



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***HER2 I655V VE PHB 3'UTR C>T POLİMORFİZMLERİNİN
ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE OLASI İLİŞKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI***

Hazırlayan
İrem YILDIZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman
Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ

TOKAT – 2021
Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*HER2 I655V VE PHB 3'UTR C>T POLİMORFİZMLERİNİN ERKEK
İNFERTİLİTESİ İLE OLASI İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

İrem YILDIZ

TOKAT-2021

Bu çalışma Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
desteklenmiştir (Proje No: 2020/110)

Her hakkı saklıdır

ETİK SÖZLEŞME

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

14/12/2021

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

İrem YILDIZ

İmzası

.....

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde; engin bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla, ilgiyle ve büyük bir özveriyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin en iyisini yapan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen kıymetli ve saygıdeğer danışman hocam Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerinden faydalandığım Anabilim Dalı Hocalarımız Prof. Dr. H. Ömer ATEŞ, Dr. Öğr. Üyesi Nihan BOZKURT ve Arş. Gör. Dr. Emel ENSARİ'ye

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen, beni sürekli motive eden çalışma arkadaşlarım Yüksek lisans öğrencileri Asiye YANCI, Mustafa KOÇAK, Yusuf SELEN, Azize ÖZEN ve Doktora öğrencisi Kübra ŞAHİN'e

Her zaman maddi ve manevi desteklerini hissettiğim ve bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, başta canım babam olmak üzere anneme ve kardeşlerime,

Son olarak, çalışmalarımın yürütülebilmesi için 2020/110 no'lu proje ile maddi destek sağlayan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

HER2 I655V VE *PHB* 3'UTR C>T POLİMORFİZMLERİNİN ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE OLASI İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YILDIZ, İrem

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ

Aralık 2021, iii + 82 sayfa

İnfertilite, korunmasız cinsel ilişkiye rağmen en az bir yıl içerisinde gebelik elde edilememesidir. *Erb-B2* Reseptör Tirozin Kinaz 2 geni (*ERBB2*, sıklıkla *HER2* olarak adlandırılmaktadır) epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptör ailesinin bir üyesini kodlar. *HER2*'nin, erkeklerde spermatogenezde ve Leydig hücre steroidogenezinde rol alabileceği düşünülmüştür. Prohibitin (*PHB*), temel sperm mitokondriyal proteinlerinden olup, somatik hücrelerdeki eksikliği mitokondriyal membran depolarizasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmaya infertilite hastalığı olan 133 erkek ve 100 sağlıklı erkek kontrol dahil edildi. Periferik kandan elde edilen hasta ve kontrol DNA'ları, PZR ve RFLP metotları uygulanarak incelendi. İstatistiksel değerlendirme IBM SPSS (version 20.0) ve Openepi (version 3.01) yazılım programları kullanılarak ki-kare ve varyans analizleri ile yapıldı. *HER2* I655V (rs1136201) ve *PHB* 3'UTR C>T (rs6917) polimorfizmleri bakımından hasta ve kontrollerin genotip ve allel sıklıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Yapılan kompozit genotip analizinde, kompozit genotiplerin erkek infertilitesi için risk oluşturmadığı saptandı. *HER2* I655V ve *PHB* 3'UTR C>T gen polimorfizmleri ile erkek infertilitesi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Örnek sayısı arttırılarak ve farklı popülasyonlarda da bakılarak çalışma daha da genişletilebilir.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi, *HER2*, *PHB*, polimorfizm

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE RELATIONSHIP OF *HER2* I655V AND *PHB* 3'UTR C>T POLYMOPHISMS WITH MALE INFERTILITY

YILDIZ, İrem

Master's Thesis, Department of Medical Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nevin KARAKUŞ

December 2021, iv + 82 pages

Infertility is the inability to achieve pregnancy in at least one year despite unprotected sexual intercourse. The *Erb-B2* Receptor Tyrosine Kinase 2 gene (*ERBB2*, also often called *HER2*) encodes a member of the epidermal growth factor (EGF) receptor family. *HER2* is thought to be involved in spermatogenesis and Leydig cell steroidogenesis in males. Prohibitin (*PHB*) is one of the essential sperm mitochondrial proteins, and its deficiency in somatic cells has been associated with mitochondrial membrane depolarization and increased production of reactive oxygen species (ROS). 133 men with infertility disease and 100 healthy male controls were included in this study. Patient and control DNAs obtained from peripheral blood were analyzed using PZR and RFLP methods. Statistical evaluation was performed with chi-square and variance analyzes using IBM SPSS (version 20.0) and Openepi (version 3.01) software programs. There was no statistically significant difference in genotype and allele frequencies of patients and controls in terms of *HER2* I655V (rs1136201) and *PHB* 3'UTR C>T (rs6917) polymorphisms ($p>0.05$). In the composite genotype analysis, it was determined that composite genotypes did not pose a risk for male infertility. No association was found between *HER2* I655V and *PHB* 3'UTR C>T gene polymorphisms and male infertility. The study can be expanded further by increasing the number of samples and studying in different populations.

Keywords: Male infertility, *HER2*, *PHB*, polymorphism

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Erkek Üreme Sistemi	4
2.1.1. Spermatogenez	5
2.1.2. Spermiyogenez	7
2.2. İnfertilite.....	8
2.2.1. Erkek İnfertilitesi.....	9
2.2.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilme Parametreleri	9
2.3. İnfertilite Epidemiyolojisi	11
2.4. İnfertiliteyi Etkileyen Risk Faktörleri	11
2.4.1. Hipogonadotropik Hipogonadizm	11
2.4.2. Hiperprolaktinemi.....	12
2.4.3. Siliyer Fonksiyon Bozuklukları.....	13
2.4.4. Kistik Fibrozis	13
2.4.5. Enfeksiyon.....	14
2.4.6. Sistemik Hastalıklar.....	14
2.4.7. Endokrin Bozucu Kimyasallar	15
2.5. Yaşam Tarzıyla İlgili Faktörler/Hastalıklar	15
2.5.1. Yaş.....	15
2.5.2. Diyet (Kafein İçeren İçecekler) ve Aşırı Egzersiz	16
2.5.3. Stres	16
2.5.4. Obezite.....	16
2.5.5. Sigara Kullanımı.....	17
2.5.6. Uyuşturucu Kullanımı	17

2.6. Erkek İnfertilitesini Etkileyen Risk Faktörleri	18
2.6.1. Testiküler Nedenler	18
2.6.2. Post Testiküler Nedenler	20
2.6.3. Varikosel.....	21
2.7. Azospermi	21
2.7.1. Azospermi Nedenleri ve Belirtileri	22
2.7.2. Azospermi Tedavisi.....	23
2.8. Polimorfizm.....	23
2.8.1. Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP)	23
2.9. HER2 Proteini	25
2.10. <i>HER2</i> Geni	27
2.10.1. <i>HER2</i> Geninin Sinyal Yolaklarındaki Rolü.....	29
2.11. PHB Proteini	32
2.11.1. PHB'nin Transkripsiyon Düzenlemesi.....	34
2.11.2. Mitokondride PHB'nin Rolü	34
2.11.3. PHB Ekspresyonunun Kansere İlişkisi.....	36
2.12. <i>PHB</i> Geni	37
2.12.1. <i>PHB</i> Geninin Sinyal Yolaklarındaki Rolü	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	42
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
3.3. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler	43
3.4. Uygulanan Yöntemler	43
3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması	44
3.4.2. Kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Protokol	45
3.4.3. <i>HER2</i> Geninin PZR-RFLP Yöntemleri ile Genotiplendirilmesi	46
3.4.4. <i>PHB</i> Geninin PZR-RFLP Yöntemi ile Genotiplendirilmesi	51
3.4.5. Agaroz Jelin Hazırlanması	55
3.4.6. Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	55
3.5. İstatistiksel Yöntemler	56
4. BULGULAR.....	57
4.1. <i>HER2</i> Geni Polimorfizmi	57
4.2. <i>PHB</i> Geni Polimorfizmi	60
4.3. <i>HER2</i> ve <i>PHB</i> Gen Polimorfizmlerinin Kompozit Genotip Analizleri	62

5. TARTIşMA VE SONUÇ	63
KAYNAKLAR	68
EKLER	81



TABLolar LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. WHO laboratuvar kılavuzundan elde edilen veriler	10
Tablo 3.1. <i>HER2</i> genindeki 148 bç'lik bölge için kullanılan primerler	47
Tablo 3.2. <i>HER2</i> I655V polimorfizmi PZR'ı için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı.....	49
Tablo 3.3. <i>HER2</i> I655V polimorfizmi RFLP analizi için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı.....	51
Tablo 3.4. 148 bç PZR ürününün kesim sonucu gözlenen fragment boyları.....	51
Tablo 3.5. <i>PHB</i> genindeki 1237 bç'lik bölge için kullanılan primerler	51
Tablo 3.6. <i>PHB</i> 3'UTR C>T polimorfizmi PZR'ı için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı.....	53
Tablo 3.7. <i>PHB</i> 3'UTR C>T polimorfizmi RFLP analizi için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı.....	54
Tablo 4.1. <i>HER2</i> I655V (A>G) polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırılması	58
Tablo 4.2. Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin <i>HER2</i> I655V (A>G) polimorfizmine göre değerlendirilmesi	59
Tablo 4.3. <i>PHB</i> 3'UTR C>T polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırılması	60
Tablo 4.4. Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin <i>PHB</i> 3'UTR C>T polimorfizmine göre değerlendirilmesi	61
Tablo 4.5. <i>HER2</i> I655V (A>G) / <i>PHB</i> 3'UTR C>T gen polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarının iki yönlü SNP-SNP etkileşimlerinin kompozit genotip analizi.....	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Erkek üreme sistemi bölümleri.....	5
Şekil 2.2. Spermatogenez aşamaları	6
Şekil 2.3. Sperm hücresinin anatomisi.....	8
Şekil 2.4. Tek nükleotit polimorfizmi (SNP).....	24
Şekil 2.5. HER2 proteinin fonksiyonel alanları	26
Şekil 2.6. HER2 proteinin yapısı	26
Şekil 2.7. HER2 proteinin 3D yapıları.....	27
Şekil 2.8. <i>HER2</i> geninin 17. kromozom üzerindeki yerleşimi	27
Şekil 2.9. <i>HER2</i> ile aktive olan PI3K-AKT-M-mTOR sinyal yolağı	30
Şekil 2.10. <i>HER2</i> geninin Ras/Raf/mitojenle aktifleştirilmiş MAPK sinyal yolağı	31
Şekil 2.11. PHB proteinin amino asit dizilimi	32
Şekil 2.12. PHB proteinin 3D yapıları	33
Şekil 2.13. PHB'nin yer aldığı hücresel organeller	33
Şekil 2.14. PHB'nin insan sperm motilitesini düzenlediği yolun şematik gösterimi	36
Şekil 2.15. <i>PHB</i> geninin 17. kromozom üzerindeki yerleşimi	37
Şekil 2.16. <i>PHB</i> 'nin yer aldığı sinyal yolları	39
Şekil 3.1. DNA izolasyonu protokol özetinin şematik gösterimi	46
Şekil 3.2. PZR prensibinin şematik gösterimi	47
Şekil 3.3. <i>HER2</i> geni genomik DNA dizisinin bir kısmı ve primerlerin gen üzerindeki bağlanma bölgeleri ile I655V polimorfik bölgesi	48
Şekil 3.4. PZR aşamalarının şematik gösterimi	49
Şekil 3.5. <i>HER2</i> I655V polimorfizmi için kullanılan PZR programı	50
Şekil 3.6. <i>HER2</i> genine ait bazı PZR ürünlerini gösteren jel fotoğrafı	50
Şekil 3.7. <i>PHB</i> geni genomik DNA dizisinin bir kısmı ve primerlerin gen üzerindeki bağlanma bölgeleri ile 3'UTR C>T polimorfik bölgesi	52
Şekil 3.8. <i>PHB</i> 3'UTR C>T polimorfizmi için kullanılan PZR programı.....	53
Şekil 3.9. <i>PHB</i> genine ait bazı PZR ürünlerini gösteren jel fotoğrafı	54
Şekil 3.10. 1237 bç PZR ürününün kesim sonucu gözlenen fragment boyları.....	55
Şekil 4.1. <i>HER2</i> I655V polimorfizminin RFLP sonuçları.....	59
Şekil 4.2. <i>PHB</i> 3'UTR C>T polimorfizminin RFLP sonuçları	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AKT	Serin/treonin kinaz
AZF	Azospermi faktör
bç	Baz çifti
BMI	Vücut kütle indeksi
°C	Santigrad derece
CF	Kistik fibrozis
CFTR	CF transmembran düzenleyici gen
DAZ	Azospermide delesyon
dk	Dakika
EDC	Endokrin bozucu kimyasallar
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ETC	Elektron taşıma zinciri
ERBB2	Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2
ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
gr	Gram
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

HH	Hipogonadotropik hipogonadizm
HWE	Hardy-Weinberg dengesi
kDa	Kilodalton
KS	Kallmann sendromu
LH	Lüteinleştirici hormon
mg	Miligram
ml	Mililitre
MAPK	Mitojenle aktiveşen protein kinaz
MCI	Mitokondriyal kompleks I
MMP	Mitokondriyal membran potansiyeli
mROS	Mitokondriyal reaktif oksijen türleri
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
ng	Nanogram
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinaz
Rb	Retinoblastoma
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikada devir sayısı
sn	Saniye
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi

SRY	Cinsiyet belirleyici faktör
UTR	Transle edilmeyen bölge
WHO	Dünya sağlık örgütü
µl	Mikrolitre



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, bir çiftin, düzenli ve yeterli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl içinde gebe kalamaması olarak tanımlanmaktadır (Mahat ve ark., 2016).

İnfertilite primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, primer infertilite, hiç gebelik oluşmaması durumudur. Sekonder infertilite ise, geçmişte en az bir kez başarılı gebelikten sonra bir korunma olmadan gebelik elde edilememesidir (Benksim ve ark., 2018). İnfertilite hem erkek hem de kadın tarafından kaynaklanabilmektedir. “Tıbbi veriler, infertilitenin kaynağı olarak, yüzde 30 erkek, yüzde 20 tübal/peritoneal, yüzde 20 ovulatuvar, yüzde 5 uterin/servikal ve yüzde 25 oranında idiyopatik faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir (Bayer ve ark., 2008)”. İnfertiliteyi etkileyen faktörler ise; yaş, beslenme, yaşam şekli, tütün, alkol ve kafein kullanımı, stres, ilişki zamanlaması, doğum kontrol yöntemleri vb. etkenlerden oluşmaktadır (Bayer ve ark., 2008).

Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2 geni (*ERBB2*, sıklıkla *HER2* olarak adlandırılmaktadır) epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFRs) ailesine ait 185 kDa büyüklüğünde bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. Bu gen, 17. kromozomun uzun kolunda (17q12) bulunmaktadır. *HER1* (*EGFR*), *HER3* (*ERBB3*) ve *HER4* (*ERBB4*), EGFR ailesindeki diğer üyelerdir. Tüm bu tirozin kinaz reseptörleri, hücre dışı ligand bağlama alanı, transmembran alanı ve hücre içi tirozin kinaz katalitik alanı dahil olmak üzere üç alandan oluşan tek alt birimli transmembran glikoproteinlerdir (Chen ve ark, 2019).

HER2 geninin, testislerin embriyonal karsinomu ve ileri testis teratomları dahil olmak üzere birçok insan kanserinin patogeneğinde rol oynadığı bildirilmiştir (Shuin ve ark., 1994; Schraml ve ark. 1999).

İnsan fetal testislerinde *HER2*'nin, çoğalan Sertoli hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde eksprese edildiği, ancak fetal spermatogonia da sadece zayıf olarak bulunduğu gözlenmiştir (Quenby ve ark., 1999).

Testiküler *HER2* mRNA düzeyinin, spermatogenik aktivite ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir ve aktif *HER2*'nin, erkeklerde erb tip-1 tirozin kinaz reseptörlerinin diğer üyeleriyle bağlantılı olarak Epidermal büyüme faktörü-büyüme faktörü (EGF-GF) sinyal yolu aracılığıyla spermatogenezde ve Leydig hücre steroidogenezinde rol alabileceği düşünülmüştür (Shin ve ark., 2011).

EGF ailesine ait bir transmembran glikoproteini kodlayan ve tirozin kinaz aktivitesine sahip bir protoonkogen olan *HER2* geni üzerinde yapılan bir çalışma ile, meme kanseri riski, izolösünün (ATC) valine (GTC) dönüşümü olan kodon 655'teki *HER2* gen polimorfizmi ile ilişkilendirilmiştir (Budiarto, 2016).

HER2 geninin transmembran kodlayan bölgesindeki 655. kodondaki tek nükleotid polimorfizminin (Izolösünün valine değişimi) varlığı, farklı kanser tiplerinde rapor edilmiştir (Papewalis ve ark., 1991; Wang ve ark., 2002).

Kodon 655'de ATC, GTC değişimi, *HER*'nin ve tirozin kinaz aktivitelerinin artmış dimerizasyonu ve otofosforilasyonuna sebep olmuştur, bu durumun, hücrelerin transformasyonuna sebep olabileceği bulunmuştur (Nakajima ve ark., 1999).

Evrimsel olarak korunmuş, 30-kDa büyüklüğünde bir protein olan Prohibitin (PHB), mitokondriyal iç zarda halka benzeri bir makromoleküler yapıya sahiptir (Merkwirth ve ark., 2008). İnsan *PHB* geni 17. kromozomun (17q21.33) bölgesinde bulunur ve 7 ekzona sahiptir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5245>).

PHB, temel sperm mitokondriyal proteinlerinden olup, somatik hücrelerdeki eksikliği mitokondriyal membran depolarizasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artışı ile ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark., 2012).

PHB, elektron taşıma zinciri (ETC) komplekslerinin yapısal bütünlüğünü korumaya yardımcı olan önemli bir mitokondriyal membran proteindir. *PHB*'nin, infertil erkeklerde mitokondriyal membran potansiyelini (MMP) değiştirerek ve ROS

seviyelerini artırarak sperm hareketliliğini düzenlediği gösterilmiştir (Durairajanayagam ve ark., 2021).

PHB'nin mitokondriyal lokalizasyonu hücre çoğalması için esastır ve *PHB*'nin olmaması uyarıcı kaynaklı apoptozise karşı artan bir duyarlılığa, mitokondriyal zarın depolarizasyonuna, serbest radikallere karşı duyarlılığa ve artan ROS türlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Schleicher ve ark., 2008).

Süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi serbest radikallerin, spermatozoanın yapısal bütünlüğünü ve bunların hareketlilik, kapasitasyon ve sperm oosit füzyonunu içeren fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir (Aitken, 1995).

Sperm plazma membranı çoklu doymamış yağ asitleri ve membrana bağlı NADPH oksidaz açısından zengin olduğundan, spermin bu işlevleri özellikle ROS'a karşı savunmasızdır. Erkek üreme sisteminin salgılarında antioksidan faktörler tarafından kontrol edilen en uygun ROS seviyesini korumak için gereken ince denge kaybolduğunda, erkek infertilitesine yol açan sperm disfonksiyonu görülmüştür (Chen ve ark., 2012).

Olası tümör-baskılayıcı rolüne ek olarak, inhibitinin translasyon gerektirmeyen ek antiproliferatif etkileri de olabilir. Prohibitinin 3' transle edilmeyen bölgesinin (UTR) hücre çoğalmasının tutulumunda pozitif bir etkisi bulunmaktadır ve bu bölgede C'den T'ye şeklinde olan bir değişim antiproliferatif etkisi olmayan bir varyant oluşturmaktadır (Jupe ve ark., 1996; Manjeshwar ve ark., 2004).

Bu çalışmada amacımız Türk popülasyonunda önemli bir sağlık sorunu olan erkek infertilitesi ile *HER2* I655V ve *PHB* 3'UTR C>T gen polimorfizmleri arasındaki olası ilişkilerin araştırılması olup, elde edilecek sonuçlara göre infertilite tanı ve tedavisine katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

“Erkek üreme sistemi; testisler, sperm taşıyan kanallar (vas deferens, epididimis, üretra), yardımcı bezler (prostat bezi, bulboüretal bez ve seminal kese) ve penis olmak üzere dört bölümden meydana gelmektedir (Şekil 2.1.).

Testisler, sperm (çoğulu:spermatozoa) üretiminde sorumlu organdır. Sağ ve sol tarafta bulunur ve embriyonik dönemde karın boşluğunda gelişir. Testisler anne karnında fetüsün gelişmesi sırasında, sperm üretiminin daha düşük sıcaklıkta meydana gelmesi için karın boşluğu dışında yer alan skrotuma (testis torbası) iner. Testislerin çoğu kısmı, kıvrımlı seminifer tüpçüklerden oluşmuştur. Seminifer tüpçükler içinde, “sperm” ve “sertoli” hücreleri bulunur. Sertoli hücresi, germ hücrelerini korur ve besler. Seminifer tüpçükler dışında yer alan leydig hücreleri ise, androjen hormonu adı verilen steroid yapıda olan testesteron salgılar.

Epididimis, spermatozoaların seminifer tüpçüklerden çıktıktan sonra ulaştığı ilk kanaldır. Spermatozoalar burada olgunlaşmasını tamamlayarak motilite kazanır.

Vas deferens, spermatozoaların, epididimisten sonra geçtiği kanaldır. Vas deferens, düz kas yapısına sahiptir. Bu kanal, idrar kesesinin arkasına dolanarak seminal keseden gelen bir kanalla birleşip boşalma kanalını oluşturur. Vas deferens, üretra’ya bağlanır. Üretradan spermatozoaların dışarı atılmasını sağlar.

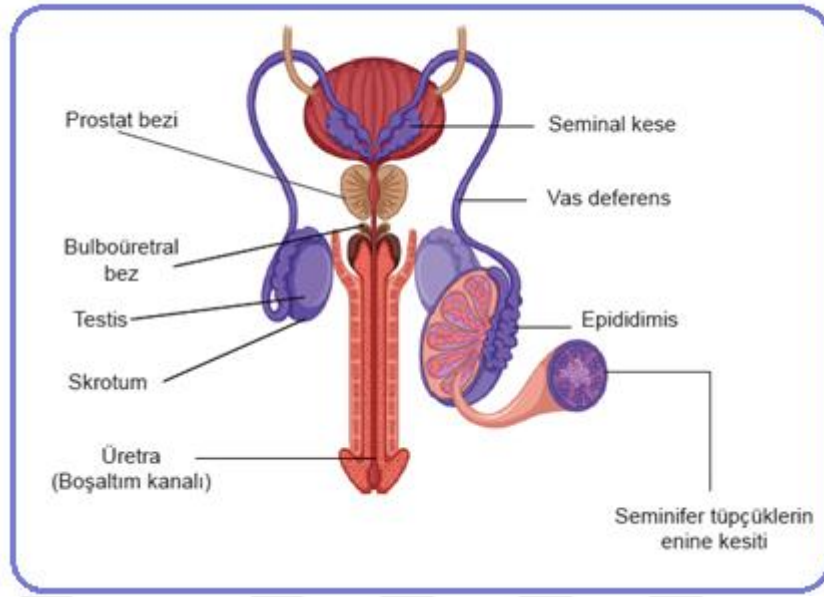
Üretra, penis içinde yer alan spermatozoa ve idrarın vücuttan atılmasını sağlayan kanaldır.

Yardımcı bezler; seminal kese, prostat bezi ve cowper bezinden oluşur. Bu bezlerin salgıladığı seminal sıvı ve bu sıvıda bulunan sperm karışımına “semen” denir. Semen; su, mukus, enzim, früktoz, askorbik asit ve çok sayıda peptit ve proteinler içerir.

Prostat bezi, salgısını ince kanallar yardımıyla doğrudan üretraya iletir. Sulu süt görünümündeki sıvı pıhtılaşmayı önleyici enzimler içerir. Spermatozoaların dışarı atılması sırasında kasılarak idrar girişini engeller.

Bulboüretal bez, prostat bezinin altında bulunan ve üretra boyunca yer alan bir çift bezelye büyüklüğündeki yapılardır. Üretrada kalmış asidik idrar kalıntısını nötralize eden berrak ve kaygan bir mukus salgılar.

Penis, üretrayı ve silindirik yapıda süngerimsi erektile (sertleşebilen) dokuyu içerir (<https://www.bilgial.com/erkek-ureme-sistemi-organlari-ve-gorevleri-nelerdir/>).

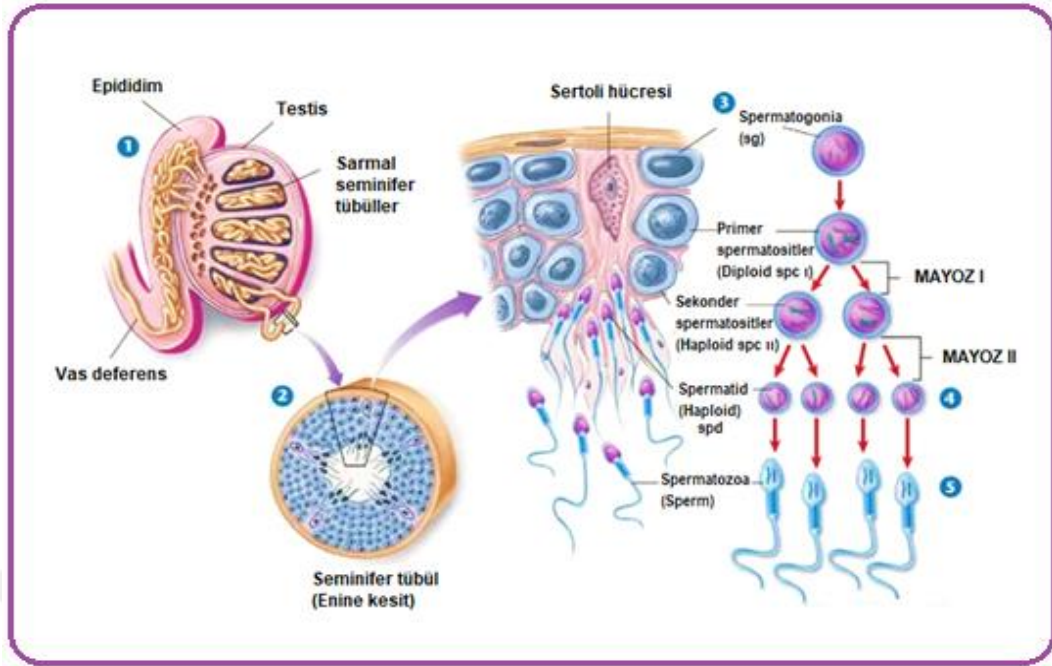


Şekil 2.1. Erkek üreme sistemi bölümleri

(<https://www.bilgial.com/erkek-ureme-sistemi-organlari-ve-gorevleri-nelerdir/>)

2.1.1. Spermatogenez

Spermatogenez, ergenlik sonrası bir erkeğin testislerinin seminifer tübüllerinde meydana gelmektedir. Seminifer tübüllerin bazal laminasına yakın diploid ilkel germ hücreleri (spermatogonia; sg olarak da adlandırılır), diploid primer spermatositleri (spc I) üretmek için ilk olarak mitotik bölünmeye uğrar. Üretilen primer spermatositlerin yaklaşık yarısı, mitotik olarak bölünmeye devam etmek için bazal laminanın yakınında kalır, böylece spermatogenezin erkeğin üreme ömrü boyunca devamlı olmasına izin verir. Diğer primer spermatositler, seminifer tübüllerin lümenine doğru göç eder ve mayoz I geçirmeye başlar, bu da haploid sekonder spermatositler (spc II) ile sonuçlanır. Bu sekonder spermatositler ayrıca mayoz II boyunca bölünerek haploid spermatidler (std) üretir. Spermiyogenez adı verilen son aşama boyunca spermatidlerden gelişen olgun spermatozoalar bir yumurtayı dölleme yeteneğine sahiptir (Şekil 2.2.) (Allais-Bonnet ve Pailhoux, 2014).



Şekil 2.2. Spermatogenez aşamaları (Allais-Bonnet ve Pailhous, 2014)

Spermatogenez sırasında mitokondri olgun spermatozoa da tutulur, bu da erkek infertilitesinde önemini göstermektedir. Spermatozoa, sperm fonksiyonunda hayati bir rol oynayan orta parçada sınırlı sayıda mitokondri içermektedir. Spermlerin motilite, hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi başarılı döllenme için gerekli olan hücresel süreçleri gerçekleştirmesi için gereken enerji mitokondri tarafından sağlanır. Yapılan bir çalışma ile, mitokondriyal aktivitenin, hem kalite hem de dölleme yeteneği açısından insan sperm işlevselliğinin ayrılmaz bir parçası olduğu gösterilmiştir (Durairajanayagam ve ark., 2021). Spermatogenez sürecinde, sperm DNA'sı, DNA'ya bağlı histonların protaminlerle değiştirildiği ve histon / protamin oranının azalmasına neden olan bir süreç olan protaminasyona uğrar. Sperm DNA'sının protaminasyonu, nükleer yoğunlaşma için esastır ve bu sürecin spermatozoadaki düzensizliği sperm DNA fragmentasyonu (SDF) ile sonuçlanabilir ve infertil erkeklerin spermatozoalarında DNA hasarının derecesi artabilmektedir (Panner Selvam ve ark., 2021).

