

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE DEFB126 DELESYON  
POLİMORFİZMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Hümeıra SUBAŞIOĞLU**

**Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI**

**İSTANBUL, 2013**

**T.C.**  
**HALIÇ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi **Hümeysra SUBAŞIOĞLU** tarafından hazırlanan “**Erkek İnfertilitesinde DEFB126 Delesyon Polimorfizmi**” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 18.09.2013

( Jüri Üyesinin Ünvanı , Adı , Soyadı ve Kurumu ) :

İmzası :

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Nagehan E.TUNALI  
Danışman-HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....  


Jüri Üyesi : Prof.Dr.Sadrettin Pençe  
İstanbul Üniv. Öğr.Üyesi

.....  


Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Mehmet OZANSOY  
Medipol Üniv. Öğr.Üyesi

.....  


Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.M.Baki YOKEŞ  
HAL.Üniv. Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

Jüri Üyesi : Doç.Dr.Hatice YORULMAZ  
HAL.Üniv. Hemşirelik ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

## ÖNSÖZ

Bu çalışma 2011-2013 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın tamamlanması süresince büyük bir gayret ve özveriyle çalışmamı takip eden, gösterdiği sabır ve hoşgörüsü bana destek olan, akademik yaşamımda davranışlarını kendime örnek olarak benimsediğim tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI'ya bana her zaman yol gösterici olduğu için çok teşekkür ederim.

Bu çalışmaya hasta bilgi ve örneklerini temin eden İstanbul Tüp Bebek ve Kadın Sağlığı Merkezi kurucusu Op. Dr. Aret KAMAR'a, Embriyoloji Laboratuvar Sorumlusu Dr. Faruk BENER'e çalışmamıza katkı sağlayan İstanbul Tüp Bebek Merkezi Ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Sağlıklı ve gönüllü bireylerin DNA örneklerinin toplanması konusunda yardımını esirgemeyen yüksek lisans arkadaşım Gülçin ÖZKARA'ya ve biyoistatistik testlerde ve değerlendirmede çok büyük yardımcı olan Arş. Gör. N. Ozan TİRYAKIOĞLU'na teşekkür ederim.

Moral kaynağım olan, birlikte olmaktan huzur ve mutluluk duyduğum hem arkadaşım hem meslektaşım Emre CEBECİ'ye tez çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemediği için teşekkür ederim.

Tezimin ilerleyişinde ve savunma öncesinde incelenmesinde yardımcı olan sayın jüri üyelerine emekleri için teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca bana destek olan, verdikleri sevgi ve fırsatlarla beni bu günlere getiren, verdiğim her kararın arkasında duran, ihtiyaç duyduğum her anımda yanımda olan sevgili anneme, babama ve canım abime anlayış ve sabırları için sonsuz teşekkür ederim.

Eylül, 2013

Hümevra SUBAŞIOĞLU

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>V</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Erkek Üreme Sistemi.....	1
1.2. Spermatogenez .....	2
1.2.1. Spermin İletimi, Olgunlaşması Ve Depolanması.....	3
1.2.2. Spermatogeneze Etki Eden Faktörler .....	3
1.2.2.1. Sıcaklık.....	3
1.2.2.2. Kriptorşidizm.....	3
1.2.2.3. Radyasyon.....	4
1.2.2.4. Kanser Kemoterapisi.....	4
1.2.2.5. Yaş .....	4
1.2.2.6. Varikosel.....	5
1.2.2.7. Sigara .....	5
1.3. İnfertilite.....	5
1.3.1. Erkek İnfertilitesinin Başlıca Nedenleri.....	6
1.3.2. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi .....	8
1.3.3. Anamnez .....	8
1.3.4. Fizik Muayene .....	8
1.3.5. Semen Analizi.....	8
1.3.6. Semen Toplanması .....	9
1.3.7. Semen Makroskopik Değerlendirilmesi .....	10
1.3.8. Semen Mikroskopik Değerlendirmesi .....	10

1.3.8.1. Sperm sayısı .....	10
1.3.8.2. Sperm motilitesi .....	10
1.3.8.3. Yuvarlak hücre sayısı.....	11
1.3.8.4. Sperm morfolojisi .....	11
1.3.8.5. Sperm malformasyonlarının tipleri .....	12
1.3.9. Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYT).....	13
1.3.10. Açıklanamayan (Sebebi Bilinmeyen) İnfertilite.....	14
1.4. Defensinler.....	14
1.4.1. $\alpha$ -Defensinler.....	15
1.4.1.1. $\alpha$ -defensinlerin işlevleri.....	16
1.4.2. $\beta$ -Defensinler.....	16
1.4.3. Teta-defensinler.....	17
1.5. DEFB126.....	17
1.5.1. DEFB126 Gen Mutasyonu ve Erkek İnfertilitesi.....	19
1.5.2. DEFB126 ve Sperm Glikokaliksi.....	20
1.5.3. DEFB126 ve Sperm Transportu.....	21
1.5.3.1. Spermin Servikal Mukusla Etkileşimi.....	21
1.5.3.2. Sperm Yumurta Kanalı Etkileşimi.....	22
1.6. Spermatozoon DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri.....	23
1.6.1. Akridin Oranj (AO) Boyaması.....	23
1.6.2. Sperm-Hyaluronik Asit Bağlanması (Sperm HBA testi).....	23
<b>2. AMAÇ.....</b>	<b>25</b>
<b>3. GEREÇLER.....</b>	<b>26</b>
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler.....	26
3.2. Kimyasallar .....	26
3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler.....	27
3.3.1. Yanak içi Epitel Örneklerinden DNA İzolasyon Tamponları.....	27
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Saflaştırma için Gerekli Kimyasallar.....	28
3.3.3. Oligonükleotid Primerler.....	28
3.3.4. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları .....	29
3.3.5. Elektroforezde Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	29
3.3.6. DNA Uzunluk Markörleri.....	29
3.3.7. Sperm Boyama Solüsyonları.....	29

3.3.8. Akridin Orange (AO) Boyama Solüsyonları.....	29
3.3.9. HBA <sup>®</sup> Sperm-Hyaluronana Bağlanma Tetkiki .....	30
3.3.10. Cihazlar.....	30
<b>4. YÖNTEMLER.....</b>	<b>32</b>
4.1. Yanak İçi Epitel Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	32
4.2. İzole Edilen DNA'nın Analizi .....	32
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	33
4.4. Primer Dizaynı.....	35
4.5. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimi.....	35
4.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	36
4.7. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması .....	37
4.8. Dizi Analizi .....	37
4.9. Sperm Örneklerinin Toplanması ve Değerlendirilmesi.....	38
4.10. Spermac <sup>™</sup> Boyama ile Sperm Morfoloji Değerlendirilmesi.....	39
4.11. Akridin Orange (AO) Boyama.....	39
4.12. HBA <sup>®</sup> Sperm-Hyaluronana Bağlanma Tetkiki.....	39
4.13. İstatistiksel Analiz.....	40
<b>5. SONUÇLAR.....</b>	<b>41</b>
5.1.Örneklerin Tanımı.....	41
5.2.DNA İzolasyonu.....	42
5.3. DEFB126 geni Polimorfizm Taraması.....	42
5.3.1. İlgili Gen Bölgesinin Çoğaltılması.....	42
5.3.2.Çoğaltılan Gen Bölgesinin Restriksiyonu.....	43
5.3.3.Dizi Analizi .....	43
5.4. Sperm Morfoloji Tayini ve Bazı Anormalilikler.....	45
5.5. Sperm DNA Fragmentasyonu.....	46
5.6. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	47
5.6.1. Erkek İnfertilitesinde Eş Yaşı Gözetmeksizin İstatistiksel Analiz .....	47
5.6.2. Erkek İnfertilitesinde Eş Yaşı Gözetilerek İstatistiksel Analiz.....	61
5.7. Sperm Hyaluronana Bağlanma Tetkiki (HBA) .....	81
<b>6. TARTIŞMA .....</b>	<b>82</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>87</b>
7.1. Kitaplar .....	87

7.2. Makaleler.....	88
7.3. İnternet .....	93
<b>8. EKLER.....</b>	<b>94</b>
8.1. EK 1: Etik Kurul Raporu.....	94
<b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>95</b>

## KISALTMALAR

<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: Amonyum sülfat
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>α</b>	: Alfa
<b>β</b>	: Beta
<b>AO</b>	: Akridin Oranj
<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>BPB</b>	: Bromofenol Mavisi
<b>BSA</b>	: Sığır Serum Albumini
<b>PBS</b>	: Fosfat Tuzu Tamponu
<b>CDS</b>	: Referans Kodlama Dizisi
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>DEFB126</b>	: Beta-defensin 126
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleotidler
<b>EDTA</b>	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
<b>EtBr</b>	: Etidyum Bromür
<b>FSH</b>	: Folikül stimüle edici hormon
<b>HA</b>	: Hyaluranik Asit
<b>HBA</b>	: Hyaluronik Asit Bağlanması Testi
<b>hBD</b>	: İnsan Beta Defensini
<b>HD</b>	: İnsan Defensini
<b>HNP 1-4</b>	: İnsan Nötrofil Defensini 1-4
<b>HspA2</b>	: Isı Şoku Proteini A2
<b>HW</b>	: Hardy Weinberg
<b>ICSI</b>	: İntrastoplazmik Sperm İnjesiyonu
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IUI</b>	: İntrauterin İnseminasyon



<b>IVF</b>	: <i>in vitro</i> Fertilizasyon
<b>LAP</b>	: Lingual Antimikrobiyal Peptit
<b>LH</b>	: Luteinleştirici homon
<b>m</b>	: Metre
<b>M</b>	: Molar
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum Klorür
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>Nm</b>	: Nanometre
<b>OD</b>	: Optik Dansite
<b>OECs</b>	: Yumurta Kanalı Epitel Hücreleri
<b>OPU</b>	: Oosit Toplama
<b>PH20</b>	: Sperm Hiyaluronidaz
<b>PSA</b>	: Prostat Spesifik Antijen
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RFLP</b>	: Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimarfizmi
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SCOS</b>	: Sertoli Cell Only Sendromu
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SNP</b>	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
<b>TAP</b>	: Trakeal Antimikrobiyal Peptit
<b>TBE</b>	: Tris Borat EDTA Tamponu
<b>TE</b>	: Tris EDTA
<b>TeBG</b>	: Testosteron Östradiol Bağlayıcı Globulin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktör-alfa
<b>UV</b>	: Ultra Viole
<b>ÜYT</b>	: Üremeye Yardımcı Teknikler
<b><math>\chi^2</math></b>	: Ki-kare
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER

### Sayfa No.

Şekil 1.1. Erkek üreme sistemi.....	1
Şekil 1.2. Spermatogenez.....	2
Şekil 1.3. Normal sperm görüntüsü.....	11
Şekil 1.4. Normal spermin bölümlerinin gösterilmesi.....	12
Şekil 1.5. Sperm baş defektleri.....	12
Şekil 1.6. Sperm boyun defektleri ve stoplazmik damla .....	13
Şekil 1.7. Sperme ait kuyruk defektleri.....	13
Şekil 1.8. HA ile bağlı ve bağlı olmayan spermin şematik olarak gösterimi.....	24
Şekil 4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu aşamaları.....	34
Şekil 5.1. İzole edilen DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	42
Şekil 5.2. 202 bç'lik PCR ürününün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	42
Şekil 5.3. Mnl I kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü.....	43
Şekil 5.4. A) wt/wt B) del/del ve C) wt/del örneklerinin dizi analizi görüntüleri.....	44
Şekil 5.5. Baş anomalisi - Uzun baş ve düzensiz akrozom dağılımı, boyun anomalisi – sitoplazmik droplet.....	45
Şekil 5.6. Boyun anomalisi-kinked.....	45
Şekil 5.7. Kuyruk anomalisi - Dag defect .....	46
Şekil 5.8. Baş anomalisi (düzensiz akrozomal dağılım) ve boyun anomalileri (kalın ve kırık boyun, sitoplazmik droplet) .....	46
Şekil 5.9. Akridin Orange boyaması sonrasında spermlerin floresan mikroskop ile analizi. 1:hasarsız-yeşil, 2: az hasarlı-sarı, 3 orta hasarlı-turuncu, 4: çok hasarlı-kırmızı hücre .....	47
Şekil 5.10. Hareketliliğin genotiplere göre dağılımı .....	50
Şekil 5.11. İleri hareketliliğin genotiplere göre dağılımı .....	51
Şekil 5.12. Bütün hasta grubunda dominant gruplamaya göre sperm hareketliliği.....	53

<b>Şekil 5.13.</b> Bütün hasta grubunda dominant gruplamaya göre sperm boyanması.....	53
<b>Şekil 5.14.</b> Oligospermi hastalarında dominant gruplamaya göre sperm sayısı farklılığı.....	56
<b>Şekil 5.15.</b> Oligospermi hastalarında dominant gruplamaya göre sperm hareketi farklılığı .....	57
<b>Şekil 5.16.</b> Oligospermi hastalarında dominant gruplamaya göre sperm ileri hareketliliği farklılığı .....	57
<b>Şekil 5.17.</b> Oligospermi hasta grubunda dominant gruplamaya göre sperm konsantrasyonu farklılığı .....	58
<b>Şekil 5.18.</b> Astenospermilerde sperm hareketliliğinin genotiplerle karşılaştırılması.....	73
<b>Şekil 5.19.</b> Astenospermilerde sperm hareketliliğinin dominant gruplandırmaya göre incelenmesi .....	74
<b>Şekil 5.20.</b> Astenospermilerde sperm ileri hareketliliğinin dominant gruplandırmaya göre incelenmesi .....	74
<b>Şekil 5.21.</b> Astenospermilerde sperm hareketliliğinin resesif gruplandırmaya göre incelenmesi .....	75
<b>Şekil 5.22.</b> Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda sperm hareketliliğinin resesif gruplandırmaya göre incelenmesi .....	78

## TABLolar

	Sayfa No.
<b>Tablo 1.1.</b> WHO 2010 semen analizi referans aralığı.....	9
<b>Tablo 1.2.</b> Sperm parametreleri sonucu morfolojik tanı kriterleri.....	9
<b>Tablo 1.3.</b> Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi.....	11
<b>Tablo 1.4.</b> Açıklanamayan infertilite olası etyolojileri.....	14
<b>Tablo 1.5.</b> $\beta$ -defensinlerin buldukları yerler ve işlevler.....	17
<b>Tablo 1.6.</b> HBA <sup>®</sup> Skor Sonuçlarının Yorumlanması.....	24
<b>Tablo 3.1.</b> Bu çalışmada incelenen polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri (F: ileri primer, R: Geri primer) .....	28
<b>Tablo 4.1.</b> PZR'da Kullanılan Malzemeler ve Miktarları.....	34
<b>Tablo 4.2.</b> PCR Isı Döngüsü Şartları.....	35
<b>Tablo 4.3.</b> Restriksiyon Enzimi Kesim Şartları.....	36
<b>Tablo 5.1.</b> Genotip frekansları .....	47
<b>Tablo 5.2</b> Kontrol Grubu İçin Hardy Weinberg Dengesi .....	48
<b>Tablo 5.3</b> Hasta Grubu İçin Hardy Weinberg Dengesi .....	48
<b>Tablo 5.4.</b> Sigara içen ve içmeyen bireylerin frekansları.....	48
<b>Tablo 5.5.</b> Alkol içen ve içmeyen bireylerin frekansları.....	49
<b>Tablo 5.6.</b> Genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi.....	49
<b>Tablo 5.7.</b> Genotipler ile hamile kalım ilişkisi.....	50
<b>Tablo 5.8.</b> Sperm hareketinin genotiplere göre karşılaştırılması .....	51
<b>Tablo 5.9.</b> Sperm ileri hareketliliğin genotiplere göre karşılaştırılması.....	52
<b>Tablo 5.10.</b> Bütün hasta grubunda dominant gruplamaya göre sperm ölçütlerinin farklılığı.....	52
<b>Tablo 5.11.</b> Bütün hasta grubunda resesif gruplamaya göre sperm ölçütlerinin farklılığı .....	54
<b>Tablo 5.12.</b> Oligospermi hastalarda genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi.....	54
<b>Tablo 5.13.</b> Oligospermi hastalarda genotipik etkiler ile hamile kalım ilişkisi.....	55

<b>Tablo 5.14.</b> Oligospermi hastalarda sperm parametreleri ile genotip ilişkisinin hipotez testi özeti.....	55
<b>Tablo 5.15.</b> Oligospermi hastalarının dominant gruplandırmaya göre sperm parametrelerinin analizi .....	56
<b>Tablo 5.16.</b> Oligospermi hastalarında anlamlı bulunan sperm parametrelerinin dominant gruplamaya göre karşılaştırılması .....	56
<b>Tablo 5.17.</b> Oligospermi hasta grubunda resesif gruplamaya göre sperm parametrelerinin analizi .....	58
<b>Tablo 5.18.</b> Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipik ve çevresel etkiler ile kısırlılık ilişkisi.....	59
<b>Tablo 5.19.</b> Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipik etkiler ile hamile kalım ilişkisi .....	59
<b>Tablo 5.20.</b> Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda sperm parametreleri ile genotip ilişkisinin hipotez testi özeti.....	60
<b>Tablo 5.21.</b> Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipe ile sperm morfolojisinin hipotez testi özeti.....	60
<b>Tablo 5.22.</b> Sebebi bilinmeyen infertil hastaların dominant modele göre sperm parametrelerinin incelenmesi .....	61
<b>Tablo 5.23.</b> Hasta grubu için Hardy Weinberg Dengesi.....	61
<b>Tablo 5.24.</b> Genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi.....	62
<b>Tablo 5.25.</b> Genotipik etkiler ile hamile kalım ilişkisi.....	62
<b>Tablo 5.26.</b> Genotipik etkiler ile DNA fragmentasyonu ilişkisi.....	62
<b>Tablo 5.27.</b> Sperm parametrelerinin genotiplere göre dağılımları.....	63
<b>Tablo 5.28.</b> Sperm parametrelerinin genotipik karşılaştırması.....	64
<b>Tablo 5.29.</b> Sperm parametrelerinin dominant gruplandırmaya göre incelenmesi....	65
<b>Tablo 5.30.</b> Sperm parametrelerinin resesif gruplandırmaya göre incelenmesi.....	65
<b>Tablo 5.31.</b> Genotipik etkilerin infertilite ile ilişkisi.....	66
<b>Tablo 5.32.</b> Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi .....	66
<b>Tablo 5.33.</b> Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genetik etkiler ile hamile kalım ilişkisi .....	67
<b>Tablo 5.34.</b> Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genetik etkiler ile DNA fragmentasyonu ilişkisi .....	67
<b>Tablo 5.35.</b> Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde sperm parametreleri ve genotiplere dağılımları .....	68
<b>Tablo 5.36.</b> Sperm ölçütlerinin genetik modellere göre grup içi farklılıkları.....	69
<b>Tablo 5.37.</b> Sperm ölçütlerinin dominant gruplamaya göre farklılıklarının belirlenmesi .....	69

<b>Tablo 5.38.</b> Sperm ölçütlerinin resesif gruplamaya göre incelenmesi.....	70
<b>Tablo 5.39.</b> Astenospermili hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi.....	70
<b>Tablo 5.40.</b> Astenospermili hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genetik etkiler ile hamile kalım ilişkisi .....	71
<b>Tablo 5.41.</b> Sperm parametrelerinin temel özellikleri ve genotip dağılımları.....	72
<b>Tablo 5.42.</b> Sperm ölçütlerinin genetik modellere göre grup içi farklılıkları.....	73
<b>Tablo 5.43.</b> Teratospermili hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi .....	75
<b>Tablo 5.44.</b> Teratospermili hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genetik etkiler ile hamile kalım ilişkisi .....	76
<b>Tablo 5.45.</b> Teratospermi hastalarının genetik etkiler ile DNA fragmentasyonu ilişkisi .....	76
<b>Tablo 5.46.</b> Teratospermi hastalarının DNA fragmentasyonu ile genotip ilişkisi.....	76
<b>Tablo 5.47.</b> Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipik ve çevresel etkiler ile kısırlık ilişkisi .....	77
<b>Tablo 5.48.</b> Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipik etkiler ile hamile kalım ilişkisi .....	77
<b>Tablo 5.49.</b> Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genetik etkiler ile DNA fragmentasyonu ilişkisi .....	78
<b>Tablo 5.50.</b> Sebebi bilinmeyen ve sigara-alkol kullanmayan infertil hastalarda sperm parametrelerinin incelenmesi.....	79
<b>Tablo 5.51.</b> Sebebi bilinmeyen ve sigara-alkol kullanmayan infertil hastalarda total hareket ve kuyruk anomalileri dağılımlarının incelenmesi.....	79
<b>Tablo 5.52.</b> Sebebi bilinmeyen ve sigara-alkol kullanmayan infertil hasta grubunda resesif gruplamaya göre sperm parametrelerinin analizi.....	80
<b>Tablo 5.53.</b> Sebebi bilinmeyen ve sigara-alkol kullanmayan infertil hasta grubunda resesif gruplamaya göre sperm total hareketi analizi.....	81
<b>Tablo 5.54.</b> Hyaluronan katmanına bağlanan sperm yüzdesi.....	81
<b>Tablo 6.1.</b> DEFB126 delesyon varyantının farklı toplumlarda genotip frekansları...	83

## GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Hümeyra SUBAŞIOĞLU  
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI  
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Eylül 2013

## ÖZET

### ERKEK İNFERTİLİTESİNDE DEFB126 DELESYON POLİMORFİZMİ

İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütüne göre (WHO) bir çiftin korunmadan bir yıl ilişkiye girmeleri durumunda gebe kalınmaması olarak tanımlanmıştır. Dünya çapında infertilite %15 civarında ve %50'sinin erkek faktörüne bağlı olduğu bildirilmiştir. İnfertil çiftlerin %15'inde infertilite açıklanamamıştır. Glikozillenmiş bir polipeptit olan B-defensin 126 (DEFB126), immün korumadan ve spermin kadın üreme sistemindeki mukozal sıvılarda verimli şekilde hareket etmesinden sorumludur. Bu çalışmada DEFB126 CC delesyon polimorfizminin (rs371674869) Türk popülasyonunda erkek infertilitesi ile ilişkisi 210 fertil ve 206 infertil erkek bireyde incelenmiş, genotip dağılımları karşılaştırılmış, anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Sebebi bilinmeyen infertil erkeklerde dominant model analizine göre erkek infertilitesi ile polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ve delesyon alelinin koruyucu etkisi vardır. Genotipik modelde de heterozigot genotip erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiş ve heterozigotluğun koruyuculuğu saptanmıştır.

İnfertil bireyler dominant modele göre gruplandırılıp sperm ölçütleri açısından analiz edildiğinde sebebi bilinmeyen infertilite ve oligozoospermi gruplarında, homozigot varyantta diğer genotiplere göre spermde total hareket ve ileri hareket

açısından anlamlı düşüş görülmüştür. Resesif modellemeye göre sebebi bilinmeyen infertil homozigot varyant grupta kuyruk anomalisi daha fazla görülmüştür. Çevresel faktörler olarak sigara ve alkolün infertiliteye etkisi araştırılmış ve sperm parametreleri normal olan ve sebebi bilinmeyen infertil erkekler için risk faktörü olarak belirlenmiştir. Açıklanamayan infertilitede sigara kullanmanın 6 kat, alkol kullanmanın ise 4 kat risk oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca polimorfizmin infertil bireylerden alınan sperm parametrelerinin sperm DNA'sında oluşan hasarla ilişkisi analiz edilmiş, ancak ilişki bulunamamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** İnfertilite, DEFB126, Defensin, Akridin Turuncusu, Türk popülasyonu



## **GENERAL INFORMATION**

Name and Surname : Hümeyra SUBAŞIOĞLU  
Field : Molecular Biology and Genetics  
Program : Molecular Biology and Genetics  
Supervisor : Assist. Prof.Dr. Nagehan ERSOY TUNALI  
Degree Awarded and Date : Master of Science – September 2013

## **ABSTRACT**

### **DEFB126 DELETION POLYMORPHISM IN MALE INFERTILITY**

Infertility was defined by World Health Organization (WHO) as inability of a non-contracepting couple to achieve a pregnancy in one year. Infertility is observed in 5% of couples worldwide and 50% of cases are caused by male infertility. A glycosylated polypeptide, B-defensin 126 (DEFB126), is responsible for immune deficiency and assist sperm to move effectively in mucosal fluid of female genital tract. In this project, association of DEFB126 CC deletion polymorphism (rs371674869) in the Turkish population was investigated in 210 fertile and 206 infertile men by comparing genotype distributions however no statistically significant difference was found between groups.

Statistically significant association was found between this polymorphism and idiopathic male infertility using dominant model, and deletion allele was found to be a protective.

Infertile patients were classified according to sperm defects and analysed in terms of their sperm parameters using the dominant model, and a significant decrease was observed for the homozygous variants in terms of sperm total and progressive motility in patients with idiopathic infertility and oligozoospermia, compared to patients with other genotypes. According to the recessive model, tail

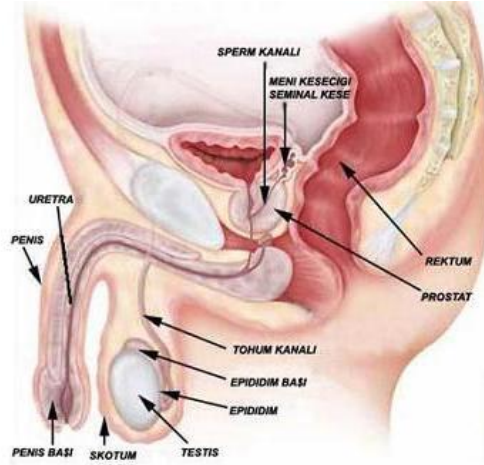
defects were much more frequent in patients with idiopathic infertility, who has homozygous variant allele. As the environmental factors, the effects of smoking and alcohol in male infertility were investigated, and both were found as risk factors in patients with idiopathic infertility. Smoking was found 6 fold, alcohol was found 4 fold risk factors for unexplained infertility. Association of this polymorphism with DNA fragmentation was also investigated in infertile subjects, however, no association was found.

**Key words:** Infertility, DEFB126, Defensin, Akridine Orange, Turkish population

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, germ hücresi olan spermin devamlı üretimi ve erkek seks hormonları olan androjenlerin sentezi ve salınımından sorumludur. Erkek üreme sistemi testis, genital kanal sistemi (epididimis, duktus deferens, duktus ejakulator ve erkek uretrasının bir kısmı), yardımcı üreme bezleri (vesikula seminalis, prostat ve bulbo uretral bezler) ve penisten oluşur (Şekil 1.1.) (Abraham, 2002: 529-550; Ross, Kaye ve Pawlina, 2003: 689-696).

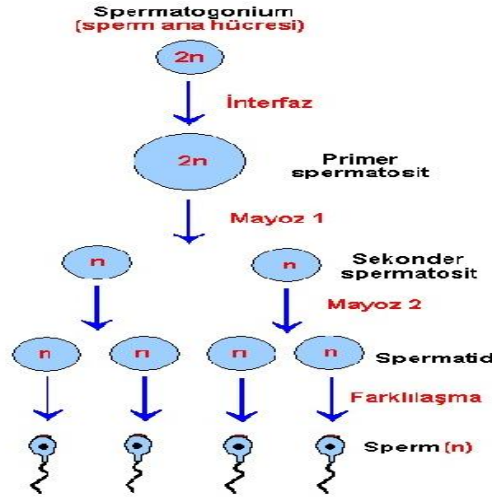


Şekil 1.1. Erkek üreme sistemi

İnsan testisi iki önemli fonksiyonu olan bir organdır. Birinci fonksiyonu seminifer tübüllerde spermatogenez ile sperm oluşumunu sağlamak, ikinci fonksiyonu ise interstisyel dokudaki Leydig hücrelerinden steroid hormonlarının (androjenleri) salgılanmasını sağlamaktır. Bu salgılanan steroid hormonlarından biri testosterondur. Testosteron yalnızca sperm üretimi için değil, aynı zamanda sekonder cinsiyet karakterlerin gelişmesi ve normal cinsel aktivitenin sürdürülmesi için de gerekli olan bir hormondur. Testosteronun bu fonksiyonları ön hipofizden gonadotropinler (Luteinleştirici hormon (LH) ve Folikül stimüle edici hormon (FSH)) salgılanması yoluyla kontrol edilir (Turek, 2004: 678-712).

## 1.2. Spermatogenez

Spermatogenez ergenlikten önce başlar, gonadotropin düzeyinin yükselmesinin etkisiyle yaşam boyunca devam eder (Ward, 1993: 1193-1201). 72 günlük sikluslar halindeki insan spermatogenezi pubertede başlar. Germ hücrelerinin çeşitli aşamalardan geçtikten sonra sperm hücresi haline gelmesi spermatogenez olarak adlandırılır. Bu süreç içinde germ hücreleri mayoz bölünme sonrası 46 kromozumlu diploid halden 23 kromozumlu haploid hale gelirler ve yine 23 kromozom içeren haploid yumurta hücresi ile birleşerek 46 kromozumlu yeni bir bireyin oluşmasına olanak sağlarlar. Spermatogenez proliferasyon, redüksiyon-bölünme ve farklılaşma fazları olmak üzere üç aşamada incelenir (Turek, 2004: 678-712; Işık ve Vicdan, 1999; Delibaşı, Balaban ve Ayaş 1993: 1-2000) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Spermatogenez

**Proliferasyon Fazı:** Germinal epitel içinde olgunlaşma evresinin ilk basamağındaki hücreler spermatogonyumlardır. Mitoz bölünme ile oluşan bu hücrelerin bir bölümü spermatogenez sürecine girerken, bir kısmı dejenere olur (Işık ve Vicdan, 1999; Delibaşı, Balaban ve Ayaş 1993: 1-2000).

