefledik.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri

İnfertilite, çiftlerin bir yıl korunmasız, vajinal yoldan ve normal sıklıkla cinsel ilişkilerine rağmen gebelik oluşturmamasıdır (WHO, 2001). Evli çiftlerin yaklaşık % 15'inde görülen infertilite, üreme sağlığı sorunu olup olguların yarısı erkektir (Kretser, 1997). İnfertilite, genetik ve epigenetik nedenlerden kaynaklanan karmaşık etiyojili bir hastalıktır.

Spermatogenez mayoz ve mitoz hücre bölünmesi ve sperm geçişini düzenleyen birçok gen ve sinyal yolağıyla kontrol edilir (Lee ve ark., 2011). Ejekulatta sperm bulunmamasına azospermi denir (Eberhart ve ark., 1996). Azospermik erkeklerin yaklaşık % 29'unda genetik bozukluklar görülür (Dohle ve ark., 2002).

Erkek infertilitesinin başlıca nedenleri arasında somatik ve/veya gamet hücrelerinde meydana gelen sayısal ya da yapısal kromozom anomalileri yer almaktadır. Kromozom bozuklukları hem cinsiyet hem de otozomal kromozomlarda olabilmektedir. Kromozom anomalilerinin toplumdaki sıklığı % 0,6 iken, infertil erkeklerde bu oran % 2-19'a yükselmektedir (Bhasin ve ark., 2000; O'Flynn O'Brien ve ark., 2010; Yatsenko ve ark., 2010). Azospermik erkeklerin % 13,7'sinde oligospermik erkeklerin ise % 4,6'sında anormal karyotip gözlenir. Azospermik erkeklerde çoğunlukla sayısal kromozom anomaliler gözlenirken oligospermiklerde çoğunlukla yapısal anomaliler gözlenmektedir (Van Assche ve ark., 1996). Türkiye'de 1214 obstrüktif olmayan azospermik (non-obstructive azoospermia; NOA) ve 721 şiddetli oligoastenoteratozpermik (oligoastenoteratospermia; OAT) infertil erkeğin dahil edildiği bir çalışma sonucunda sitogenetik anomali sıklığı NOA erkeklerde %16,40, şiddetli OAT erkeklerde %5,83 olarak tespit edilmiştir (Kumtepe ve ark., 2009).

Erkek infertilitesiyle ilişkilendirilen kromozomal anomaliler sayısal, yapısal ve Y kromozomu anomalileri şeklinde sınıflandırılabilir (Huynh ve ark., 2002; O'Flynn O'Brien ve ark., 2010). Ayrıca *kistik fibrosiz transmembran düzenleyici* (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CFTR*) gen mutasyonları, X kromozomu üzerinde bulunan bazı genlerde görülen bozukluklar, sperm mitokondriyal DNA defektleri ve epigenetik faktörler de erkek infertilitesinde rol alan başlıca genetik nedenler arasındadır (Lee ve ark., 2011).

### **2.1.1. Sayısal Kromozom Anomalileri**

İnfertil erkeklerde sayısal kromozom anomalileri genellikle cinsiyet kromozomlarında görülmektedir (Güneş ve Aşcı, 2013).

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

47,XXY karyotipi infertil erkekler arasında en sık görülen cinsiyet kromozomu anöploidisidir (Lee ve ark., 2011). Azospermik erkeklerin yaklaşık % 14'ü Kleinfelter Sendromudur (Oates, 2008).

#### ***47,XYY Sendromu***

Genel olarak 47,XYY karyotipli erkekler normal semen parametrelerine sahiptirler ancak şiddetli oligospermi görülen erkeklerde mayoz bölünme hatalarının daha fazla olduğu, eşey hücre kayıplarının ve anöploid sperm oluşumunun daha fazla görüldüğü göz önüne alınmalıdır (Güneş ve Aşcı, 2013). Teorik olarak bu erkeklerin spermlerinin yarısının anormal olması gerektiği düşünülse de yapılan çalışmalarda spermler arasında cinsiyet anöploidisi sıklığının %0,3 ile %15,0 arasında değişebileceği bildirilmiştir. Fakat bu çalışmalara dahil edilen hasta sayılarının az olduğu gözden kaçırılmamalıdır (Mercier ve ark., 1996; Chevret ve ark., 1997; Shi ve ark., 2000; Moretti ve ark., 2007; Wong ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada şiddetli oligospermi gösteren 47,XYY karyotipli iki erkekte sperm anöploidi sıklığının % 37,23-37,80 arasında değiştiği ve preimplante embriyolarda anöploidi sıklığının %32,0 olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma sonucunda sperm anöploidi sıklığıyla preimplante embriyo anöploidi sıklığı arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (Gonzalez-Merino ve ark., 2007).

#### ***45,X/46,XY Mozaizmi***

İnfertil erkeklerin küçük bir bölümünde periferik kandan yapılan sitogenetik analiz sonuçlarında 45,X hücre hattının yanı sıra, normal veya anormal Y kromozomu taşıyan 46,XY hücre hattı daha tespit edilmiştir. 45,X/46,XY mozaizmi, Y kromozomu anomalileri ile sıklıkla ilişkili bulunmuştur (Güneş ve Aşcı, 2013).

45,X/46,XY mozaik karyotipli olgular kadın fenotipi, fertil erkek ve azospermik erkeğe kadar değişen fenotipler göstermektedir. Fenotip ve mozaizim oranı

arasında bir korelasyon kurulamamıştır. Normal fenotipe sahip azospermik erkeklerde 45,X/46,XY mozaizmi genellikle Y kromozomu delesyonları/mikrodelesyonları ile birlikte görülmüştür. Ancak mozaizimli erkeklerin bir kısmının periferik kanından yapılan analizlerde Y kromozomu mikrodelesyonları saptanamazken (Jaruzelska ve ark., 2001; Patsalis ve ark., 2005; Alvarez-Nava ve ark., 2006; Patsalis ve ark., 2006) gonadlardan elde edilen DNA ile yapılan testlerde Y kromozomu mikrodelesyonları saptanmıştır (Alvarez-Nava ve ark., 2008).

### **2.1.2. Yapısal Kromozom Anomalileri**

Robertsonian ve resiprokal translokasyonlar, inversiyonlar ve marker kromozomlar infertil erkeklerde en sık rastlanan yapısal kromozom bozukluklarıdır (Huynh ve ark., 2002).

#### ***Robertsonian Translokasyonlar***

İki akrosentrik kromozomun (13, 14, 15, 21 ve 22) kısa kollarının kaybı ve uzun kollarının sentromer bölgesinin yakınlarında birleşmesi sonucu oluşmaktadır (Ferlin ve ark., 2007). Robertsonian translokasyonları 13;14 ve 14;21 numaralı kromozomlar arasında daha fazla rastlanılmaktadır (Huynh ve ark., 2002). Akrosentrik kromozomların kısa kollarında çok sayıda ribozomal RNA (rRNA) gen kopyaları bulunmaktadır. Translokasyon sonrasında rRNA gen kopyalarını içeren kısa kollarının kaybının infertiliteye etkisi yoktur. Robertsonian translokasyon taşıyıcısı bireylerin kromozom sayıları 45'tir (Güneş ve Aşçı, 2013).

Oligospermik erkeklerde Robertsonian translokasyonu görülme sıklığı % 1,5 iken azospermiklerde bu sıklığın % 0,2 olduğu bildirilmiştir (Krausz ve ark., 2000; Chantot-Bastaraud ve ark., 2008; O'Flynn O'Brien ve ark., 2010). Robertsonian translokasyon taşıyıcılarında, fertilitenin azalmasının nedeni translokasyonlu kromozomların mayoz bölünmede homolog kromozom eşleşmesi esnasında trivalent yapı oluşturmasıdır. Spermatogenezde translokasyonlu kromozomların ayrılması esnasında meydana gelebilecek hataların oligospermiye neden olabileceği bildirilmiştir (Ferlin ve ark., 2007).

### ***Resiprokal Translokasyonlar***

Resiprokal translokasyonlar homolog olmayan kromozomlar (otozomal kromozomlar veya cinsiyet kromozomları) arasında meydana gelen karşılıklı parça değişimi sonucunda oluşmaktadır. Toplumda yenidoğanda görülme insidansı % 0,1'dir. Oligospermik erkeklerde görülme sıklığı azospermik erkeklerle ve genel popülasyonla karşılaştırıldığında daha yüksektir (Chantot-Bastaraud ve ark., 2008). Translokasyon taşıyıcısı erkeklerde mayoz sırasında normal bivalent oluşumunun engellenmesi, mayozun bozulmasına, spermatogenez esnasında maturasyon arrest oluşumlarına ve sonuç olarak dengesiz gametlerin oluşumlarına yol açmaktadır (Shah ve ark., 2003).

### ***46,XX Erkek Sendromu***

46,XX Cinsiyet Gelişiminin Testiküler Bozukluğu (46,XX Testicular Disorder of Sex Development; Testicular DSD, 46,XX Erkek Sendromu) infertil erkeklerde nadir görülen cinsiyet kromozom anomalisidir (Chiang ve ark., 2013).

Paternal mayoz bölünme esnasında X ve Y kromozomları, kısa ve uzun kollarının distallerinde bulunan psödootozomal bölgede (pseudoautosomal region; PAR) rekombinasyon yaparlar (De La Chapelle, 1981). Psödootozomal bölgede X ve Y kromozomlarında bulunan DNA dizileri benzerlik göstermektedir. Cinsiyet belirleyici gen (*Sex-determining region on Y; SRY*), Y kromozomunun kısa kolunda yer almaktadır ve psödootozomal bölgeye oldukça yakındır. Rekombinasyonun psödootozomal bölgenin dışını kapsamaması durumunda *SRY* genini içeren Y kromozom dizileri, X kromozomunun kısa koluna transloke olur (Ferguson-Smith, 1966). *SRY* geni X kromozomuna transloke olan erkeklerin Y kromozomunun uzun kolu üzerinde bulunan spermatogenezle ilişkili azospermik faktör (azoospermia factor region; AZF) bölgelerinin olmaması nedeniyle azospermiktirler (Oates, 2008; Güneş ve ark., 2013). 46,XX karyotipli erkeklerin %80'inde *SRY* pozitif, diğerleri ise *SRY* negatiftir (Uçan ve ark., 2013). 46,XX *SRY* negatif karyotipine, *DAX1* ve *SOX9* genleri mutasyonlarının sebep olabileceği bildirilmektedir (Kim ve ark., 2010).

### ***İnversiyonlar***

İnversiyonlar, mayoz bölünmede homolog kromozomların eşleşmesi sırasında delesyon ve duplikasyon oluşumuna yol açarak (Shak ve ark., 2003) germ hücre arresti veya yüksek oranda anöplid sperm hücrelerinin oluşumuna neden olmaktadır (Anton ve ark., 2005; Chantot-Bastaraud ve ark., 2007). İnfertil erkeklerde 1, 3, 4, 6, 9, 10 ve 21. kromozom inversiyonları yaygındır (Dada ve ark., 2006). 1, 3, 5, 6, 10 numaralı kromozomlarda meydana gelen inversiyonların sperm üretim kapasitesini % 1-54 oranında azaltarak infertiye yol açtığı saptanmıştır (Krausz ve ark., 2000).

### ***Marker Kromozom***

İnfertil erkeklerde marker kromozomların fertil erkeklere göre 8 kat daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir (De Braekeleer ve ark., 1991).

### **2.1.3. Y Kromozomu Yapısal Bozuklukları**

#### ***İzodisentrik Y Kromozomları***

Y kromozomunda yer alan amplikonik dizilerin rekombinasyonun meydana geldiği bölgelerde olmaları nedeniyle iki sentromerli izodisentrik (idic) Y kromozomu oluşumuna yol açar (Lange ve ark., 2009). İzodisentrik Y kromozomları birleşim biçimlerine göre iki şekilde sınıflandırılır.

1. ***idicYq kromozomu:*** Y kromozomunun kısa kollarının kırılması ve uzun kollarının sentromer bölgesinde birleşmeleri sonucunda meydana gelir.

2. ***idicYp kromozomu:*** Y kromozomunun uzun kollarının kırılması ve kısa kollarının sentromer bölgesinde birleşmesi sonucunda meydana gelir. idicYp kromozomu infertil erkeklerde Y kromozomu mikrodelsyonlarıyla birlikte görülebileceği bildirilmiştir (Güneş ve Aşçı, 2013).

#### ***Y Kromozomu Mikrodelsyonları***

Y kromozomu mikrodelsyonları, azosperminin en yaygın nedenidir ve azospermik infertil erkeklerin % 5-15'inde görülmektedir (Chandley, 1979; Poongothai ve ark., 2009). Y kromozomunun uzun kolu üzerinde bulunan AZF bölgesi, sperm gelişimi ve farklılaşmadan sorumludur (Poongothai ve ark., 2009). AZF bölgesi çoklu gen aileleri, AZFa, AZFb, AZFc bölgelerini içermektedir (Ferlin ve ark., 2007). AZF

bölgesi delesyonlarının % 69'u AZFc , %6'sı AZFa ve % 14'ü AZFb bölgesinde görülmektedir (Massart ve ark., 2012).

#### **2.1.4. X Kromozomuna Bağlı Bozukluklar**

X kromozomu üzerinde yer alan *TEX11* (Xq13.1) ve *TAF7L* (Xq22.1) genleri sinaps oluşumu ve crossing overin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonların, segregasyon bozukluklarına ve azospermiye neden olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark., 2011).