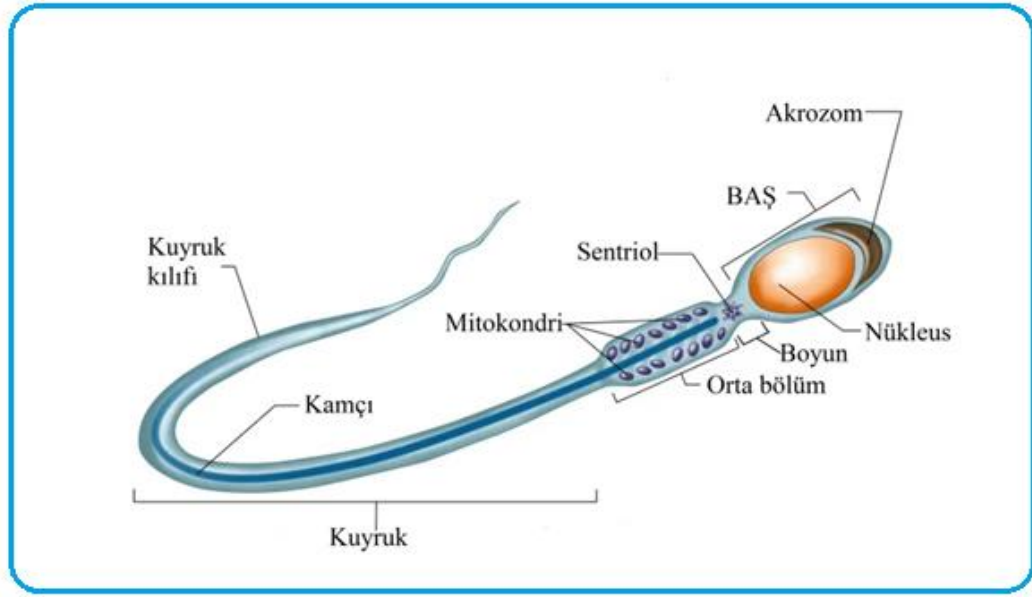
2.1.2. Spermiyogenez

Spermiyogenez, spermatidlerin olgun ve hareketli spermatozoalara doğru olgunlaştığı spermatogenezin son aşamasıdır. Spermatit, bir çekirdek, golgi cisimciği, sentriol ve mitokondri içeren dairesel bir hücreden oluşmaktadır. Bu bileşenler spermatozoon oluşumunda rol oynamaktadır. Mayozun sona ermesinden sonra, haploid yuvarlak spermatitler, bir hücre iskeleti ağı ile non-polarize hücreler halinde spermiyogenezise girerler. Spermiyogenez; golgi aşaması, şapka/akrozom aşaması, kuyruk oluşumu ve olgunlaşma aşaması olmak üzere 4 aşamadan meydana gelir (Kızılay ve Altay, 2019).

Golgi fazında, trans-Golgi ağından proakrozomik granüller oluşur. Bu granüller, Golgi'nin medüller bölgesinde birikir ve nükleer zarfla yakın temas kuran tek bir büyük akrozomik granül oluşturmak için birbirleriyle kaynaşır. Şapka/akrozom aşamasında, küresel akrozomik granül, golgi aparatından ilave veziküller ile birleşerek genişler. Bu aşamada, akrozom artık küresel değildir, düzleşir ve çekirdeğin yüzeyine yayılır. Akrozom fazında, çekirdek uzamaya başlar ve akrozom bu değişikliği takip eder ve sonuç olarak nükleer yüzeyin üçte ikisini kaplar (Muciaccia ve ark., 2013).

Kuyruk oluşumu aşamasında, hücrenin sentriollerinden birisi, spermin kuyruğunu oluşturmak için uzar. Oluşan sperm kuyruğu, modifiye edilmiş hareketli bir siliumdur. Sperm'in kendine özgü yapısı (keratin benzeri dış yoğun lifler [ODF], bir mitokondriyal ve lifli bir kılıf ile aksonem denilen 9+2 merkezi mikrotübüller den meydana gelmektedir. Mikrotübüller, flagellanın yapısını ve fonksiyonunun desteklenmesinde rol oynamaktadır (Kızılay ve Altay, 2019).

Son olarak, olgunlaşma aşamasında, akrozom türe özgü şeklini ve boyutunu geliştirir (Muciaccia ve ark., 2013). Spermiyogenez sonucu oluşan sperm hücresinin yapısı Şekil 2.3. de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Sperm hücresinin anatomisi

(<https://www.biyolojidersim.com/gametogenez-1-spermatogenez/>)

2.2. İnfertilite

İnfertilite, 12 aylık düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiden sonra klinik olarak gebelik oluşturmama veya bir kişinin üreme kapasitesinin bozulmasına bağlı olarak karakterize edilen bir hastalık olarak tanımlanır. Dünya çapında üreme çağındaki çiftlerin %8 ila 12'sini etkilediği tahmin edilmektedir (Vander Borgh ve Wyns, 2018). İnfertilite terimi, bazı klinisyenler tarafından subfertilite ile eşanlamli olarak kullanılmaktadır. Dünya çapında 186 milyon insan infertiliteden muzdarip olup, çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde ikamet etmektedir (Inhorn ve Patrizio, 2015).

Subfertilite, infertilite ile birbirinin yerine kullanılabilen bir terimdir (Zegers-Hochschild ve ark., 2017). Subfertilite, gebe kalmaya çalışan çiftlerde fertilitenin azalmasının herhangi bir şekli veya derecesi olarak da tanımlanır (Vander Borgh ve Wyns, 2018).

2.2.1. Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesi, testislerde spermatozoanın tamamen yokluğundan sperm kalitesinde belirgin değişikliklere kadar oldukça heterojen fenotipik çeşitliliğe sahip olup, erkek popülasyonunun yaklaşık %7'sini etkileyen karmaşık, çok faktörlü bir patolojik durumdur (Tournaye ve ark., 2017; Krausz, 2011). Meni ve testis histolojisi son derece heterojen olduğundan ve spermatogenezde en az 2.000 gen yer aldığından, erkek infertilitesinin yapısı oldukça karmaşıktır. Erkek infertilitesine katkıda bulunan, bilinen faktörlerin en yüksek sıklığı (%25) azospermidir, ancak diğer semen ve etiyolojik kategorilerde tanımlanan anomalilerin sayısı sürekli artmaktadır (Krausz ve Riera-Escamilla, 2018). Testiküler ve post testiküler nedenler, yıllar içinde gözlenen semen düşüşü ve endokrin bozucu kimyasallar dahil olabilecek diğer faktörlerdir (Vander Borgh ve Wyns, 2018).

2.2.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilme Parametreleri

Erkek infertilitesinin teşhisi zor olabilir, çünkü iki kişinin değerlendirilmesini gerektirir. İnfertiliteyi değerlendirmenin ilk adımı kapsamlı bir öykü almaktır. İnfertilite primer (daha önce doğurganlık yok) veya sekonder (daha önce doğurgan, şu anda infertil) olarak sınıflandırılabilir.

İnfertilite geçmişi: Zaman, önceki gebelikler ve sonuçlar (primer ve sekonder infertilite), partnerin doğurganlık geçmişi, tedaviler.

Cinsel geçmiş: Libido, erektil disfonksiyon, boşalma disfonksiyonu, çiftleşme sıklığı ve zamanlaması, cinsel yolla bulaşan hastalık.

Tıbbi geçmiş: Kriptorşidizm, ergenlik zamanlaması, anosmi, testis torsiyonu tarihi, testis travması, şeker hastalığı, nörolojik durumlar (omurilik yaralanması, multipl skleroz), enfeksiyonlar (idrar yolu enfeksiyonları, epididimit veya prostatit, tüberküloz, kabakulak orşiti, yakın zamanda geçirilen ateşli hastalık), böbrek hastalığı, kanser.

Cerrahi geçmiş: Orkidopeksi, retroperitoneal veya pelvik cerrahi, herniorafi, vazektomi, mesane boynu veya prostat cerrahisi.

Gonadotoksin maruziyetleri: İlaçlar (Endokrin düzenleyiciler, antihipertansifler, antibiyotikler, antipsikotikler).

Aile geçmişi: İnfertilite, kistik fibrozis, androjen reseptör eksikliği (Agarwal ve ark., 2021).

2.2.3. Semen Analizi

WHO, erkek infertilitesi potansiyelinin değerlendirilmesinde ilk adım olarak geleneksel semen analizini önermiştir (Agarwal ve ark., 2021). Semen analizi, erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde temel olan spermin kantitatif analizi olarak tanımlanır (Okutman ve ark., 2018). İnsan Spermi ve Sperm-Servikal Mukus Etkileşiminin İncelenmesi ve İşlenmesi için WHO Laboratuvar Kılavuzu 1980'den beri yayınlanmaktadır. En son 2010 yılında piyasaya sürülmüştür. Semen parametreleri için önerilen değerler yıllar içinde çarpıcı bir şekilde gelişmiştir (Tablo 2.1.), ancak semen kalitesi ile ilgili isimlendirme değişmeden kalmıştır (Agarwal ve ark., 2021).

Tablo 2.1. WHO laboratuvar kılavuzundan elde edilen veriler (Agarwal ve ark., 2021)

	WHO Laboratuvar Kılavuzu 1. Baskı (1980)	WHO Laboratuvar Kılavuzu 2. Baskı (1987)	WHO Laboratuvar Kılavuzu 3. Baskı (1992)	WHO Laboratuvar Kılavuzu 4. Baskı (1999)	WHO Laboratuvar Kılavuzu 5. Baskı (2010)
Semen Hacmi	*ND	≥ 2.0 ml	≥ 2.0 ml	≥ 2.0 ml	≥ 1.5 ml
Sperm Konsantrasyonu	20– 200×10^6 /ml	$\geq 20 \times 10^6$ /ml	$\geq 20 \times 10^6$ /ml	$\geq 20 \times 10^6$ /ml	$\geq 15 \times 10^6$ /ml
Toplam Sperm Sayısı	$\geq 40 \times 10^6$ /ml	$\geq 40 \times 10^6$ /ml	$\geq 40 \times 10^6$ /ml	$\geq 40 \times 10^6$ /ml	$\geq 39 \times 10^6$ /ml
Sperm Hareketliliği (%)	$\geq 60\%$	$\geq 50\%$	$\geq 50\%$	$\geq 50\%$	$\geq 32\%$
Sperm Canlılığı (%)	*ND	$\geq 50\%$	$\geq 75\%$	$\geq 75\%$	$\geq 58\%$
Sperm Morfolojisi (% Normal)	≥ 80.5	$\geq 50\%$	$\geq 30\%$	$\geq 15\%$	$\geq 4\%$

(*ND: tanımlanmadı)

2.3. İnfertilite Epidemiyolojisi

Fertilite çağındaki kadınlarda infertilite prevalansının batı dünyasında her yedi çiftten birinde ve gelişmekte olan ülkelerde her dört çiftten birinde olduğu tahmin edilmektedir. Güney Asya, Sahra altı Afrika'nın bazı ülkeleri, Orta Doğu ve Kuzey Afrika, Orta ve Doğu Avrupa ve Orta Asya dahil dünyanın bazı bölgelerinde infertilite oranları %30'a ulaşabilmektedir (Mascarenhas ve ark., 2012).

Erkeklerin infertilite vakalarının %20-30'undan tek başına sorumlu olduğu, ancak toplam vakaların %50'sine katkıda bulunduğu bulunmuştur. Ancak bu rakamlar dünyanın tüm bölgelerini tam olarak temsil etmemektedir. Elde edilen veriler erkek infertilite oranlarının Afrika ve Orta/Doğu Avrupa'da en yüksek olduğunu, Kuzey Amerika, Avustralya ve Orta ve Doğu Avrupa için karşılık gelen oranların sırasıyla %4.5-6, %9 ve %8-12 arasında değiştiğini göstermektedir (Agarwal ve ark., 2015). Özetle, infertilitenin dünya çapında üreme çağındaki çiftlerin %8 ila %12'sini etkilediği tahmin edilmektedir (Ombelet ve ark., 2008).

2.4. İnfertiliteyi Etkileyen Risk Faktörleri

Her iki cinsiyette de infertiliteyi etkileyen risk faktörleri, hipogonadotropik hipogonadizm, hiperprolaktinemi, siliyer fonksiyon bozuklukları, kistik fibrozis, enfeksiyonlar, sistemik hastalıklar, endokrin bozucu kimyasallar ve yaşam tarzıyla ilgili faktörler/hastalıklardır (Vander Borgh ve Wyns, 2018).

2.4.1. Hipogonadotropik Hipogonadizm

Hipogonadotropik hipogonadizm (HH), Hipotalamik Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH), Lüteinleştirici Hormon (LH) ve Folikül Uyarıcı Hormonlarının (FSH) yeterli salgılanmamasından dolayı, hipofiz bozukluklarına ve zayıflamış gonadal uyarıma neden olmasıdır (Hart, 2016).

Kallmann sendromu (KS), anosmi ile HH birlikteliği olarak tanımlanır ve konjenital bir hastalıktır (Jongmans ve ark., 2009). GnRH salgılayan nöronların gelişim sırasında koku alma lobuna göç etmemesinden kaynaklanır. Koku alma lobunun

gelişiminde ki bir başarısızlık anosmiye yol açar. X'e bağlı otozomal dominant olarak kalıtılan, Kallmann sendromu 1 (*KAL1*), Kallmann sendromu 2 (*KAL2*) ve Fibroblast büyüme faktörü reseptörü (*FGFR1*) genlerindeki mutasyonlar KS'na neden olmaktadır (Ohlander ve ark., 2016).

Normosmik idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm ise, anosmi/hiposmisi olmayan HH sonuçlarını kapsar (Jongmans ve ark., 2009). Erkeklerde, kadınlardan 3 ila 5 kat daha fazla görülür; özellikle Kallmann sendromu, erkeklerde 1/5000 prevalansına sahip heterojen bir hastalıktır (Valdes-Socin ve ark., 2014).

Prader-Willi Sendromu, kromozom 15'in q11 veya q13'te paternal kalıtılan mutasyonlarından veya delesyonundan kaynaklanır. Yaklaşık 15.000 ila 30.000 kişide 1 görülür ve aşırı iştah, obezite, mental retardasyon, kriptorşidizm, infantil hipotoni ve HH ile karakterizedir (Ohlander ve ark., 2016).

2.4.2. Hiperprolaktinemi

Hiperprolaktinemi, oligospermik infertil erkeklerin yaklaşık %11'inde mevcuttur. Hiperprolaktinemi, FSH, LH ve testosteron hormonlarının pulsatil salınımının azalmasıyla, GnRH salgılanması spermatojenik durmaya, sperm hareketliliğinde ve sperm kalitesinde azalmaya neden olmaktadır (Mahat ve ark., 2016). Prolaktin, anovülasyona yol açan gonadotropin salgısını inhibe etmektedir (Hart, 2016). Erkeklerde hiperprolaktinemi, düşük serum testosteron düzeylerine, infertiliteye ve cinsel işlev bozukluğuna neden olmaktadır (De Rosa ve ark., 2003). Hiperprolaktinemili 1607 hastadan oluşan geniş bir seride, hesaplanan prevalans, erkeklerde yaklaşık 100.000'de 10 ve kadınlarda 100.000'de 30'dur ve 25-34 yaş arası kadınlar için, en yüksek prevalans değeridir (Kars ve ark., 2009). Semptomatik prolaktinomanın (hipofiz tümörü) bildirilen popülasyon prevalansı erkeklerde 100.000'de 6-10 ila kadınlarda yaklaşık 100.000'de 50 arasında değişmektedir (Fernandez ve ark., 2010).