**Redüksiyon-Bölünme Fazı:** İnsanda, koyu tip A, açık tip A ve B spermatogonyumlar olmak üzere üç grup spermatogonyum ayırt edilmiştir. Koyu tip A spermatogonyumlar açık tip A spermatogonyumlara dönüşürler. Açık tip A spermatogonyumlar da tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Tip B spermatogonyumlar ise farklılaşma sürecine girerek primer spermatozoidlerin öncüllerini oluştururlar. Primer spermatozoidler ise birinci mayoz bölünme ile

sekonder spermatositleri oluşturur. Hemen arkasından ikinci mayoz bölünmeyi geçirerek haploid sayıda kromozom içeren spermatidleri meydana getirir. Spermatosit adını alan hücreler genetik materyallerini iki katına çıkardıktan sonra 4 ayrı hücreye bölünürler. Bu 4 hücreden her biri 23 kromozom içermektedir (Işık ve Vicdan, 1999; Delibaşı, Balaban ve Ayaş 1993: 1-2000).

**Farklılaşma Fazı:** Bölünerek genetik materyallerini yarıya indiren bu yeni hücreler uzun bir süreç sonunda farklılaşırlar. Buna *spermiyogenez* adı verilir. Spermiyogenez süresince üreme hücreleri hem dölleme yeteneklerini kazanırlar, hem de spermlerin hareket yeteneğini sağlayan kuyruk gelişir. Tüm bu fazlar sırasında sperm öncülü hücreler seminifer epitelinin derinliklerinden yüzeye, yani seminifer tübüllerin iç boşluğuna doğru ilerler (Işık ve Vicdan, 1999; Delibaşı, Balaban ve Ayaş 1993: 1-2000).

### **1.2.1. Spermin İletimi, Olgunlaşması ve Depolanması**

Spermin üretiminden testis, spermatozoaların olgunlaşması, depolanması ve taşınmasından ise epididimis sorumludur. Testiste hareketsiz olarak bulunan ve ovumu dölleme yeteneğinden yoksun olan spermatozoalar, epididimisten geçtikten sonra hareket ve dölleme yeteneği kazanırlar. Epididimis 5-6 m uzunluğunda tek bir tubuli kontortiden ibaret olup baş (kaput), gövde (korpus) ve kuyruk (kauda) olmak üzere 3 bölümden oluşmuştur. Epididimis aynı zamanda sperm için bir rezervuar veya depo görevi görür (Anafarta ve diğ., 1998).

### **1.2.2. Spermatogeneze Etki Eden Faktörler**

#### **1.2.2.1. Sıcaklık**

Normalde testisler vücut ısısından 2-3°C daha soğuk ortamda bulunurlar. Spermatogenez için 35°C'lik sıcaklık idealdir. Skrotum, testisleri içerisinde taşımakla birlikte kasılıp-gevşemesiyle de testislerin belirli bir ısıda kalmasını sağlarlar.

#### **1.2.2.2. Kriptorşidizm**

Kriptorşidizm (inmemiş testis) gelişim sırasında testisin skrotal keseye ulaşamaması ve abdominal boşluk veya inguinal kanalda kalması olayıdır. Bu

durumda, normal vücut sıcaklığı (37°C-38°C) spermatogenezi önler ve durum çift taraflıysa infertilite meydana gelir (Ross ve diğ., 2003: 689-696).

### **1.2.2.3. Radyasyon**

Spermatogonyal kök hücrelerin erkek fertilitesinde önemli etkileri vardır. Bu hücreler kısmen sessiz hücrelerdir ve dolayısıyla radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler. Mitotik olarak bölünen spermatogonyumlar, mayotik bölünen spermatozoidler ve farklılaşmakta olan spermatozoidler kanser kemoterapisine ve radyasyona duyarlıdır (Abraham ve diğ., 2002: 529-550).

### **1.2.2.4. Kanser Kemoterapisi**

Anti-tümoral ilaçlarla tedavi edilen genç erkek hastalar geçici süreyle aspermatogenik hale gelirler. Tedavi spermatogonyumların mitozunu ve spermatozoidlerin mayozunu etkileyebilmektedir (Ross ve diğ., 2003: 689-696). Hayvan çalışmalarında radyoterapi ve kemoterapinin DNA hasarı yaptığı, insan spermalarında ise anöploidi oranında geçici olarak bir artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Stahl ve diğ., 2006: 3199-3205).

### **1.2.2.5. Yaş**

Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada semen hacmi, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, motilite ve normal morfolojili sperm sayısının yaş ile azaldığı görülmüştür (Chen ve diğ., 2003: 24). Chen ve arkadaşları bir başka çalışmada mevsim, yaş ve sigara kullanmanın semen parametreleri üzerine etkisini araştırmıştır. Yaş grupları ile semen volümü, sperm konsantrasyonu, motilite yüzdesi ve normal morfoloji yüzdesi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Chen ve diğ., 2004: 1-2). Eskenazi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise semen kalitesinde yaşa bağlı belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Özellikle semen volümü ve sperm motilitesi konusunda daha belirgin bir azalış gözlenmiştir (Eskenazi ve diğ., 2003: 447-454). Yaşlanma ile doğru orantılı olarak sperm DNA'sında hasar oluşmaktadır. Yaşa bağlı azalan sperm motilitesinin ve artan DNA hasarının nedeninin, semen içerisindeki lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) olabileceği ileri sürülmüştür (Aitken ve diğ., 1998: 1037-1046; Irvine ve diğ., 2000: 33-44).

### **1.2.2.6. Varikosel**

Varikosel testiküler venlerdeki geri akımla karakterize olup spermatik kordon venlerinin anormal genişlemesi nedeniyle oluşur. Varikosel sonucu sperm üretimi azalır (Abraham ve diğ., 2002: 529-550). Fujisawa ve arkadaşları varikoselli hastaların testis dokusunda DNA polimeraz seviyesinde ciddi bir azalma olduğunu ve bu enzim eksikliğinin spermatogenez üzerine olumsuz bir etki yapması nedeniyle DNA hasarı meydana getirebileceğini ileri sürmüşlerdir (Fujisawa ve diğ., 1988: 795-800).

### **1.2.3.7. Sigara**

Sigara ve sperm parametreleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bir kısım yayınlar sperm parametrelerinin sigara kullanımından etkilendiğini savunurken, yapılan bazı çalışmalarda ise sigara ile sperm parametreleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. İnfertil Türk erkeklerinde yapılan bir çalışmada günde yirmi adet ve daha fazla sigara içenlerde sperm kuyruk defektlerinin daha fazla olduğu gözlenmiş, ancak ilginç olarak günde yirminin üzerinde sigara içenlerde hafif içicilere göre ileri hareketliliğin daha fazla olduğu saptanmıştır (Özgür ve diğ., 2005: 109-112). Ancak İsveç erkeklerinde yapılan çalışmada semen hacmi ve total sperm konsantrasyonu dışında semen kalitesi ile sigara içimi arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Osser ve diğ., 1992: 215-218). Buna karşın Trummer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonucunda sigara içiminin semen parametrelerini etkilemediği, ancak yuvarlak hücre ve lökosit oranını anlamlı olarak artırdığı gözlenmiştir (Trummer ve diğ., 2002: 1554-1559).

## **1.3. İnfertilite**

Çiftlerin yaklaşık %15'i düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen ilk bir yıl içerisinde çocuk sahibi olamamaktadırlar. Olguların % 20'sinde erkek tek başına sorumlu bulunurken, % 30-40'ında kadın faktörüne eşlik eden bir patoloji mevcuttur. Dolayısıyla, infertil çiftlerin yarısında bir erkek faktörü söz konusudur (Moshcr ve Pratt, 1991: 192-193). İnfertilitede eğer erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bir bozulma ile ortaya çıkar. Oysa sperm değerleri normal olsa da cinsel fonksiyon bozuklukları ya da penil deformiteler gibi sorunlar

da infertilite nedeni olabilir. Ayrıca, kromatin hasarları, fertilizasyon ve embriyo gelişim bozukluğu durumları da son yıllarda üzerinde sık durulan konular arasındadır. Erkek infertilitesinin yaklaşık %40-60'ında altta yatan neden bilinse de birçoğunda etken ortaya konamamakta (%15) ve açıklanamayan infertilite olarak kabul edilmektedir. Tam değerlendirilmesi neticesinde, düzeltilemeyecek bir patolojiye sahip olduğunun anlaşılması, erkeğin gereksiz ve stres yaratacak uzun tedavi protokolleri içerisine girmesini önler. Böyle çiftler ejakülat spermi ya da epididimis veya testislerden elde edilecek spermlerin, *in vitro* fertilizasyon (IVF) veya intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI)'nda kullanılması ile çocuk sahibi olabilirler. Bütün bunlara ek olarak, altta yatan nedenin genetik olduğunun bilinmesi, doğacak çocuğun maruz kalabileceği anomaliler hakkında ailenin önceden bilgilendirilmesi bakımından son derece önem taşır. Diğer yandan, sağlıklı bir gebeliğin başarılabilmesi için optimal değerlendirme protokolü içerisinde erkek faktörünün normal bulunmasının yanı sıra kadında ovulasyon, tubaların açıklığı ve fonksiyonel durumu, uterus kavitesinin durumu ile servikal faktörlerin de ortaya konmuş olması gerekir (Aydos ve diğ., 2004: 74-172).

### **1.3.1. Erkek İnfertilitesinin Başlıca Nedenleri**

Erkek infertilitesinin başlıca nedenleri hormonal bozukluklar, kromozom bozuklukları, gonadotoksinler, anormal spermatogenez ve çeşitli hastalıklar olabilir (Aydos ve diğ., 2007: 967-1012; Turek ve diğ., 2004: 678-712).

#### **Hormonal Bozukluklar**

- İzole gonadotropin yetmezliği (Kallman sendromu),
- İzole LH ve FSH yetmezliği,
- Hiperprolaktinemi,
- Tiroid hastalıkları,
- Konjenital hipogonadotropik hastalık,
- Hipofizer yetersizlik (tümörler, infiltratif olay, ameliyat, radyasyon),
- Ekzojen hormonlar (androjen-estrogen, glukokortikoid fazla verilmesi).



### **Kalıtısal gen hastalıkları ve kromozom bozuklukları**

- Klinefelter Sendromu, XX erkek, XYY sendromu,
- Turner sendromu,
- Y kromozom mikrolelesyonları,
- Myotonik distrofi,
- Hemokromatozis,
- Orak hücre anemisi,
- Germ hücre aplazisi (SCOS: Sertoli cell only sendromu).

### **Gonadotoksinler**

- İlaçlar, insektisitler,
- Radyasyon, manyetik alanlar,
- Alkol, sigara ve uyuşturucu maddeler,
- Gıda katkı maddeleri.

### **Çeşitli hastalıklar**

- Testislere travma ve omurilik zedelenmesi,
- Böbrek yetmezliği, karaciğer hastalığı,
- İmmünolojik hastalıklar, enfeksiyonlar.

### **Anormal spermatogenez**

- Kriptorşitizm (inmemiş testis),
- Varikozel,
- Sperm kanallarında tıkanıklık,
- Sperm motilite ve fonksiyon bozukluğu,
- Sperm morfoloji defekti (baş, kuyruk, akrozom vs),
- Maturasyon defekti.

### **1.3.2. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi**

Normal bir çiftin bir ay içerisinde gebe kalma şansları %20-25, altı ay içerisinde %75 ve bir yıl içerisinde ise %90'dır. Gebeliklerin çoğu ovulasyon günü veya ovulasyondan önceki ve sonraki üç gün içerisinde bulunan cinsel ilişki neticesinde görülür. Hem erkek hem de kadın için 24 yaşında fertilizasyon oranları en yüksektir. Fertilizasyon oranları bu yaştan sonra her iki cinste de azalmaya başlar (Kaygil, 2006: 253-261).

İnfertil erkeğin değerlendirilmesine öykü almak ile başlanır. İlk değerlendirme fizik muayene ve başlangıç laboratuvar incelemeleri ile tamamlanır. Öykü, fizik inceleme ve laboratuvar sonuçlarına göre ayırıcı tanı için ek özel testlere yönelinmelidir (Aşçı, 2008: 1-6).

### **1.3.3. Anamnez**

İnfertilitenin araştırılmasına genel üreme hikayesinin alınarak ve 15 gün arayla 2 semen analizi yapılarak başlanır. Üreme hikayesinde cinsel ilişki sıklığı ve zamanlaması, infertilite süresi ve önceki fertilizasyon durumu, çocukluk hastalıkları, çocukluk ve puberte gelişimi, sistemik hastalıklar ve geçirdiği ameliyatlar, cinsel yaşam, cinsel yolla geçen hastalıklar, gonadal toksinlere maruz kalınımı sorgulanmalıdır (Gazvani ve diğ., 2000: 251-256).

### **1.3.4. Fizik Muayene**

İnfertil erkeğin fizik incelemesi tüm sistemleri kapsamaktadır. Hastanın vücut yapısı ve virilizasyonu incelenir. Sekonder seks karakterlerinin gelişimine bakılır, jinekomasti araştırılır. Genital muayenede peniste kurvatür varlığı ve üretral meatusun yeri incelenir. Normal erişkin testis hacmi 24±4 ml'dir. Epididimis muayenesinde endürasyonlar, düzensizlikler ve kistik oluşumlar muayene ile saptanabilir (Çulha, 2007: 292-296).

### **1.3.5. Semen Analizi**

Hikaye ve fizik muayeneden sonra, erkeğe ait laboratuvar testleri yapılmalıdır. Her hastanın en az 15 gün aralıklarla yapılan, iki ya da üç semen analizi bulunmalıdır. Semen analizi, hastaların infertil ve fertil gruplar şeklinde kesin ayırımının yapılmasını sağlamaz. Semen parametrelerinin kalitesi azaldıkça

istatistiksel olarak gebelik şansı da azalır. Buna rağmen doğru şekilde yapılmış bir semen analizi infertil erkeğin değerlendirilmesinde önemli bir araçtır (Ford; WHO, 2010) (Tablo 1.1 , 1.2).

**Tablo 1.1.** WHO 2010 semen analizi referans aralığı

<u>WHO 2010 Sperm Değerlendirme Kriterleri</u>	
Hacim (ml)	≥ 1,5
Konsantrasyon ( $\times 10^6$ /ml)	≥ 15
Total sperm sayısı (konsantrasyon x hacim)	≥ 40
İleri hareketlilik (%)	≥ 32
Total hareketlilik	≥ 40
Normal sperm morfolojisi (%)	≥ 4

**Tablo 1.2.** Sperm parametreleri sonucu morfolojik tanı kriterleri

Normozoospermi	Referans degerleriyle tanımlanmış normal ejakülat
Oligozoospermi	Referans degerinden daha az sperm konsantrasyonu
Astenozoospermi	Referans degerinden daha az sperm motilitesi
Teratozoospermi	Referans degerinden daha az sperm normal morfolojisi
Oligoastenoteratozoospermi	Her üç degiskenin bozukluğunu gösterir
Kriptoospermi	Ejakülatın bazal degerlendirmesinde hiç sperm yokken, santrifügasyon sonrası birkaç sperm elde edilmesi
Azoospermi	Santrifügasyon sonrası hiç sperm bulunmaması
Aspermi	Seminal plazma volümü= 0 ml
Polizoospermi	Yüksek sperm konsantrasyonu (>250 milyon/ml)

Türk Androloji Rehberi 2004, Günalp S, Orhon Esat, Özgür K, Seçkin B, Tarcan T.

### 1.3.6. Semen Toplanması

Semen en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrası toplanmalı ve bu süre 7 günü geçmemelidir. Semen laboratuvar yanında özel olarak hazırlanmış bir odada görsel cinsel uyarı ve masturbasyon yöntemi ile toplanmalıdır (Kadioğlu ve diğ., 2004: 317-323). Sperm örneği dışarıdan laboratuvara getirilecekse vücut ısısında ve 1 saat içinde ulaştırılmalıdır (Emir, 2008: 291-298).

### **1.3.7. Semen'in Makroskopik Değerlendirilmesi**

Semen toplandığında koagulum halindedir ve 5-25 dakika arasında Prostat Spesifik Antijen (PSA) ve plazminojen aktivatör gibi prostat kökenli proteazlar nedeniyle likefiye olur. Semen volümü WHO' ya göre 1,5 ml'nin üzerinde olmalıdır. Bunun altındaki değerlerde retrograt ejakülasyon ve distal kanal patolojileri akla gelmeli ve buna yönelik araştırmalar yapılması gerekmektedir. Seminal sıvının tam yokluğuna aspermi denilmektedir. Normal semende fruktoz konsantrasyonu 120-450 mg/dl'dir. Düşük hacimli semende fruktoz tayini mutlaka yapılmalıdır (Emir, 2008: 291-298; 'World Health Organization Manual for semen analysis', 2010). Semen pH'sı 7,2 veya üzerinde olmalıdır. pH, asidik prostat salgıları ve alkalen seminal vezikül salgılarının karışım oranına bağlı olarak değişebilir (Aydos ve diğ., 2004: 317-323).

### **1.3.8. Semen'in Mikroskopik Değerlendirmesi**

#### **1.3.8.1. Sperm sayısı**

Fertil popülasyonda bildirilen ortalama sperm sayısı mililitrede 70-100 milyondur. WHO'nun referanslarına göre olması gereken en az sperm sayısı 15 milyon/ml'dir. Bu değerin altı oligospermi olarak adlandırılmaktadır. Ejakülatta spermatozoa hücrelerinin hiç görülmemesi azospermi olarak adlandırılır (Aydos ve diğ., 2004: 317-323; 'World Health Organization Manual for semen analysis', 2010).

#### **1.3.8.2. Sperm motilitesi**

Motilite kuyruk hareketi gösteren sperm yüzdesidir. Alternatif bir sistem spermi 4 kategoride ele alır: a, ileri hızlı hareketi; b, yavaş ya da tembel ileri hareketi; c, ileri olmayan hareketi ve d, hareketin bulunmadığını belirtir. Bu sistemde, her bir kategoriye giren sperm yüzdesi değerlendirmeye alınır. WHO 'a+b' motilitenin %40'nin, sadece 'a' kalite motilitenin ise %32'in üzerinde olması gerektiğini belirtmiştir ('World Health Organization Manual for semen analysis', 2010). Sperm hareket bozukluğu (astenospermi) motilitede ya da ileri harekette veya her ikisinde birden azalmayı ifade eder.

### 1.3.8.3. Yuvarlak hücre sayısı

Semendeki yuvarlak hücreler immatür spermatozoalar, genitoüriner sistem epitel hücreleri, prostatik hücreler ve lökositlerden oluşur. Normal semende yuvarlak hücre sayısı <5 milyon/ml olmalıdır. Yuvarlak hücrelerden klinik olarak önemli olan lökositlerdir. Yuvarlak hücre sayısı >1 milyon/ml olduğunda lökosit sayısını değerlendirmek için myeloperoksidaz testi (Endtz testi) yapılmalıdır. Normal semende lökosit sayısı <1 milyon/ml olmalıdır ('World Health Organization Manual for semen analysis', 2010).

### 1.3.8.4. Sperm morfolojisi

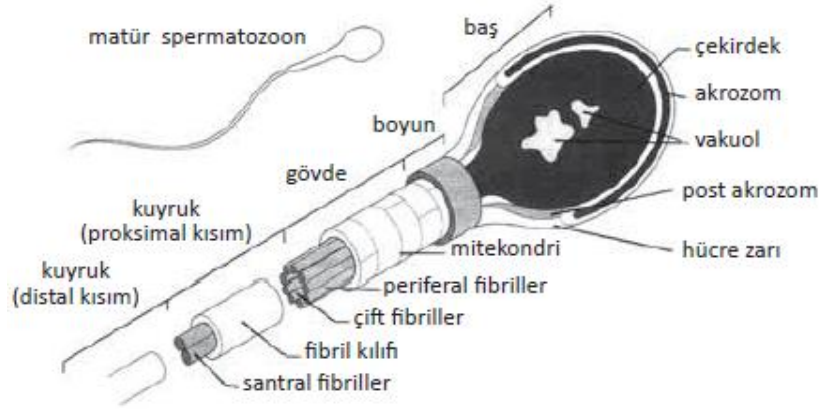
Sperm morfolojisi değerlendirmesi, taze semende elektron mikroskop ile veya faz kontrast mikroskop ile değerlendirilir. Doğru bir morfolojik değerlendirme için spermin boyanması gereklidir. Bunun için en fazla kullanılan boyama yöntemleri "Papanicolau" yöntemi ve "Diff- Quick" yöntemidir (Ombelet ve diğ., 1997: 1015-1020). Bir spermin normal kabul edilebilmesi için baş, boyun, orta kısım ve kuyruğun normal olması gereklidir (Tablo 1.3; Şekil 1.3 , Şekil 1.4). ('World Health Organization Manual for semen analysis', 2010).

**Tablo 1.3.** Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi

<b>Baş</b>	Uzunluk: 5-6 $\mu$
	Genişlik: 2,5-3,5 $\mu$
<b>Akrozom</b>	Başın % 40-70'ini oluşturmali
<b>Orta parça</b>	Genişlik 1 $\mu$
	Uzunluk 1,5 x baş uzunluğu
<b>Kuyruk</b>	Boyu yaklaşık 45 $\mu$
	Uniform
	Orta parçadan daha ince
	Kıvrılmamış
<b>Sitoplazmik artık</b>	Kırık içermeyen
	Baş alanının % 30-70'inden az
	Sadece orta parçada lokalize



**Şekil 1.3.** Normal sperm görüntüsü.



Şekil 1.4. Normal spermin bölümlerinin gösterilmesi

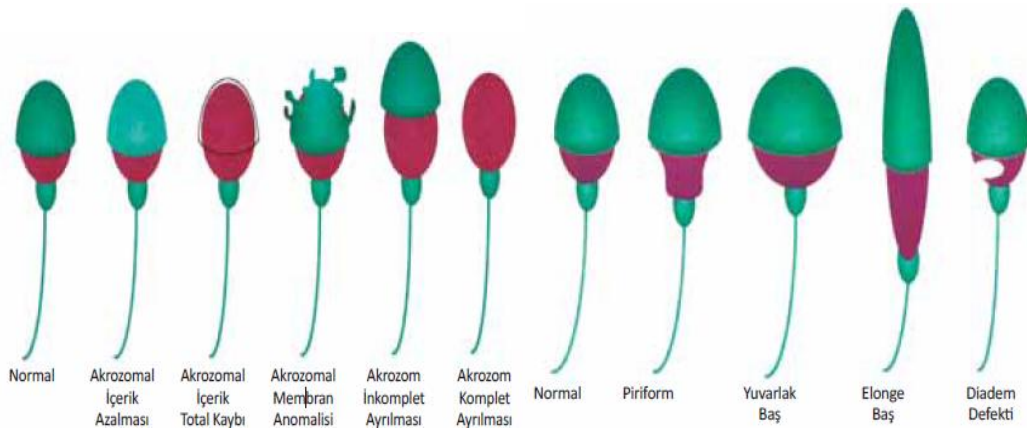
### 1.3.8.5. Sperm malformasyonlarının tipleri

**Baş defektleri:** Büyük ya da küçük, konik, piriform, yuvarlak, amorf, vakuollü (>2'den fazla vakuol, vakuoler alan boyanması %20'den fazla), çift başlı veya bunların kombinasyonu (Şekil 1.5).

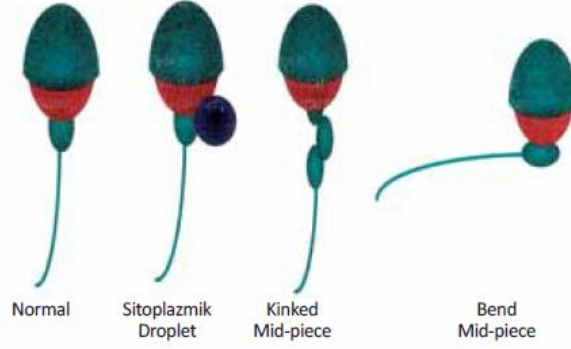
**Boyun ve orta kısım defektleri:** Başın asimetrik olarak orta parçaya girmesi, kalın ya da düzensiz olması, ince olması veya bunların kombinasyonu (Şekil 1.6).

**Kuyruk defektleri:** Kısa, birden çok, kırık, keskin açılı, koil şekilli, düzensiz ve bunların kombinasyonları (Şekil 1.7).

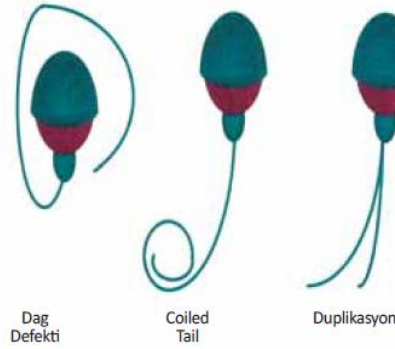
**Fazla sitoplazma kalıntısı:** Spermatogenik süreçte üretilen anormal spermatozoa ile ilgilidir. Büyük miktarda düzensiz sitoplazma içerir ve orta kısım defektleri ile ilgilidir. (Şekil 1.6) (Ford, 2010: 56-63; Orhon, 1995: 17-29).



Şekil 1.5. Sperm baş defektleri (Orhon ve diğ., 1995: 17-29)



Şekil 1.6. Sperm boyun defektleri ve sitoplazmik damla (Orhon ve diğ., 1995: 17-29)



Şekil 1.7. Sperme ait kuyruk defektleri (Orhon ve diğ., 1995: 17-29)

Spermin morfolojik incelemesinin spermatogenez kalitesinin ve fertilitenin duyarlı bir göstergesi olduğu ortaya konulmuştur (Kruger ve diğ., 1986: 118-123).

### 1.3.9. Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYT)

Fizyolojik yollardan gebeliğin sağlanamadığı durumlarda ÜYT kullanılması gerekmektedir. Günümüzde 3 çeşit ÜYT uygulaması yapılmaktadır. Bunlar intrauterin inseminasyon (IUI), *in vitro* fertilizasyon (IVF), intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI)'dur. IUI, spermin yıkanarak iyi motilite ve morfolojideki spermatozoanın konsantre halde uterus içerisine bir kanül vasıtasıyla verilmesidir (Ritossa, 1962: 571-573). IVF, kadından toplanan oositlerin (OPU: oosit toplama) bir petri kutusu içerisinde spermatozoa ile 24-48 saat inkübe edilmesi, arkasından oluşan embriyoların uterus kavitesine transferini içerir (Aydos, 2008: 57-66). ICSI ise tek bir spermatozoanın oosit sitoplazması içerisine mikroskop altında mikroenjeksiyonudur (Aydos 2008: 57-66).

### 1.3.10. Açıklanamayan (Sebebi Bilinmeyen) İnfertilite

Açıklanamayan infertilite; infertilite nedenleri için yapılan tetkikler sonucunda herhangi bir neden saptanamaması olarak tanımlanır. Çiftlerin ortalama %15'i açıklanamayan infertilite tanısı almaktadır (Templeton ve Penney, 1982: 175-182; 'American Fertility Society', 1992). Açıklanamayan infertilitede olası etiyolojiler Tablo 1.4'de belirtilmiştir.

**Tablo 1.4.** Açıklanamayan infertilite olası etiyolojileri

1)	Antagonist servikal sekresyonlar
2)	Erken embriyonel implantasyonda defektif endometrial reseptivite
3)	Anormal tubal siliyal aktivite
4)	Defektif ovum pick-up mekanizması
5)	Luteinize unruptüre follikül sendromu
6)	Ek hormonal anormallikleri, örnek: Luteal faz defekti
7)	Bozulmuş oosit ve/veya sperm fertilizasyon kapasitesi
8)	Minimal veya orta düzeyde endometriozis
9)	İmmünolojik faktörler
10)	Bozulmuş peritoneal makrofaj aktivitesi
11)	Bozulmuş peritoneal sıvı antioksidan fonksiyonu

(Tıraş ve Aybar, 2006: 37-41)

### 1.4. Defensinler

Defensin grubu peptidler, memelilerde en önemli antimikrobiyal peptid gruplarının içinde yer alırlar (Froy, 2005: 1387-1397; Bevins ve Paneth, 2006: 263-266). Defensinler katyonik, 30-40 aminoasitten oluşan, arjinince zengin,  $\beta$ -tabakalı katlantı gösteren, moleküler ağırlıkları 3,5-6 kDa arasında olan ve altı sistein rezidüsünün oluşturduğu üç disülfid köprüsü içeren moleküllerdir (Muller ve diğ., 2005: 1297-1307; Dommett ve diğ., 2005: 903-912; Schneider ve diğ., 2005: 587-595). Bilinen tüm insan defensin genleri 8. kromozomda telomer bölgesine yakın p22-23.1 bölgesinde bulunmaktadır (Fellermann ve Stange, 2001: 771-776).

Defensinler, sistein rezidülerine ve disülfid bağlarının yerleşimine göre alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) ve teta ( $\theta$ ) defensinler olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar (Bevins, 2006: 263-266; Fellermann ve Stange, 2001: 771-776). Teta defensinler insanlarda tanımlanmamıştır (Eckmann, 2005: 147-151).



Defensinler innat immün sistemle ilişkili efektör peptidlerdir. Defensinler ilk olarak memelilerde, fagositik beyaz hücrelerde ve mukozal epitel hücrelerdeki antimikrobiyal etkileri sayesinde bulunmuştur (Ganz, 2004: 539-549; Selsted ve Oullette, 2005: 551-557). Yapısal olarak defensinler, 6 korunmuş sistein içeren 29-42 amino asitten oluşan katyonik peptidlerdir. Sistein rezidüleri 3 molekül içi disulfid bağı oluşturur, ki bu peptidi aktif konformasyona sokarak proteazlara karşı direnç kazandırır. İnsan beta defensinlerinin homologları geviş getirenlerde, kemirgenlerde, kuşlarda, balıklarda, keselilerde ve atnalı yengeçlerinde tanımlanmıştır. İnsan genomunda yaklaşık olarak 40 beta defensin geni vardır, ancak, peptid aktivitesi ve biyolojisi ile ilgili veriler 10 tanesinden daha azı için ulaşılabilir; bu verilerin çoğu solunum, sindirim ve üreme sisteminin mukozal epitel hücrelerinden salınan beta defensin ifadesiyle ilgilidir (Schutte ve diğ., 2002: 2129-2133). İlginç olarak, insanda beta defensinleri kodlayan mRNA'ların yarısına yakını epididimiste bulunmuştur (Radhakrishnan, 2005: 203-210; Com ve diğ., 2003: 95-104). Epididimisteki beta defensin mRNA'sı ifadesi kemirgenlerde (Jelinsky ve diğ., 2007: 561-570) ve insanları da içeren primatlarda iyi karakterize edilmiştir. Başlangıçta beta defensinlerin erkek üreme sisteminin innat immün korumasıyla ilişkili olduğu düşünülüyordu, fakat yeni çalışmalar DEFB126'yı da içeren en azından birkaç beta defensinin üreme fizyolojisinde de rol aldığını göstermiştir (Radhakrishnan ve diğ., 2005: 203-210).

