

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

**SEPTIN12 c.474 G>A POLİMORFİZMİNİN ERKEK
İNFERTİLİTESİNDEKİ ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Gülçin ÖZKARA**

**Danışman
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 **Gülçin ÖZKARA** tarafından hazırlanan “SEPTIN12 c.474G>A Polimorfizminin Erkek İnfertilitesindeki Rolü” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 18.09.2013

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

İmzası :

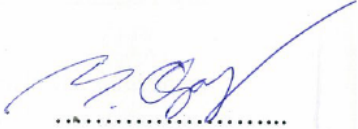
Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Nagehan E.TUNALI
Danışman-HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....


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

Tez çalışmalarım esnasında her türlü yardımı esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya,

Örnek toplamamda gerekli kontağın sağlanmasına yardımcı olan ve her zaman güler yüzü ve pozitif enerjisiyle beni motive eden Sayın Op. Dr. Emre Karatekelioğlu'na,

Hasta örneklerinin toplanma sürecinde bana her türlü imkan ve olanağı sağlayan Sayın Op. Dr. Aret Kamar ve Sayın Dr. Faruk Bener başta olmak üzere gösterdikleri hoşgörü için tüm İstanbul Tüp Bebek Merkezi çalışanlarına,

Her türlü yardım ve desteği için Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem Kurnaz'a,

Destek ve anlayışları için Ozan Tiryakioğlu başta olmak üzere Haliç Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndaki asistan arkadaşlarım Anıl Cebeci ve Deniz Kanca'ya,

Yüksek Lisans eğitimim süresince anlayış ve sabrını benden esirgemeyen İVI Tüp Bebek Merkezi Tüp Bebek Laboratuvarı direktörü Sayın Dr. Tuğçe Pehlivan Budak'a ve sevgili embriyolog arkadaşım Esra Soydan'a,

Tez çalışmalarım süresince gösterdikleri anlayış için Sayın İbrahim Selçuk başta olmak üzere iş arkadaşlarım Dilek Alpsar ve Fırat Çaralan'a,

Kontrol örneklerini toplamamda ve deneylerimde verdiği destek ve yardımları için yüksek lisans arkadaşım Hümeysra Subaşıoğlu'na,

Maddi ve manevi olarak beni her zaman destekleyen, her konuda en büyük yardımcım, hayattaki en büyük şansım, değerli eşim Özkan Özkara'ya ve beni yetiştiren aileme teşekkür ederim.

İstanbul, 2013

Gülçin ÖZKARA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KISALTMALAR	III
ŞEKİLLER	V
TABLolar	VII
ÖZET	XI
ABSTRACT	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Erkek Üreme Sistemi	1
1.1.1. Testis	2
1.1.2. Genital Yollar	4
1.1.2.1. Epididim.....	4
1.1.2.2. Vaz Deferens (Ductus Deferens)	4
1.1.2.3. Ejekulatuar Kanallar.....	4
1.1.3. Genital Bezler.....	4
1.1.3.1. Seminal Vezikül	4
1.1.3.2. Prostat.....	5
1.1.3.3. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri)	5
1.2. Seksüel Farklılaşma, Fetal Testis	5
1.3. Spermatogenez	6
1.4. Spermijogenez	7
1.5. Epididimde Sperm Matürasyonu	9
1.6. Matür Spermin Yapısı	9
1.7. Erkek İnfertilitesi	13
1.7.1. Septinler ve Erkek İnfertilitesi	15
1.7.2. Memelilerde Septinler	16
1.8. Septin2 ve Erkek İnfertilitesi	17
1.8.1. c.474 G>A Polimorfizmi ve Erkek İnfertilitesi.....	19
2. AMAÇ	21
3. GEREÇLER	22
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler	22
3.1.1. DNA İzolasyonu.....	22
3.1.2. Sperm Morfoloji Boyama	22
3.1.3. Sperm DNA Fragmentasyonu Belirlenmesi	22
3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	23
3.1.4.1. Oligonükleotid Primerler	23
3.1.5. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi	23
3.1.6. Agaroz Jel Elektroforezi	23
3.1.6.1. DNA Büyüklük Markörleri	23

3.1.7. PCR Pürifikasyonu.....	23
3.1.8. DNA Dizi Analizi	23
3.1.9. DNA Ölçümleri.....	24
3.2. Kullanılan Cihazlar	24
4. YÖNTEMLER	25
4.1. Seçilecek Örneklerin Tanımı.....	25
4.2. Sperm Örneklerinin Toplanması ve Değerlendirilmesi	26
4.3. Sperm DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi.....	27
4.4. Yanak İçi Epitel Hücrelerinden DNA İzolasyonu	28
4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
4.6. Agaroz Jel Elektroforezi	29
4.7. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi	30
4.8. PCR Pürifikasyonu.....	30
4.9. DNA Ölçümleri.....	30
4.10. DNA Dizi Analizi	31
4.11. İstatistiksel Değerlendirme.....	32
5. SONUÇLAR	34
5.1. DNA İzolasyonu.....	34
5.2. PCR	34
5.3. RFLP	34
5.4. Dizi Analizi	35
5.5. Spermde Morfoloji Değerlendirme	36
5.6. Spermde DNA Fragmentasyonunun Değerlendirilmesi	38
5.7. İstatistiksel Bulgular.....	39
5.7.1. Hasta ve Kontrol Gruplarında Genotip Dağılımları.....	39
5.7.2. Çevresel Faktörlerin Erkek İnfertilitesine Etkisi.....	41
5.7.3. Genotip ile Sperm Konsantrasyonu İlişkisi.....	43
5.7.4. Genotip ile Ejakulat Hacmi İlişkisi	47
5.7.5. Genotip ile Total Sperm Sayısı İlişkisi	50
5.7.6. Genotip ile Sperm Hareketliliği İlişkisi	53
5.7.7. Genotip ile Sperm Morfolojisi İlişkisi	59
5.7.8. Genotip ile DNA Fragmentasyonu İlişkisi.....	74
5.7.9. Genotip ile Gebelik Sonuçları İlişkisi	74
5.7.10. Sigara İçmeyen Bireylerde Genotipin Erkek İnfertilitesine Etkisi	75
6. TARTIŞMA	85
7. KAYNAKLAR	91
8. EKLER.....	99
8.1. EK1: Etik Kurul Raporu.....	99
9. ÖZGEÇMİŞ.....	100

KISALTMALAR

(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ABP	: Androjen bağlayıcı protein
AMH	: Antimüllerian hormon
AO	: Akridin turuncusu
bç	: Baz çifti
BPB	: Bromofenol mavisi
CENP-E	: Sentromer protein E
CEU	: Avrupa popülasyonu
CI	: Güven aralığı
CO₂	: Karbondioksit
DFI	: DNA fragmentasyon indeksi
dNTP	: Deoksi nükleotid trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EST	: İfade edilmiş dizi etiketleri
EtBr	: Etidyum Bromid
FGF-9	: Fibroblast büyüme faktörü-9
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
g	: Gram
HCB	: Han Çinli popülasyonu
Hm	: Homozigot
Ht	: Heterozigot
HW	: Hardy-Weinberg
HWP	: Hardy-Weinberg p değeri
JPT	: Japon popülasyonu
L	: Litre
M	: Molar
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MIF	: Müller kanalı inhibi edici faktör

MIS	: Müllerian inhibe edici madde
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Na₂HPO₄	: Dibazik sodyum fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOAc	: Sodyum asetat
O.R.	: Göreceli risk oranı
PB	: Polibazik kısım
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGH	: Primordial germ hücreleri
PSA	: Prostat spesifik antijen
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
S.D.	: Standart sapma
S.E.	: Standart hata
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SEPT	: Septin
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SUE	: Septin zgn element
TBE	: Tris-borik asit-Edta
TBF (SRY)	: Testis belirleyici faktör
TE	: Tris-Edta
TEXT14	: Testiste ifade edilen gen 14
TP	: Transisyon proteinleri
U	: nite
V	: Volt
WHO	: Dünya Sağlık rgt
YRI	: Yoruba popülasyonu

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. Erkek üreme sistemi	1
Şekil 1.2. Testis ve seminiferöz tübüllerin yapısı	2
Şekil 1.3. Seminiferöz tübül epitelini	3
Şekil 1.4. Farede primordial germ hücrelerinin göçü	6
Şekil 1.5. Spermatogenez.....	7
Şekil 1.6. Matür spermin yapısı	10
Şekil 1.7. Spermde baş ve flagellanın yapısı	11
Şekil 1.8. Flagellada mikrotübüllerin yapısı	12
Şekil 1.9. Septin12 geni ve ürünleri.....	18
Şekil 1.10. c.474 G>A polimorfizminin popülasyonlardaki dağılımı	20
Şekil 5.1. DNA izolasyonu sonrasında örneklerin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	34
Şekil 5.2. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	34
Şekil 5.3. Apal1 ile kesim sonrası %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	35
Şekil 5.4. Homozigot GG örneğinin dizi analizinde elektroferogram görüntüsü.....	35
Şekil 5.5. Homozigot AA örneğinin dizi analizinde elektroferogram görüntüsü.....	36
Şekil 5.6. Heterozigot GA örneğinin dizi analizinde elektroferogram görüntüsü.....	36
Şekil 5.7. Normal sperm görüntüsü	36
Şekil 5.8. Spermde çeşitli akrozom anomalileri.	37
Şekil 5.9. Spermde çeşitli baş anomalileri	37
Şekil 5.10. Spermde çeşitli boyun anomalileri	38
Şekil 5.11. Spermde çeşitli kuyruk anomalileri	38
Şekil 5.12. DNA fragmentasyonunun AO boyama ile değerlendirilmesi	39
Şekil 5.13. Tüm infertil ve kontrol gruplarında alkol kullanımı.....	42
Şekil 5.14. Tüm infertil ve kontrol gruplarında sigara kullanımı	43
Şekil 5.15. Tüm infertil sperm konsantrasyonu ortalamalarının genotiplere göre dağılımı.....	45
Şekil 5.16. Tüm infertil ejakulat hacmi ortalamalarının genotiplere göre dağılımı.....	52

Şekil 5.17. Tüm infertillerde total sperm sayısı ortalamalarının genotiplere göre dağılımı.....	53
Şekil 5.18. Tüm infertillerde ileri hareketli sperm (%) ortalamalarının genotiplere göre dağılımı	57
Şekil 5.19. Tüm infertillerde normal normolojiye sahip sperm (%) ortalamalarının genotiplere göre dağılımı	60
Şekil 5.20. Tüm infertillerde baş anomalileri (%) ortalamalarının genotiplere göre dağılımı.....	63
Şekil 5.21. Tüm infertillerde boyun anomalileri (%) ortalamalarının genotiplere göre dağılımı.....	67
Şekil 5.22. Tüm infertillerde kuyruk anomalileri (%) ortalamalarının genotiplere göre dağılımı.....	70

TABLULAR

	Sayfa No
Tablo 1.1. Erkeklerde infertilite etiyolojisi ve dağılımı	14
Tablo 4.1. WHO 2010 sperm değerlendirme kriterleri	26
Tablo 4.2. Sperm parametrelerine göre hasta grupları	27
Tablo 4.3. PCR protokolü.....	29
Tablo 4.4. PCR’da uygulanan termal profil	29
Tablo 4.5. Dizi analizi reaksiyonu.....	32
Tablo 4.6. Dizi analizi termal profili	32
Tablo 5.1. Tüm infertil ve kontrol gruplarında genotip ve allel frekansları.....	40
Tablo 5.2. Hasta gruplarında kodominant, aditif, dominant ve resesif modeller ile erkek infertilitesi analizi.....	41
Tablo 5.3. Alkol kullanımının erkek infertilitesine etkisi	42
Tablo 5.4. Sigara kullanımının erkek infertilitesine etkisi	43
Tablo 5.5. Tüm infertil, oligozoospermi, astenozoospermi gruplarında genotip ile sperm konsantrasyonu ilişkisi	44
Tablo 5.6. Teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında genotip ile sperm konsantrasyonu ilişkisi	44
Tablo 5.7. Hasta gruplarında dominant model ile sperm konsantrasyonu analizi.....	46
Tablo 5.8. Açıklanamayan infertilite olgularında A allelinin dominant etkisinin sperm konsantrasyonu ile ilişkisi	46
Tablo 5.9. Teratozoospermi grubunda dominant model ile sperm konsantrasyonu analizi	46
Tablo 5.10. Hasta gruplarında resesif model ile sperm konsantrasyonu analizi	47
Tablo 5.11. Hasta gruplarında genotip ile ejakulat hacmi ilişkisi	48
Tablo 5.12. Açıklanamayan infertilite olgularında genotip ile ejakulat hacmi ilişkisi	48
Tablo 5.13. Tüm infertil, oligozoospermi ve astenozoospermi gruplarında dominant model ile ejakulat hacmi analizi.....	49
Tablo 5.14. Teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite olgularında dominant model ile ejakulat hacmi analizi.....	49
Tablo 5.15. Hasta gruplarında resesif model ile ejakulat hacmi analizi.....	50

Tablo 5.16. Tüm infertil, oligozoospermi ve astenozoospermi gruplarında genotip ile total sperm sayısı ilişkisi	51
Tablo 5.17. Teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında genotip ile total sperm sayısı ilişkisi	51
Tablo 5.18. Tüm infertil, oligozoospermi, astenozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında dominant model ile total sperm sayısı analizi.....	52
Tablo 5.19. Teratozoospermi grubunda dominant model ile total sperm sayısı analizi	53
Tablo 5.20. Hasta gruplarında resesif model ile total sperm sayısı analizi	53
Tablo 5.21. Hasta gruplarında genotip ile total hareketli sperm sayısı ilişkisi.....	54
Tablo 5.22. Hasta gruplarında dominant model ile total hareketli sperm sayısı analizi	55
Tablo 5.23. Hasta gruplarında resesif model ile total hareketli sperm sayısı analizi	56
Tablo 5.24. Hasta gruplarında genotip ile ileri hareketli sperm sayısı ilişkisi	57
Tablo 5.25. Tüm infertillerde dominant model ile ileri hareketli sperm sayısı analizi	58
Tablo 5.26. Hasta gruplarında dominant model ile ileri hareketli sperm sayısı analizi	58
Tablo 5.27. Hasta gruplarında resesif model ile ileri hareketli sperm sayısı analizi.	59
Tablo 5.28. Açıklanamayan infertilite grubunda genotip ile normal morfoloji ilişkisi	59
Tablo 5.29. Hasta gruplarında genotip ile normal morfoloji ilişkisi	60
Tablo 5.30. Hasta gruplarında dominant model ile normal morfolojiye sahip sperm sayısı analizi.....	61
Tablo 5.31. Oligozoospermi grubunda dominant model ile normal morfolojiye sahip sperm sayısı analizi	61
Tablo 5.32. Hasta gruplarında resesif model ile normal morfolojiye sahip sperm sayısı analizi	62
Tablo 5.33. Hasta gruplarında genotip ile spermde baş anomalileri ilişkisi	63
Tablo 5.34. Hasta gruplarında dominant model ile spermde baş anomalileri analizi	64
Tablo 5.35. Hasta gruplarında dominant model ile spermde baş anomalileri analizi	64
Tablo 5.36. Oligozoospermi grubunda dominant model ile spermde baş anomalileri analizi	64
Tablo 5.37. Hasta gruplarında resesif model ile spermde baş anomalileri analizi	65

Tablo 5.38. Tüm infertil ve oligozoospermi gruplarında genotip ile spermde boyun anomalileri ilişkisi	66
Tablo 5.39. Astenozoospermi, teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında genotip ile spermde boyun anomalileri ilişkisi	66
Tablo 5.40. Teratozoospermi grubunda boyun anomalileri ortalamalarının genotiplere göre dağılımı.....	66
Tablo 5.41. Tüm infertil ve oligozoospermi gruplarında dominant model ile spermde boyun anomalileri analizi	67
Tablo 5.42. Astenozoospermi, teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında dominant model ile spermde boyun anomalileri analizi	68
Tablo 5.43. Teratozoospermi grubunda dominant modelde boyun anomalileri ortalamalarının genotiplere göre dağılımı	68
Tablo 5.44. Hasta gruplarında resesif model ile spermde boyun anomalileri analizi	69
Tablo 5.45. Hasta gruplarında genotip ile spermde kuyruk anomalileri ilişkisi	70
Tablo 5.46. Açıklanamayan infertilite grubunda genotip ile spermde kuyruk anomalileri ilişkisi	70
Tablo 5.47. Hasta gruplarında dominant model ile spermde kuyruk anomalileri analizi	71
Tablo 5.48. Açıklanamayan infertilite grubunda dominant model ile spermde kuyruk anomalileri analizi.....	71
Tablo 5.49. Hasta gruplarında resesif model ile spermde kuyruk anomalileri analizi.	72
Tablo 5.50. Tüm morfoloji anomalilerinin genotiplere göre dağılımı	73
Tablo 5.51. Tüm infertillerde kodominant, aditif, dominant ve resesif modeller ile DNA fragmentasyonu analizi.....	74
Tablo 5.52. Hasta gruplarında kodominant, aditif, dominant ve resesif modeller ile gebelik sonuçları analizi.....	75
Tablo 5.53. Sigara içmeyen hasta gruplarında genotipin erkek infertilitesine etkisi	76
Tablo 5.54. Hasta gruplarında sigara içmeyen bireylerde genotipin sperm parametreleri ile ilişkisi.....	77
Tablo 5.55. Teratozoospermi grubunda sigara içmeyen bireylerde genotipe göre boyun anomalilerinin dağılımı	77
Tablo 5.56. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde genotipe göre sperm konsantrasyonu ve total sperm sayısının dağılımı.....	78
Tablo 5.57. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde genotipin sperm parametreleri ile ilişkisi	78
Tablo 5.58. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde genotipe göre total hareketli ve ileri hareketli sperm sayısının dağılımı	79
Tablo 5.59. Sigara içmeyen infertil bireylerde dominant model ile sperm parametreleri analizleri.....	80

Tablo 5.60. Tüm infertil ve teratozoospermi gruplarında sigara içmeyen bireylerde dominant modele göre boyun anomalilerinin dağılımı	81
Tablo 5.61. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde dominant modele göre konsantrasyon, total sperm sayısı, total hareketli sperm sayısı dağılımı	81
Tablo 5.62. Sigara içmeyen infertil bireylerde dominant model ile normal morfoloji (%) ve baş anomalisi (%) analizi.....	82
Tablo 5.63. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde dominant modele göre ileri hareketli sperm sayısı dağılımı	82
Tablo 5.64. Hasta gruplarında sigara içmeyen infertil bireylerde resesif model ile sperm parametreleri analizi	83
Tablo 5.65. Tüm infertil, oligozoospermi, açıklanamayan infertilite gruplarında sigara içmeyen infertil bireylerde resesif model ile sperm parametreleri analizi	84

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Gülçin ÖZKARA
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

SEPTIN12 c.474 G>A Polimorfizminin Erkek İnfertilitesindeki Rolü

İnfertilite çiftlerin yaklaşık %8-10'unda gözlenen bir problem olup %50 oranında erkek infertilitesi olarak karşımıza çıkar. Erkek infertilitesi %15-30 genetik temellidir ve olguların önemli bölümünde etiyoloji aydınlatılamamaktadır. Sperm üretimi ve testiküler fonksiyon ile ilişkili genlerdeki bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin çevresel etmenlerle birlikte sperm sayısı ve hareketliliğinde azalmaya ve infertilite riski oluşturduğuna dair bulgular mevcuttur.

Bu tezde SEPTIN12 c.474 G>A polimorfizminin erkek infertilitesi ile ilişkisi 164 fertil ve 115 infertil Türk bireyde incelenmiştir. Hasta ve kontrol grupları genotipleri açısından kodominant, dominant ve resesif modeller karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Hasta grubu sperm parametreleri bozukluklarına göre gruplandırılarak her grupta genotiplerin sperm parametrelerine etkisi incelenmiştir. Teratozoospermi grubunda GG genotipli hastalarda GA genotipli olanlara göre anlamlı boyun anomalisi farkı bulunmuştur.

Hasta ve kontrol gruplarında sigara içmeyen bireyler ayrıca gruplanarak genotip frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Teratozoospermi grubunda boyun anomalileri ortalamaları, açıklanamayan infertilite grubunda sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, total hareketli ve ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından kodominant modelle istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Dominant model ile tüm infertil ve teratozoospermi gruplarında boyun anomalileri, açıklanamayan infertilite grubunda

konsantrasyon, total sperm sayısı, total hareketli sperm sayısı ve ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. A alleli varlığının açıklanamayan infertilite vakalarında hem sperm konsantrasyonunu hem de sperm hareketliliğini olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: erkek infertilitesi, SEPTIN12, c.474 G>A polimorfizmi, Türk popülasyonu

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Gülçin ÖZKARA
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

The Role of SEPTIN12 c.474 G>A Polymorphism in Male Infertility

Approximately 8-10% of the couples are affected by infertility and in 50% of the cases male infertility is involved. 15-30% of the male infertility cases have a genetic basis, however, etiology is not clear in most of them. Together with environmental factors, some single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes involved in sperm production and testicular function are found to be risk factors for infertility and cause lower sperm counts and decreased motility.

In this thesis, the association of SEPTIN12 c.474 G>A polymorphism with male infertility was investigated in 164 fertile and 115 infertile Turkish individuals. The genotypes of the patient and control groups are compared using codominant, additive, dominant and recessive models, however, no statistically significant difference was found. The patient group is classified according to sperm defects and the effects of the genotypes on sperm parameters are examined. In the teratozoospermia group, significant neck anomalies are detected in patients with GG genotype, compared to those with GA genotype.

Nonsmoking infertile and fertile subjects were further grouped and genotype frequencies are compared, however, no statistically significant difference is obtained. In the teratozoospermia group, means of the neck defects; in unexplained infertility group, means of sperm concentration, total sperm count, total motile and progressive motile sperm count are found statistically significant using the codominant model group. Using the dominant model, statistically significant results are found in all infertile and teratozoospermia groups in terms of neck defects; in unexplained

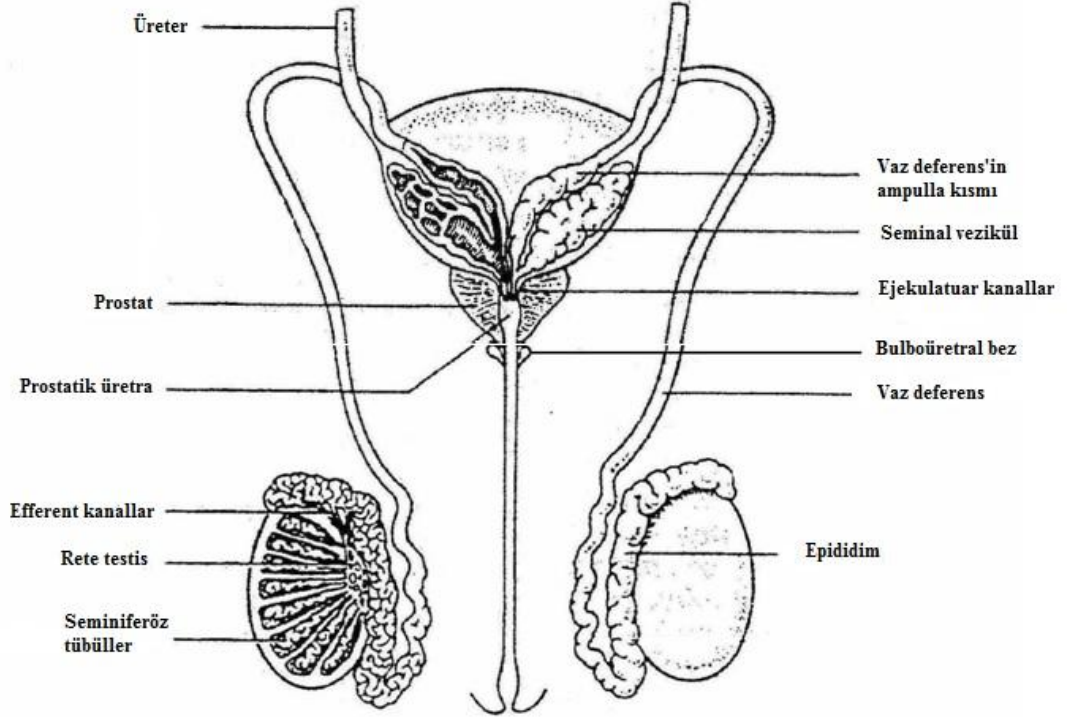
infertility group in terms of sperm concentration, total sperm count, total motile and progressive motile sperm count. The presence of the A allele in the unexplained infertility group is found to have a negative effect on sperm concentration and motility.

Keywords: male infertility, SEPTIN12, c.474 G>A polymorphism, Turkish population

1. GİRİŞ

1.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi üreme hücrelerini (gametleri, erkekte spermatozoon) oluşturan üreme organı testis (gonad) ve bu hücreleri kadın üreme sistemine ileten iletilici yollar ve eklenti bezlerinden oluşur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Erkek Üreme Sistemi (Balkan: 2006, Şekil 1'den değiştirilerek hazırlanmıştır.)

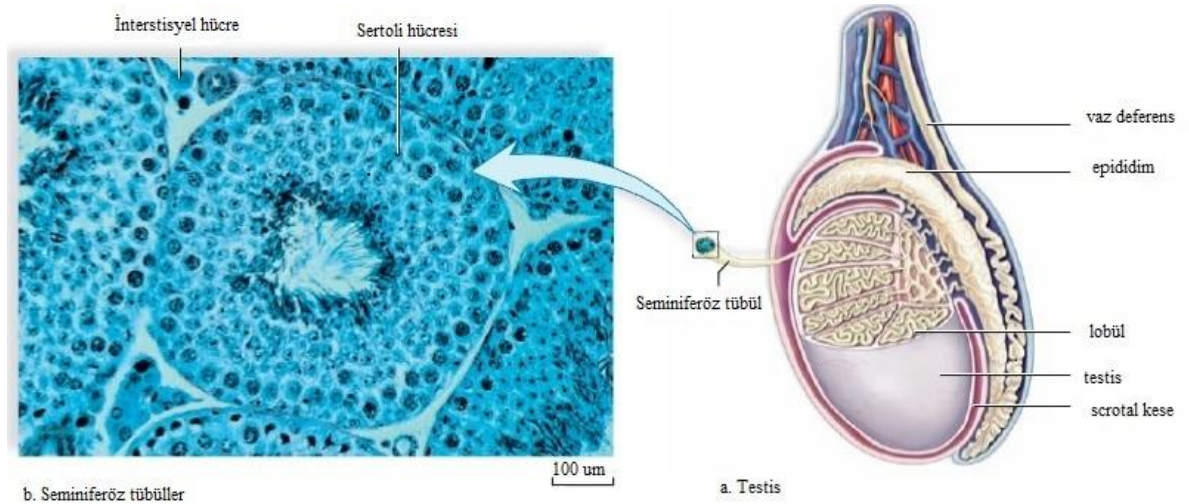
İletici (genital) yollar epididim, vaz deferens, ejakulatuar kanallar ve üretradan oluşur. Testosteron hormonu kontrolünde salgılarını genital yollara boşaltan ve ejakulat oluşumuna katkıda bulunan bezler ise seminal vezikül, prostat ve bulboüretal bezlerdir (Yıldırım, 2012: 247).

1.1.1. Testis

Testis, skrotum içerisinde yer alan, her biri 2,5x3x5 cm boyutlarında ve 10-15 g ağırlığında olan erkekte temel üreme organıdır. Spermatozoon ve erkek seks hormonları olan androjenleri üretir. Fetal dönemde karın boşluğunda olan testisler doğumdan hemen önce (35-40. haftalar) inguinal kanal ile skrotum içerisine inerler (Elder ve Dale, 2011: 31; Yıldırım, 2012: 247).

Testislerin normal fonksiyon görebilmeleri için vücut ısısından daha düşük bir ısıya (34-35°C) ihtiyaçları vardır. Scrotum yapısındaki özellikler (derisinde yer alan bol miktarda ter bezleri ve diğer katmanlardaki kas lifleri) ile testislerin vücuda yaklaşması veya vücuttan uzaklaşmasını sağlayarak ısı regülasyonunu sağlar (Yıldırım, 2012: 253; Mader ve Windelspecht, 2012: 369).

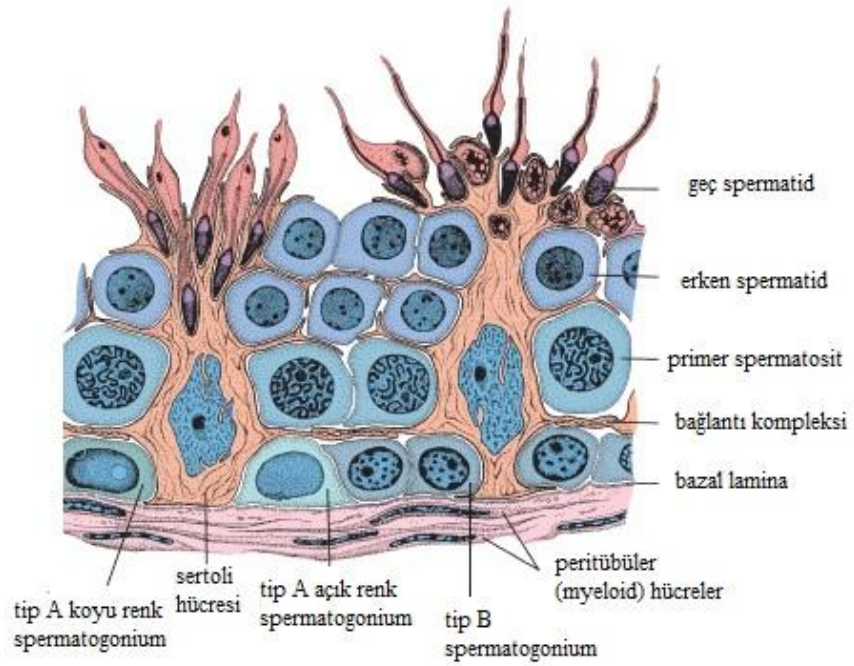
Her bir testiste 250-300 adet lobül olup her lobül içerisinde 1-4 adet seminiferöz tübül olmak üzere tüm testiste 1000 kadar seminiferöz tübül bulunur (Yıldırım, 2012: 248). Bu tübüller spermatozoonların üretildiği yerlerdir (Şekil 1.2). Tübüller birbirinden kan damarları, birkaç lenfosit, plazma hücreleri ve interstisyel hücre (leydig hücresi) kümeleri içeren bağ dokusu ile ayrılır (Elder ve Dale, 2011: 31). İnterstisyel hücreler puberte ile birlikte hipofiz bezi kontrolünde androjenleri salgılayan endokrin hücrelerdir (Yıldırım, 2012: 248).