2.4.3. Siliyer Fonksiyon Bozuklukları

Sperm ve embriyoların taşınması için bir kanal olarak görev alan fallop tüpü, siliyer faaliyete dayanır. Siliyalar, patojenler veya inflamasyon tarafından hasar görebilirken, siliyer yapı ve fonksiyonun birincil bozukluğu Primer Siliyer Diskinezi (PCD) tubal transportu bozar ve gebelik kesesinin ektopik implantasyonuna ve subfertiliteye yatkınlık oluşturur (Hart, 2016).

PCD’li erkeklerin çoğu, kusurlu sperm-kamçı hareketinin bir sonucu olarak sperm hareketsizliğine “sekonder infertiliteye” sahiptir. PCD, tahmini prevalansı 10.000 ila 40.000 canlı doğumda yaklaşık 1 olan, nadir görülen, otozomal resesif bir hastalıktır. Hollanda’daki Volendam nüfusu, İngiliz Asyalı nüfusu ve ABD’ndeki Amish ve Mennonite toplulukları gibi coğrafi olarak ayrılmış belirli topluluklar veya etnik gruplar, akrabalık nedeniyle daha yüksek PCD prevalansına sahiptir (Damseh ve ark., 2017).

2.4.4. Kistik Fibrozis

Kistik Fibrozis (CF), CF transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) genindeki mutasyonların neden olduğu otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (Miller ve ark., 2020). CFTR genindeki mutasyonlar, hem erkek hem de kadın infertilitesinde etkilidir. CF, anormal mukus sekresyonu ile karakterize bir durumdur. Bu hastalık tüm dünyadaki popülasyonları etkiler, ancak Kuzey Avrupalı beyazlarda (yaklaşık 2500 kişiden 1’i) ve Aşkenazi Yahudilerinde (yaklaşık 2270’te 1) daha yaygındır (Vander Borcht ve Wyns, 2018). CF’li kişilerde genin 2 kusurlu kopyası vardır ve neredeyse tekrarlayan sinopulmoner enfeksiyonlardan muzdariptirler. Ayrıca, bu kişilerde genellikle endokrin, gastrointestinal, pankreas, karaciğer ve üreme bozuklukları gelişmektedir (Miller ve ark., 2020).

CF, üreme sisteminin epitel hücreleri üzerindeki doğrudan etkisinden dolayı, dişi subfertilitesi ile ilişkilidir. Kalın servikal mukus, sperm penetrasyonunu bozar. Uterus kavitesi ve fallop tüpünün işlevi üzerindeki etkisi daha az önemlidir. Bikarbonat metabolizmasının, fallop tüpü içinde sperm kapasitasyonu ile ilgili sorunlara yol açtığı bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2013). CF’den muzdarip erkekler genellikle doğuştan vas

deferens (sperm taşıyıcı kanal) yokluğu ile başvururlar. Vas deferens ve seminal veziküllerin hipoplazisi (yetersiz gelişme) veya aplazisi (yokluk, gelişmeme) iki taraflı veya tek taraflı olarak ortaya çıkabilir. Testis gelişimi ve spermatogenez genellikle etkilenmez (Vander Borgh ve Wyns, 2018).

2.4.5. Enfeksiyon

İnfertiliteye neden olan en yaygın enfeksiyöz ajan *Chlamydia trachomatis*'tir. *Chlamydia trachomatis*'in erkek infertilitesi üzerindeki etkisi tartışmalı olsa da (Eley ve ark., 2005), yapılan çalışmalarda metodolojik sorunlar nedeniyle, hem erkeklerde hem de kadınlarda geçmişte *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonu ve subfertilite arasında bir ilişki olduğu düşünülmüştür (Karinen ve ark., 2004).

2.4.6. Sistemik Hastalıklar

Kötü metabolik kontrollü diyabetik ($HbA1c \geq \%7$) hastalarda, bozulmuş sperm motilitesi (azalmış ilerleyici motilite) ve anormal sperm morfolojisi (çift başlı, yuvarlak ve uzun spermatidler ve sitoplazmik orta ve kuyruk parçaları) ile önemli ölçüde ilişkilidir. Metabolik sendrom, insülin direnci, merkezi yağlanma, dislipidemi (kolesterol bozuklukları), endotel disfonksiyonu, aterosklerotik hastalık ve düşük dereceli inflamasyon gibi birbiriyle ilişkili birçok faktörden oluşan karmaşık bir hastalıktır. Sonuç olarak bunların, düşük sperm sayısına, bozulmuş motiliteye ve sperm morfolojisinin anormalliğine yol açabileceği bulunmuştur (Omu, 2013).

Ek olarak, diyabetik hastaların spermelerinde, diyabetik olmayanlara göre 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, diabetes mellitus tip 2 (DM2) olan infertil erkeklerde, diabetes mellitus tip 1 (DM1) hastalarına ve diyabetik olmayan hastalara kıyasla daha yüksek oranda, ROS ve apoptoz belirteçleri kaydedilmiştir (Panner Selvam ve ark., 2021). Hipertansiyonun ise, doğrudan ya da ilaçların bir yan etkisi olarak erektil disfonksiyona neden olabileceği bildirilmiştir (Vander Borgh ve Wyns, 2018).

Otoimmün hastalıklar her iki cinsiyetin üreme yaşamını ve infertiliteyi etkileyebilmektedir (Carp ve ark., 2012). Kronik böbrek yetmezliğinin de infertiliteyi olumsuz etkilediğine dair çalışmalar mevcuttur (Hart, 2016; Iglesias ve ark., 2012).

2.4.7. Endokrin Bozucu Kimyasallar

Endokrin bozucu kimyasallar (EDC'ler), eksojen kimyasallar veya hormon miktarını değiştiren kimyasalların karışımıdır (Gore ve ark., 2015). Başlıca EDC'ler, bisfenol A (plastik ve reçine üretiminde yaygın olarak kullanılan sentetik bir kimyasal olan BPA), ftalatlar ve bunların esterleri (malzemelere esneklik sağlamak için plastikleştiriciler), pestisit atrazin (ticari mahsul yetiştirmede kullanılır), poliklorlu bifeniller'dir. (PCB'ler, 1979'da yasaklanmıştır) (Hart, 2016).

Farklı endüstriyel ürünlerde kullanılan bir diğer önemli toksin olan PCB'ler, potansiyel bir endokrin bozucu kimyasal olarak kabul edilen kalıcı bir organoklorlu kirleticidir. Bu toksine maruz kalmanın sperm kromatin bütünlüğü üzerinde olumsuz bir etkisinin olduğu görülmüştür (Panner Selvam ve ark., 2021).

2.5. Yaşam Tarzıyla İlgili Faktörler/Hastalıklar

2.5.1. Yaş

Kandaki testosteron düzeyleri çoğu erkekte, sağlıklı olanlarda bile yaşla birlikte düşer ve bu düşüş 30 yaş civarında başlar. 30 yaşına kadar testosteron seviyelerinde yılda yaklaşık %1'lik bir düşüş andropoz olarak adlandırılmaktadır. 52 ila 79 yaşları arasında değişen 55 sağlıklı erkeğin sperm örneği üzerinde yapılan bir incelemede, yaşlı erkeklerin anormal sperm morfolojisi ve azalmış canlılık ile daha düşük semen hacmine sahip oldukları görülmüştür. Belçika'da yapılan bir çalışma ile, yaşlı erkeklerin testis hacminin, 18 ila 40 yaş arasındaki genç kontrol grubuna kıyasla %31 oranında daha az olduğu gösterilmiştir (Mahat ve ark., 2016).

2.5.2. Diyet (Kafein İçeren İçecekler) ve Aşırı Egzersiz

Kafein içeren içeceklerin tüketilmesi erkeklerde fertilitate etki edebilir. Yapılan bir çalışma ile, günde üç fincandan fazla çay tüketilmesinin erkeklerde fertilitenin azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mahat ve ark., 2016). Yoğun spor yapmanın, semen kalitesini etkilediğine dair çalışmalar mevcuttur. Rekreatif sporcularda, egzersizin temel olarak pozitif veya nötr etkilerle ilişkili olduğu görülmüştür. Buna karşılık, yoğun spor yapmak sperm konsantrasyonunu, hareketli sperm yüzdesini ve morfolojik olarak normal sperm yüzdesini azalttığından, profesyonel sporcuların, potansiyel infertilite riski altında olduğu bildirilmiştir (Józków ve Rossato, 2017).

Ayrıca, spor yapan bazı erkekler hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenini inhibe eden ve HH'e yol açan anabolik steroidler alabilir, bu da spermatogenezin kısmi veya tamamen inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır (Semet ve ark., 2017).

2.5.3. Stres

Erkeklerde, zihinsel stres sperm kalitesine etki etmektedir. İleri derecede depresyon, azalmış testosteron seviyeleri ile ilişkili olmakla birlikte, testiküler parakrin etkileşimlerini ve spermatogenezini etkilemektedir (Vander Borgh ve Wyns, 2018).

Yapılan bir çalışma ile semen parametrelerinin, stres altındaki erkeklerde önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (Collodel ve ark., 2006). Psikolojik faktörler de dahil olmak üzere birçok stres türü erkek infertilitesini ve üremesini etkileyebilmektedir. Otonom sinir sistemi ve adrenal hormonların klasik stres yanıtına katılırken, üreme sistemini de etkilediği görülmüştür (Mishra ve ark., 2012).

2.5.4. Obezite

Dünyadaki erkeklerin yüzde 13'ü ve kadınların yüzde 21'i vücut kitle indekslerine (BMI) göre obez olarak sınıflandırılmaktadır (Smurthwaite ve Bagheri, 2017). Obezite, erkek infertilitesi ile yakından ilişkilidir. Buna hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenindeki bozulmalar aracılık eder, bu da testosteronun azalmasına ve bacaklarda ve skrotum çevresindeki aşırı yağ dokusu nedeniyle skrotal sıcaklıkta artışa neden olmaktadır. Bu

yolla bozulmuş spermatogeneze, aşırı ROS üretimine yol açabilmektedir (Panner Selvam ve ark., 2021). Obezite ayrıca, artan sistemik inflamasyonla sonuçlanan proinflamatuvar bir durum olarak kabul edilir. Trans yağ asitleri ve doymuş yağlar içeren yüksek enerjili diyet alımı, ROS oluşumunu artırabilmektedir, testisleri ve sperm DNA bütünlüğünü etkileyerek spermde metilasyon bozulmalarına neden olabilmektedir (McPherson ve Lane, 2015; Tsatsanis ve ark., 2015).

ABD’nde çiftçileri ve eşlerini araştıran bir araştırmada, vücut ağırlığındaki 10 kg’lık artışın fertilitiyi yaklaşık %10 oranında azaltabileceği ve BMI değeri 32’nin üzeri olan erkeklerin infertiliteye daha yatkın olabileceği bildirilmiştir (Sallmén ve ark., 2006).

2.5.5. Sigara Kullanımı

Üreme çağındaki erkeklerin yaklaşık %37’si sigara içmektedir ve bu durum Avrupa’nın en yüksek sigara kullanım oranlarına sahip olduğunu göstermektedir. Sigara, 4.000’den fazla kimyasal bileşik içermektedir ve bunların çoğu sigara içenlerin semen örneklerinde bulunmaktadır. Sigara, seminal lökosit konsantrasyonlarında %48’lik bir artış, ROS düzeylerinde %107’lik bir artış ile ilişkilidir (Panner Selvam ve ark., 2021).

Erkeklerde sigara kullanımı sperm üretimini, motilitesini ve morfolojisini olumsuz etkiler ve artan DNA hasarı riski ile ilişkilidir (Künzle ve ark., 2003). Sperm hareketliliğini ve normal sperm hücrelerinin yüzdesini azaltarak erkek fertilitisini azalttığı ve sperm hücrelerinin hareketlilik yüzdesindeki ve normal morfolojideki bir azalmanın günde içilen sigara sayısı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Nadeem ve ark., 2012).

2.5.6. Uyuşturucu Kullanımı

Yapılan bir çalışma ile, erkeklerde 5 yıl boyunca haftada birkaç kez uyuşturucu kullanımının, sperm hiperaktivitesi ile birlikte ejaküle seminal hacimde, sperm sayısında ve morfoloji ve motilitede değişikliklere ve fertilizasyon kapasitelerinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Alvarez, 2015).

2.5.7. Alkol Kullanımı

Alkol bilinen bir teratojendir. Araştırma noktası olarak alkolü içeren çoğu çalışma, en azından orta düzeyde alkol tüketenler arasında, sperm sayıları üzerinde önemli bir etki göstermemiştir. Buna karşılık, birçok çalışma da kronik alkol tüketicilerinde, spermatogenez de bozulma ve sperm sayısı ve testesteron düzeylerinde azalma olduğu görülmüştür (Sharpe, 2010).

2.6. Erkek İnfertilitesini Etkileyen Risk Faktörleri

2.6.1. Testiküler Nedenler

Testiküler disfonksiyon, bozulmuş spermatogenezin en sık nedenidir (Jungwirth ve ark., 2012). Testiküler disfonksiyon, konjenital, edinsel veya idiyopatik yetmezlik olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır. Konjenital yetmezlik anorşi, testiküler disgenezis ve kriptorşidizm olarak kendini gösterebilir. Genetik anomaliler de konjenital yetmezliğe neden olabilmektedir. Bazı araştırmalar, beyaz erkeklerin siyah erkeklere göre önemli ölçüde daha yüksek kriptorşidizm riskine sahip olduğunu bildirmiştir; diğer çalışmalar farklılıklar bildirmemiştir (McGlynn ve ark., 2006).

En sık görülen genetik anomaliler, **Klinefelter sendromu (47 XXY)**, **Y kromozomu mikrolelesyonları ve Kromozomal translokasyonlardır**. Klinefelter sendromu (47, XXY) erkeklerde sık görülen kromozomal bir bozukluktur ve sıklıkla HH, küçük sert testisler, jinekomasti, metabolik ve nörobilişsel bozukluklar ve boy uzaması ile kendini gösterir. Yapılan bir çalışmada epilepsi nöbetleri ve tremor gibi nörolojik rahatsızlıkların yanı sıra psikiyatrik rahatsızlıkların daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Skakkebæk ve ark., 2021). Klinefelter sendromunun, prevalansı yaklaşık 1000’de 1 ila 500 erkekte 1’dir (Bojesen ve ark., 2003). Yetişkin Klinefelter hastalarının, çoğunda düşük testesteron seviyeleri, yüksek FSH ve LH seviyeleri ve saptanamayan serum inhibin B seviyeleri baş gösterir. Klinefelter hastaları, germ hücrelerinin tamamen yokluğu nedeniyle genel olarak infertildir. Leydig hücresi yetersizliği, testislerin somatik ortamının bozulması, somatik ve germ hücreleri arasında işlevsiz bir iletişim, eksik X kromozomu inaktivasyonu ve ayrıca Leydig hücrelerinin ve Sertoli hücrelerinin

bozulmuş apoptotik aktivitesi ile ilgili farklı hipotezler tanımlanmıştır (Aksglæde ve ark., 2006).