*Androjen reseptörü (AR)* geni, Xq11.2-12'de yer almaktadır (Stouffs ve ark., 2009). *AR* geninde meydana gelen mutasyonlar 46,XY infertil kadın ve 46,XY azospermik erkek fenotiplerine neden olmaktadır (Arnedo ve ark., 2005). X'e bağlı *androjen reseptörü* geni lokusundaki normal alel, reseptör proteinin testesteron ve dihidrotestesteron ile kompleks oluşturmasını sağlar. Bu kompleks oluşamazsa hormon nukleusa giremez ve erkek yönünde farklılaşma için gerekli hedef genlerin transkripsiyonu uyarılamaz. Ayrıca, *AR* geninde ekzon 1'de (CAG)<sub>n</sub> ve (GGC)<sub>n</sub> olmak üzere polimorfizm gösteren iki tekrar dizisi bulunmaktadır (Stouffs ve ark., 2009). Yapılan bazı çalışmalarda CAG tekrar dizisi uzunluğu ile erkek infertilitesi arasında ters bir ilişki olduğu tespit edilirken (Dowsing ve ark., 1999) diğer çalışmalarda böyle bir ilişkiye rastlanmamıştır (Tufan ve ark., 2005).

Kallman Sendromu, 30,000 doğumda bir görülen yaygın infertilite problemidir. Olguların yaklaşık % 11'i X kromozomuna bağlı gen mutasyonu gösterirken, diğerleri otozomal kalıtım şekli göstermektedir. Erken embriyonik dönemde X kromozomu üzerinde *KAL-1* (Xp22.3) genindeki delesyonun neden olduğu Kallman Sendromu, azalmış gonodotropin salıcı hormon (GNRH) düzeyi ile karakterizedir (Walsh ve ark., 2009).

#### **2.1.5. Kistik Fibrosiz Transmembran Düzenleyici (CFTR) Gen Mutasyonları**

Kistik Fibrosiz otozomal resesif bir hastalıktır. *CFTR* genindeki (7q31.20) mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Kistik fibrosizli erkeklerin % 90'ı konjenital bilateral vas deferens agenezine (congenital bilateral absence of the vas deferens; CBAVD) bağlı olarak obstrüktif azospermiktir (Walsh ve ark., 2009).



### 2.1.6. Mitokondriyal DNA Bozuklukları

Sperm mitokondrisi spermatogenez ve sperm hareketliliği için gereken enerjiyi sağlar. Artan yaş ve oksidatif strese bağlı olarak spermde mitokondriyal DNA delesyonları artmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, azospermik erkeklerde mitokondriyal DNA delesyon oranının fertillere göre arttığı tespit edilmiştir (O'Connel ve ark., 2002).

### 2.2. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Geni

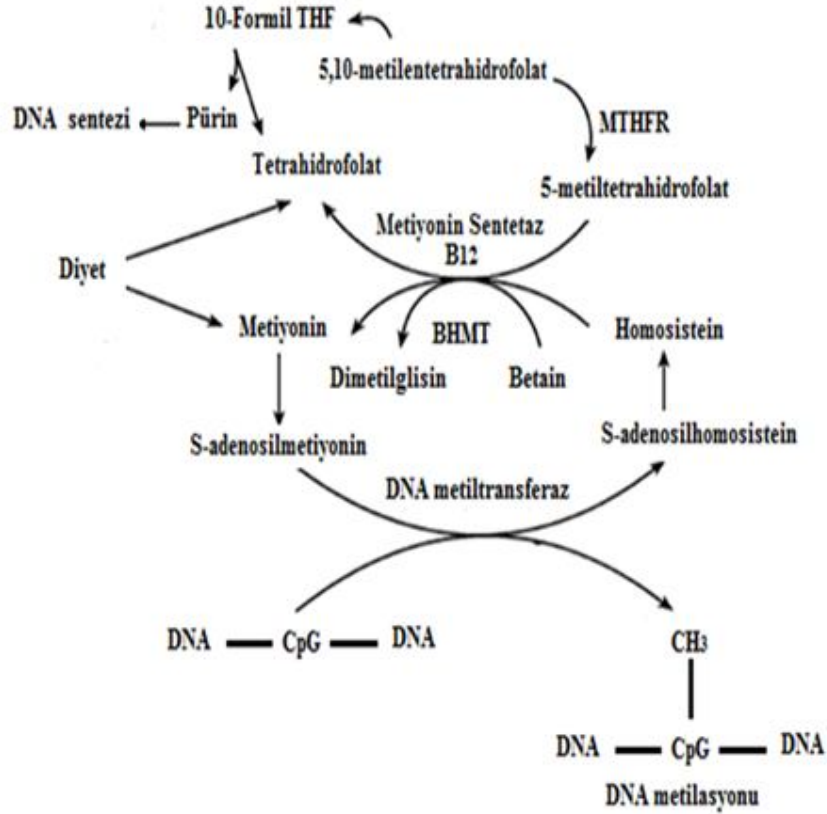
İnsan *MTHFR* geni 1 numaralı kromozomun kısa kolunda (1p36.3) yer almaktadır ve 11 ekzondan oluşmuştur (Frosst ve ark., 1995; Goyette ve ark., 1998). Bu gen 656 amino asitten oluşan MTHFR enzimini kodlamaktadır. MTHFR enzimi folat metabolizması, DNA sentezi ve metilasyon reaksiyonlarının temel düzenleyicisidir (Wu ve ark., 2010). MTHFR enzimi, folat metabolizmasında önemli rol oynamasının yanısıra DNA metilasyonu ve spermatogenez için kritik role sahiptir (Nutti ve ark., 2008). *MTHFR* geni, spermatogenik bozukluklara yatkınlık oluşturabilecek aday genlerden biridir (Eloualid ve ark., 2012). MTHFR enzimi 5,10-metilen tetrahidrofolatın 5-metil tetrahidrofolata indirgenmesini kataliz eder (Goyette ve ark., 1994). 5-metil tetrahidrofolat, homosisteinin metiyonine yeniden metilasyonu için metil grubu sağlar. MTHFR, hücre içinde metil gruplarının gen havuzu içinde dengelenmesinde anahtar rol oynar (Wu ve ark 2010). 5,10-metilen tetrahidrofolat, pürin sentezi için 10 formil tetrahidrofolata okside olmaktadır (Bagley ve ark., 1998; Bailey ve ark., 2002).

Homosistein metilasyonu sonucunda metiyonin oluşmaktadır. Homosisteinden metiyonin sentezlenme mekanizması iki farklı şekilde gerçekleşebilir.

Betain metil grubu vericisidir. Betain bir metil grubunu homosisteine aktararak homosisteini metiyonine dönüştürür. Bu reaksiyon Betain homosistein metiltransferaz (BHMT) enzimi katalizörlüğünde gerçekleşmektedir. Betain ise bu işlem sonunda dimetilglisine dönüşür.

Diğer bir yol ise şu şekilde gerçekleşmektedir. 5,10-metilentetrahidrofolat, MTHFR enzimi katalizörlüğünde 5-metiltetrahidrofolata dönüşür. Metil grubu vericisi olan 5-metiltetrahidrofolat bir metil grubunu homosisteine aktararak metiyonin oluşturulur bu reaksiyon kofaktörü vitamin B12 olan metiyonin sentez katalizörlüğünde

gerçekleşmektedir. 5-metil tetrahidrofolat metil grubunu verdikten sonra kendisi tetrahidrofolata dönüşür (Dikmen, 2004). MTHFR enziminin metabolik yolağı Şekil 1’de gösterilmektedir.



**Şekil 1.** MTHFR enziminin metabolik yolağı (Kim, 1999’den uyarlanmıştır) **THF:** Tetrahidrofolat  
**BHMT:** Betain homosistein metiltransferaz

S-adenozilmetiyonin (SAM), DNA metilasyon mekanizmalarında global metil grubu vericisidir (Li, 2002). S-adenozilmetiyoninden metil grubunun aktarılması ile S-adenozilhomosistein (SAH) oluşur. SAH’nın hidrolize olmasıyla homosistein ve adozin oluşur (Marks ve ark., 2007).

*MTHFR* geni polimorfizmleri azalan enzim aktivitesi nedeniyle hiperhomosisteinemi ve infertilite de dahil olmak üzere bir çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Austin ve ark., 2004). *MTHFR* C677T ve A1298C polimorfizmleri en yaygın araştırılan polimorfizmler arasındadır (Jacques ve ark., 1996; Rozen, 1997). *MTHFR* C677T polimorfizmi, 222. kodonda alanin yerine valin değişimine, *MTHFR*

A1298C ise 429. kodonda glutamat yerine alanin değişimine yol açmaktadır (Frosst ve ark., 1995). *MTHFR* C677T varyantı, enzim aktivitesini azaltırken homosistein seviyesini arttırmaktadır, benzer bir şekilde A1298C varyantı C677T varyantı kadar olmamakla birlikte enzim aktivitesini azaltmaktadır (Frosst ve ark., 2005; Ebisch ve ark., 2003). Yapılan çalışmaların bir bölümü *MTHFR* geni polimorfizmleri ve erkek infertilitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu (Singh ve ark., 2005; Chan ve ark., 2010; Wu ve ark., 2010; Gava ve ark., 2011; Safarinejad ve ark., 2011) gösterirken diğerleri bu ilişkinin varlığını göstermemiştir (Bezold ve ark., 2001; Lee ve ark., 2006; Paracchini ve ark., 2006; Ravel ve ark., 2009; Montjean ve ark., 2011).

Folat düzeyi ile infertilite arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (Safarinejad ve ark., 2011). Folatın antioksidant özelliği olduğu bildirilmiştir (Doshi ve ark., 2002). Seminal plazmadaki düşük folat konsantrasyonunun artan sperm DNA hasarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Boxmeer ve ark., 2009). Wallock ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada hem sigara içen hem de içmeyen erkeklerde seminal plazmalarındaki düşük sperm folat konsantrasyonu, sperm yoğunluğu ve sayısının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Wallock ve ark., 2001). Serum folat düzeyi ile serum total homosistein konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon olduğu belirtilmiştir (Ganji ve ark., 2004). Serumda azalmış vitamin B düzeyi, homosistein konsantrasyonunun azalmasına ve remetilasyon döngüsünün zayıflamasına neden olduğu bildirilmiştir (Friso ve ark., 2005). Bu süreçler, spermatogenez için önemlidir (Boxmeer ve ark., 2009). Ejekulatta yüksek homosistein konsantrasyonunun zararlı etkilere yol açtığı saptanmıştır (Ebisch ve ark., 2006).

Gava ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 55 obstrüktif olmayan azospermik, 78 şiddetli oligospermik ve 173 sağlıklı Brezilyalı erkekte *MTHFR* geni C677T, A1298C, G1793A polimorfizmlerinin infertilite ile olası ilişkisi araştırılmıştır. T allelini taşıyan obstrüktif olmayan azospermik erkeklerin 1,97 kat ve şiddetli oligospermik erkeklerin 3,66 kat daha fazla infertilite riski taşıdıkları tespit edilmiştir. Sonuç olarak *MTHFR* geni C677T polimorfizmi Brezilyalı erkek popülasyonunda idiopatik erkek infertilitesiyle ilişkilendirilmiştir. Diğer yandan, Brezilyalı erkek popülasyonunda A1298C ve G1793A polimorfizmleri ise idiopatik erkek infertilitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Gava ve ark., 2011).

Yapılan bir diğerk çalışmada 344 idiopatik infertil ve 450 fertil Faslı erkekte *MTHFR* geni A1298C polimorfizmi araştırılmıştır. Şiddetli oligospermik C/C genotipli homozigot erkeklerin A/A genotipli erkeklere göre 3,372 kat daha fazla infertilite riski taşıdığı tespit edilmiştir. 1298C aleli Fas populasyonunda azalan sperm sayısıyla ilişkilendirilmiştir (Eloualid ve ark., 2012).

Safarinejad ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 164 infertil ve 328 fertil İranlı erkekte *MTHFR* C677T, A1298C, G1793A polimorfizmleri ve infertilite arasındaki ilişki araştırılmıştır. T/T genotipli homozigot bireylerin 2,76 kat, C/T genotipli heterozigotheterozigot bireylerin ise 1,63 kat daha fazla infertilite riski taşıdıkları tespit edilmiştir. A1298C ve G1793A polimorfizmleri ise infertiliteyle ilişkilendirilmemiştir.

Ayrıca 677T, 1298C, 1793G alellere sahip erkeklerde daha yüksek serum homosistein ve daha düşük folat seviyesi saptanmıştır. Sperm folat konsantrasyonu ile sperm yoğunluğu, sperm hareketlilik yüzdesi ve sperm normal morfoloji yüzdesi arasında positif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Safarinejad ve ark., 2011).

Shen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, Çin populasyonunda *MTHFR* 1298C aleli idiopatik erkek infertilitesi için genetik bir risk faktri oluşturduğu tespit edilmiştir (Shen ve ark., 2012).