#### **1.4.1. $\alpha$ -Defensinler**

İnsanlarda altı adet  $\alpha$ -defensin ifade edilmektedir. (Eckmann, 2005: 147-151; Fellerman ve Stange, 2001: 771-776; Bevins, 2006: 263-266; Muller ve diğ., 2005: 1297-1307; De Smet ve Contreras, 2005: 1333-1347; Yoshio ve diğ., 2004: 304-311). Dört tanesi nötrofillerden izole edilmiştir ve bu nedenle 'insan nötrofil defensini' olarak isimlendirilmişlerdir (HNP 1-4) (Eckmann, 2005: 147-151; De Smet ve Contreras, 2005: 1337-1347). Başlıca işlevleri fagosite edilen mikroorganizmaların oksijen bağımsız yol ile öldürülmesidir (Dommett ve diğ., 2005: 147:151; De Smet ve Contreras, 2005: 1337-1347).

#### 1.4.1.1. $\alpha$ -defensinlerin işlevleri

$\alpha$ -defensinler epitel kök hücrelerinin korunması, ince barsak kolonizasyonunun sayı ve bileşiminin düzenlenmesi, parakrin uyarı sistemi, T hücreleri, immatür dendritik hücreler ve monositlerin kemotaksisi, T hücrelerinden IFN- $\lambda$ , IL-6 ve IL-10 salınımı, monositlerden TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  salınımı, alveolar makrofajlar, barsak ve akciğer epitel hücre zincirlerinden IL-8 salınımı, zarflı virüsler, Gram (-) ve Gram (+) bakterilere karşı mikrobisidal etki, yeni damar oluşumunun önlenmesi, inflamasyon ve anjiyogenez arasında bağlantı kurulması, mast hücre degranülasyonu, yara iyileşmesi gibi pek çok mekanizmada etkilidirler (Dommett ve diğ., 2005: 147:151).

#### 1.4.2. $\beta$ -Defensinler

Bugüne kadar beş grupta toplam 28  $\beta$ -defensin geni tanımlanmıştır (Muller ve diğ., 2005: 1297-1307; Yoshio ve diğ., 2004: 304-311). Kromozom 8p22-23.1'deki grupta sekiz tane  $\beta$ -defensin geni bulunmaktadır: İnsan beta defensin (hBD) 1-4 ve defensin (Def) 105-108 (Muller ve diğ., 2005: 1297-1307; Diamond ve Bevins, 1998: 221-225). Tablo 1.5'de  $\beta$ -defensinlerin yerleşimleri ve görevleri gösterilmiştir (Oppenheim ve diğ., 2003:17-21; De Smet ve Contreras, 2005: 1337-1347; Schneider ve diğ., 2005: 587-595; Yoshio ve diğ., 2004: 304:311; Harder ve diğ., 2001: 5707-5713; Bensch ve diğ., 1995: 331-335). Memelilerde ilk tanımlanan  $\beta$ -defensin trakeal antimikrobiyal peptit (TAP) olarak adlandırılmış ve sığırlarda saptanmıştır (Diamond ve diğ., 1991: 3952-3956). İkinci olarak yine sığırlarda lingual antimikrobiyal peptit (LAP) izole edilmiştir (Schonwetter ve diğ., 1995: 1645-1648). İnsanlarda gösterilen ilk  $\beta$ -defensin (hBD-1) ise diyaliz tedavisi alan hastaların hemofiltratlarından izole edilmiştir (Bensch ve diğ., 1995: 331-335). İkinci üye hBD-2, ilk kez psoriatik deride tanımlanmıştır (Harder ve diğ., 1997: 387-861). Epitel dokulardaki  $\beta$ -defensin genlerinin ifadesi enfeksiyon ve inflamasyondan etkilenmektedir. Bunlardan hBD-1 epitel dokuların yapısal bir parçası olup, hBD-2, hBD-3 ve hBD-4'ün ifadesi çeşitli bakteriyel ürünler (LPS, Gram pozitif bakteriler, Candida türleri) ve sitokinlere (IL-1, TNF- $\alpha$ ) cevaben uyarılır (Eckmann, 2005: 147-151; Fellermann ve Stange, 2001: 771-776; Muller ve diğ., 2005: 1297-1307).

**Tablo 1.5.**  $\beta$ -defensinlerin buldukları yerler ve işlevler

<b><math>\beta</math>-defensinlerin Bulunduğu Yerler</b>			
<b>hBD*-1</b>	<b>hBD*-2</b>	<b>hBD*-3</b>	<b>hBD*-4,5,6</b>
Nötrofil ve Diğer Lökositler	Nötrofil ve Diğer Lökositler Deri	Deri	Epididimis
Plazma	Plazma	Tonsiller	Plazma
İdrar	İdrar	Nötrofil ve Diğer Lökositler Deri	İdrar
Hemofiltrat	Bağırsak	Plazma	Mide Antrumu
Akciğer	Akciğer	İdrar	Nötrofiller
Meme Bezleri	Ürogenital sistem	Bağırsak	Tiroid
Tükrük Bezleri	Pankreas	Akciğer	Akciğer
Deri	Deri	Timus	Uterus
Timus	Kemik İliği	Uterus	Böbrek Epiteli
İnce Bağırsak	Böbrek	Böbrek	
Testis	Mide	Kalp	
Vajina	Timus	İskelet Kası	
Dişi Genital Sistem	Karaciğer		
Plasenta			
Anne sütü			
Böbrek			
Pankreas			
Prostat			
<b><math>\beta</math>-defensinlerin İşlevleri</b>			
Bakteri, fungus, klamidy ve zarflı virüslere karşı antimikrobiyal etki			
T hafıza hücreleri, immatür dendritik hücreler ve nötrofillerin kemotaksisi			
İmmatür dendritik hücrelerin matürasyonu			
Mast hücre kemotaksisi ve degranülasyonu			
*: insan beta defensin			

### 1.4.3. Teta-defensinler

$\theta$ -defensinler sadece rhesus maymunlarında tanımlanmıştır. Dolaşımda bulunan 18 amino asit içeren mini defensinlerdir (Froy ve diğ., 2005: 903-912).

### 1.5. DEFB126

Glikozillenmiş bir polipeptit olan  $\beta$ -defensin 126 (DEFB126), epididimis tarafından üretilir ve sperm yüzeyi tarafından absorblanır, bu protein immün korumadan ve spermın kadın üreme sistemindeki mukozal sıvılarda verimli biçimde hareket etmesinden sorumludur. DEFB126'ların çoğu deride veya mukus membranlara sunulan antimikrobiyal proteinleri kodlar (Lehrer, 2004: 727-738). Birçok  $\beta$ -defensin epididimiste birincil olarak eksprese edilir (Yudin ve diğ., 2003: 118-1128). Bir hipoteze göre bazı beta defensinler mikroplardan kaynaklanan

enfeksiyonu korumak için epididimiste ifade edilirler. Ancak epididimal defensinler arasından DEFB126 proteinin farklı bir rolü vardır. Bir model organizmada bu protein sperminin plazma membranı kapladığı gösterilmiştir (Yudin ve diğ., 2005: 119-129). Makaklarda yapılan fonksiyonel çalışmalara göre, DEFB126 protein kılıfının servikal mukustaki sperm penetrasyonuna yardımcı olur (Tollner ve diğ., 2008: 400-412), spermlerin kadın immün sistem tarafından tanınmasını önler (Yudin ve diğ., 2005: 1243-1252), ve onların yumurta kanalı epitelyumuna bağlanmasını teşvik eder (Tollner ve diğ., 2008: 2523-2534).

Makaklarda, epididimal DEFB126 yüksek oranda sinyalize olmuş bir glikopeptittir ve sperm epididimis boyunca ilerlerken adsorblanır (Yudin ve diğ., 2003: 1118-1128). DEFB126 burada sperm glikokaliksinin bir ana bileşeni haline gelir (Yudin ve diğ., 2005: 119-129). DEFB126 geni insanlarda 20p13'ün subtelomerik ucundadır ve kopya numarası varyasyonu göstermez (Hollox ve Armour, 2008: 113).

İnsan DEFB126 geninin nükleotid dizisi incelendiğinde, Tollner ve arkadaşları, son derece yaygın bir dizi varyantını bildirmişlerdir (Tollner ve diğ., 2011). Bu varyant "del" olarak ifade edilmiş ve SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) kodu rs371674869'dur.

Kodlanmış protein DEFB126, makak spermlerinin, dişi üreme sisteminin üst kısımlarında ilerlemesinde görev görür (Tollner ve diğ., 2008: 400-412) ve bu kısımlarda bir immüno koruyucu katman oluşturur (Yudin ve diğ., 2005: 1243-1252). Servikal mukustaki sperm penetrasyonunu kolaylaştırır (Tollner ve diğ., 2008: 2523-2534) ve spermin yumurta kanalı epiteline bağlanmasına aracılık eder (Tollner ve diğ., 2008: 400-412). Benzer yapılar ve fonksiyonlar fare ortologlarında ( $\beta$ def22) da görülür (Yudin ve diğ., 2008: 753-765). Sisteince zengin defensin benzeri peptidler üreme başarısında tamamlayıcı olarak görünür (Avila ve diğ., 2011: 21-40; Amien ve diğ., 2010).

DEFB126 özel yapısal özellikleri olan bir moleküldür. Kökensele olarak makaklarda (Yudin ve diğ., 2003: 118-1128; Perry ve diğ., 1999: 965-972) bulunur ve adı epididimis spesifik protein, ESP13.2'dir. Daha sonra ESP13.2 beta-defensin olarak yeniden sınıflandırılmış ve DEFB126 olarak isimlendirilmiştir. DEFB126 diğer  $\beta$ -defensinlerden farklı olarak 60 amino asitlik karboksil ucu içerir (Yudin ve

diğ., 2003: 118-1128). Bu uzamış karboksil kuyruk 20 adet O-bağlı glikolizasyon bölgesi (serin ve treonin rezidüleri) ve tahminen dimerizasyonla alakalı olan eşleşmemiş bir sistein rezidüsü içerir (Froy, 2005: 1387-1397). O-glikanaz ile muamele edilen makak spermlerinin DEFB126'larının moleküler ağırlıkları 10 kDa'a düşer, tipik bir beta-defensinden kuyruk olarak daha uzun olduğundan bu sonuç tutarlıdır (Lehrer, 2004: 727-738).

İmmüno lokalizasyon ve transmisyon elektron mikroskopi çalışmaları, makaklardaki DEFB126'nın (Yudin ve diğ., 2003: 1118-1128) ve farelerdeki DEFB22'nin (Yudin ve diğ., 2008: 753-765) üniform bir şekilde bütün sperm yüzeyine dağıldığını göstermiştir. DEFB126 sperm yüzeyine kuvvetli bir şekilde eklenmiştir ve santrifügasyona, yoğunluk gradyent solüsyonlarına ve yüksek tuz koşullarına dirençlidir. DEFB126'nın lipid membranla etkileşimi, kovalent bağ yapmış bir dimer gibidir (Tollner ve diğ., 2004: 325-337; Tollner ve diğ., 2008: 400-412). Benzer şekilde, DEFB126'nın sıçan spermlerinden izolasyonu sırasında, proteinin çoğu lipid fraksiyonunda, çapraz bağ yapmış bir homodimer gibi bulunmuştur. Buradan Defb22'nin lipid tabakaya defensin benzeri çekirdekle ilişkili hidrofobik aminoasit dizisi sayesinde gömüldüğü anlaşılmaktadır. DEFB126 makaklarda, şartlara bağlı olarak sperm yüzeyinden kolayca akar (Tollner ve diğ., 2004: 325-337), sperm yumurtaya bağlanma ve fertilize etme özellikleri kazanmak için boşalma sonrasında bir dizi kompleks değişiklikler geçirmek zorundadır (Jaiswal ve Eisenbach, 2002: 57-117).

### **1.5.1. DEFB126 Gen Mutasyonu ve Erkek İnfertilitesi**

İnsan popülasyonlarında DEFB126 geninde bir dizi varyasyonunun olduğu bulunmuştur. Bu varyasyon 2 nükleotidlik bir delesyondur, ki bu delesyon açık okuma çerçevesinde kayma ve non-stop mRNA olarak bilinen, çerçeve içi stop kodonu eksik ve fonksiyonsuz bir mRNA oluşturur (Tollner ve diğ., 2011).

Delesyon varyantı (del/del) olarak homozigot olan erkeklerden alınan spermler sperm sayısı, güçlü hareketlilik yüzdesi, normal form ve şekil yüzdesi gibi yaygın erkek fertilité testleri bakımından normal görünmektedir. Ancak, del/del erkeklerden alınan spermler, yabani tip erkeklerden alınan spermlere kıyasla çok daha düşük miktarda sperm yüzeyi O-bağlı oligosakkariti içermektedir, bu da sperm

glikokaliksinin anormal olduğunu göstermektedir. Del/del erkeklerden alınan sperm, servikal mukus benzeri bir yapı olan hyaluronik asit jelinde belirgin bir hareket bozukluğu göstermektedir (Tollner ve diğ., 2011).

Bu bulgulara göre DEFB126 mutasyonu, sperm servikal mukus içindeki hareketini bozar ve böylece fertilizasyon olasılığını düşürür. DEFB126 mutasyonu fertilizasyonu başka yollarla da etkiliyor olabilir, örneğin üst dişi üreme sisteminde sperm fonksiyonu kaybı veya üreme sisteminin infeksiyonlardan korunması gibi, fakat bu olasılıklar henüz keşfedilmemiştir.

### **1.5.2. DEFB126 ve Sperm Glikokaliksi**

Sperm dişi üreme sistemi boyunca ilerlerken mukozal sıvıların ve ekstrasellüler matrikslerin bulunduğu bir karışımdan geçmek zorundadır. Sperm bazı epitel yüzeylerden geçerken fagositlerden, komplement proteinlerden ve antikorlardan kaçmak zorundadır. Başarılı spermatozoa, bu zorlu yolculuk için gerekli modifikasyonlara ve yüzey özelliklerine sahip olmak zorundadır. Memeli sperm, yoğun bir glikokaliks ilişkili oligosakkarit kaplaması ile çevrilidir, ki bu kaplama sperm ve dişi üreme sisteminin çoklu mikro çevreleri arasında primer bir ara yüzey oluşturur (Diekman, 2003: 298-308; Schroter ve diğ., 1999: 302-313).

Spermatogenezden hemen sonra, olgun memeli sperm gelişmemiş bir glikokaliks sahiptir, fakat sperm epididimden geçtikleri 3-12 günlük süre içinde çok geniş yüzey modifikasyonları geçirirler (Dacheux ve diğ., 2003: 7-17). Bu yüzey değişiklikleriyle birlikte, sperm hareket ve fertilizasyonu başarma yetenekleri kazanır. Glikokaliks özel bileşenlerinin sperm korunması, kümülüs matriksin penetransı, oolemma ve zona pelikulanın tanınması ve sperm yumurta membranı ile birleşmesi için kritik öneme sahip olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Gatti, 2004: 321-339). Bu bulgular, uzamış erkek kanalındaki sperm glikokaliks formasyonunun, sperm dişi üreme sistemi içinde hayatta kalması ve doğru fonksiyon sergilemesi için kritik öneme sahip olduğu hipotezine ışık tutmuştur (Schroter ve diğ., 1999: 302-313). Ayrıca, sperm ve glikokaliks arasındaki bu yakın ilişki hayvanlar arasında, internal fertilizasyon üzerinden üretilen korunmuş bir özellik olabilir gibi görünmektedir.

DEFB126 epididimal geçiş sırasında sperm tarafından adsorblanır. DEFB126 distal korpusun temel hücreleri tarafından salgılanır. Sperm epididimin korpus bölgesinden geçerken baştan aşağı (flagellanın terminal ucuna kadar) DEFB126 ile kaplanır. Sperm kaulada sperm yüzeyindeki DEFB126'ları stabilize eden şartlar altında depolanır.

İnsandaki DEFB126 (Rodriguez-Jimenez, 2003: 175-183), sıandaki Defb22 (Jelinsky, 2007: 561-570; Patil ve diğ., 2005: 5-17) ve faredekiler (Jelinsky, 2007: 561-570; Yudin ve diğ., 2008: 753-765) gözlemlendiğinde, ifade paterninin ortologlar arasında korunmuş olduğu g r lmektedir (Yudin, 2003: 1118-1128; Yudin ve diğ., 2005: 119-129). Aynı şekilde, insan (Tollner, 2011) ve sıçan (Zanich ve diğ., 2003: 302-313) spermelerinde ortologlar benzer şekilde dağılmış olarak görünür, fakat bu türlerde kaplama daha az üniform olarak görünmektedir.

Salgılanmış glikoproteinlerin spermi kaplamasının sperm bütünlüğünü koruduğu ve spermin ömrünü uzattığı, semenderler (Sever ve diğ., 2004: 1-17), balıklar (Parenti ve diğ., 2010: 1399-1406), yengeerler (Sant'Anna ve diğ., 2007: 903-911) ve Drosophila (Wolfner, 1997: 179-192; Avila ve diğ. 2011: 21-40) gibi birçok türde gösterilmiştir. Memelilerde, karbonhidratlar spermi yumurta kanalı geçişindeki epitel hücrelere bağlar, sperm rezervuarı oluşturularak sperm ov lasyona kadar günlerce hatta aylarca korunur (Suarez, 2002: 140-143).

### **1.5.3. DEFB126 ve Sperm Transportu**

#### **1.5.3.1. Spermin Servikal Mukusla Etkileşimi**

Primatlar, tavşanlar ve geviş getirenler, ejakulatı serviksin içi yerine vajinaya boşaltan tek memeli türleridir. Bu türlerde, servikal mukus sperm girişinin kolaylaşmasında ve kaliteli spermelerin uterusu yönlendirilmesinde hayati role sahiptir. Başlangıçta, sperm dişi üreme sistemi kaslarının kasılmasıyla oluşan basınç gradyenti ile içeri çekilir. Sperm transportunun bu pasif fazı kısa sürelidir, ancak, spermin daha sonra servikal kanal içindeki hareketi, spermin kendini flagelar olarak itmesine ihtiyaç duyar. Servikal mukustaki sperm y z ş , onun glikoproteinlerin hakim olduğu yapısını penetre etmek zorundadır. Bunun için, sperm y z ş n n verimi büyük oranda sperm yüzeyinin özelliklerine bağlıdır. Boşalma sırasında, makak spermeleri DEFB126 ile yoğun bir şekilde ve uniform olarak

sarılmış durumdadır (Yudin, 2003: 1118-1128). Sperm, mukusun içine ve dışına doğru hareketi sırasında, hem *in vitro*da hem de doğal çiftleşmede DEFB126 kaplı olarak kalırlar (Tollner ve diğ., 2008: 2523-2534).

DEFB126'ya ekli oligosakkaritler arasında negatif yüklü olanlar makaklarda sperm servikal mukus içinde etkin bir şekilde yüzmesi için çok önemlidir (Tollner ve diğ., 2008: 2523-2534). Sperm nöroaminidaz ile muamelesi terminal siyalik asit grublarını uzaklaştırır ve DEFB126'daki negatif yükleri elimine eder (Yudin ve diğ., 2005: 119-129; Yudin, 2005: 1243-1252) ve bu nedenle sperm yüzey yükü azalır. Sperm yüzey yükünün etkin mukus penetrasyonunu nasıl teşvik ettiğinin mekanizması kesin olarak bilinmemektedir, DEFB126 tarafından sağlanan yük kabuğu sperm negatif yüklü servikal mukusla minimize etmek için gerekli olduğu tahmin edilmektedir (Yudin ve diğ., 2005: 119-129).

### **1.5.3.2. Sperm Yumurta Kanalı Etkileşimi**

Çoğu memelide yumurta kanalındaki sperm rezervuarı formasyonu başarılı fertilizasyonda kritik öneme sahiptir. Dişi üreme sisteminin yükselişi sırasında sperm ejakulatının sadece küçük bir fraksiyonu başarılı bir şekilde yumurta kanalının istmik bölgesine göç eder. İstmik sperm rezervuarı fertilizasyon-yeterli spermlerinin yumurta kanalı epiteli hücrelerine seçici olarak bağlanmasıyla oluşturulur (Suarez, 2002: 140-143).

Makak spermeleri yumurta kanalı epiteline DEFB126 bağımlı bir bağlanma gösterirler. Perioovulatuvar yumurta kanalının istmik yarısındaki epitele sperm bağlanması sıvı kesici güçler tarafından engellenir. Ancak sperm OEC etkileşimi spermde DEFB126'nın uzaklaştırılmasının indüklenmesi, anti-DEFB126 immünoglobulinleri ile muamele ya da sperm yüzeyi oligosakkaritlerinden siyalik asitin uzaklaştırılmasını takiben yaklaşık % 80 oranında azalır. Sperme çözülmüş halde DEFB126 eklenmesi sperm OEC bağının bağlanmasının tamamen geri kazanılması ile sonuçlanır. Çözülmüş haldeki DEFB126 spesifik olarak *in situ*'da yumurta kanalı epitelinin salgı hücrelerine bağlanır ve sperm baş bölgesinin yumurta kanalındaki yerleşimiyle çakışır (Tollner, 2008: 400-412). Bu nedenle DEFB126 sperm oosite ulaşana kadar yumurta kanalı kenetlenmesi ve korunmasını sağlar.



## 1.6. Spermatozoon DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri

### 1.6.1. Akridin Oranj (AO) Boyaması

Spermatozoon nükleer DNA'sının asit ilavesiyle denatürasyon hassasiyetinin *in situ* ölçülmesine dayanır. Metakromatik AO boyası çift zincir (ds) DNA'da (doğal DNA) monomer olarak araya sokulurken, tek zincir (ss) (denatüre DNA) agregat olarak bağlanır. ssDNA değerlendirmesinde kullanılan diğer yöntemlerle güçlü korelasyon göstermektedir. Ancak floresan mikroskobu kullanılıyorsa gözlemci özneliği sonuçları etkileyebilir (Agarwal A. Ve Said TM., 2004: 99).

### 1.6.2. Sperm-Hyalüronik Asit Bağlanması (Sperm HBA testi)

Hyalüronik asit (HA) yüksek molekül ağırlıklı glikozaminoglikan yapısındadır ve insan oositini saran kumulus ooforus matriksinin major bileşenlerinden bir tanesidir. Hyaluronon ile yapılan ilk çalışmalar *in vitro* olarak hyalüronik asit içeren ortamda taze ve donmuş-çözülmüş ejakulatta sperm hızı, motilite ve viabiliteyi arttırdığı gösterilmiştir (Huzsar ve diğ., 2003: 1616-1624). Sperm motilite ve hızında meydana gelen bu artış HA'ya karşı direkt bir yanıtın sonucudur. Bu sonuca iki gözlemden yola çıkılarak varılmıştır. İlki, sperm HA ile ilk karşılaştığı anda sperm kuyruk hareket frekansında artış saptanmıştır. İkinci olarak ise, yoğunluk gradyenti santrifüjü sonrası sperm, HA içermeyen normal bir ortama dönünce sperm hız ve motilite normale döner. Bu iki gözlemden yola çıkarak sperm ve HA etkileşiminin reseptör aracılı olduğu sonucuna varılmıştır (Prinosilova ve diğ., 2009: 177-183).

Doğal döllenmede, olgun sperm kumulus ooforus matriksinin ana bileşeni olan hyaluronana bağlanır; olgun olmayan sperm bağlanamaz. HA bağlanma testi HA ile kaplanmış çember şeklinde bir lamda gerçekleştirilir. Kuvvetli kuyruk hareketi olup ileri hareket etmeyen spermier HA bağlanması olan spermier olarak değerlendirilirken, serbest olarak hareket eden spermier bağlanmamış spermier olarak değerlendirilirler (Şekil 1.8). Bağlanma yüzdesi, bağlı hareketli spermierin toplam hareketli spermierlere oranının hesaplanması ile elde edilir.



**Şekil 1.8.** HA ile bağlı ve bağlı olmayan spermın şematik olarak gösterimi

Hyaluronana bağlanma, HspA2 şaperon proteini aracılığıyla spermiyojenik olayların başarıyla tamamlandığını gösterir. Şaperonun yokluğunda, mayoz eksikliği, DNA onarımı, hyaluronan bağlanması ve spermdeki diğer adımlar ortaya çıkabilir. Sperm motilitesi bağlanan hyaluronanla uyarılır. Böylece hyaluronana bağlanma yeteneğini olgun bir sperm belirler ve olgun sperm oranı, bir semen örneğinde spermın olgunluğunu gösterir (Petersan, 2010: 8-149).

Düşük HBA<sup>®</sup> skoru, semedeki olgun sperm oranının düşük olduğunu gösterir ve dolayısıyla infertiliteye işaret edebilir. Bunun aksine hyaluronana bağlanan sperm, oositle etkileşim konusunda yeterlidir ve yüksek genomik bütünlükle bağlantılıdır, bu da zigota olan paternal katkının kalitesini yükseltir. Hyaluronana bağlanma, yüksek ve düşük fonksiyonel bütünlüğü ve fertilize olma potansiyelini farklılaştırır. Fertilite tahmininde, tüm spermın hyaluronana bağlanabilme yeteneğine sahip olması gerekmez, ancak iyi bir fertilite olasılığı elde etmek için, hyaluronana bağlayıcılarının oranının etkin bir düzeye erişmesi gerekir. Etkin düzeyin üzerinde bağlanma, muhtemelen fertiliteyi daha fazla iyileştirmez. Normal sperm morfolojisi ile olan ilinti temel alınarak, fertilitenin düşük beklentisinden daha yüksek farklılık gösteren Hyaluronana Bağlanma Tetkiki düzeyi, yaklaşık %80 olarak tahmin edilmektedir (Tablo 1.6) (Kovacs ve diğ., 2011: 49-54).

**Tablo 1.6.** HBA<sup>®</sup> Skoru Sonuçlarının Yorumlanması

<b>HBA<sup>®</sup> Skoru Sonuçlarının Yorumlanması</b>	
<b>HBA<sup>®</sup> Skoru (% bağlanma)</b>	<b>Yorum</b>
>%80 bağlama	Normal olgunluk ve fizyolojik fonksiyon
<%80 bağlama	Azalmış olgunluk ve fizyolojik fonksiyon

## 2. AMAÇ

İnfertilite çiftlerin korunmasız ilişkiye rağmen ilk bir yıl içerisinde çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır. Çiftlerin yaklaşık %15'i infertiliteden muzdariptir. Erkek infertilitesinin yaklaşık %40-60'ında altta yatan neden bilinse de birçoğunda etken ortaya konamamakta ve açıklanamayan infertilite olarak kabul edilmektedir. Açıklanamayan infertilite, infertilite nedenleri için yapılan tetkikler sonucunda herhangi bir neden saptanamaması olarak tanımlanır. Çiftlerin ortalama % 15'i açıklanamayan infertilite tanısı almaktadır. İnfertilitede eğer erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bir bozulma ile ortaya çıkmaktadır. DEFB126 sperm yüzey proteini, glikokaliks yapısının spermin fertilizasyon potansiyeli ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Glikozillenmiş bir polipeptit olan B-defensin 126 (DEFB126), epididimis tarafından üretilir ve sperm yüzeyi tarafından absorblanır, bu protein immün korumadan ve spermin kadın üreme sistemindeki mukozal sıvılarda verimli biçimde hareket etmesinden sorumludur.

Bu tez kapsamında erkek infertilitesine DEFB126 genindeki CC delesyon polimorfizminin (rs371674869) Türk popülasyonunda etkisi ve gebe kalmadaki rolünün saptanması hedeflenmiştir. Hasta ve sağlıklı bireylerin taşıdıkları polimorfizmlerin alel frekansları karşılaştırılarak bu polimorfizmin Türk popülasyonunda erkek infertilitesine etkisi olup olmadığı belirlenecektir. Ek olarak, sigara ve alkol kullanımının erkek infertilitesine etkisi araştırılacaktır. Akridin Oranj boyama yapılarak DNA hasarının sperm parametreleri ile ilişkisine bakılacaktır. Ayrıca spermelere Hyaluronan Bağlanma Testi uygulanarak polimorfizmin sperm olgunluğu ve infertilite ile ilişkisi araştırılacaktır. Bu sayede Türk erkek infertilitesinde DEFB126 genindeki CC delesyon polimorfizminin ilk kez belirlenmesi ve bu konuda yapılacak olan ileriki çalışmalar için temel oluşturması hedeflenmektedir.

### **3. GEREÇLER**

#### **3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler**

Bu çalışmadaki hasta grubunu oluşturan bireyler, Eylül 2012–Ocak 2013 tarihleri arasında Özel İstanbul Tüp Bebek Merkezi'ne infertilite tedavisi için başvuran ve 1 yıldır korunmasız ilişkiye rağmen çocuğu olmayan 277 infertil erkek birey arasından seçilmiştir. Hastaların yaşları, cinsiyetleri, meslekleri, aile öyküleri, sigara ve alkol kullanma alışkanlıkları ile daha önceki IUI, IVF bilgileri de sorgulanmıştır. Çalışmaya dahil olma kriterleri, Sperm parametreleri WHO 2010 kriterlerine göre düşük olan infertil yetişkin erkek bireyler, infertiliteye neden olabilecek düzeltililebilir bir hastalığın (varikosel, enfeksiyon, inmemiş testis, kanal tıkanıklıkları ve ejakülasyon bozukluğu) bulunmaması, ve lökospermi olmamasıdır. Bu kriterleri sağlayan infertil erkek bireyler analizlere dahil edilmiştir. Buna ek olarak, sperm parametreleri değerlendirilmiş ve atılacak olan sperm örnekleri temin edilerek lama yayımları ve boyamaları yapılmıştır. Sperm parametreleri WHO 2010 kriterlerine göre normal olan yetişkin erkek bireyler ile en az bir çocuğu bulunan 234 sağlıklı yetişkin erkek birey kontrol grubuna dahil edilmiştir. Tüm gönüllü deneklere de anket uygulanarak hasta grubu için belirtilen bilgilere ulaşılmıştır. Hasta ve kontrol grubu için minimum 18 yaş sınırı gözetilmiştir. Hasta ve kontrol grubu örnekleri, bireylerin çalışma hakkında bilgilendirilmesi ve yazılı onaylarının alınmasından sonra toplanmıştır. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2. Kimyasallar**

Bu çalışmada kullanılan tüm katı ve sıvı kimyasallar moleküler biyoloji kalitesindedir, aksi belirtilmediği takdirde marka olarak Sigma (ABD) ya da Merck (ALMANYA) tercih edilmiştir.