Y kromozomunun Azospermi faktör (AZF) bölgesindeki mikrolelesyonlar, değişen sperm parametreleri ve sadece Sertoli hücre sendromundan (SCOS) hipospermatogeneze kadar değişen testiküler histolojik özellikler ile ilişkilendirilmiştir. Erkek cinsiyet belirleyici bölge (SRY), Y kromozomunun kısa kolunda (Yp11) yer alırken, spermatogenez ile ilgili genler, AZF bölgesinin uzun kolunun proksimalinde (Yq11) yer alır (AZFa, AZFb ve AZFc alt bölgelerine ayrılan AZF bölgesi). Y kromozom mikrolelesyonları infertil erkeklerin %5-10'unda rapor edilmiştir (Vander Borcht ve Wyns, 2018). En yaygın mikrolelesyon AZFc alt bölgesinde görülür ve buna Azospermide delesyon (DAZ) gen silinmesi eşlik eder. AZFa ve AZFb alt bölgelerindeki mikrolelesyonlar, azospermi ile ilişkilendirilmiştir (Asadi ve ark.,2017).

Kromozomal translokasyonlar, erkeklerde en sık görülen yapısal bir bozukluk olup 1000 kişide 1.23 sıklığındadır ve infertil popülasyonda prevalansı 10 kat daha fazladır. Kromozomal translokasyonlar dengeli ve dengesiz translokasyonlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Dengeli resiprokal translokasyon, iki veya daha fazla kromozom arasında genetik materyalin değişimidir. Dengeli resiprokal translokasyonlarda otozomal ve cinsiyet kromozom translokasyonları vardır. Kırılma noktalarına bağlı olarak, otozomal translokasyon taşıyıcılarının yaklaşık %60'ı semen analizlerinde en az bir anormal parametreye sahiptir. Cinsiyet kromozomu translokasyonlarının sıklığı nadir olmakla birlikte, bazı çalışmalar Y kromozomu translokasyonları ile azospermi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Kuroda ve ark., 2020).

Robertsonian translokasyonu, insanlarda dengesiz kromozomal translokasyonun en yaygın şeklidir ve aynı zamanda erkek infertilitesinin de en yaygın nedenidir. Robertsonian translokasyonlar, ciddi spermatojenik disfonksiyonu olan infertil erkeklerin %0.9-%3.4'ünde bulunmaktadır. Bunlar beş akrosentrik kromozom çiftinde (13, 14, 15, 21, 22) meydana gelebilir ve sentromerlerinde kırılmalarına neden olarak iki uzun kolun birbirine kaynaşarak tek bir büyük kromozomla sonuçlanmasına neden olur. Böylece, Robertsonian translokasyonu olan bireylerin 45 kromozomu vardır. Bu genetik anomaliliğe rağmen, Robertsonian translokasyonu taşıyıcıları fenotipik olarak normaldir

çünkü iki akrosentrik kromozomun kısa kolları önemli genler içermez. Bununla birlikte, taşıyıcılar, düşük veya transloke trizomili fetüslerle sonuçlanabilecek sperm anöplidi riski altındadır. Robertsonian translokasyon taşıyıcılarının ejakülat semenindeki sperm oranı %5.8 ile %32 arasında olduğu bildirilmektedir (Pylyp ve ark., 2013).

“Edinilmiş testis yetmezliği; travma, testis torsiyonu (testis dönmesi), kabakulak orşiti (ergenliğin sonlarında kabakulakların neden olduğu iltihaplı testisler), ekzojen faktörler (ilaçlar), endojen faktörler (sistemik hastalıklar, varikosel veya testislerin vasküler anatomisine zarar verebilecek ameliyatlardan kaynaklanabilmektedir”.

Oksidatif stresin de infertilitede merkezi bir rolü var gibi görülmektedir (Jensen ve ark., 2017). ROS ve antioksidan dengesindeki bir değişim; sperm motilitesi ve fertilizasyon yeteneklerinde değişikliklere kadar, spermatozoların, membranlardaki yağ asitlerinin oksidasyonuna da yol açtığı bulunmuştur (Vander Borcht ve Wyns, 2018).

2.6.2. Post Testiküler Nedenler

Post testiküler nedenler, ya boşalma bozukluğundan ya da sperm iletiminin obstrüksiyonundan (tikanıklık) kaynaklanır. Obstrüksiyon, epididim, vas deferens ve ejakülatör kanalda meydana gelebilir, edinsel veya konjenital olabilir (Lee ve Seo, 2012).

Epididimal obstrüksiyon, post testiküler nedenlerden biridir. Edinsel formlar arasında epididimal enfeksiyonu en sık görülenlerdir. Vas deferens, obstrüksiyona bağlı enfeksiyon, vazektomi (sperm akışını önlemek için vas deferensin kesildiği veya klemplendiği kalıcı doğum kontrol prosedürü) veya fıtık onarımının sonucu olabileceği düşünülmektedir (Jungwirth ve ark., 2012). Vas deferens'in konjenital bilateral yokluğu 1600 erkekten 1'inde ve CF'li erkeklerin çoğunda bulunur. Sinüzit-infertilite sendromu olarak da adlandırılan Young sendromu, bronşektazi, rinosinüzit ve azospermi gibi semptomların nadir bir kombinasyonudur ve genital kanaldan sperm taşınmasının fonksiyonel olarak engellenmesidir. Ejakülatuar kanal obstrüksiyonu, post testiküler vakalarının %1-3'ünde bulunur. Bu tikanıklıklar kistik veya postinflamatuvar olarak sınıflandırılabilir. Kistik tikanıklıklar genellikle doğuştandır (Müllerian kanal kisti veya ürogenital sinüs/ utriküler kist) ve prostat da ejakülatör kanallar arasında medialde yer

alır (Vander Borgh ve Wyns, 2018). Ejakülatör kanalların veya seminal veziküllerin konjenital veya edinilmiş tam tıkanıklıklarının, genellikle düşük semen hacmi, seminal fruktozun yokluğu veya azalması ve seminal sıvının asit pH'ı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Jungwirth ve ark., 2012).

2.6.3. Varikosel

Varikosel, skrotumdaki kan akışını sağlayan pampiniform pleksus adı verilen venözlerin genişlemesi olarak tanımlanmaktadır. Genel erkek popülasyonunun %15'inde, primer infertiliteye sahip erkeklerin %35'inde ve sekonder infertiliteye sahip erkeklerin %80'e varan kısmında mevcut olduğu bildirilmektedir (Alsaikhan ve ark., 2016). Varikosellerin testis fonksiyonundaki mekanizması çok faktörlüdür, ancak en yaygın olarak kabul edilen teori ise, pampiniform pleksustaki venözlerin kan akışını yavaşlatması ve ROS türlerinin artışına neden olmasıdır. Varikoselin neden olduğu erkek infertilitesinde rol oynayan diğer olası mekanizmalar, skrotal hipertermi, hipoksi, renal ve adrenal metabolitlerin geri akışı, hormonal dengesizlikler ve antisperm antikorlarının oluşumunu içermektedir (Jensen ve ark., 2017).

Varikosel için birincil tedavi yaklaşımı cerrahi onarımdır ve radyolojik perkütan embolizasyon uygulanabilir bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Varikosektomi retroperitoneal, laparoskopik veya robot yardımlı laparoskopik, mikrocerrahi yaklaşımlarla yapılabilir. Yapılan çalışmalar ile; varikosektominin, semen parametrelerini iyileştirdiği ve oksidatif stresi azalttığı bulunmuştur (Agarwal ve ark., 2021).

2.7. Azospermi

Ejakülat da sperm olmaması olarak tanımlanan azospermi, tüm erkeklerin yaklaşık %1'inde ve infertil erkeklerin %10 ila 15'inde mevcuttur (Cocuzza ve ark., 2013). Normal bir sperm sayısının 15 milyon/ml veya daha fazla olduğu kabul edilmektedir. Düşük sperm sayısına sahip erkeklerin (oligozoospermi) sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml'nin altındadır.

İki ana azospermi türü vardır:

1. Obstrüktif azospermi: Bu tür azospermi, epididimde, vas deferenste veya üreme sisteminin herhangi bir yerinde bir tıkanıklık olduğu anlamına gelmektedir. Sperm üretilir, ancak çıkışı gerçekleşmez, bu nedenle ejakülat da ölçülebilir miktarda sperm yoktur.
2. Obstrüktif olmayan azospermi: Bu tür azospermi, testislerin yapısındaki veya işlevindeki kusurlar veya diğer nedenlerden dolayı sperm üretiminin zayıf olduğu veya hiç olmadığı anlamına gelmektedir.

2.7.1. Azospermi Nedenleri ve Belirtileri

Azosperminin nedenleri doğrudan azospermi türleri ile ilgilidir. Bu nedenler bir tıkanıklıktan veya engelleyici olmayan sebeplerden kaynaklanabilmektedir.

Azosperminin obstrüktif nedenleri şunlardır:

1. Travma veya yaralanma
2. Enfeksiyonlar
3. Enflamasyon
4. Pelvik bölgede önceki ameliyatlar
5. Bir kistin gelişimi
6. Vazektomi
7. Vas deferens'in oluşmamasına veya spermin vas deferens'te kalın salgıların birikmesiyle tıkanmasına neden olacak şekilde anormal gelişime neden olan CF gen mutasyonu.

Azosperminin obstrüktif olmayan nedenleri şunlardır:

1. Genetik nedenler
2. Kallmann sendromu
3. Klinefelter sendromu
4. Y kromozomunda delesyon
5. Hipogonadotropik hipogonadizm
6. Meninin mesaneye girdiği retrograd boşalma sorunları

2.7.2. Azospermi Tedavisi

Azosperminin tedavisi nedene bağlıdır. Genetik testler ve danışmanlık, genellikle azospermiyi anlamamanın ve tedavi etmenin önemli bir parçasıdır. Tedavi yaklaşımları şunları içermektedir:

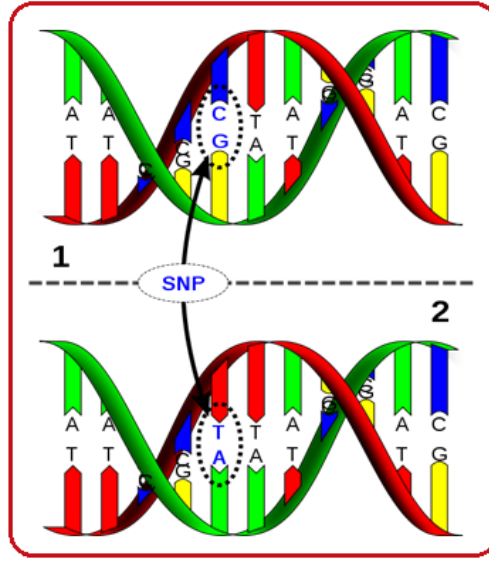
1. Azosperminin nedeni bir tıkanıklık ise, ameliyat, tüplerin engelini kaldırabilir veya anormal tüpleri yeniden yapılandırabilir ve bağlayabilir.
2. Düşük hormon üretimi ana nedense, hormon tedavisi verilebilir. Hormonlar arasında FSH, insan koryonik gonadotropin (HCG), klomifen, anastrozol ve letrozol bulunur.
3. Zayıf sperm üretiminin nedeni varikosel ise, sorunlu damarlar cerrahi bir prosedürle bağlanarak çevredeki yapılar korunabilir.
4. Bazı erkeklerde kapsamlı bir biyopsi ile doğrudan testisten sperm alınabilir (<https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15441-azoospermia>).

2.8. Polimorfizm

Genetik polimorfizm, bir polimorfizmin tipik özelliği olan gen sekanslarına, kromozom yapısına veya bir fenotipe (gen sekansları ve kromozomal varyantlar %1 veya daha yüksek frekansta görülür) göre en az iki varyantın varlığıdır (Teama, 2018).

2.8.1. Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP)

SNP'ler, DNA'nın yaklaşık olarak her 1200 bç'inde bir meydana gelen ve insan popülasyonunun <%1'inde bulunan tek nükleotid (A, T, G ve C) varyasyonlarıdır (Şekil 2.4.) (Devesa-Peiró ve ark., 2020).



Şekil 2.4. Tek nükleotit polimorfizmi (SNP) (Gök ve ark., 2017)

İnsan genomundaki bollukları nedeniyle insanlarda en yaygın genetik varyasyon türü olan; SNP'ler, insan hastalıklarının, popülasyon genetiğinin ve evrimsel çalışmaların haritalanması için önemli genetik belirteçler haline gelmiştir (Rothberg ve ark., 2011). SNP'ler çoğunlukla hatalar oluştuğunda (yer değiştirme, insersiyon ve delesyon) oluşmaktadır. Genomun bazı bölgeleri SNP'lerce diğerlerinden daha zengindir. Gen dizilerinde veya intergenik dizilerde oluşabilir. Genomun kodlamayan bölgelerinde bulunur ve bireyin fenotipi üzerinde çoğunlukla, doğrudan bilinen bir etkiye sahip değildir (Ismail ve Essawi, 2012).

Kesin olarak insan genomundaki SNP sayısı bilinmemekle birlikte, ancak farklı özel ve kamu veri tabanlarında 5 milyondan fazla kaydedilmiş ve yaklaşık 4 milyon doğrulanmış SNP bulunmaktadır. İnsan Genomu projesinden elde edilen veriler ile insan nükleotid dizisinin her 1000-1500 bazda bir kişiden diğerine farklılık gösterdiği ortaya koyulmuştur. Bununla birlikte SNP'lerin 60.000'den fazlası genlerin içindedir ve bazılarının hastalıklarla ilişkili olduğu bulunmuştur Bir kodlama sekansı içindeki SNP'ler orak hücreli anemide dahil olmak üzere birçok genetik hastalıklara neden olabilmektedir. Bir hastalıktan sorumlu SNP'ler, herhangi bir genetik bölgede de ortaya çıkabilir. Örneğin promotör bölgelerindeki SNP'ler genlerin ekspresyon aktivitelerini etkileyebilmektedir (Teama, 2018).

Bir başka önemli SNP grubu, ilaç metabolizmasında yer alan bir proteinin birincil yapısını değiştiren gruptur; bu SNP'ler yıllardır farmakogenetik çalışmaların hedefi olmuştur. Bununla birlikte, bazı SNP'ler hastalığa neden olan bir sekansla yakın ilişki içindedir ve bu nedenle diğer SNP'lerden ayrılır, bu SNP'lerin varlığı, hastalığı geliştirme riskinin artması ile ilişkili olup; hastalığın tanısında, teşhisinde ve diğer uygulamalarda fayda gösterebilmektedir (Ismail ve Essawi, 2012).