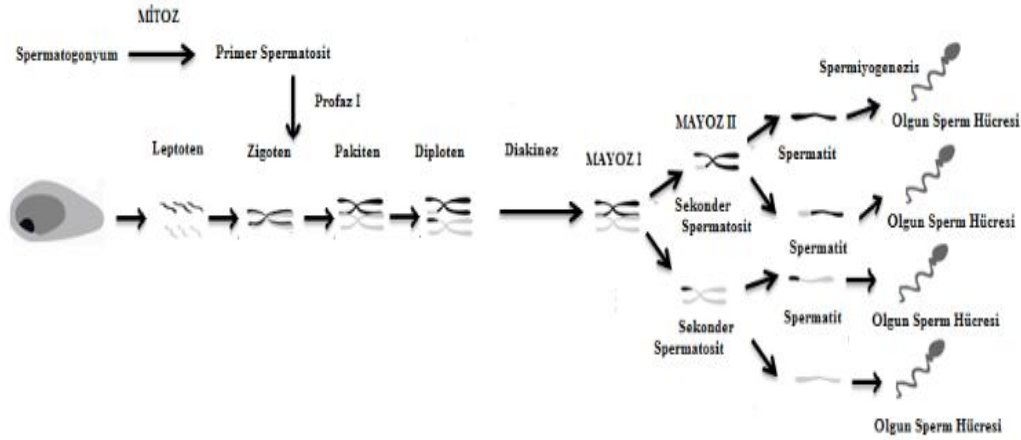
Benzer biçimde *MTHFR* C677T polimorfizminin Hindistan, Çin, Kore, Asya populasyonlarında idiopatik erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu (Lee ve ark., 2006; Zhou-Cun ve ark., 2007; Gupta N. ve ark.; 2011; Wu ve ark., 2012) Cezayir, İtalya, Kafkas populasyonlarında ise idiopatik erkek infertilitesiyle ilişkili olmadığu (Stuppia ve ark., 2003; Chellat ve ark., 2012; Wu ve ark., 2012) bildirilmiştir.

Ayrıca, *MTHFR* A1298C polimorfizmi Hindistan ve İran populasyonlarında idiopatik erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu (Singh ve ark., 2010; Shen ve ark., 2012) Kafkas ve Asya populasyonlarında ise ilişkili olmadığu (Shen ve ark., 2012) bildirilmiştir.

### **2.3. Spermatogenez**

Spermatogonyumlar, mitoz bölünmeyle çoğalarak A tipi spermatogonyumlar olarak adlandırılan kök hücreleri ya da primer spermatositlere farklılaşan B tipi spermatogonyumları oluşturur (Junqueira ve ark., 2006). Primer spermatositler diploit

hücrelerdir ve birinci mayoz bölünme sonrası sekonder spermatositlere dönüşür. Sekonder spermatositler de ikinci mayoz bölünme sonrası yuvarlak spermatidlere dönüşür (Zamudio ve ark., 2008). Spermatogenez olayı Şekil 2’de gösterilmektedir (Güneş ve Kulaç, 2013).



Şekil 2. Spermatogenez (Güneş ve Kulaç, 2013’den uyarlanmıştır)

## 2.4. Spermiyogenez

Spermiyogenez esnasında yuvarlak spermatitler uzamaya başlayarak uzamış (elongated) spermatit halini alırlar. Olgun sperme dönüştüklerinde baş, boyun ve kuyruk kısımlarından oluşurlar. Baş kısmında hücrenin nükleusu yoğun, sitoplazması azalmış ve sitoplazmanın çevresinde hücre membranı bulunmaktadır. Başın ön kısmında golgi aygıtından oluşan akrozom bulunmaktadır (Guyton, 2007).

Spermiyogenez akrozom oluşumu, nükleus yoğunlaşması, kuyruk gelişimi ve sitoplazmik kaybı içeren karmaşık bir evredir (Junqueira ve ark., 2006). Olgun sperm üretimi spermiyogenezin en son aşamasıdır. Spermiyogenez üç aşamada incelenebilir:

### ***Golgi Evresi***

Yuvarlak spermatid sitoplazması golgi aygıtı, mitokondriler, bir çift sentriol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum içerir. Akrozomal granüller golgi aygıtında birikerek akrozomal vezikülün içinde yer alan akrozomal granülü oluşturur.

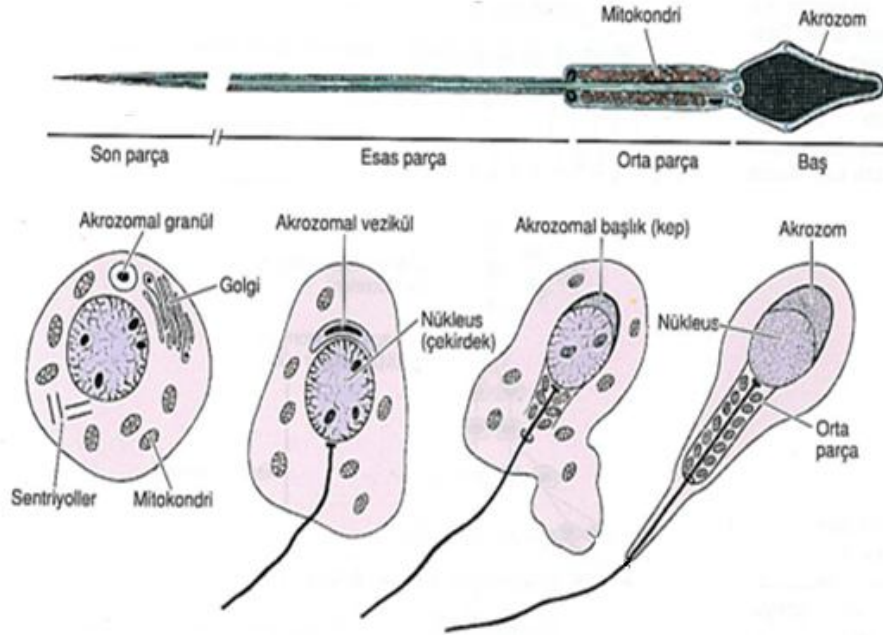
### ***Akrozomal Evre***

Akrozomal vezikül ve granül yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplar ve akrozom adını alır. Akrozom hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfotaz ve bazı hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler, fertilizasyon esnasında oositin çevresindeki korona radyata hücrelerini birbirinden ayırır ve zona pellisudayı parçalar. Olgun sperm hücresi bir oositle karşılaştığında akrozom dış membranı, sperm hücre zarıyla kaynaşarak akrozomal enzimler hücre dışına boşalır. Bu mekanizma döllenmenin ilk aşamalarında gerçekleşen akrozomal reaksiyon olayıdır.

Spermiyogenezin bu evresinde nükleus uzar ve sperm DNA'sı kondanse olur. Sentriyollerden biri gelişerek flagellumu oluşturur. Flagellumun baş kısmında mitokondri bir araya gelerek spermin orta kısmını oluşturur. Mitokondri, sperm hareketi için gerekli olan enerjiyi sağlar. Fertilizasyon esnasında spermin yalnızca baş kısmı oosit içerisine girdiğinden mitokondri DNA'sı anne tarafından fetusa aktarılır.

### ***Matürasyon (Olgunlaşma) Evresi***

Bu evrede, sitoplazma kalıntıları sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve olgun sperm hücresi seminifer tübülün lümenine salınır (Junqueira ve ark., 2006) (Şekil 3).



**Şekil 3.** Spermiyogenez (Junqueira ve ark., 2006'dan uyarlanmıştır).

## 2.5. Epigenetiğin Spermatogenezdeki Rolü

Epigenetik, mitotik ve/veya mayotik olarak kalıtılabilen DNA dizilerinde değişim olmaksızın gen ifadesinin kalıtılabilir değişimleridir (Carrell, 2012). Eski Yunanca'da, epi- ön eki üstünde, üzerinde, ötesinde anlamını taşımaktadır. Bundan dolayı adı genetiğin üzerinde ya da ötesinde anlamına gelmektedir (Dada ve ark., 2012).

Epigenetik mekanizmalar, organizmanın yaşamı boyunca gelişimin farklı evrelerinde, replikasyon ve gen ekspresyonu esnasında düzenleyici rolü olan çok çeşitli proteinlerin DNA ile etkileşimini düzenlemektedir. Her hücre çeşidinin kendine özgü epigenetik karakteri vardır. Bu epigenetik karakter canlının gelişim öyküsünü ve çevresel etkilerini, hücre ve organizmanın fenotipinde yansıtır (Angers ve ark., 2010).

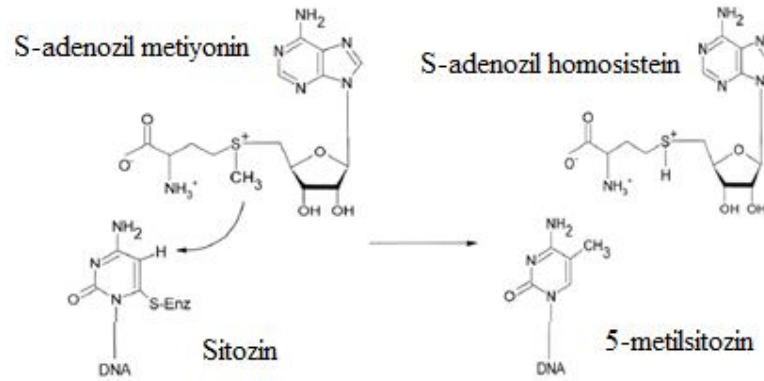
DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yeniden düzenlenmeleri temel epigenetik değişikliklerdir (Rajender ve ark., 2011).

### 2.5.1. Sperm DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, CpG adacığında bulunan sitozin nükleotidinin pirimidin halkasının 5. karbonuna bir metil grubunun eklenmesiyle meydana gelen bir biyokimyasal işlemdir (Talbert ve ark., 2006). CpG adacıkları yaklaşık 500 bp uzunluğundaki genomik bölgelerdir (Takai ve ark., 2002). CpG adacıkları memeli genlerinin yaklaşık %40'ının promotor bölgesinde yer alır. Promotor bölgesinde yer alan ve CpG adacıklarında görülen DNA metillenmesi transkripsiyon düzeyinde kalıtılabilir susturmaya yol açar. CpG adacıklarında görülen DNA metillenmesi, gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde, özellikle genlerin promotor bölgelerindeki metillenme, transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgesine bağlanma yerlerinde değişiklikler meydana getirerek ya da metillenmiş DNA'ya özgül olarak bağlanabilen represörlerin bağlanmasını engelleyerek gen ifadesinin baskılanmasında rol oynamaktadır (Yi ve ark., 2009; Klug ve ark., 2011).

DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz (DNMT) enziminin etkisiyle meydana gelir. S-adenozil metiyoninden bir metil grubunun sitozine verilmesi üç DNA metil transferazdan biri [bir DNMT1, bir DNMT2, üç DNMT3 (DNMT3a/3b ve DNMT3L)] tarafından kataliz edilir (Yi ve ark., 2009). DNMT1, DNA replikasyonu sırasında DNA metilasyonunun devamından sorumludur. DNMT3'ler *de novo* metiltransferazlardır ve erken embriyonik gelişim döneminde genomik DNA'yı metillemektedir. DNMT2'nin

rolü tam olarak açıklanamamakla birlikte tRNA metiltransferazı olarak etki edebileceği önerilmektedir (Okano ve ark., 1998; Yi, 2009; Miklos ve ark, 2011). Kazanılan değişiklikler devamlı ve kalıcıdır (Wilson ve ark., 1983; Richardson ve ark., 2002). Hipometilasyon ve hipermetilasyon genomun farklı bölgelerinde kendiliğinden meydana gelebilir (Issa, 2000). Sitozin bazının metillenerek 5-metilsitozine dönüşümü Şekil 4’te gösterilmektedir.



Şekil 4. Sitozin bazının metillenerek 5-metilsitozine dönüşümü (Turek-Plewa ve ark., 2005’den uyarlanmıştır)

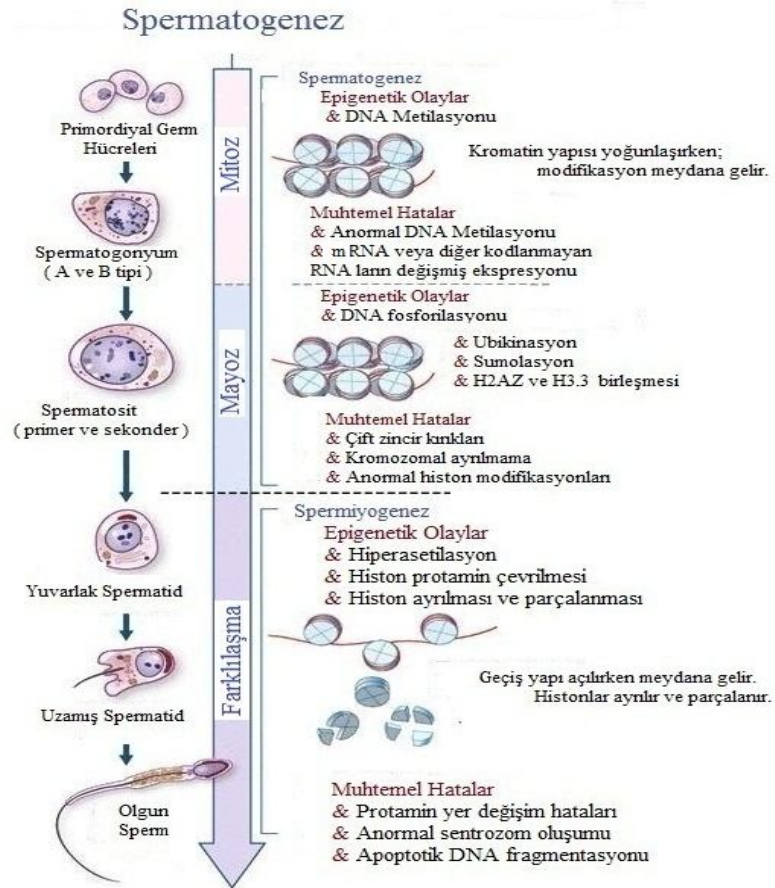
### 2.5.2. Sperm Histon Modifikasyonları

Histonlar, ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde yer alan ve DNA’nın nükleozomlar halinde paketlenmesini sağlayan, lizin ve arjinine zengin olan bazik proteinlerdir. H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinleri nükleozomun çekirdek bölümünde yer almaktadırlar (Campos ve ark., 2009). Histonlar, basit kimyasal modifikasyonlarla DNA’nın bağlanma ve diğer düzenleyici faktörlerin DNA ile etkileşebilme özelliklerini değiştirerek, gen aktivasyonunda da değişime yol açmaktadırlar. Histon modifikasyonları asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubikinyasyon ile gerçekleştirilir. Genel olarak, histon H3 ve H4’ün asetilasyonu transkripsiyonel aktivasyona yol açmaktadırlar (Liu ve ark., 2011). Deasetilasyon ise transkripsiyonel inaktivasyona yol açıp genel olarak metilasyon ile korelasyon göstermektedir. Genel olarak histon asetilasyonu transkripsiyonun aktif olduğu bölgelerde görülürken, hipoasetile histonlar ise inaktif ökromatin ve heterokromatin bölgelerde yer alır (Peng ve ark., 2011). Histonların metilasyonu ise hem aktif hem de inaktif kromatin bölgelerinde yer almaktadır. Bir diğer düzenleyici mekanizma da histon kuyruklarındaki



lizinin metilasyonudur. Histon H3'ün amino terminalindeki 9. lizinin metilasyonu (H3-9K) DNA'nın sessizleştirmesine yol açmakta ve heterokromatik bölgelere yayılmaktadır. Diğer yandan, histon H3 proteininin 4. lizinin (H3-4K) metilasyonu aktivasyonla ilişkili olup ağırlıklı olarak aktif genlerin promotor bölgelerinde yer almaktadır. Spermatogenez sırasında histonların kuyruklarının metilasyonu H3-K4 ve H3-K9 metiltransferaz tarafından gerçekleştirilmektedir (Carrell ve ark., 2008).