### 3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

#### 3.3.1. Yanak içi Epitel Örneklerinden DNA İzolasyon Tamponları

Lizis Tamponu	: : 50mM Tris pH 8.0 50mM EDTA 50mM sükröz 100mM NaCl % 1 (w/v) SDS
Sodyum Asetat (NaOAc)	: 3 M
Proteinaz K	: 10 mg/ml
Saf İzopropanol	
Etanol (EtOH)	: %70
Fenol (pH =8,0)	: Tris ile doyurulmuş
Kloroform-İzoamil Alkol (24:1)	:Saf Kloroform ve İzoamil alkol 24'e 1 oranında karıştırılır.
Low-TE Tamponu (pH=8,0)	:10 mM Tris (pH=8,0) 0,1mM EDTA (pH=8,0)

### 3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Saflaştırma için Gerekli Kimyasallar

10X MgCl <sub>2</sub> 'süz Tampon	: 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 750 mM Tris-HCl (pH 8,8) % 0,1 Tween 20 (Fermantas LİTVANYA)
MgCl <sub>2</sub>	: dH <sub>2</sub> O' da 25 mM (Fermantas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotidler (dNTP)	: 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP(Fermantas, LİTVANYA)
Taq DNA Polimeraz	: Rekombinant Taq DNA Polimeraz (5U/μl ) (Fermentas, LİTVANYA)
PZR ürünlerinin saflaştırılması	: High Pure PCR Product Purification Kit
Primerler	: Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

### 3.3.3. Oligonükleotid Primerler

**Tablo 3.1.** Bu çalışmada incelenen polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri (F: İleri primer, R: Geri primer)

Lokus	Primer Dizisi (5' → 3')	
DEFB126	MnlI-F	AGA ATG GTT GGG CAA TGT GC
	MnlI-R	GTT CAA CCA GTG GGA GAA ACG AG

### 3.3.4. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları

MnII	: 10 U/ $\mu$ l (Fermentas, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu	: Buffer G (Fermentas, LİTVANYA) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA
Tanım Dizisi	: 5'...C C T C (N) <sub>7</sub> ↓...3' 3'...G G A G (N) <sub>6</sub> ↑...5'

### 3.3.5. Elektroforezde Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)	: 890 mM Tris-Baz, 890 mM Borik Asit, 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O, (pH=8.3)
Agaroz Jel	: 0.5 X TBE Tamponu içinde %1 veya %2 (w/v) agaroz
10X Bromofenol Mavisi (BPB)	: 2.5 mg/ml BPB
Etidyum Bromür (EtBr)	: 10 mg/ml

### 3.3.6. DNA Uzunluk Markörleri

50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

### 3.3.7. Sperm Boyama Solüsyonları

Spermac	: Spermac Stain Kit (FertiPro N.V. BELÇİKA)
---------	------------------------------------------------

### 3.3.8. Akridin Orange (AO) Boyama Solüsyonları

Tampon 1	: Metanol:Asetik Asit (3:1)
----------	-----------------------------

Tampon 2 : 0,1 M Sitrik Asit  
% 37'lik HCl (pH=2,5)  
0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Distile su  
%1'lik Akridin Oranj

Tampon 3 : %1'lik PBS

### **3.3.9. HBA<sup>®</sup> Sperm-Hyaluoronana Bağlanma Tetkiki**

HBA<sup>®</sup> :ORIGIO MidAtlantic Devices, USA

### **3.3.10. Cihazlar**

Otoklav : Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)

Tartılar : Hassas Terazi XB 220A  
(Presica, İSVİÇRE)  
Terazi, KB 400-2 (KERN,  
ALMANYA)

Santrifüjler : Mikrosantrifüj, MiniSpin Plus  
(Eppendorf, ALMANYA)

Derin Dondurucular : -20°C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE)  
-20°C, GSD26410NE (Bosch,  
ALMANYA)

Dokümantasyon Sistemleri : Bio-RAD Universal Hood II  
(BIO-RAD, İTALYA)

Yatay Elektroforez Sistemleri : Flowgen (İNGİLTERE)  
Sub-Cell GT  
(BIO-RAD, İTALYA)



Güç Kaynakları	: EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ) PowerPac Basic (BIO-RAD, İTALYA) PowerPac Universal (BIO-RAD, İTALYA)
Isı Bloğu	: DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Manyetik Karıştırıcılar	: MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
Buzdolapları	: Beko 8742, Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
Spektrofotometreler	: Shimadzu UV 1601 (JAPONYA)
Thermo-Cyclers	: Techne TC-512 (İNGİLTERE)
Mikroskoplar	: Işık Mikroskobu (SOIF, ÇİN) (LEICA, ALMANYA) Floresan Mikroskop (OLYMPUS, ALMANYA)
Vorteks	: Heidolph REAX (ALMANYA)
Su Banyoları	: Nüve BM 402 (TÜRKİYE)
Su Arıtma Sistemi	: Millipore Milli Q Synthesis A10 (FRANSA)

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Yanak İçi Epitel Örneklerinden DNA İzolasyonu

Örnekler ucunda steril pamuk bulunan bir çubuk yardımıyla yanağın her iki kısmına yaklaşık 30 saniye sürülerek toplanır. Yanak içi epitel doku örneği taşıyan steril çubuk, 600-700 µl lizis tamponu içeren 1,5ml Eppendorf tüpe aktarılır. Tampon hacminin en az 500 µl olduğuna emin olunduktan sonra 50 µl 10 mg/ml Proteinaz K ile 55°C'de 1 saat inkübe edilir. Tercihen gece boyu da inkübasyona bırakılabilir. Steril çubuk tüpün içinde çeperele ve tüpün ağzına bastırılarak emdiği tamponu hücrelerle beraber bırakması sağlanır ve tüpten çıkarılır. Üzerine 300 µl fenol ve 600 µl kloroform eklenir. 12000 g'de 2 dk. santrifüj edilir. Sulu faz yeni tüpe aktarılır. Yeni tüpe aktarılan sulu faza eşit hacimde (yaklaşık 500 µl) CHCl<sub>3</sub>: IAA (24:1) eklenir. Tüp 12.000 g'de 2dk. santrifüj edilir. Sulu faz yeni tüpe aktarılır ve 1:10 hacimde 3 M NaOAc eklenip karıştırılır. Üzerine toplam hacmin %10'u kadar izopropanol eklenir. Tüpler -20°'de gece boyu inkübe edilerek DNA'nın çökmesi sağlanır. İnkübasyondan sonra tüpler 12000 g'de 10 dk. santrifüjlenir ve DNA çöktürülür. DNA pelleti 500 µl %70 etanol ile 12000 g'de 5 dk. santrifüjlenerek yıkanır. Süpernatant atıldıktan sonra tüpler yaklaşık 15-20 dakika kurumaya bırakılır. DNA 50 µl Low-TE tamponu içinde ve oda sıcaklığında 2-3 gün bırakılarak çözündürülür. DNA içeren tüpler -20°C derecede saklanabilir.

### 4.2. İzole Edilen DNA'nın Analizi

İzole edilen DNA'ların miktar tayininde absorpsiyon temeline dayanan spektrofotometrik yöntemler kullanılır. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon gösterir. Bu nedenle 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A<sub>260</sub>) saf olarak elde edilen nükleik asitlerin µg düzeyinde

miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. Çift zincirli DNA molekülleri için 1 optik dansitenin (OD) 50 µl/ml'ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için miktar tayininde ;

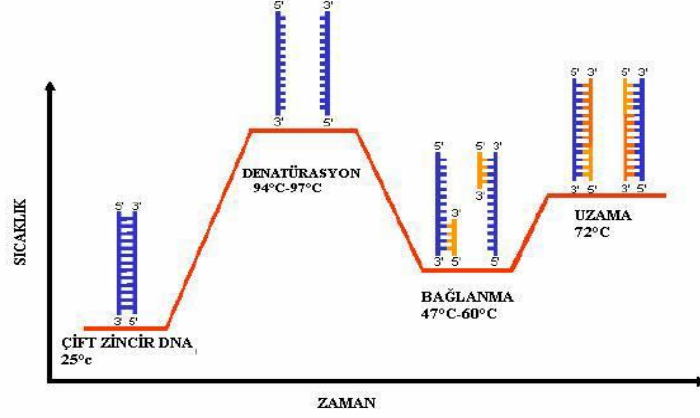
$$C (\mu\text{g}/\text{ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{sulandırma faktörü}$$

formülü kullanılır. Ayrıca izole edilen DNA'nın ne kadar saf olduğu da önemlidir. Bu sebeple protein kontaminasyon varlığı, her izolasyon işleminden sonra kontrol edilmesi gereken bir parametredir. Protein kontaminasyonunun yüksek olması, sonrasında uygulanacak PZR işleminde sorunlara sebep olur. Proteinler 280 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon gösterirler. Böylece 260 ve 280 nm'de ölçülen değerler kullanılarak A260/A280 oranı hesaplanır. Saf DNA'da bu oran 1,75-1,80'in üzerinde olmalıdır. Ölçümlerde UV geçirgen kuvarz küvetler kullanılır.

### 4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan bir DNA parçasını çoğaltmak için primerlerin kullanıldığı yapay bir tepkimedir. Amplifikasyon için önce DNA iki oligonükleotid primer ve dört deoksिनükleotid trifosfatın (dNTP) varlığında 95°C'ye kadar ısıtılarak denatüre edilir. Daha sonra 55°-65°C arasında bir ısıya düşürülerek özgül primerlerin komplementer dizilerine yapışması sağlanır. Tipik bir PZR reaksiyonu çoğaltılacak DNA'yı, istenilen bölgeyi hedefleyen ileri ve geri primerleri, reaksiyon tamponunu, MgCl<sub>2</sub>, dNTP'leri ve Taq polimeraz enzimini içerir. Taq polimeraz aktivitesi için serbest Mg<sup>+2</sup> iyonlarına ihtiyaç duyulur. Reaksiyon tamponu enzim aktivitesi için gerekli iyonları içerecek şekilde hazırlanır ve dNTP'ler de DNA sentezi için gerekli nükleotidleri sağlar. Nükleotidler iki değerlikli katyonları yakaladığı için Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonu nükleotid konsantrasyonundan biraz daha fazla tutulmalıdır. Mg<sup>+2</sup> ve diğer tuzlar primerlerin kalıp DNA'ya hibridizasyonunu da etkileyebilir. Son olarak 72°C'de DNA polimeraz aktivitesi gösteren ve yüksek ısıdan etkilenmeyen Taq polimeraz enzimi, 5'-3' yönünde olmak üzere, ortamdaki nükleotidleri kullanarak, primerlerin 3' hidroksil ucuna nükleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA parçasının bir kopyası elde edilir. Şekil 4.1'de PZR aşamaları gösterilmiştir. Bir PZR döngüsü denatürasyon,

bağlanma ve uzamadan oluşan üç aşamadan oluşur. Her bir siklus sonucunda DNA miktarı üssel olarak artar. Toplam döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır (Temizkan ve diğ., 2004 :136).



Şekil 4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu aşamaları

Polimeraz zincir reaksiyonunun kesin koşulları ve döngünün her bir basamağının süresi kullanılan örneğe, amplifiye olacak hedef bölgenin uzunluğuna ve primer dizilerine bağlıdır. Tepkime koşulları değişken olup maksimum verim için optimizasyona gerek duyulur. Bu nedenle en uygun koşulların sağlanması için PZR bileşenlerinde düzenlemeler yapılır.

Bu çalışmada yapılan polimeraz zincir reaksiyonu şartları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. PZR'da Kullanılan Malzemeler ve Miktarları

	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Miktarlar (µL)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Tampon	10X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,0 µL
dNTP	5 mM	2,0 µL
Primer MnlIF	12,5 pmol/µL	1,0 µL
Primer MnlIR	12,5 pmol/µL	1,0 µL
Taq Polimeraz (5U/µL)	5U/µL	0,2 µL
DNA (ng)	30-50ng	
Toplam Hacim (µL)	25 µL	

**Tablo 4.2.** PZR Isı Döngüsü Şartları

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Başlangıç Denatürasyonu	94°C	5dk
Denatürasyon	94°C	30sn
Bağlanma	62°C	45sn
Uzama	72°C	45sn
Son Uzama	72°C	5dk
Döngü Sayısı		30

#### 4.4. Primer Dizayını

Çalışmada kullanılan MnlI geri primeri, yabancı alel için polimorfik bölgede T→C nükleotid değişimi yaparak MnlI kesim bölgesi oluşturmaktadır. Primerlerin gen üzerinde bağlandıkları bölgeler internet tabanlı elektronik PZR ile kontrol edilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

#### 4.5. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimi

Restriksiyon enzimleri veya diğer adıyla restriksiyon endonükleazları çift zincirli DNA'yı şeker fosfat bağından kopararak keser. Bu kesim çift zincirin karşılıklı fosfat bağlarında simetrik veya asimetrik şekilde olabilir. Kesim simetrik ise DNA parçaları herhangi bir şekilde birbirine tutunamayacağı için küt uç oluşur, fakat enzim DNA'nın her iki zincirini tam karşılıklı kesmemiş ise yapışkan uçlar oluşur ve bu uçlardaki bazlar hidrojen bağı kurarak birbirine tekrar yapışabilir. Her restriksiyon enzimi DNA üzerinde 4-6 baz çiftlik belirli diziyi tanır ve ancak bu tanıma bölgesi bulunduğu zaman DNA'yı bu bölgeden veya bu bölgeye belirli bir uzaklıktan ve de her tanıma bölgesi için bir kesim yapacak şekilde ayırır. Bu bakımdan restriksiyon endonükleazları moleküler biyolojide oldukça kullanışlı enzimlerdir ve günümüzde çeşitli bakterilerden saflaştırılan, farklı tanıma bölgelerine sahip, kör ve yapışkan uçlu kesim yapabilen pek çok restriksiyon enzimi ticari olarak mevcuttur.

Farklı tanıma bölgelerine sahip pek çok enzimin var oluşu bu enzimlerin ilgili gen üzerinde oluşan bir mutasyonu veya polimorfizmi taramak için sıkça

kullanılmasına olanak sağlamıştır. Teorik olarak bir gen üzerinde oluşan nokta mutasyonları bir veya daha fazla restriksiyon enzimi için tanıma bölgesi oluşturabilir veya aksine, var olan bir tanıma bölgesinin kaybolmasına sebep olabilir. PZR ile çoğaltılan ilgili gen bölgesi çeşitli restriksiyon enzimleri ile *in vitro* reaksiyona sokularak gen üzerindeki polimorfizmler hakkında yorum yapılabilir. Tipik bir restriksiyon reaksiyonu PZR ürünü, enzim tamponu, restriksiyon enzimi ve su içerir. Reaksiyon tamponu son konsantrasyonda 1X olacak şekilde konur. Reaksiyon sıcaklığı kullanılan restriksiyon enziminin optimum çalışma sıcaklığı olmalıdır. Çok yüksek sıcaklıklar enzimin bozulmasına ve deaktivasyonuna yol açarken çok düşük sıcaklıklarda enzimin aktivitesini düşürür veya tamamen durdurabilir. Yüksek enzim konsantrasyonu “star” aktivitesine yol açıp spesifik olmayan fazladan kesimlere yol açacağından enzim konsantrasyonu kullanılan DNA miktarına göre doğru ayarlanmalıdır. Enzim konsantrasyonunun düşük olması ise reaksiyon süresini uzatır. Reaksiyon süresi, kullanılan enzim ve DNA oranı ile enzimin türüne bağlıdır. Reaksiyonun süresinin gereğinden uzun tutulması yine star aktivitesine yol açabilir. Bu yüzden enzim miktarı, DNA miktarı ve reaksiyon süresi doğru ayarlanıp optimize edilmelidir. Bu tezde kullanılan enzimlerin optimize olmuş reaksiyon şartları Tablo 4.3.’de verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Restriksiyon Enzimi Kesim Şartları

<b>Kesim Enzimi</b>	<b>10X Tampon</b>	<b>MnII (10U/μL)</b>	<b>Toplam Hacim (μL)</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (saat)</b>
MnII	0,2 μL	2,0	20	37	16

#### **4.6. Agaroz Jel Elektroforezi**

Agaroz jel elektroforezi DNA parçalarının moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlar. Jeli hazırlamak için agaroz 0,5 X TBE solüsyonunda yüksek sıcaklıkta çözündürülür. Çözelti 50°C’ye kadar soğutulup içine Etidyum bromür (0.5mg/ml) eklenir. Etidyum bromür DNA bazları arasına bağlanarak UV ışığı altında floresan etki gösterir ve DNA’ların belirlenmesine yardımcı olur. EtBr eklendikten sonra çözelti jel kasetine dökülür. Örneklerin yüklenebilmesi için taraklar yardımıyla kuyucuklar oluşturulur. Örnekler BPB yükleme tamponu ile son konsantrasyon 1X olacak şekilde karıştırılır ve mikropipet kullanılarak jeldeki

kuyucuklara yüklenir. Elektrik akımı verilmesi ile birlikte DNA anoda doğru hareket etmeye başlar. Agaroz jeller genellikle 120 Voltta (V) 120 dakika yürütülür. Voltaj yükseldikçe agaroz jelin ayırma etkisi azalır. DNA fragmanlarının optimum ayırımını sağlamak için 5V/cm akım uygulanmalıdır. Elektroforez tamamlandığında DNA bantları UV ışığı altında gözlenebilir. Bu çalışmada PZR örnekleri ve restriksiyon enzimi kesim ürünlerinin tamamı %2'lik agaroz jelde EtBr boyaması ile UV ışığı altında gözlemlenmiş ve görüntülenmiştir. Restriksiyon enzimi kesiminde Agaroz (Nu micropor, Prona) kullanılmıştır.

#### **4.7. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması**

Dizi analizi yapılacak örnekler belirlenerek PZR ile amplifiye edilir. PZR ürünleri High Pure PCR Purification Kit (Roche) kullanılarak saflaştırılır. Filtreli tüpe 50 µl PZR ürünü ile 250 µl bağlanma tamponu eklenir. 1 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atıldıktan sonra 250 µl yıkama tamponu eklenir ve 1400 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Bu aşama ikinci kez 100 µl tampon eklenerek tekrarlanır ve sonrasında 100 µl elüsyon tamponu eklenerek 1 dakika bekletilir ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra süzüntü 0.2 µl'lik Eppendorf tüpe aktarılır. %2'lik agaroz jelde yürütülerek saflaştırılan PZR ürününün varlığı ve miktarı kontrol edilir.

#### **4.8. Dizi Analizi**

DNA dizi analizinde günümüzde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam ve diğ., 1977) ve Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemidir (Sanger ve diğ., 1977). En yaygın kullanılan yöntem ise Sanger-Coulson yöntemidir. Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA zinciri yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenow, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin yanı sıra deoksiribozun 3'pozisyonunda OH grubu taşımayan dideoksiribonükleozit trifosfatları (ddNTP) da substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur.

Günümüzde dizi analizlerinde otomatik dizileme sistemleri kullanılmaktadır. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik analizde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jel matrisi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendisi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir dedektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook et al., 1989). Bu tez çalışmasında dizi analizi işlemleri İontek A.Ş. tarafından yapılmıştır. Dizileme sonuçları ChromasPro programı ile görüntülenmiş ve analiz edilmiştir.

#### **4.9. Sperm Örneklerinin Toplanması ve Değerlendirilmesi**

Özel İstanbul Tüp Bebek Merkezinde, 2-7 günlük cinsel perhiz sonrası hastalardan mastürbasyon ile elde edilen semen örnekleri 30 dk oda sıcaklığında likefaksiyon için inkübe edilir. Semen analizi WHO 2010 kriterlerine göre yapılır. Sperm hacmine serolojik pipet ile bakılır. Konsantrasyon ve hareketlilik analizi makler kamera üzerine 10 µl semen örneği konularak ışık mikroskopunda 20X objektif ile yapılır. Konsantrasyon analizi, yatay veya dikey yanyana 10 adet kare içerisindeki spermler sayılarak yapılır,  $10^6$  ile çarpılarak mililitredeki konsantrasyon bulunur. Doğru analiz için birbirinden uzak, 3 sıra 10 kare sayılıp ortalaması alınır. Total sperm sayısı (konsantrasyon/ mililitre x hacim)  $40 \times 10^6$  ve üzeri olan sperm örnekleri normal olarak değerlendirilir. Hareketlilik analizi için 100 adet sperm sayılır, her bir sperm ileri hareketli, yerinde hareketli ve hareketsiz olarak tanımlanır. İleri hareketli sperm sayısı %32 ve üzeri olanlar normal olarak değerlendirilir.



#### **4.10. Spermac™ Boyama ile Sperm Morfoloji Değerlendirilmesi**

Morfoloji analizi için 10 µl sperm lama yayılacak, havada kurutulduktan sonra Spermac™ boya ile ilgili protokol izlenerek boyanır (10 dk fiksasyon, 2 dk A boyası, 1 dk B boyası, 1 dk C boyası). Morfoloji için Kruger'in kesin kriterleri (Kruger ve Coetzee, 1999: 172-182) kullanılarak değerlendirme yapılır.

#### **4.11. Akridin Oran (AO) Boyama**

Metanol:Asetik asit (3:1) fiksatifinde 16 saat inkübasyon yapılır. 40 ml 0.1M sitrik asit ve pH'sı %37'lik HCl ile 2.5 a ayarlanmış 2.5 ml 0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 10 ml distile suyla hazırlanmış %1'lik Akridin turuncusu karıştırılarak boyama solüsyonu hazırlanır. Bu solüsyonda karanlık ortamda ve çalkalayıcıda düşük hızda 5 dk sperm yayılmış ve havada kurutulmuş lamalar boyanır. 2 kez %1'lik PBS ile çalkalayıcıda düşük hızda 5 dk yıkama yapılır. Lamaların fazla suyu peçete ile alınır. Lamel konulup kenarları oje ile kapatılarak lamel sabitlenir. Kuruduktan sonra karanlık ortamda floresan mikroskopunda 40x objektif ile mümkün olduğunca çabuk sayım yapılır. En az 100 adet sperm sayılır ve kırmızı ile yeşil spermlerin oranı çıkarılır. Akridin turuncusunun absorpsiyonu (emisyon) 490nm, eksitasyonu yeşil için 530nm turuncu için 640nm'dir. Sarı-turuncu-kırmızı boyanan spermler anormal kabul edildi (sperm DNA'sı kırık, tek zincirli DNA). Yeşil boyananların DNA'sı sağlam (çift zincirli) olarak kabul edildi.

#### **4.12. HBA® Sperm-Hyaluronana Bağlanma Tetkiki**

Semen, tercihen 2-3 günlük abstinensi takiben mastürbasyonla elde edilmeli ve temiz ve kuru bir kaba toplanmalıdır. Sıvılaşması için, semen 30 dakika boyunca 20-30°C'de tutulur. 30 dakika sonra hala ağdalı olan örnekler, insan tubal sıvısı (HTF) gibi eşit hacimde bir sperm seyreltme aracı ile seyreltilebilir. Semen örneği üzerindeki tetkiki toplanmasından sonraki 3 saat içerisinde gerçekleştirilir.

Tetkik 20-30°C'de gerçekleştirilir. Öncelikle kaptaki semen örneği karıştırılır ve tetkik bölmesinin ortasına hacmi 7-10µL olan bir damla damlatılır. 45°C'lik açıyla lamel hava kabarcığı kalmadan üzerine yerleştirilir. En az 10, en fazla 20 dakika bekletilir. Aynı grid karesi içerisindeki, bağlanmamış hareketli spermler ve

bağlanmış hareketli sperm sayılır. 10 dakika içerisinde tüm sperm devinimsiz hyaluronan katmanıyla temas edip bağlanacaktır. 20 dakika sonra zayıf hareketli sperm hareketliliklerini yitirebilir. Bağlanmış hareketli sperm, aşamalı hareketlerini durduracaklardır, ancak aktif kuyruk sallamaları devam edecektir. Ölü ya da hareketsiz spermde kuyruk hareketi görülmez. Bağlanmayan hareketli sperm serbestçe yüzerler.

İyi bir tetkik hassaslığı, bağlanmış artı bağlanmamış hareketli sperm sayısı 100-200 arasındayken elde edilecektir. En azından 100 sperm ya da 100 grid karesi sayılıncaya kadar, predominant hareketli sperm sınıfı (bağlanmış ya da bağlanmamış) sayılmalıdır. Sayım yapıldıktan sonra Hyaluronana bağlanan sperm yüzdesi hesaplanır.

Hyaluronan katmanına bağlanan sperm yüzdesinin hesaplanması :

$$\% \text{Bağlanma} = 100X \frac{\text{Bağlanmış Hareketli Sperm}}{\text{Bağlanmış Hareketli Sperm} + \text{Bağlanmamış Hareketli Sperm}}$$

#### 4.13. İstatistiksel Analiz

Genotiplerin, sperm konsantrasyonu, sayısı, hareketli sperm yüzdesi, ileri hareketli sperm yüzdesi, spermelerin yerinde hareketlilik yüzdesi, DNA fragmentasyonu, normal morfolojili sperm yüzdesi ve baş, kuyruk veya herhangi bir diğer morfolojik anomaliye sahip olma yüzdesi ölçütleri açısından anlamlı bir farklılık gösterip göstermediklerini incelemek amacıyla ilk olarak bu özellikleri genotiplere dağılımları açısından normal dağılımda olup olmadıkları Shapiro-Wilk testi ( $p < 0,05 \rightarrow$  nonparametrik,  $p > 0,05 \rightarrow$  parametrik) ile incelenmiştir. Anlamlılık seviyesi 0.05 olarak kabul edilmiştir. Shapiro-Wilk testinin sonucuna göre örnekler parametrik ve nonparametrik olarak ayrılmış ve parametrik örneklerin gruplar arası dağılımlarındaki farklılıklar bağımsız t-testi ve one-way ANOVA ile analiz edilirken, nonparametrik ölçütler için Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testleri uygulanmıştır. Bütün testler için kabul edilen alfa seviyesi 0.05'tir.

## 5.SONUÇLAR

### 5.1.Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki örnek grubu kullanılmıştır. Kontrol grubunu doğal yolla doğmuş, en fazla 7 yaşında ve en az bir çocuğu bulunan 234 fertil erkek birey oluşturmuştur. Çocukların yaşları 1 ay - 7 yaş arasında değişmektedir, ortalaması 37 aylıktır. Kontrol bireylerin yaşları 22-49 yaş arasındadır ve yaş ortalaması 32'dir. Yanak içi epitel hücrelerinden DNA izolasyonu sonrasında 210 bireyin genotipleri belirlenebilmiştir.

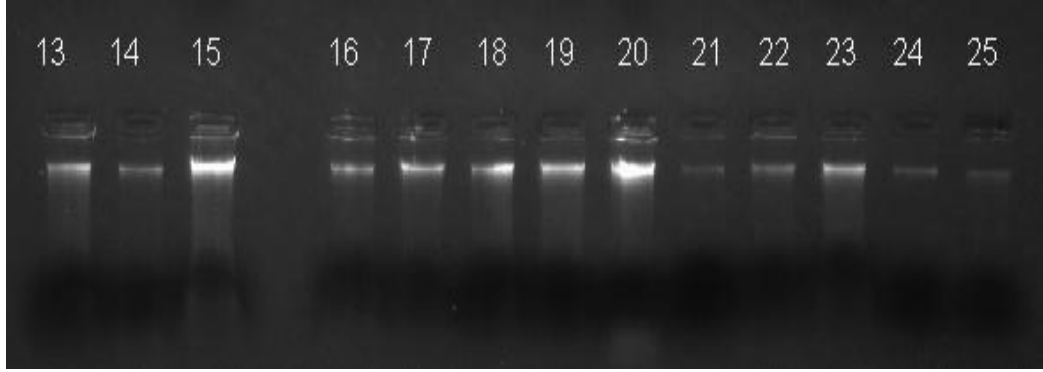
Hasta grubunu Özel İstanbul Tüp Bebek Merkezi'ne infertilite tedavisi için başvuran ve 1 yıldır korunmasız ilişkiye rağmen çocuğu olmayan 277 infertil erkek birey oluşturmuştur. Hasta bireyler sperm parametreleri WHO 2010 kriterlerine göre seçilmiş infertil yetişkin erkek bireylerden oluşturulmuştur. İnfertiliteye neden olabilecek düzeltilebilir bir hastalığın (varikosel, enfeksiyon, inmemiş testis, kanal tıkanıklıkları ve ejakülasyon bozukluğu) bulunmadığı ve lökospermi olmayan örnekler ile çalışılmıştır. Hasta bireylerin yaşları 22-53 yaş arasındadır ve yaş ortalaması 35'tir. Bu bireylerden DNA izolasyonunu takiben 206 bireyin genotipleri belirlenebilmiştir. Buna ek olarak, sperm parametreleri değerlendirilmiş sperm örneklerinin lama yayımları ve boyamaları yapılmıştır.

Tüm hasta bireyler birlikte analiz edildikten sonra sperm parametrelerine göre alt gruplara ayrılmış (oligozoospermi, astenozoospermi, teratozoospermi, sebebi bilinmeyen) ve her grup kendi içinde ayrıca değerlendirilmeye alınmıştır. Buna ek olarak infertil erkek bireylerden eşlerinin yaşı 37'den küçük olanlar (158 kişi) tekrar gruplanarak analiz edilmiştir.