Şekil 1.2. Testis (a) ve seminiferöz tübüllerin (b) yapısı (Mader ve Windelspecht, 2012: 370, Şekil 16.4'ten değiştirilerek hazırlanmıştır.)

Seminiferöz tübüllerden kesit alındığında epitelinde farklı matürasyon aşamalarında germ hücreleri görülebilir. Matürasyonun erken safhalarındaki hücreler tabandaki membranda görülürken daha çok farklılaşmış hücreler tübül lümenine

doğru görülür. Tübül epitelinde bir de germ hücrelerini beslediği düşünülen polimorfik, bol sitoplazması olan, nükleusları soluk görünen sertoli hücreleri bulunur (Elder ve Dale, 2011: 32) (Şekil 1.3). Sertoli hücreleri puberteden sonra oğalmazlar. Tübüllerin yapısal organizasyonundan sorumludurlar (Ross ve Pawlina, 2011: 789). Sertoli hücreleri folikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron reseptörleri içerirler. Sertoli hücreleri testosteronu konsantre eden androjen bağlayıcı protein (ABP) ve FSH salınımını inhibe eden inhibin hormonu sentezlerler. Ayrıca büyüme faktörleri ve Müller kanalı inhibe edici faktör (MIF) gibi parakrin faktörler salgırlar (Ross ve Pawlina, 2011: 802).



Şekil 1.3. Seminiferöz tübül epiteli (Ross ve Pawlina, 2011: 791 Şekil 22.6'dan değiştirilerek hazırlanmıştır.)

Seminiferöz tübüller daha sonra birbirleriyle ağızlaşmalar yaparak rete testisi oluşturular. Peritübüler (myeloid) hücrelerin hareketleriyle rete testise ulaşan spermatozonlar buradan çıkan 10-20 adet eferent kanallar ile epididime ulaştırılır (Ross ve Pawlina, 2011: 791; Yıldıırım, 2012: 248).

1.1.2. Genital Yollar

1.1.2.1.Epididim

Bir kanal sisteminden ibaret olan epididim spermiumlar için olgunlaşma ve depolama yeridir. Eferent kanallar ile baş kısma (*caput*) getirilen spermiumlar epididimde 2-14 gün boyunca kalarak oositi dölleyebilecek kapasiteye erişip kuyruk kısmında (*cauda*) depolanır (Yıldırım, 2012: 248; Elder ve Dale, 2011: 32).

1.1.2.2.Vaz Deferens (Duktus Deferens)

Ampulla bölümü hariç kaslı yapısı ile spermiumların sadece ejakulatuar kanala doğru iletimini sağlar. Ejekulatuar kanal oluşumuna katılmadan hemen önce bulunan *ampulla* kısmı spermiumlar için depolama yeridir (Yıldırım, 2012: 249).

1.1.2.3.Ejakulatuar Kanallar

Vaz deferens ve seminal vezikül ile prostat bezi içeriğinin karıştırılıp ejakulat (semen, meni) olarak üretradan fişkırtılmasını sağlar (Yıldırım, 2012: 250).

1.1.3. Genital Bezler

Testosteron hormonu kontrolündeki bu bezlerin genel olarak görevi spermilerin beslenmesi, hareketinin artırılması, semenin likefaksiyonu ve vajinanın asidik ortamının nötralizasyonudur (Yıldırım, 2012: 250).

Bu bezlerin hipofonksiyonu veya enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan seminal lökositler nedeniyle semen vizkozitesi artar bu da sperm konsantrasyon ve hareketliliğinin düşmesine neden olur. Erkeklerin %12-29'unda görülen bu durum fertilitiyi olumsuz yönde etkiler (Du Plessis ve diğ., 2013)

1.1.3.1.Seminal Vezikül

Seminal vezikül, ejakulatın %60-70'ini oluşturan fruktoz ve diğer besleyici maddelerce zengin hafif alkalik vizküz bir sıvı salgılar (Yıldırım, 2012: 250). Salgının bir fonksiyonu da kadın üreme sistemindeki immün aktiviteyi baskılamaktır (Zhang ve Jin, 2007).

Salgıladığı koagülan semenogelin proteini prostat bezinden salgılanan prostat spesifik antijen (PSA) ile degradasyona uğrayarak spermilerin kapasitasyon esnasında ileri hareket kazanmasını sağlar (Su ve Wang, 2009; de Lamirande, 2007).

1.1.3.2.Prostat

Prostat, genital bezlerin en büyüğüdür. Ejakulatın %20-30'unu oluşturan alkali bir sıvı salgılar. Vajinadaki asit ortamın nötralizasyonunu sağlar (Yıldırım, 2012: 251).

Eğer PSA salgılamasında bozukluk oluşursa seminal vezikülden salgılanan semenogelin proteini degrade olamaz ve sperm kapasitasyonu ve dolayısıyla hareketliliği bozulur (de Lamirande, 2007).

1.1.3.3.Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri)

Bulboüretal bezler, albumin açısından zengin, alkali, mukoid bir salgı salgılar. Ejakulata kayganlık ve akıcılık vererek spermlerin üretra mukozasındaki idrarın irridatif etkisinden korunmasını sağlar. Salgısı ejakulatın kendine has kokusunu oluşturur (Yıldırım, 2012: 252).

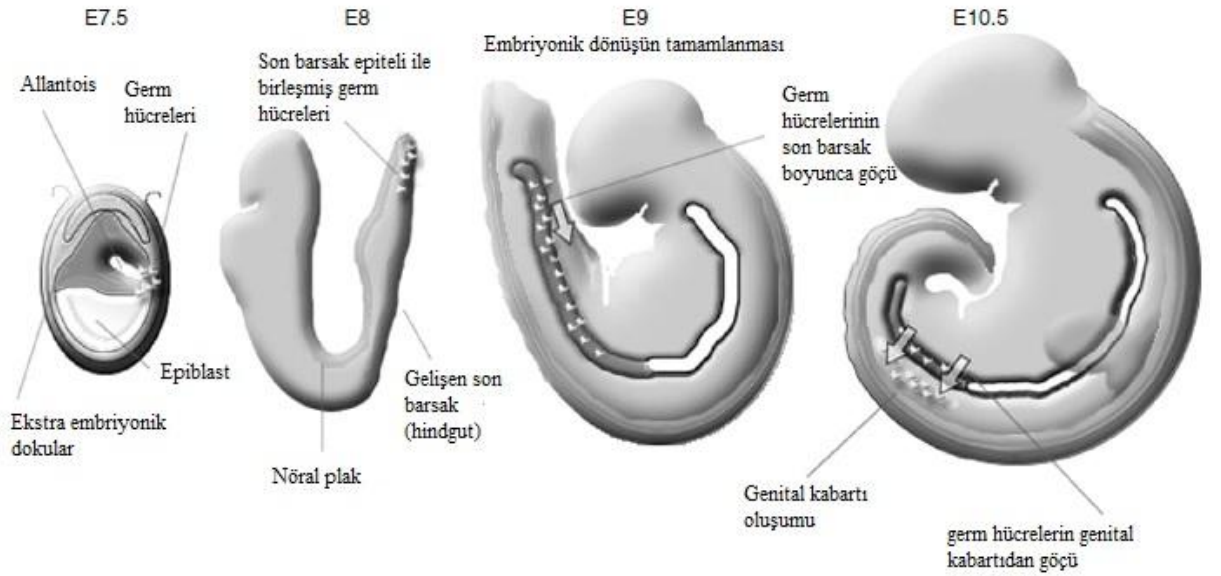
1.2. Seksüel Farklılaşma, Fetal Testis

Blastokist uterusu implante olduktan sonra üç adet primer germ tabakasına farklılaşırken (gastrulasyon) bir grup hücre ise primordial germ hücrelerini (PGH) oluşturur. Önceki jenerasyondan gelen epigenetik bilgi silinir (demetilasyon). XX genotipindeki hücrelerde inaktivasyona uğramış olan X tekrar aktive olur (Elder ve Dale, 2011: 28).

PGH'ler yolk kesesinde ekstra-embriyonik mezodermdeki primitif çizginin arkasına lokalize olup gastrulasyon evresinin sonuna doğru embriyoya göç ederler. Gonadları oluşturmak üzere koloni oluşturana kadar embriyonik doku boyunca göç ederler ve mitoz bölünme ile çoğalırlar (Şekil 1.4). Knock-out hayvan modellerinde yapılan araştırmalarda PGH'lerin göçünün ve lokalizasyonunun düzenlenmesinde, hareket ve yenilenmelerinde görevli birçok gen ve sinyal molekülü tanımlanmıştır (Elder ve Dale, 2011: 28; MacLaren, 2003).

İnsanda 6.gebelik haftasında göç tamamlanır. Genital kabartıyı çevreleyen hücre grupları farklılaşmamış gonada göç ederek koloni oluşturur (primitif cinsiyet kordonları oluşumu). Cinsiyet kordonları üzerindeki hücrelerde Y kromozomu üzerindeki testis belirleyici faktör (TBF, SRY) geni ifade olarak testis kordonları (medüller kordonlar) ve sertoli hücrelerinin farklılaşmasını uyarır (Elder ve Dale, 2011: 28 ve 31; Sadler, 2003: 337). Sertoli hücreleri Fibroblast Büyüme Faktörü-9

(FGF-9) üreterek testiküler kordonlarının (seminiferöz tübüllerin öncülleri) oluşmasını sağlar. Sertoli hücrelerinden Antimüllerian hormon (AMH) / Müllerian inhibe edici madde (MIS) salınarak dişi genital sistemini oluşturacak olan Müller kanalının oluşumu inhibe edilir. Sertoli hücreleri puberteye kadar bu hormonun üretimine devam eder. Leydig hücreleri de 8-10. gebelik haftasından itibaren testosteron üretimine başlar. Testosteron erkek genital sistemini oluşturacak olan Wolf kanalının büyüme ve farklılaşmasını sağlar. Fetal testisler SRY, SOX9, WT1, XH2, SF1, DAX1 gibi genlerin kontrolünde farklılaşır (Elder ve Dale, 2011: 31; Ross ve Pawlina, 2011: 785).



Şekil 1.4. Farede primordial germ hücrelerinin göçü (Elder ve Dale, 2011: 29, Şekil 3.1'den değiştirilerek hazırlanmıştır.)

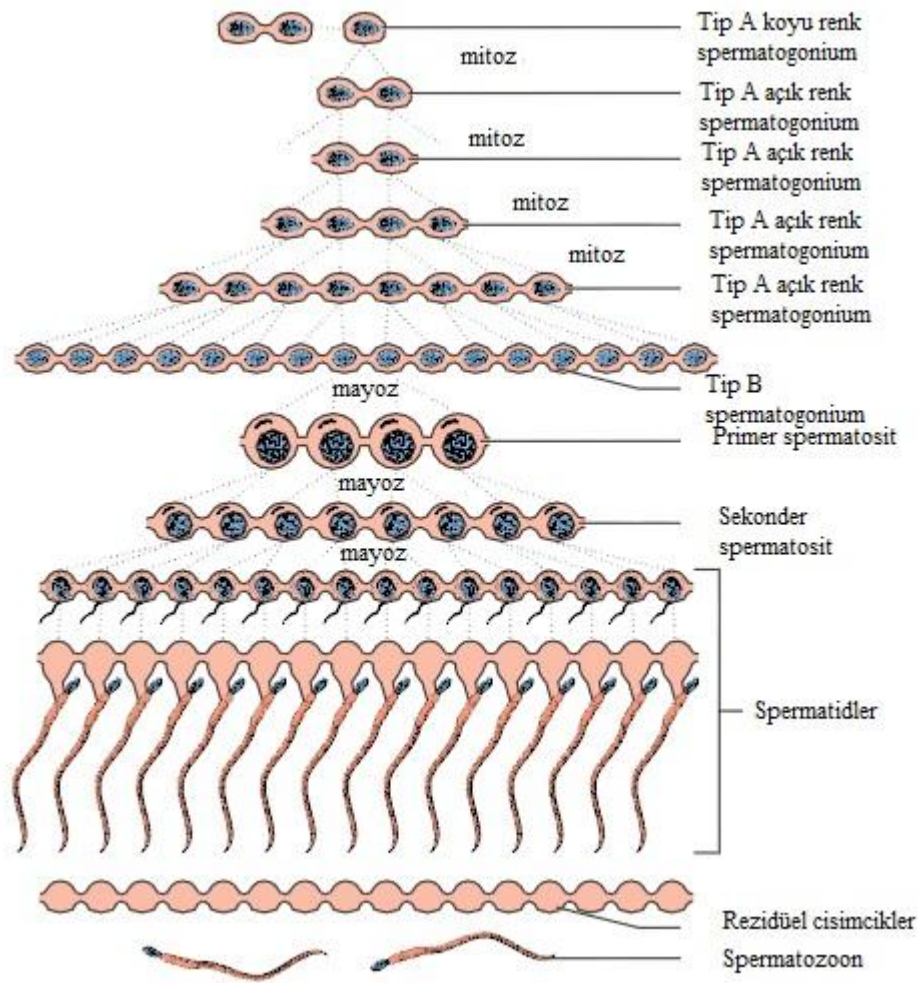
1.3. Spermatogenez

Spermatogenez farklılaşmamış germ hücrelerinden sperm gelişimi sürecidir. Üç aşamada gerçekleşir: mitotik, mayotik ve post-mayotik (spermiyogenez) (Papaioannou ve Nef, 2010). Bu kompleks süreç esnasında yuvarlak şekilli diploid spermatogonium haploid spermatozoona dönüşür (Xiao-Yan ve Jia-Hao, 2011; Eddy, 2002; Baccetti ve Afzelius, 1976). Spermatogenez insanda yaklaşık olarak 74 gün sürer (Ross ve Pawlina, 2011: 798).

Fetal testiste PGH'ler spermatozoal kök hücrelere (tip A spermatogonium) farklılaşır ve puberte ile birlikte lümeni oluşan seminiferöz tübüllerde mitoz bölünmeye başlayarak sayılarını arttırlar (primer spermatosit-tip A

spermatogonium; çift kromatid, 46 kromozom). Her bir mitoz bölünme ile iki adet hücre oluşur: primer spermatisit- tip A spermatogonium ve primer spermatisit-tip B spermatogonium (çift kromatid, 46 kromozom). Tip B spermatogonium lümene yakın kısma hareket eder ve iki mayoz bölünme ile iki adet sekonder spermatisit (çift kromatid, 23 kromozom) oluşturur. Her bir sekonder spermatisit de mayoz bölünmeyle iki adet erken spermatid (tek kromatid, 23 kromozom) oluşturur (Zuping ve diğ., 2009; Papaioannou ve Nef, 2010; Elder ve Dale, 2011: 33) (Şekil 1.5).

Spermatogenezde oogeneze kıyasla çok daha fazla bölünme gerçekleştiğinden embriyodaki mutasyonlar genelde erkek kaynaklıdır (Wistuba ve diğ., 2007).



Şekil 1.5. Spermatogenez (Sadler, 2003: 25, şekil 1.22'den değiştirilerek hazırlanmıştır.)

1.4. Spermiyogenez

Spermiyogenez, spermatidin oositi dölleyebilecek kapasitede spermatozoona dönüşmesi için geçirdiği süreçtir. Yaklaşık olarak 2 hafta sürer. Hücre bölünmesi

olmaz, bir dizi morfolojik değişim (akrozom oluşumu, nükleer kondansasyon, flagella oluşumu ve sitoplazmik yeniden düzenlenme) gerçekleşir (Papaioannou ve Nef, 2010; Elder ve Dale, 2011: 33).

Temel olarak dört aşamada gerçekleşir: golgi fazı, cap fazı, akrozomal faz ve matürasyon fazı (Ross ve Pawlina, 2011: 794-796; Elder ve Dale, 2011: 33).

- 1) Golgi fazı: Golgi kompleksleri birleşir ve glikoproteinlerce zengin proakrozomal granülleri oluşturulur. Nükleer zara bitişik akrozomal vezikül oluşur. Vezikül genişleyerek içeriğini bu fazda artırır. Sentioller spermatidin posterior kutbuna göç edip sperm kuyruğundaki aksonem yapısının oluşumunu başlatır.
- 2) Cap fazı: Akrozomal veziküller nükleusun ön yarısına dağılır ve akrozomal cap olarak adlandırılan yapı şekillenir. Akrozomal cap altındaki nükleer zarın porları kaybolur ve zar kalınlaşır. Nükleer içerik kondanse olur.
- 3) Akrozomal faz: Bu aşamada spermatid kendi lokalizasyonunu belirler. Baş sertoli hücreleri arasına gömülür, gelişen flagella seminiferöz tübül lümenine doğru uzanır. Kondanse nükleus yassılaşır ve oval şekil alır. Flagella oluşumunu başlattıktan sonra sentriyoller geri göç eder ve boyun kısmını oluşturur. Aksonem mikrotubullerinin periferine doğru uzanıp nükleus ve kuyruğu bağlayan bağlayıcı kısım oluşur. Plazma membranı uzayan flagellayı sarar. Sitoplazmadaki mitokondriler boyun ve kuyruk kısmına doğru hareket eder.
- 4) Matürasyon fazı: Flagella etrafındaki fazla sitoplazma atılır. Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilen bu sitoplazma rezidüel cisimcikleri oluşturur. Olgun spermatozoon sertoli hücrelerinden ayrılıp lümenine salınır (Ross ve Pawlina, 2011: 794-796).

Spermiyogenez esnasında hücrelerin gelişim hızı sabittir ve hormon gibi dış faktörlerden etkilenmez. Depolanan mRNA'nın translasyon zamanı süreci kontrol eder (Elder ve Dale, 2011: 33).

Sperm nükleusundaki DNA'nın somatik hücrelerde kapladığı hacmin %10'undan azını kaplaması gerektiğinden farklı bir paketlenme aşaması vardır. Spermatogenez süresince DNA, testis spesifik arjinin açısından zengin histon varyant proteinleri (H1t, TH2A, TH2B, TH3) ile paketlenir (Meistrich ve diğ., 1978; Papaioannou ve Nef, 2010). Yani histonlar, yer değiştirmelerini kolaylaştırmak için hiper asetile olurlar (Papaioannou ve Nef, 2010; Oliva ve Mezquita, 1986; Hazzouri

ve diğ., 2000; Marcon ve Boissonneault, 2004). Mayoz bölünmeyi takiben sekonder spermatozoon aşamasında histonlar transisyon proteinleri (TP1 ve TP2) ile yer değiştirir. TP'ler spermiyogenez sırasında histonların ayrılmasını, protaminlerin birleşmesini sağlar. Kromatin kondansasyonu düzensiz olduğu için birçok geç dönem spermatidde DNA kırıkları oluşur (Wistuba ve diğ., 2007). Histonlar daha sonra yüksek oranda pozitif yüklü protaminlerle yer değiştirerek sperm DNA'sının %85-95'ini içeren sıkı halkasal kompleksler oluşturur. Bu yoğun kompakt yapı spermiyogenez sırasında DNA'yı transkripsiyona kapatır (Papaioannou ve Nef, 2010; Oliva ve Castillo, 2011; Elder ve Dale, 2011: 35).

1.5. Epididimde Sperm Matürasyonu

Spermatozoon epididimden geçerken protaminler arasında disülfid ve çinko köprüleri oluşarak kromatin daha da kompakt hale alır (Oliva ve Castillo, 2011). Spermatozoonun baş kısmında net negatif yük artışı olarak sperm *zona pelucida* ile etkileşime girebilme yeteneği kazanır. Oosit bağlanması ve füzyonunda görevli hyaluronidaz, fertilin gibi antijenler biyokimyasal modifikasyonlar ile epididimde aktive edilir.

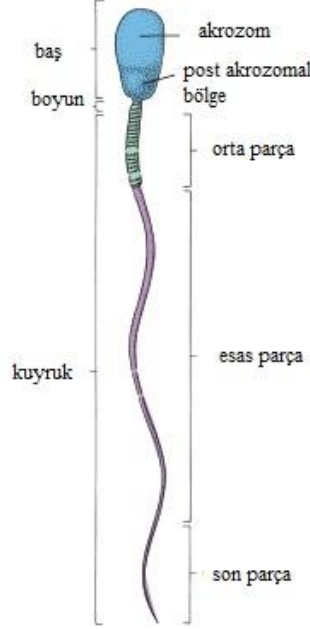
Epididimin *caput* kısmında hareketlenmeye başlayan spermatozoon *cauda* kısmında ileri hareketli hale gelir. Epididim sıvısındaki ileri hareket proteini ve karnitinin spermin hareket kazanmasında rolü olduğu düşünülmektedir. Epididimde spermin ATP, cAMP ve Mg^{+2} 'a maruz kalması da hareketlenmeyi tetikler (Elder ve Dale, 2011: 35). Spermin cAMP, Ca^{+2} ve intrasellüler pH seviyesinde değişiklikler olur. Bu faktörler protein kinaz ve protein fosfatazları fosforilleyerek flagella hareketini düzenler (Ross ve Pawlina, 2011: 798).

1.6. Matür Spermin Yapısı

Matür sperm (spermatozoon) 60 μm uzunluğunda olup baş, orta parça ve esas kısımdan (kuyruk) oluşur (Şekil 1.6).

Baş yassıdır, 4,5 μm uzunluğunda, 3 μm genişliğinde ve 1 μm kalınlığındadır. Akrozom nükleusun 2/3'ünü kaplar ve spermin oositin zona pelusidasına penetrasyonunu sağlayan hyaluronidaz, nöroaminidaz, asit fosfataz ve akrozimin (tripsin benzeri proteaz) enzimlerini içerir (Ross ve Pawlina, 2011: 796). Spermde sitoplazma azalmıştır ve sadece fonksiyonel organeller (mitokondri, golgi,

ribozom, endoplazmik retikulum) mevcuttur (Alberts ve diğ., 2007: 1292-1293). Başı orta parçaya bağlayıcı kısım bağlar, burada sentriol ve fibrillerin kökü bulunur (Şekil 1.7'de soldaki resim).

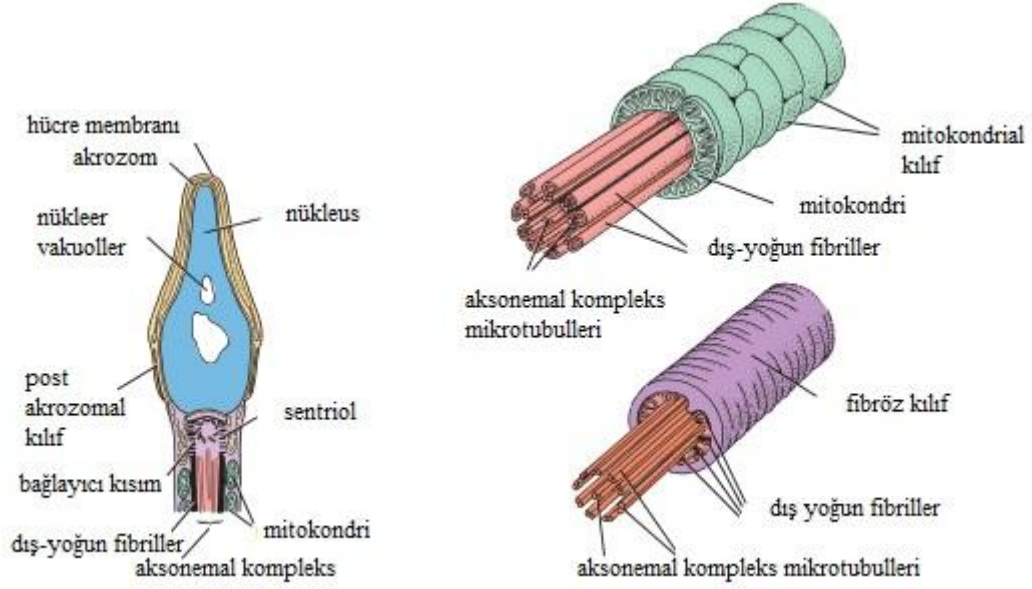


Şekil 1.6. Matür spermin yapısı (Ross ve Pawlina, 2011: 797, Şekil 22.12'den değiştirilerek hazırlanmıştır.)

Orta parça 7 μm uzunluğundadır. Mitokondri ve çevrelediği heliks tarzında sarılmış fibriller ile aksonemal kompleks içerir (Şekil 1.7'de sağ üstteki resim). Buradaki mitokondriler kuyruğun hareketi için gerekli enerjiyi üretir ve sperme hareketlilik sağlar. Orta parça ile esas parça arasında annulus bulunur.

Esas parça 40 μm uzunluğundadır ve aksonemal kompleks ve fibrilleri saran fibröz kılıf içerir (Şekil 1.7'de sağ alttaki resim).

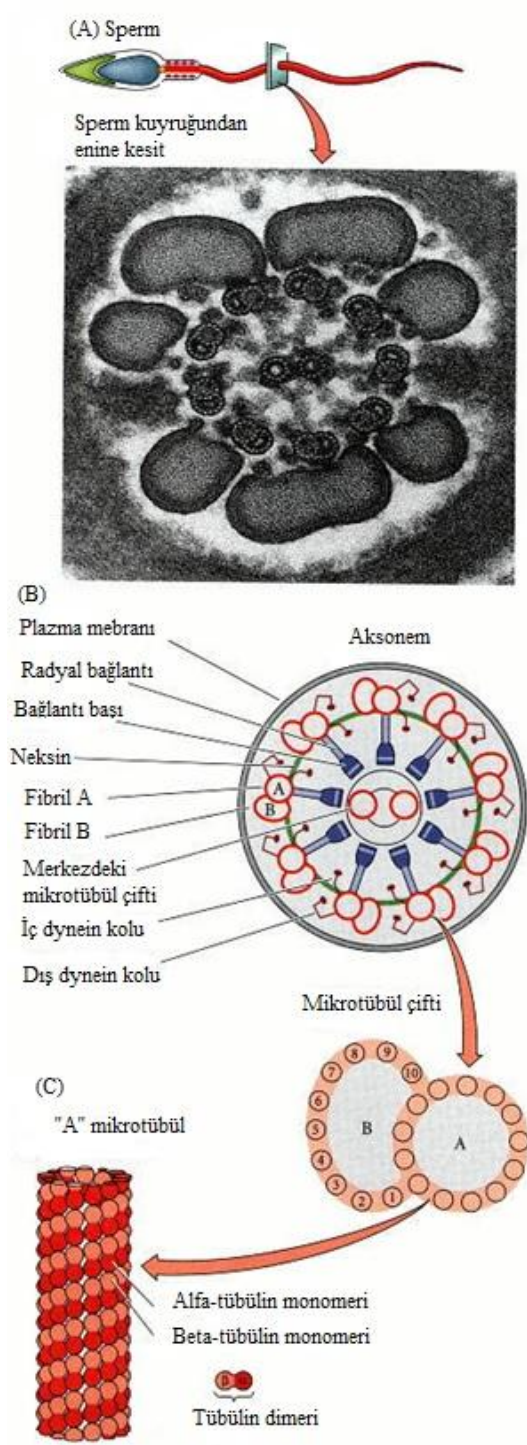
Son parça flagellanın son 5 μm 'lik parçası olup sadece aksonemal kompleks ve plazma membranı içerir (Ross ve Pawlina, 2011: 797)



Şekil 1.7. Spermde baş ve flagellanın yapısı (Ross ve Pawlina, 2011: 797, Şekil 22.12’den değiştirilerek hazırlanmıştır.)

Flagella iki adet merkezi mikrotübülün dokuz adet çiftli mikrotübüllerle sarıldığı aksonem yapısı içerir (Şekil 1.8 (B)). Flagella yapısının ana proteini tubulin olup mikrotübüle bağlı dynein kolları içerdiği ATPaz ile ATP hidrolizi yaparak hareket için gerekli enerjiyi sağlar. Bu enerji ile dış taraftaki çiftli mikrotübüller kayarak flagella kıvrılır. Şekil 1.8 (C)’de bir mikrotübülün üç boyutlu yapısı görülmektedir. α - ve β -tubulin alt üniteleri benzer olmakla birlikte aynı değildir ve mikrotübül tubulin alt ünitelerini polimerize ve depolimerize ederek şeklini değiştirebilir. Kartagener sendromlu hastalar genetik olarak dyneine sahip değildir ve spermelerin hareketsiz olması nedeniyle infertildirler. Ökaryotik canlılarda ‘‘9+2’’ mikrotübül yapısı korunmuştur. Flagellanın hareketini sağlayan asıl enerji boyun bölgesinde lokalize mitokondrilerce sağlanır (Gilbert, 2000: Part 2, Chapter 7).

Spermiler ejakulasyon ile kadın üreme sistemine atıldıktan sonra burada 2-3 gün canlı kalırlar. Bu süreçte oositi dölleyebilecek kapasiteye ulaşırlar (kapasitasyon). Kapasitasyonda adenilat siklaz aktivitesindeki artış nedeniyle cAMP artışı, tirozin fosforilasyonunda artış, Ca^{+2} kanallarının aktive olması nedeniyle intrasellüler Ca^{+2} seviyesinde artış, sperm başından seminal sıvı glikokonjugatları (glikokaliks) atılımı, plazma membranından kolesterol atılımı ve membrandaki karbonhidrat ve fosfolipidlerin yeniden dağılımı görülür (Ross ve Pawlina, 2011: 840).



Şekil 1.8. Flagellada mikrotübüllerin yapısı (Gilbert, 2000, Şekil 7.3'ten değiştirilerek hazırlanmıştır.)

1.7. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, bir yıldır korunmasız ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamamak olarak tanımlanır (Meniru, 2004; Hamada ve diğ., 2012). Çiftin gebelik geçmişinin olmadığı durumda primer, sonucu ne olursa olsun (ektopik, düşük, kürtaj vs) gebelik geçmişi varsa sekonder infertilite olarak adlandırılır (Meniru, 2004).