Gelişim sırasında germ hücrelerinin epigenetik profili değişmektedir (Kimmins ve ark., 2005; Surani ve ark., 2007). Spermatogenez sırasındaki epigenetik değişimler Şekil 5'te gösterilmektedir. Germ hücrelerinin epigenetik profilleri mayozun farklı aşamalarında değişime uğrar (Dada ve ark., 2012).



**Şekil 5.** Spermatogenez sırasındaki epigenetik değişimler (Dada ve ark., 2012'den uyarlanmıştır)

**H2AZ:**Histon 2AZ **H3.3:** Histon 3.3

Premayotik primordiyal germ hücreleri (primordial germ cells; PGC) ve spermatogonia, özgün histon H3K9me3 modifikasyonu modelini gösterir (McLaren, 2003; Payne ve ark., 2006). Ancak, erkek germ hücrelerinde mayozun başlamasıyla bu modeller değişirler (Peters ve ark., 2001). Oakes ve arkadaşları genom boyunca DNA metilasyonunun özelliklerinin spermiyogenez sırasında pakitten sonra az değiştiğini bildirmiştir (Oakes ve ark., 2007).

Bu iki epigenetik düzenleyici mekanizma, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu, gen ekspresyonunda birbiriyle sıkı şekilde ilişkilidir. Gen ekspresyonunun başarılı epigenetik kontrolü sıklıkla her iki mekanizmanın işbirliği ve etkileşimine ihtiyaç duyar (Carrell, 2012).

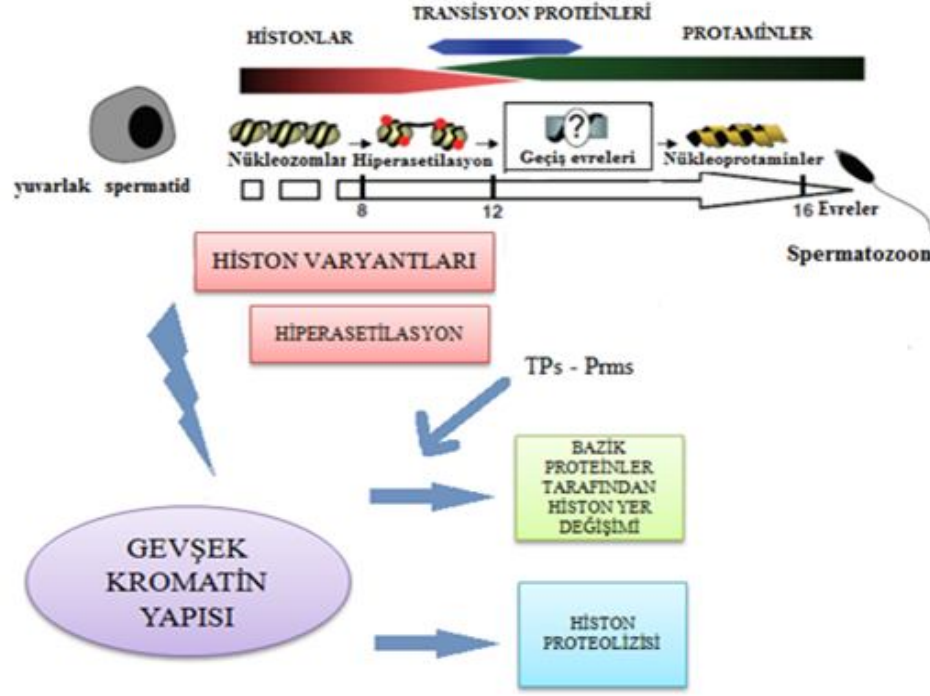
### **2.5.3. Spermiyogenez Sırasında Kromatin Modifikasyonu**

Fertilizasyon, spermin dişi üreme sistemi boyunca hareketi, zona pellusidaya bağlanma ve oosit içine penetrasyonu ve çok sayıda penetrasyon sonrası olayı kapsamaktadır (Yanagimachi, 2005). Bu aşamaların hasarsız başarılı olabilmesi için sperm hücresinde histonların %90-95'i protaminlerle yer değiştirir (Oliva, 2006).

Protaminler arjinince zengin ve spermiyogenez sırasında sentezlenen küçük proteinlerdir (Balhorn, 1982). Sperm kromatin protaminasyonu sperm genomunun sıkılaştırılmasını kolaylaştırır, oksitlenmekten ve dişi üreme sistemi içerisindeki zararlı moleküllerden korur. Böylece genom için güvenli koşullar sağlanır. Protaminasyon sonrası DNA'nın ileri derece paketlenmesi transkripsiyonu engellemektedir. Protaminasyon, sperm hücrelerine özgü epigenetik düzenlenmedir (Oliva, 2006).

Fertilizasyon öncesinde olgun spermin taşıdığı paternal haploid genom protaminlerle sıkıca paketlenirken, metafaz II'de baskılanan maternal genom histon proteinleri ile paketlenir. Fertilizasyon sonrasında protaminler hızlıca histonlarla yer değiştirmekte ve oosit metafaz II'yi tamamlamaktadır.

Sperm kromatin protaminasyonu Şekil 6'da gösterilmektedir. Yapılan araştırmalar fertil erkeklerde DNA'nın yaklaşık %5-10'nun, infertil erkeklerde ise daha fazlası histonlara bağlı kaldığını göstermektedir (Hammoud ve ark., 2009; Hammoud ve ark., 2011).



Şekil 6. Spermiyogenez esnasında histonların protaminlerle yer değiştirmesi (Gaucher ve ark., 2010'dan uyarlanmıştır) **TPs**: Transisyon Proteinleri **Prms**: Protaminler

## 2.6. Çevresel Faktörler ve Epigenetik

Bazı çevresel faktörlerin, semen parametreleri üzerinde olumsuz etki yaratan epigenetik düzenlenmelere neden olduğu tespit edilmiştir. Seminal reaktif oksijen türlerinin üretiminin artmasının, DNA fragmentasyonunun artışı ve DNA hipometilasyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Tunc ve ark., 2009). İnfertil erkeklerin, fertil erkeklere nazaran daha fazla DNA fragmentasyonu ve daha yüksek seviyede seminal serbest oksijen türlerine sahip oldukları tespit edilmiştir (Tunc ve ark., 2009). Bu bilgilere dayanılarak oksidatif strese bağlı ortaya çıkan DNA hasarının anormal global DNA metilasyon oluşumunu kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (Rajender ve ark., 2011). Üç ay süresince antioksidanlarla tedavi edilen deneklerde, DNA hasarında ve reaktif oksijen seviyesinde bir azalma ve global DNA

hipometilasyonunda artış görülmüştür (Tunc ve ark., 2009). Oakes ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, bir anti kanser ajanı olan 5-aza-2'-deoksisitidinin global hipometilasyona sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca global hipometilasyonun değişmesi sperm morfolojisi, azalmış sperm hareketliliği, azalmış fertilizasyon kapasitesi ve azalmış embriyo sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir (Oakes ve ark., 2007). 5-aza-2'-deoksisitidin erkek germ hücrelerinde *de novo* metilasyonu engellediği bildirilmiştir (Rajender ve ark., 2011).

Metoksiklor ve vinklozolin gibi endokrin bozucuların spermatogenez bozukluklarına ve erkek infertilitesi oluşumuna yol açtığı birkaç çalışmada gösterilmiştir. Anway ve arkadaşlarının (Anway ve ark., 2005) yaptıkları bir çalışmada, gebelik esnasında annenin geçici bir süre metoksiklora (östrojenik pestisit) ve vinklozoline (anti androjenik fungusit) maruz bırakılması, erkek dölde azalmış sperm sayısı ve yaşayabilirlik, azalmış spermatogenik hücre apoptosizi, anormal seminifer tubül morfolojisi ve infertiliteye sebep olduğu ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon değişimlerinin Türkiye populasyonunda idiopatik erkek infertilitesiyle ilişkili olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Oluşturulması ve Özellikleri

Bu tez çalışmasına 12 Nisan 2012 -15 Mayıs 2013 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Üroloji Polikliniğinde infertilite tanısı alan, yaşları 25-40 arasında değişen, 31 NOA infertil erkek ve 46 şiddetli oligospermik hasta dahil edilmiştir. OMÜ KAİK 2012/04 karar nolu tez çalışmamızın amaç, gereç, yaklaşım ve yöntemiyle ilgili açıklamalarımız Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre 31.05.2012 tarihli Etik Kurulda incelenmiş ve etik açıdan uygunluğu oy birliği ile kabul edilmiştir (Bkz: Ek). Bu hastalarla aynı yaşta olan sperm motilitesi ve morfolojisi normal 49 gönüllü normospermik erkek kontrol grubuna dahil edilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin dokuzu fertil iken diğerleri kadın faktörü nedeniyle infertilite gözlenen çiftlerdeki erkekler arasından seçildi. Hasta ve kontrol gruplarına gönüllü olur formu imzalatılmıştır. Kromozom anomalisi, kistik fibrosis ve Y kromozomu mikrodelesyonu gözlenen hastalar ve lökosit içeren ejakulat örnekleri çalışma grubuna dahil edilmemiştir. Ayrıca 18 azospermik hastanın DNA izolasyonu sırasında oluşan teknik aksaklıklardan dolayı başarılı bir şekilde DNA'ları izole edilemediğinden çalışmamıza dahil edilemedi. Benzer bir şekilde metilasyon profillerini belirlediğimiz 4 tane Klinefelter Sendromlu azospermik hastanın sonuçları metilasyon profilleri belirlendiği halde çalışmaya dahil edilmedi.

DNA izolasyonu, tüp bebek tedavisi için testiküler sperm ekstrasyonu (testicular sperm extraction, TESE) yapılan azospermik hastaların testis biyopsisi örneklerinden, şiddetli oligospermik infertil ve normospermik erkeklerin de ejakulat spermatozoalarından yapılmıştır. Ejakulat örneklerinden bekletilmeden DNA izolasyonu yapılmıştır. Azospermik erkeklerden TESE ile alınan testis biyopsisi örnekleri ise DNA izolasyonu yapılmıyaya kadar derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2010 yılı kriterlerine göre normal sperm morfoloji oranı  $\geq$  %4 ve normal sperm motilite oranı  $>$  %40 olarak değerlendirilmiştir (Dünya Sağlık Örgütü, 2010). şiddetli oligospermik ve normospermik erkeklerde morfolojik ve motilite değerlendirilmesi bu kriterlere göre yapılmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen bireylerde sperm konsantrasyonu  $\geq$ 30 milyon/ml olan erkekler normospermik,  $\leq$ 5 milyon/ml olan erkekler ise şiddetli oligospermik

olarak kabul edildi. Normospermik erkeklerin yaş ortalaması 32, oligospermik ve azospermik erkeklerin yaş ortalaması ise sırasıyla 29 ve 31 olarak tespit edildi.

### 3.2. Testis Biyopsisi Örneklerinden DNA İzolasyonu

Azospermik hastalardan TESE yöntemiyle alınan testis biyopsisi örneklerinden DNA izolasyonu ZR Genomic DNA™-Tissue MicroPrep Kiti (Zymo Research, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

DNA izolasyonuna başlanmadan önce 100 ml Genomic Lysis Buffer üzerine 500 µl beta-mercaptoethanol ilave edildi. 5 mg Proteinaz K, 260 µl Proteinase K Stok Tamponu ile sulandırıldı. Son proteinaz K konsantrasyonu ~20 mg/ml olarak elde edildi.

DNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Eppendorf tüpü içerisindeki testis biyopsisi örneği kısa bir santrifüj yapılarak dokunun tüpün dibine çökmesi sağlandı.
2. Eppendorf tüpü içerisindeki doku üzerine 95 µl saf su, 95 µl Sindirim (Digestion) Tamponu, 10 µl proteinaz K konuldu.
3. Hafif bir vorteks yapılarak solüsyonların karıştırılması sağlandı.
4. Doku, 55°C'de su banyosunda 3 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon süresi boyunca 15-20 dakikada bir vorteks yapılarak tam liziz olması sağlandı.
6. Su banyosundan alınan Eppendorf tüpündeki doku üzerine 700 µl Genomik Lizis Tamponu eklendi.
7. Oda sıcaklığında 13,000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatant toplama tüpüne yerleştirilen 'Zymo-Spin™ IC kolon içerisine aktarıldı.
9. Oda sıcaklığında 13,000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın spin kolondan tamamıyla akması gerektiği için santrifüj işlemi gerektiğinde tekrarlandı.
10. 'Zymo-Spin™ IC kolon, temiz toplama tüpüne aktarıldı.
11. 'Zymo-Spin™ IC kolona 200 µl DNA Ön yıkama (Prewash) Tamponu eklendi.