2.9. HER2 Proteini

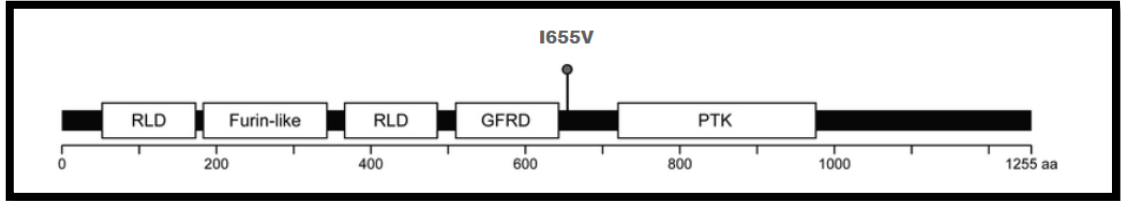
ERBB2, CD340 ve Neu protoonkogen olarak da bilinen HER2 (İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2), EGFR ailesinin bir üyesidir (Daks ve ark., 2020).

EGF, yaklaşık olarak 6 kDa ağırlığında polipeptid yapılı bir büyüme faktörü olup dönüştürücü büyüme faktörü- α (TGF- α), heparin bağlayıcı EGF (HB-EGF), epiregulin, epigen betaselülin ve amfiregulin içeren grup I EGF ailesinin prototipidir. EGF, biyolojik etkilerini bir transmembran protein olan EGFR aracılığı ile mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK 1/2), fosfatidilinositol-3 kinaz-serin/treonin protein kinaz (PI3K-AKT) gibi hücre içi sinyalizasyon yollarını aktive ederek göstermektedir. EGFR (ErbB1), tirozin kinaz reseptörleri ile ilişkili ailenin bir üyesidir. Bu ailenin, diğer üyeleri ise, ErbB2/neu, ErbB3 ve ErbB4 tür. EGF, hücrelerin farklılaşması, çoğalması, bölünmesi, ve hücre göçünü uyaran protein yapıda bir büyüme faktörü olup, organizmalarda birçok süreçte rol oynamaktadır. EGF etkilerini başlıca sindirim, üreme ve sinir sistemi üzerinde göstermektedir (Yarım ve Kazak, 2016).

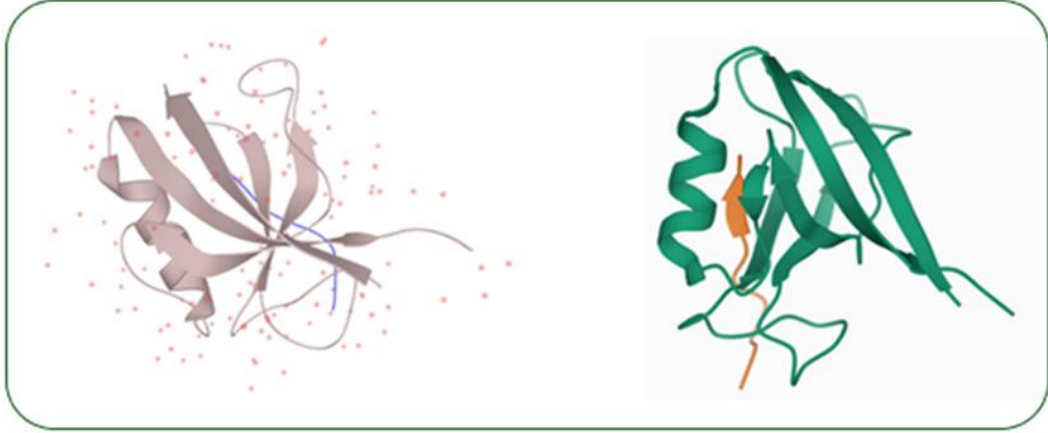
EGF gibi büyüme faktörleri normal spermatogenezde önemli bir rol oynar ve öncelikle testisteki Leydig hücreleri tarafından üretilir. Erkek germ hücrelerinde EGF ve EGFR ekspresyonu, spermatogenezin önemli parakrin ve/veya otokrin düzenleyicileri olarak rol oynar (Aminmalek ve ark., 2021).

HER2 proteini 1255 aa den oluşmaktadır (Şekil 2.5.) ve UniProt kodu P04626 dır. Bu proteinin kendine ait ligand bağlama alanı yoktur ve bu nedenle büyüme faktörlerini bağlayamaz. Bununla birlikte, bir heterodimer oluşturmak, ligand bağlanmasını stabilize etmek ve MAPK ve PI3K'ı içerenler gibi aşağı hedeflenen sinyal yollarının kinaz

aracılı aktivasyonunu arttırmak için ligand bağlı diğer EGF reseptör ailesi üyelerine sıkıca bağlanır. En yaygın allel varyasyonları ise izoform a'nın Ile654 ve Ile655 amino asit pozisyonlarındaki formlarıdır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>).



HER2 proteinin 3 boyutlu yapıları Şekil 2.7. de verilmiştir.

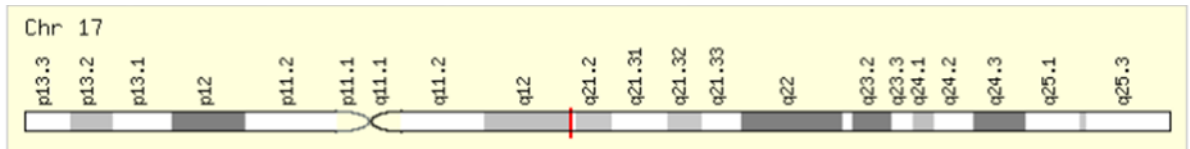


Şekil 2.7. HER2 proteinin 3D yapıları (<https://www.uniprot.org/uniprot/P04626>)

2.10. HER2 Geni

HER2, onkojenik büyüme faktörü reseptörü 1980’lerin başında kemirgen ve insan modellerinden bağımsız olarak tanımlanmış ve adlandırılmış, ancak yakın zamanda birbirlerinin homologları olduğu tespit edilmiştir. Bu genin *v-erbB* (kuş eritroblastoz virüsü) viral onkogenine ve *EGFR* genine homolog olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, *HER2* olarak da adlandırılmaktadır (Moasser, 2007).

HER2 (Gen ID: 2064, OMIM:164870) 17 numaralı kromozomun uzun kolunda (17q12) lokalizedir (Şekil 2.8.). 32 eksondan, 47523 bp’den meydana gelmektedir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>).



Şekil 2.8. *HER2* geninin 17. kromozom üzerindeki yerleşimi
(<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERBB2>)

İlk olarak, NIH 3T3 hücrelerini dönüştüren sıçan nöroblastomlarında yeni bir gen olarak tanımlanmıştır. İnsan meme karsinomundan elde edilen DNA'nın bu genin amplifikasyonuna sahip olduğu bildirilmiştir. Neu onkogen dizisi, erb-B onkogenine homologdur ve 185 kDa fosfoproteini, EGF ile antijenik olarak ilişkilidir (Krishnamurti ve Silverman, 2014).

HER2 geni erb tip-1 tirozin kinaz reseptörleri, erkek germ hücre gelişiminde sperm hücrelerinin ve steroidlerin üretiminde önemli rol oynar. *HER2*, Sertoli ve Leydig hücre proliferasyonu ve farklılaşmasına aracılık eder ve hücre fonksiyonları östrojen üretimini etkiler. Ergenlikten önce Sertoli hücreleri, östrojeni temel rol üstlenirken, Leydig hücreleri aromataz aktivitesi aracılığıyla yetişkinlikte bu sorumluluğu üstlenmiştir. Sertoli ve Leydig hücre proliferasyonu, büyümesi ve fonksiyonunun düzenlenmesinin yanı sıra östrojen, germ hücrelerinin apoptozunu ve akrozom biyogenezini etkiler (Ajayi ve Akhigbe, 2020).

Östrojen, östrojen reseptörü- α (ER α) yoluyla spermiyogenezi düzenlerken, spermatosit apoptozu ve östrojen reseptörü- β (Er β) yoluyla spermiyasyonu düzenler (Walczak-Jędrzejowska ve ark., 2007).

HER2 geninin anormal amplifikasyonu, karsinogenesis ve meme, yumurtalık, akciğer, mide, kolon, prostat, pankreas, baş ve boyun, serviks ve birçok kanser türünde, insanlarda metastaza sebebiyet göstermektedir. HER ailesi üyeleri, serviks kanserleri dahil olmak üzere çeşitli epitelyal tümörlerin tedavisinde terapötik hedefler olarak kabul edilmektedir (Kruszyna ve ark., 2010). Birkaç çalışmada prostat karsinomlarının %40'a varan kısmında *HER2* amplifikasyonu bulunmuştur (Savinainen ve ark., 2002). *HER2* meme kanserlerinin %20-30'unda amplifiyedir ve kötü prognozun bir belirteci olarak kabul edilir. Rahim ağzı kanseri, dünya çapında özellikle gelişmekte olan ülkelerde kadınlarda sık görülen malignitelerden biridir. Rahim ağzı kanserlerinde *HER2*'nin aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerini daha etkili büyümeye teşvik eden, ilave hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla *HER1* sinyalini güçlendirdiği bulunmuştur (Kruszyna ve ark., 2010).

HER2 geni I655V (1136201) polimorfizmi, Papewalis ve arkadaşları tarafından, 1991 yılında tanımlanmıştır. 655. amino asit pozisyonundaki izolösinin valine dönüşümü 40196. nükleotitdeki A>G değişimi sonucu meydana gelir ve bu değişim genin 22. eksonunda yer almaktadır. Bu polimorfik bölge TM sarmal segmentinin N-terminalini kodlayan bir konsensüs dizisi içinde yer alır. Aktif *HER2* heterodimerlerinin destabilizasyonuna yol açabilir, sonuç olarak *HER2* ekspresyonu için sinyal transdüksiyonunu arttırarak, kinaz aktivitesini ve malign transformasyonu uyarmaktadır (Gao ve ark., 2019).

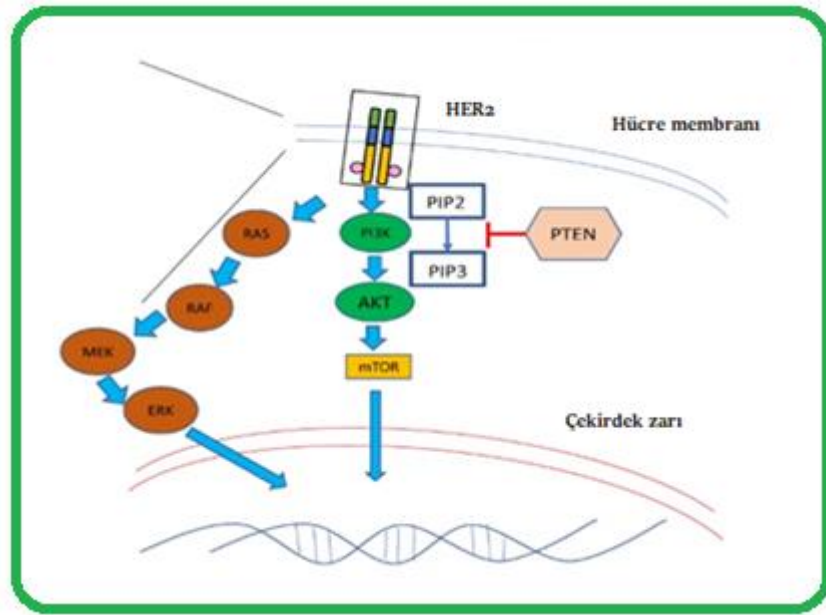
Bu polimorfizmle ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda, *HER2* geninin membranı kapsayan bölgesini değiştiren bir nokta mutasyonunun, bir hayvan modelinde normal geni güçlü bir onkogene dönüştürdüğü görülmüştür. *HER2* geninde, kodon 655'te ya ATC ya da GTC kodlayan transmembran kodlama bölgesinde bu SNP tanımlanmıştır. Valin ifade eden hücreler, izolösin ifade eden hücrelere kıyasla daha yüksek bir büyüme oranı göstermiştir (Mojtahedi ve ark., 2013). Val allelinin, Ile ile karşılaştırıldığında gelişmiş *HER2* sinyalleme ile ilişkili olduğu ve Val eksprese eden hücrelerin in vitro olarak gelişmiş proliferasyon ve azalmış apoptoz gösterdiği açıklanmıştır (de Almeida ve ark., 2018). *HER2*'nin transmembran alanında 655Ile'nin varlığı, aktif *HER2* proteinlerinin diğer *HER*-ailesi üyeleriyle bozulmuş dimerizasyonuna bağlanmıştır, bu da 655Val varyantına kıyasla sinyal iletiminin azalması ile sonuçlanmıştır (Watrowski ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada, *HER2* reseptörünün tirozin kinaz alanının aktivitesinin ve meme kanseri hücrelerinin tümörjenik potansiyelinin artmasına neden olan Val değişiminin fonksiyonel sonuçları olabileceği öne sürülmüştür (Furrer ve ark., 2016).

2.10.1. *HER2* Geninin Sinyal Yolaklarındaki Rolü

HER2 tarafından aktive edilen başlıca hücre içi yollar, MAPK ve PI3K-AKT'yi içerenlerdir.

HER2'nin aktive ettiği PI3K-AKT sinyalleşme kaskadı, en önemli sinyal yolaklarından biridir. Hücre proliferasyonu, protein sentezi, hücre döngüsü ilerlemesi ve stres koşulları altında hücrenin hayatta kalmasının aktivasyonundan sorumludur. Bu sinyal yolu aynı zamanda tümör transformasyonu ile de ilişkilidir. PI3K aktive edilmiş

HER2 tarafından alınır ve fosforile edilir. PI3K, inositol halkasının 3-hidroksil grubunda fosfatidilinositolü fosforile eden protein kinaz enzimleri ailesinin bir üyesidir. PI3K, düzenleyici ve katalitik alt birimlerden oluşan bir heterodimerdir ve PI3K/AKT sinyal yolunun temel bir unsurudur. *HER2* otofosforilasyonu tarafından tetiklenen fosforilasyon kaskadı, hücre metabolizmasının ve otofajinin ana düzenleyicisi olan rapamisin protein kompleksinin memeli hedefine (mTOR) giden PI3K/AKT sinyal yolu aracılığıyla hücre proliferasyonunu destekler. (Şekil 2.9.) (Daks ve ark., 2020).