Herhangi bir kontraseptif kullanmayan çiftlerin %80'i bir yıl içinde, kalanların %10'u ikinci yıl içinde çocuk sahibi olur. İnfertil olarak adlandırılan diğer %10'da ise bu süreçte gebelik görülmez. Bu çiftlerin bazılarında ileriki yıllarda yardımsız gebelik oluşumu gözlenebilir ancak gebelik elde etme zaman alacağından fertilitenin kısmen bozulduğu bu kişiler subfertil olarak adlandırılır (Meniru, 2004). Subfertil tanımı aynı zamanda gebeliğin doğal yoldan oluşmadığı ancak yardımla üreme teknikleri ile sağlandığı kişiler için de kullanılır (Garrido ve diğ., 2008).

Çiftlerin yaklaşık olarak %8-10'unda gözlenen infertilite, %50 oranında erkek infertilitesi olarak karşımıza çıkar (Hamada ve diğ., 2012). Erkek infertilitesi %15-30 oranında genetik temellidir ve bunlar Y kromozomu mikrodelesyonları, kromozomal anomaliler ve tek gen bozukluklarını içerir. Konjenital veya sonradan oluşan ürogenital anormallikler, genital enfeksiyonlar, immünolojik faktörler, varikosel, hormonal bozukluklar ve genetik anomaliler erkek infertilitesinin bilinen nedenleri arasındadır. Vakaların %60-75'inde ise herhangi bir neden bulunamamaktadır (Pastuszak ve diğ., 2012).

Genel olarak nedeni bilinmeyen erkek infertilitesi iki şekilde tanımlanır: açıklanamayan ve idiyopatik infertilite. Kadınlarda ise bu iki tanım aynı durumu ifade eder. İnfertil erkeklerde %6-27 oranında görülen açıklanamayan infertilite, eşinde infertiliteye yol açan herhangi bir neden olmaksızın ve erkeğin iki veya daha fazla spermiyogram testi sonucunun normal olup erkekte fiziksel veya endokrin olarak herhangi bir bozukluğun saptanamaması durumunu ifade eder. İdiyopatik infertilite ise infertil erkeklerde %31 oranında görülür (Hamada ve diğ., 2011) ve eşinin durumuna bakılmaksızın erkeklerin sperm parametrelerinde, fiziksel muayenelerinde ve endokrin testlerinde herhangi bir bozukluğa rastlanmaması durumudur (Kumar ve diğ., 2006; Garrido ve diğ., 2008; Hamada ve diğ., 2011). İdiyopatik erkek infertilitesinde kronik stres, ROS, çevresel, genetik ve epigenetik etmenler rol oynayabilir (Jungwirth ve diğ., 2013). Tablo 1.1'de erkek infertilitesinin etiyojik nedenleri yer almaktadır.

Tablo 1.1. Erkeklerde infertilite etiyolojisi ve dağılımı (Hamada ve diğ.,2011)

Etiyoloji	Dağılım (%)
İmmünolojik	-
İdiyopatik	32,6
Varikozel	26,6
Obstrüksiyon	15,3
Açıklanamayan nedenler (normal sperm değerleri)	10,7
Kriptorşidizm	2,7
Ejakulatuar bozukluklar	2,0
Endokrin bozukluklar	1,5
İlaç/radyasyon	1,4
Genetik faktörler	1,2
Testiküler bozukluklar	1,1
Seksüel faktörler	0,7
Pyospermi	0,5
Kanser	0,4
Sistemik hastalıklar	0,3
Enfeksiyon	0,2
Torsiyon	0,1
Ultrastrüktürel	2,1
Toplam	100

Semen analizi sonucuna göre ejakulatta sperm görülmemesi azospermi, sperm konsantrasyonunun düşük olması oligozoospermi, sperm motilitesinin düşük olması astenozoospermi, normal morfolojiye sahip sperm sayısının az olması teratozoospermi, tüm bu anomalilerin birlikte gözlenmesi oligoastenoteratozoospermi olarak adlandırılır (Jungwirth ve diğ, 2013).

1.7.1. Septinler ve Erkek İnfertilitesi

Septinler ilk olarak bölünen *S.cerevisia*'da sitokinezde defektlere neden olan proteinler olarak keşfedilmiştir (Hartwell, 1971; Kinoshita, 2003; Ding ve diğ., 2007). Sitokinez (Kinoshita ve diğ., 1997; Surka ve diğ., 2002) dışında polarite belirlenmesi (Gladfelter ve diğ., 2001; Irazoqui ve diğ., 2004), yüksek oranda özelleşmiş hücrelerde vezikül trafiği (Hsu ve diğ., 1998; Beites ve diğ., 1999, Kartmann ve diğ., 2001; Kissel ve diğ., 2005) ve hücre iskeletinin şekillenmesi (Kinoshita ve diğ., 1997; Surka ve diğ., 2002, Kartmann ve diğ., 2001; Kissel ve diğ., 2005), apoptozis (Larisch ve diğ., 2000), neoplazi (Hall ve diğ., 2005), morfogenez (Lin ve diğ., 2012) gibi birçok biyolojik süreçte rol alırlar.

Septinler GTPaz aktivitesine sahip olup polimerize edici-GTP-bağlayıcı proteinler (P-loop GTPaz) sınıfına aittir. GTP-bağlayıcı ve hidroliz edici N-terminal uç ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş olup, septinler C-terminal uçlarına göre sınıflandırılır (Hall ve diğ., 2005; Cao ve diğ., 2009; Lin ve diğ., 2012). Kinezin, miyozin ve ras gibi P-loop GTPaz'lar GTP bağlayıcı domeynlerinde G1-G5 olarak gösterilen en az beş adet korunmuş motif içerirler (Leipe ve diğ., 2002; Cao ve diğ., 2009). Septinler ise G1, G3, G4 motiflerine sahiptirler (Field ve Kellogg, 1999; Cao ve diğ., 2009). G1 motif nükleotidlerin fosfat grubuyla etkileşime girer (Zhang ve diğ., 1999; Casamayor ve Snyder, 2003; Cao ve diğ., 2009), G3 motif hidrofobik rezidüleri içerir ve Mg^{+2} bağlayarak GTP'nin b ve c fosfatları ile etkileşime girer. G4 motif GTP bağlama duyarlılığı açısından önemlidir (Pan ve diğ., 2007; Cao ve diğ., 2009). C-terminal uç septinler arasında korunmuş 53 aminoasitlik septin elementi içerir (Versele ve diğ., 2004; Cao ve diğ., 2009). Birçok septinde kıvrılmış demetler oluşturan ve diğer septinlerle etkileşim için gerekli olan C-terminal uç uzantısı yer alır (Versele ve Thorner, 2005; Casamayor ve Snyder, 2003; Cao ve diğ., 2009).

Septinler *in vitro* ve *in vivo*'da makromoleküler ve heterooligomeric filamentler oluşturarak fonksiyon gösterirler (Surka ve diğ., 2002; Kinoshita ve diğ., 2002; Lin ve diğ., 2012). Filamentöz yapı birçok septinde gözlenir ve bir septin subünitesinin kaybı kompleksteki diğer subüniteleri de etkiler (Spiliotis ve diğ., 2005; Kinoshita ve diğ., 2002; Kremer ve diğ., 2005; Lin ve diğ., 2012).

Septinler hücre içerisindeki spesifik bölgelerde protein organizasyonu için sitoplazmada filamentöz omurga olarak görev yaparlar ve birçok proteinin

lokalisasyonu septinlere bağlıdır (Cooper ve Kiehart, 1996; Kinoshita, 2003; Ding ve diğ., 2007).

1.7.2. Memelilerde Septinler

Memelilerde şimdiye kadar 14 adet septin (SEPT,SEPTIN) geni tespit edilmiş olup bunlar kompleks bir kırılma süreciyle birçok farklı transkript oluşturur ve farklı hücre tiplerinde farklı izoformların yer almasına neden olur (Hall ve diğ., 2005; Peterson ve diğ., 2007; Ding ve diğ., 2007; Lin ve diğ., 2012). Bazı septin genleri (SEPT13) tüm hücrelerde ifade edilirken diğerleri lenfoid doku (SEPT1, 6, 9, ve 12), beyinde (SEPT2, 3, 4, 5, 7, 8, ve 11) daha fazla ifade olur (Hall ve diğ., 2005). Bazıları ise sadece nöron (SEPT3 ve SEPT5) (Xue ve diğ., 2004; Son ve diğ., 2005; Lin ve diğ., 2012) ve germ hücreleri (SEPT1, 6, 7) (Kissel ve diğ., 2005; Ihara ve diğ., 2005) gibi iyi diferansiye hücrelerde ifade edilir (Hall ve diğ., 2005; Lin ve diğ., 2012). Çeşitli tümörlü dokularda septin ifade seviyelerinde farklılık gözlenmiştir. Özellikle santral sinir sisteminde 13 adet septin geninin ifade seviyelerinde farklılık tespit edilmiştir (Hall ve diğ., 2005).

Nörodejenerasyon, erkek infertilitesi, kanser gibi bozuklukların patogeneğinde septin proteinlerinde fonksiyon kaybı görülür (Hall ve Russell, 2004).

Memelilerde SEPT2, 7, 9'un erkek germ hücrelerinde hücreler arası köprü markörü olan testiste ifade edilen gen 14 (TEXT14) ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir (Greenbaum ve diğ., 2007; Lin ve diğ., 2012). Farelerde TEXT14 kaybı hücreler arası köprünün bozulmasına ve germ hücrelerinde apoptozis artışına neden olur (Greenbaum ve diğ., 2006; Lin ve diğ., 2012).

Memeli somatik hücrelerindeki sept2, sept6, sept7, sept9 proteinleri farklı moleküllerle etkileşerek somatik hücrelerde sitokinezin tamamlanmasında rol oynar (Spiliotis ve diğ., 2005; Zhu ve diğ., 2008; Kinoshita ve diğ., 1997; Surka ve diğ., 2002; Lin ve diğ., 2012).

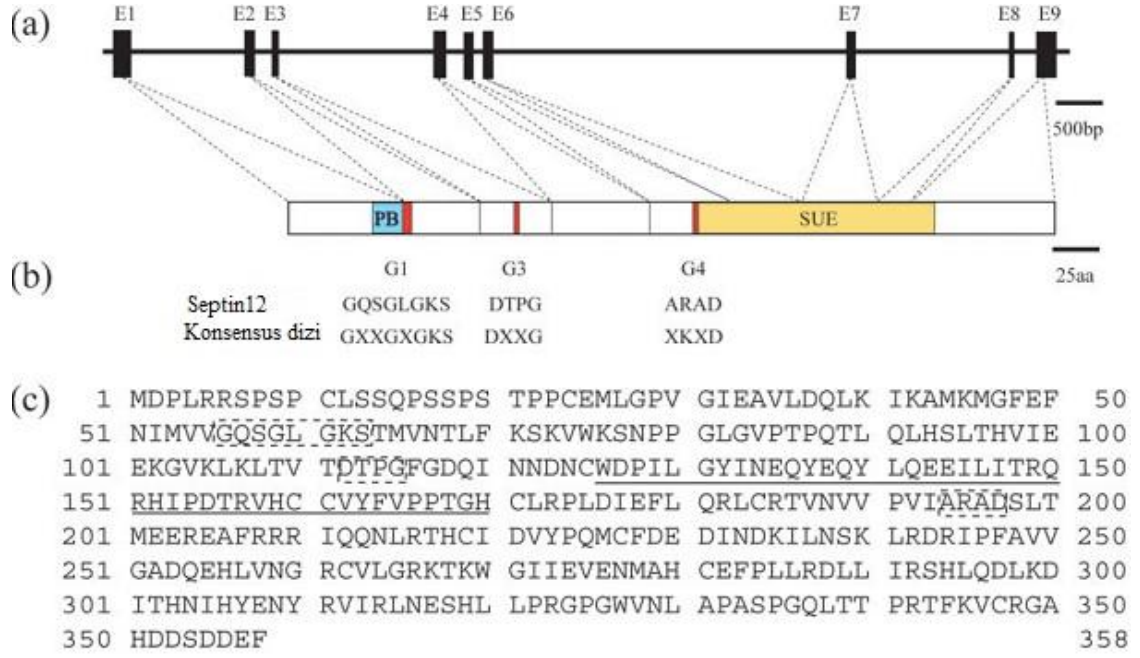
Sept7 sentromer protein E (CENP-E) ile etkileşerek bu proteinin kinetokorda lokalizasyonunu sağlamlaştırır ve ekvator da kromozom dizilimini sağlar. Hücre modellerinde sept2, sept6, sept7 veya sept9'un susturulması çift nükleuslu hücre oranını artırır (Spiliotis ve diğ., 2005; Nagata ve diğ., 2003; Estey ve diğ., 2010); fakat sept6 eksikliği olan farelerde ise anormal fenotip gözlenmemiştir (Ono ve diğ., 2005; Lin ve diğ., 2012)

SEPT4'ün diğer septinlerle (SEPT1, 6, 7) birlikte spermatozoonun annulus kısmında lokalize olduğu gösterilmiştir. SEPT4 null erkek farelerde annulus yapısının bozulması sebebiyle spermde hareket kaybı ve sterilite gözlenmiştir (Kissel ve diğ., 2005; Ihara ve diğ., 2005; Lin ve diğ., 2012). SEPT4 mutasyonları görülen bazı astenozoospermi hastalarında sperm annulusunda organizasyon kaybı olduğu bulunmuştur (Ihara ve diğ., 2005; Sugino ve diğ., 2008; Lhuiler ve diğ., 2009; Lin ve diğ., 2012).

1.8. SEPTIN12 ve Erkek İnfertilitesi

İnsanda spermatogenik defektlerde rol oynadığı düşünülen genlerle ilgili yapılan mikrodizin çalışmalarında bulunan testis spesifik genlerden birisi de SEPTIN12'dir (Lin ve diğ., 2012). Birçok hücrede ifadesi olsa da testiste daha fazla ifade edilir (Hall ve diğ., 2005; Ding ve diğ., 2007).

Sept12'nin genomik DNA dizisi 10 kb olup kromozomdaki lokalizasyonu 16p13.3'dür, 9 ekzon içerir ve kodlayıcı dizisi 1077 bç'dir (Şekil 1.9 (a)). NCBI veri bankasındaki İfade edilmiş dizi etiketleri (EST) memelilerde ekzon 4'ün alternatif kırılmayla oluşturduğu iki matür transkript olduğunu göstermektedir. (Şekil 1.9 (b)). Bu iki majör izoform versiyon 1 ve 2 olarak adlandırılır. Sept12'nin primer aminoasit dizisi GTP bağlayıcı konsensus dizi (Şekil 1.9 (b)'de kırmızı gösterilmiştir) ve septin özgün element içerir (Şekil 1.9 (b)'de sarı gösterilmiştir). G4 domeyni diğer septinlerdeki yüksek oranda korunmuş lizinin (XKXD) aksine arjinin (ARAD) içerir (Bourne ve diğ., 1991; Steels ve diğ., 2007). İnsanlarda SEPT12, SEPT9 ve SEPT3 ile birlikte SEPT3 grubunda yer alır ve bu gruptaki tüm septinlerde kıvrılmış demet oluşturan C-terminal uç uzantısı yer almaz (Hall ve diğ., 2005; Steels ve diğ., 2007; Cao ve diğ., 2009).



Şekil 1.9. SEPT12 geni ve ürünleri. (b) Septin12'nin GTP bağlayıcı konsensus dizisi kırmızı, polibazik kısmı (PB) mavi, septin-özgün element (SUE) sarı ile gösterilmiştir. (c) SEPT12 versiyon 2'nin aminoasit dizisinin tamamı. G1, G3 ve G4 dizileri kutucuk içerisinde, ekzon 4 ise altı çizilerek gösterilmiştir.

SEPT12, sıçanlarda olgun sperm hücrelerinin annulus kısmında bulunduğu tespit edilmiş olup insanlarda post-mayotik germ hücrelerinde farklı subselüler kompartmanlarında (spermatidlerde baş ve boyun, matür spermelerde annulus) ifade edildiği gösterilmiştir (Steels ve diğ., 2007; Lin ve diğ., 2012). Knock-out farelerde sterilitte, Septin12^{+/+} / Septin12^{+/-} kimerik farelerden elde edilen spermelerde nükleer DNA hasarı, boyun defektleri, immatür sperm gibi birçok anomalinin saptanmış olması SEPT12 geninin ifade seviyesinin germ hücresi gelişiminde önemli role sahip olduğunu gösterir ve bu geni erkek infertilitesinin araştırılmasında aday gen yapar (Lin ve diğ., 2009; 2011).

Ding ve ark. (2007) testis cDNA kütüphanesinden klonladıkları SEPT12'nin HeLa hücrelerinde SEPT6 ile etkileşime girdiğini ve bu etkileşimin SEPT6'nın filamentöz yapısını değiştirdiğini gösterdiler. Yine aynı çalışmada SEPT12'nin hücre bölünmesinin farklı aşamalarında farklı lokalizasyonlarda bulunduğu gösterilmiştir. İnterfazda filamentöz yapı olarak nükleusta, mitoz başlarken bu yapının kaybolduğu, anafazda merkezi iğ iplikçiklerinde, sitokinezde ise oluşan orta cisimcikte lokalize olduğu görülmüştür.

Miyakawa ve ark (2012) SEPT12 geninde kodlayıcı bölgelerde (ekzon 2-9) yer alan 8 adet polimorfizmin azoospermi hastalarında testiste sadece sertoli

hücrelerin bulunması ile karakterize sertoli cell only sendromuna (germinal aplazi) neden olduğunu göstermişlerdir.

Hipospermatogenez veya matürasyon aresti görülen erkeklerin testis dokularında sağlıklı olanlara göre daha düşük seviyede SEPT12 transkripti seviyesi bildirilmiştir (Lin ve diğ., 2009).

Fare SEPT12 knockout embriyonik kök hücreler kullanılarak yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerden oluşan kimeralarda sperm sayısı ve hareketliliğinde düşüş ve spermde tüm hücresel kısımlarda defektler görülmüştür (Lin ve diğ., 2009).

1.8.1. c.474G>A Polimorfizmi ve Erkek İnfertilitesi

Lin ve arkadaşları (2012) anormal sperm parametreleri olan infertil erkeklerde SEPT12 geninin tüm kodlayıcı bölgesini dizilemiş ve on adet tek nükleotid polimorfizmi (SNP) saptamışlardır. Bunlardan kodon 474 G>A (NM_144605.4; rs759991) polimorfizminin infertil erkeklerde fertil kontrollere göre daha sık bulunduğu gözlenmiştir. Ekzon 5'te GTP-bağlayıcı bölgede yer alan bu SNP'in yeni bir alternatif kırılma varyantı oluşturabileceği ve yeni transkriptin oluşturduğu kırılmış proteinin spermde filament oluşumunu etkileyebileceği ortaya atılmıştır. Bu SNP'in bulunduğu infertil erkeklerde DNA hasarı, kuyuksuz veya kıvrık kuyuklu sperm mevcudiyeti gibi anomalilere rastlanmış ve SEPT12 genetik varyantı ile infertilite arasında literatürde ilk kez ilişki kurulmuştur.

Miyakawa ve arkadaşlarının azospermi hastaları ile yaptıkları çalışmalarında (2012) ise c.474 G>A polimorfizmi açısından hasta (AA %12) ve kontrol grupları (AA %10,7) arasında anlamlı fark görülmemiştir (p=0,92).

mRNA'da 738. pozisyonda GTG→GTA değişimine yol açan, fakat aminoasit değişikliğine (V[Val] →V [Val]) neden olmayan (sinonim polimorfizm) bu SNP'nin popülasyonlardaki genotip ve allel frekansları Şekil 1.10'da verilmiştir.

Popülasyon	2n	Allel Frekansı	Genotip Frekansı	HWP
HAPMAP: HapMap-YRI	120	T: 0.217 ± 0.07	T/T: 0.033 ± 0.03	0.5839
		C: 0.783 ± 0.07	C/T: 0.367 ± 0.09	
			C/C: 0.6 ± 0.09	
HAPMAP: HapMap-JPT	90	T: 0.322 ± 0.10	T/T: 0.111 ± 0.06	0.6547
		C: 0.678 ± 0.10	C/T: 0.422 ± 0.10	
			C/C: 0.467 ± 0.10	
HAPMAP: HapMap-HCB	90	T: 0.244 ± 0.09	T/T: 0.022 ± 0.03	0.2506
		C: 0.756 ± 0.09	C/T: 0.444 ± 0.10	
			C/C: 0.533 ± 0.10	
HAPMAP: HapMap-CEU	120	T: 0.317 ± 0.08	T/T: 0.117 ± 0.06	0.5839
		C: 0.683 ± 0.08	C/T: 0.4 ± 0.09	
			C/C: 0.483 ± 0.09	

Şekil 1.10. c.474 G>A polimorfizminin popülasyonlardaki dağılımı (dbSNP veri bankasından alınmıştır)

2. AMAÇ

Genlerdeki tek nükleotid polimorfizmlerinin bazı hastalıklara genetik yatkınlığa sebep oldukları bilinmektedir. Erkek infertilitesi ile ilgili olarak, sperm üretimi gibi üreme fonksiyonları ile ilişkisi tespit edilen ve testiküler fonksiyon ile ilişkili olan genlerdeki bazı polimorfizmlerin çevresel etmenlerle birlikte sperm sayısı ve hareketliliğinde azalmaya ve infertiliteye sebep olabileceği belirtilmiştir. Bu gerekçe ile, infertilitede rol oynayabilecek genlerdeki tek nükleotid polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ile ilişkisinin araştırılması, açıklanamayan infertilite vakalarının aydınlatılmasını sağlayacaktır.

Bu araştırma çerçevesinde erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu düşünülen ve literatürde yalnızca Lin ve ark. (2012) tarafından araştırılmış ve teratozoospermi vakaları için risk teşkil ettiği bulunmuş SEPTIN c. 474 G>A polimorfizminin Türk toplumunda erkek infertilitesi için risk oluşturup oluşturmayacağı, yine bu polimorfizmin sperm konsantrasyonu, hareketliliği, morfolojisi ve spermde DNA hasarı ve sigara-alkol gibi çevresel etmenler ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca eşinde infertilite problemi olmayan ve normal sperm değerlerine sahip erkeklerde bu polimorfizmin etkisine rastlanmasının açıklanamayan infertilite vakalarına da ışık tutacağı düşünülmektedir.

3. GEREÇLER

3.1. Kimyasallar, Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

Kullanılan kimyasallar moleküler biyoloji amaçlı olup, aksi belirtilmediği takdirde marka olarak Sigma (ABD) ya da Merck (Almanya) kullanılmıştır.

3.1.1. DNA İzolasyonu

Buccal Lizis Tamponu: 50 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 8.0), 50 mM Sükroz, 100 mM NaCl, %1SDS

Proteinaz K (10 mg/ml)

Low TE (pH 8.0); 10 mM Tris (pH 8.0), 0,1 mM EDTA (pH 8.0)

3 M NaOAc

%70 Etanol

%100 İsopropanol

Fenol

Kloroform

3.1.2. Sperm Morfoloji Boyama

SpermacTM Sperm Morfoloji Boyası (Stain Enterprise, Güney Afrika)

3.1.3. Spermde DNA Fragmentasyonu Belirlenmesi

%1 Akridin Turuncusu (AO) (Sigma, ABD)

0,1 M Sitrik Asit

0,3 M Na₂HPO₄

Metanol

Asetik asit

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

10X MgCl₂ süz Tampon 500 mM (NH₄)₂SO₄

25 mM MgCl₂

dNTP set (her biri 100 mM) (Thermo Scientific, ABD)

Rekombinant Taq DNA Polimeraz (5 U) (Thermo Scientific, ABD)

3.1.4.1. Oligonükleotid Primerler

Bu çalışmada ilgili polimorfik bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primer dizileri (Macrogen, Kore):

SEPT474F: 5' TATAAACGACAGCAGCAGGG 3', T_m: 58,9°C

SEPT474R: 5' ACAGTTCTGAGGGGAGGGTC 3', T_m: 60,5°C

3.1.5. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi

Fast Digest Apal1 (10 U/μl) (New England Biolabs, ABD)

10X Apal1 Tamponu

3.1.6. Agaroz Jel Elektroforezi

10X yükleme boyası: 2.5 mg/ml BPB, 0,5 M EDTA, %10 SDS, gliserol

Etidyum Bromid (EtBr): 10 mg/ml

%1 veya 2'lik Agaroz Jel: 0.5X TBE Tamponunda %1 veya %2 (w/v) agaroz

3.1.6.1. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 50 bç DNA markörü: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bç fragmentler içeren DNA markörü (Thermo Scientific, ABD)

3.1.7. PCR Purifikasyonu

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Almanya)

3.1.8. DNA Dizi Analizi

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD)

BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, ABD)

Pop-7 Polimer (Applied Biosystems, ABD)

36 cm kapiler (Applied Biosystems, ABD)

3.1.9. DNA ölçümleri

Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Applied Biosystems, ABD)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Thermal döngü cihazı (Techne, İNGİLTERE; Applied Biosystems, ABD)

Otoklav (BES, Türkiye)

Etüv

Isı bloğu (Techne, İNGİLTERE)

Dijital görüntüleme sistemi (Bio-rad, İtalya)

Elektroforez için güç kaynağı (EC Apparatus Corporation, ABD; Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ)

Hassas terazi (Precisa, İsviçre; Kern, Almanya)

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Elektromag, Türkiye, Heidolph, Almanya)

Mikrodalga fırın (Philco, ABD)

Mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (Heidolph REAX, Almanya)

pH metre (Hanna, ABD)

Pipet takımı (Eppendorf, Almanya)

Falkon santrifüj (Hettich, Almanya)

Su banyosu (GFL, Almanya)

Çalkalayıcı (Stuart, İngiltere)

Elektroforez sistemi (Flowgen, İngiltere)

Kapiler elektroforez cihazı (Model 3130, Applied Biosystems, ABD)

Plate vorteksi (IKA MS 3, Almanya), Qubit® 2.0 Florometre (Applied Biosystems, ABD)

-20°C derin dondurucu (Bosch, Almanya; Arçelik, Türkiye)

+4°C buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

-80°C derin dondurucu (Thermo Scientific, ABD)

Işık mikroskobu (SOIF, Çin; Leica, Almanya)

Floresan mikroskobu (Olympus, Almanya)

Makler sayım kamerası (Sefi Medical Instruments, İsrail)

4. YÖNTEMLER

4.1. Seçilecek Örneklerin Tanımı

Etik Kurul onayı alınmış bu çalışmada hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki örnek grubu kullanılmıştır (Etik Kurul raporu Ek 1'dedir.). Kontrol grubunu doğal yolla doğmuş en az bir çocuğu bulunan 164 fertil erkek birey, hasta grubunu Özel İstanbul Tüp Bebek Merkezi'ne infertilite tedavisi için başvuran ve en az 1 yıldır korunmasız ilişkiye rağmen çocuğu olmayan 115 erkek birey oluşturmaktadır. Hasta seçiminde çiftlerde kadın kaynaklı problem olmaması için çalışmaya eşinde tubal faktör, hormonal bozukluklar, düşük over rezervi gibi problemleri olanlar ve eşinin yaşı >37 olanlar dahil edilmemiştir. Erkeklerin yapılan muayenelerinde varikosel, enfeksiyon, inmemiş testis, kanal tıkanıklıkları ve ejakülasyon bozukluğu gibi infertiliteye neden olabilecek düzeltilebilir bir hastalıkları bulunmadığına dikkat edilmiştir. Y kromozom mikrodelsiyonu olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Vakaların sigara içip içmedikleri ve içiyorlarsa ne sayıda olduğu kaydedilmiş ve en az 1 sigara içmeleri durumunda sigara içen gruba alınmışlardır. Vakaların alkol kullanıp kullanmadıkları ve kullanıyorlarsa ne sıklıkta olduğu kaydedilmiş ve sosyal içici olmaları durumunda bile alkol kullanan gruba alınmışlardır. Hastalar sperm parametrelerindeki anormalliklere göre gruplara ayrılmıştır: spermde konsantrasyon, hareketlilik ve morfoloji değerleri düşük olan hastalar sırasıyla oligozoospermi, astenozoospermi, teratozoospermi gruplarına ve sperm değerleri normal olan hastalar açıklanmayan infertilite grubuna ayrılmıştır.

Çalışmamıza katılan bireylerden yanak içi sürüntü örnekleri alınmadan önce çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgi verilmiştir. Gönüllü katılımcı olmaları halinde, kendi iradeleriyle bu çalışmaya katıldıklarını gösteren bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmış ve kişisel bilgilere ait anket formu doldurulmuştur.

4.2. 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 edilmiştir. Semen analizi Tablo 4.1’de yer alan WHO 2010 kriterlerine göre yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre vakalar Tablo 4.2’de yer alan kriterlere göre gruplandırılmıştır.

Sperm hacmine serolojik pipet ile bakılmıştır. Konsantrasyon ve hareketlilik analizi makler kamera üzerine 10 µl semen örneği konularak ışık mikroskopunda 40X objektif ile yapılmıştır. Konsantrasyon analizi, yatay veya dikey yan yana 10 adet kare içerisindeki sperm sayılarak yapılmış ve 10^6 ile çarpılarak mililitredeki konsantrasyon bulunmuştur. Doğru analiz için birbirinden uzak, en az 3 sıra 10 kare sayılıp ortalaması alınmıştır. Total sperm sayısı (konsantrasyon x hacim) $\geq 40 \times 10^6$ olan örnekler konsantrasyon açısından normal olarak belirlenmiştir. Hareketlilik analizi için 100 adet sperm sayılmış, her bir sperm ileri hareketli, yerinde hareketli ve hareketsiz olarak tanımlanmıştır. İleri hareketli sperm sayısı $\geq \%32$ olan örnekler hareketlilik açısından normal olarak belirlenmiştir. Morfoloji analizi için 10 µl sperm lama yayılmış, havada kurutulduktan sonra SpermacTM boya ile ilgili protokol izlenerek boyanmıştır (10 dk fiksasyon, 2 dk A boyası, 1 dk B boyası, 1 dk C boyası). Preparat kuruduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunda 100X objektif ile Kruger’in kesin kriterlerine (Kruger ve diğ., 1999) göre değerlendirme yapılmış ve normal morfolojiye sahip sperm sayısı >4 olanlar sperm morfolojisi açısından normal olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1. WHO 2010 Sperm Değerlendirme Kriterleri (Jungwirth ve diğ., 2013)

Hacim (ml)	$\geq 1,5$
Konsantrasyon ($\times 10^6 / \text{ml}$)	≥ 15
Total sperm sayısı (konsantrasyon x hacim)	≥ 40
İleri hareketlilik (%)	≥ 32
Total hareketlilik	≥ 40
Normal sperm morfolojisi (%)	≥ 4

Tablo 4.2. Sperm Parametrelerine Göre Hasta Grupları

Total sperm sayısı < 40	Oligozoospermi
İleri hareketlilik < %32	Astenozoospermi
Normal sperm morfolojisi < %4	Teratozoospermi

4.3. Spermde DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi

Sperm parametrelerinin yukarıda belirtildiği şekilde Özel İstanbul Tüp Bebek Merkezinde değerlendirilmesinin ardından, kullanılmayacak olan sperm örneklerinden 50-100 µl alınarak Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda Akridin turuncusu (AO) ile DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi yapılmıştır.