12. Oda sıcaklığında 13,000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi. Yıkama Tamponunun spin kolondan tamamıyla akması için gerektiğinde santrifüj işlemi tekrarlandı.
13. 'Zymo-Spin™ IC kolon, temiz toplama tüpüne aktarıldı.
14. Zymo-Spin™ IC kolona 400 µl g-DNA Yıkama (Wash) Tamponu eklendi.
15. Oda sıcaklığında 13,000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi. Yıkama Tamponunun spinden tamamıyla akması için gerektiğinde santrifüj işlemi tekrarlandı.
16. 'Zymo-Spin™ IC kolon steril Eppendorf tüpüne yerleştirildi.
17. Spin kolonun merkezine 80 µl Elüsyon Tamponu koyuldu.
18. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
19. Tüpler maksimum hızda oda sıcaklığında 3 dakika santrifüj edildi.
20. Spin kolondan Eppendorf tüpüne geçen DNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

### **3.3. Ejekulat Örneklerinden DNA İzolasyonu**

İzolasyona başlanmadan önce, 18 ml Yıkama (Wash) solüsyonu içerisine 42 ml absolü etanol eklendi. Ejekulat örneklerinden DNA izolasyonu, Norgen Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

DNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Temiz bir Eppendorf tüpüne 580 µl ejekulat örneği konuldu.
2. Ejekulat üzerine 300 µl Sindirim (Digestion) Tamponu ve 20 µl proteinaz K ilave edildi. Vorteks yapılarak tam karışım sağlandı.
3. Ejekulat, 55°C'lik su banyosunda 45 dakika-2 saat inkübe edildi.
4. 15 dakikada bir vortekslenerek tam liziz sağlandı. Lizata bağlı olarak homojen bir görünüm elde edilene kadar su banyosunda inkübasyona devam edildi.
5. Su banyosundan çıkarılan lizata 300 µl Bağlama (Binding) Solüsyonu eklendi. Vorteks ve spin yapıldı.
6. Lizata 300 µl absolü alkol eklendi. Vorteks ve spin yapıldı.
7. Spin kolonlar ile toplama tüpleri birleştirildi. Lizattan 600 µl alınıp kolona aktarıldı.
8. Oda sıcaklığında 13,000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi.

9. Eppendorf tüpünde geriye kalan lizat kolona aktarıldı. Sıvının tamamı spinden uzaklaşınca kadar santrifüj yapılır.
10. Oda sıcaklığında 13,000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi.
11. 500 µl Yıkama (Wash) Solüsyonu kolona koyuldu.
12. Oda sıcaklığında 13,000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi spin kolondansısı tamamen uzaklaşana dek santrifüj yapıldı.
13. 500 µl Yıkama (Wash) solüsyonu kolona koyularak yıkama işlemi tekrarlandı.
14. Oda sıcaklığında 13,000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi.
15. Spin kolon, 1,7 µl'lik elüsyon tüpü içerisine yerleştirdi.
16. 50 µl Elüsyon (Elution) Tamponu spin kolona eklendi. Elüsyon tamponunun spin kolonun merkezine gelmesine dikkat edildi.
17. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
18. Oda sıcaklığında 13,000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi.
19. Spin kolondan tüp içerisine geçen purifiye DNA örnekleri daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı.

### **3.4. Ekstrakte Edilen DNA'ların Bisülfıt Modifikasyonu**

DNA bisülfıt modifikasyonu için EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, ABD) kullanıldı. Metilasyonu saptamak için bugün kullanılan en yaygın tekniklerden biri bisülfıt dönüşüm yöntemidir (Frommer, 1992). Bisülfıt modifikasyonu ile metillenmiş sitozinler değişmeden kalırken metillenmemiş sitozinler urasile dönüşür. Urasil PCR sonrası timine dönüşmektedir. Bisülfıt modifikasyonu sonrası DNA'nın metilasyon profili Metilasyona Spesifik PCR'yi (Methylation Specific PCR; MSP) takiben DNA dizilenmesiyle de tespit edilebilir.

Çalışmamızda testis biyopsisi ve ejakulattan elde edilen DNA'ların bisülfıt modifikasyonu için 200-500 ng DNA kullanıldı. *In vitro* metillenmiş DNA (IVD) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Bisülfıt modifikasyonuna başlamadan önce CT Dönüşüm Reaktifi ve M-Yıkama Tamponu kitin protokolünde belirtildiği gibi hazırlandı.

**CT Dönüşüm Reaktifi'nin Hazırlanması:** Her CT Dönüşüm Reaktifi tüpü 10 adet DNA modifikasyon işlemi için tasarlanmış liyofilize bir karışım içermektedir.

Kullanımdan önce taze olarak aşağıdaki şekilde hazırlandı:



1. CT Dönüşüm Reaktifi tüpü kısa bir santrifüj yapılarak içerisindeki katı partiküllerin dibe çökmesi sağlandı.
2. CT Dönüşüm Reaktifi tüpüne 900 µl su, 300 µl M-Seyreltme (Dilution) Tamponu ve 50 µl M-Çözücü (Dissolving) Tampon eklendi.
3. Oda sıcaklığında 20 dakika boyunca vortekslenerek karıştırıldı.

Işığa duyarlı bir reaktif olduğundan hazırlanmasını takiben hemen kullanıldı. Oda sıcaklığında bir gece, 4°C'de bir hafta, -20°C'de bir aya kadar saklanabileceği ve kullanım öncesinde 37°C'ye getirilerek vortekslenmesi gerektiği belirtilmiştir.

**M-Yıkama Tamponu'nun Hazırlanması:** Kullanım öncesinde 24 ml'lik M-Yıkama Tamponu içerisine 96 ml absöü etanol ilave edilmiştir.

CT Dönüşüm Reaktifi ve M-Yıkama Tamponunun hazırlanmasından sonra bisülfid modifikasyon işlemi için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. PCR tüplerine 20 µl DNA örnekleri koyuldu. DNA hacminin 20 µl'den az olduğu durumlarda aradaki hacim farkı deiyonize su ile tamamlandı. 130 µl CT Dönüşüm Reaktifi, PCR tüplerine ilave edildi. Örnekler pipetajla iyice karıştırıldı.
2. PCR tüpleri ısı dönüştürücü (thermal cycler) cihazına koyularak aşağıda belirtilen program ayarlandı:

98°C'de 10 dakika.

64°C'de 2 saat 30 dakika.

4°C'de saklama (20 saate kadar).

3. Zymo-Spin™ IC Kolonlar, toplama tüplerine yerleştirildi ve içerisine 600 µl M-Bağlama (Binding) Tamponu eklendi.
4. Isı dönüştürücüden çıkarılan örnekler M-Bağlama (Binding) Tamponu içeren Zymo-Spin™ IC Kolonlar içerisine pipetaj yapılarak ilave edildi.
5. 13,000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapılarak sıvı kısım uzaklaştırıldı.
6. Kolonlara 100 µl M- Yıkama (Wash) Tamponu eklendi.
7. 13,000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapılarak sıvı kısım uzaklaştırıldı.
8. Kolonlara 200 µl M-Desülfonasyon Tamponu eklendi.

9. Kolonlar oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrası 13,000 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı.
11. Kolonlara 200 µl M-Yıkama (Wash) Tamponu eklendi.
12. 13,000 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı.
13. Kolonlara 200 µl M-Yıkama Tamponu eklenerek yıkama işlemi tekrarlandı ve 13,000 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı.
14. Kolonlar 1,5 ml’lik Eppendorf tüplerine yerleştirilerek 10 µl M-Elüsyon Tamponu kolon merkezine eklendi.
15. 13,000 rpm’de 30 saniye santrifüj yapılarak DNA elde edildi.
16. Modifiye edilmiş DNA’lar PCR işlemine kullanılmaya kadar -20°C’de saklandı.

### 3.5. Metilasyona-spesifik PCR

MSP analizi (Herman ve ark. 1996) DNA metilasyon çalışmalarında yapılan en önemli teknolojik ilerlemelerden biridir. Sadece metillenmemiş sitozinlerin urasile dönüşümünde bisülfitin seçici dönüştürücü gücünden faydalanmaktadır.

MSP işlemi için ZymoTaq<sup>TM</sup> DNA Polimeraz (Zymo Research, ABD) kullanıldı. ZymoTaq<sup>TM</sup> DNA Polimeraz Hot-start polimeraz enzimidir. ZymoTaq<sup>TM</sup> DNA Polimeraz başlangıç denatürasyonundan sonra sıcaklık 75°C’ye indiğinde PCR tüplerine ilave edildi. ZymoTaq<sup>TM</sup> DNA Polimeraz, primer dimer ve spesifik olmayan ürün oluşumunu en aza indirmekte ve bisülfitle muamele edilmiş modifiye DNA’nın metilasyon durumunu belirlemek için spesifik olarak tasarlanmıştır (Zymo Research, ABD). 50 µl’lik reaksiyon karışımı Tablo 1’de belirtilen maddeleri içermektedir.

**Tablo 1.** 50 µl’lik reaksiyon karışımı

2X reaksiyon tamponu	25 µl (1X)
dNTP karışımı (25 mM)	0.5 µl (0.25 mM)
Forward primer (100 µM)	1.5 µl (0.5 µM)
Reverse primer (100 µM)	1.5 µl (0.5 µM)
Modifiye DNA	4 µl
ZymoTaq polimeraz (5U/µl)	0.4 µl (2U/50µl)
ddH <sub>2</sub> O	17.5 µl

Modifiye edilen DNA'ların 4 µl'si, IVD'nin ise 2 µl'si 50 µl'lik PCR reaksiyon karışımında kalıp olarak kullanıldı. MSP ve metilasyona spesifik olmayan PCR (USP) için reaksiyon karışımları farklı tüplerde hazırlandı. PCR için pozitif kontrol olarak tam olarak metillenmiş insan DNA standartı (Zymo Research, ABD) kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise deiyonize su (ddH<sub>2</sub>O) (Zymo Research, ABD) kullanıldı. *MTHFR* MSP koşulları Tablo 2'de gösterilmektedir.

**Tablo 2.** *MTHFR* MSP koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	40 sn	40
Bağlanma	58°C	40 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	1

*MTHFR* USP koşulları Tablo 3'de gösterilmektedir.

**Tablo 3.** *MTHFR* USP Koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	95°C	40 sn	40
Bağlanma	59°C	40 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	1

*MTHFR* promotor bölgesi MSP ve USP için kullanılan primer dizileri ve amplifikasyon büyüklükleri Tablo 4’de gösterilmektedir.

**Tablo 4.** *MTHFR* promotor bölgesi MSP ve USP için kullanılan primer dizileri

Forward Primer	Reverse Primer	PCR ürünü (bp)	Referans
MSP: TAG ATT TAG GTA CGT GAA GTA GGG TAG AC	MSP: GAA AAA CTA ATA AAA AAC CGA CGA A	200 bp	(Wu. ve ark., 2010)
USP: TTT AGG TAT GTG AAG TAG GGT AGA TGT	USP: CAA AAA ACT AAT AAA AAA CCA ACA AA	190 bp	

### 3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

%2,5’lik agaroz jel hazırlamak için 130 ml 1XTBE (Tris-Borik Asit-EDTA) ölçülüp bir erlenmayere aktarıldı ve 3,25 g agaroz tartılarak 130 ml 1XTBE solüsyonuna ilave edildi. Erlenmayer içindeki heterojen karışım mikrodalga fırında homojen bir görünüm elde edilene kadar ve içerisindeki köpükler gidene kadar 30 saniyelik aralıklarla ısıtıldı. Solüsyon oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Solüsyon sıcaklığı 75°C’ye indiğinde 0,5 mg/ml’lik etidyum bromürden 130 µl eklendi. Karışım çalkalanarak etidyum bromidin tüm çözeltiliye dağılması sağlandı. Yatay elektroforez setine jel tarakları yerleştirildi. Agaroz jel karışımı elektroforez setine dökülerek polimerizasyona bırakıldı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 45 dakika 4°C’de bekletildi. Polimerize olmuş jelden taraklar uzaklaştırıldı. Jel yeterli miktarda 1XTBE solüsyonu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. 30 µl PCR ürünü, 5 µl 6XLoading Dye (yükleme boyası) ile jelin kuyucuklarına yüklendi. 130 voltteki elektrik akımında yürütüldü. Elektroforez işleminden sonra, bantlar UV transillüminatörü altında görüntülenerek incelendi.

### 3.7. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS 17.0 paket programında yapıldı. Parametreler arasındaki ilişki ki-kare testiyle değerlendirildi.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Şiddetli oligospermik ve non-obstrüktif azospermik infertil erkeklerde ve aynı yaşta olan normospermik erkeklerde *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri Tablo 5’de gösterilmiştir. Normospermik erkeklerde metilasyon sıklığı %51,0 (Fertil erkeklerde 7/9; Normospermik erkeklerde 18/40; Toplam: 25/49), oligospermik erkeklerde %58,7 (27/46), azospermik olgularda ise %48,4 (15/31) olarak tespit edildi.