Araştırmanın yapılabilmesi için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmış ve 18 yaş üzeri denekler bilgilendirilerek yazılı onayları sonrasında örnekler toplanmıştır.

## 5.2.DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubunun DNA izolasyonu yanak içi epitellerinden gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde incelenmiş ve DNA'nın parçalanmadan elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 5.1). DNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon analizleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir.

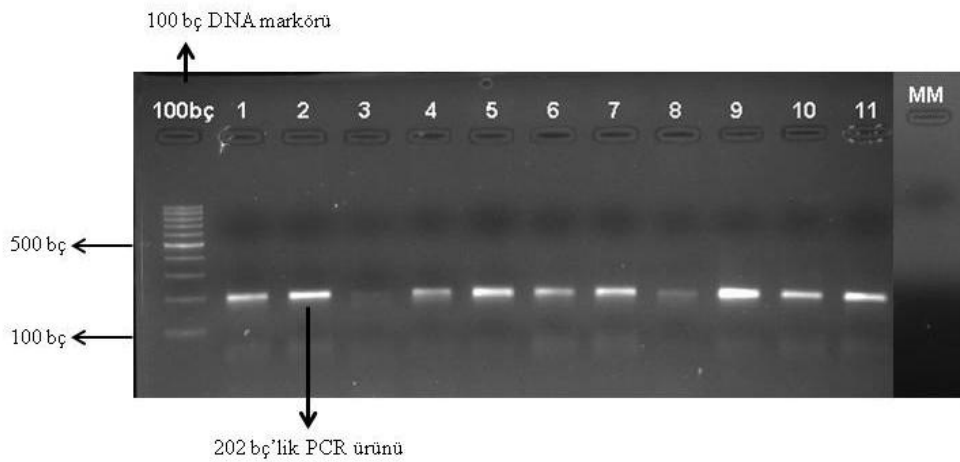


Şekil 5.1. İzole edilen DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi.

## 5.3. DEFB126 geni Polimorfizm Taraması

### 5.3.1. İlgili Gen Bölgesinin Çoğaltılması

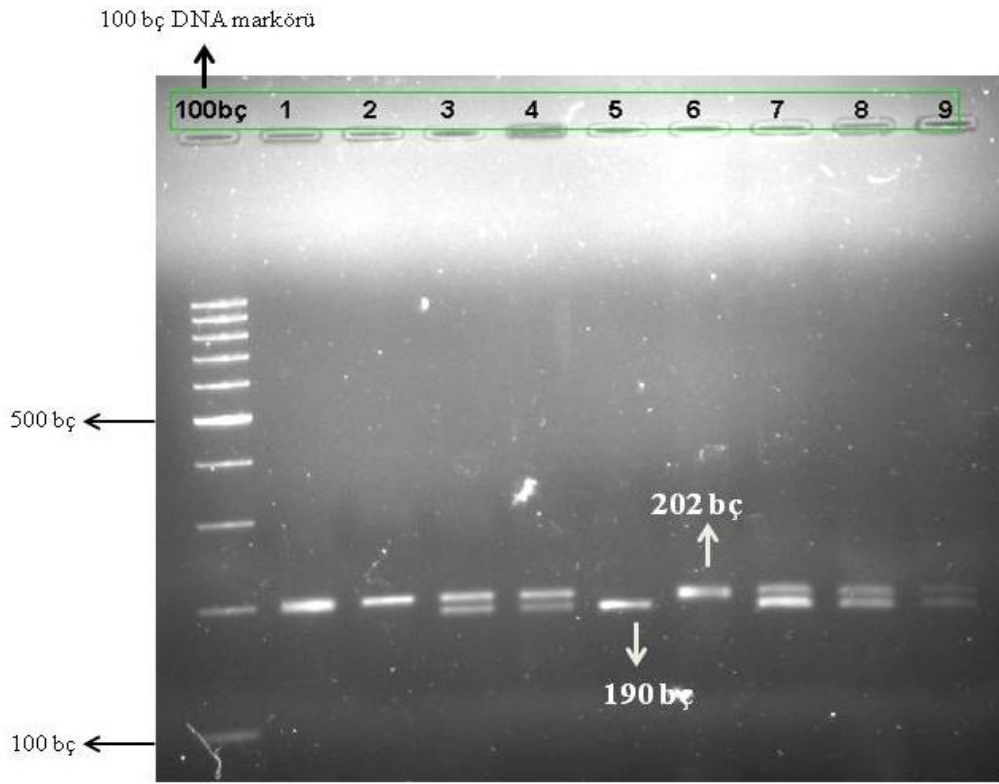
DEFB126 genindeki CC delesyonunun belirlenmesi için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı. Total genomik DNA'daki DEFB126 geninin polimorfik bölgesi MnlI-F ve MnlI-R kullanılarak amplifiye edildi. Elde edilen 202 bç'lik PZR ürünleri 100 bç'lik DNA markörü kullanılarak %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. 202 bç'lik PZR ürününün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (MM: master miks).

### 5.3.2.Çoğaltılan Gen Bölgesinin Restriksiyonu

PZR işlemi ile çoğaltılan gen bölgesine MnlI enzimi ile 37°C’de gece boyu bekletilerek restriksiyon işlemi uygulanmıştır. Restriksiyon işlemi ile referans kodlama dizisinde CC delesyonu olup olmadığı saptanmıştır. Bu gen pozisyonunda Homozigot yabancı olanlar kesilir ve PZR ürünü 190 ve 12bç’lik fragmentlere ayrılır. Delesyonlu allel değişmez ve jelde 202 bç’lik tek bir bant gözlenir. Heterozigot bireyler için ise 190, 12 ve 202 bç bantları oluştuğu gözlenir (Şekil 5.3.). Fragment uzunlukları birbirine çok yakın olan 190 ve 202 bç’lik ürünlerin ayırdedilebilmesi için Numicropore agaroz kullanılmıştır.

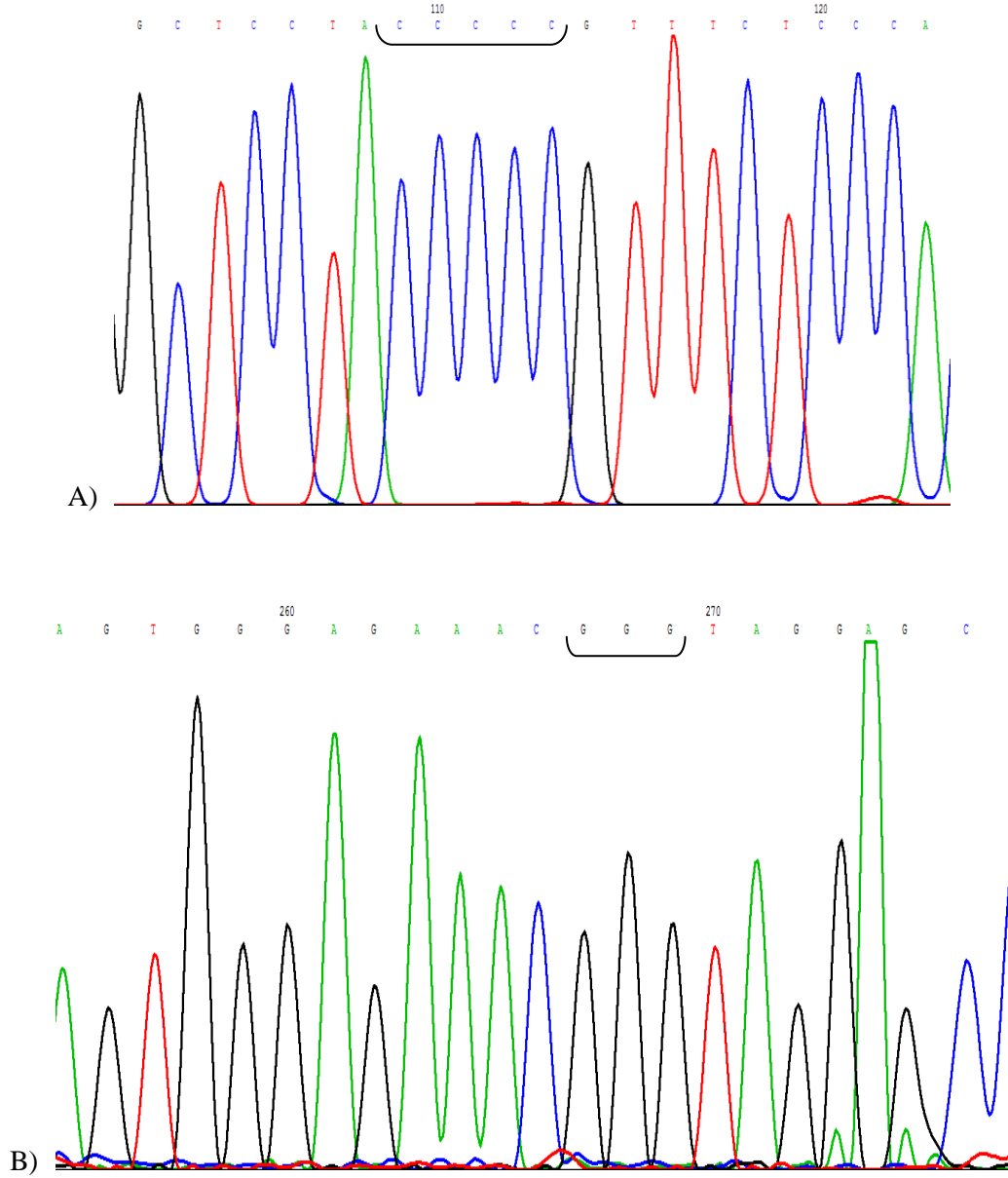


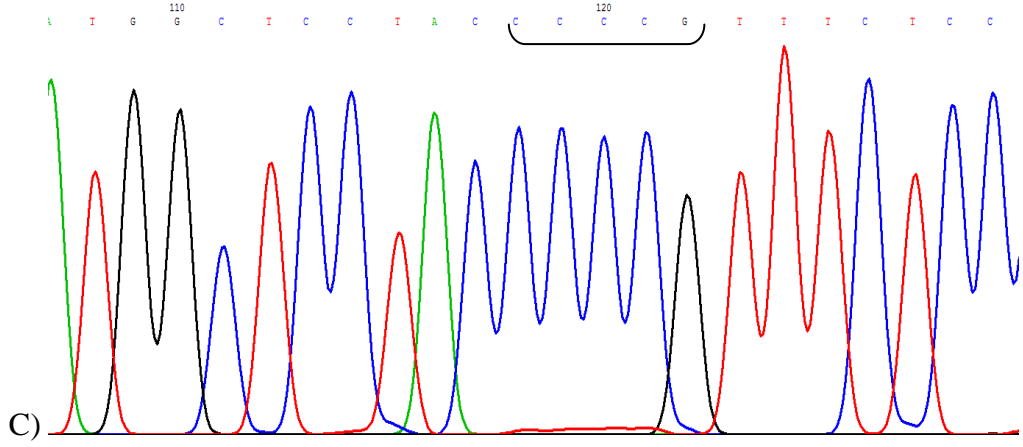
Şekil 5.3. MnlI kesim ürünlerinin %2’lik agaroz jelde görünümü.

### 5.3.3.Dizi Analizi

PZR-RFLP yöntemi ile saptanan genotipler arasından DNA dizi analizi ile konfirme edilmek üzere rastgele olarak homozigot ve heterozigot örnekler seçilmiştir. Dizi analizi yapılacak DNA örnekleri PZR ile çoğaltılıp saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PZR örneklerinin kalitesi agaroz jel elektroforezi ile teyid edildikten sonra dizi analizi işlemi Iontek A.Ş. tarafından gerçekleştirilmiştir. MnlI-F primeri

kullanılarak yapılan dizi analizi sonuçları Codoncode Aligner ve Chromas Pro yazılımları ile incelenerek (Şekil 5.4.) restriksiyon sonuçları ile karşılaştırılmış ve PZR işlemi ile çoğalan gen bölgesinin doğruluğu ile restriksiyon sonucu elde edilen genotip bilgisinin doğruluğu kontrol edilmiştir.

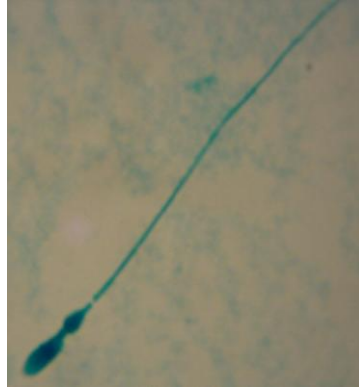




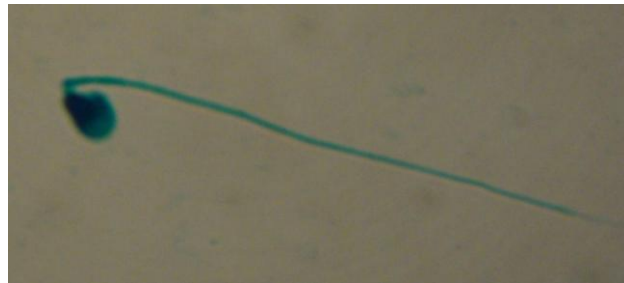
Şekil 5.4. A) wt/wt B) del/del ve C) wt/del örneklerinin dizi analizi görüntüleri.

#### 5.4. Sperm Morfoloji Tayini ve Bazı Anormalilikler

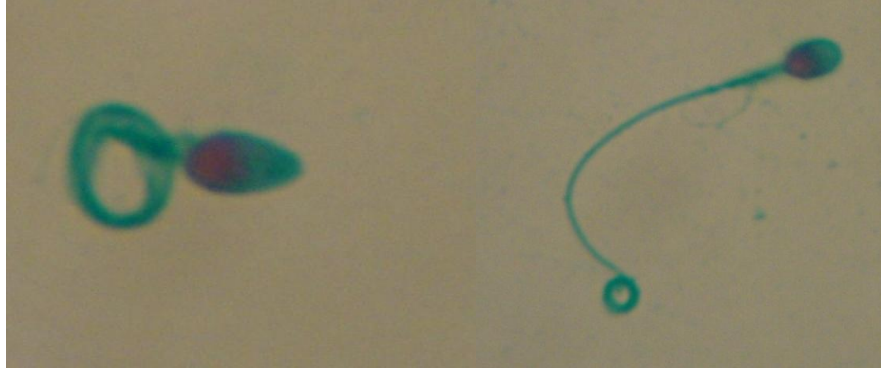
Sperm morfolojisi için boyama yapıldıktan sonra ışık mikroskobu altında 40x büyütmede sayım yapılır. Bunun sonucuna göre sperm morfojik tanısı konur (Şekil 5.5 - 5.8).



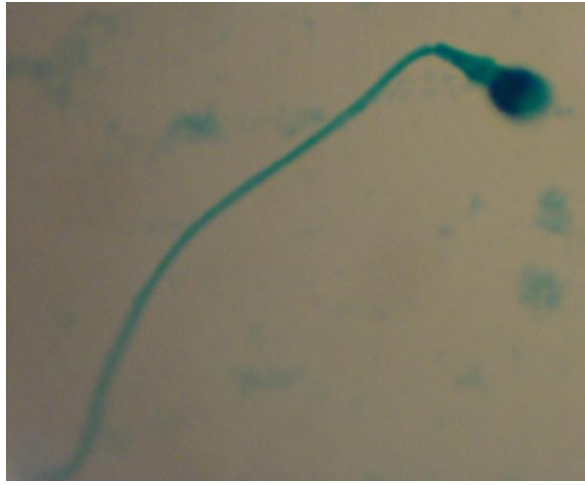
Şekil 5.5. Baş anomalisi - Uzun baş ve düzensiz akrozom dağılımı, boyun anomalisi – sitoplazmik droplet



Şekil 5.6. Boyun anomalisi-kinked



Şekil 5.7. Kuyruk anomalisi - Dag defect



Şekil 5.8. Baş anomalisi (düzensiz akrozomal dağılım) ve boyun anomalileri ( kalın ve kırık boyun, sitoplazmik droplet)

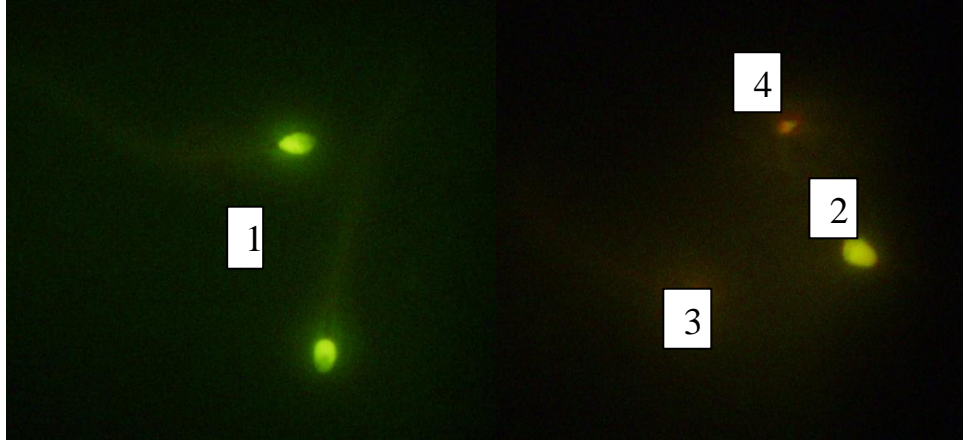
### 5.5. Sperm DNA Fragmentasyonu

Fertil erkeklerle farklı androlojik patoloji gösteren infertil bireylerin spermalarının AO ile boyanmasında literatürde dikkat çekici farklılıklar bulunmuştur. AO çift zincirli DNA varlığında nükleustan yeşil floresan emisyonu yapar. DNA'nın denatüre olduğu durumlarda ise floresanın rengi sarı-turuncu-kırmızıya dönüşür.

Boyama amacıyla 15 µl sperm lamlara yayılmış ve havada kurutulan lamlar Metanol: asetik asit (3:1) fiksatifinde gece boyu bekletilmiştir. 40 ml 0.1M sitrik asit, 2.5 ml 0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 2.5) ve distile suda çözülmüş 10 ml %1'lik AO ile karıştırılarak boyama solüsyonu hazırlanmıştır. Sperm yayımı yapılan lamlar bu solüsyonda karanlık ortamda ve çalkalayıcı üzerinde boyanmış ve ardından iki kez %1'lik PBS ile yıkanmıştır. Üzerine lamel kapatılarak sabitlenmiştir. Floresan mikroskopunda 40X objektif ile yeşil spermiler 530 nm filtre, sarı-turuncu-kırmızı



spermler 640 nm filtre kullanılarak sayılmıştır. Sarı-turuncu-kırmızı boyanan spermlerde DNA fragmentasyonu olduğu kabul yeşil boyananların çift zincirli DNA'ya sahip oldukları kabul edilmiştir (Şekil 5.9). Sarı-turuncu-kırmızı spermlerin toplamının tüm spermlere oranı hesaplanarak DNA fragmentasyon indeksleri (DFI) hesaplanmıştır. DNA fragmentasyonu varlığı için DFI  $\geq$  % 30 oranı temel alınmıştır (Agarwal A. ve Said TM., 2004: 99).



**Şekil 5.9.** Akridin Oranj boyaması sonrasında spermlerin floresan mikroskop ile analizi. 1:hasarsız-yeşil, 2: az hasarlı-sarı, 3 orta hasarlı-turuncu, 4: çok hasarlı-kırmızı hücre

## 5.6. Verilerin İstatistiksel Analizi

### 5.6.1. Erkek İnfertilitesinde Eş Yaşı Gözetmeksizin İstatistiksel Analiz

DEFB126 geninde yer alan delesyon polimorfizminin araştırılması amacıyla hasta ve kontrol grupları için PZR-RFLP yöntemiyle belirlenen genotiplerin dağılımı incelenmiştir ve her iki grup da Hardy Weinberg dengesinde bulunmuştur (Tablo 5.1-5.3).

**Tablo 5.1.** Genotip frekansları

	genotip			Toplam
	wt/wt	wt/del	del/del	
<b>Kontrol</b>	34	107	69	210
<b>Hasta</b>	32	93	81	206
<b>Toplam</b>	66	200	150	416

**Tablo 5.2.** Kontrol Grubu İçin Hardy Weinberg Dengesi

Genotip	Gözlenen	Beklenen
Homozigot yabancı	34	37
Heterozigot	107	102
Homozigot varyant	68	71
$X^2 = 0,559883575$		
$p = 0,454307$		

**Tablo 5.3.** Hasta Grubu İçin Hardy Weinberg Dengesi

Genotip	Gözlenen	Beklenen
Homoziot yabancı	32	30
Heterozigot	93	97
Homozigot varyant	81	79
$X^2 = 0,379786312$		
$p = 0,537718$		

Çevresel faktörler olarak sigara ve alkolün infertiliteye etkisi ki-kare testi ile belirlemiştir. Shapiro-wilk testi ile sperm ölçütlerinin genotiplere göre normal dağılımda bulunup bulunmadığına bakılmıştır.  $p < 0,05$  ise parametrik olmayan,  $p > 0,05$  ise parametrik test kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen ölçütlerin genotiplere göre anlamlı şekilde farklılık gösterip göstermediği Kruskal-wallis testi ile, dominant, resesif, aditif ve genotipik modeller kullanılarak belirlenmiştir. İnfertil ve fertil bireylerin sigara ve alkol kullanma sayıları Tablo 5.4 ve Tablo 5.5'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.4.** Sigara içen ve içmeyen bireylerin frekansları

	sigara		Total
	sigara-	sigara+	
kontrol grup	77	156	233
hasta	135	133	268
Total	212	289	501

**Tablo 5.5.** Alkol içen ve içmeyen bireylerin frekansları

	alkol		Total
	alkol-	alkol+	
grup kontrol	150	83	233
hasta	206	62	268
Total	356	145	501

Sigara ve alkol kullanımının erkek infertilitesi ile ilişkisi anlamlı bulunmuştur, ancak test istatistiklerine göre koruyucu etkinin varlığı tespit edilmiştir. Biyolojik açıdan bu yorum doğru olmayacağı için erkek infertilitesinde genotipik etkilerin çevresel etkilerden daha ön planda olması ve çevresel etkileri maskeleyeceği düşünülebilir (Tablo 5.6). Dominant model analizi sonucuna göre erkek infertilitesi ile polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p=0,016295$ ) ve delesyon alelinin koruyucu etkisinden ( $OR=0,619$ ) bahsedilebilir. Genotipik modelde de heterozigot genotip erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiş ( $p=0,005$ ) ve yine heterozigotluğun koruyuculuğu ( $OR=0,548$ ) saptanmıştır (Tablo 5.6). Diğer modellerde infertilite ile hastalık ilişkisi bulunmamıştır.

**Tablo 5.6.** Genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Sigara	0,487	0,000098	0, 339 -0,700
Alkol	0,586	0,004413	0,385-0,837
Dominant	0,619	<b>0,016295</b>	0,422-0,909
Resesif	1,311	0,192280	0,883 – 1,947
Aditif	0,857	0,176	0,685-1,072
Genotipik	Wd 0,548	<b>0,005</b>	0,358-0,836
	Dd 0,730	0,174	0,464-1,149

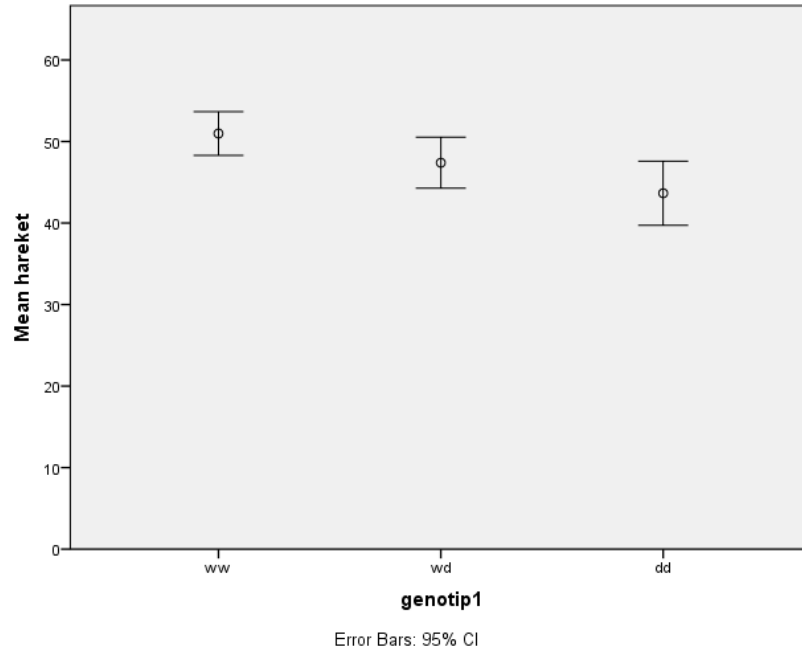
Genotipler ile hamile kalım arasındaki ilişki araştırılmış, ancak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 5.7).

**Tablo 5.7.** Genotipler ile hamile kalım ilişkisi

Etki	OR	P	%95CI
Genotipik	Wd 1,956	0,088	0,904-4,234
	Dd 1,859	0,123	0,845-4,090
Dominant	1,909	0,084	0,957 -3,81
Resesif	1,023	0,948	0,55 – 1,947
Aditif	1,344	0,138	0,909-1,988

Hiçbir parametre normal dağılım göstermediği (Shapiro-Wilk p değeri <0,05) için 3 genotip arasında sperm konsantrasyonu, hacmi, sayısı, genel hareketlilik, ileri hareketlilik ve AO ile boyanma oranları ölçütleri Kruskal-Wallis testi ile incelenmiş ve sadece genel ve ileri hareketliliğin genotip dağılımları arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir (sırasıyla p=0,16 ve p=0,004). Bu farklılığın miktarı ve hangi gruplar arasında olduğu TUKEY HSD testi ile post-hoc çoklu karşılaştırmalar yapılarak belirlenmiştir.

Hastaların ortalama sperm genel hareketlilik yüzdesi %47,56'dır (Min:0,5, Max:75 SS:15,6). Genel hareketlilik genotipler arası farklılık göstermektedir (N:272, H(2):8,288, p=0,016) (Şekil 5.10).



**Şekil 5.10.** Hareketliliğin genotiplere göre dağılımı

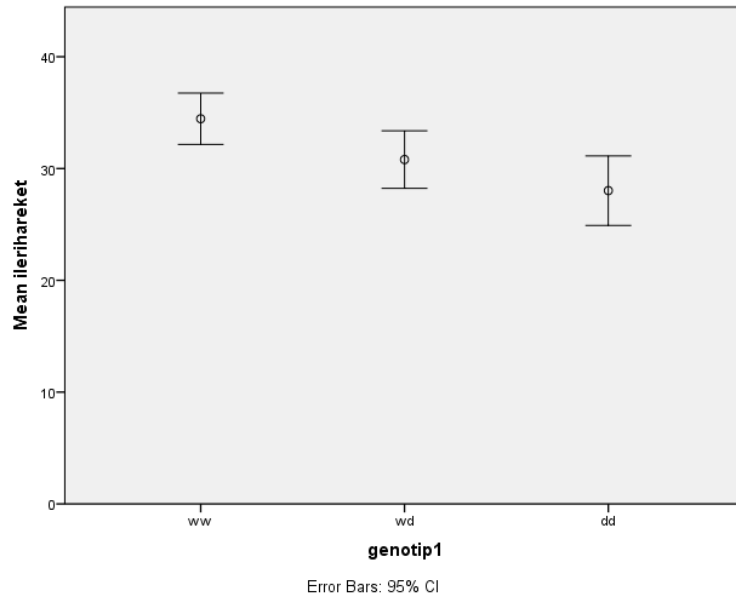
Homozigot yabancı ve homozigot mutant genotipe sahip kişiler arasında sperm hareketliliği önemli ölçüde farklılık göstermektedir (ortalama fark: 7,321, p:0,005 %95CI 1,87-12,77). Homozigot yabancı genotipe sahip kişilerde sperm hareketliliği ortalama %7,321 daha fazladır (Ortalama hareketlilik<sub>ww</sub>:%50,98, Ortalama hareketlilik<sub>dd</sub>:%43,66) (Tablo 5.8).

**Tablo 5.8.** Sperm hareketinin genotiplere göre karşılaştırılması

(I) genotip1	(J) genotip1	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ww	wd	3,583	2,243	,248	-1,70	8,87
	dd	7,321*	2,312	,005	1,87	12,77
wd	ww	-3,583	2,243	,248	-8,87	1,70
	dd	3,738	2,346	,250	-1,79	9,27
dd	ww	-7,321*	2,312	,005	-12,77	-1,87
	wd	-3,738	2,346	,250	-9,27	1,79

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Hastaların (N:270) ortalama sperm ileri hareket yüzdeleri %31,27'dir (Min:2, Max:55 SS:12,83). İleri hareketlilik genotipler arası farklılık göstermektedir (N:270, H(2):11,098, p: 0,04) (Şekil 5.11).



**Şekil 5.11.** İleri hareketliliğin genotiplere göre dağılımı

Homozigot yabancı ve homozigot mutant genotipe sahip kişiler arasında sperm ileri hareketliliği önemli ölçüde farklılık göstermektedir (ortalama fark: 6,429,  $p=0,002$  %95CI=1,97-10,89). Homozigot yabancı genotipe sahip kişilerde sperm ileri hareketliliği ortalama % 6,429 daha fazladır (Ortalama ileri hareketlilik<sub>ww</sub>:%34,45, Ortalama hareketlilik<sub>dd</sub>:%28,02) (Tablo 5.9).