AO çift zincirli DNA ile etkileşime girer ve yeşil floresan sperm nükleusu tarafından emilir, protamin molekülleri arasındaki disülfid bağlarının az olduğu immatür nükleus ise kolayca denatüre olur ve sperm DNA'sı kolayca tek zincirli hal alır. Bu durumda AO molekülleri nükleusta agregatlar oluşturur ve floresanın rengi turuncuya dönüşür (Talebi ve diğ., 2007).

Boyama amacıyla 15 µl sperm lamlara yayılmış ve havada kurutulan lamlar Metanol: Asetik asit (3:1) fiksatif içerisinde gece boyu inkübe edilmiştir. 40 ml 0.1M sitrik asit, %37'lik HCl ile pH 2.5'a ayarlanmış 2.5 ml 0.3M Na₂HPO₄ ve distile suyla hazırlanmış 10 ml %1'lik AO karıştırılarak boyama solüsyonu hazırlanmıştır. Sperm yayılmış ve havada kurutulmuş lamların bu solüsyonda karanlık ortamda ve çalkalayıcıda (düşük hızda 5 dk) boyanmasının ardından iki kez %1'lik PBS ile çalkalayıcıda (düşük hızda 5 dk) yıkama yapılmıştır. Lamların fazla suyu peçete ile alınarak hemen lamel konulup kenarları renksiz oje ile kapatılarak lamel sabitlenmiştir. Lamlar kuruduktan sonra karanlık ortamda floresan mikroskopunda 40X objektif ile mümkün olduğunca çabuk sperm sayımı yapılmıştır. AO'nun absorpsiyonu (emiyon) 490 nm, eksitasyonu yeşil için 530 nm, turuncu için 640 nm olduğundan, yeşil spermeler 530 nm filtre kullanılarak, sarı-turuncu-kırmızı spermeler 640 nm filtre kullanılarak sayılmıştır. Sarı-turuncu-kırmızı boyanan spermeler fragmentasyonlu kabul edilirken (sperm DNA'sı kırık, tek zincirli DNA) yeşil boyananlar normal (sperm DNA'sı sağlam, çift zincirli DNA) olarak kabul

edilmiştir. Sarı-turuncu-kırmızı spermlerin toplamının tüm spermelere oranı hesaplanarak DNA fragmentasyon indeksleri (DFI) hesaplanmıştır. DNA fragmentasyonu pozitifliği için DFI \geq % 30 oranı sınır değer (cut off) olarak kabul edilmiştir.

4.4. Yanak İçi Epitel Hücrelerinden DNA İzolasyonu

Yanak içi sürüntü örneklerinden fenol-kloroform metodu ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, pamuklu çubuk ile alınan sürüntüler lizis tamponunda 1 gece bekletilip daha sonra proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek 55°C'de 30 dk-1saat arası inkübe edilmiştir. Tüplere 300 µl fenol eklenip 13000 g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra aköz faz yeni bir tüpe aktarılıp eşit hacimde kloroform eklenmiş ve 13000 g'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir Eppendorf tüpe aktarılıp üzerine 1/10 hacimde 3M sodyum asetat ve 0,6X izopropanol eklenmiştir (toplam hacmin 0,6'sı kadar). Gece boyu -20°C'de inkübasyon sonrasında tüpler 16000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Oluşan DNA'ya 500 µl %70'lik etanol eklenmiş ve 16000 g'de 10 dk santrifüj edilerek DNA yıkanmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra etanolün uçması için tüpler 15-20 dk kurumaya bırakılmış ve presipite olan DNA'ya 50 µl low TE tamponu eklenip 2-3 gün beklenerek DNA'nın tampon içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Agaroz jel elektroforezi ile görüntülenen DNA'lar PCR uygulanana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, çift iplikli DNA molekülünde, hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanarak Taq polimeraz enzimi, dört adet dNTP, enzim tamponu ve MgCl₂ varlığında hedef dizinin *in vitro* olarak çoğaltılmasıdır. Enzim tamponu, Taq polimeraz enziminin çalışması için ortam pH'sını ayarlarken MgCl₂, enzimin aktivasyonu için gerekli Mg⁺² iyonunu sağlar. Bir PCR döngüsü, denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama aşamalarından oluşur. Denatürasyon aşamasında yüksek sıcaklıkta (94-95°C) DNA'nın çift ipliği birbirinden ayrılır ve Taq polimeraz enzimi aktive olur. Sıcaklık hedef diziye komplementer primerlerin bağlanması için uygun sıcaklığa (55-65°C) düşürüldüğünde DNA'nın çift ipliği tekrar hibridize olmadan primerler DNA'ya bağlanır. Taq DNA polimeraz, sıcaklık enziminin ideal çalışma sıcaklığına (70-72°C) düşürüldüğünde primerlerin 3'OH ucuna dNTP'leri

ekleyerek diziyi 5'-3' yönünde uzatır. Her döngüde DNA molekülü üzerinde istenilen bölge iki katına çıkar. Sentezlenen her dizi bir sonraki döngüde primerler için kalıp görevi gördüğünden DNA miktarı PCR sonrası üstel olarak artar.

Bu tez çalışmasında Tablo 4.3'deki miktarlarda reaksiyon hazırlanarak Tablo 4.4'deki termal profil uygulanmıştır.

Tablo 4.3. PCR protokolü

Malzeme	Miktar
25 mM Mg ₂ Cl ₂	2.0 µl
5 mM dNTP karışımı	2.0 µl
SEPT474F (12.5 pmol/µl)	1.0 µl
SEPT474R (12.5 pmol/µl)	1.0 µl
10X Tampon ((NH ₄) ₂ SO ₄)	2,5 µl
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,2 µl
DNA	30-50 ng
dH ₂ O	25 µl'ye tamamlayacak kadar

Tablo 4.4. PCR'da uygulanan termal profil

Sıcaklık	Süre	Amaç
94 °C	5 dk	Enzim aktivasyonu
94 °C	30 sn	Denatürasyon
62,2 °C	45 sn	Primerlerin bağlanması
72 °C	30 sn	Uzama
72 °C	5 dk	Son uzama
+4 °C	sonsuz	Muhafaza etme

30 döngü

4.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Genomik DNA ve PCR ürünlerini yürütmek amacıyla toz agaroz sırasıyla %1 ve %2 konsantrasyonunda 0,5 X TBE solüsyonunda yüksek sıcaklıkta çözdürülmüş, çözelti 50°C'ye kadar soğutulup içine Etidyum bromür (0.5 mg/ml) eklendikten sonra jel tankına dökülmüştür. 8 µl örnek BPB içeren 2µl 10X yükleme boyası ile karıştırılıp polimerize olan jele yükelenmiş ve 120 V elektrik akımında 15-30 dk yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel, jel dokümantasyon cihazında UV ışığı altında incelenmiştir. Örneklerle birlikte kuyucuklardan birine yüklenen DNA markörüne göre elde edilen bantın boyunun istenilen uzunlukta olduğu kontrol edilmiştir.

4.7. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi

Primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan gen bölgesi, %2'lik (0,02 g/ml) agaroz jelde 20-30 dk elektroforez ile görüntülenmiş ve istenilen boyutta bant (292 bç) alınan örnekler (50 ng/µl) Apa1 (0,1 U/µl) restriksiyon enzimi ve 10X Tampon (1X) ile karıştırılıp 37°C'de 10 dk muamele edilerek kesimiştir. Apa1, 5'...G[~] TGCAC...3' veya 3'...CACGT[~] G...5' dizisini tanır ve G ve T nükleotidleri arasından DNA'yı keser. Kesilmiş örneklerde 155 ve 137 bç boyutlarında iki bant oluşur. Kodlayıcı bölgede 474 G>A polimorfizmi olan homozigot örnekler (AA genotipi) kesilmez (292 bç). Bu polimorfizmin görülmediği örnekler, yani homozigot GG genotipine sahip olanlar kesilir ve jelde iki bant görülür. Heterozigot örneklerde (GA) ise jelde 3 bant gözlenir (292, 155 ve 137 bç).

4.8. PCR Pürifikasyonu

PCR ürünlerinin saflaştırılması için kit protokolü uygulanmıştır: 50 µl PCR ürünü üzerine 250 µl Binding Buffer eklenip karışım kolon üzerine uygulanmış ve 14000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolondan geçen ve tüpte biriken sıvı dökülmüştür. Kolon üzerine absolüt etanol eklenmiş ve 250 µl Wash Buffer uygulanmıştır. 13000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolondan geçen ve tüpte biriken sıvı dökülmüştür. Kolon üzerine 100 µl Wash Buffer eklenip 13000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolon 1,5 ml'lik tüp içerisine konulup ve üzerine 40 ul Elution

Buffer eklenip 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 13000 g'de 1 dk santrifüj edilerek pürifiye PCR ürünü tüp içerisinde elde edilmiştir.

4.9. DNA ölçümleri

PCR pürifikasyonu sonrası dizi analizi yapılacak örneklerin konsantrasyonları Qubit® dsDNA BR Assay kit (2-1000 ng DNA için) protokolüne uygun olarak Qubit® cihazı ile belirlenmiştir. Buna göre, her örnek ve iki adet standart için 199 µl dilüsyon tamponu ve 1 µl florofor boya içeren reaktif karıştırılıp çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Cihazın kalibrasyonu için 190 µl çalışma solüsyonu ile 10 µl standart 1 ve 2 ışımıyı geçiren tüplerde karıştırılıp 2 dk beklenerek cihaza önce standart 1 (0 ng/µl), sonra standart 2 (100 ng/µl) okutulmuştur. Ölçüm hacmi 200 µl olduğundan her örnek için 1-20 µl arası DNA ve 200 µl'ye tamamlayacak kadar çalışma solüsyonu konulup 2 dk beklenerek tüpler cihaza okutulmuştur. Örneklerin konsantrasyonları otomatik olarak ng/µl olarak belirlenmiştir.

4.10. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi, Sanger sekans yöntemi ile kapiler elektroforez cihazında (ABI310) yapılmıştır. İleri primer kullanılarak tek yönlü okuma gerçekleştirilmiştir.

İlgili gen bölgesi için primerler aracılığıyla DNA PCR ile çoğaltılırken 3' ucunda her biri farklı floresan ile işaretlenmiş ddNTP'lerden biri olan çeşitli boylarda fragmentler oluşur. Bu fragmentler polimer ile dolu kapilere enjekte edilir ve elektroforez gerçekleştirilir. Negatif yüklü DNA pozitif yüke doğru göç ederken ddNTP'lerdeki floresan boyalar lazer aracılığıyla belirlenir ve elde edilen veri cihaz tarafından diziye dönüştürülür. Bu amaçla BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit protokolü uygulanmıştır. Tablo 4.5'deki miktarlarda reaksiyon hazırlanarak ve Tablo 4.6'daki termal profil kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.5. Dizi analizi reaksiyonu

Malzeme	Miktar
Kullanıma hazır reaksiyon karışımı (2,5X) (dNTP'ler, floresan işaretli ddNTP'ler, AmpliTaq® DNA Polimeraz)	4 µl
BigDye Sekans Tamponu (5X)	2 µl
Primer (1 pmol/ul)	3,6 µl
DNA	3-10 ng
dH ₂ O	20 µl'ye tamamlayacak kadar

Tablo 4.6. Dizi analizi termal profili

Sıcaklık	Süre	Amaç
96 °C	1 dk	Başlangıç denatürasyonu
96 °C	10 sn	denatürasyon
50 °C	5 sn	primerlerin bağlanması
60 °C	4 dk	Uzama
+4 °C	sonsuz	Muhafaza etme

} 25 döngü

Örnekleri dizi analizi cihazına yüklemeye önce bağlanmamış floresan işaretli ddNTP'ler ve fazla tuzun örneklerden uzaklaştırılması gerekir. Aksi halde kapilerde DNA dizisi ile yarışabilirler ve sonuçlarda floresan kirliliği oluşturabilirler. Bu amaçla BigDye® XTerminator™ Purification Kit kullanılmıştır. Kit protokolünde yazdığı üzere örnekler üzerine 90 µl SAM™ ve 20 µl XTerminator™ solüsyonu konulup plate üzeri seal ile kapatılmış ve 30 dk plate vorteksinde B modunda çalkalanmıştır. 1000 g'de 1 dk santrifüj edilip kapiler elektroforez cihazına yüklenmiştir.

4.11. İstatistiksel Değerlendirme

RFLP sonuçları agaroz jel kullanılarak belirlenmiştir. Bu işlem hasta ve sağlıklı popülasyonda tamamlandıktan sonra genotip dağılımları açısından hasta ve kontrol vakalarının Hardy-Weinberg dengesine uygunlukları test edilmiştir.

Asosiasyon analizlerinde 4 model uygulanmıştır:

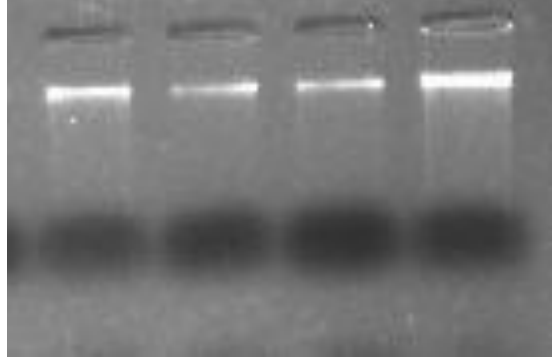
- 1) GG ve AA genotiplerinin aynı etkiye sahip olduğunun varsayıp GA genotipine sahip olmanın riski ile GG ve GA genotiplerinin aynı etkiye sahip olduğunun varsayıp AA genotipine sahip olmanın riskinin verildiği kodominant model,
- 2) GA genotipinin r kat risk, AA genotipinin $2r$ kat risk taşıdığı kabul edildiği aditif model,
- 3) Tek A alleli taşımanın oluşturduğu artmış riski hesaplayan dominant model (GG ve GA+AA genotipleri karşılaştırılır),
- 4) A allelinin hastalık oluşturması için iki kopya bulunması gerektiğinin kabul edildiği resesif model (GG+GA ve AA genotipleri karşılaştırılır).

Sperm parametrelerinin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testiyle analiz edilmiştir. Dominant, resesif modelde sperm parametreleri karşılaştırmalarında normal dağılıma uyanlar için t-test, uymayanlar için Mann-Whitney U testi; kodominant modelde sperm parametreleri karşılaştırmaları için normal dağılıma uyanlar için One Way Anova, uymayanlar için Kruskal-Wallis testleri kullanılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarında kodominant, aditif, dominant ve resesif modellerde sigara, alkol kullanımı, gebelik sonuçları, DNA fragmentasyonu ilişkileri Lojistik Regresyon analizi yapılarak karşılaştırılmıştır. Analizler SPSS21.0 programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

5. SONUÇLAR

5.1. DNA İzolasyonu

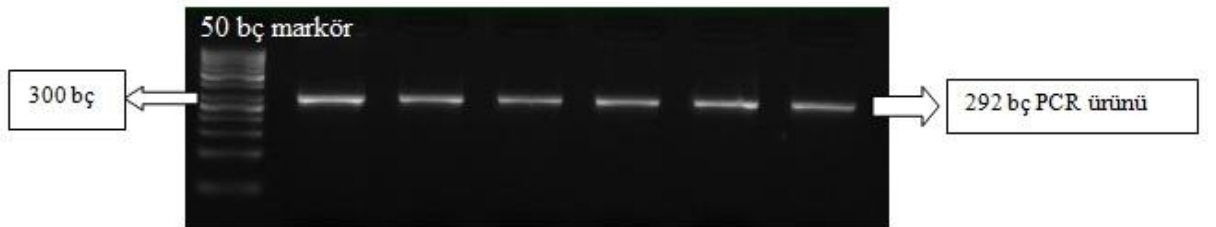
Yanak içi epitel hücrelerinden DNA izolasyonu sonrası örnekler %1'lik agaroz jele 5 µl (3 µl DNA + 2 µl 10X yükleme boyası) yüklenerek 15 dk 120 V'ta yürütülmüştür (Şekil 5.1). Bant görülen örnekler PCR yapılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 5.1. DNA izolasyonu sonrasında örneklerin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

5.2. PCR

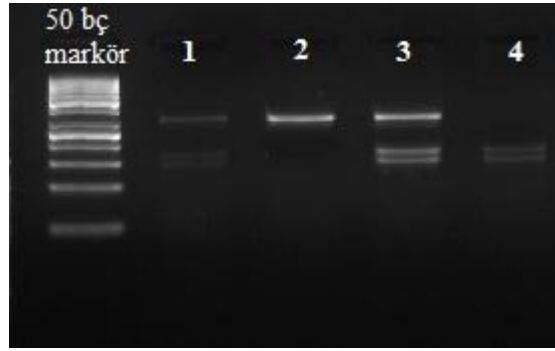
PCR sonrası örnekler %2'lik agaroz jele 10 µl (8 µl PCR ürünü + 2 µl 10X yükleme boyası) yüklenerek 20 dk 120 V'ta yürütülmüştür. 292 bç bant görülen örneklerle (Şekil 5.2) RFLP analizi yapılmıştır.



Şekil 5.2. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

5.3. RFLP

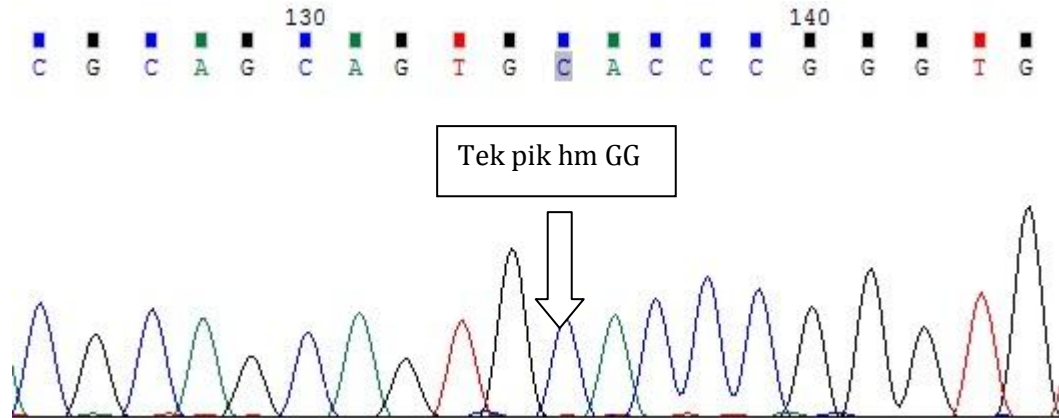
PCR sonrası 292 bç bant elde edilen örnekler Apal1 enzimiyle 10 dk 37°C'de kesilmiş ve kesim sonrası örnekler %2'lik agaroz jele 10 µl (8 µl kesim ürünü + 2 µl 10X yükleme boyası) yüklenerek 20-30 dk 120 V'ta yürütülmüştür. AA genotipine sahip homozigot örneklerde 292 bç'lik tek bant (Şekil 5.3'te 2 numaralı örnek), GA genotipine sahip heterozigot örneklerde 292, 155 ve 137 bç'lik üç bant (Şekil 5.3'te 1 ve 3 numaralı örnekler) ve GG genotipine sahip homozigot örneklerde ise 155 ve 137 bç'lik iki bant (Şekil 5.3'te 4 numaralı örnek) görülmüştür.



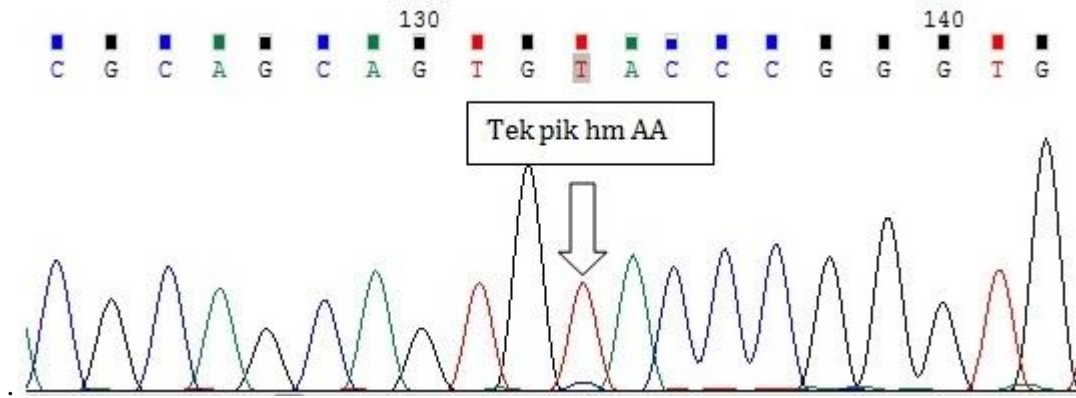
Şekil 5.3. Apal1 ile kesim sonrası %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

5.4. Dizi Analizi

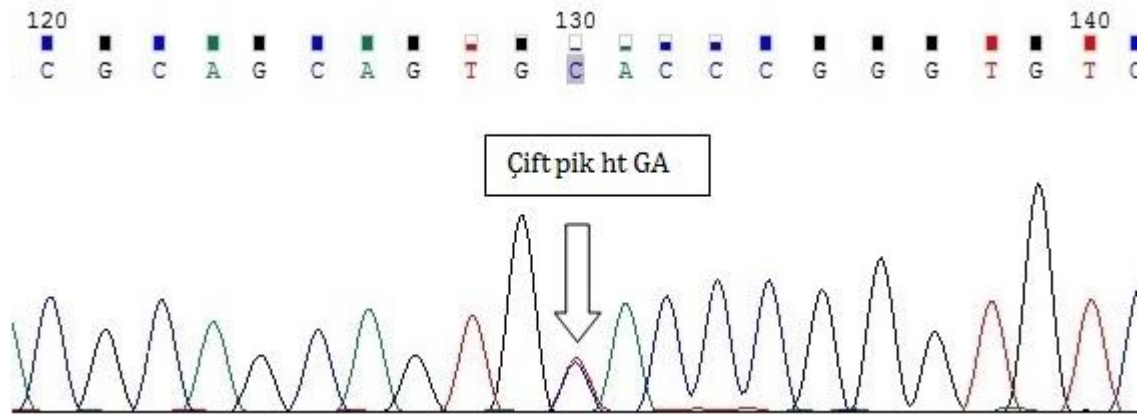
RFLP analizinin doğruluğunu kanıtlamak üzere örneklere dizi analizi yapılmış ve elektroferogram görüntülerinde ilgili nükleotid için tek pik (homozigot) (Şekil 5.4 ve 5.5) veya çift pik (heterozigot) (Şekil 5.6) varlığına göre örneklerin genotipleri belirlenmiştir.



Şekil 5.4. Homozigot GG örneğinin dizi analizinde elektroferogram görüntüsü



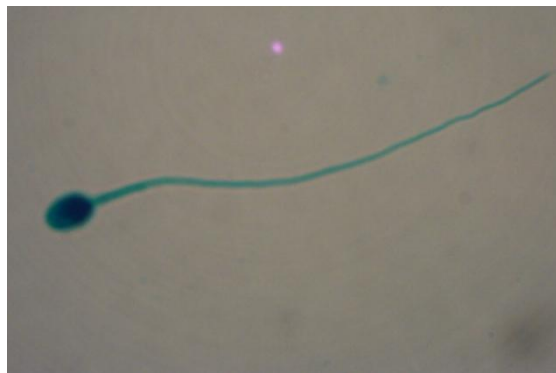
Şekil 5.5. Homozigot AA örneğinin dizi analizinde elektroferogram görüntüsü



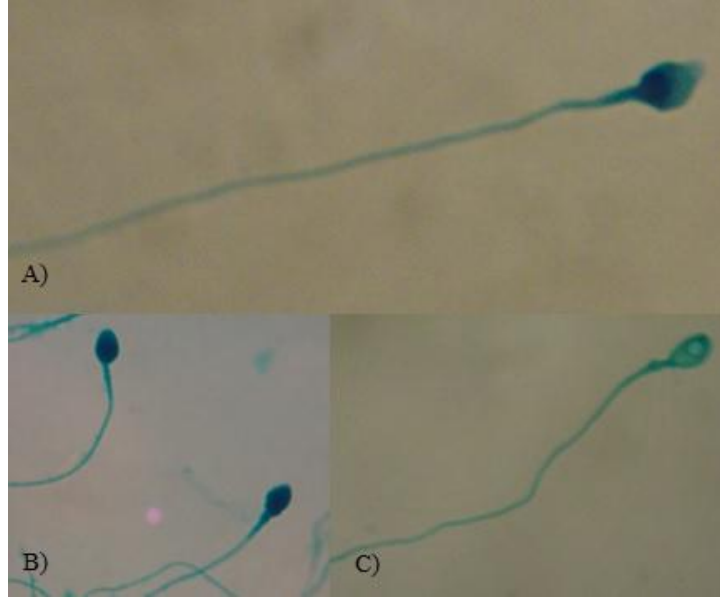
Şekil 5.6. Heterozigot GA örneğinin dizi analizinde elektroferogram görüntüsü

5.5. Spermde Morfoloji Değerlendirme

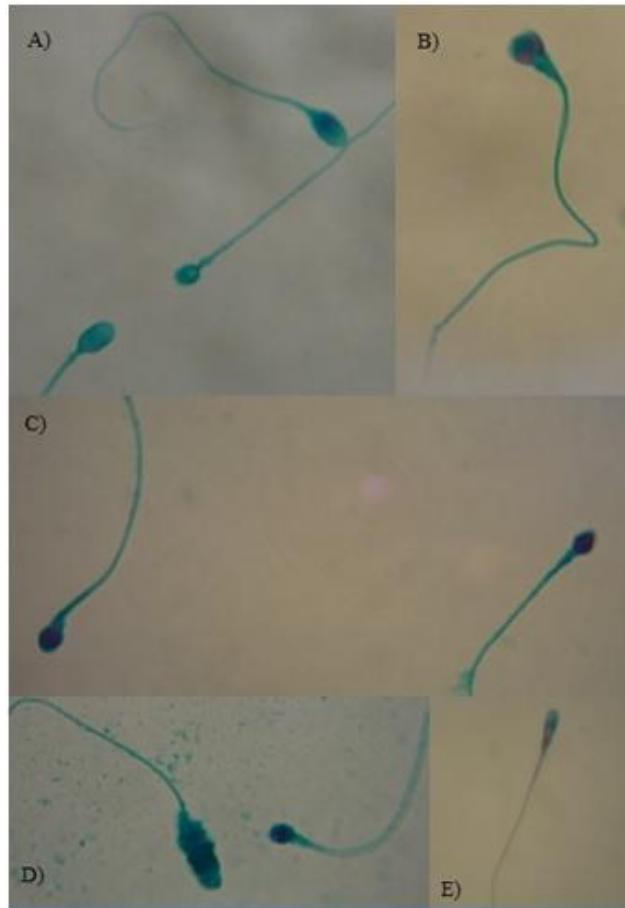
Spermde morfoloji değerlendirilirken Kruger'in kesin kriterlerine göre değerlendirme yapılmıştır. Preparatlar ışık mikroskopunda 100X büyütmede değerlendirilip fotoğraflanmıştır. Normal sperm Şekil 5.7'de, hastalarda görülen baş, boyun ve kuyruk anomalileri sırasıyla Şekil 5.8, 5.9, 5.10, 5.11'de gösterilmiştir.