**Tablo 5.** Azospermik, oligospermik ve normospermik erkeklerin *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri

Örnek tipi (n)	Metillenmiş <i>MTHFR</i> (%)	Metillenmemiş <i>MTHFR</i> (%)
<b>Azospermik erkekler (31)</b> (Testis biyopsisi)	15 (48,4)	16 (51,6)
<b>Oligospermik erkekler (46)</b> (Ejekulat)	27 (58,7)	19 (41,3)
<b>Kontrol grubu (49)</b> (Ejekulat)	25 (51,0)	24 (49,0)

Sonuç olarak şiddetli oligospermik ve non-obstrüktif azospermik hastalar ve normospermik erkekler arasında *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı ( $p = 0,625$ ).

Oligospermik erkekler içerisinde altı olguda her iki alelin metilasyona uğradığı, 19 olguda her iki alelde metilasyon olmadığı, 21 olgunun da heterozigot olduğu tespit edildi. (Tablo 6).

**Tablo 6.** Azospermik, oligospermik ve normospermik erkeklerin MSP Sonuçları

Örnek (n)	M/U (%)	M/M (%)	U/U (%)
<b>Azospermik erkekler (31) (Testis biyopsisi)</b>	15 (48,4)	0 (0)	16 (51,6)
<b>Oligospermik erkekler (46) (Ejekulat)</b>	21 (45,7)	6 (13)	19 (41,3)
<b>Kontrol (49) (Ejekulat)</b>	23 (46,9)	2 (4,1)	24 (49)

Azospermik erkeklerde her iki alelin metilasyona uğradığı olgu tespit edilemezken 16 olguda her iki alelde metilasyon olmadığı, 15 olgunun da heterozigot olduğu tespit edildi. Normospermik erkekler içerisinde iki olguda her iki alelin metilasyona uğradığı, 24 olguda her iki alelin de metilasyona uğramadığı, 23 olgunun da heterozigot olduğu tespit edildi.

Çalışılan 46 oligospermik erkek içerisinde yedi olguda sperm motilitesinin normal olduğu saptanırken 39 olguda ise düşük olduğu saptandı (Tablo 7).

**Tablo 7.** Normal ve düşük motiliteye sahip oligospermik erkeklerin *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri

Örnek (n)	Metillenmiş <i>MTHFR</i> geni (%)	Metillenmemiş <i>MTHFR</i> geni (%)
<b>Düşük sperm motilitesi görülen oligospermik hastalar (39) (Ejekulat)</b>	22 (56,4)	17 (43,6)
<b>Normal motilitesi gözlenen oligospermik hastalar (7) (Ejekulat)</b>	5 (71,4)	2 (28,6)

Sperm motilitesi  $\geq$  %4 olan bireyler normal kabul edildi. Motilitesi düşük olan oligospermik erkeklerden 22 olguda metilasyon saptanırken, 17 olguda metilasyon saptanmadı. Normal motiliteye sahip olan oligospermik erkeklerden 5 olguda metilasyon saptanırken, 2 olguda metilasyon saptanmadı.

Sonuç olarak oligospermik erkeklerde *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyonunun sperm motilitesi üzerine bir etkisi olmadığı saptandı ( $p=0,682$ ).

Çalışılan 46 oligospermik erkek içerisinde 1 olgunun normal sperm morfolojisi gösterdiği, 45 olgunun anormal sperm morfolojisi gösterdiği saptandı (Tablo 8).

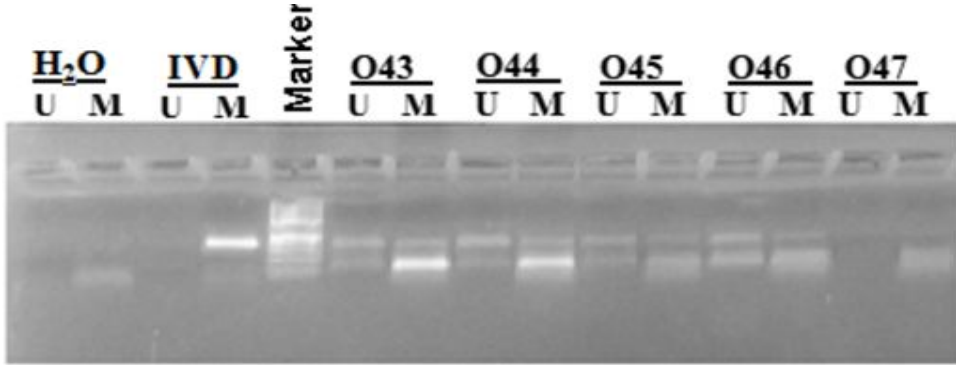
**Tablo 8.** Normal ve anormal morfolojiye sahip oligospermik erkeklerin *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri

Örnek (n)	Metillenmiş <i>MTHFR</i> (%)	Metillenmemiş <i>MTHFR</i> (%)
Normal sperm morfolojisi gösteren oligospermik erkekler (1) (Ejekulat)	0 (%0)	1 (%100)
Anormal sperm morfolojisi gösteren oligospermik erkekler (45) (Ejekulat)	27 (%60)	18(%40)

Sperm morfolojisi  $\geq$  %4 olan bireyler normal kabul edildi. Anormal sperm morfolojisi gösteren oligospermik erkeklerden 27 olguda metilasyon saptanırken, 18 olguda metilasyon saptanmadı. Normal sperm morfolojisi gösteren oligospermik olguda metilasyon saptanmadı.

Sonuç olarak oligospermik erkeklerde *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyonunun sperm morfolojisi üzerine bir etkisi olmadığı saptandı ( $p=0,413$ ).

43-47 no'lu oligospermik hastaların metilasyon profilleri Şekil 7'de gösterilmektedir.



**Şekil 7:** Oligospermik hastaların metilasyon profilleri. **U:** Metillenmemiş; **M:** Metillenmiş

Birinci ve 2. kuyularda yer alan negatif kontrolde amplifikasyon görülmemektedir. Üçüncü ve 4. kuyular pozitif kontrolü temsil etmektedir. Pozitif kontrolün U'sunda 190 bç'lik amplifikasyon görülürken, M'sinde 200 bç'lik amplifikasyon görüldü. Beşinci kuyu 50 bç'lik DNA Ladder Marker'i temsil etmektedir. Altıncı ve 7. Kuyular 43 numaralı şiddetli oligospermik hastayı temsil etmektedir. Bu hastanın heterozigot olduğu tespit edildi. Sekizinci ve 9. kuyular 44 numaralı şiddetli oligospermik hastayı temsil etmektedir. Bu hastanın heterozigot olduğu tespit edildi. Onuncu ve 11. kuyular 45 numaralı şiddetli oligospermik hastayı temsil etmektedir. Bu hastanın heterozigot olduğu tespit edildi. Onikinci ve 13. kuyular 46 numaralı şiddetli oligospermik hastayı temsil etmektedir. Bu hastanın heterozigot olduğu tespit edildi. Ondördüncü ve 15. kuyular 47 numaralı şiddetli oligospermik hastayı temsil etmektedir. Bu hastanın homozigot metile banta sahip olduğu tespit edildi.



Çalışmaya dahil edilen 49 kişilik normospermik erkeğin *MTHFR* geni metilasyon profillerini karşılaştırmak amacıyla konsantrasyonları 30-50 milyon/ml; 50-70 milyon/ml ve  $\geq 70$  milyon/ml olmak üzere normospermik erkekler sperm konsantrasyonlarına göre üç gruba ayrılmıştır. *MTHFR* geni promotor metilasyonu ve normospermik erkeklerde sperm konsantrasyonları arasında fark saptanmamıştır (P: 0,240) (Tablo 9).

**Tablo 9.** Normospermik erkeklerin sperm konsantrasyonları ve metilasyon profilleri arasındaki ilişki

Sperm Konsantrasyonu (milyon/ml)	MSP negatif	MSP pozitif	Total
30-50	14	20	34
50-70	7	4	11
$\geq 70$	3	1	4

## 5. TARTIŞMA

Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *MTHFR* geninin aktivitesinin erişkin fare testislerinde diğer organlarıyla karşılaştırıldığında 5 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2001). Yapılan başka bir çalışmada *MTHFR* geni inaktif olan erkek farelerde yapılan testis biyopsisi sonucunda testis histolojisinin anormal olduğu ve spermatogenezin yapılamadığı tespit edilmiştir (Kelly ve ark., 2005). Bu bulgular, *MTHFR*'nin spermatogenezde rolü olduğunu ve *MTHFR* genindeki değişimlerin erkek infertilitesiyle ilişkili olabileceğini göstermektedir.

İnsanlarda da *MTHFR* geninde görülen polimorfizmlerin ve epigenetik değişimlerin farklı populasyonlarda idiyomatik erkek infertilitesiyle ilişkili olabileceği ortaya konulmuştur (Eloualid ve ark., 2012).

Yaptığımız çalışma sonucunda, şiddetli oligospermik ve non-obstrüktif azospermik hastalar ve normospermik erkekler arasında *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık.

Sonuçlarımız bu konuda daha önce biri İran'da diğeri Çin'de yapılan iki çalışmadan farklılık göstermektedir. Her iki çalışmada da *MTHFR* geni promotor bölgesi hipermetilasyonunun idiyomatik erkek infertilitesiyle ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak, hasta ve kontrol gruplarımız bu çalışmalardan farklılık göstermektedir.

Sonuçlarımızın güvenilirliği açısından çalışacağımız örneklem sayısını belirlemek için %95 güven aralığında power analiz yaptırıldık fakat ilgili bu iki makalede power analizi yaptırıldıklarına dair bir ifade bulunmamaktadır. Çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta ve kontrol sayısı diğer iki çalışmanın sayılarıyla karşılaştırıldığında daha fazladır. Ayrıca hasta ve kontrol grubumuzun özellikleri de diğer iki çalışmadan farklıdır.

Khazamipour ve arkadaşlarının İran'da yaptıkları çalışmada, DNA'ları periferik kandan izole edilen 50 NAO infertil ve yaş olarak eşleneği olan 50 fertil erkeğin *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri değerlendirilmiştir. NAO infertil erkelerde metilasyon sıklığı %30 (15/50) olarak belirlenirken, fertil erkeklerde ise %18 (9/50) olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, periferik kandan *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri açısından azospermik hastalar ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Khazamipour ve

arkadaşlarının çalışmasında, ayrıca testis biyopsisinden DNA'ları izole edilen 32 NOA infertil ve yaş olarak eşleneği olan 5 obstrüktif azospermik (obstructive azoospermia; OA) erkekte *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri araştırılmıştır. NAO infertil erkeklerde metilasyon sıklığı % 53,0 (17/32), OA kontrollerde ise % 0 (0/5) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmayla beraber NAO infertil erkeklerin testislerinde *MTHFR* geni promotor bölgesi hipermetilasyonu olduğu istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Khazamipour ve ark., 2009). Çalışmamıza dahil edilen kontrol grubu sayımız Khazamipour ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla karşılaştırıldığında daha yüksektir.

Khazamipour'un ve Chen'in yaptıkları çalışmalar *MTHFR* geni metilasyon profilinin dokuya spesifik olabileceğini göstermiştir. Bundan dolayı çalışmamızda şiddetli oligospermik infertil hasta ve yaş olarak eşleneği olan normospermik erkeklerin DNA'larını ejakulattan, azospermik hastaların DNA'larını ise testis biyopsisinden izole ettik.

Çalışmamıza 31 non-obstrüktif azospermik ve 46 şiddetli oligospermik hasta ve yaş açısından eşleneği olan 49 normospermik erkek dahil edildi. Normospermik olgularda metilasyon sıklığı %51,0 (25/49), oligospermik olgularda %58,7 (27/46), azospermik olgularda ise %48,4 (15/31) olarak tespit edildi. Normospermik erkeklerin dokuzu fertil iken 40'ı normal sperm parametrelili ve eşleri nedeniyle infertile sorunları yaşamaktaydı.

Bizim çalışmamızda 49 normospermik erkekte 25'inde metilasyon gözlenirken 24 olguda metilasyon gözlenmedi. Normospermik erkeklerde metilasyon oranımız %51,0 olarak tespit edildi. Khazamipour ve arkadaşlarının çalışmasında ise kontrol grubunu oluşturan 5 obstrüktif azospermik erkekte hiç metilasyon saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda 31 azospermik hasta içerisinde 15 olguda metilasyon gözlenirken 16 olguda metilasyon gözlenmedi. Non-obstrüktif azospermik erkeklerde metilasyon oranımız %48,4 olarak tespit edildi. Khazamipour ve arkadaşlarının çalışmasında ise 32 non-obstrüktif azospermik hasta içerisinde 17 olguda metilasyon gözlenirken 16 olguda metilasyon gözlenmemiştir. Non-obstrüktif azospermik hastalarda metilasyon oranı %53,0 olarak tespit edilmiştir. Metilasyon profillerimiz Khazamipour ve arkadaşlarının metilasyon profilleriyle karşılaştırıldığında

non-obstrüktif azospermik erkeklerde paralellik gösterdiği fakat kontrol gruplarımızda paralellik göstermediği görülmektedir.

Ayrıca infertil hasta grubumuza Y kromozomu mikrolelesyonu, kistik fibrosiz ve karyotip anomalisi olan erkekler dahil edilmeyerek idiopatik hasta grubu olmasına dikkat edildi. Ancak, Khazamipour ve arkadaşları yaptıkları çalışmada infertil hasta grubu bu açıdan değerlendirilmemiştir.