**Tablo 5.9.** Sperm ileri hareketliliğin genotiplere göre karşılaştırılması

(I) genotip1	(J) genotip1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ww	wd	3,651	1,840	,118	-,68	7,99
	dd	<b>6,429*</b>	<b>1,891</b>	<b>,002</b>	<b>1,97</b>	<b>10,89</b>
wd	ww	-3,651	1,840	,118	-7,99	,68
	dd	2,778	1,919	,318	-1,75	7,30
dd	ww	-6,429*	1,891	,002	-10,89	-1,97
	wd	-2,778	1,919	,318	-7,30	1,75

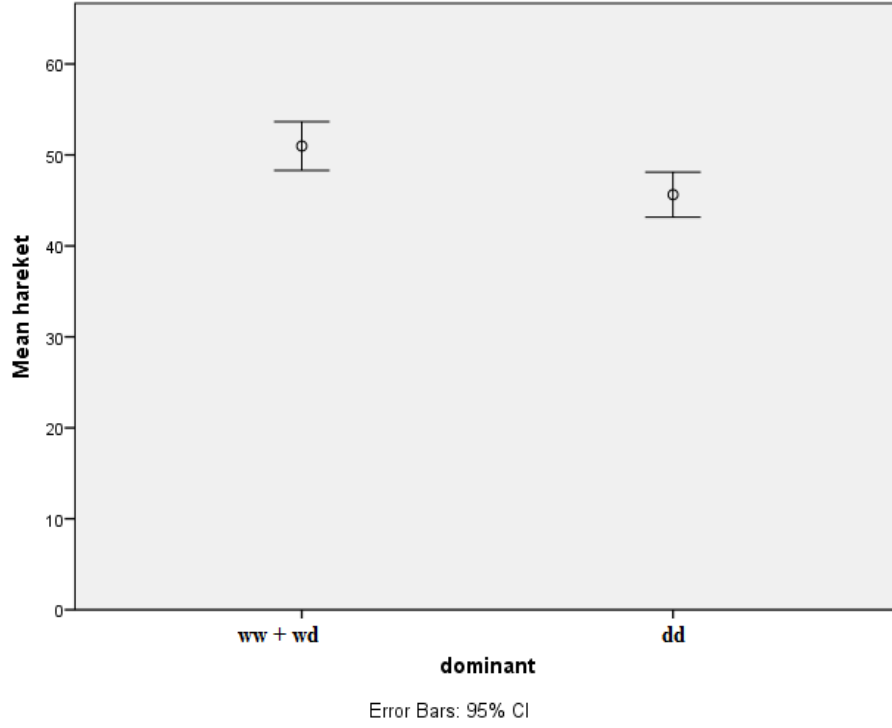
Anlamlılık seviyesi <0,05

Sperm morfolojisinin, normal morfolojiye sahip olanlar, baş anomalisi, kuyruk anomalisi ve boyun anomalisi olanlar olarak genotiplere göre dağılımında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlemlenmemiştir.

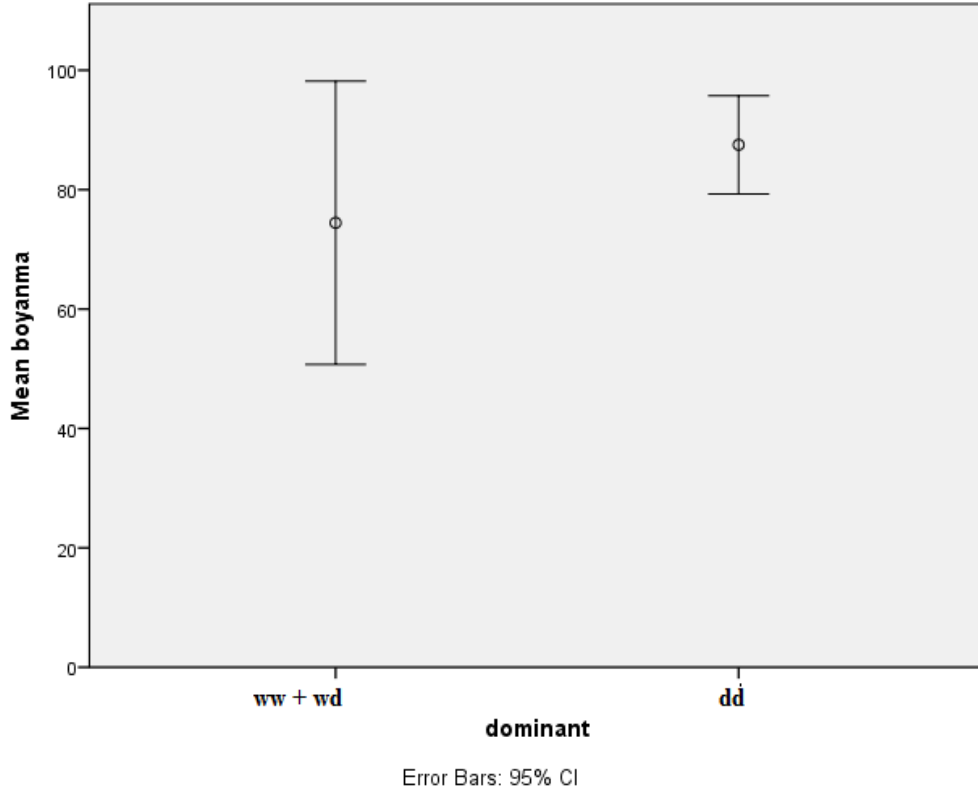
Hasta grubu dominant modele göre gruplandırılıp sperm ölçütleri açısından incelendiğinde spermlerin genel ve ileri hareketliliğin yanı sıra AO ile boyanma oranları açısından da farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 5.10, Şekil 5.12, Şekil 5.13); ( $U_{hareket}:6938,5$   $Z:-2,570$ ,  $p:0,01$  -  $U_{ilerihareket}:6492$ ,  $Z:-3,121$ ,  $p:0,002$ - $U_{boyanma}:84,5$   $Z:-2,06$ ,  $p:0,039$ ) .

**Tablo 5.10.** Bütün hasta grubunda dominant gruplamaya göre sperm ölçütlerinin farklılığı

	konsantras yon	hacim	sayı	hareket	İleri hareket	boyanm a	normal	Baş anormal	Kuyruk anormal	Boyun anormal
Mann-Whitney U	8101,500	8702,500	7948,500	6938,500	6492,000	84,500	5274,000	5281,500	4957,000	5009,000
Wilcoxon W	25306,500	13553,500	23348,500	22163,500	21543,000	129,500	8677,000	13666,500	13213,000	13394,000
Z	-1,602	-,414	-1,001	-2,570	-3,121	-2,060	-,035	-,018	-,678	-,503
Asymp. p	,109	,679	,317	,010	,002	,039	,972	,986	,498	,615
Exact p						,049 <sup>b</sup>				



Şekil 5.12. Bütün hasta grubunda dominant gruplamaya göre sperm hareketliliği



Şekil 5.13. Bütün hasta grubunda dominant gruplamaya göre sperm boyanması

Hasta grubu resesif modele göre gruplandırılıp sperm ölçütleri açısından incelendiğinde grupların hiçbir ölçüt açısından farklılık göstermedikleri belirlenmiştir (Tablo 5.11).

**Tablo 5.11.** Bütün hasta grubunda resesif gruplamaya göre sperm ölçütlerinin farklılığı

	konsantrasyon	hacim	sayı	hareket	İleri hareket	boyanma	normal	Baş anormal	Kuyruk anormal	Boyun anormal
Mann-Whitney U	5393,500	5278,500	4657,500	4430,500	4350,500	166,000	2611,500	2618,500	2564,000	2722,500
Wilcoxon W	9048,500	8848,500	8060,500	7833,500	7753,500	376,000	4627,500	6896,500	6750,000	4867,500
Z	-,660	-,602	-1,199	-1,660	-1,770	-,438	-1,054	-1,028	-1,112	-,622
Asymp p	,509	,547	,231	,097	,077	,662	,292	,304	,266	,534
Exact Sig. p						,696 <sup>b</sup>				

Tüm hastalar için yapılan ve yukarıda belirtilen analizler, hastalar arasında sadece oligozoospermili olanlar için ayrıca uygulanmıştır, genotipler ile infertilite arasında modellerin hiçbiri ile anlamlılık bulunamamıştır (Tablo 5.12-5.13).

**Tablo 5.12.** Oligospermili hastalarda genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Sigara	0,682	0,096	0, 443 1,050
Alkol	0,624	0,052	0,392-0,992
Dominant	0,923	0,808	0,574-1,483
Resesif	1,308	0,285	0,823 – 2,077
Aditif	1,042	0,769	0,790-1,376
Genotipik	Wd 0,799	0,398	0,474-1,345
	Dd 1,062	0,831	0,612-1,841



**Tablo 5.13.** Oligospermi hastalarda genotipik etkiler ile hamile kalım ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Genotipik	Wd 2,083	0,354	0,441-9,844
	Dd 0,893	0,886	0,190-4,186
Dominant	1,359	0,730	0, 325 -5,686
Resesif	0,556	0,418	0,190 – 1,621
Aditif	0,798	0,546	0,383-1,660

Oligospermi hasta grubunda genotipler ve sperm konsantrasyonu, hacmi, miktarı, sayısı, hızı ve AO ile boyanma ölçütleri açısından farklılık göstermemektedir (Tablo 5.14).

**Tablo 5.14.** Oligospermi hastalarda sperm parametreleri ile genotip ilişkisinin hipotez testi özeti

	Null hipotez	Test	p	Karar
1	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki konsantrasyon dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,245	Null hipotez korunur.
2	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki hacim dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,950	Null hipotez korunur.
3	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki sayı dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,183	Null hipotez korunur.
4	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki hareket dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,144	Null hipotez korunur.
5	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki ileri hareket dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,096	Null hipotez korunur.
6	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki AO boyanma dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,708	Null hipotez korunur.

Anlamlılık seviyesi 0,05

Sperm morfolojisinin, normal morfolojiye sahip olanlar, baş anomalisi, kuyruk anomalisi ve boyun anomalisi olanlar olarak genotiplere göre dağılımında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlemlenmemiştir (sırasıyla p=0,153; 0,152; 0,280; 0,931).

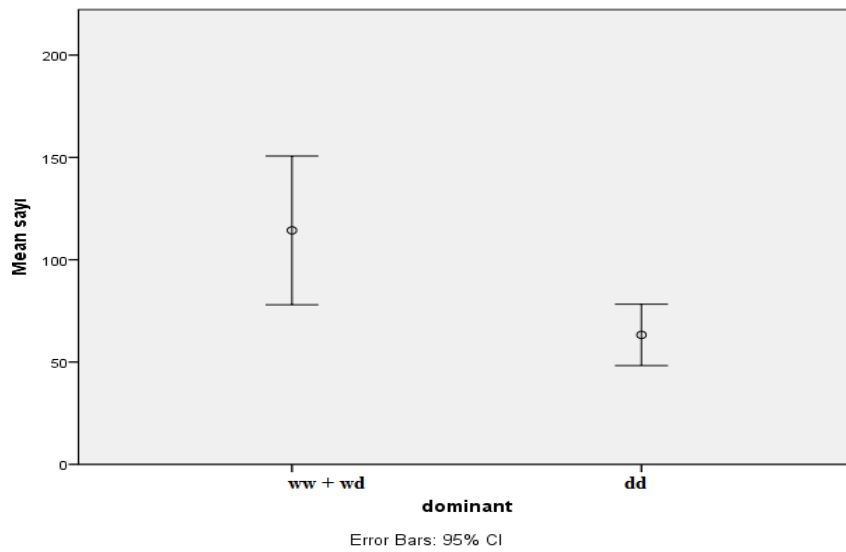
Oligospermi hastalarının dominant gruplandırmaya göre sperm sayısı, hareket, ileri hareket ve sperm konsantrasyonu karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları sayı, konsantrasyon, hareket ve ileri hareket parametrelerinin anlamlı farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (Tablo 5.15 , 5.16). Gruplar arası farklılıklar Şekil 5.14-5.17’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.15.** Oligospermi hastalarının dominant gruplandırmaya göre sperm parametrelerinin analizi

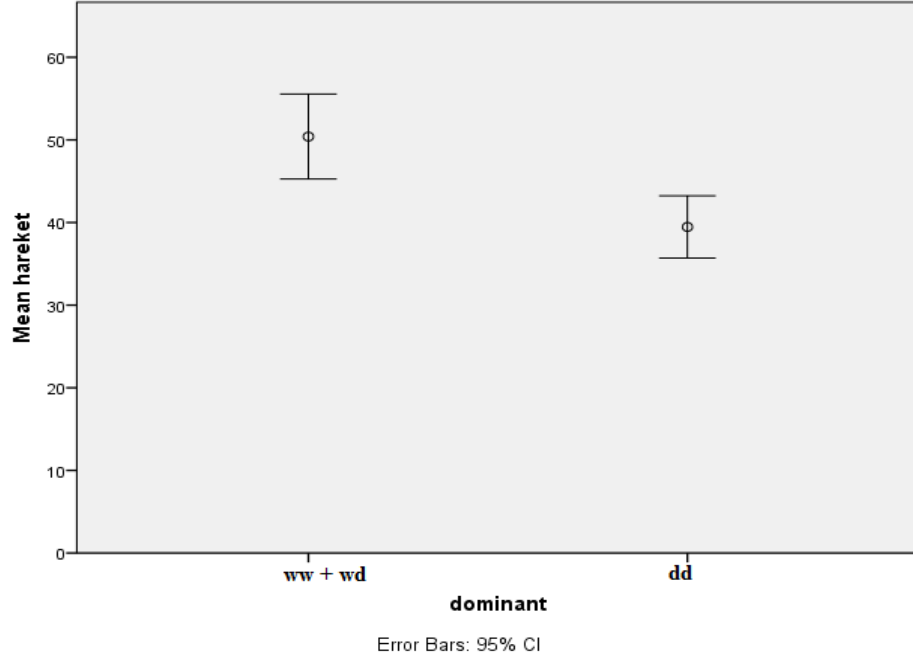
	hacim	sayı	hareket	ileri hareket	boyanma	normal	Baş anormal	Kuyruk anormal	Boyun anormal	konsantrasyon
Mann-Whitney U	1717,000	1180,500	1091,000	1053,000	12,000	671,500	668,500	667,000	809,500	1217,500
Z	-.742	-2,890	-3,197	-3,340	-.729	-1,593	-1,620	-1,519	-.248	-3,439
p	.458	.004	.001	.001	.466	.111	.105	.129	.806	.001

**Tablo 5.16.** Oligospermi hastalarında anlamlı bulunan sperm parametrelerinin dominant gruplamaya göre karşılaştırılması

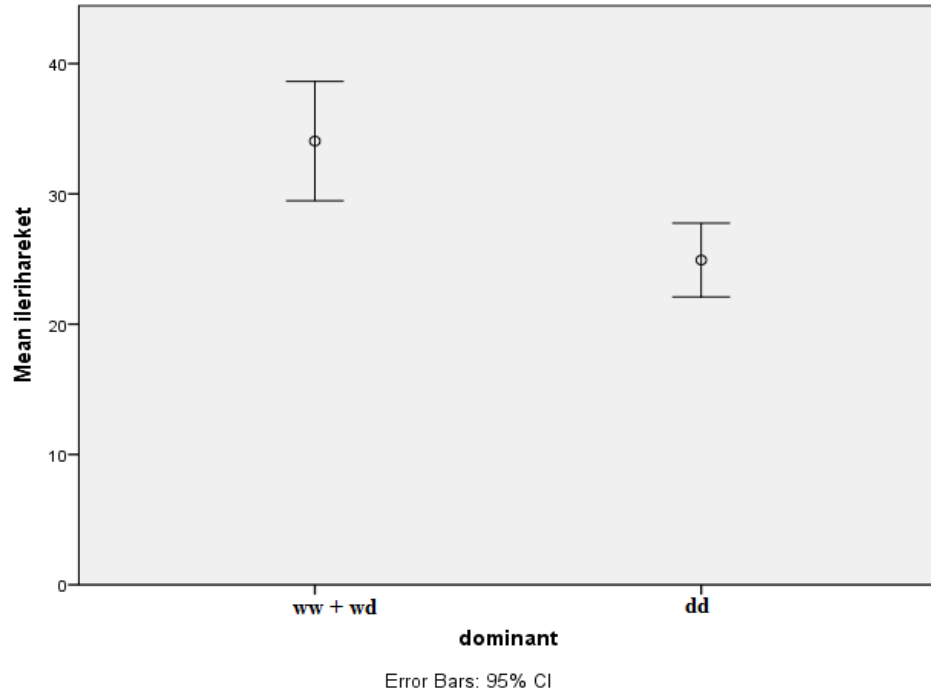
Ölçüt	Ortalama	%95CI	Minimum	Maximum
Sperm sayısı WW + WD	114,37	78,02-150,72	1	420
Sperm sayısı DD	64,36	49,1-79,63	0	350
Sperm hareketliliği WW + WD	50,41	45,26-55,55	10	70
Sperm hareketliliği DD	39,89	36,17-43,61	5	70
Sperm ileri hareketliliği WW + WD	34,05	29,47-38,63	5	55
Sperm ileri hareketliliği DD	24,92	22,10-27,75	2	55
Sperm konsantrasyonu WW + WD	40,67	29,92-51,42	0,5	110
Sperm konsantrasyonu DD	24,4	18,73-30,08	01	100



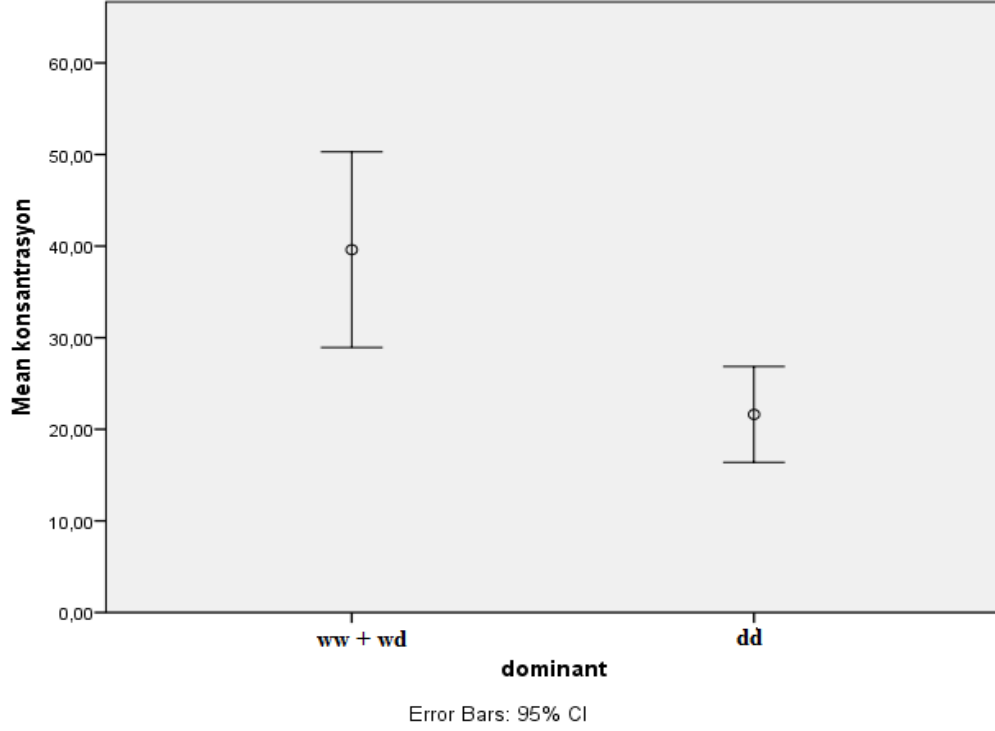
**Şekil 5.14.** Oligospermi hastalarında dominant gruplamaya göre sperm sayısı farklılığı



Şekil 5.15. Oligospermi hastalarında dominant gruplamaya göre sperm hareketi farklılığı



Şekil 5.16. Oligospermi hastalarında dominant gruplamaya göre sperm ileri hareketliliği farklılığı



Şekil 5.17. Oligospermi hasta grubunda dominant gruplamaya göre sperm konsantrasyonu farklılığı

Oligospermili hastalar resesif gruplandırmaya göre hiçbir ölçüt açısından farklılık göstermemektedir (Tablo 5.17).

Tablo 5.17. Oligospermi hasta grubunda resesif gruplamaya göre sperm parametrelerinin analizi

	hacim	sayı	hareket	İleri hareket	boyanma	normal	Bas anormal	Kuyruk anormal	Diğer anormal	konsantrasyon
Mann-Whitney U	1657,500	1225,500	1171,500	1141,500	17,000	557,500	559,000	516,000	595,000	1600,000
Z	-,119	-,1498	-,1720	-,1796	-,462	-,1210	-,1193	-,1509	-,625	-,856
p	,905	,134	,086	,073	,644	,226	,233	,131	,532	,392

İnfertilite sebebi açıklanamayan hastalarda da aynı analizler yapılmıştır. Genotipik etkiler ile infertilite ve hamile kalım ile ilişkisi bulunmamıştır (Tablo 5.18, 5.19)

**Tablo 5.18.** Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipik ve çevresel etkiler ile kısırılık ilişkisi

<b>Etki</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>	<b>%95CI</b>
Sigara	0,458	0,000167	0,306-0,685
Alkol	0,588	0,18	0,38-0,909
Dominant	0,95	0,888	0,546-1,652
Resesif	1,297	0,272	0,844-1993
Aditif	1,115	0,473	0,829-1,5
Genotipik	Wd 0,832	0,539	0,462-1498
	Dd 1,132	0,692	0,614-2,084

**Tablo 5.19.** Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipik etkiler ile hamile kalım ilişkisi

<b>Etki</b>	<b>OR</b>	<b>P</b>	<b>%95CI</b>
Genotipik	Wd 0,587	0,394	0,172-1,998
	Dd 0,833	0,781	0,242-2,909
Dominant	0,694	0,574	0,22-2,189
Resesif	1,247	0,671	0,537-2,892
Aditif	1,011	0,971	0,562-1,817

İnferlitate sebebi bilinmeyen hastalar genotiplerine göre gruplandırılıp, sperm konsantrasyonu, hacim, sayı, hareketlilik ve ileri hareketlilik açısından incelendiğinde genotiplerin bu ölçütler açısından anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir (Tablo 5.20).

**Tablo 5.20.** Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda sperm parametreleri ile genotip ilişkisinin hipotez testi özeti

	<b>Null hipotez</b>	<b>Test</b>	<b>p</b>	<b>Karar</b>
1	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki konsantrasyon dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,968	Null hipotez korunur.
2	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki hacim dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,873	Null hipotez korunur.
3	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki sayı dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,560	Null hipotez korunur.
4	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki hareket dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,462	Null hipotez korunur.
5	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki ileri hareket dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,299	Null hipotez korunur.
6	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki boyanma dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,757	Null hipotez korunur.

Anlamlılık seviyesi 0,05

Sebebi bilinmeyen infertiliteye sahip hastalar genotiplerine göre gruplandırıldığında sperm morfoloji özelliklerinde bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 5.21).

**Tablo 5.21.** Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipe ile sperm morfolojisinin hipotez testi özeti

	<b>Null hipotez</b>	<b>Test</b>	<b>p</b>	<b>Karar</b>
1	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki normal sperm dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,532	Null hipotez korunur.
2	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki baş anormal dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,321	Null hipotez korunur.
3	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki kuyruk anormal dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,567	Null hipotez korunur.
4	Genotip 1'in tüm kategorilerdeki boyun anormal dağılımı aynıdır.	Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi	,524	Null hipotez korunur.

Anlamlılık seviyesi 0,05

Sebebi bilinmeyen infertiliteye sahip hastalar dominant modele göre gruplandırıldığında hiçbir özellik açısından anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 5.22). Diğer modellerin uygulanmasının da uygun olmadığı görülmüştür.

**Tablo 5.22.** Sebebi bilinmeyen infertil hastaların dominant modele göre sperm parametrelerinin incelenmesi

	hacim	sayı	hareket	ilerihareket	boyanma	normal	Bas anormal	Kuyruk anormal	Boyun anormal	konsantrasyon
Mann-Whitney U	1657,500	1225,500	1171,500	1141,500	17,000	557,500	559,000	516,000	595,000	1600,000
Z	-.119	-1.498	-1.720	-1.796	-.462	-1.210	-1.193	-1.509	-.625	-.856
p	,905	,134	,086	,073	,644	,226	,233	,131	,532	,392

### 5.6.2. Erkek İnfertilitesinde Eş Yaşı Gözetilerek İstatistiksel Analiz

Eş yaşının 37'den büyük olduğu vakalar analiz dışı bırakılarak ve hasta grubu oligozoospermi, astenozoospermi, teratozoospermi ve sebebi açıklanamayan infertil hastalar olmak üzere daha fazla gruba ayrılarak analizler detaylandırılmıştır.

Eş yaşının 37'den küçük olduğu tüm hastalar ele alındığında, bu grubun HW dengesinde olduğu bulunmuştur (Tablo 5.23).

**Tablo 5.23.** Hasta Grubu İçin Hardy Weinberg Dengesi

Genotip	Gözlenen	Beklenen
Homoziot yabancı	23	22
Heterozigot	72	74
Homozigot varyant	63	62
$\chi^2 = 0,108409049$		
$p = 0,741963$		

Genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi Tablo 5.24'de, hamile kalım ile ilişkisi Tablo 5.25'de, DNA fragmentasyonu ile ilişkisi ise Tablo 5.26'te gösterilmiştir. Genetik etkiler ile infertilite, hamile kalım ve DNA fragmentasyonu arasında ilişki bulunmamıştır.

**Tablo 5.24.** Genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi

<b>Etki</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>	<b>%95CI</b>
Sigara	0,432	0,000026	0, 291 -0,641
Alkol	0,532	0,004019	0,345-0,820
Dominant	1,134	0,668132	0,638-2,014
Resesif	1,355	0,192280	0,882 – 2,082
Aditif	1,202	0,233	0,888-1,627
Genotipik	Wd 0,995	0,986	0,542-1,826
	Dd 1,350	0,351	0,719-2,534

**Tablo 5.25.** Genotipik etkiler ile hamile kalım ilişkisi

<b>Etki</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>	<b>%95CI</b>
Genotipik	Wd 0,703	0,489	0,259-1,907
	Dd 0,750	0,577	0,273-2,060
Dominant	0,725	0,500	0, 284 -1,850
Resesif	0,976	0,944	0,496 – 1,923
Aditif	0,909	0,694	0,565-1,462

**Tablo 5.26.** Genotipik etkiler ile DNA fragmentasyonu ilişkisi

<b>Etki</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>	<b>%95CI</b>
Dominant	0,714	0,782	0,066-7,788
Resesif	1,33	0,888	0,198 – 6,486
Aditif	0,979	0,973	0,282-2,397
Genotipik	Wd 0,615	0,719	0,044-8,703
	Dd 0,800	0,862	0,065-9,919

Bu hasta grubuna ait sperm parametreleri değerlendirmelerinin genotiplere göre dağılımları Tablo 5.27’de gösterilmiştir



**Tablo 5.27.** Sperm parametrelerinin genotiplere göre dağılımları

<b>Konsantrasyon (milyon/ml)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	31,27	21,65-40,91	19,35	4	65
<b>wd</b>	37,59	30,25-44,94	24,73	1	85
<b>dd</b>	38,84	29,28-48,40	31,83	1	120
<b>Hacim (ml)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	2,88	2,38-3,39	1,02	1,5	5
<b>wd</b>	3,19	2,89-3,49	0,99	1,5	6
<b>dd</b>	2,72	2,36-3,07	1,18	0,7	5,5
<b>Sayı (milyon)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	91,78	56,65-126,91	70,64	12	275
<b>wd</b>	118,28	90,95-145,61	92,01	4	420
<b>dd</b>	101,6	74,01-129,2	91,856	2	480
<b>Hareketlilik (%)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	51,67	47,32-56,02	8,74	35	70
<b>wd</b>	50,87	47,86-53,88	10,12	25	70
<b>dd</b>	48,22	44,07-52,38	13,82	15	75
<b>İleri Hareketlilik (%)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	34,72	30,68-38,77	8,13	20	50
<b>wd</b>	33,37	30,21-36,53	10,649	15	50
<b>dd</b>	31,33	27,69-34,98	12,126	10	55
<b>Yerinde Hareketlilik (%)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	16,94	15,21-18,68	3,48	10	25
<b>wd</b>	17,5	16,3-18,7	4,04	10	30
<b>dd</b>	16,89	15,41-18,37	4,919	5	30
<b>Normal (%)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	3,39	1,84-4,93	3,1	0	12
<b>wd</b>	3,17	2,30-4,05	2,94	0	14
<b>dd</b>	2,58	1,96-3,2	2,07	0	8
<b>Baş Anormal (%)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	96,91	95,07-98,16	3,1	88	100
<b>wd</b>	96,83	95,95-97,70	2,94	86	100
<b>dd</b>	97,42	96,80-98,04	2,07	92	100
<b>Kuyruk Anormal (%)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	20,33	13,39-27,47	14,36	6	55
<b>wd</b>	18,78	14,04-23,52	15,96	1	74
<b>dd</b>	18,93	15,40-22,47	11,76	1	57
<b>Boyun Anormal (%)</b>					
	<b>Ortalama</b>	<b>%95CI</b>	<b>SS</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>ww</b>	32	22,09-41,91	19,93	3	73
<b>wd</b>	39,04	33,61-44,48	18,29	5	84
<b>dd</b>	33	28,91-37,09	13,60	10	70

Bütün ölçütlerin hem genotiplere hem de dominant ve resesif genetik model gruplandırmalarına göre farklılıkları incelenmiştir. Parametrik ölçütlerin 2'den fazla kategoriye (genotipik model) göre farklılığı tek yönlü varyans analizi ile (tek yönlü ANOVA), 2'li kategorizasyonlara (dominant ve resesif model) göre dağılımı ise ilişkisiz grup t-testi (independent t – test) ile analiz edilmiştir. Tek parametrik olmayan ölçüt olan “yerinde hareketlilik” ise genotipik dağılım açısından Kruskal-Wallis, dominant ve resesif modellere göre ise Mann-Whitney-U testi ile incelenmiştir. 2'den fazla kategori içeren analizlerde anlamlı farklılıkların derecesi ve yönü post-hoc çoklu karşılaştırma testlerinden TUKEY HSD testi ile belirlenmiştir. Konsantrasyon, hacim, sayı, hareket, ileri hareketlilik, normal morfoloji yüzdesi, baş morfolojisi anormal yüzdesi, kuyruk morfolojisi anormal yüzdesi ve diğer morfolojik anormalliği olan spermlerin yüzdesi ölçütleri genotipik gruplarda farklılıkları açısından tek yönlü varyans analizi ile incelendiğinde herhangi bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 5.28). Yerinde hareketlilik ölçütünün genotipler arası farklılığı Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş ve anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (H(2): 1,452 p:0,484)

**Tablo 5.28.** Sperm parametrelerinin genotipik karşılaştırması

<b>Ölçüt</b>	<b>df(grup,grupiçi)</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Konsantrasyon</b>	2,155	0,589	0,556
<b>Hacim</b>	2,153	0,607	0,546
<b>Sayı</b>	2,148	0,354	0,702
<b>Hareket</b>	2,147	0,563	0,570
<b>İleri hareket</b>	2,149	0,681	0,508
<b>Normal</b>	2,109	0,837	0,436
<b>Baş anormal</b>	2,109	0,837	0,436
<b>Kuyruk anormal</b>	2,108	0,033	0,968
<b>Boyun anormal</b>	2,108	1,998	0,141

Konsantrasyon, hacim, sayı, hareket, ileri hareketlilik, normal morfoloji yüzdesi, baş morfolojisi anormal yüzdesi, kuyruk morfolojisi anormal yüzdesi ve boyun morfolojik anormalliği olan spermlerin yüzdesi dominant gruplandırmaya göre farklılıkları açısından bağımsız örneklem t - testi ile incelendiğinde herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Levene varyans eşitliği testi sonuçlarına göre (bütün karşılaştırmalar için  $p > 0.05$ ) varyanslar eşit kabul edilmiştir (Tablo 5.29).