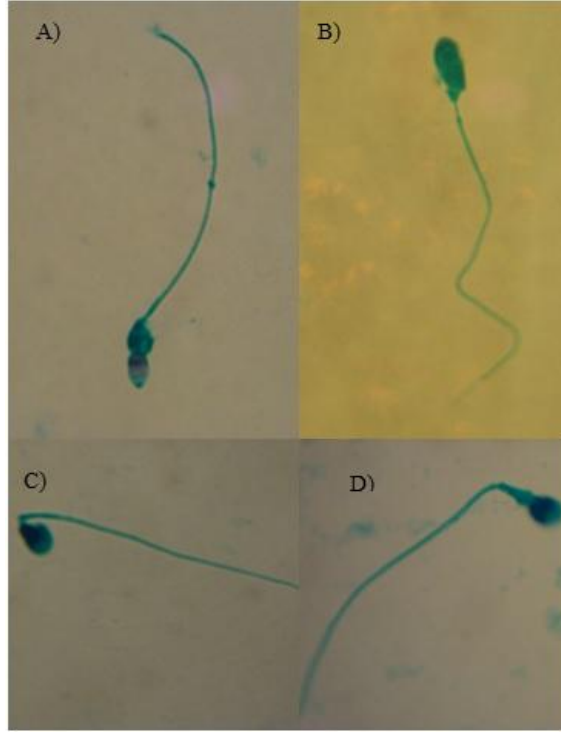
Şekil 5.7. Normal sperm görüntüsü



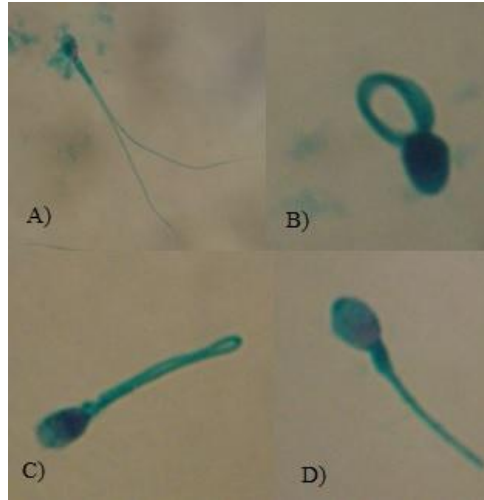
Şekil 5.8. Spermde çeşitli akrozom anomalileri. A) Akrozomal kist, B) İrregüler akrozomal dağılım, C) Akrozomal vakuol



Şekil 5.9. Spermde çeşitli baş anomalileri. A) Küçük baş (ortada), B) Çift baş, C) Yuvarlak baş (akrozomun total yokluğu), D) Amorf ve büyük baş (solda), E) Uzun baş



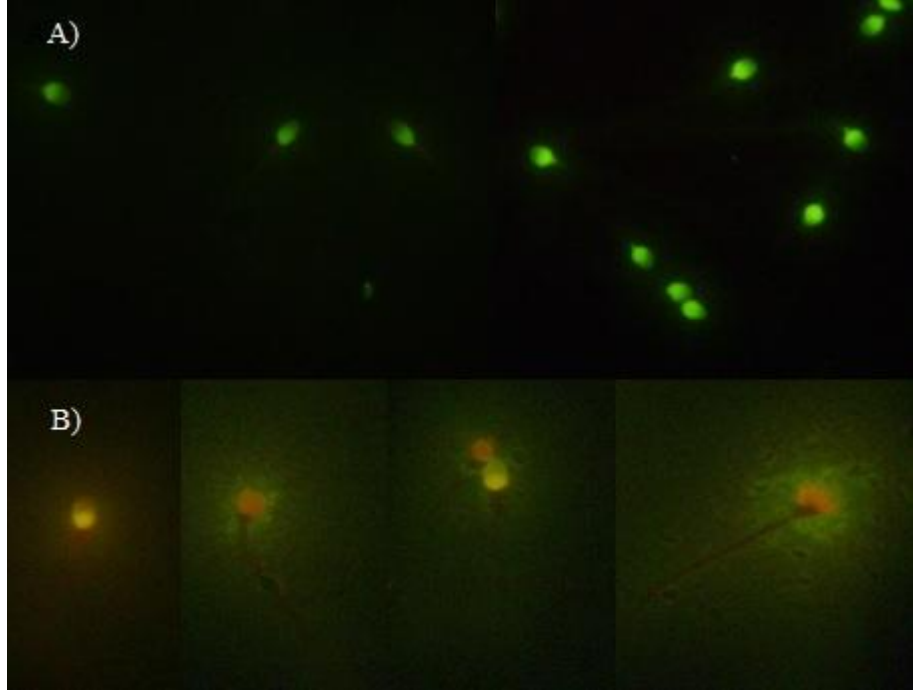
Şekil 5.10. Spermde çeşitli boyun anomalileri. A) Sitoplazmik droplet, B) Mitokondriyal kayıp (ince boyun), C) Kırık boyun (bent neck), D) Kalın boyun



Şekil 5.11. Spermde çeşitli kuyruk anomalileri. A) Çift kuyruk, B) Dag defekti, C) Kıvrık kuyruk (coiled tail), D) Kısa kuyruk

5.6. Spermde DNA Fragmentasyonunun Değerlendirilmesi

AO ile boyama sonrası preparatlar floresan mikroskopunda 40X objektif ile değerlendirilip fotograflanmıştır. DNA hasarı bulunmayan (çift zincirli DNA) spermeler yeşil renk, DNA hasarı bulunan (tek zincirli DNA) spermeler sarı-turuncu-kırmızı renk olarak görüntülenmiştir (Şekil 5.12).



Şekil 5.12. DNA fragmentasyonunun AO boyama ile değerlendirilmesi. A) DNA hasarı bulunmayan sperm, B) DNA hasarı bulunan sperm

5.7. İstatistiksel Bulgular

5.7.1. Hasta ve Kontrol Gruplarında Genotip Dağılımları

115 kişiden oluşan tüm infertil hasta grubunda ortalama yaş $32,9 \pm 4,5$, 164 kişiden oluşan kontrol grubunda ise $32,9 \pm 5,4$ yaş bulunmuştur. Eşlerinin yaş ortalaması ise tüm infertil hasta grubunda $29,8 \pm 4,2$, kontrol grubunda $29,5 \pm 5,2$ yaş bulunmuştur.

45 kişiden oluşan oligozoospermi hasta grubunda ortalama yaş $32,6 \pm 4,9$, eşlerinin yaşları ortalaması $29,4 \pm 4,1$ yaş bulunmuştur.

74 kişiden oluşan astenozoospermi hasta grubunda ortalama yaş $33,1 \pm 4,9$, eşlerinin yaşları ortalaması $30,1 \pm 4,2$ yaş bulunmuştur.

48 kişiden oluşan teratozoospermi hasta grubunda ortalama yaş $33,0 \pm 4,4$, eşlerinin yaşları ortalaması $30,1 \pm 4,3$ yaş bulunmuştur.

16 kişiden oluşan açıklanamayan infertilite hasta grubunda ortalama yaş $32,9 \pm 5,9$, eşlerinin yaşları ortalaması $29,5 \pm 5,2$ yaş bulunmuştur.

Tüm infertil ve kontrol grupları, genotip dağılımları açısından Hardy-Weinberg dengesinde çıkmıştır (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Tüm infertil ve kontrol gruplarında genotip ve allel frekansları

	Genotip Frekansları			Allel Frekansları		χ^2	HWP (%95 C.I.)
	GG	AA	GA	G	A		
Hasta (115 kişi)	43 (%37,4)	12 (%10,4)	60 (%52,2)	103 (%89,6)	72 (%62,6)	1,80	0,17
Frekans	0,37	0,10	0,52	0,63	0,37		
Kontrol (164 kişi)	68 (%41,5)	13 (%7,9)	83 (%50,6)	151 (%92,1)	96 (%58,5)	3,23	0,072
Frekans	0,41	0,079	0,50	0,67	0,33		

Hasta gruplarında kodominant, aditif, dominant ve resesif modeller kullanılarak erkek infertilitesi analiz edilmiş, ancak hiçbir modelde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 5.2).

Tablo 5.2. Hasta gruplarında kodominant, aditif, dominant ve resesif modeller ile erkek infertilitesi analizi

Hasta Grupları		B	S.E.	Wald	Df	Sig. (p)	Exp(B) (O.R.)	95% C.I.		
								En düşük	En yüksek	
Tüm infertiliter	Kodominant Model	GG			,785	2	,675			
		GA	,134	,258	,269	1	,604	1,143	,689	1,896
		AA	,378	,445	,722	1	,396	1,460	,610	3,493
	Aditif Model		,168	,194	,744	1	,388	1,182	,808	1,730
	Dominant Model		,171	,250	,468	1	,494	1,186	,727	1,934
	Resesif Model		,303	,420	,518	1	,472	1,353	,594	3,084
	Oligozoospermi	Kodominant Model	GG			,795	2	,672		
GA			- ,295	,350	,710	1	,399	,745	,375	1,478
AA			- ,338	,686	,243	1	,622	,713	,186	2,736
Aditif Model		- ,232	,278	,695	1	,404	,793	0,460	1,368	
Dominant Model		- ,300	,338	,791	1	,374	,741	0,382	1,436	
Resesif Model		- ,187	,664	,079	1	,778	,830	0,226	3,048	
Astenozoospermi		Kodominant Model	GG			,740	2	,691		
	GA		-,139	,296	,220	1	,639	,870	-,139	,296
	AA		,268	,498	,290	1	,590	1,308	,268	,498
	Aditif Model		,028	,222	,016	1	,901	1,028	,028	,222
	Dominant Model		-,023	,283	,007	1	,936	,977	-,023	,283
	Resesif Model		,394	,452	,760	1	,383	1,484	,394	,452
	Teratozoospermi	Kodominant Model	GG			2,412	2	,299		
GA			,563	,363	2,408	1	,121	1,756	,563	,363
AA			,402	,643	,391	1	,532	1,495	,402	,643
Aditif Model		,338	,268	1,594	1	,207	1,402	,338	,268	
Dominant Model		,593	,355	2,791	1	,095	1,809	,593	,355	
Resesif Model		,220	,549	,160	1	,689	1,246	,220	,549	
Açıklanamayan infertilite grubu		Kodominant Model	GG			,072	2	,965		
	GA		-,291	1,111	,069	1	,793	,747	,085	6,595
	AA		-,066	,543	,015	1	,904	,936	,323	2,713
	Aditif Model		-,032	,273	,013	1	,908	,969	,567	1,656
	Dominant Model		-,094	,528	,031	1	,859	,911	,323	2,565
	Resesif Model		-,256	1,072	,057	1	,812	,774	,095	6,336

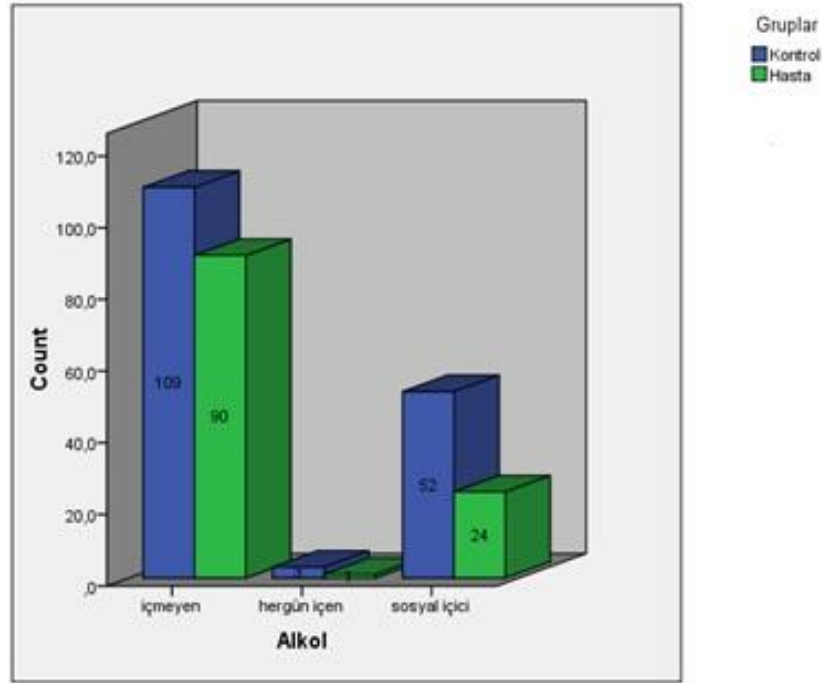
5.7.2. Çevresel Faktörlerin İnfertiliteye Etkisi

Alkol kullanımı açısından tüm infertil ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,033$). Bu tez çalışmasında kontrol grubunda alkol kullanan (sosyal içici ve hergün içen) bireylerin sayısı tüm hastalara kıyasla daha fazla bulunmuştur (sırasıyla, % 33,5 ve %21,7). Hasta grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise gruplar arasında alkol kullanımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.3).

Tablo 5.3. Alkol kullanımının erkek infertilitesine etkisi

Gruplarda Alkol Kullanımı	B	S.E.	Wald	Df	Sig. (p)	Exp(B) (O.R.)	95% C.I.	
							En düşük	En yüksek
Tüm infertililer	-,597	,280	4,541	1	,033 *	,551	,318	,953
Oligozoospermi	-,444	,384	1,338	1	,247	,641	0,302	1,362
Astenozoospermi	-,526	,322	2,666	1	,103	,591	,314	1,111
Teratozoospermi	-,529	,381	1,926	1	,165	,589	,279	1,244
Açıklanamayan infertilite grubu	-,782	,662	1,399	1	,237	,457	,125	1,672

Tüm infertil ve kontrol gruplarının alkol alışkanlıkları Şekil 5.13'te sunulmuştur.



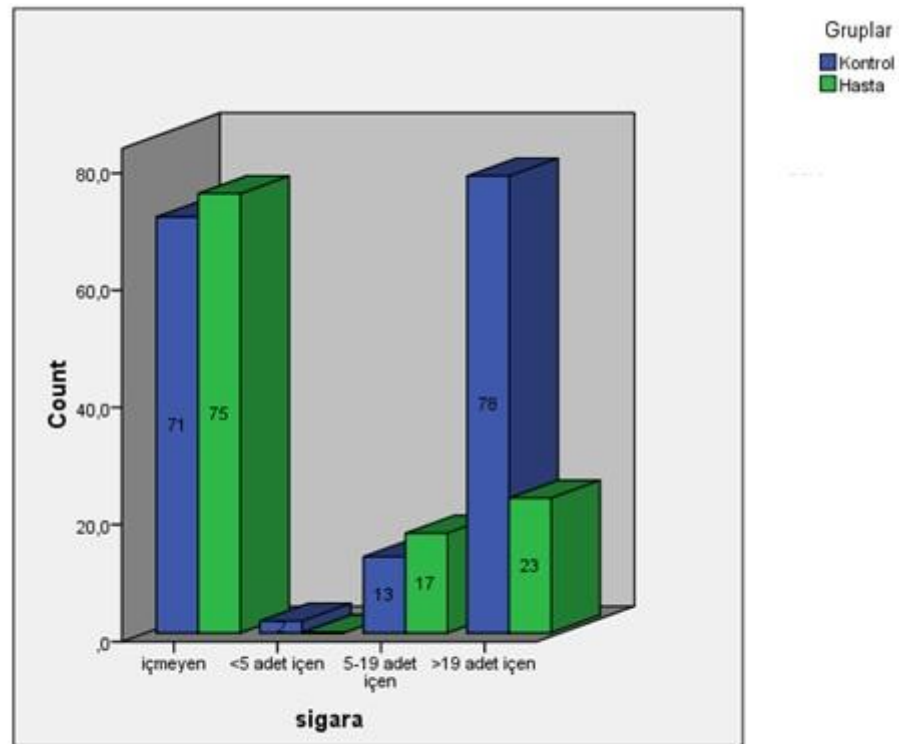
Şekil 5.13. Tüm infertil ve kontrol gruplarında alkol kullanımı

Sigara kullanımı açısından tüm infertil ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,00$). Bu tez çalışmasında kontrol grubunda sigara kullanan bireylerin sayısı tüm infertil hastalara kıyasla daha fazla bulunmuştur (sırasıyla, % 57,3 ve %34,8) (Şekil 5.14). Sperm parametrelerine göre ayrılan hasta grupları ve kontrol grubu arasında da sigara kullanımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 5.4). Gruplar arasında sigara kullanımı istatistiksel olarak koruyucu faktör olarak bulunsa da bunu açıklayacak herhangi bir biyolojik mekanizma yoktur. Bu hastalarda infertilitede muhtemelen diğer genetik faktörler etkilidir.

Tablo 5.4. Sigara kullanımının erkek infertilitesine etkisi

Gruplarda Sigara Kullanımı	B	S.E.	Wald	Df	Sig. (p)	Exp(B) (O.R.)	95% C.I.	
							En düşük	En yüksek
Tüm infertiller	-,923	,252	13,480	1	,000*	,397	,243	,650
Oligozoospermi	-,890	,349	6,490	1	,011*	,411	0,207	0,814
Astenozoospermi	-1,091	,297	13,528	1	,000*	,336	,188	,601
Teratozoospermi	-,718	,335	4,597	1	,032*	,488	,253	,940
Açıklanamayan infertilite grubu	-1,761	,660	7,127	1	,008*	,172	,047	,626

Tüm infertil ve kontrol gruplarının sigara alışkanlıkları (günde <5 adet, 5-19 adet ve >19 adet sigara içen) Şekil 5.14'te sunulmuştur.



Şekil 5.14. Tüm infertil ve kontrol gruplarında sigara kullanımı

5.7.3. Genotip ile Sperm Konsantrasyonu İlişkisi

Tüm infertil, oligozoospermi, astenozoospermi gruplarında sperm konsantrasyonu normal dağılıma uymadığından Kruskal-Wallis testiyle incelenmiş, ancak bu gruplarda genotip ile sperm konsantrasyonu arasında ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.5). Teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında sperm konsantrasyonu normal dağılıma uyduğundan sperm konsantrasyonu ve genotip ilişkisi One Way Anova testi kullanılarak incelenmiş, ancak bu gruplarda

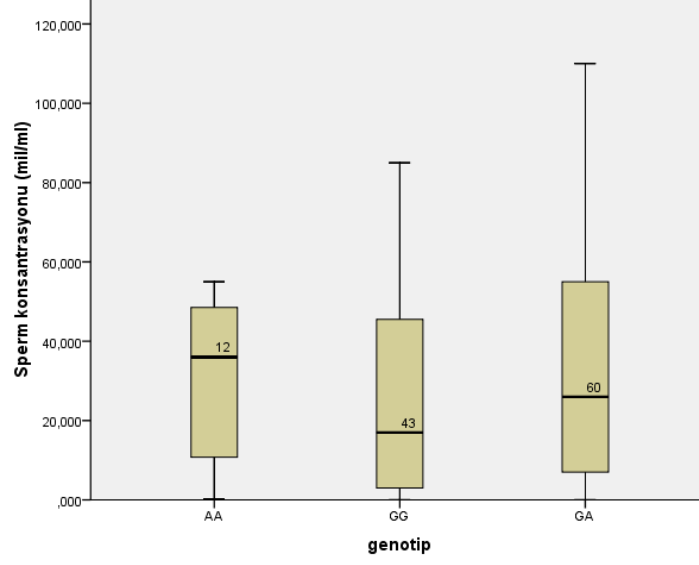
genotip ile sperm konsantrasyonu arasında ilişki bulunamamıştır ($p=0,65$) (Tablo 5.6). Tüm infertil hastalarda sperm konsantrasyonu ortalamalarının genotiplere göre dağılımı Şekil 5.15’te gösterilmiştir.

Tablo 5.5. Tüm infertil, oligozoospermi, astenozoospermi gruplarında genotip ile sperm konsantrasyonu ilişkisi

Hasta Grupları	Sperm Konsantrasyonu (mil/ml) Ortalama \pm SD		
Tüm infertiller	31,97 \pm 29,76	Chi-Square	,964
		df	2
		Asymp. Sig. (p)	,618
Oligozoospermi hasta grubu	5,12 \pm 6,03	Chi-Square	3,737
		df	2
		Asymp. Sig.(p)	,154
Astenozoospermi hasta grubu	19,97 \pm 23,77	Chi-Square	2,796
		df	2
		Asymp. Sig.(p)	,247

Tablo 5.6. Teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında genotip ile sperm konsantrasyonu ilişkisi

Hasta Grupları	Sperm Konsantrasyonu (mil/ml) Ortalama \pm S.D.	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig.(p)
Teratozoospermi	35,46 \pm 24,37	Gruplar arasında	228,104	2	114,052	,185	,831
		Grup içinde	27687,599	45	615,280		
		Total	27915,703	47			
Açıklanamayan infertilite grubu	62,31 \pm 26,34	Gruplar arasında	2643,938	2	1321,969	2,213	,149
		Gruplar içinde	7765,500	13	597,346		
		Total	10409,438	15			



Şekil 5.15. Tüm infertillerde sperm konsantrasyonu ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

Hasta gruplarında dominant model ile sperm konsantrasyonu analizi yapılmış ve açıklanamayan infertilite grubunda sperm konsantrasyonu açısından hastalar arasında istatistiksel olarak sınırdan anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,057$) (Tablo 5.7). GG genotipine sahip bireylerin sperm konsantrasyonu ortalamaları AA ve GA genotipine sahip bireylerin sperm konsantrasyonundan fazla bulunmuştur (Tablo 5.8). A alleli dominant etkiye sahip olduğunda sperm parametreleri normal olan hastalarda sperm konsantrasyonunda azalmaya yol açmaktadır. Diğer hasta gruplarında dominant model ile sperm konsantrasyonu incelendiğinde hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.7 ve Tablo 5.9).

Tablo 5.7. Hasta gruplarında dominant model ile sperm konsantrasyonu analizi

Hasta Grupları	Sperm Konsantrasyonu (mil/ml) Ortalama ± S.D.		
Tüm infertiller	31,97 ± 29,76	Mann-Whitney U	627,500
		Wilcoxon W	5880,500
		Z	-,314
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,754
Oligozoospermi hasta grubu	5,12 ± 6,03	Mann-Whitney U	177,500
		Wilcoxon W	453,500
		Z	-1,720
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,085
Astenozoospermi hasta grubu	19,97 ± 23,77	Mann-Whitney U	640,000
		Wilcoxon W	1168,000
		Z	-,349
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,727
Açıklanamayan infertilite grubu	62,31 ± 26,34	Mann-Whitney U	13,500
		Wilcoxon W	58,500
		Z	-1,907
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,057*

Tablo 5.8. Açıklanamayan infertilite olgularında A allelinin dominant etkisinin sperm konsantrasyonu ile ilişkisi

	Dominant	Sayı	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı
Sperm konsantrasyonu (mil/ml)	GG	7	11,07	77,50
	AA+GA	9	6,50	58,50
	Total	16		

Tablo 5.9. Teratozoospermi grubunda dominant model ile sperm konsantrasyonu analizi

Sperm konsantrasyonu Ortalama ± S.D.	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
	F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
								En düşük	En yüksek
35,46 ± 24,37	,333	,567	-,304	46	,762	-2,376050	7,814957	18,106743	13,354642

Hasta gruplarında resesif model ile sperm konsantrasyonu analizi yapılmış, ancak hasta gruplarında sperm konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.10).

Tablo 5.10. Hasta gruplarında resesif model ile sperm konsantrasyonu analizi

Hasta Grupları	Sperm konsantrasyonu (mil/ml) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	31,97 \pm 29,76	Mann-Whitney U	627,500
		Wilcoxon W	5880,500
		Z	-,314
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,754
Oligozoospermi hasta grubu	5,12 \pm 6,03	Mann-Whitney U	34,500
		Wilcoxon W	40,500
		Z	-1,301
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,193
Astenozoospermi hasta grubu	19,97 \pm 23,77	Mann-Whitney U	196,000
		Wilcoxon W	2341,000
		Z	-1,597
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,110
Teratozoospermi hasta grubu	35,46 \pm 24,37	Mann-Whitney U	84,000
		Wilcoxon W	99,000
		Z	-,794
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,427
Açıklanamayan infertilite grubu	62,31 \pm 26,34	Mann-Whitney U	1,000
		Wilcoxon W	2,000
		Z	-1,411
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,158

5.7.4. Genotip ile Ejakulat Hacmi İlişkisi

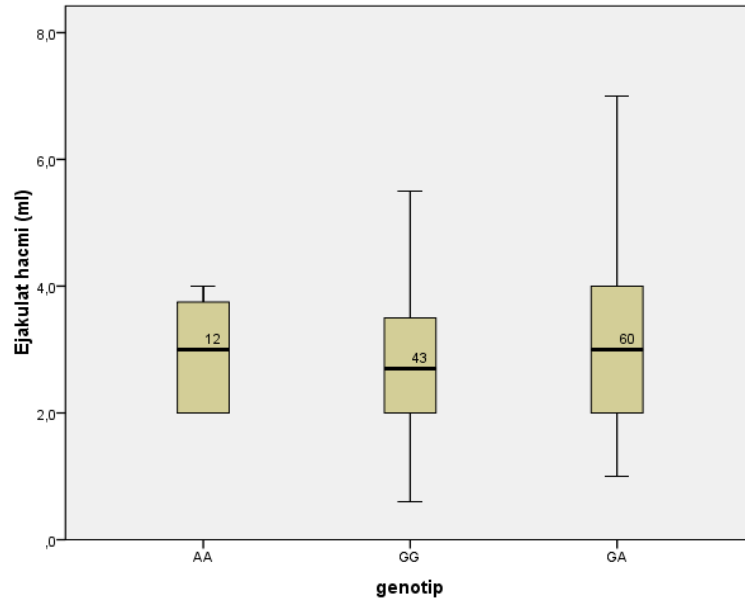
Hasta gruplarında genotip ile ejakulat hacmi arasında ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.11 ve Tablo 5.12). Tüm infertil hastalarda ejakulat hacmi ortalamalarının genotiplere göre dağılımı Şekil 5.16'da gösterilmiştir.

Tablo 5.11. Hasta gruplarında genotip ile ejakulat hacmi ilişkisi

Hasta Grupları	Ejakulat hacmi (ml) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	3,05 \pm 1,33	Chi-Square	,748
		Df	2
		Asymp. Sig.(p)	,688
Oligozoospermi hasta grubu	3,00 \pm 1,65	Chi-Square	1,301
		Df	2
		Asymp. Sig.(p)	,522
Astenozoospermi hasta grubu	2,92 \pm 1,28	Chi-Square	,174
		Df	2
		Asymp. Sig.(p)	,917
Teratozoospermi hasta grubu	3,00 \pm 1,11	Chi-Square	1,159
		Df	2
		Asymp. Sig.(p)	,560

Tablo 5.12. Açıklanamayan infertilite olgularında genotip ile ejakulat hacmi ilişkisi

Ejakulat hacmi (ml) Ortalama \pm S.D.	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig.(p)
3,07 \pm 1,19	Gruplar arasında	1,983	2	,991	,669	,529
	Gruplar içinde	19,267	13	1,482		
	Total	21,250	15			

**Şekil 5.16.** Tüm infertillerde ejakulat hacmi ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

Hasta gruplarında dominant ve resesif model ile ejakulat hacmi ortalamaları incelenmiş, ancak hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (sırasıyla, Tablo 5.13 ve 5.14; Tablo 5.15).

Tablo 5.13. Tüm infertil, oligozoospermi ve astenozoospermi gruplarında dominant model ile ejakulat hacmi analizi

Hasta Grupları	Ejakulat hacmi (ml) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	3,05 \pm 1,33	Mann-Whitney U	1400,000
		Wilcoxon W	2346,000
		Z	-,865
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,387
Oligozoospermi hasta grubu	3,00 \pm 1,65	Mann-Whitney U	212,500
		Wilcoxon W	465,500
		Z	-,933
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,351
Astenozoospermi hasta grubu	2,92 \pm 1,28	Mann-Whitney U	672,000
		Wilcoxon W	1575,000
		Z	,000
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	1,000

Tablo 5.14. Teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite olgularında dominant model ile ejakulat hacmi analizi

Hasta Grupları	Ejakulat hacmi (ml) Ortalama \pm S.D.	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
		F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
									En düşük	En yüksek
Teratozoospermi	3,00 \pm 1,11	1,288	,262	,217	46	,830	,0773	,3571	-,6415	,7961
Açıklanamayan infertilite grubu	3,07 \pm 1,19	10,196	,007	,916	14	,375	,55238	,60307	-,74107	1,84584

Tablo 5.15. Hasta gruplarında resesif model ile ejakulat hacmi analizi

Hasta Grupları	Ejakulat hacmi (ml) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	3,05 \pm 1,33	Mann-Whitney U	650,000
		Wilcoxon W	5903,000
		Z	-,116
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,908
Oligozoospermi hasta grubu	3,00 \pm 1,65	Mann-Whitney U	44,000
		Wilcoxon W	947,000
		Z	-,877
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,380
Astenozoospermi hasta grubu	2,92 \pm 1,28	Mann-Whitney U	263,500
		Wilcoxon W	308,500
		Z	-,486
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,627
Teratozoospermi hasta grubu	3,00 \pm 1,11	Mann-Whitney U	72,500
		Wilcoxon W	87,500
		Z	-1,196
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,232
Açıklanamayan infertilite grubu	3,07 \pm 1,19	Mann-Whitney U	1,500
		Wilcoxon W	2,500
		Z	-1,320
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,187

5.7.5. Genotip ile Total Sperm Sayısı İlişkisi

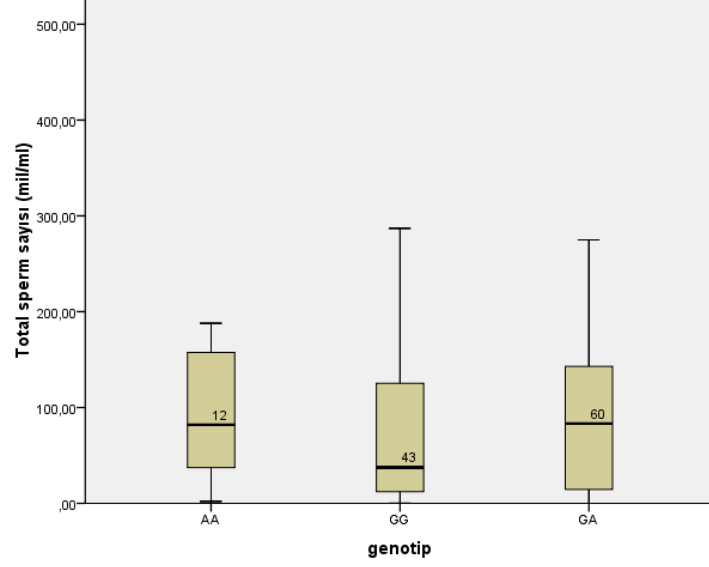
Hasta gruplarında genotip ile total sperm sayısı arasında ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.16 ve Tablo 5.17). Tüm infertil hasta grubunda total sperm sayısı ortalamalarının genotiplere göre dağılımı Şekil 5.17’de gösterilmiştir.

Tablo 5.16. Tüm infertil, oligozoospermi ve astenozoospermi gruplarında genotip ile total sperm sayısı ilişkisi

Hasta Grupları	Total sperm sayısı (kons. x hacim) Ortalama ± S.D.		
Tüm infertiller	91,78 ± 91,10	Chi-Square	1,195
		df	2
		Asymp. Sig. (p)	,550
Oligozoospermi hasta grubu	11,31 ± 11,04	Chi-Square	3,392
		Df	2
		Asymp. Sig.(p)	,183
Astenozoospermi hasta grubu	51,80 ± 57,99	Chi-Square	2,954
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,228

Tablo 5.17. Teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında genotip ile total sperm sayısı ilişkisi

Hasta Grupları	Total sperm sayısı (kons x hacim) Ortalama ± S.D.	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig.(p)
Teratozoospermi hasta grubu	103,44 ± 73,61	Gruplar arasında	2191,340	2	1095,670	,195	,823
		Grup içinde	252511,679	45	5611,371		
		Total	254703,019	47			
Açıklanamayan infertilite grubu	180,59 ± 83,07	Gruplar arasında	30155,520	2	15077,760	2,672	,107
		Gruplar içinde	73361,089	13	5643,161		
		Total	103516,609	15			



Şekil 5.17. Tüm infertillerde total sperm sayısı ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

Hasta gruplarında dominant ve resesif model ile total sperm sayısı analiz edilmiş, ancak hastalar arasında total sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (sırasıyla, Tablo 5.18 ve 5.19; Tablo 5.20).