Wu ve arkadaşlarının yaptıkları benzer çalışmada 94 idiopatik infertil ve aynı yaşlarda olan 54 fertil erkekte *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri araştırılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarının DNA'ları spermden elde edilmiştir. Y kromozomu mikrolelesyonu, kistik fibrosiz ve karyotip anomalisi olan erkekler bizim çalışmamızda olduğu gibi çalışmaya dahil edilmemiştir. İdiopatik infertil erkeklerde metilasyon sıklığı %45,0 (41/94), fertil kontrollerde ise %15 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmayla beraber idiopatik infertil erkeklerde *MTHFR* geni promotor bölgesi hipermetilasyonu olduğu istatistiksel olarak kabul edilmiştir (Wu ve ark., 2010). Ayrıca bu çalışma sonucunda idiopatik oligospermik infertil erkeklerde idiopatik normospermik infertil erkeklere nazaran daha yüksek metilasyon profili gösterdikleri tespit edilmiştir. Ejakulat lökosit, olgunlaşmamış germ hücresi, epitel gibi sperm dışında birçok hücre içerdiği için metilasyon oranı sadece spermatozoayı temsil edemez. Çalışmamız Wu ve arkadaşlarından yöntemsel olarak farklılık göstermektedir. Wu ve arkadaşları swim-up işlemi uygulayarak spermatozoayı olası somatik hücrelerden ayırmışlardır. Çalışmamızda lökosit infiltrasyonunu önlemek için lökosit içeren ejakulat örnekleri dahil edilmedi. Teknik sınırlamalardan dolayı swim-up işlemi yapılmadı. Ancak, swim-up işlemi uygulanmadan yapılan epigenetik çalışmalar bulunmaktadır (Khazamipour ve ark., 2009; Hammoud ve ark., 2010). Diğer yandan, metilasyon dokuya özgü gerçekleşmektedir ve metilasyon literatürüne göre sadece mayozun başlangıcında gerçekleşmektedir. Dolayısıyla metilasyon tüm haploid hücrelerde aynı metilasyon profiline sahiptir (Oakes ve ark., 2007). Ancak bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak idiopatik infertil hastalar grubunda 30 idiopatik normospermik infertil ve 64 idiopatik oligospermik erkek yer almıştır. Wu ve arkadaşlarının çalışmasında sperm konsantrasyonu  $\geq 20$  milyon/ml olanlar idiopatik normospermik infertil erkek,  $< 20$  milyon/ml olanlar oligospermik olarak kabul edilmiştir. Bizim çalışmamıza sperm konsantrasyonu  $\geq 30$  milyon/ml olan

normospermik erkekler,  $\leq 5$  milyon/ml olan şiddetli oligospermik infertil erkekler dahil edildi. Ayrıca, Wu ve arkadaşları DSÖ'nün 1999 yılı kriterini göz önüne almışlardır. Bu nedenle oligospermik olarak adlandırdıkları hastaların bir bölümü 2010 DSÖ kriterlerine göre değerlendirildiğinde normospermik olarak kabul edilmektedir.

Epigenetik değişimler yaşla birlikte artmaktadır. Khazamipour ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bireylerin yaş ortalamaları ve yaş sınırları belirtilmediğinden yaş açısından bir korelasyon kurulmadı.

Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oligospermik erkeklerin yaş ortalaması 29, fertil erkeklerin yaş ortalaması ise 30 olarak saptanmıştır. Benzer bir şekilde bizim çalışmamızda da oligospermik erkeklerin yaş ortalaması 29, normospermik erkeklerin ise 32 olarak saptanmıştır.

Ayrıca, Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada metilasyon profilleri tespit edildikten sonra bisülfid dizileme yöntemiyle metilasyon dereceleri de tespit edilmiştir. Diğer yandan, bizim çalışmamızda bisülfid dizileme yapılmadığından dolayı metilasyonun hiper ya da hipo olduğunu belirleyemedik.

Yapılan bir diğer çalışmada eşinde tekrarlayan düşük öyküsü olan 20 erkek ve 147 infertil erkekte *MTHFR* geni promotor metilasyon parametreleri araştırılmıştır. Metilasyon sıklıkları eşinde tekrarlayan düşüğü olan erkeklerde %75, infertil erkeklerde %54 ve fertillerde %15 olarak tespit edilmiştir. Rotondo ve arkadaşları yaptıkları bu çalışma sonucunda İtalyan popülasyonunda *MTHFR* geni promotor bölgesinin, eşinde tekrarlayan düşüğü olan erkeklerde infertil erkeklere nazaran daha yüksek hipermetilasyon profili gösterdiği tespit edilmiştir (Rotondo ve ark., 2012).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda erkek infertilitesiyle ilgili çok sayıda genetik çalışma yapılmış olmasına rağmen hala infertilite olgularının önemli kısmının nedenleri açıklanamamaktadır. Yapılan çalışmalar epigenetik faktörlerin spermatogenezde önemli rol aldığını göstermektedir. Bu faktörlerin ve etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılması, erkek infertilitesinin nedenlerinin belirlenmesi ve sonrasında da bu mekanizmaların nasıl kontrol edilebileceğinin belirlenmesine katkı sağlayabilir.

Metilasyon sıklığı normospermik olgularda %51,0 (25/49), oligospermik olgularda %58,7 (27/46) ve azospermik olgularda ise %48,4 (15/31) olarak tespit edildi.

Bulgularımıza göre şiddetli oligospermik ve non-obstrüktif azospermik hastalar ve normospermik erkekler arasında *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyon profilleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Ayrıca şiddetli oligospermik erkeklerde *MTHFR* geni promotor bölgesi metilasyonunun sperm morfolojisi ve sperm motilitesi üzerine bir etkisinin olmadığı saptandı.

Türkiye’de ilk kez yapılan bu çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi normospermik ve azospermik ve oligospermik idiyopatik infertil erkek popülasyonunda *MTHFR* geni promotor bölgesinde metilasyon değişiklikleri açısından bir fark saptanmadı.

## KAYNAKLAR

- Alvarez-Nava F, Puerta H. Y-chromosome microdeletions in 45,X/46,XY patients. *Am J Med Genet A*. 2006;140(10):1128-1130.
- Alvarez-Nava F, Puerta H, Soto M, Pineda L, Temponi A. High incidence of Y-chromosome microdeletions in gonadal tissues from patients with 45,X/46,XY gonadal dysgenesis. *Fertil Steril*. 2008;89(2):458-460.
- Angers B, Castonguay E, Massicotte R. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Mol Ecol*. 2010;19(7):1283-1295.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers. *Cytogenet Genome Res*. 2005;111(3-4):297-304.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 2005;308(5727):1466-1469.
- Arnedo N, Nogués C, Bosch M, Templado C. Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation. *Hum Reprod*. 2005;20(2):462-468.
- Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 2004;11:56-64.
- Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(22):13217-20.
- Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GP, Quinlivan EP, Davis SR, Cuadras A, Hutson AD, Gregory JF 3rd. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr*. 2002;132(7):1872-8.
- Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982;93:298-305.
- Bezold G, Lange M, Peter RU. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. *N Engl J Med*. 2001;344(15):1172-3.
- Bhasin S, Mallidis C, Ma K. The genetic basis of infertility in men. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000;14(3):363-88. Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GP, Quinlivan EP, Davis SR, Cuadras A, Hutson AD, Gregory JF 3rd. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C

- methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr.* 2002;132(7):1872-8.
- Boxmeer JC, Smit M, Utomo E, Romijn JC, Eijkemans MJ, Lindemans J, Laven JS, Macklon NS, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertil Steril.* 2009;92(2):548-56.
- Campos EI, Reinberg D. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet.* 2009;43:559-99.
- Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril.* 2012;97(2):267-74.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *Int J Androl* 2008;31:537-45.
- Chan D, Cushnie DW, Neaga OR, Lawrance AK, Rozen R, Trasler JM. Strain-specific defects in testicular development and sperm epigenetic patterns in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase-deficient mice. *Endocrinology.* 2010;151(7):3363-73.
- Chandley AC. The chromosomal basis of human infertility. *Br Med Bull.* 1979;35(2):181-6.
- Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, Siffroi JP. Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(1):55-9.
- Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Siffroi JP. Underlying karyotype abnormalities in IVF/ICSI patients. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(4):514-522.
- Chellat D, Rezgoune ML, Hamane D, Semmame O, Benlatrèche C, Abadi N, Satta D. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphisms in Algerian infertile men with azoospermia or severe oligozoospermia. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(8):874-878.
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet.* 2001;10(5):433-443.
- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R, Sele B. Meiotic behaviour of sex chromosomes investigated by three-colour FISH on 35,142 sperm nuclei from two 47,XYY males. *Hum Genet.* 1997;99(3):407-412.



- Chiang HS, Wu YN, Wu CC, Hwang JL. Cytogenic and molecular analyses of 46,XX male syndrome with clinical comparison to other groups with testicular azoospermia of genetic origin. *J Formos Med Assoc.* 2013;112(2):72-78.
- Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Cytogenetic and molecular analysis of male infertility: Y chromosome deletion during nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Cell Biochem Biophys.* 2006;44(1):171-177.
- 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(3):213-223.
- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod.* 1991;6(2):245-250.
- De La Chapelle A. The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet.* 1981;58:105-116.
- Dikmen M. Metilentetrahidrofolat Redüktaz enziminin moleküler biyolojisi ve hastalıklarla ilişkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi.* 2004;5:9-16.
- Doerksen T, Benoit G, Trasler JM. Deoxyribonucleic acid hypomethylation of male germ cells by mitotic and meiotic exposure to 5-azacytidine is associated with altered testicular histology. *Endocrinology.* 2000;141(9):3235-44.
- Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, van den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod.* 2002;17(1):13-16.
- Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ, Goodfellow J. Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation.* 2002;105(1):22-26.
- Dowsing AT, Yong EL, Clark M, McLachlan RI, de Kretser DM, Trounson AO. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet.* 1999;354(9179):640-643.
- Dünya Sağlık Örgütü (2010) WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. World Health Organization, Geneva.
- Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. *Nature.* 1996;381(6585):783-5.
- Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers-Theunissen RP. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod.* 2006;21(7):1725-33.

- Ebisch IM, van Heerde WL, Thomas CM, van der Put N, Wong WY, Steegers-Theunissen RP. C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. *Fertil Steril*. 2003;80(5):1190-4.
- Eloualid A, Abidi O, Charif M, El Houate B, Benrahma H, Louanjli N, Chadli E, Ajjemami M, Barakat A, Bashamboo A, McElreavey K, Rhaissi H, Rouba H. Association of the MTHFR A1298C variant with unexplained severe male infertility. *PLoS One*. 2012;7(3):e34111.
- Ferguson-Smith MA. X-Y chromosomal interchange in the aetiology of true hermaphroditism and of XX Klinefelter's syndrome. *Lancet* 1966;288:475-476.
- 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 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):762-70.
- Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism. *Curr Drug Metab*. 2005 Feb;6(1):37-46. Frommer M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89(5): 1827-1831.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;10(1):111-3.
- Gabor Miklos GL, Maleszka R. Epigenomic communication systems in humans and honey bees: from molecules to behavior. *Horm Behav*. 2011;59(3):399-406.
- Ganji V, Kafai MR. Frequent consumption of milk, yogurt, cold breakfast cereals, peppers, and cruciferous vegetables and intakes of dietary folate and riboflavin but not vitamins B-12 and B-6 are inversely associated with serum total homocysteine concentrations in the US population. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6):1500-7.
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S. From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J*. 2010 Feb;277(3):599-604.
- Gava MM, Chagas Ede O, Bianco B, Christofolini DM, Pompeo AC, Glina S, Barbosa CP. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms are related to male infertility in Brazilian men. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011;15(3):153-7.
- Gava MM, Kayaki EA, Bianco B, Teles JS, Christofolini DM, Pompeo AC, Glina S, Barbosa CP. Polymorphisms in folate-related enzyme genes in idiopathic infertile Brazilian men. *Reprod Sci*. 2011;18(12):1267-72.

- Gonzalez-Merino E, Hans C, Abramowicz M, Englert Y, Emiliani S. Aneuploidy study in sperm and preimplantation embryos from nonmosaic 47,XYY men. *Fertil Steril*. 2007;88(3):600-6. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome*. 1998;9(8):652-6.
- Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet*. 1994;7(2):195-200.
- Gupta N, Gupta S, Dama M, David A, Khanna G, Khanna A, Rajender S. Strong association of 677 C>T substitution in the MTHFR gene with male infertility a study on an indian population and a meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(7):e22277.
- Guyton A. Erkeklerde Üreme İşlevleri ve Hormonal İşlevler. Çavuşoğlu H, Yeğen B. Editörler, *Tıbbi Fizyoloji*, 11. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi. 2007; 997-998.
- Güneş S, Aşçı R. Erkek İnfertilitesine Yol Açan Diğer Kromozomal Hastalıklar (Baskıda).
- Güneş S, Kulaç T. Epigenetiğin Spermatogenezdeki Rolü. *Türk Üroloji Dergisi*. 2013;39(3):181-7.
- 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. USA*. 1996;93(18):9821-9826.
- Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR, Carrell DT. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod* 2011;26:2558-69.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009;460:473-8.
- Hammoud SS, Purwar J, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1728-33.
- Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update*. 2002;8(2):183-98.
- Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 249:101-18.

- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*. 1996;93(1):7-9.
- Jaruzelska J, Korcz A, Wojda A, Jedrzejczak P, Bierla J, Surmacz T, Pawelczyk L, Page DC, Kotecki M. Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with AZFc deletion. *J Med Genet*. 2001;38(11):798-802.
- Junqueira L, Carneiro J, Abrahamsohn P. Erkek Üreme Sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S. Editörler, Temel Histoloji, 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi. 2006; 433-437.
- Kelly TL, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler JM. Infertility in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biol Reprod*. 2005;72(3):667-77.
- Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhane M, Pujol P. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Hum Reprod*. 2009;24(9):2361-4.
- Kim JW, Bak CW, Chin MU, Cha DH, Yoon TK, Shim SH. SRY-negative 46,XX infertile male with Leydig cell hyperplasia: clinical, cytogenetic, and molecular analysis and review of the literature. *Fertil Steril*. 2010;94(2):753.
- Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem*. 1999;10(2):66-88.
- Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*. 2005;434(7033):583-9.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Ökaryotlarda Gen İfadesinin Düzenlenmesi. Öner C, Sümer S, Öner R, Öğüş A, Açık L, Editörler, Genetik Kavramlar, 8. Baskı, Ankara, Palme yayıncılık. 2011; 422-423.
- Krausz C, Forti G. Clinical aspects of male infertility. *Results Probl Cell Differ*. 2000;28:1-21.
- Kretser DM. Male infertility. *Lancet*. 1997;349(9054):787-90.
- Kumtepe Y, Beyazyurek C, Cinar C, Ozbey I, Ozkan S, Cetinkaya K, Karlikaya G, Karagozoglu H, Kahraman S. A genetic survey of 1935 Turkish men with severe male factor infertility. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(4):465-74.

- Lange J, Skaletsky H, van Daalen SK, Embry SL, Korver CM, Brown LG, Oates RD, Silber S, Repping S, Page DC. Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of homologous recombination that maintains palindromes. *Cell*. 2009;4;138(5):855-69.
- Lee HC, Jeong YM, Lee SH, Cha KY, Song SH, Kim NK, Lee KW, Lee S. Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3162-70.
- Lee JY, Dada R, Sabanegh E, Carpi A, Agarwal A. Role of genetics in azoospermia. *Urology*. 2011;77(3):598-601.
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2002;3(9):662-73.
- Liu Y, Lu C, Yang Y, Fan Y, Yang R, Liu CF, et al. Influence of histone tails and H4 tail acetylations on nucleosome-nucleosome interactions. *J Mol Biol* 2011;14:749-64.
- Marks A, Colleen Smith, Lieberman M. Tetrahidrofolat, Vitamin B12 ve S-Adenozilmetiyonin. İnal M, Atik U, Aksoy N, Haşimi A. Editörler, Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası, 2. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri. 2007; 732-745.
- Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl*. 2012;14(1):40-8.
- McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol*. 2003;262(1):1-15.
- Mercier S, Morel F, Roux C, Clavequin MC, Bresson JL. Analysis of the sex chromosomal equipment in spermatozoa of a 47,XYY male using two-colour fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod*. 1996;2(7):485-8.
- Montjean D, Benkhalifa M, Dessolle L, Cohen-Bacrie P, Belloc S, Siffroi JP, Ravel C, Bashamboo A, McElreavey K. Polymorphisms in MTHFR and MTRR genes associated with blood plasma homocysteine concentration and sperm counts. *Fertil Steril*. 2011;95(2):635-40.
- Moretti E, Anichini C, Sartini B, Collodel G. Sperm ultrastructure and meiotic segregation in an infertile 47, XYY man. *Andrologia*. 2007;39(6):229-34.
- Nuti F, Krausz C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2008;16(4):504-13.
- Oakes CC, Kelly TL, Robaire B, Trasler JM. Adverse effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on spermatogenesis include reduced sperm function and selective inhibition of de novo DNA methylation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(3):1171-80.

- Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B, Trasler JM. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(1):228–33.
- Oates RD. The genetic basis of male reproductive failure. *Urol Clin North Am*. 2008;35(2):257-70.
- O’Connel M, McClure N, Lewis SE. A comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 2002;17:1571-1577.
- O’Flynn O’Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril*. 2010;93(1):1-12. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*. 1998;19(3):219–20.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12:417–35.
- Paracchini V, Garte S, Taioli E. MTHFR C677T polymorphism, GSTM1 deletion and male infertility: a possible suggestion of a gene-gene interaction? *Biomarkers*. 2006;11(1):53-60.
- Patsalis PC. Response to the Alvarez Nava and Puerta "Y-chromosome microdeletions in 45,X/46,XY patients". *Am J Med Genet A*. 2006;140(11):1251-2.
- Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, Kousoulidou L, Koumbaris G, Eftychi C, Stavrides G, Ioulianos A, Kitsiou-Tzeli S, Galla-Voumvouraki A, Kosmaidou Z, Hadjiathanasiou CG, McElreavey K. Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. *Am J Med Genet A*. 2005;135(2):145-9.
- Payne C, Braun RE. Histone lysine trimethylation exhibits a distinct perinuclear distribution in Plzf-expressing spermatogonia. *Dev Biol*. 2006;293(2):461–72.
- Peng L, Seto E. Deacetylation of nonhistone proteins by HDACs and the implications in cancer. *Handb Exp Pharmacol* 2011;206:39–56.
- Peters AH, O’Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*. 2001;107(3):323–37.
- Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*. 2009;50(4):336-47.
- Rajender S, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res*. 2011;727(3):62-71.

- Ravel C, Chantot-Bastarud S, Chalmei C, Barreiro L, Akinin-Seifer I, Pfeffer J, Berthaut I, Mathieu EE, Mandelbaum J, Siffroi JP, McElreavey K, Bashamboo A. Lack of association between genetic polymorphisms in enzymes associated with folate metabolism and unexplained reduced sperm counts. *PLoS One*. 2009;4(8):e6540.
- Richardson BC. Role of DNA methylation in the regulation of cell function autoimmunity, aging and cancer. *J Nutr*. 2002;132(8):2401–5.
- Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost*. 1997;78(1):523-6.
- Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. Relationship between genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (C677T, A1298C, and G1793A) as risk factors for idiopathic male infertility. *Reprod Sci*. 2011;18(3):304-15.
- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction*. 2003;126(1):13-25.
- Shen O, Liu R, Wu W, Yu L, Wang X. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase gene A1298C polymorphism with male infertility: a meta-analysis. *Ann Hum Genet*. 2012;76(1):25-32.
- Shi Q, Martin RH. Spontaneous frequencies of aneuploid and diploid sperm in 10 normal Chinese men: assessed by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;90(1-2):79-83.
- Singh K, Singh SK, Raman R. MTHFR A1298C polymorphism and idiopathic male infertility. *J Postgrad Med*. 2010;56(4):267-9.
- Singh K, Singh SK, Sah R, Singh I, Raman R. Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population. *Int J Androl*. 2005;28(2):115-9.
- 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.
- Stuppia L, Gatta V, Scarciolla O, Colosimo A, Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Palka G. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and male infertility in Italy. *J Endocrinol Invest*. 2003;26(7):620-2.
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 2007;128(4):747–62.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3740–5.

- Talbert PB, Henikoff S. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nat Rev Genet.* 2006;7(10):793–803.
- Tufan AC, Satiroglu-Tufan NL, Aydinuraz B, Satiroglu MH, Aydos K, Bageci H. No association of the CAG repeat length in exon 1 of the androgen receptor gene with idiopathic infertility in Turkish men: implications and literature review. *Tohoku J Exp Med.* 2005;206(2):105-15.
- 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, Jagodziński PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(4):631-47.
- Uçan B, Özbek M, Topaloğlu O, Yeşilyurt A, Güngüneş A, Demirci T, Delibaşı T. 46,XX Erkek Sendromu. *Turk Jem* 2013;17: 46-8.
- 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 Suppl 4:1-24; 25-6.
- Wallock LM, Tamura T, Mayr CA, Johnston KE, Ames BN, Jacob RA. Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril.* 2001;75(2):252-9.
- Walsh TJ, Pera RR, Turek PJ. The genetics of male infertility. *Semin Reprod Med.* 2009;27(2):124-36.
- Wilson VL, Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science.* 1983;220(4601):1055–7.
- Wong EC, Ferguson KA, Chow V, Ma S. Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male. *Hum Reprod.* 2008;23(2):374-8.
- World Health Organization. Laboratory manual of the WHO for the examination of human semen and sperm and sperm- cervical mucus interaction. *Ann Ist Super Sanita.* 2001;37:I-xii:1-123.
- Wu W, Shen O, Qin Y, Lu J, Niu X, Zhou Z, Lu C, Xia Y, Wang S, Wang X. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of male infertility: a meta-analysis. *Int J Androl.* 2012;35(1):18-24.
- 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(11):e13884.

Yanagimachi R. Male gamete contributions to the embryo. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1061:203-7.

Yatsenko AN, Yatsenko SA, Weedin JW, Lawrence AE, Patel A, Peacock S, Matzuk MM, Lamb DJ, Cheung SW, Lipshultz LI. Comprehensive 5-year study of cytogenetic aberrations in 668 infertile men. J Urol. 2010;183(4):1636-42.

Yi SV, Goodisman MA. Computational approaches for understanding the evolution of DNA methylation in animals. Epigenetics. 2009;4(8):551-6.

Yiğit G. Erkeklerde Üreme İşlevleri ve Hormonal İşlevler. Çavuşoğlu H, Yeğen B, Aydın Z, Alican İ. 11. Baskı, Ankara, Nobel Tıp Kitapevleri. 2007;997-998.

Zamudio NM, Chong S, O'Bryan MK. Epigenetic regulation in male germ cells. Reproduction. 2008;136(2):131-46.

Zhou-Cun A, Yang Y, Zhang SZ, Li N, Zhang W. Single nucleotide polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene might be a genetic risk factor for infertility for Chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia. Asian J Androl. 2007;9(1):57-62.

**EKLER**  
**EK 1. Etik Kurulu Raporu**

**T.C.**  
**ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ**  
**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/ *SC*

01.06.2012

Sayın: **Prof. Dr. Ramazan AŞCI**

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Non-obstrüktif Azoospermik ve Şiddetli Oligospermik İnfertil Erkeklerde MTHFR Geni Metilasyon Değişimlerinin Araştırılması** başlıklı, OMÜ KA EK 2012/ 04 Karar nolu Genetik çalışma nitelikli araştırma projeniz: Amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre 31.05.2012 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.



Doç.Dr.A.Tevfik SÜNTER  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
Başkan yard.

## HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ

\*

---

### ARAŞTIRMANIN ADI ( ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

“Non-obstrüktif Azospermik ve Oligospermik İnfertil Erkeklerde  
*MTHFR* Geni Metilasyon Değişimlerinin Araştırılması ”

---

### 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 ZORUNDA MIYIM?

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 / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

### ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR? Açıklayınız

**Konu:** İnfertilitede *MTHFR* Geni Kimyasal Değişimleri

Nonobstrüktif azospermik ve şiddetli oligospermik infertil erkekelerde *MTHFR* geni kimyasal değişimlerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

### ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

İnfertilite ile ilişkisi olduğu bildirilen *MTHFR* geni kimyasal değişimlerini incelemek amacıyla testis biyopsisi (azospermik) yapılacak hastalardan 20 mikrogram biyopsi materyali; şiddetli oligospermik infertil erkekler ve fertil erkeklerden 2 mikrolitre

ejakülât alınacaktır. Testis dokusundan ve/veya ejakülattan DNA izole edilecek, DNA modifiye edilerek metilasyon değişimleri incelenecektir. Bu araştırma sizin tedavinizi ve tedavinizde kullanılacak ilaçları hiçbir şekilde yönlendirmeyecektir. Araştırmaya katılıp katılmama hakkına sahipsiniz. Araştırma başladıktan sonra istediğiniz taktirde araştırmadan ayrılabilirsiniz. Araştırmanın gidişine göre rızanıza bakılmaksızın araştırma dışında bırakılabilirsiniz.

### **BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?**

İnfertilite nedeniyle testis biyopsisi alınacaksa 20 mikrogram biyopsi materyali; diğer durumlarda (şiddetli oligospermik ve fertile erkekler) ise 2 mikrolitre ejakülât vermeniz gerekiyor.

### **BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?**

İnfertilite nedeniyle testis biyopsisi alınacaksa biyopsi materyalinden 20 mikrogram diğer durumlarda ise 2 mikrolitre ejakülât vermeniz gerekiyor.

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

Yoktur.

### **GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ**

Gebelik ve doğum kontrolüne etkisi yoktur.

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

Erkek infertilitesinde metilasyon değişimlerinin rol alıp almadığının belirlenebilmesine katkıda bulunulacaktır.

### **GÖNÜLLÜ KATILIM**

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

### **CALIŞMAYA 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 ilgili 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. Çalışma destekleyicisi firma düzenleyici otorite veya diğer 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 ve çalışma destekleyicisi firmanın her ikisi de yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar.

Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, 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 hakkında sahipsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahipsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen gerekirse sizin çalışma destekleyicisi firma ile temasa geçmenize yardımcı olabilecek doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Çalışma destekleyici firma onayınızdan vazgeçmeden önceki çalışma verilerinizi kullanmaya devam edebilir.

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

**ARASTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:**

Ad, Soyadı ve telefon numaraları

**Dr. Ramazan AŞCI**

Tel: 362 312 19 19/2255

**ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:** Varsa açıklayınız

Yoktur.

**YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR**

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

**Çalışmaya Katılma Onayı**

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

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

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

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

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Tuba KULAÇ

Doğum Yeri: Üsküdar

Doğum Tarihi:12.05.1986

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

2000-2004 yılları arasında Süleyman Demirel Lisesi'nde (Yabancı Dil Ağırlıklı) okudum. 2009 yılı'nda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden üçüncülük ile mezun oldum. 2010 yılı'nda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na yüksek lisans öğrencisi olarak kabul edildim. 2010 yılı'nda Anatomi, Fizyoloji, Farmakoloji, Histoloji ve Embriyoloji derslerini içeren bilimsel hazırlık programını başarıyla tamamladım.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

2011-2013 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda Y kromozomu mikrodelsyonları ve çeşitli polimorfizm çalışmalarında aktif olarak çalıştım.

E-posta: bio.tuba@hotmail.com