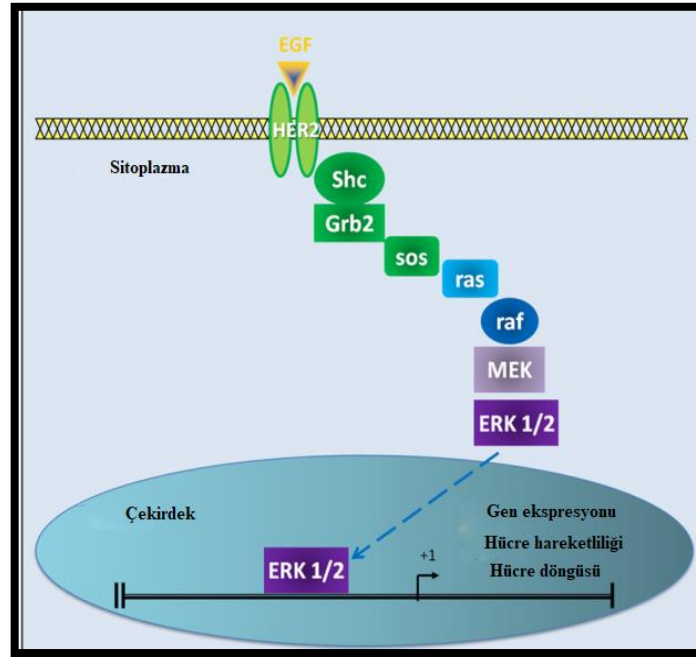


Şekil 2.9. *HER2* ile aktive olan PI3K-AKT-mTOR sinyal yolağı (Daks ve ark., 2020)

PI3K yolağının birkaç hedefi vardır, AKT en önemli sinyal dönüştürücü proteinlerden biridir (Guo ve ark., 2015). PI3K/AKT sinyal yolu malignitelerde sıklıkla bozulur ve önemli bir antitümör hedefi olarak görülmektedir (Thorpe ve ark., 2015). AKT, hücre ölümünden sorumlu genleri baskılayarak ve hücre sağkalımını destekleyen genlerin ekspresyonunu aktive ederek kanser hücrelerinin büyümesini kolaylaştırır (Nicholson ve Anderson, 2002) ve apoptoz indüksiyonunu baskılayan en önemli kinazlardan biridir (Daks ve ark., 2020). Çok sayıda çalışma ile, AKT'deki mutasyonların hücre proliferasyonlarını baskıladığını, buna karşın yukarı regüle edilmiş AKT ekspresyonunun çeşitli stres faktörleri tarafından tetiklenen apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (Daks ve ark., 2020). *HER2* tarafından aktive edilen PI3K-AKT-mTOR

sinyal yolu, stres koşulları (açlık, oksidatif stres, enfeksiyon) altında ve tümör baskılanmasında otofajiyi düzenleyen ana yollardan biridir (Levine ve Kroemer, 2008).

EGF'nin *HER2*'ye bağlanması, merkezi Ras/Raf/MAPK sinyal yolunun aktivasyonu dahil bir dizi hücre içi sinyali başlatır (Şekil 2.10.) (Altieri ve ark., 2012). MAPK yolu, onkogeneze, tümör ilerlemesi ve ilaç direncinin gelişimi ile ilgili bir sinyal zinciridir. Bu sinyal yolunun aktivasyonu, hücre proliferasyonu, büyümesi ve hayatta kalmasından sorumlu anahtar proteinlerin amplifikasyonu ile ilişkilidir (Plotnikov ve ark., 2015). Tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonundan sonra sinyal, sitozolik haberciler, her şeyden önce efektör genlerin transkripsiyonunu veya translasyonunu düzenleyen Ras GTPaz ile ilişkili moleküller yoluyla iletilir (Cargnello ve Roux, 2011). Ras GTPaz'lar, hücre içi sinyal iletimi sağlayan yaklaşık 150 küçük G-proteini içerir. Etkinleştirilmiş Ras, sinyali aşağı regüle ederek, efektör Raf'a iletir. Ras aktivasyonu, Grb2 ve Shc adaptör proteinlerinin kenetlenme bölgelerine bağlanmasını ve Ras GTPaz'ı bağlayan guanin değişim faktörü Sos'un alınmasını gerektirir. Raf ailesi, MEK (MAPK/ERK) yolunun ve ERK1/2 aktivasyonundan sorumlu AKT'leri içermektedir (Daks ve ark., 2020).

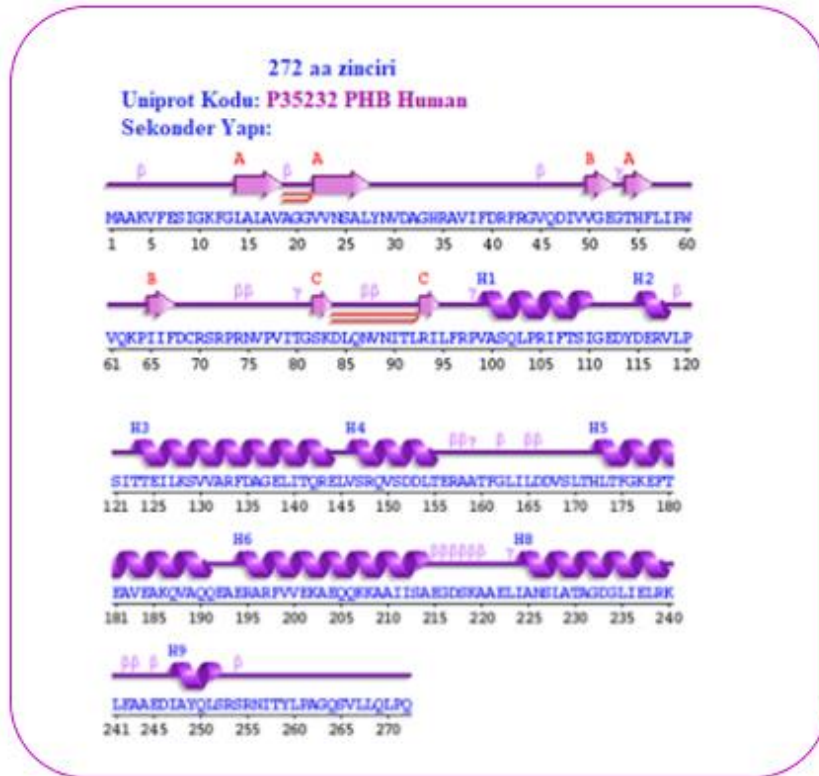


Şekil 2.10. *HER2* geninin Ras/Raf/mitojenle aktifleştirilmiş MAPK sinyal yolağı (Altieri ve ark., 2012)

Ras-MAPK kinaz yolağı, *HER2* pozitif meme kanserinde PI3K/AKT yolu ile uyum içinde olduğu bilinmektedir. MAPK yolu ile uyarılan fosforilasyon için bir hedef, tristetraprolindir (TTP, ayrıca ZFP36 olarak da adlandırılır); genellikle AU açısından zengin mRNA'ların bozulmasını destekleyen bir RNA bağlayıcı proteindir. Fosforillendiğinde inaktif hale gelir ve mRNA stabilitesinin ve translasyonun artmasına neden olmaktadır (Al-Matouq ve ark., 2021).

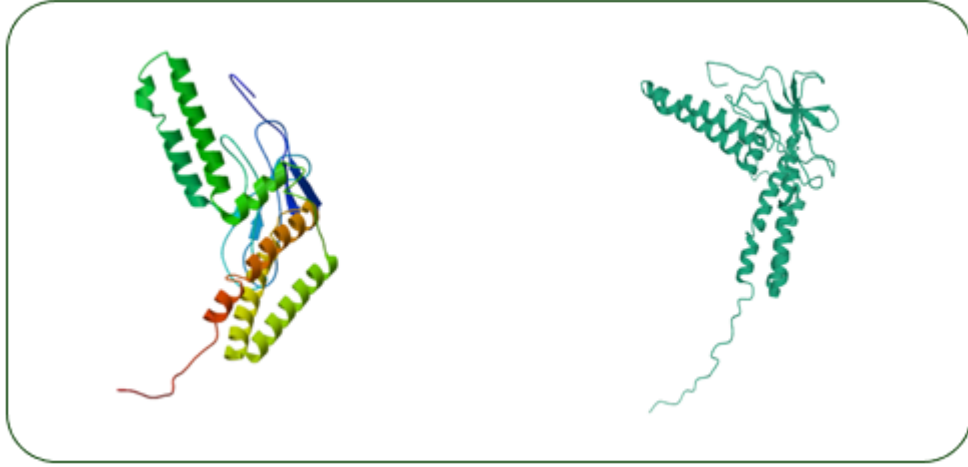
2.11. PHB Proteini

Mitokondriyal iç zar proteini olan PHB evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş bir proteindir, spermatogenez ve sperm kalite kontrolü ile yakından ilişkilidir ve aynı zamanda ubikuitinasyon modifikasyonunun potansiyel bir substratıdır (Hou ve ark., 2017). Epididim Salgı Sperm Bağlayıcı Protein Li 54e, Epididim Luminal Protein 215, HEL-S-54e, HEL-215 olarak da bilinmektedir. Uniprot kodu P35232 dir ve 272 amino asit ten oluşmaktadır (Şekil 2.11.).



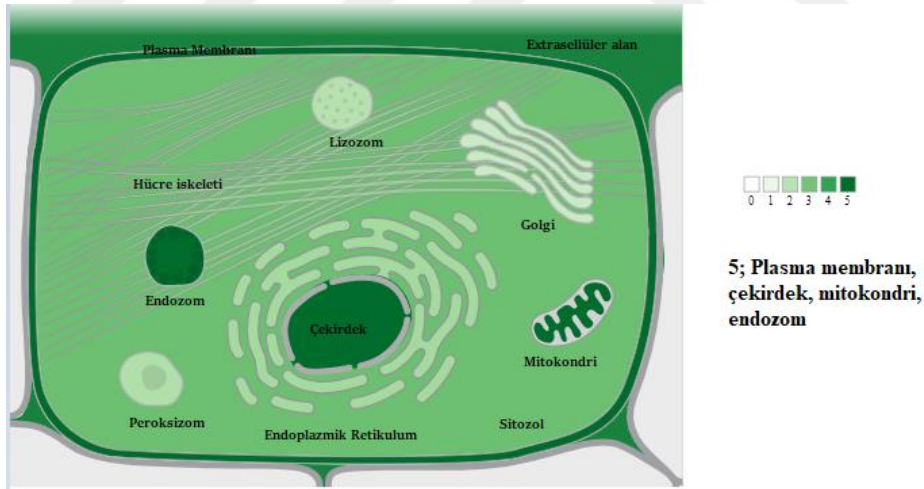
Şekil 2.11. PHB proteininin amino asit dizilimi (<https://www.rcsb.org/>)

PHB proteinin 3 boyutlu yapısı Şekil 2.12. de verilmiştir.



Şekil 2.12. PHB proteinin 3D yapıları (<https://www.uniprot.org/uniprot/P35232>)

PHB proteini; sitozol, mitokondri, çekirdek, endozom ve plazma membranı dahil olmak üzere çoklu hücresel bölmelerde bulunmaktadır (Şekil 2.13.) (Zhou ve Qin, 2013).



Şekil 2.13. PHB'nin yer aldığı hücresel organeller
(<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PHB>)

Çekirdekteki PHB, esas olarak hücre döngüsünü, yaşlanmayı ve tümör baskılanmasını düzenleyebilen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir (Zhou ve Qin, 2013). Ayrıca, mitokondrideki PHB, oksidatif stres oluşumu ile ilişkili olup, mitokondriyal proteinlerin solunum zinciri ve stabilizasyonu için de önemli bir rol

oynamaktadır (Sievers ve ark., 2010; Rajalingam ve Rudel 2005). Plazma zarındaki PHB, plazma zarının bütünlüğünü korumak için bir lipid iskelesi görevi görür (Osman ve ark., 2009).

2.11.1. PHB'nin Transkripsiyon Düzenlemesi

PHB, memeli replikasyon mekanizmasının bileşenleri ile etkileşime girerek replikasyonu etkili bir şekilde bastırır ve bu durum, PHB'nin büyüme düzenleyici özelliklerine katkı sağlar (Rizwani ve ark., 2009). Endojen PHB, hem transkripsiyonel hem de post-translasyonel mekanizmayı içeren karmaşık bir işlem ile, hücrelerin G1'den S evresine geçişinin kontrolüne katkı sağlamaktadır.

PHB, in vitro ve in vivo olarak üç retinoblastoma (Rb) ailesi proteininin tümü ile fiziksel olarak etkileşime girerek E2F aracılı transkripsiyonun baskılanmasında oldukça etkilidir. PHB, E2F 1, 2, 3, 4 ve 5'in aktivitesini inhibe edebilir, ancak bir E2F alanı olmayan promotörlerin aktivitesini etkilemez (Zhou ve Qin, 2013).

2.11.2. Mitokondride PHB'nin Rolü

PHB, mitokondride bir dizi fonksiyonda yer alan küçük korunmuş proteinlerdir (Týč ve ark., 2010). PHB, mitokondriyal kalıtmada ve mitokondriyal morfolojinin düzenlenmesinde esastır. İç zar proteinlerinin m-AAA proteaz tarafından proteolizi, PHB'den yoksun mitokondrilerde uzun süreli olmaktadır, bu da PHB'nin m-AAA proteaz aktivitesi üzerinde negatif bir düzenleyici etkisi olduğunu göstermektedir (Zhou ve Qin, 2013).

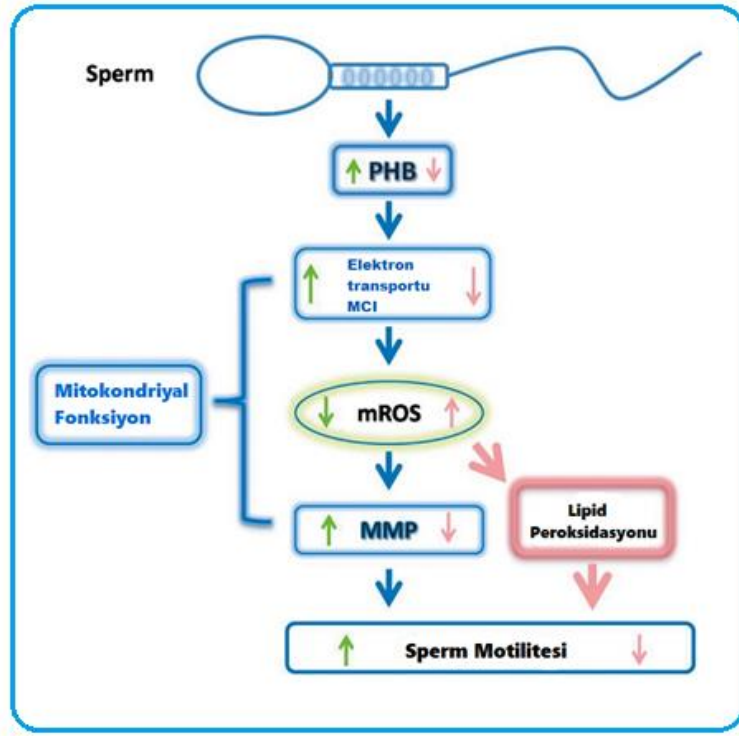
PHB, mitokondriyal kompleks I'in (MCI) montajında veya bozulmasında rol oynamaktadır (Bourges ve ark., 2004). PHB ayrıca hem Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A'dan (TFAM) bağımsız hem de bağımlı yollar aracılığıyla mtDNA'nın organizasyonunu ve kopya sayısını korumada görev almaktadır (Kasashima ve ark., 2008). PHB, ROS üretimi ve mitokondride, mitokondriyal solunum fonksiyonunun sürdürülmesi ile ilişkilidir. PHB gen susturma, MMP kaybını ve ROS'un mitokondriyal üretimini arttırmaktadır. PHB'nin yukarı regülasyonu, kompleks I inhibitörü rotenona

maruz kalan mitokondride ki azalmış ROS üretimi ile ilişkilidir. PHB'nin epitel hücrelerinde gen susturulması, artan hücre içi ROS aracılığıyla mitokondriyal otofajiyi indüklemektedir. PHB yıkımı sırasında otofajinin baskılanması, mitokondriyal depolarizasyonu arttırdığı ve hücre canlılığını azaltmaktadır. İşlevsel olmayan otofajinin eşlik ettiği azalmış PHB seviyeleri, bağırsak epitel hücrelerini mitokondriyal hasara ve sitotoksositeye duyarlı hale getirmektedir. PHB'nin yenilenmesi, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi hastalıklarda oksidan ve sitokin kaynaklı mitokondriyal hasarla mücadele için terapötik bir yaklaşım sunabilir (Kathiria ve ark., 2012).