Tablo 5.18. Tüm infertil, oligozoospermi, astenozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında dominant model ile total sperm sayısı analizi

Hasta Grupları	Total sperm sayısı (kons x hacim) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	91,78 \pm 91,10	Mann-Whitney U	1370,000
		Wilcoxon W	2316,000
		Z	-1,029
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,303
Oligozoospermi hasta grubu	11,31 \pm 11,04	Mann-Whitney U	180,000
		Wilcoxon W	456,000
		Z	-1,659
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,097
Astenozoospermi hasta grubu	51,80 \pm 57,99	Mann-Whitney U	642,500
		Wilcoxon W	1170,500
		Z	-,322
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,747
Açıklanamayan infertilite grubu	180,59 \pm 83,07	Mann-Whitney U	14,000
		Wilcoxon W	59,000
		Z	-1,855
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,064

Tablo 5.19. Teratozoospermi grubunda dominant model ile total sperm sayısı analizi

Total sperm sayısı (kons x hacim) Ortalama ± S.D.	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
	F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
								En düşük	En yüksek
103,44 ± 73,61	,794	,377	-,379	46	,706	-8,94874	23,59267	-56,43833	38,54085

Tablo 5.20. Hasta gruplarında resesif model ile total sperm sayısı analizi

Hasta Grupları	Total sperm sayısı (kons x hacim) Ortalama ± S.D.		
Tüm infertiller	91,78 ± 91,10	Mann-Whitney U	607,500
		Wilcoxon W	5860,500
		Z	-,490
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,624
Oligozoospermi hasta grubu	11,31 ± 11,04	Mann-Whitney U	77,500
		Wilcoxon W	87,500
		Z	-,180
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,857
Astenozoospermi hasta grubu	51,80 ± 57,99	Mann-Whitney U	190,000
		Wilcoxon W	2335,000
		Z	-1,696
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,090
Teratozoospermi hasta grubu	103,44 ± 73,61	Mann-Whitney U	82,000
		Wilcoxon W	97,000
		Z	-,861
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,389
Açıklanamayan infertilite grubu	180,59 ± 83,07	Mann-Whitney U	,000
		Wilcoxon W	1,000
		Z	-1,629
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,103

5.7.6. Genotip ile Sperm Hareketliliği İlişkisi

Hasta gruplarında genotipin total hareketli sperm sayısına etkisi bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.21).

Hasta gruplarında dominant ve resesif model ile total hareketli sperm sayısı analiz edilmiş, ancak hastalar arasında total hareketli sperm sayısı ortalamaları

açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (sırasıyla,Tablo 5.22 ve 5.23).

Tablo 5.21. Hasta gruplarında genotip ile total hareketli sperm sayısı ilişkisi

Hasta Grupları	Total hareketli sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	45,87 \pm 15,86	Chi-Square	1,662
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,436
Oligozoospermi hasta grubu	30,58 \pm 14,51	Chi-Square	,033
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,983
Astenozoospermi hasta grubu	37,87 \pm 14,37	Chi-Square	1,196
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,550
Teratozoospermi hasta grubu	49,58 \pm 12,28	Chi-Square	1,503
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,472
Açıklanamayan infertilite grubu	60,43 \pm 7,19	Mann-Whitney U	5,174
		Wilcoxon W	2
		Z	,075
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	5,174

Tablo 5.22. Hasta gruplarında dominant model ile total hareketli sperm sayısı analizi

Hasta Grupları	Total hareketli sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	45,87 \pm 15,86	Mann-Whitney U	1160,500
		Wilcoxon W	1980,500
		Z	-1,280
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,200
Oligozoospermi hasta grubu	30,58 \pm 14,51	Mann-Whitney U	176,000
		Wilcoxon W	366,000
		Z	-,132
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,895
Astenozoospermi hasta grubu	37,87 \pm 14,37	Mann-Whitney U	532,000
		Wilcoxon W	967,000
		Z	-,244
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,807
Teratozoospermi hasta grubu	49,58 \pm 12,28	Mann-Whitney U	202,500
		Wilcoxon W	307,500
		Z	-,817
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,414
Açıklamayan infertilite grubu	60,43 \pm 7,19	Mann-Whitney U	14,500
		Wilcoxon W	59,500
		Z	-1,868
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,062

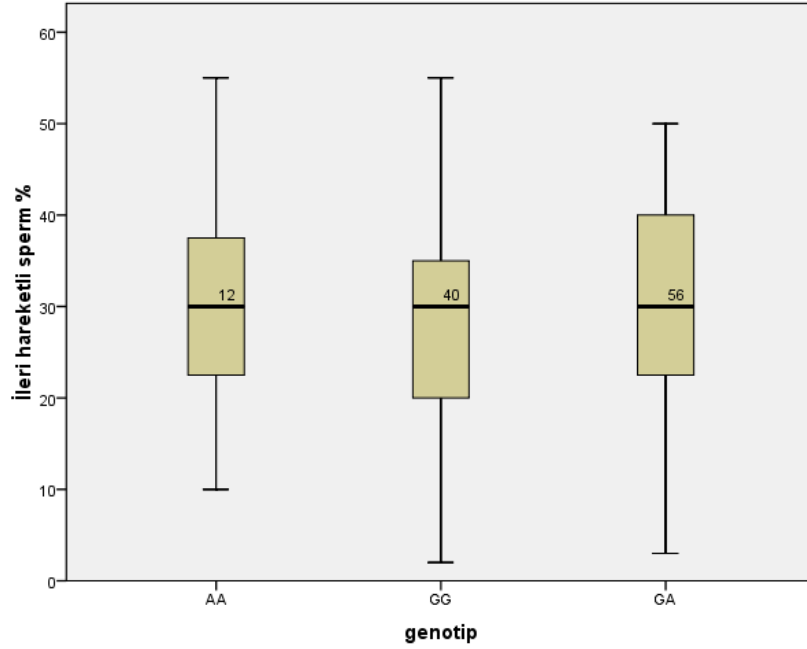
Tablo 5.23. Hasta gruplarında resesif model ile total hareketli sperm sayısı analizi

Hasta Grupları	Total hareketli sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	45,87 \pm 15,86	Mann-Whitney U	555,500
		Wilcoxon W	5211,500
		Z	-,202
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,840
Oligozoospermi hasta grubu	30,58 \pm 14,51	Mann-Whitney U	30,000
		Wilcoxon W	36,000
		Z	-1,255
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,210
Astenozoospermi hasta grubu	37,87 \pm 14,37	Mann-Whitney U	151,500
		Wilcoxon W	1921,500
		Z	-1,185
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,236
Teratozoospermi hasta grubu	49,58 \pm 12,28	Mann-Whitney U	84,000
		Wilcoxon W	94,000
		Z	-,160
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,873
Açıklanamayan infertilite grubu	60,43 \pm 7,19	Mann-Whitney U	,000
		Wilcoxon W	1,000
		Z	-1,689
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,091

Hasta gruplarında genotipin ileri hareketli sperm sayısına etkisi bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.24). Tüm hastalarda ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları Şekil 5.18’de gösterilmiştir.

Tablo 5.24. Hasta gruplarında genotip ile ileri hareketli sperm sayısı ilişkisi

Hasta Grupları	İleri hareketli sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	30,12 \pm 12,88	Chi-Square	2,016
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,365
Oligozoospermi hasta grubu	18,63 \pm 9,90	Chi-Square	,089
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,957
Astenozoospermi hasta grubu	22,28 \pm 8,98	Chi-Square	,290
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,865
Teratozoospermi hasta grubu	32,92 \pm 11,19	Chi-Square	2,121
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,346
Açıklanamayan infertilite grubu	42,81 \pm 7,06	Mann-Whitney U	3,590
		Wilcoxon W	2
		Z	,166
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	3,590



Şekil 5.18. Tüm infertillerde ileri hareketli sperm sayısı (%) ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

Hasta gruplarında dominant model ile ileri hareketli sperm sayısı analiz edilmiş, ancak hastalar arasında ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (sırasıyla, Tablo 5.25; 5.26).

Tablo 5.25. Tüm infertillerde dominant model ile ileri hareketli sperm sayısı analizi

İleri hareketli sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
	F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
								En düşük	En yüksek
30,12 \pm 12,885	,060	,807	-1,316	106	,191	-3,368	2,559	-8,441	1,705

Tablo 5.26. Hasta gruplarında dominant model ile ileri hareketli sperm sayısı analizi

Hasta Grupları	İleri hareketli sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.		
Oligozoospermi hasta grubu	18,63 \pm 9,90	Mann-Whitney U	175,000
		Wilcoxon W	365,000
		Z	-,162
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,871
Astenozoospermi hasta grubu	22,28 \pm 8,98	Mann-Whitney U	533,500
		Wilcoxon W	968,500
		Z	-,040
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,968
Teratozoospermi hasta grubu	32,92 \pm 11,19	Mann-Whitney U	539,500
		Wilcoxon W	974,500
		Z	-,150
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,881
Açıklanamayan infertilite grubu	42,81 \pm 7,06	Mann-Whitney U	16,000
		Wilcoxon W	61,000
		Z	-1,686
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,092

Hasta gruplarında resesif model ile ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları incelenmiş, ancak hastalar arasında ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.27).

Tablo 5.27. Hasta gruplarında resesif model ile ileri hareketli sperm sayısı analizi

Hasta Grupları	İleri hareketli sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	30,12 \pm 12,885	Mann-Whitney U	570,500
		Wilcoxon W	5226,500
		Z	-,054
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,957
Oligozoospermi hasta grubu	18,63 \pm 9,90	Mann-Whitney U	49,000
		Wilcoxon W	679,000
		Z	-,192
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,848
Astenozoospermi hasta grubu	22,28 \pm 8,98	Mann-Whitney U	232,500
		Wilcoxon W	1943,500
		Z	-,540
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,589
Teratozoospermi hasta grubu	32,92 \pm 11,196	Mann-Whitney U	66,500
		Wilcoxon W	76,500
		Z	-,815
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,415
Açıklanamayan infertilite grubu	42,81 \pm 7,06	Mann-Whitney U	2,000
		Wilcoxon W	3,000
		Z	-1,226
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,220

5.7.7. Genotip ile Sperm Morfolojisi İlişkisi

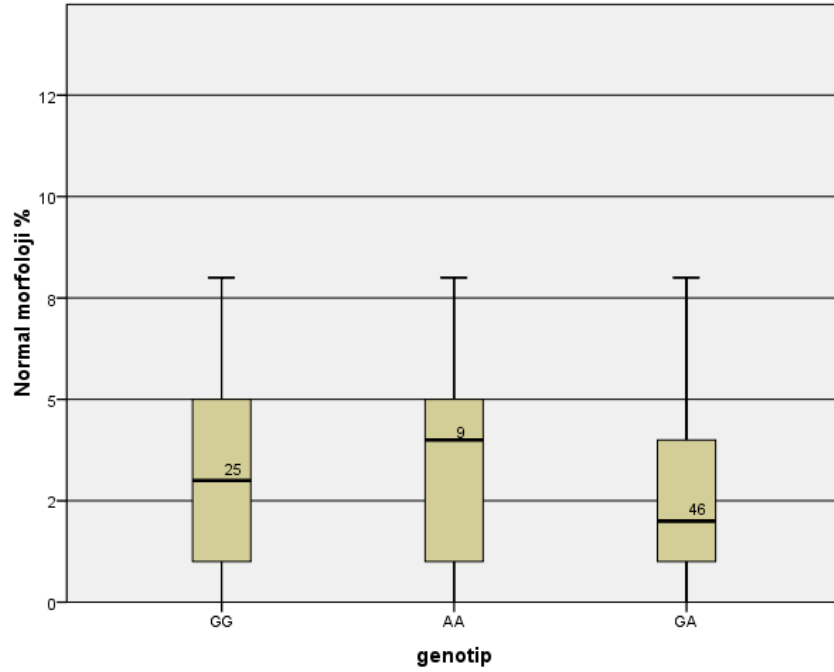
Hasta gruplarında genotipin normal morfolojiye etkisi bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.28 ve Tablo 5.29). Tüm infertil hasta grubunda normal morfolojiye sahip sperm sayısı ortalamalarının genotiplere göre dağılımı Şekil 5.19'da gösterilmiştir.

Tablo 5.28. Açıklanamayan infertilite grubunda genotip ile normal morfoloji ilişkisi

Normal morfolojiye sahip sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig.(p)
5,78 \pm 2,99	Gruplar arasında	3,157	2	1,579	,153	,860
	Gruplar içinde	113,200	11	10,291		
	Total	116,357	13			

Tablo 5.29. Hasta gruplarında genotip ile normal morfoloji ilişkisi

Hasta Grupları	Normal morfolojiye sahip sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	3,01 \pm 2,79	Chi-Square	1,684
		df	2
		Asymp. Sig. (p)	,431
Oligozoospermi hasta grubu	2,56 \pm 3,24	Chi-Square	2,721
		df	2
		Asymp. Sig. (p)	,257
Astenozoospermi hasta grubu	2,60 \pm 2,68	Chi-Square	,052
		df	1
		Asymp. Sig. (p)	,820
Teratozoospermi hasta grubu	1,33 \pm 1,13	Chi-Square	1,144
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,564



Şekil 5.19. Tüm infertillerde normal normolojiye sahip sperm (%) ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

Hasta gruplarında dominant model ile normal morfolojiye sahip sperm sayısı analiz edilmiş, ancak hastalar arasında normal morfolojiye sahip sperm ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 5.30 ve Tablo 5.31).

Tablo 5.30. Hasta gruplarında dominant model ile normal morfolojiye sahip sperm sayısı analizi

Hasta Grupları	Normal morfolojiye sahip sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	3,01 \pm 2,79	Mann-Whitney U	597,000
		Wilcoxon W	2137,000
		Z	-,950
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,342
Astenozoospermi hasta grubu	2,60 \pm 2,68	Mann-Whitney U	204,000
		Wilcoxon W	555,000
		Z	-,106
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,916
Teratozoospermi hasta grubu	1,33 \pm 1,13	Mann-Whitney U	233,500
		Wilcoxon W	828,500
		Z	-,106
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,916
Açıklanamayan infertilite grubu	5,78 \pm 2,99	Mann-Whitney U	10,500
		Wilcoxon W	55,500
		Z	-1,629
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,103

Tablo 5.31. Oligozoospermi grubunda dominant model ile normal morfolojiye sahip sperm sayısı analizi

Normal morfolojiye sahip sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
	F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
								En düşük	En yüksek
2,56 \pm 3,240	,270	,610	1,573	16	,135	2,364	1,503	-,822	5,549

Hasta gruplarında resesif model ile normal morfolojiye sahip sperm sayısı analiz edilmiş, ancak hastalar arasında normal morfolojiye sahip sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.32).

Tablo 5.32. Hasta gruplarında resesif model ile normal morfolojiye sahip sperm sayısı analizi

Hasta Grupları	Normal morfolojiye sahip sperm sayısı (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	3,01 \pm 2,79	Mann-Whitney U	278,500
		Wilcoxon W	2834,500
		Z	-,631
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,528
Oligozoospermi hasta grubu	2,56 \pm 3,24	Mann-Whitney U	3,500
		Wilcoxon W	4,500
		Z	-1,012
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,312
Astenozoospermi hasta grubu	2,60 \pm 2,68	Mann-Whitney U	111,000
		Wilcoxon W	741,000
		Z	-,396
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,692
Teratozoospermi hasta grubu	1,33 \pm 1,13	Mann-Whitney U	60,500
		Wilcoxon W	70,500
		Z	-1,065
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,287
Açıklanamayan infertilite grubu	5,78 \pm 2,99	Mann-Whitney U	6,000
		Wilcoxon W	7,000
		Z	-,126
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,900

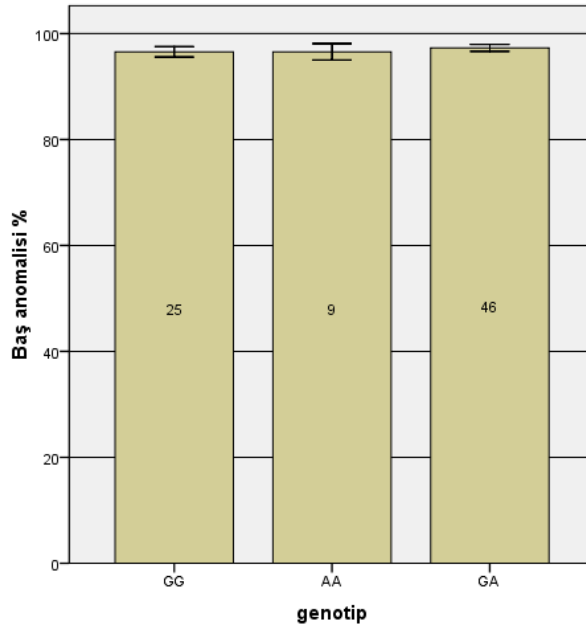
Hasta gruplarında genotipin spermde baş anomalilerine etkisi bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.33 ve Tablo 5.34). Tüm hastalarda spermde baş anomalileri ortalamalarının genotiplere göre dağılımı Şekil 5.20’de gösterilmiştir.

Tablo 5.33. Hasta gruplarında genotip ile spermde baş anomalileri ilişkisi

Hasta Grupları	Spermde baş anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	96,99 \pm 2,79	Chi-Square	1,684
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,431
Oligozoospermi hasta grubu	97,44 \pm 3,24	Chi-Square	2,721
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,257
Astenozoospermi hasta grubu	97,40 \pm 2,68	Chi-Square	,261
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,878
Teratozoospermi hasta grubu	98,67 \pm 1,13	Chi-Square	1,144
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,564

Tablo 5.34. Açıklanamayan infertilite grubunda genotip ile spermde baş anomalileri ilişkisi

Baş anomalisi (%) Ortalama \pm S.D.	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig.(p)
94,21 \pm 2,99	Gruplar arasında	3,157	2	1,579	,153	,860
	Gruplar içinde	113,200	11	10,291		
	Total	116,357	13			



Şekil 5.20. Tüm infertillerde baş anomalileri ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

Hasta gruplarında dominant model ile spermde baş anomalileri ortalamaları analiz edilmiş, ancak hastalar arasında baş anomalileri ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.35 ve 5.36).

Tablo 5.35. Hasta gruplarında dominant model ile spermde baş anomalileri analizi

Hasta Grupları	Spermde baş anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	97,02 \pm 2,76	Mann-Whitney U	608,500
		Wilcoxon W	933,500
		Z	-,829
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,407
Astenozoospermi hasta grubu	97,40 \pm 2,68	Mann-Whitney U	204,000
		Wilcoxon W	340,000
		Z	-,106
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,916
Teratozoospermi hasta grubu	98,67 \pm 1,13	Mann-Whitney U	233,500
		Wilcoxon W	338,500
		Z	-,106
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,916
Açıklanamayan infertilite grubu	94,21 \pm 2,99	Mann-Whitney U	10,500
		Wilcoxon W	55,500
		Z	-1,629
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,103

Tablo 5.36. Oligozoospermi grubunda dominant model ile spermde baş anomalileri analizi

Spermde baş anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
	F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
								En düşük	En yüksek
97,44 \pm 3,240	,270	,610	-1,573	16	,135	-2,364	1,503	-5,549	,822

Hasta gruplarında resesif model ile spermde baş anomalileri ortalamaları analiz edilmiş, ancak hastalar arasında baş anomalileri ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.37).

Tablo 5.37. Hasta gruplarında resesif model ile spermde baş anomalileri analizi

Hasta Grupları	Spermde baş anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertililer	97,02 \pm 2,760	Mann-Whitney U	275,000
		Wilcoxon W	320,000
		Z	-,685
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,493
Oligozoospermi hasta grubu	97,44 \pm 3,240	Mann-Whitney U	3,500
		Wilcoxon W	156,500
		Z	-1,012
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,312
Astenozoospermi hasta grubu	97,40 \pm 2,68	Mann-Whitney U	111,000
		Wilcoxon W	139,000
		Z	-,396
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,692
Teratozoospermi hasta grubu	98,67 \pm 1,136	Mann-Whitney U	60,500
		Wilcoxon W	1050,500
		Z	-1,065
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,287
Açıklanamayan infertilite grubu	94,21 \pm 2,99	Mann-Whitney U	6,000
		Wilcoxon W	97,000
		Z	-,126
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,900

Hasta gruplarında genotipin spermde boyun anomalilerine etkisi incelendiğinde diğer hasta grupları arasında boyun anomalileri ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken, teratozoospermi hastaları arasında boyun anomalileri ortalamaları açısından istatistiksel olarak sınırda anlamlılık bulunmuştur ($p=0,059$) (Tablo 5.38 ve Tablo 5.39). Bu hastaların genotip dağılımları incelendiğinde GG ve GA genotipine sahip bireyler arasında boyun anomalileri ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p=0,046$) (Tablo 5.40). GG genotipine sahip bireylerde boyun anomalileri ortalamaları GA genotipindeki bireylere göre daha fazla bulunmuştur (Tablo 5.40). Tüm infertil hasta grubunda spermde boyun anomalileri ortalamalarının genotiplere göre dağılımı Şekil 5.21’de gösterilmiştir.

Tablo 5.38. Tüm infertil ve oligozoospermi gruplarında genotip ile spermde boyun anomalileri ilişkisi

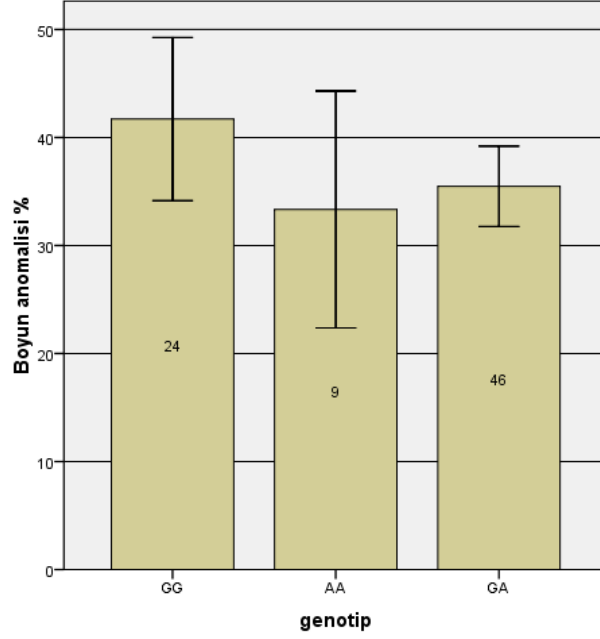
Hasta Grupları	Spermde boyun anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertililer	37,13 \pm 18,32	Chi-Square	1,713
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,425
Oligozoospermi hasta grubu	36,28 \pm 17,25	Chi-Square	1,460
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,482

Tablo 5.39. Astenozoospermi, teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında genotip ile spermde boyun anomalileri ilişkisi

Hasta Grupları	Boyun anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig.(p)
Astenozoospermi hasta grubunda	37,85 \pm 18,57	Gruplar arasında	592,589	2	296,294	,852	,43
		Grup içinde	13208,533	38	347,593		
		Total	13801,122	40			
Teratozoospermi hasta grubunda	42,40 \pm 18,23	Gruplar arasında	1850,792	2	925,396	3,028	,059*
		Grup içinde	13448,527	44	305,648		
		Total	15299,319	46			
Açıklanamayan infertilite grubu	29,79 \pm 15,05	Gruplar arasında	91,557	2	45,779	,177	,841
		Gruplar içinde	2852,800	11	259,345		
		Total	2944,357	13			

Tablo 5.40. Teratozoospermi grubunda boyun anomalileri ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

(I) Genotip	(J) Genotip	Ortalama Farkı (I-J)	S.E.	Sig. (p)	95% C.I.	
					En düşük	En yüksek
GG	GA	14,285*	5,805	,046*	,20	28,36
	AA	10,135	9,996	,572	-14,11	34,38
AA	GG	-10,135	9,996	,572	-34,38	14,11
	GA	4,150	9,306	,896	-18,42	26,72



Şekil 5.21. Tüm infertillerde boyun anomalileri (%) ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

Tüm infertil ve oligozoospermi gruplarında dominant model ile spermde boyun anomalilerini analiz edildiğinde hastalar arasında boyun anomalileri ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 5.41). Astenozoospermi grubunda boyun anomalileri ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken, teratozoospermi hastalarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p = 0,019$) (Tablo 5.42). Bu hastalarda GG genotipine sahip bireylerde boyun anomalileri ortalaması AA ve GA'ya göre daha fazla bulunmuştur (Tablo 5.43).

Tablo 5.41. Tüm infertil ve oligozoospermi gruplarında dominant model ile spermde boyun anomalileri analizi

Hasta Grupları	Spermde boyun anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	37,13 \pm 18,32	Mann-Whitney U	543,500
		Wilcoxon W	2083,500
		Z	-1,242
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,214
Oligozoospermi hasta grubu	36,28 \pm 17,25	Mann-Whitney U	34,500
		Wilcoxon W	62,500
		Z	-,362
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,717

Tablo 5.42. Astenozoospermi, teratozoospermi ve açıklanamayan infertilite gruplarında dominant model ile spermde boyun anomalileri analizi

Hasta Grupları	Boyun anomalileri (%) Ortalama ± S.D.	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
		F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
									En düşük	En yüksek
Astenozoospermi hasta grubu	37,85 ± 18,57	2,561	,118	1,307	39	,199	7,800	5,970	-4,276	19,876
Teratozoospermi hasta grubu	42,40 ± 18,23	1,414	,241	2,442	45	,019*	13,796	5,650	2,417	25,176
Açıklanamayan infertilite grubu	29,79 ± 15,05	,008	,929	,617	12	,548	5,311	8,601	-13,430	24,052

Tablo 5.43. Teratozoospermi grubunda dominant modelde boyun anomalileri ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

	Dominant	Sayı	Ortalama	S.D.	S.E.
Boyun anomalisi %	GG	13	52,38	21,152	5,867
	AA+GA	34	38,59	15,706	2,694

Hasta gruplarında resesif modelde spermde boyun anomalileri ortalamaları açısından hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.44).

Tablo 5.44. Hasta gruplarında resesif model ile spermde boyun anomalileri analizi

Hasta Grupları	Spermde boyun anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	37,13 \pm 18,32	Mann-Whitney U	270,000
		Wilcoxon W	315,000
		Z	-,695
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,487
Oligozoospermi hasta grubu	36,28 \pm 17,25	Mann-Whitney U	3,000
		Wilcoxon W	4,000
		Z	-1,061
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,289
Astenozoospermi hasta grubu	37,85 \pm 18,57	Mann-Whitney U	114,500
		Wilcoxon W	709,500
		Z	-,156
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,876
Teratozoospermi hasta grubu	42,40 \pm 18,23	Mann-Whitney U	84,500
		Wilcoxon W	1030,500
		Z	-,057
		(çift kuyruklu) (p)	,954
Açıklanamayan infertilite grubu	29,79 \pm 15,05	Mann-Whitney U	5,500
		Wilcoxon W	6,500
		Z	-,249
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,804

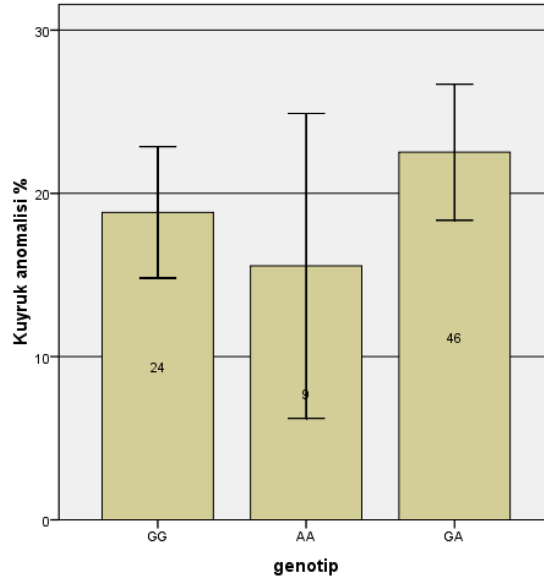
Hasta gruplarında genotipin spermde kuyruk anomalilerine etkisi bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.45 ve Tablo 5.46). Tüm infertil hasta grubunda spermde kuyruk anomalileri ortalamalarının genotiplere göre dağılımı Şekil 5.22’de gösterilmiştir.

Tablo 5.45. Hasta gruplarında genotip ile spermde kuyruk anomalileri ilişkisi

Hasta Grupları	Spermde kuyruk anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	20,61 \pm 15,76	Chi-Square	2,814
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,245
Oligozoospermi hasta grubu	28,61 \pm 18,50	Chi-Square	1,613
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,446
Astenozoospermi hasta grubu	24,59 \pm 18,94	Chi-Square	3,347
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,188
Teratozoospermi hasta grubu	22,77 \pm 15,50	Chi-Square	,273
		Df	2
		Asymp. Sig. (p)	,872

Tablo 5.46. Açıklanamayan infertilite grubunda genotip ile spermde kuyruk anomalileri ilişkisi

Kuyruk anomalileri anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig.(p)
15,00 \pm 9,66	Gruplar arasında	74,325	2	37,163	,359	,706
	Gruplar içinde	1139,675	11	103,607		
	Total	1214,000	13			



Şekil 5.22. Tüm infertillerde kuyruk anomalileri (%) ortalamalarının genotiplere göre dağılımı

Hasta gruplarında dominant model ile spermde kuyruk anomalileri analiz edildiğinde hastalar arasında kuyruk anomalilerinin ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.47 ve Tablo 5.48).

Tablo 5.47. Hasta gruplarında dominant model ile spermde kuyruk anomalileri analizi

Hasta Grupları	Spermde kuyruk anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	20,61 \pm 15,76	Mann-Whitney U	644,500
		Wilcoxon W	944,500
		Z	-,165
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,869
Oligozoospermi hasta grubu	28,61 \pm 18,50	Mann-Whitney U	25,000
		Wilcoxon W	53,000
		Z	-1,224
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,221
Astenozoospermi hasta grubu	24,59 \pm 18,94	Mann-Whitney U	190,500
		Wilcoxon W	541,500
		Z	-,122
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,903
Teratozoospermi hasta grubu	22,77 \pm 15,50	Mann-Whitney U	202,000
		Wilcoxon W	293,000
		Z	-,452
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,651

Tablo 5.48. Açıklanamayan infertilite grubunda dominant model ile spermde kuyruk anomalileri analizi

Spermde kuyruk anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
	F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
								En düşük	En yüksek
15,00 \pm 9,66	,571	,465	-,797	12	,441	-4,356	5,467	-16,268	7,557

Hasta gruplarında resesif model ile spermde kuyruk anomalileri analiz edildiğinde hastalar arasında kuyruk anomalilerinin ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.49).