**Tablo 5.29.** Sperm parametrelerinin dominant gruplandırmaya göre incelenmesi

<b>Ölçüt</b>	<b>t</b>	<b>df</b>	<b>p</b>
<b>Konsantrasyon</b>	-1,036	156	0,302
<b>Hacim</b>	0,787	154	0,433
<b>Sayı</b>	-,756	149	0,451
<b>Hareket</b>	0,404	148	0,686
<b>İleri Hareket</b>	0,512	147	0,609
<b>Normal</b>	0,880	110	0,381
<b>Baş Anormal</b>	-0,880	110	0,381
<b>Kuyruk Anormal</b>	0,108	109	0,914
<b>Boyun Anormal</b>	-1,016	109	0,312

Aynı ölçütler için farklılıklar resesif gruplandırmaya göre incelendiğinde yine anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 5.30). Diğer morfolojik anomali oranı (Levene testi p:0,008) hariç bütün karşılaştırmalar için varyanslar eşit kabul edilmiştir (Levene testi p>0.05).

**Tablo 5.30.** Sperm parametrelerinin resesif gruplandırmaya göre incelenmesi

<b>Ölçüt</b>	<b>t</b>	<b>df</b>	<b>p</b>
<b>Konsantrasyon</b>	-0,662	156	0,509
<b>Hacim</b>	0,990	154	0,324
<b>Sayı</b>	0,100	149	0,921
<b>Hareket</b>	1,064	148	0,289
<b>İleri Hareket</b>	1,165	147	0,246
<b>Normal</b>	1,209	110	0,229
<b>Baş Anormal</b>	-1,209	110	0,229
<b>Kuyruk Anormal</b>	-0,178	109	0,859
<b>Boyun Anormal</b>	1,273	108,895	0,206

Yerinde hareketlilik hem dominant hem de resesif gruplandırma açısından farklılık göstermemektedir. (Dominant gruplandırma için U:1238 Z:-0,901 p:0,368, resesif gruplandırma için U:2562,5 Z: -0,445 p:0,657).

Sigara ve alkol kullanan bireyler analiz dışı bırakılarak sadece genetik etkilerin erkek infertilitesi ile ilişkisi de araştırılmıştır. Ancak aditif, kodominant, dominant ve resesif model analizi sonuçlarına göre anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 5.31).

**Tablo 5.31.** Genotipik etkilerin infertilite ile ilişkisi

Etki	Genotip	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Aditif	Wt/wt	,121	,251	,233	1	,629	1,129
	Sabit	-,252	,360	,489	1	,484	,777
Kodominant	Wt/wt			,242	2	,886	
	Wt/del	,078	,532	,021	1	,884	1,081
	Del/del	,223	,544	,168	1	,682	1,250
	Sabit	-,123	,199	,382	1	,536	,884
Dominant	dominant	-,259	,547	,224	1	,636	,772
	Sabit	,134	,518	,067	1	,796	1,143
Resesif	resesif	,140	,344	,165	1	,684	1,150
	Sabit	-,140	,216	,418	1	,518	,870

Yukarıda belirtilen hasta grubunun içinden oligospermili hastalar seçildiğinde ve genetik modeller uygulandığında genetik etkilerin hastalık ile (Tablo 5.32), hamile kalım ile (Tablo 5.33) ve DNA fragmantasyonu ile (Tablo 5.34) ilişkisi bulunmamıştır.

**Tablo 5.32.** Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Sigara	0,736	0,318	0,402 -1,346
Alkol	0,621	0,157	0,320-1,206
Dominant	1,150	0,742	0,500-2,648
Resesif	1,516	0,181	0,823 – 2,794
Aditif	1,281	0,273	0,823-1,992
Genotipik	Wd 0,949	0,909	0,390-2,313
	Dd 1,458	0,412	0,592-3,592

**Tablo 5.33.** Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genetik etkiler ile hamile kalım ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Genotipik	Wd 0,303	0,197	0,049-1,861
	Dd 0,367	0,279	0,060-2,252
Dominant	0,333	0,208	0,060 -1,844
Resesif	0,894	0,845	0,290 – 2,757
Aditif	0,725	0,425	0,329-1,598

**Tablo 5.34.** Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genetik etkiler ile DNA fragmentasyonu ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Dominant	0,333	0,501	0,14-8,182
Resesif	0,200	0,278	0,011 – 3,661
Aditif	0,420	0,321	0,076-2,324
Genotipik	Wd 1	1	0,020-50,394
	Dd 0,200	0,368	0,006-6,664

Sadece oligospermili hastalardan oluşan grupta, sperm konsantrasyonu, hareketli sperm yüzdesi, ileri hareketli sperm yüzdesi, spermelerin yerinde hareketlilik yüzdesi, DNA fragmentasyonu, normal morfolojili sperm yüzdesi ve baş, kuyruk veya herhangi bir diğer morfolojik anomaliye sahip olma yüzdesi ölçütleri genotiplere dağılım açısından normal dağılım göstermektedir (Tablo 5.35).

**Tablo 5.35.** Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde sperm parametreleri ve genotiplere dağılımları

Konsantrasyon (milyon/ml)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	8,33	-1,07-17,73	3,78	4	11
wd	5,43	0,60-10,26	5,77	1	16
dd	6,36	3,57-9,15	4,15	1	16
Hacim (ml)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	2,83	1,39-4,26	0,57	2,5	3,5
wd	3,31	2,60-4,01	0,84	1,5	6
dd	2,33	1,63-3,03	1,04	0,7	4
Sayı (milyon)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	24,83	-4,30-53,97	11,73	12	35
wd	14,69	4,49-24,89	12,20	4	39
dd	13,15	7,74-18,57	8,067	2	28
Hareketlilik (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	43,33	24,36-62,31	7,638	35	50
wd	40,00	34,53-45,47	6,54	30	50
dd	31,82	23,69-39,95	12,09	15	50
İleri Hareketlilik (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	26,67	12,32-41,01	5,77	20	30
wd	23,75	18,88-28,62	5,82	15	30
dd	18,64	14,11-23,17	6,74	10	30
Normal (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	1,67	-5,55-8,84	2,88	0	5
wd	2,50	0,66-4,34	2,20	0	6
dd	0,82	-0,02-1,66	1,25	0	4
Baş Anormal (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	98,33	91,16-105,50	2,88	95	100
wd	97,50	95,66-99,34	2,20	94	100
dd	99,18	98,34-100,02	1,25	96	100
Kuyruk Anormal (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	26,67	-26,05-79,38	21,22	12	51
wd	25,75	10,28-41,22	18,49	5	58
dd	27,27	21,64-32,91	8,39	15	43
Boyun Anormal (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	27,67	-30,93-86,26	23,58	3	50
wd	41,75	25,98-57,52	18,86	20	72
dd	30,91	21,97-39,85	13,30	11	50

Oligospermili alt grupta sperm sayısı hariç bütün ölçütlerin hem genotiplere hem de dominant ve resesif genetik model gruplandırmalarına göre farklılıkları incelenmiştir. Hiçbir ölçüt genotipik gruplarda farklılık göstermemektedir (Tablo 5.36).

**Tablo 5.36.** Sperm ölçütlerinin genetik modellere göre grup içi farklılıkları

Ölçüt	df (grup,grupiçi)	F	p
<b>Konsantrasyon</b>	2,51	0,233	0,793
<b>Hacim</b>	2,49	1,187	0,314
<b>Hareket</b>	2,43	0,546	0,583
<b>İleri hareket</b>	2,42	0,672	0,516
<b>Normal</b>	2,21	1,646	0,217
<b>Baş anormal</b>	2,21	1,646	0,217
<b>Kuyruk anormal</b>	2,21	0,116	0,891
<b>Boyun anormal</b>	2,21	1,454	0,256

Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde, hem dominant hem de resesif gruplamaya göre normal morfolojili sperm yüzdesi hariç bütün ölçütler normal dağılım göstermektedir ( $p>0.05$ ). Normal morfolojili sperm yüzdesi ölçütü dominant gruplamaya göre dağılımı Mann-Whitney U testi ile incelenmiş ve anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir ( $U_{\text{dominant}}:28,5$ ,  $Z:-0,278$ ,  $p:0,781$   $U_{\text{resesif}}:46,5$ ,  $Z:-1562$ ,  $p:0,118$ ) (Tablo 5.37)

Oligospermi hastalarda eş yaşı gözetildiğinde, dominant gruplamaya göre hiçbir ölçüt farklılık göstermemektedir. Levene varyans eşitliği testi sonuçlarına göre (bütün karşılaştırmalar için  $p>0.05$ ) varyanslar eşit kabul edilmiştir.

**Tablo 5.37.** Sperm ölçütlerinin dominant gruplamaya göre farklılıklarının belirlenmesi

Ölçüt	t	df	p
<b>Konsantrasyon</b>	0,123	52	0,903
<b>Hacim</b>	1,492	50	0,142
<b>Hareket</b>	0,660	45	0,513
<b>İleri Hareket</b>	0,506	44	0,615
<b>Normal</b>	0,237	43	0,815
<b>Baş Anormal</b>	-0,237	22	0,815
<b>Kuyruk Anormal</b>	0,695	22	0,736
<b>Boyun Anormal</b>	0,639	22	0,378

Aynı ölçütler için farklılıklar resesif gruplandırmaya göre incelendiğinde yine anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 5.38). Normal morfolojili ve baş anomalili sperm yüzdesi (her iki ölçüt için de Levene testi p:0,009) hariç bütün karşılaştırmalar için varyanslar eşit kabul edilmiştir (Levene testi p>0.05).

**Tablo 5.38.** Sperm ölçütlerinin resesif gruplamaya göre incelenmesi

Ölçüt	t	df	p
<b>Konsantrasyon</b>	-0,589	52	0,559
<b>Hacim</b>	0,899	50	0,373
<b>Hareket</b>	1,009	44	0,318
<b>İleri Hareket</b>	1,171	43	0,248
<b>Normal</b>	1,791	16,808	0,091
<b>Baş Anormal</b>	-1,791	16,808	0,091
<b>Kuyruk Anormal</b>	-0,457	22	0,652
<b>Boyun Anormal</b>	0,961	22	0,347

Tüm hasta grubunun içinden sadece astenozoospermili hastalar seçilerek analizler tekrarlanmıştır (Tablo 5.39 , 5.40).

**Tablo 5.39.** Astenospermili hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Sigara	0,446	0,072	0, 182 -1,095
Alkol	0,728	0,525	0, 272 -1,947
Dominant	0,966	0,958	0,265-3,519
Resesif	1,3	0,602	0,483 – 3,501
Aditif	1,128	0,741	0,554-2,298
Genotipik	Wd 0,847	0,814	0,213-3,374
	Dd 1,150	0,847	0,280-4,726



**Tablo 5.40.** Astenospermili hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genetik etkiler ile hamile kalım ilişkisi

<b>Etki</b>	<b>OR</b>	<b>P</b>	<b>%95CI</b>
Genotipik	Wd 0,667	0,501	0,039-8,11,285
	Dd 0,667	0,501	0,039-8,11,285
Dominant	0,667	0,762	0, 048 -9,189
Resesif	0,889	0,906	0,125 – 6,310
Aditif	0,851	0,812	0,224-3,226

Bu grupta hamile kalan olmadığı için genotipik ve dominant OR değerleri eşittir. Bu gruba dahil edilen örnekler arasında sadece 3 tanesi için AO boyaması yapılabildiği için istatistiksel analizi yapılmamıştır.

Astenozoospermili hastalar için sperm parametreleri ve genotiplere göre dağılımları Tablo 5.41’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.41.** Sperm parametrelerinin temel özellikleri ve genotip dağılımları

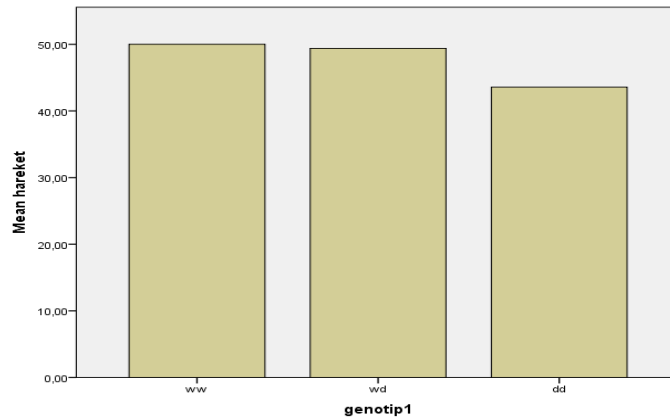
Konsantrasyon (milyon/ml)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	22,33	14,34-30,31	3,21	20	26
wd	59,25	45,41-73,08	8,69	50	70
dd	49,00	3,97-94,02	28,29	16	85
Hacim (ml)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	3	0,51-5,48	1	2	4
wd	3,25	2,22-4,27	0,64	2,5	4
dd	2,37	1,18-3,56	0,75	1,5	3
Sayı (milyon)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	65	29,95-100,04	14,10	52	80
wd	203	109,41-296,58	58,81	150	280
dd	102,62	39,92-165,32	39,40	48	135
Hareketlilik (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	43,33	24,36-62,31	7,638	35	50
wd	40,00	34,53-45,47	6,54	30	50
dd	31,82	23,69-39,95	12,09	15	50
İleri Hareketlilik (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	-	-	-	-	-
wd	28,75	24,77-32,72	2,5	25	30
dd	27,5	22,90-32,09	2,88	25	30
Normal (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	5,33	2,46-8,20	1,15	4	6
wd	7	2,89-11,11	2,58	4	10
dd	4,5	2,91-6,09	1,25	4	6
Baş Anormal (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	94,67	91,80-97,54	1,15	94	96
wd	93,00	88,89-97,11	2,58	90	96
dd	95,50	93,91-97,09	1	94	96
Kuyruk Anormal (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	20,67	-5,90-47,23	10,69	14	33
wd	16,50	-21,52-54,52	23,89	1	52
dd	13,00	-4,33-30,33	10,89	4	26
Boyun Anormal (%)					
	Ortalama	%95CI	SS	Minimum	Maksimum
ww	20,67	-24,48-65,82	18,17	6	41
wd	31,25	-0,77-63,27	20,12	5	48
dd	38,00	12,11-63,89	16,26	20	59

Sadece astenospermili hastalardan oluşan grupta, hareketli sperm yüzdesi ve ileri hareketli sperm yüzdesi hariç ( $p < 0,05$ ) bütün ölçütler genotiplere göre normal dağılım göstermektedir. Hiç bir parametrik ölçüt genotipik gruplarda farklılık göstermemektedir (Tablo 5.42).

**Tablo 5.42.** Sperm ölçütlerinin genetik modellere göre grup içi farklılıkları

Ölçüt	df (grup,grupiçi)	F	p
<b>Konsantrasyon</b>	2,15	1,1	0,358
<b>Hacim</b>	2,15	0,366	0,700
<b>Sayı</b>	2,15	1,869	0,189
<b>Normal</b>	2,8	2,007	0,197
<b>Baş anormal</b>	2,8	2,007	0,197
<b>Kuyruk anormal</b>	2,8	0,176	0,842
<b>Boyun anormal</b>	2,8	0,774	0,493

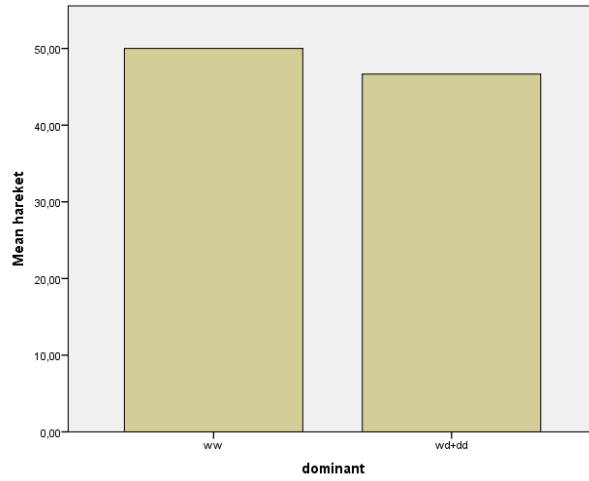
Genotipik gruplamaya göre non-parametrik ölçütler olan hareketlilik ve ileri hareketlilik ise Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildiğinde hareketlilik yüzdesinin genotip grupları arasında farklılık gösterirken, ileri hareketlilik oranının anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir (Hareketlilik;  $H(2):6,284$   $p:0,043$ ; İleri Hareketlilik  $H(2):3,213$   $p:0,201$ ). Genotiplere göre farklılık gösteren sperm hareketliliği yüzdesinde farklılığın miktarı, yönü ve hangi genotipler arasında farklılık gösterdiğini belirlemek üzere yapılan TUKEY hsd testinin sonuçlarına göre homozigot varyant genotipe sahip asteno spermili bireylerde sperm hareketliliği heterozigot bireylere nazaran önemli ölçüde azalmıştır (ortalama fark: %5,8  $p:0,041$ ). Homozigot varyant genotipe sahip bireyler homozigot yabancı genotipli bireylere kıyasla da azalmış hareketliliğe sahip olsalar da bu farkın anlamlılığı sınır değerdedir (ortalama fark:%6,82  $p:0,09$ ) (Şekil 5.18).



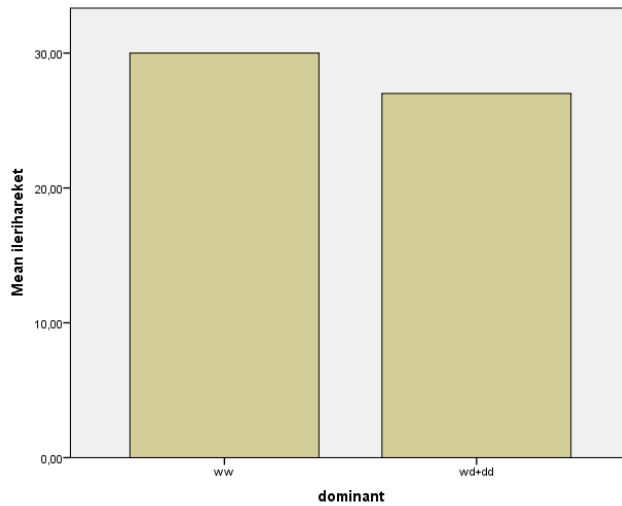
**Şekil 5.18.** Astenospermilerde sperm hareketliliğinin genotiplerle karşılaştırılması

Sadece astenospermili hastalardan oluşan grupta, normal morfolojili ve anormal baş morfolojili sperm yüzdesi hariç ( $p < 0,05$ ) bütün ölçütler dominant gruplamaya göre normal dağılım göstermektedir.

Astenospermili grup dominant gruplama ile kategorize edildiğinde hareketlilik ve ileri hareketlilik yüzdesinin gruplar arası farklılık gösterdiği belirlenmiştir ( $t_{hareket(14)}:2,467$   $p:0,027$  ortalama fark %3,33 ;  $t_{ilerihareket(14)}:3,154$   $p:0,007$  ortalama fark %3). Her iki karşılaştırma için de varyans eşitliği kabul edilmemiştir (Levene test  $p$  değeri  $< 0,05$ ). Normal dağılımda olmayan ölçütler (normal morfoloji, anormal baş morfolojisi) dominant gruplamaya göre anlamlı bir farklılık göstermemektedir (Mann-Whitney U testi  $p$  değeri  $> 0,05$ ) (Şekil 5.19 , 5.20).

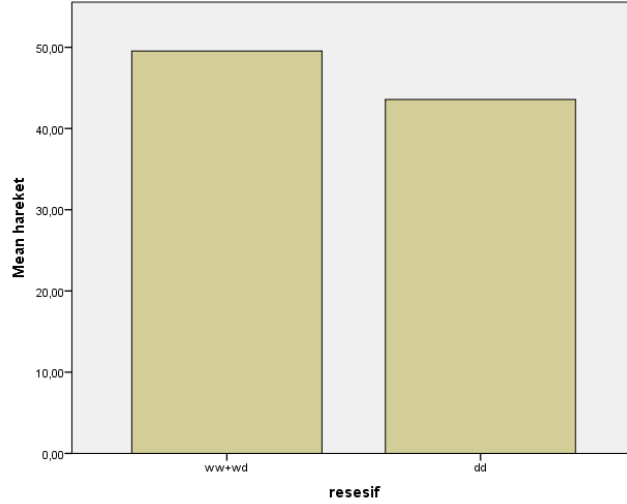


Şekil 5.19. Astenospermilerde sperm hareketliliğinin dominant gruplandırmaya göre incelenmesi



Şekil 5.20. Astenospermilerde sperm ileri hareketliliğinin dominant gruplandırmaya göre incelenmesi

Resesif gruplandırmaya göre hareketli sperm yüzdesi ve ileri hareketli sperm yüzdesi hariç ( $p < 0,05$ ) bütün ölçütler normal dağılım göstermektedir. Hiçbir parametrik ölçüt resesif gruplandırmaya göre farklılık göstermemektedir. Resesif gruplamaya göre normal dağılım göstermeyen genel ve ileri hareketlilik ölçütleri Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde genel hareketlilik yüzdesinin homozigot varyantlarda önemli derecede azaldığı belirlenmiştir ( $U_{\text{hareketlilik}}:12,5$ ,  $Z:-2,494$ ,  $p:0,013$  ; Ortalama sıra( $ww+wd$ ):11,86 Ortalama sıra ( $dd$ ):5,79) (Şekil 5.21).



**Şekil 5.21.** Astenospermilerde sperm hareketliliğinin resesif gruplandırmaya göre incelenmesi

Hasta grubu içinden sadece teratozoospermili hastalar seçildiğinde infertilite (Tablo 5.43), hamile kalım (Tablo 5.44) ve DNA fragmentasyonu (Tablo 5.45, 5.46) ile ilişkisi bulunamamıştır.

**Tablo 5.43.** Teratospermili hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genotipik ve çevresel etkiler ile infertilite ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Sigara	0,834	0,666	0,365 -1,907
Alkol	0,520	0,169	0,202-1,339
Dominant	0,821	0,736	0,260-2,591
Resesif	0,817	0,689	0,304 – 2,199
Aditif	0,858	0,647	0,446-1,652
Genotipik	Wd 0,874	0,827	0,261-2,924
	Dd 0,739	0,656	0,195-2,795

**Tablo 5.44.** Teratospermili hastalarda eş yaşı gözetildiğinde genetik etkiler ile hamile kalım ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Genotipik	Wd 2	0,661	0,090-44,350
	Dd 0,667	0,810	0,025-18,059
Dominant	1,333	0,849	0, 069 -25,912
Resesif	0,381	0,383	0,043 – 3,338
Aditif	0,643	0,588	0,130-3,176

**Tablo 5.45.** Teratospermi hastalarının genetik etkiler ile DNA fragmentasyonu ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Dominant	538491626	1	0,000-
Resesif	1615474861	0,999	0,000 –
Aditif	634698145,402676	0,999	0,000 -
Genotipik	Wd 1	1	0,000 -
	Dd 1615472020	1	0,000 -

Fragmentasyon ile ilişkili sonuçlar bu şekilde çıkmasının sebebi örneklerin dağılımından kaynaklanmaktadır (Tablo 5.46).

**Tablo 5.46.** Teratospermi hastalarının DNA fragmentasyonu ile genotip ilişkisi

		Sayı			Total
		genotip1			
		ww	wd	dd	
DFI	NF	1	2	1	4
	F	0	0	1	1
Total		1	2	2	5

F: Fragmentasyonlu; NF: fragmente olmayan)

Teratospermi grubunda bütün ölçütler genotipik gruplamaya göre normal dağılım göstermektedirler. Genotipler bu hasta grubunda hiçbir ölçüt açısından farklılık göstermemektedir. Bütün karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi p değeri 0,05'ten büyüktür. İleri hareketlilik dışında bütün ölçütler dominant gruplama içinde normal dağılım göstermektedir.

Dominant gruplama açısından ölçütler farklılık göstermemektedir. Bütün ölçütler için bağımsız örneklem t-testi p değeri 0,05' ten büyüktür. İleri hareketlilik de anlamlı bir farklılık göstermemektedir (U:20 Z:-1,410 p:0,159).

Resesif gruplandırma için bütün ölçütler normal dağılımdadır. Fakat bu gruplamaya göre de anlamlı bir farklılık yoktur, hiçbir karşılaştırma için p değeri 0,05'ten küçük değildir.

Sebebi açıklanamayan ve eş yaşı gözetilerek gruplanan infertil erkekler için yapılan analizlerde, sigara ve alkolün infertiliteye etkisi anlamlı bulunmuştur. Sigara içen erkeklerin 6,1 kat, alkol kullananların ise 3,9 kat infertilite riskleri olduğu saptanmıştır. Genetik modellere göre ise genotiplerin infertilite, hamile kalım ya da DNA fragmantasyonu için oluşturduğu bir risk bulunmamıştır (Tablo 5.47-5.49).

**Tablo 5.47.** Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipik ve çevresel etkiler ile kısırlık ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Sigara	6,117	0,000047	2,234 -16,029
Alkol	3,848	0,023	1,115-13,283
Dominant	1,360	0,632	0,384-4,815
Resesif	1,449	0,396	0,613 – 3,429
Aditif	1,314	0,400	0,696-2,482
Genotipik	Wd 1,176	0,812	0,310-4,464
	Dd 1,643	0,473	0,424-6,361

**Tablo 5.48.** Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genotipik etkiler ile hamile kalım ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Genotipik	Wd 1615474791,612774	0,999	0,000-
	Dd 969284874,967663	0,999	0,000-
Dominant	1292380053,193313	0,999	0,000-
Resesif	0,960	0,965	0,156 – 5,900
Aditif	1,631	0,476	0,426-6,249

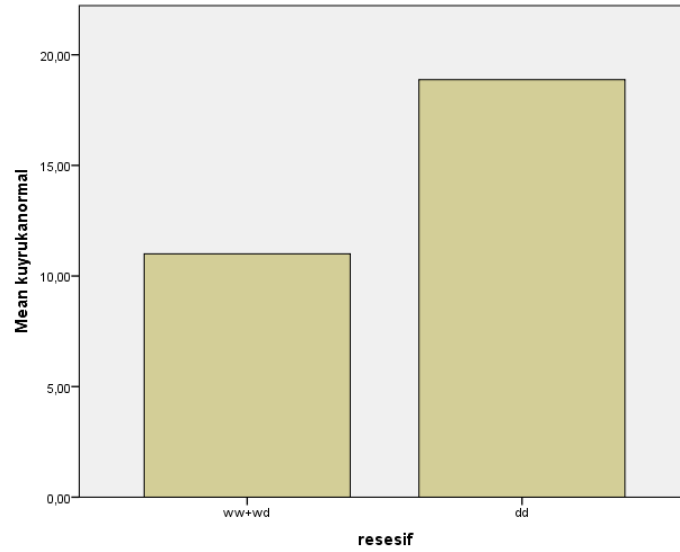
**Tablo 5.49.** Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda genetik etkiler ile DNA fragmentasyonu ilişkisi

Etki	OR	p	%95CI
Dominant	-	-	-
Resesif	0,667	0,810	0,025 – 18,059
Aditif	0,667	0,810	0,025 – 18,059
Genotipik	Wd 0,667	0,810	0,025 – 18,059
	Dd-	-	-

Sonuçların aynı çıkmasının sebebi; fragmentasyon değeri hesaplanan hiçbir örneğin homozigot varyant olmamasıdır.

Bütün ölçütler genotiplere göre normal dağılımda ve hiçbir ölçüt farklılık göstermemektedir (tek yönlü varyans analizi p değeri >0,05).

Hem dominant hem de resesif grupe göre hacim, normal morfolojili ve anormal baş morfolojili sperm yüzdesi dışında bütün ölçütler normal dağılımdadır. Hiçbir ölçüt dominant grupe göre farklılık göstermemektedir. Resesif grupe göre ise anormal morfolojili kuyruk yüzdesi anlamlı bir farklılık göstermektedir (Şekil 5.22). Bağımsız örneklem t-testi sonuçlarına göre homozigot varyant grupta anormal kuyruk morfolojisi %7,87 daha fazla görülmektedir (t(17):-2,1; p:0,05; Homozigot varyant anormal kuyruk yüzdesi : %18,87, Homozigot yabanıl ve heterozigot anormal kuyruk yüzdesi : %11).