Tablo 5.49. Hasta gruplarında resesif model ile spermde kuyruk anomalileri analizi

Hasta Grupları	Spermde kuyruk anomalileri (%) Ortalama \pm S.D.		
Tüm infertiller	20,61 \pm 15,76	Mann-Whitney U	186,000
		Wilcoxon W	222,000
		Z	-1,359
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,174
Oligozoospermi hasta grubu	28,61 \pm 18,50	Mann-Whitney U	8,000
		Wilcoxon W	9,000
		Z	-,097
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,923
Astenozoospermi hasta grubu	24,59 \pm 18,94	Mann-Whitney U	51,500
		Wilcoxon W	61,500
		Z	-,785
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,432
Teratozoospermi hasta grubu	22,77 \pm 15,50	Mann-Whitney U	73,000
		Wilcoxon W	83,000
		Z	-,209
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,834
Açıklanamayan infertilite grubu	15,00 \pm 9,66	Mann-Whitney U	3,500
		Wilcoxon W	94,500
		Z	-,748
		Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,455

Tablo 5.50’de tüm morfoloji anomalilerinin genotiplere göre dağılımı verilmiştir ve genotipin bu morfoloji anomalilerine etkisi bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 5.50. Tüm morfoloji anomalilerinin genotiplere göre dağılımı

Morfoloji Anomalileri	Genotip	N/ Total	Sıra Ortalaması	p	Morfoloji Anomalileri	Genotip	N/ Total	Sıra Ortalaması	P
Amorf baş %	GG	17/60	30,53	1,00	Pin head %	GG	12/22	12,04	0,84
	AA	7/60	30,64			AA	2/22	12,25	
	GA	36/60	30,46			GA	8/22	10,50	
Akrozomal şekil bozukluğu %	GG	15/54	32,30	0,37	Yuvarlak baş tip I %	GG	10/31	15,45	0,23
	AA	7/54	25,21			AA	3/31	8,33	
	GA	32/54	25,75			GA	18/31	17,58	
İrrüler akrozomal dağılım %	GG	17/60	29,38	0,61	Yuvarlak baş tip II %	GG	6/26	12,17	0,74
	AA	7/60	36,64			AA	3/26	11,83	
	GA	36/60	29,83			GA	17/26	14,26	
Akrozomal kist %	GG	15/48	24,13	0,32	Tapered (konik) baş %	GG	7/28	11,57	0,10
	AA	6/48	32,25			AA	3/28	22,33	
	GA	27/48	22,98			GA	18/28	14,33	
Akrozomal vakuol %	GG	14/53	19,25	0,08	Abeksiyel implantasyon %	GG	5/16	8,80	0,80
	AA	6/53	31,58			AA	1/16	6,00	
	GA	33/53	29,45			GA	10/16	8,60	
Nükleer şekil bozukluğu %	GG	13/45	21,13	0,70	Parsiyel seperasyon %	GG	2/12	5,00	0,43
	AA	5/45	26,8			AA	2/12	8,50	
	GA	27/45	23,20			GA	8/12	6,38	
Diadem defekti %	GG	2/14	11,50	0,18	Büyük baş %	GG	12/44	28,83	0,07
	AA	2/14	8,25			AA	5/44	25,70	
	GA	10/14	6,55			GA	27/44	19,09	
Nükleer kist %	GG	5/8	3,90	0,32	Küçük baş %	GG	14/48	23,89	0,57
	AA	-	-			AA	5/48	28,80	
	GA	3/8	5,50			GA	29/48	25,78	
Nükleer vakuol %	GG	8/28	13,94	0,64	Uzun baş %	GG	17/56	32,50	0,36
	AA	4/28	11,50			AA	7/56	22,64	
	GA	16/28	15,53			GA	32/56	27,66	
Ridged (çıkıntılı) baş %	GG	-	-	0,34	Multipl baş %	GG	5/8	4,40	0,87
	AA	¼	1,50			AA	-	-	
	GA	3/6	2,83			GA	3/8	4,67	
Diğer çeşitli anomaliler %	GG	2/6	4,00	0,57	Normal başlı ama boyun veya kuyruk defektli %	GG	10/37	22,25	0,30
	AA	-	-			AA	4/37	22,88	
	GA	4/6	3,25			GA	23/37	16,91	

5.7.8. Genotip ile DNA Fragmentasyonu İlişkisi

Bu tez çalışmasında hasta gruplarında kodominant, aditif, dominant ve resesif model ile DNA fragmentasyonu analiz edilmiş, ancak hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.51). Oligozoospermi, astenozoospermi, teratozoospermi hasta gruplarında yapılmış AO boyama sayısı az olduğundan bu gruplarda analiz yapılamamıştır.

Tablo 5.51. Tüm infertillerde kodominant, aditif, dominant ve resesif modeller ile DNA fragmentasyonu analizi

		B	S.E.	Wald	Df	Sig. (p)	Exp(B) (O.R.)	95% C.I.	
								En düşük	En yüksek
Kodominant Model	GG			,494	2	,781			
	GA	20,104	14210,362	,000	1	,999	5,385E8	,000	.
	AA	21,203	14210,362	,000	1	,999	1,615E9	,000	.
Aditif Model		1,945	1,180	2,718	1	,099	6,994	,693	70,624
Dominant Model		20,287	14210,362	,000	1	,999	6,462E8	,000	.
Resesif Model		1,735	1,547	1,258	1	,262	5,667	,273	117,448

5.7.9. Genotip ile Gebelik Sonuçları İlişkisi

Hastaların tüp bebek tedavisi sonrası gebelik sonuçları kodominant, aditif, dominant ve resesif model ile incelendiğinde hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.52).

Tablo 5.52. Hasta gruplarında kodominant, aditif, dominant ve resesif modeller ile gebelik sonuçları analizi

Hasta Grupları		B	S.E.	Wald	Df	Sig. (p)	Exp(B) (O.R.)	95% C.I.	
								En düşük	En yüksek
Tüm infertiller	Kodominant Model	GG			4,055	2	,132		
		GA	-,727	,468	2,415	1	,120	,484	,193 1,209
		AA	,606	,884	,470	1	,493	1,833	,324 10,367
	Aditif Model	-,099	,341	,085	1	,770	,905	,464 1,765	
	Dominant Model	-,545	,454	1,438	1	,231	,580	,238 1,413	
	Resesif Model	1,057	,832	1,614	1	,204	2,878	,564 14,696	
Oligozoospermi	Kodominant Model	GG			,274	2	,872		
		GA	-,357	,682	,274	1	,601	,700	,184 2,664
		AA	20,952	28420,748	,000	1	,999	1,256	000
	Aditif Model	,181	,566	,102	1	,750	1,198	,395 3,629	
	Dominant Model	-,156	,667	,055	1	,815	,856	,231 3,162	
	Resesif Model	21,146	28420,721	,000	1	,999	1,778	,147 21,509	
Astenozoospermi	Kodominant Model	GG			2,960	2	,228		
		GA	-,375	,544	,474	1	,491	,688	,237 1,998
		AA	1,551	1,153	1,809	1	,179	4,714	,492 45,155
	Aditif Model	,285	,393	,525	1	,469	1,330	,615 2,875	
	Dominant Model	-,079	,521	,023	1	,880	,924	,333 2,565	
	Resesif Model	1,755	1,113	2,486	1	,115	5,786	,516 15,052	
Teratozoospermi	Kodominant Model	GG			,376	2	,829		
		GA	-,486	,792	,376	1	,540	,615	,130 2,905
		AA	20,980	23205,429	,000	1	,999	1,292	,000
	Aditif Model	,401	,615	,425	1	,514	1,493	,447 4,983	
	Dominant Model	-,223	,777	,082	1	,774	,800	,174 3,669	
	Resesif Model	1,163	1,209	,925	1	,336	3,200	,299 34,241	
Açıklanamayan infertilite grubu	Kodominant Model	GG			,000	2	1,000		
		GA	,000	44029,199	,000	1	1,000	1,000	,000
		AA	-21,203	17974,844	,000	1	,999	,000	,000
	Aditif Model	-18,475	10273,948	,000	1	,999	,000	,000	
	Dominant Model	-20,980	17974,844	,000	1	,999	,000	,000	
	Resesif Model	20,392	40192,977	,000	1	1,000	7,180	,000	

5.7.10. Sigara İçmeyen Bireylerde Genotipin Erkek İnfertilitesine Etkisi

Hasta ve kontrol gruplarında sigara içmeyenler kodominant, aditif, dominant ve resesif modeller ile karşılaştırılmış, ancak hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.53).

Tablo 5.53. Sigara içmeyen hasta gruplarında genotipin erkek infertilitesine etkisi

Hasta Grupları		B	S.E.	Wald	Df	Sig. (p)	Exp(B) (O.R.)	95% C.I.		
								En düşük	En yüksek	
Tüm infertililer	Kodominant Model	GG			,723	2	,697			
		GA	-,172	,352	,241	1	,624	,842	,422	1,677
		AA	-,488	,599	,664	1	,415	,614	,190	1,986
	Aditif Model		-,217	,261	,691	1	,406	,805	,483	1,342
	Dominant Model		-,164	,337	,238	1	,626	,848	,438	1,643
	Resesif Model		-,226	,547	,171	1	,679	,798	,273	2,329
Oligozoospermi	Kodominant Model	GG			2,848	2	,241			
		GA	-,547	,460	1,416	1	,234	,579	,235	1,425
		AA	-	1,107	1,978	1	,160	,211	,024	1,845
	Aditif Model		-,644	,374	2,963	1	,085	,525	,252	1,093
	Dominant Model		-,613	,446	1,889	1	,169	,542	,226	1,298
	Resesif Model		-,555	,824	,454	1	,500	,574	,114	2,884
Astenozoospermi	Kodominant Model	GG			,869	2	,648			
		GA	-,347	,391	,786	1	,375	,707	,329	1,521
		AA	-,352	,635	,307	1	,579	,703	,202	2,443
	Aditif Model		-,237	,284	,698	1	,403	,789	,452	1,376
	Dominant Model		-,288	,372	,599	1	,439	,750	,362	1,554
	Resesif Model		,033	,574	,003	1	,954	1,033	,335	3,186
Teratozoospermi	Kodominant Model	GG			,618	2	,734			
		GA	-,185	,463	,161	1	,689	,831	,336	2,057
		AA	-,655	,860	,581	1	,446	,519	,096	2,799
	Aditif Model		-,266	,351	,575	1	,448	,766	,385	1,524
	Dominant Model		-,198	,446	,197	1	,657	,821	,342	1,967
	Resesif Model		-,112	,716	,024	1	,876	,894	,220	3,640
Açıklanamayan infertilite grubu	Kodominant Model	GG			,171	2	,918			
		GA	-,393	1,167	,113	1	,736	,675	,069	6,648
		AA	,077	,639	,015	1	,904	1,080	,309	3,780
	Aditif Model		,045	,324	,020	1	,889	1,046	,555	1,974
	Dominant Model		,005	,621	,000	1	,994	1,005	,298	3,391
	Resesif Model		-,437	1,107	,156	1	,693	,646	,074	5,650

Hasta gruplarında sigara içmeyen bireylerin normal dağılıma uymayan sperm parametreleri Kruskal-Wallis testi ile incelendiğinde; teratozoospermi grubundaki hastalar arasında boyun anomalileri ortalamaları açısından, açıklanamayan infertilite grubundaki hastalar arasında sperm konsantrasyonu ve total sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla, $p=0,019$; $p=0,018$ ve $p=0,054$) (Tablo 5.54). Teratozoospermi grubunda sigara içmeyen bireylerden GG genotipine sahip olanlarda daha fazla boyun anomalisi gözlenmiştir (Tablo 5.55). Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerden AA ve GA genotiplerine sahip olanlarda sperm konsantrasyonu ve total sperm sayısı ortalamaları GG genotipine sahip olanlara göre daha az bulunmuştur. (Tablo 5.56).

Tablo 5.54. Hasta gruplarında sigara içmeyen bireylerde genotipin sperm parametreleri ile ilişkisi

Hasta Grupları		Sperm konsantrasyonu (mil/ml)	Ejakulat hacmi (ml)	Total sperm sayısı (mil/ml)	Total Hareketli sperm %	İleri hareketli sperm %	Normal morfoloji %	Baş anomalisi %	Boyun anomalisi %	Kuyruk anomalisi %
Tüm infertiller	Chi-Square	,218	1,877	,077	,722	1,450	,024	,024	4,796	1,118
	df	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Asymp. Sig. (p)	,897	,391	,962	,697	,484	,988	,988	,091	,572
Oligozoospermi	Chi-Square	2,084	1,329	2,505	1,506	1,055	,007	,007	,231	,413
	df	2	2	2	2	2	1	1	1	1
	Asymp. Sig. (p)	,353	,514	,286	,471	,590	,935	,935	,631	,520
Astenozoospermi	Chi-Square	2,896	1,260	1,957	1,491	,191	,913	,913	3,633	1,268
	df	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Asymp. Sig. (p)	,235	,533	,376	,475	,909	,633	,633	,163	,530
Teratozoospermi	Chi-Square	,574	3,173	,008	1,325	1,514	3,880	3,880	7,945	,901
	df	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Asymp. Sig. (p)	,751	,205	,996	,516	,469	,144	,144	,019 *	,637
Açıklanamayan infertilite	Chi-Square	8,003	1,949	5,843			2,204		,616	1,188
	df	2	2	2			2		2	2
	Asymp. Sig. (p)	,018*	,377	,054*			,332		,735	,552

Tablo 5.55. Teratozoospermi grubunda sigara içmeyen bireylerde genotipe göre boyun anomalilerinin dağılımı

		Sayı	Sıra Ortalaması
Boyun anomalisi %	GG	13	19,35
	GA	14	10,39
	AA	2	19,00

Tablo 5.56. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde genotipe göre sperm konsantrasyonu ve total sperm sayısının dağılımı

		Sayı	Sıra Ortalaması
Total sperm sayısı (kons x hacim)	GG	5	9,90
	GA	1	1,00
	AA	7	5,79
Sperm konsantrasyonu (mil/ml)	GG	5	10,60
	GA	1	1,00
	AA	7	5,29

Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde baş anomalisi, total ve ileri hareketli sperm sayısı parametreleri normal dağılımda çıktığından bu parametreler One Way Anova testi ile incelenmiş ve hastalar arasında ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüş, total hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından da istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark görülmüştür ($p= 0,026$ ve $p=0,001$) (Tablo 5.57). Her iki parametre açısından GA genotipine sahip birey sayısı iki olmadığından anlamlılığın ne yönde olduğunu görmek için Tukey analizi yapılamamıştır. Tablo 5.58’de görüldüğü üzere AA ve GA genotiplerine sahip bireylerde hem total hareketli hem de ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları GG genotipine sahip bireylere göre azalmıştır.

Tablo 5.57. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde genotipin sperm parametreleri ile ilişkisi

Sperm parametresi	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig.(p)
Baş anomalisi (%)	Gruplar arasında	4,452	2	2,226	,181	,837
	Grup içinde	110,464	9	12,274		
	Total	114,917	11			
Total hareketli sperm sayısı (%)	Gruplar arasında	491,912	2	245,956	14,066	,001*
	Gruplar içinde	174,857	10	17,486		
	Total	666,769	12			
İleri hareketli sperm sayısı (%)	Gruplar arasında	306,593	2	153,297	5,365	,026*
	Gruplar içinde	285,714	10	28,571		
	Total	592,308	12			

Tablo 5.58. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde genotipe göre total hareketli ve ileri hareketli sperm sayısının dağılımı

Sperm parametresi		Sayı	Ortalama	S.D.	S.E.
Total hareketli sperm sayısı (%)	GG	5	69,0000	5,47723	2,44949
	GA	1	50,0000	.	.
	AA	7	58,1429	3,02372	1,14286
İleri hareketli sperm sayısı (%)	GG	5	50,0000	6,12372	2,73861
	GA	1	35,0000	.	.
	AA	7	41,4286	4,75595	1,79758

Hasta gruplarında sigara içmeyen bireylerin normal dağılıma uymayan sperm parametreleri Kruskal-Wallis testi kullanılarak dominant model ile incelendiğinde tüm infertil ve teratozoospermi hasta gruplarındaki hastalar arasında boyun anomalileri, açıklanamayan infertilite grubundaki hastalar arasında sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı ve total hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 5.59). Tüm infertil ve teratozoospermi gruplarında GG genotipine sahip bireylerde boyun anomalileri daha fazla görülmüştür (Tablo 5.60). Açıklanamayan infertilite grubunda ise AA ve GA genotiplerine sahip bireylerde GG genotipine sahip bireylere göre konsantrasyon, total sperm sayısı ve total hareketli sperm sayısı ortalamaları daha az saptanmıştır (Tablo 5.61).

Tablo 5.59. Sigara içmeyen infertil bireylerde dominant model ile sperm parametreleri analizleri

Hasta Grupları		Sperm konsantrasyonu (mil/ml)	Ejakulat hacmi (ml)	Total sperm sayısı (mil/ml)	Total Hareketli sperm %	İleri hareketli sperm %	Normal morfoloji (%)	Baş anomalisi (%)	Boyun anomalisi %	Kuyruk anomalisi %
Tüm infertiller	Mann-Whitney U	666,000		671,000	542,500	552,000			220,000	294,500
	Wilcoxon W	1227,000		1232,000	1038,500	1048,000			716,000	547,500
	Z	-,288		-,235	-,740	-,628			-2,185	-,840
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,773		,814	,460	,530			,029*	,401
Oligozoospermi	Mann-Whitney U	71,500	79,000	68,500	65,500	67,500	17,500	17,500	15,000	14,000
	Wilcoxon W	162,500	215,000	159,500	170,500	122,500	38,500	38,500	36,000	35,000
	Z	-1,432	-1,108	-1,558	-,266	-,148	-,081	-,081	-,480	-,643
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,152	,268	,119	,790	,882	,935	,935	,631	,520
Astenozoospermi	Mann-Whitney U	318,000	293,000	317,500	244,500	248,000	94,500	94,500	67,000	102,000
	Wilcoxon W	618,000	593,000	617,500	497,500	501,000	199,500	230,500	203,000	207,000
	Z	-,113	-,593	-,123	-,436	-,365	-,736	-,736	-1,872	-,416
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,910	,553	,902	,663	,715	,462	,462	,061	,677
Teratozoospermi	Mann-Whitney U	90,500	87,000	104,000	87,000	94,000	85,500	85,500	47,500	82,500
	Wilcoxon W	181,500	223,000	240,000	178,000	185,000	176,500	221,500	183,500	173,500
	Z	-,592	-,757	,000	-,757	-,445	-,842	-,842	-2,480	-,943
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,554	,449	1,000	,449	,657	,400	,400	,013*	,345
Açıklanamayan infertilite grubu	Mann-Whitney U	2,000	17,500	5,500	2,500		7,500		11,500	10,000
	Wilcoxon W	38,000	32,500	41,500	38,500		43,500		47,500	20,000
	Z	-2,635	-,373	-2,126	-2,628		-1,475		-,767	-1,024
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,008*	,709	,034*	,009*		,140		,443	,306

Tablo 5.60. Tüm infertil ve teratozoospermi gruplarında sigara içmeyen bireylerde dominant modele göre boyun anomalilerinin dağılımı

Hasta Grupları	Dominant	Sayı	Sıra ortalaması	Sıra Toplamı
Tüm infertililer	GG	22	32,50	715,00
	AA+GA	31	23,10	716,00
Teratozoospermi hasta grubu	GG	13	19,35	251,50
	AA+GA	16	11,47	183,50

Tablo 5.61. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde dominant modele göre konsantrasyon, total sperm sayısı, total hareketli sperm sayısı dağılımı

Sperm parametreleri	Dominant	Sayı	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı
Konsantrasyon (mil/ml)	GG	5	10,60	53,00
	AA+GA	8	4,75	38,00
Total sperm sayısı (kons x hacim)	GG	5	9,90	49,50
	AA+GA	8	5,19	41,50
Total hareketli sperm sayısı (%)	GG	5	10,50	52,50
	AA+GA	8	4,81	38,50

Tüm infertil ve açıklanamayan infertilite gruplarında normal dağılıma uyan sperm parametreleri t-test kullanılarak dominant model ile analiz edildiğinde açıklanamayan infertilite grubunda hastalar arasında ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,011$) (Tablo 5.62). Tablo 5.63'te görüldüğü üzere A allelinin dominant etkili olması durumunda spermde ileri hareketlilik oranı düşmektedir.

Tablo 5.62. Sigara içmeyen infertil bireylerde dominant model ile normal morfoloji (%) ve baş anomalisi (%) analizi

Hasta Grupları	Sperm Parametreleri	Ortalama ± S.D.	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
			F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
										En düşük	En yüksek
Tüm infertililer	Normal morfoloji (%)	3,45 ± 2,96	,273	,604	,004	51	,997	,003	,825	-1,654	1,660
	Baş anomalisi (%)	96,55 ± 2,96	,273	,604	-,004	51	,997	-,003	,825	-1,660	1,654
Açıklanamayan infertilite grubu	İleri hareketli sperm sayısı (%)	45,31±5,53	,054	,821	3,040	11	,011*	9,37500	3,08382	2,58756	16,16244
	Baş anomalisi (%)	93,87±2,43	2,222	,167	-,613	10	,553	-1,250	2,038	-5,791	3,291

Tablo 5.63. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerde dominant modele göre ileri hareketli sperm sayısı dağılımı

	Dominant	Sayı	Ortalama	S.D.	S.E.
İleri hareketli sperm sayısı (%)	GG	5	50,0000	6,12372	2,73861
	AA+GA	8	40,6250	4,95516	1,75191

Hasta gruplarında normal dağılıma uymayan sperm parametreleri Kruskal-Wallis testi kullanılarak resesif model ile analiz edildiğinde hastalar arasında sperm parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.64).

Tablo 5.64. Hasta gruplarında sigara içmeyen infertil bireylerde resesif model ile sperm parametreleri analizi

		Sperm konsantrasyonu (mil/ml)	Ejakulat hacmi (ml)	Total sperm sayısı (mil/ml)	Total Hareketli sperm %	İleri hareketli sperm %	Normal morfoloji %	Baş anomalisi %	Boyun anomalisi %	Kuyruk anomalisi %
Tüm infertiller	Mann-Whitney U	229,500		236,500	192,500	168,500	110,500	110,500	108,500	105,500
	Wilcoxon W	2575,500		2582,500	220,500	196,500	125,500	1286,500	1284,500	120,500
	Z	-,155		-,027	-,553	-1,030	-,292	-,292	-,350	-,442
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,877		,978	,580	,303	,770	,770	,726	,659
Oligozoospermi	Mann-Whitney U	21,500	23,000	18,000		19,000	4,500	4,500	,000	5,000
	Wilcoxon W	399,500	401,000	396,000		22,000	5,500	70,500	66,000	6,000
	Z	-,476	-,348	-,775		-,317	-,293	-,293	-1,593	-,145
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,634	,728	,438		,752	,769	,769	,111	,884
Astenozoospermi	Mann-Whitney U	85,500	105,000	91,000	92,500	112,000	44,500	44,500	43,000	37,000
	Wilcoxon W	1120,500	126,000	1126,000	912,500	932,000	54,500	395,500	394,000	47,000
	Z	-1,449	-,888	-1,287	-,912	-,271	-,463	-,463	-,549	-,916
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,147	,374	,198	,362	,787	,643	,643	,583	,360
Teratozoospermi	Mann-Whitney U	36,000	13,500	30,000	20,500	20,500	24,500	24,500	20,000	37,000
	Wilcoxon W	42,000	19,500	36,000	26,500	26,500	30,500	375,500	371,000	43,000
	Z	-,215	-1,855	-,645	-1,345	-1,343	-1,078	-1,078	-1,362	-,143
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,830	,064	,519	,179	,179	,281	,281	,173	,886
Açıklanamayan infertilite grubu	Mann-Whitney U	,000			,000	1,000	5,000	5,000	5,500	3,500
	Wilcoxon W	1,000			1,000	2,000	6,000	71,000	6,500	69,500
	Z	-1,604			-1,645	-1,369	-,148	-,148	,000	-,582
	Asymp. Sig. (çift kuyruklu) (p)	,109			,100	,171	,882	,882	1,000	,560

Hasta gruplarında normal dağılıma uyan sperm parametreleri t-test kullanılarak resesif model ile analiz edildiğinde hastalar arasında sperm parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5.65).

Tablo 5.65. Tüm infertil, oligozoospermi, açıklanamayan infertilite gruplarında sigara içmeyen infertil bireylerde resesif model ile sperm parametreleri analizi

Hasta Grupları	Sperm Parametreleri	Ortalama \pm SD	Varyans eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitliği için t-test						
			F	Sig.	T	Df	Sig. (çift kuyruklu) (p)	Ortalamalar farkı	S.E. farkı	95% C.I.	
										En düşük	En yüksek
Tüm infertil	Ejakulat hacmi (ml)	2,74 \pm 0,91	2,035	,158	1,020	73	,311	,4912	,4817	-,4688	1,4512
Oligozoospermi	Total hareketli sperm sayısı (%)	29,70 \pm 16,37	,004	,953	,393	22	,698	4,409	11,230	-18,880	27,698
Açıklanamayan infertilite grubu	Ejakulat hacmi (ml)	2,52 \pm 1,11			,896	11	,390	1,04167	1,16280	-1,51765	3,60098
	Total sperm sayısı (kons x hacim)	133,45 \pm 87,73		.	1,390	11	,192	126,91667	91,31300	-74,06189	327,89522

6. TARTIŞMA

Bu araştırmada ilk olarak Lin ve ark. (2012) tarafından araştırılmış ve teratozoospermi vakaları için risk teşkil ettiği bulunmuş SEPTIN12 c.474 G>A polimorfizminin Türk toplumunda erkek infertilitesi ile ilişkisi 164 fertil ve 115 infertil erkek bireyinde incelenmiş, ancak genotip dağılımları açısından hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı sonuca ulaşılamamıştır ($p>0,05$). Bu sonuçlar Lin ve ark. (2012)'nin çalışmasında çıkan sonuçlar ile çelişmektedir. Lin ve ark. hasta grubuna azospermi vakalarını da dahil etmişlerdir ve AA genotipinde bulunan 15 hastadan 5 kişi azospermi vakasıdır. Miyakawa ve ark. (2012)'nin SEPTIN12 geninde tespit ettikleri 8 adet polimorfizmin azospermi hastalarında testiste sadece sertoli hücrelerin bulunması ile karakterize sertoli cell only sendromuna (germinal aplazi) neden olduğunu gösterdikleri çalışmalarında ise bu tez çalışmasındaki sonuçlara benzer olarak c.474 G>A polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grupları arasında fark görülmemiştir (%10,7 ve %12). Bu çalışmaya azospermi vakaları dahil edilmemiştir. Sonraki alışmalarda Türk toplumunda azospermi vakaları bu polimorfizm açısından araştırılabilir.

Sperm parametrelerinin normal olduğu açıklanamayan infertilite ve kontrol gruplarında AA genotipine (sırasıyla, %6,2 ve %7,9) ve GA genotipine (sırasıyla, 50,6 ve %50) sahip bireylerin anormal spermiyogeneze yatkınlıkları olabileceğini söylenebilir. Diğer sperm parametreleri açısından normal olup konsantrasyon (2 kişi), hareket (14 kişi) ve normal morfolojiye sahip sperm sayısı düşük (20 kişi) hastalarda GG genotipine rastlanmıştır (sırasıyla 1, 3, 2 kişi). Bu hastalarda diğer genetik ve çevresel etmenler bozulmuş spermiyogenezde rol oynayabilir.

Sigara ve alkol kullanımının seminal plazmada ROS seviyesinde artışa yol açarak sperm parametrelerini olumsuz yönde etkilediği (Hamada ve diğer., 2012) gösterilmiş, ayrıca sperm konsantrasyonu ve total hareketliliği düşük hastalarda anplooidilere daha fazla rastlanmış ve sigara/alkol kullanımı spermde kromozomal anomaliler ile ilişkilendirilmiştir (Hamada ve diğer., 2011). Bu çalışmada çevresel etmenlerin (alkol ve sigara) erkek infertilitesi ile ilişkisi incelenmiş, kontrol

grubunda sigara ve alkol kullanımı hasta grubuna göre daha fazla bulunduğundan sigara ve alkol kullanımları açısından hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı sonuca ulaşılmıştır. Bu tez çalışmasında alkol kullanımı açısından sosyal içiciler de alkol kullanan gruba dahil edilmiştir. Literatürde bazı çalışmalarda alkol kullanımının sperm parametrelerine negatif etkisi olduğu bulunsa da genel olarak *in vitro* fertilizasyon uygulamalarında ve popülasyon çalışmalarında hergün alkol kullanılmadığı sürece alkolün sperm parametrelerine etkisi görülmez (La Vignera ve ark., 2013). Ayrıca alkolün sperm parametrelerine olumsuz etkisi alkol kullanımı bırakıldığında yok olur. Bu tez çalışmasında sigara kullanımı açısından gruplar arasında ileri derecede istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. İstatistiksel olarak sigara kullanımı erkek infertilitesi açısından koruyucu faktör çıksa da bunu herhangi bir biyolojik mekanizma ile açıklamak mümkün değildir, bu bireylerde genetik etkiler çevresel etkileri maskeliyor olabilir. Mitra ve ark. (2012)'nin çalışmasında sigara içmenin düşük sperm hareketliliği ve artmış sperm morfoloji defektleri ile ilişkisi tespit edilmiştir. Davar ve ark. (2012)'nin çalışmasında ise sigara içmenin sperm parametrelerine etkisi görülmemiştir. Bu tez çalışmasında, kontrol grubundan sperm alınmadığından sigara ve alkol kullanımları açısından sperm parametreleri karşılaştırılamamıştır. İleriki çalışmalarda daha fazla sigara içen hasta sayısı ile ve kontrol grubunun da sperm parametreleri çalışmaya dahil edilerek daha kapsamlı analiz yapılabilir.

Hasta grubu sperm parametrelerine göre sperm konsantrasyonu (oligozoospermi), hareketliliği (astenozoospermi) ve morfolojisi (teratozoospermi) anormal olanlar ve sperm parametreleri normal olanlar (açıklanamayan infertilite) olarak alt gruplara ayrılmış ve gruplar bu polimorfizmin kodominant, aditif, dominant ve resesif modellerde erkek infertilitesi açısından kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Sonuçlarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuca ulaşılammıştır. Hasta gruplarındaki bireyler genotip, dominant ve resesif etkiler için ayrı ayrı sperm parametreleri açısından birbirleriyle kıyaslanmış ve teratozoospermi hastalarında boyun anomalilerinin ortalamaları açısından hastalar arasında sınırda anlamlılık elde edilmiştir ($p=0,059$). GG genotipine sahip hastalarda GA genotipine sahip hastalara göre daha fazla boyun anomalisi görüldüğü sonucuna ulaşılmıştır ($p=0,046$). Ayrıca bu hastalarda dominant modelde GG genotipine sahip hastalarda boyun anomalileri ortalamaları GA genotipine göre daha fazla bulunmuştur ($p=0,019$). Bu sonuçlar varyant A allelinin sperm parametreleri açısından herhangi

bir etkisinin olmadığını göstermektedir. GG genotipine sahip bu hastalarda görülen boyun anomalileri diğer genetik ve çevresel etkenlerden kaynaklanabilir.

Bu tez çalışmasında c.474 G>A polimorfizminin sperm hareketliliğine etkisi gösterilememiştir. Bu tez çalışmasında astenozoospermi hasta grubunu spermde diğer parametrelere bakılmaksızın sperm hareketliliğinin anormal olduğu hastalar oluşturmaktadır. Spermde morfolojik diğer anomaliler sperm hareketliliğini etkileyebilir. Bu tez çalışmasında diğer parametreleri normal olup sadece sperm hareketliliği anormal olan hastalara sayı azlığı nedeniyle istatistiksel analiz yapılamamıştır. İleriki çalışmalarda bu tarz hastalarla c. 474 G>A polimorfizminin etkisinin araştırılması önerilebilir. Sugino ve ark. (2008) SEPT4 genindeki mutasyonların astenozoospermi hastalarının ayırıcı tanısında kullanılabileceğini; Lin ve ark. (2009) astenozoospermi vakalarında testiste SEPTIN12 geninin ifade seviyesinin azaldığını göstermiştir. İleriki çalışmalarda astenozoospermi hastalarında c.474 G>A polimorfizminin SEPTIN12 geninin ifade seviyesine etkisi incelenebilir.

SEPTIN12 testiste ifade edilen spermiyogenez açısından önemli bir gen dir. Bu genin testisteki ifade seviyesinin değişmesi bozulmuş spermiyogenez ve bunun sonucu ortaya çıkan spermde hareket ve morfoloji defektleri ile ilişkilendirilmiştir (Lin ve diğ., 2009). Ayrıca Lin ve ark. (2012) c.474 G>A polimorfizmini bozulmuş sperm morfolojisi ile ilişkilendirmişlerdir. Bu tez çalışmasında bu polimorfizmin sperm morfolojisine etkisi gösterilememiştir. Bu tez çalışmasında diğer parametreleri normal olup sadece sperm morfolojisi anormal olan hastalara sayı azlığı nedeniyle istatistiksel analiz yapılamamıştır. İleriki çalışmalarda bu tarz hastalarla c. 474 G>A polimorfizminin etkisinin araştırılması önerilebilir.

Lin ve ark. (2012) c.474 G>A polimorfizminin özellikle kırık kuyruk, anormal baş ve immatür sperm formlarıyla ilişkili bulmuşlardır. Bu sonuç çalışmalarına azoospermi vakalarını dahil etmelerinden kaynaklanabilir. Çünkü özellikle non-obstrüktif azoospermi vakalarında mayotik arest nedeniyle defektif spermatogenez gerçekleşir ve sperm morfoloji anomalileri yoğun olarak görülür (Miyamoto ve diğ.,2012; Tsujimura ve diğ., 2002; Yavetz ve diğ., 2001). Ayrıca onların çalışmasında sperm değerlendirme kriterleri olarak WHO 1999 versiyonu kullanıldığından bu tez çalışmasındaki hasta gruplarının sperm parametreleri açısından değerlendirilmesinde farklılık oluşmuştur. Bu çalışmada AA genotipi ile spesifik hiçbir anomali ilişkili bulunamamıştır, fakat hemen hemen tüm anomaliler

GA genotipine sahip bireylerde daha sık gözlenmiştir. Bu çalışmada bir kişide total pin head anomalisine rastlanmıştır ve genotipi GG bulunmuştur. c.474 G>A polimorfizminin bu tarz spesifik anomalilere etkisi anlamlı sayıda hastayla ileriki çalışmalarda bakılabilir. Bu çalışmada hastaların çoğuna birden fazla sperm analizi yapılamamıştır. Sonraki çalışmalar için 15 gün aralıklarla en az iki kez yapılan sperm analizlerinin ortalamasının alınarak çalışmanın tekrar edilmesi önerilebilir.

Bu tez çalışmasında sigara içmenin olumsuz etkisini saf dışı bırakarak hasta ve kontrol gruplarında sigara içmeyenler kodominant, aditif, dominant ve resesif modeller ile karşılaştırılmış, ancak hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Teratozoospermi grubundaki sigara içmeyen bireyler arasında boyun anomalileri ortalamaları, açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireyler arasında sperm konsantrasyonu ve total sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla, $p=0,019$; $p=0,018$ ve $p=0,054$). Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireylerden AA ve GA genotiplerine sahip olanlarda sperm konsantrasyonu ve total sperm sayısı ortalamaları GG genotipine sahip olanlara göre daha az bulunmuştur. Açıklanamayan infertilite grubunda sigara içmeyen bireyler arasında ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüş, total hareketli sperm sayısı ortalamaları açısından da istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark görülmüştür ($p= 0,026$ ve $p=0,001$). Her iki parametre açısından AA ve GA genotiplerine sahip bireylerde hem total hareketli hem de ileri hareketli sperm sayısı ortalamalarının GG genotipine sahip bireylere göre azaldığı görülmüştür. Hasta gruplarında sigara içmeyen bireylerin sperm parametreleri dominant model ile incelendiğinde tüm infertil ($p=0,029$) ve teratozoospermi ($p=0,013$) hasta gruplarındaki hastalar arasında boyun anomalileri, açıklanamayan infertilite grubundaki hastalar arasında sperm konsantrasyonu ($p=0,008$), total sperm sayısı ($p=0,034$) ve total hareketli sperm sayısı ($p=0,009$) ve ileri hareketli sperm sayısı ($p=0,011$) ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Tüm infertil ve teratozoospermi gruplarında GG genotipine sahip bireylerde boyun anomalileri daha fazla görülmüştür. Açıklanamayan infertilite grubunda ise dominant modelde AA ve GA genotiplerine sahip bireylerde GG genotipine sahip bireylere göre konsantrasyon, total sperm sayısı, total hareketli ve ileri hareketli sperm sayısı ortalamaları daha az saptanmıştır. Sonuç olarak genotipte A alleli varlığı açıklanamayan infertilite vakalarında hem sperm konsantrasyonunu hem de sperm

hareketliliğini olumsuz yönde etkilemektedir. A alleli dominant etkili olduğunda sperm konsantrasyonunu ve hareketliliğini olumsuz etkilerken, resesif etkili olduğu zaman sperm parametrelerine etkisi bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında spermde DNA hasarı değerlendirilmesinde AO boyama kullanılmış ve yeşil boyanan spermler DNA hasarı olmayan (çift zincirli DNA), sarı-turuncu-kırmızı boyanan spermler DNA hasarı olan (tek zincirli DNA) olarak değerlendirilmiştir (Tejada ve diğ., 1984; Avcı, 2006; Khalili ve diğ., 2006). DNA hasarı olan spermler total sperm sayısına bölünerek örneklerin DFI değerleri belirlenmiştir. DNA hasarı cut off değeri yapılan çalışmalarda %20-50 arasında değişmektedir (Evenson ve diğ., 1999; Zini ve diğ., 2002; Gopalkrishnan ve diğ., 1999). Birçok çalışma yeşil sperm sayısının <%50 olmasının spermin oositi dölleme yeteneğine olumsuz etkisi olduğunu göstermiştir (Hoshi ve diğ., 1996; Variant-Klun ve diğ., 2002; Katayose ve diğ., 2003). Bu çalışmada cut off değeri ≥ 30 seçilmiştir ve Lin ve ark.(2012)'nin bulgularının aksine tüm infertil ve açıklanamayan infertilite gruplarında genotipin DNA fragmentasyonuna etkisi gösterilememiştir. Bu tez çalışmasında açıklanamayan infertilite grubu hariç sperm parametrelerine göre ayrılan diğer hasta gruplarında AO boyama yapılmış preparat sayısı az olduğundan DNA fragmentasyonu açısından istatistiksel analiz yapılamamıştır. Tüm hastalarda DNA fragmentasyonu olmayan kişi sayısı az (8 kişi) olduğundan daha fazla vaka sayısı ile çalışmanın tekrarlanması önerilebilir. DNA hasarı ve sperm parametreleri arasında ilişki olup olmadığı ve DNA hasarı ölçümlerinin fertil ve infertil bireylerdeki oranları halen tartışılan bir konudur (Frasel, 2004; Khalili ve diğ., 1997 ve 2006). Fertil ve infertil erkeklerden toplanan spermler arasında DNA hasarı farklılıklarının ortaya çıkarılmasında yeterince duyarlı olup olmadıkları açık değildir (Khalili ve diğ., 2006).

Bu tez çalışmasında c.474 G>A polimorfizminin gebelik sonuçları ile ilişkisi bulunmamıştır. Spermde konsantrasyon, hareketlilik ve morfoloji bozuklukları olan hasta gruplarında da genotipin gebelik sonuçlarına etkisi görülmemiştir. Bu çalışmada fertilizasyon başarısızlığı, embriyo transfer iptali gibi çeşitli nedenlerden dolayı hastaların tedavi sonuçlarına ait gebelik sonucu verilerinin tamamı elde edilememiştir. Sonraki çalışmalarda bu polimorfizmin fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik üzerine etkileri araştırılabilir.

c.474 G>A polimorfizmi genotipte bulunabilir ancak fenotipik etkisi yoktur (non-penetrant). Bu durum kırılma mutasyonlarında genel olarak görülür (Lin ve diğ., 2012; Bonnet ve diğ., 2008; Quaye ve diğ., 2009). İnsanda kırılma sürecinde oluşan genetik varyasyonların gözlenenden çok daha kompleks olduğu ve kırılma mutasyonlarının fenotipik ifadesi için birçok faktörün rol aldığı gösterilmiştir (Lin ve diğ., 2012; Graveley, 2008; Kwan ve diğ., 2008; de Souza ve diğ., 2011). İnkomplet penetrans birçok genin kırılma mutasyonları için genel bir durumdur (Lin ve diğ., 2012; Basel-Vanagaite ve diğ., 2009; Rio Frio ve diğ., 2009). Böyle durumlarda SEPTIN12 için kırılmış proteinin varlığı filament oluşumunun bozulması için çok düşük olabilir (Lin ve diğ., 2012).

Sperm sayısında çarpıcı değişimler yapan kromozomal anöloidiler (Rubio ve diğ., 2001; Bernardini ve diğ., 2005) veya Y kromozom mikrodelenasyonları (Martinez ve diğ., 2000) dışında şu an için temel sperm analizine tamamlayıcı herhangi bir moleküler diagnostik test bulunmamaktadır. Moleküler infertilite markörleri arasında sperm DNA hasarı analizinin kullanışsızlığı ile ilgili literatürde çelişkili veriler bulunmaktadır (Evenson ve Wixon, 2006; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006). Son yıllarda spermde oksidatif stresin erkek infertilitesi markörü olabileceği ile ilgili çok fazla araştırma vardır (Agarwal ve diğ., 2006; Garrido ve diğ., 2004). Diğer moleküler markörlerin henüz sperm fertilizasyon ve gebelik oluşturma yeteneğini önceden tespit edebilme konusunda etkisi bulunamamıştır (Braundmeier ve Miller, 2001; Sullivan, 2004). Tüm bunlar spermde fonksiyon bozukluğunda birçok faktörün birlikte rol oynadığını göstermektedir (Garrido ve diğ., 2008).

7. KAYNAKLAR

Agarwal A, Sharma R K, Nallella K P (2006). Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and Sterility* 86, 878– 885.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). *Molecular Biology of the Cell*. (5.Baskı). Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
Baccetti B, Afzelius BA. The biology of the sperm cell. *Monogr Dev Biol* 1976; 10: 1– 254.

Balkan M (2006). *İnfertil Erkeklerde Genetik Araştırmalar*. Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Basel-Vanagaite L, Pelet A, Steiner Z, Munnich A, Rozenbach Y (2007). Allele dosage-dependent penetrance of RET proto-oncogene in Israeli-Arab inbred family segregating Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 15: 242- 245.

Beites C L, Xie H, Bowser R, Trimble W S. (1999) The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat. Neurosci.* 2, 434- 439.

Bernardini L M, Calogero A E, Bottazzi C (2005). Low total normal motile count values are associated with increased sperm disomy and diploidy rates in infertile patients *International Journal of Andrology* 28, 328–336.

Berrin Avcı. Farklı Fiksasyon Protokolleri ile Sperm Kromatin Kondansasyon Anomalisinin Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 32 (2) 55- 59, 2006.

Bonnet C, Krieger S, Vezain M, Rousselin A, Tournier I (2008). Screening Brca1 and Brca2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and ex vivo assay based on a splicing reporter minigene. *J Med Genet* 45: 438- 446.

Braundmeier A G, Miller D J 2001 The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *Journal of Dairy Science* 84, 1915– 1925.

Cao L, Yu W, Wu Y, Yu L. The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* (2009) 66: 3309– 3323.

Casamayor A, Snyder M. (2003). Molecular dissection of a yeast septin: Distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol Cell Biol* 23: 2762– 2777.

Cooper J A ve Kiehart D P. (1996). Septins may form a ubiquitous family of cytoskeletal filaments. *J. Cell Biol.* 134, 1345- 1348.

Dada R, Thilagavathi J, Venkatesh S, Esteves S C, Agarwal A. Genetic Testing in Male Infertility. *The Open Reproductive Science Journal*, 2011, 3, 42- 56.

Davar R, Sekhavat L, Naserzadeh N. Semen parameters of non-infertile smoker and non-smoker men. *J Med Life*. 2012 Dec 15; 5 (4): 465- 8. Epub 2012 Dec 25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23346252>

De Lamirande E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost*. 2007 Feb; 33 (1): 60-8.

De Souza J E., Ramalho R F., Galante P A., Meyer D, de Souza S J. Alternative splicing and genetic diversity: silencers are more frequently modified by SNVs associated with alternative exon/intron borders. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jul; 39 (12): 4942- 8

Ding X, Yu W, Liu M, Shen S, Chen F, Wan B, Yu L. SEPT12 Interacts with SEPT6 and This Interaction Alters the Filament Structure of SEPT6 in HeLa Cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 40, No. 6, November 2007, pp. 973- 978. <http://www.jbmb.or.kr/fulltext/jbmb/view.php?vol=40&page=973>

Dohle G R, Zsolt K, Jungwirth A, Diemer T, Giwercman A, Krausz C. Guidelines for the investigation and treatment of male infertility. *Eur Urol* 2004 Nov; 46 (5): 555- 8.

Du Plessis SS, Gokul S, Agarwal A. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jan 1; 5: 224- 31.

Eddy EM (2002). Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 103– 28.

Elder K ve Dale B (2011). *In-Vitro Fertilization*. (3.Baskı). Cambridge University Press, New York.

Estey M P, Di Ciano-Oliveira C, Froese C D, Bejide M T, Trimble W S (2010). Distinct roles of septins in cytokinesis: SEP9 mediates midbody abscission. *J Cell Biol* 191: 741- 749.

Evenson D, Jost L, Marshall D Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039–49.

Evenson D, Wixon R (2006) Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive BioMedicine Online* 12, 466– 472.

Field C M, Kellogg D (1999) Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol* 9: 387– 394.

Fraser L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Pol J Vet Sci*. 2004; 7: 311- 21.

Garrido N, Meseguer M, Simon C (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility Asian. *Journal of Andrology* 6, 59–65.

Garrido N, Remohi J, Martinez-Conojero J A., Garcia-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success . *Vol 17* No 6. 2008 855- 865 Reproductive BioMedicine Online. www.rbmonline.com/Article/3383 on web 30 October 2008

Gilbert SF (2000). *Developmental Biology*. Sunderland (MA): Sinauer Associates. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/>

Gladfelter A S, Pringle J R, Lew D J. (2001) The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 681- 689.

Gopalkrishnan K, Hurkadli K, Padwal V. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Andrologia* 1999; 31: 277– 82.

Graveley B R (2008). The haplo-spliceo-transcriptome: common variations in alternative splicing in human population. *Trends Genet* 24: 5- 7.

Greenbaum M P, Ma L, Matzuk M M (2007). Conversion of midbodies into germ cell intercellular bridges. *Dev Biol* 305: 389- 396.

Greenbaum M P, Yan W, Wu M H, Lin Y N, Agno J E (2006). TEXT14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4982- 4987.

Hall P A, Jung K, Hillan K J, Russell S E. Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol* 2005; 206: 269- 78; PMID:15915442; DOI:10.1002/path.1789.

Hall P A, Russell S E. (2004). Pathobiology of the septin gene family. *J Pathol* 204: 489- 505.

Hamada A, Esteves S C, Agarwal A. Unexplained male infertility: potential causes and management. *Human Andrology* 2011; 1: 2-16.

Hamada A, Esteves S C, Nizza M, Agarwal A. Unexplained Male infertility: Diagnosis and Management. *Int Braz J Urol.* 2012 Sep;38 (5): 576- 94.

Hartwell L H. (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* 69, 265- 276.

Hazzouri M, Rousseaux S, Mongelard F, Usson Y, Pelletier R, Faure AK, Vourc'h C, Sele B. Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol Reprod Dev.* 2000; 55: 307– 315.

He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano G I ve Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction* (2009); 137: 901– 911.

Hoshi K, Katayose H, Yanagida K. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996; 66: 634– 9.

Hsu S C, Hazuka C D, Roth R, Foletti D L, Heuser J, Scheller R H. (1998) Subunit composition, protein interactions and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* 20, 1111- 1122.

Huang X Y ve Sha J H. Proteomics of spermatogenesis: from protein lists to understanding the regulation of male fertility and infertility. *Asian Journal of Andrology* (2011); 13, 18– 23.

Ihara M, Kinoshita A, Yamada S, Tanaka H, Tanigaki A (2005). Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Dev Cell* 8: 343- 352.

Irazoqui J E, Lew D J. (2004) Polarity establishment in yeast. *J. Cell Sci.* 117, 2169- 2171.

Jungwirth A, Dimer T, Dohle G R, , Giwercman A, Kopa Z, Tournaye H, Krausz C (2013). Guidelines on male infertility. European Association of Urology. http://www.uroweb.org/gls/pdf/16_Male_Infertility_LRV2.pdf

Kartmann B, Roth D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J Cell Sci* 2001; 114: 839- 44; PMID: 11181167.

Katayose H, Yanagida K, Hashimoto S. Use of diamide–acridine orange fluorescence staining to detect aberrant protamination of human ejaculated sperm nuclei. *Fertil Steril* 2003; 79: 670– 6.

Khalili M A, Vahidi S, Aflatonian A, Amir-Arjmand M. Intracytoplasmic sperm injection for the treatment of male factor infertility. *Med J Islam Repub Iran.* 1997; 11: 181- 5.

Khalili M, A, Aghaie-Maybodi F, Anvari M, Talebi A R. Sperm Nuclear DNA in Ejaculates of Fertile and Infertile Men Correlation with Semen Parametres. *Urol J (Tehran).* 2006; 3: 154- 9. www.uj.unrc.ir.

Kinoshita M (2003) Assembly of mammalian septins. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 491- 496.

Kinoshita M, Field C M, Coughlin M L, Straight A F, Mitchison T J.(2002). Self- and actin- templated assembly of mammalian septins. *Dev Cell* 3: 791- 802.

Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, Hiraoka Y ve Noda M (1997) Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev.* 11, 1535- 1547.

Kissel H, Georgescu M M, Larisch S, Manova K, Hunnicutt G R, Steller H. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Dev Cell* 2005; 8: 353- 64; PMID:15737931; DOI:10.1016/j.devcel.2005.01.021.

Kremer B E, Haystead T, Macara I G. (2005). Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule –binding protein MAP4. *Mol Bio Cell* 16: 4648- 4659.

- Kruger T F, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update*. 1999 Mar- Apr; 5 (2): 172- 8. Review.
- Kumar R, Gautam G, Gupta N P (2006). Drug therapy for idiopathic male infertility: rationale versus evidence. *Journal of Urology* 176, 1307– 1312.
- Kwan T, Benewoy D, Dias C, Gurd S, Provencher C(2008). Genome-wide analysis of transcript isoform variation in humans. *Nat Genet* 40: 225- 231)
- Larisch S, Yi , Lotan R, Kerner H, Eimerl S, Tony P W, Gottfried Y, Birkey R S, deCaestecker M P, Danielpour D, Book-Melamed N, Timberg R, Duckett C S, Lechleider R J, Steller H, Orly J, Kim S J, Roberts A B (2000) A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat. Cell Biol.* 2, 915- 921.
- La Vignera S, Condorelli R A, Balercia G, Vicari E, Calogero A E. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian J Androl*. 2013 Mar;15(2):221-5. doi: 10.1038/aja.2012.118. Epub 2012 Dec 31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274392>
- Leipe D D, Wolf Y I, Koonin E V, Aravind L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* 317: 41– 72.
- Lhuillier P, Rode B, Escalier D, Lores P, Dirami T. (2009). Absence of annulus in human asthenozoospermia: case report. *Hum Reprod* 24: 1296- 1303.
- Lin Y H, Chou C K, Hung Y C, Yu I S, Pan H A. SEPT12 deficiency causes sperm nucleus damage and developmental arrest of preimplantation embryos. *Fertil Steril* (2011) 95: 363– 365.
- Lin Y H, Lin Y M, Wang Y Y, Yu I S, Lin Y W, Wang Y H, Wu C M, Pan H A, Chao S C, Yen P H, Lin S W, Kuo P L. (2009). The expression level of Septin12 is critical for spermatogenesis. *Am J Pathol*. 174: 1857– 1868.
- Lin Y H, Lin Y M, Wang Y Y, Yu I S, Lin Y W. The expression level of septin12 is critical for spermiogenesis. *Am J Pathol* (2009) 174: 1857– 1868.
- Lin Y H, Wang Y Y, Chen H I, Kuo Y C, Chiou Y W. (2012) SEPTIN12 Genetic Variants Confer Susceptibility to Teratozoospermia. *PLoS ONE* 7(3): e34011. doi:10.1371/journal.pone.0034011.
- Mac Laren A (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology*. 262 (1): 1- 15.
- Mader S ve Windelspecht M (2012). *Human Biology*. (20.Baskı). McGraw-Hill Companies. Inc., New York.
- Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod*. 2004; 70: 910– 918.
- Martínez M C, Bernabe M J, Gomez E (2000). Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *Journal of Andrology* 21, 651– 655.

Meistrich M L, Brock W A, Grimes S R, Platz R D, Hnilica L S. Nuclear protein transitions during spermatogenesis. *Fed Proc.* 1978; 37: 2522– 2525.

Meniru G. (2004). Cambridge guide to infertility management and assisted reproduction. Cambridge University Press, Cambridge. <http://www.cambridge.org/0521010713>

Mitra A, Chakraborty B, Mukhopadhyay D, Pal M, Mukherjee S, Banerjee S, Chaudhuri K. Effect of smoking on semen quality, FSH, testosterone level, and CAG repeat length in androgen receptor gene of infertile men in an Indian city. *Syst Biol Reprod Med.* 2012 Oct; 58 (5): 255- 62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22578234>

Miyakawa H, Miyamoto T, Koh E, Tsujimura A, Miyagava Y, Saijo Y, Namiki M, Sengoku K. Single-Nucleotide Polymorphisms in the SEPTIN12 Gene May Be a Genetic Risk Factor for Japanese Patients With Sertoli Cell– Only Syndrome. *J androl* 2012; 33: 483– 487. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2164/jandrol.110.012146/pdf>

Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagava Y, Koh E, Namiki M, Horikawa M., Saijo Y, Sengoku K. Single nucleotide polymorphisms in the SEPTIN12 gene may be associated with azoospermia by meiotic arrest in Japanese men. *J Assist Reprod Genet.* 2012 January; 29 (1): 47– 51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3252415/>

Nagata K, Kawajiri A, Matsui S, Takagishi M, Shiromizu T (2003). Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interaction with microtubules. *J Biol Chem* 278: 18538- 18543.

Oliva R, Mezquita C. Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro. *Biochemistry.* 1986; 25: 6508–6511. Oliva R; Castillo J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian Journal of Andrology* (2011) 13, 24– 30.

Ono R, Ihara M, Nakajima H, Ozaki K, Kataoka-Fujiwara Y (2005). Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4. *Mol Cell Biol* 25: 10985-10987.

Pan F F, Malmberg R L, Momany M (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol* 7: 103.

Papaoiannou M D, Nef S. microRNAs in the Testis: Building Up Male Fertility. *Journal of Andrology.* Vol. 31, No. 1, January/February 2010.

Pastuszak A W, Lamb D J. The genetics of male fertility from basic science to clinical evaluation. *J Androl.* 2012 Nov; 33 (6): 1075- 84.

Peterson E A, Kalikin L M, Steels J D, Estey M P, Trimble W S (2007). Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14 a novel testis-specific septin. *Mamm Genome* 18: 796- 807.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2006) The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertility and Sterility* 86, S35– S37.

Quaye L, Tyrer J, Ramus S J, Song H, Wozniak E (2009). Association between common germline genetic variation in 94 candidate genes or regions and risks of invasive epithelial ovarian cancer. *Plos One* 4: e5983.

Rio Frio T, McGee T L, Wade N M, Iseli C, Beckmann J S (2009). A single base substitution within an intronic repetitive element causes dominant retinitis pigmentosa with reduced penetrance. *Hum Mutat* 30: 1340- 1347.

Ross M ve Pawlina W (2011). *Histology a Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. (6.Baskı). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Rubio C, Gil-Salom M, Simon C (2001). Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Human Reproduction* 16, 2084–2092.

Sadler T W (2003). *Langman's Medical Embryology*. (9.Baskı). Williams&Wilkins,USA.

Son J C, Kawamata H, Yoo M S, Kim D J, Lee Y K (2005). Neurotoxicity and behavioral deficits associated with Septin 5 accumulation in dopaminergic neurons. *J Neurochem* 94: 1040- 1053.

Spiliotis E T, Kinoshita M, Nelson W J (2005). A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. *Science* 307: 1781- 1785.

Steels J D, Estey M P, Froese C D, Reynaud D, Pace-Asciak C. (2007) Sept12 is a component of the mammalian sperm tail annulus. *Cell Motil Cytoskeleton* 64: 794–807.

Su SF, Wang ZJ. Advances in the study of Semenogelin I from human seminal vesicles. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2009 Apr; 15(4): 364- 6.

Sugino Y, Ichioka K, Soda T, Ihara M, Kinoshita M (2008). Septins as diagnostic markers for a subset of human asthenozoospermia. *J Urol* 180: 2706-0709.

Sullivan R (2004). Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science* 82–83, 341–347.

Surka M C, Tsang C W, Trimble W S. (2002) The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 13, 3532- 3545.

Talebi A R, Khalili M A, Hossaini A. Assessment of nuclear DNA integrity of epididymal spermatozoa following experimental chronic spinal cord injury in the rat. *international journal of andrology*. 30 (2007) 163– 169.

Tejada R I, Mitchell J C, Norman A, Marik J J, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 1984 Jul; 42 (1): 87- 91

Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, Tohda A, Miura H, Nishimura K. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod.* 2002; 17: 2924– 2929. doi: 10.1093/humrep/17.11.2924.

Variante-Klun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 319– 28.

Versele M, Gullbrand B, Shulewitz M J, Cid VJ, Bahmanyar S, Chen R E, Barth P, Alber T, Thorner J (2004). Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15: 4568– 4583.

Versele M, Thorner J (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol* 15: 414– 424.

Wistuba J, Stukenborg J B, Luetjens J M. Mammalian Spermatogenesis. *Functional Development and Embryology (2007) Global Science Books*. 1 (2). 99-117.

Xue J, Tsang C V, Gai W P, Malladi C S, Trimble W S (2004). Septin 3 (G-septin) is developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *J Neurochem* 91: 579- 590.

Yavetz H, Yogev L, Kleiman S, Botchan A, Hauser R, Lessing JB, Paz G, Gamzu R. Morphology of testicular spermatozoa obtained by testicular sperm extraction in obstructive and nonobstructive azoospermic men and its relation to fertilization success in the in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection system. *J Androl.* 2001 May-Jun; 22 (3): 376- 81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11330637>

Yıldırım M (2012). *İnsan Anatomisi*. (7.Baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

Zhang J S, Kong C, Xie H, McPherson P S, Grinstein S, Trimble W S (1999). Phosphatidyl inositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr Biol* 9: 1458– 1467.

Zhang XD, Jin BF. The role of seminal vesicles in male reproduction and sexual function. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2007 Dec; 13 (12): 1113- 6.

Zhu M, Wang F, Yan F, Yao P Y, Du J (2008). Septin7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J Biol Chem* 283: 18916- 18925.

Zini A, Fischer M, Sharir S. Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology* 2002; 60: 1069– 72.

8. EKLER

EK-1: ETİK 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:

Fakülteniz 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

1982 yılında Kırklareli’de doğan Gülçin Özkara (Gülebenzer) ilk ve orta öğrenimini Lüleburgaz’da tamamladı. 2004 yılında İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü’nden mezun oldu. 2004-2007 yılları arasında MedSanTek Lab. Malzemeleri A.Ş’de Satış ve Aplikasyon Sorumlusu olarak çalıştı. 2007-2008 yılları arasında tüp bebek laboratuvar uygulamaları konusunda Barselona’da IVI Tüp Bebek Merkezi’nde eğitim aldı. 2008 yılında aynı kliniğin İstanbul şubesinin kurulumunda yer aldı ve 2012 yılına kadar tüp bebek ve androloji laboratuvarlarında tıbbi biyolog olarak çalıştı. 2012 yılında Haliç Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Moleküler Biyoloji ve Genetik yüksek lisansına başlayan Özkara, 2013 yılı başından bu yana MedSanTek Lab. Malzemeleri Uygulama Laboratuvarı’nda Applied Biosystems cihazlarının Real-Time PCR, Sanger ve yeni nesil dizileme uygulamaları konusunda çalışmaktadır.