**Şekil 5.22.** Sebebi bilinmeyen infertil hastalarda sperm hareketliliğinin resesif grupe göre incelenmesi



Sebebi bilinmeyen infertil hasta grubunda sigara ve alkol kullanan infertil bireyler analiz dışı bırakılarak sperm parametrelerinin dağılımı incelenmiştir. Kuyruk ve total hareket hariç bütün ölçütler normal dağılım göstermektedir. Bu grupta sperm parametreleri dağılımlarının incelenmesi Tablo 5.50 , Tablo 5.51’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.50.** Sebebi bilinmeyen ve sigara-alkol kullanmayan infertil hastalarda sperm parametrelerinin incelenmesi

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
konsantrasyon	Between Groups	133,467	2	66,733	,072	,931
	Within Groups	8374,533	9	930,504		
	Total	8508,000	11			
hacim	Between Groups	2,221	2	1,110	,605	,567
	Within Groups	16,508	9	1,834		
	Total	18,729	11			
sayı	Between Groups	11087,158	2	5543,579	,504	,620
	Within Groups	98962,008	9	10995,779		
	Total	110049,167	11			
ilerihareket	Between Groups	15,417	2	7,708	,128	,881
	Within Groups	540,833	9	60,093		
	Total	556,250	11			
NORMAL1	Between Groups	32,533	2	16,267	2,473	,165
	Within Groups	39,467	6	6,578		
	Total	72,000	8			
basanormal	Between Groups	32,533	2	16,267	2,473	,165
	Within Groups	39,467	6	6,578		
	Total	72,000	8			
boyunanormal	Between Groups	228,000	2	114,000	1,613	,275
	Within Groups	424,000	6	70,667		
	Total	652,000	8			

**Tablo 5.51.** Sebebi bilinmeyen ve sigara-alkol kullanmayan infertil hastalarda total hareket ve kuyruk anomalileri dağılımlarının incelenmesi

	Total hareket	Kuyruk anormal
Chi-Square	,630	3,869
df	2	2
Asymp. Sig.	,730	,145

Sebebi bilinmeyen infertil hastalar resesif gruplandırmaya göre gruplandığında total hareket hariç tüm ölçütler normal dağılım göstermektedir. İstatistik test sonuçları Tablo 5.52 , Tablo 5.53’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.52.** Sebebi bilinmeyen ve sigara-alkol kullanmayan infertil hasta grubunda resesif grüplamaya göre sperm parametrelerinin analizi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
konsantrasyon	Equal variances assumed	,135	,721	-,318	10	,757	-5,33333	16,75576	-42,66750	32,00083
	Equal variances not assumed			-,318	9,983	,757	-5,33333	16,75576	-42,67594	32,00927
hacim	Equal variances assumed	,461	,512	,995	10	,343	,75000	,75369	-,92934	2,42934
	Equal variances not assumed			,995	9,018	,346	,75000	,75369	-,95447	2,45447
sayı	Equal variances assumed	,931	,357	,791	10	,447	46,50000	58,75441	-84,41298	177,41298
	Equal variances not assumed			,791	8,561	,450	46,50000	58,75441	-87,45690	180,45690
İleri hareket	Equal variances assumed	1,624	,231	,194	10	,850	,83333	4,29793	-8,74306	10,40972
	Equal variances not assumed			,194	8,973	,851	,83333	4,29793	-8,89376	10,56042
NORMAL	Equal variances assumed	4,286	,077	1,883	7	,102	3,30000	1,75296	-,84508	7,44508
	Equal variances not assumed			1,688	3,404	,179	3,30000	1,95533	-2,52521	9,12521
Baş anormal	Equal variances assumed	4,286	,077	-1,883	7	,102	-3,30000	1,75296	-7,44508	,84508
	Equal variances not assumed			-1,688	3,404	,179	-3,30000	1,95533	-9,12521	2,52521
Kuyruk anormal	Equal variances assumed	,010	,922	-1,178	7	,277	-8,35000	7,09001	-25,11521	8,41521
	Equal variances not assumed			-1,212	6,996	,265	-8,35000	6,88882	-24,64133	7,94133
Boyun anormal	Equal variances assumed	11,72	,011	-1,634	7	,146	-9,00000	5,50844	-22,02538	4,02538
	Equal variances not assumed	1		-1,482	3,672	,219	-9,00000	6,07179	-26,46796	8,46796

**Tablo 5.53.** Sebebi bilinmeyen ve sigara-alkol kullanmayan infertil hasta grubunda resesif gruplamaya göre sperm total hareketi analizi

	<b>Hareket</b>
Mann-Whitney U	18,000
Wilcoxon W	39,000
Z	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 <sup>b</sup>

Çoğu ölçüt tek bir parametrelili değişken haline geldiği için dominant gruplama incelenmemiştir.

### **5.7. Sperm Hyaluronana Bağlanma Tetkiki (HBA)**

HBA skoru  $\geq$  % 80 ise normal olgunluktaki spermdir. Eğer  $<$  % 80 ise azalmış olgunluktaki spermdir (Tablo 5.54)

**Tablo 5.54.** Hyaluronan katmanına bağlanan sperm yüzdesi

	<b>Bağlanmış sperm</b>	<b>Bağlanmamış Sperm</b>	<b>% Bağlanma</b>
<b>del/del</b>	80	20	<b>80</b>
	78	26	<b>90</b>
	94	23	<b>80.3</b>
	112	34	<b>76.2</b>
	90	25	<b>78</b>

Bu çalışmada 5 del/del genotipine sahip infertil erkek değerlendirilebilmiş, bağlanma skorunun %80'in üzerinde ya da çok yakın olduğu görülmüştür. Örnek sayısı az olduğundan istatistiksel analiz yapılamamıştır.

## 6. TARTIŞMA

Defensinler doğal immün sistemle ilişkili efektör peptidlerdir. İnsan genomunda yaklaşık olarak 40 beta defensin geni vardır. Defensinlerdeki genetik değişimlerin erkek infertilitesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Başlangıçta beta defensinlerin doğal immün korumasıyla ilişkili olduğu düşünülüyordu, fakat yeni çalışmalar ile birlikte DEFB126'yı da içeren birkaç beta defensinin üreme fizyolojisinde de rol aldığı gösterilmiştir (Tollner ve diğ., 2008: 400-412).

DEFB126 özel yapısal özellikleri olan bir moleküldür, bu yapı sistence zengin konikal bir beta-defensin çekirdek motifi ve yüksek miktarda glikozillenmiş bir karboksil uç içerir. Kökensele olarak makaklarda bulunur ve adı epididimis-spesifik protein ESP13.2 dir. Glikozillenmiş bir polipeptit olan DEFB126, epididimis tarafından üretilir ve sperm yüzeyi tarafından absorblanır, bu protein immün korumadan ve spermin kadın üreme sistemindeki mukozal sıvılarda verimli biçimde hareket etmesinden sorumludur (Yudin ve diğ., 2005: 1243-1252).

DEFB126 yüksek oranda siyalize olmuş bir glikopeptiddir ve sperm epididimis boyunca ilerlerken adsorblanır, DEFB126 burada sperm glikokaliksini bir ana bileşeni haline gelir. Ve böylece servikal mukustaki sperm penetrasyonunu kolaylaştırır ve spermin yumurta kanalı epiteline bağlanmasına aracılık eder (Tollner ve diğ., 2008: 400-412).

DEFB126 geninin makaklarda bulunan biyolojik anahtar fonksiyonları sonucunda del mutant alelinin, Çin Japon, Avrupa ve Afrika (allel frekansı 0.44-0.61) popülasyon kohortlarında yaygın olduğu görülmüştür (Tablo 6.1). İki nükleotidlik delesyon ile oluşan çerçeve kaymasıyla meydana gelen genetik varyant, mRNA'da nonstop bir mutasyon oluşturur. Delesyon mutasyonu bakımından homozigot olan erkeklerin ürettiği spermdeki yüzey O-bağlı oligosakkaritlerde bir eksiklik oluşur ve bu durum *in vitro*'da HA jelde penetrasyon zorluğu oluşturur.

Semen kalitesinin ölçümleri bakımından (sperm yoğunluğu, hareketli sperm yüzdesi, ileri sperm hareketliliği ve sperm morfolojisi), WHO kriterlerine göre normal görünmektedirler. Populasyon bazlı prospektif kohort analizlerine göre del/del genotipi taşıyan erkekler, bu alleli wild-type taşıyan erkeklere göre daha az fertillerdir. Bu nedenle DEFB126 genotipi erkek infertilitesinin değerlendirmesinde kullanışlı bir parametre olabileceği öne sürülmüştür (Tollner ve diğ., 2011).

**Tablo 6.1.** DEFB126 delesyon varyantının farklı toplumlarda genotip frekansları

Populasyon	n	wt/wt	wt/del	del/del
<b>kohortu</b>				
Türk popülasyonu (Bu çalışmada)	210	0,16	0,51	0,33
Çin (Fertil Kohort)	638	0,29	0,51	0,19
Çin (HapMap)	45	0,33	0,49	0,18
Japon (HapMap)	45	0,22	0,56	0,22
Utah, Avrupa orjini (HapMap)	60	0,16	0,58	0,25
Yoruba, Nijerya (HapMap)	60	0,15	0,48	0,37
İngiliz	91	0,21	0,60	0,19

DEFB126 delesyon varyantının farklı toplumlarda genotip frekansları gösterilmiştir. Türk populasyonunda fertil kontrol için allel frekansları wt/wt: 0.16, wt/del:0.51, del/del: 0.33 olup infertil erkek için wt/wt: 0.16, wt/del: 0.45, del/del: 0.39'dur. Alel frekanslarının etnik farklılıklar göstermesi bu çalışmanın diğer popülasyonlarda da tekrarlanmasını gerektirmektedir.

Yapılan çalışmada, erkeklerin DEFB126 proteinini kodlayan gende yüksek yüzdede taşıdıkları bir fonksiyonel polimorfizmin infertiliteye katkısı ve gebe kalmadaki rolü araştırılmaktadır. Bu çalışma kapsamında 206 infertilite geçmişi sahip erkekte ve 210 sağlıklı bireyden alınan örneklerle DEFB126 genindeki delesyon polimorfizmi çalışılmıştır. Yapılan PCR-RFLP çalışmaları sonucunda her bir polimorfizmin alel frekansları elde edilmiştir. Bu alel frekanslarının Hardy-

Weinberg Dengesi'ne uygunluğu ölçülmüştür. Çiftlerin infertilitesinde kadından kaynaklanabilecek tubal faktör, düşük over rezervi gibi faktörler elenerek sadece erkek infertilitesi problemi olan örnekler çalışmaya dahil edilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken infertil erkeklerin eşlerinin yaşı gözetilerek (eş yaşı < 37 yaş dahil edilerek) iki farklı istatistiksel analiz yapılmıştır. Hasta ve kontrol grupları HW dengesinde bulunmuştur.

Eş yaşı gözetilmeksizin tüm hastalar dahil edilip erkek infertilitesinde genotipik etkilere bakıldığında dominant model analizi sonucuna göre erkek infertilitesi ile polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p=0,016295$ ) ve delesyon alelinin koruyucu etkisinden ( $OR=0,619$ ) bahsedilebilir. Genotipik modelde de heterozigot genotip erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiş ( $p=0,005$ ) ve yine heterozigotluğun koruyuculuğu ( $OR=0,548$ ) saptanmıştır (Tablo 5.6). Bu durum del allelinin başka bir fonksiyonunun heterozigotlarda seçici avantaj oluşturduğunu gösteriyor olabilir. Örneğin diğer epididimal proteinlerin sperm yüzeyi ile etkileşim yollarını değiştiriyor olabilir. Bir başka alternatif ise del allelinden, sperme bağlı kalmayan fakat verimliliğe katkı sağlayan bir varyant gen ürünü sentezleniyor olabileceğidir (Tollner ve diğ., 2011).

Tüm hastalar dahil edilip sperm hareketliliğine bakıldığında homozigot yabancı ve homozigot mutant genotipe sahip kişiler arasında sperm hareketliliği önemli ölçüde farklılık göstermektedir (ortalama fark: 7,321;  $p=0,005$ ; %95CI=1,87-12,77); homozigot yabancı genotipe sahip kişilerde sperm hareketliliği ortalama %7,321 daha fazla bulunmuştur (Ortalama hareketlilik<sub>ww</sub>:%50,98 ve Ortalama hareketlilik<sub>dd</sub>:%43,66). Eş yaşı <37 olan infertil erkek grubunda ise ilişki bulunamamıştır. Sperm ileri hareketliliğine bakıldığında tüm hasta grubunda infertil bireylerin homozigot yabancı ve homozigot mutant genotipe sahip kişiler arasında sperm ileri hareketliliği önemli ölçüde farklılık gösterdiği görülmektedir (ortalama fark: 6,429,  $p:0,002$  %95CI 1,97-10,89). Homozigot yabancı genotipe sahip kişilerde sperm ileri hareketliliği ortalama % 6,429 daha fazladır (Ortalama ileri hareketlilik<sub>ww</sub>:%34,45, Ortalama hareketlilik<sub>dd</sub>:%28,02). Eş yaşı <37 olan infertil erkek grubunda ise ilişki bulunamamıştır. Sonuç olarak eş yaşı kriterini gözetmeksizin yapılan analizde homozigot varyant bireylerin sperm hareketliliği ve sperm ileri hareketliliğinde belirgin bir düşüş görülmektedir. Bu da DEFB126 protein

kılıfının servikal mukustaki sperm penetrasyonunda etkisi olduğuna dair bulguları destekler (Tollner ve diğ., 2008: 400-412). Kadın yaşı gözetmesizin DNA fragmentasyonuna bakıldığında akridin turuncusu ile boyanma oranları açısından da farklılık olduğu belirlenmiştir ( $U_{\text{boyanma}}:84,5$  Z:-2,06, p:0,039). Homozigot varyant ile homozigot yabancı ve heterozigot olan bireyler karşılaştırıldığında akridin turuncusu boyanması arasında büyük fark vardır, bu da delesyon polimorfizminin DNA fragmentasyonu ile ilişkisine işaret eder. Sigara ve alkol kullanan bireyler analiz dışı bırakılarak sadece genetik etkilerin erkek infertilitesi ile ilişkisi de araştırılmıştır. Ancak aditif, kodominant, dominant ve resesif model analizi sonuçlarına göre anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Oligospermi grubunda eş yaşı  $> 37$  olan infertil erkek bireylerde homozigot varyanta göre sperm sayısı, hareket, ileri hareket ve sperm konsantrasyonu farklılık göstermektedir. Oligospermi sperm sayısı azlığında meydana gelen bir durumdur. Kadın yaşı  $> 37$  olan infertil erkeklerde hareket ve ileri harekette dominant grupta belirgin düşüş görülmektedir.

Astenospermi grubunda eş yaşı  $< 37$  infertil bireylerde hareketlilik yüzdesi genotip grupları arasında farklılık göstermektedir (Hareketlilik; H(2):6,284 p:0,043). Homozigot varyant genotipe sahip astenospermili bireylerde sperm hareketliliği heterozigot bireylere nazaran önemli ölçüde azalmıştır (ortalama fark: %5,8 p:0,041).

Sebebi bilinmeyen infertilite grubunda, infertil erkek normal sperm parametrelerine sahiptir, fakat fertilizasyon gerçekleşmemektedir. Bu yüzden bu grupta genetik faktörler ile birlikte çevresel faktörler de değerlendirilmiş ve ayrıca eş yaşı  $< 37$  olanlar ele alınmış, dolayısıyla kadın faktör olabileceğini düşünülen durumların hiçbiri dahil edilmemiştir. İlk olarak sigara ve infertilite için bir değerlendirme yapılmış ve aralarında çok kuvvetli ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur (P=0,000047; OR= 6,117). Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre sigara içenler, içmeyenlere kıyasla 6 kat daha fazla infertilite riski taşımaktadır. Sigaranın da infertilite ile ilişkisi pek çok çalışmada doğrulanmış ve infertilite için bir risk faktörü olduğu kabul görmüştür. İnfertilite oluşumu için araştırılan diğer bir çevresel faktör ise alkoldür. Alkol ve infertilite arasında da önemli bir ilişki bulunmuştur (P=0,023; OR=3,848). Yapılan istatistiksel analize göre alkol kullananlar 4 kat daha fazla infertilite riski taşımaktadır.

Sebebi bilinmeyen infertilite grubunda anormal morfolojili sperm kuyruğuna sahip olanlarda anlamlı bir farklılık görölmektedir. Bağımsız örneklem t-testi sonuçlarına göre homozigot varyant grupta anormal kuyruk morfolojisi %7,87 daha fazladır. Homozigot varyant anormal kuyruk yüzdesi : %18,87 iken, homozigot yabani ve heterozigot anormal kuyruk yüzdesi %11 bulunmuştur. Sebebi bilinmeyen infertil hasta grubunda sigara ve alkol kullanan infertil bireyler analiz dışı bırakılarak sperm parametrelerinin dağılımını incelenmiştir. Kuyruk ve total hareket hariç bütün ölçütler normal dağılım göstermektedir. Resesif gruplandırmaya göre sperm parametreleri analiz edildiğinde total hareket hariç bütün ölçütlerin normal dağılımda olduğu görölmüştür.

DEFB126'ya biyolojik açıdan bakmak insan üreme sistemini daha iyi anlamamıza katkı sağlar, hem de erkek infertilitesi için tedavi ve teşhis alanlarında ilerlemeye katkı sağlayabileceği düşünölmektedir. İnfertil erkeklerin DEFB126 delesyon polimorfizmi bakımından genetik analiz, fertilite müdahalelerine karar verme konusunda yardımcı olabilir. Genotip analizinin yapılmasıyla, klinisyenler IUI ve IVF gibi doğrudan müdahaleler konusunda daha seçici olabilirler, böylece çiftler uzun süren tetkiklerden, para ve zaman kaybından kurtulmuş olurlar. DEFB126 delesyon polimorfizminin erkek infertilitesine katkılarının netleşmesi için farklı etnik gruplarda genotip ve alel frekanslarının geniş hasta gruplarında ve tüm sperm parametreleri ve çevresel faktörlerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

### 7.1. Kitaplar

Abraham L, Kierszenbaum Histology and Cell Biology, 2th edition, Mosby, 2002; 529-550.

Agarwal A, Said TM. Sperm Chromatin Assessment. In: Textbook of Assisted Reproductive Techniques, 2nd edition, Editors: DK Gardner, A Weissman, CM Howles, Z Shoham, Martin Dunitz, London, UK, Chapter 7, 2004, pp. 99-100.

Anafarta K., Göğüş O., Bedük Y., Arıkan N. Temel Üroloji. Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara 1998.

Aydos K. Erkek infertilitesi. İç: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N editörler. Temel Üroloji 3. baskı; Güneş Tıp Kitabevleri; 2007; 967-1012.

Aydos K. Erkeğin üremeye yardımcı teknikler için hazırlanması. Türkiye Klinikleri Üroloji Özel Erkek İnfertilitesi Özel Sayısı 2008; 57-66.

Aydos K. Subfertil erkeğin değerlendirilmesi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; 2004; 74-172.

Çulha M. Erkek infertilitesinde tanı. TUYK Ders Notları Kitabı Ankara: Ünal Ofset; 2007; 292-296

Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler (sperm/oosit) fertilizasyon ve embriyoner Emir L. Erkek infertilitesinde tanı yöntemleri. TUYK Ders Notları Kitabı 2008; 291-298.

Ford WC. World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. 2010; 56-63.

Işık AZ, Vicdan K. İn Vitro Fertilizasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Çağdaş Medikal, Ankara, 1999.

Kayıgil Ö. Erkek infertilitesinde tanı yöntemleri. TUYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Kongre Basımevi; 2006; 253-261

Ross HM, Kaye G, Pawlina W, Histology, a text and atlas, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Philedelphia, 2003; 689-696

Temizkan G., Yilmazer S., Öztürk M., Arı Ş., Ertan H., Sarıkaya A., Arda N. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri (2004)

Tıraş MB, Aybar F. *İnvitro* Fertilizasyon (ivf)-intrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (icsi) Endikasyonları. *Türkiye Klinikleri, J Surg Med Sci* 2006, 2(5):37-41

Turek P, Erkek infertilitesi. *Smith Genel Üroloji*. Nobel Tıp Kitabevleri: 2004.s.678-712

Moshcr WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Ferti Steril*. 1991; 56: 192-193.

## 7.2. Makaleler

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D ve ark., Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-1046.

American Fertility Society. *Investigations of the infertile couple*. Birmingham, American Society for Reproductive Medicine 1992.

Aşçı R. İnfertil çiftte erkeğin sorgulanması. *Türkiye Klinikleri Üroloji Özel Erkek İnfertilitesi Özel Sayısı*. 2008, 1(1):1-6.

Avila F. W., Sirot L. K., LaFlamme B. A., Rubinstein C. D., Wolfner M. F. Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annu. Rev. Entomol.* 2011; 56, 21–40.

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P ve ark. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett*. 1995; 368: 331-5.

Bevins CL., Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochem .Soc. Trans.* 2006; (34) 263-66

Chen Z, Toth T, Godfrey-Bailey L, Mercedat N ve ark., Seasonal variation and age-related changes in human semen parameters. *J Androl.*, 2003; 24

Chen Z, Toth T, Godfrey-Bailey L, Schiff I ve ark., Impact of seasonal variation, age and smoking status on human semen parameters: The Massachusetts General Hospital experience. *J. Exp. Clin. Assist Reprod.*, 2004; 1:2

Com E. *et al.* Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol. Reprod.* 2003; 68, 95–104

Dacheux J. L., Gatti J. L., Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.* 2003; 61, 7–17

De Smet K, Contreras R., Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 1337-47

Diamond G., Bevins CL., Beta-defensins: Endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998 (88): 221-5

Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M ve ark. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 3952-6.

Diekmann A. B. Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cell. Mol. Life. Sci.* 2003; 60, 298–308

Dommett R, Zilbauer M, George JT, Bajaj-Elliott M. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Mol Immunol* 2005; 42: 903-12.

Eckmann L., Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol*; 2005; (21)147-151.

Eskenazi B., Wyrobek AJ., Slotter E., Kidd SA. ve ark., *Hum Reprod.*, 2003; 18(2): 447-454.

Fellermann K, Stange EF. Defensins- innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 771-6.

Froy O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol* 2005; 7: 1387-97.

Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O ve ark., Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertil Steril*, 1988; 50: 795-800.

Gatti J. L. *et al.* Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim. Reprod. Sci* 2004; 83, 321–339.

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol.* 2004; 327, 539–549.

Gazvani MR, Wilson EDA, Richmond DH, Howard PJ, Kingsland CR, Lewis- Jones DI. Role of mitotic control in spermatogenesis. *Fertil Steril.* 2000: 251-256.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-13.

Hollox E. J., Armour J. A., Directional and balancing selection in human b-defensins. *BMC Evol. Biol.* 2008; 8, 113.

Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L: Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003, 79(Suppl 3):1616-1624.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL ve ark., Integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33-44.

Jaiswal B. S., Eisenbach M. in *Fertilization* (ed. Hardy, D. M.) (Academic Press, San Diego) 2002; 57–117.

Jelinsky S. A. *et al.* The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biol. Reprod.* 2007; 76, 561–570.

Kovacs P, Kovats T, Sajgo A, Matyas S, Kaali S. G: The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* (2011) 28:49–54.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lambard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphology features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986; 46: 118-123.

Kruger TF, Coetzee K, Lombard C, Shaughnessy D, Oehninger S, Ozgür K, Pomeroy K, Muller CH, Muller C; Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertility and sterility* 1999;71(1):80-4.

Lehrer R. I., Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2, 727–738.

Maxam AM, Gilbert W: A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977 Feb; 74(2): 560-4.

Muller, CA., Autenrieth, IB., Peschel, A., Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2005; (62) 1297-307.

Osser S, Beckman-Ramirez A, Liedholm P, Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Swedish population. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 1992; 71(3):215-8.

Özgür K, Isikoglu M, Seleker M, Dönmez L, Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Turkish population. *Arch Gynecol Obstet*, 2005; 271(2):109-112.

Oppenheim, JJ., Biragyn, A., Kwak, LW., Yang, D., Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis.*: 2003; (62) 17-21.

Orhon E. Sperm Morfoloji Atlası. Türkiye infertilite vakfı yayınları 1995;17-29.

Parenti L. R., LoNostro F. L. & Grier H. J. Reproductive histology of *Tomeurus gracilis* Eigenmann, 1909 (Teleostei: Atherinomorpha: Poeciliidae) with comments on evolution of viviparity in atherinomorph fishes. *J. Morphol.* 2010; 271, 1399–1406.

- Patil A. A., Cai Y., Sang Y., Blecha F., Zhang G. Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. *Physiol. Genomics* 2005; 23, 5–17.
- Perry, A. C., Jones, R., Moisyadi, S., Coadwell, J. & Hall, L. The novel epididymal secretory protein ESP13.2 in *Macaca fascicularis*. *Biol. Reprod.* 1999; 61, 965–972.
- Petersen et al.: Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010 8:149.
- Prinosilova P, Kruger T, Sati L, Ozkavukcu S, Vigue L, Kovanci E, Huszar G: Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology. *Reprod Biomed Online* 2009, 18:177-183.
- Rodriguez-Jimenez F. J. *et al.* Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics* 2003; 81, 175–183.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A.R: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology*, 1977: Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467
- Sant'Anna B. S., Pinheiro M. A. A., Mataqueiro M. & Zara F. J. Spermathecae of the mangrove crab *Ucides cordatus*: a histological and histochemical view. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 2007; 87, 903–911.
- Schneider JJ., Unholzer A., Schaller M., Schafer-Korting M. *ve ark.* Human defensins. *J Mol Med*; 2005; (83): 587-595.
- Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 1995; 267: 1645-8.
- Schroter, S., Osterhoff, C., McArdle, W. & Ivell, R. The glycocalyx of the sperm surface. *Hum. Reprod. Update* 1999; 5, 302–313.
- Schutte B. C. *et al.* Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99, 2129–2133.
- Selsted M. E., Ouellette A. J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 2005; 6, 551–557.
- Sever D. M., Tait C. K., Diller L. V., Burkholder L. Ultrastructure of the annual cycle of female sperm storage in spermathecae of the torrent Salamander, *Rhyacotriton variegatus* (Amphibia: Rhyacotritonidae). *J. Morphol.* 2004; 261, 1–17
- Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M *ve ark.*, *Hum Reprod.* 2006; 21(12):3199-3205.

Suarez S. S. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod. Domest. Anim.* 2002; 37, 140–143

Templeton AA, Penney GC. The incidence, characteristics, and prognosis of patients whose infertility is unexplained. *Fertil Steril* 1982; 37:175-82.

Tollner A. I. *et al.* Beta-defensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia. *Biol. Reprod.* 2008; 78, 400–412.

Tollner, T. L. *et al.* A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Sci. Transl. Med.* 2011.

Tollner T. L., Venners S. A., Hollox E. J., Yudin A. I., Liu X., Tang G., Xing H., Kays R. J., Lau T., Overstreet J. W., Xu X., Bevins C. L., Cherr G. N., A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Sci. Transl. Med.* 2011.

Tollner T. L., Yudin A. I., Tarantal A. F., Treece C. A., Overstreet J. W., Cherr G. N., b-Defensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia. *Biol. Reprod.* 2008; 78, 400–412.

Tollner T. L., Yudin A. I., Treece C.A., Overstreet J.W., Cherr G. N., Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Hum. Reprod.* 2008; 23, 2523–2534.

Tollner T. L., Yudin A. I., Treece C. A., Overstreet J. O., Cherr G. N. Macaque sperm release ESP13.2 and PSP94 during capacitation: The absence of ESP13.2 is linked to sperm-zona recognition and binding. *Mol. Reprod. Dev.* 2004; 69, 325–337.

Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod.*, 2002; 17(6): 1554-1559.

Yoshio H, Lagercrantz H, Gudmundsson GH, Agerberth B. First line of defense in early human life. *Semin Perinatol* 2004; 28: 304-11.

Yudin, A. *et al.* Beta-defensin 22 is a major component of the mouse sperm glyocalyx. *Reproduction* 2008; 136, 753–765.

Yudin A. I., Generao S. E., Tollner T. L., Treece C. A., Overstreet J. W., Cherr G. N., b-Defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. *Biol. Reprod.* 2005; 73, 1243–1252.

Yudin A. I. *et al.* ESP13.2, a member of the beta-defensin family, is a macaque sperm surface-coating protein involved in the capacitation process. *Biol. Reprod.* 2003; 69, 1118–1128.

Yudin A. I., Treece C. A., Tollner T. L., Overstreet J. W. & Cherr G. N. The carbohydrate structure of DEFB126, the major component of the cynomolgus Macaque sperm plasma membrane glyocalyx. *J. Membr. Biol.* 2005; 207, 119–129.

Ward W.S. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa: minireview. *Biol. Reprod.* 1993; 48:1193-1201.

Wolfner M. F. Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 1997; 27, 179–192.

Zanich A., Pascall J. C., Jones R. Secreted epididymal glycoprotein 2D6 that binds to the sperm's plasma membrane is a member of the beta-defensin superfamily of pore-forming glycopeptides. *Biol. Reprod.* 2003; 69, 1831–1842.

### **7.3. Internet**

National Center for Biotechnology Information. Haziran, 2013

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

## 8.EKLER

### 8.1. EK 1: Etik Kurul Raporu



T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 83045809/ 5565  
Konu:

İstanbul ..... / ..... / .....

Haliç Üniversitesi Fen -Edebiyat Fakültesi  
Dekanlığına

07 Mart 2013

İLGİ: 14.02.2013 tarihli, 123 sayılı yazınıza:

Fakültemiz Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Yard.Doç.Dr.Nagehan Ersoy TUNALI'nın sorumluluğunda Dr.Faruk BENER, Gülçin GÜLEBENZER ve Hümeysra SUBAŞIOĞLU'nun yardımcı araştırmacılarında "SEPTIN12, CRISP2, DEFB126 Genlerinin Erkek Infertilitesindeki Rolünün İncelenmesi" başlıklı akademik amaçlı araştırma projesi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 05 Mart 2013 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir. Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini arz ederim.

Eki:  
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı



## 9. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Balıkesir'in Gönen ilçesinde doğan Hümevra SUBAŞIOĞLU, ilk, orta ve lise eğitimini Gönen'de tamamladı.

Yüksek öğrenimini Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yaptı ve 2011 yılında mezun oldu.

Yüksek lisans eğitimine Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde devam etti.