PHB'nin oligonükleotid siRNA tarafından yıkılması, adipojenik belirteçlerin ekspresyonunu, lipidlerin birikimini ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazların fosforilasyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır. 3T3-L1 hücrelerinde PHB gen susturulması üzerine yapılan bir çalışmada, mitokondriyal retikulumun parçalanması, mitokondriyal krista kaybı, mitokondriyal içeriğin azalması, MCI aktivitesinin bozulması ve aşırı ROS üretimi gözlenmiştir (Liu ve ark., 2012).

Yapılan bir çalışmada, infertil erkeklerde zayıf motiliteye veya düşük konsantrasyonlara sahip spermilerin, mitokondriyal reaktif oksijen türleri (mROS) seviyesi ile negatif korelasyon gösterdiği, ancak MMP ve sperm motilitesi ile pozitif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca bu hücrelerin düşük bir PHB ekspresyon seviyesine de sahip olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, PHB ekspresyon seviyelerinin, germ hücre mitokondriyal bütünlüğü için kritik olduğunu ve insan sperm kalitesinin bir göstergesi olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (Li ve ark., 2020).

PHB ekspresyonunun, sperm kalitesi düşük olan infertil erkeklerde, mitokondriyal mROS seviyeleri ile MMP ve lipid peroksidasyonu yoluyla sperm motilitesini düzenleyebileceği sonucuna varılmıştır (Şekil 2.14.) (Chai ve ark., 2017).



Şekil 2.14. PHB'nin insan sperm motilitesini düzenlediği yolun şematik gösterimi (Fizyolojik koşullar altında (yeşil ok), PHB, MCI aktivitesi ve yüksek MMP tarafından üretilen optimal mROS seviyeleri de dahil olmak üzere mitokondriyal işlevselliği düzenleyerek sperm motilitesini korur. PHB bir kez aşağı regüle edildiğinde (pembe ok), sperm motilitesi, MCI, elektron transportu aktivitesi tarafından yüksek mROS, düşük MMP ve ayrıca lipid peroksidasyonu gibi mitokondri disfonksiyonu ile azalır) (Chai ve ark., 2017).

2.11.3. PHB Ekspresyonunun Kanserle İlişkisi

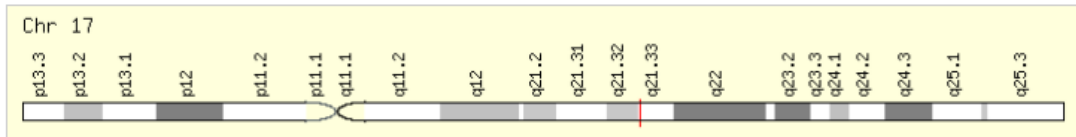
PHB, kanser hücrelerinin çoğalması için gereklidir ve PHB ekspresyonunun aşağı regülasyonu, hücre bölünmesi oranını büyük ölçüde azaltır. Ayrıca, PHB, hücredeki adezyon süreçlerinde rol aldığı için, kanser hücresi yayılımının ve hayatta kalmasının sürdürülmesinde oldukça önemlidir. PHB, normal mide dokularına kıyasla mide kanseri dokularında aşırı eksprese edildiği zaman, mide kanseri dokularında hücre büyümesi gözlenmiştir. PHB'nin aşırı ekspresyonunun karaciğer kanseri için bir risk faktörü olduğunu bildiren bazı çalışmalar mevcuttur. PHB, MHCC97-H hücrelerinde yukarı regüle edildiğinde karaciğer kanseri hücrelerinde hem proliferasyona hem de migrasyona neden olmaktadır (Zhou ve Qin, 2013).

Üriner sistemde PHB, prostat kanseri (PCA) hücrelerinde TGF β sinyalinin hücre içi efektörüdür (Zhu ve ark., 2006). PHB ekspresyonundaki azalma, PCA'nın hem "androjene bağımlı" hem de "androjenden bağımsız" tümör büyümesini desteklemektedir (Dart ve ark., 2009). PHB'nin aşırı ekspresyonu, PCA hücre büyümesi ile ilişkilidir (Fletcher ve ark.,2012). Benign prostat hiperplazisi (BPH) ile karşılaştırıldığında PCA'da PHB'nin yukarı regülasyonu gözlenmiştir ve bu durumun PCA ve BPH'yi ayırt etmek için potansiyel bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. PHB, karsinogenezin erken aşamalarında aktive olmakta ve aşırı eksprese edilmektedir ve duruma insan mesane kanserinin ilerlemesinde karşılaşıldığında sinerjik bir rol oynadığı görülebilir (Zhou ve Qin, 2013).

2.12. PHB Geni

PHB (Gen ID: 5245, OMIM: 176705) 17 numaralı kromozomun uzun kolunda (17q21.33) lokalizedir (Şekil 2.15.). 7 ekson, 17823 bç'den oluşmaktadır. Bu gen, insan hücrel yaşlanmasında ve tümör baskılanmasında rol oynamaktadır. Antiproliferatif aktivitenin, trans-etkili bir düzenleyici RNA olarak işlev gördüğü ileri sürülen 3'UTR de lokalize olduğu rapor edilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5245>).

PHB, hücre proliferasyonu ve büyümesi, apoptoz, hücre sinyalizasyonu, gen transkripsiyonu, mitokondriyal fonksiyon ve östrojen ve androjen reseptörlerinin kontrolü gibi bir dizi hücrel sürecin düzenlenmesi ile bağlantılıdır. Bu süreçlerin inaktivasyonu, insan kanserinin patogeneze katkıda bulunmaktadır (Sirisena ve ark., 2018).



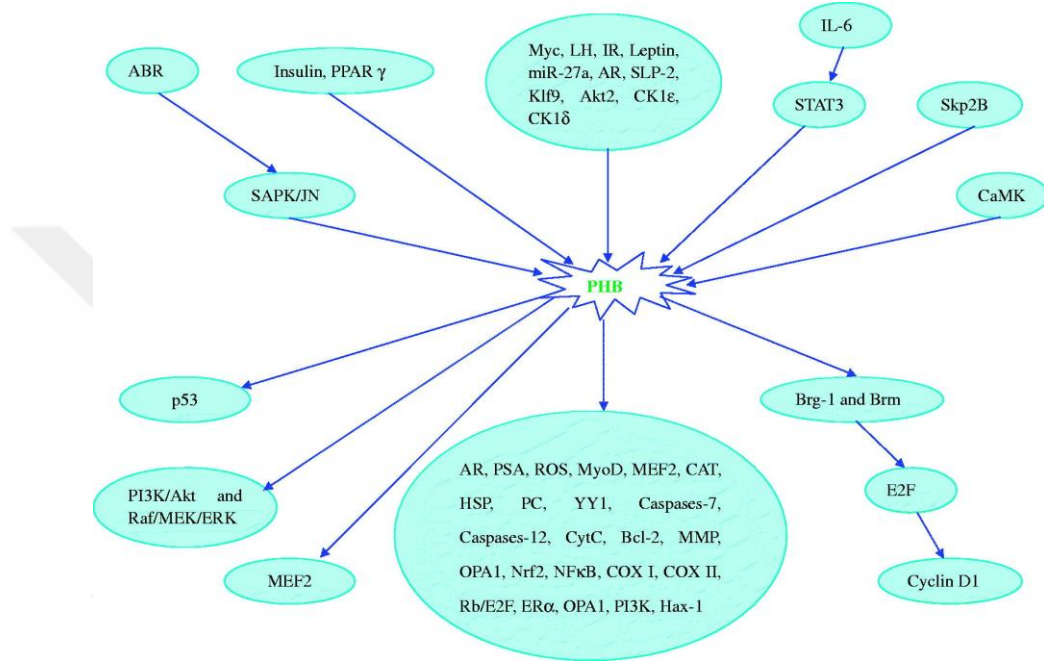
Şekil 2.15. *PHB* geninin 17. kromozom üzerindeki yerleşimi
(<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PHB>)

PHB geninin 3'UTR C>T polimorfizmi, 15700. nükleotitdeki C>T değişimi sonucu meydana gelir ve bu değişim genin 7. eksonunda yer almaktadır. İnsan genlerinin yaklaşık yarısı, alternatif 3'UTR'lere sahip mRNA'lar üretmektedir. 3'UTR aracılı protein-protein etkileşimleri sayesinde, alternatif 3'UTR'ler, aynı amino asit dizisine sahip proteinlerin işlevselliğini sağlamaktadır (Ma ve Mayr 2018). Memeli mRNA'larının 3'UTR'leri, gen regülasyonuna önemli ölçüde katkıda bulunurken aynı zamanda, mRNA bozunmasının ve translasyonunun düzenlenmesi de dahil olmak üzere çok çeşitli alternatif transkripsiyon sonrası modifikasyonları yönlendirmektedir (Geissler ve Grimson, 2016). Bu genin 3'UTR'si, hem normal epitelyal hem de meme kanseri hücre dizilerinde hücre döngüsünün G1 ve S fazları arasındaki hücrelerin proliferasyonunu engelleyen tümör baskılayıcı etkileri olan bir RNA molekülünü kodlamaktadır (Sirisena ve ark., 2018).

Bu polimorfizmle ilgili yapılan çalışmaları incelediğimizde ise, *PHB* 3'UTR'nin iki allelik formu (C→T) mevcuttur ve ailede meme kanseri öyküsü olan daha az yaygın varyantın (T allel) taşıyıcıları meme kanseri riskinde artış göstermiştir (Manjeshwar ve ark., 2003). Campbell ve arkadaşları, *PHB*'nin 3'UTR C>T gen polimorfizminin meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu bulamamıştır (Campbell ve ark., 2003). Karakuş ve arkadaşları, Türk kadınlarında 3'UTR C>T gen polimorfizminin meme kanseri riskine katkıda bulunmadığını ve *PHB*, T varyantının meme kanseri riski ile ilişkili olmadığını bildirmiştir (Karakuş ve ark., 2008). Grimm ve arkadaşları, *PHB* 3'UTR polimorfizminin, Kafkasyalı kadınlarda yumurtalık kanseri riski ve prognozu ile ilişkili olmadığını bulmuştur (Grimm ve ark., 2008). Hasta ve kontrol grubu arasındaki genotip sıklıkları karşılaştırıldığında da Polonyalı kadınlarda *PHB* 3'UTR CT+TT genotipleri ile yumurtalık kanseri riski arasında bir ilişki olmadığını ortaya konmuştur (Jakubowska ve ark., 2008). *PHB*, T varyantı da Avustralyalı kadınlarda yumurtalık kanseri riski ile ilişkili görülmemiştir (Spurdle ve ark., 2003). Zhou ve arkadaşları, *PHB* 3'UTR C>T polimorfizminde, T allelinin kanser duyarlılığını öngörmede önemli bir genetik moleküler belirteç olduğunu ve CC genotipinin özellikle meme kanseri için koruyucu olduğunu bildirmişlerdir (Zhou ve ark., 2012).

2.12.1. *PHB* Geninin Sinyal Yolaklarındaki Rolü

Son yıllarda *PHB* geninin sinyal yolakları üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Araştırmalar, *PHB*'nin ekspresyonunu düzenleyebilecek bazı genlerin olduğunu ve *PHB*'nin bazı genlerin ekspresyonunu düzenleyebileceğini göstermektedir (Şekil 2.16.) (Zhou ve Qin., 2013).



Şekil 2.16. *PHB*'nin yer aldığı sinyal yolakları (Zhou ve Qin, 2013)

PHB'nin yukarı regülasyonunda aşağıdaki gibi bazı sinyal yolakları vardır:

1. *PHB* ve *PHB2* genleri; Myc, LH, insülin reseptörü (IR), leptin tarafından yukarı regüle edilir; ve miR-27a ve androjen reseptörü (AR) *PHB*'yi aşağı regüle edebilir.
2. HeLa hücrelerinde SLP-2'nin tükenmesi, *PHB* ve *PHB2*'nin artan proteolizine yol açar.
3. Klf9'un silinmesi, uterus *PHB2* ekspresyonunu yukarı regüle eder ve *PHB2* nükleer lokalizasyon sinyalini artırır.
4. Abrin (ABR) ile indüklenen *PHB* yukarı regülasyonuna, stresle aktive olan protein kinaz/c-Jun NH2-terminal kinaz (SAPK/JNK) yolu aracılık eder.

5. 3T3-L1 fibroblastlarının insülin veya peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör- γ (PPAR γ) agonisti ile tedavisi, doza ve zamana bağlı bir şekilde *PHB*'nin yukarı regülasyonu ile sonuçlanır.
6. *PHB*'nin interlekin-6 (IL-6) tarafından yukarı regülasyonu, sinyal dönüştürücü transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) fosforilasyonu yoluyla düzenlenir.
7. *PHB*, AKT için bir substrattır. AKT2 ekspresyonu için susturulmuş hücreler, artan *PHB2* seviyesi gösterir ve AKT2 α 'nın aşırı ekspresyonu, azalmış *PHB2* ile sonuçlanır.
8. CK1 ϵ ekspresyonunun yıkılması *PHB2* protein seviyesini artırır ve CK1 δ 'nin yıkılması *PHB2* transkript seviyesini düşürür (Zhou ve Qin, 2013).

PHB'nin aşağı regülasyonunda aşağıdaki gibi bazı sinyal yolları vardır:

1. *PHB*, androjen reseptörü (AR), prostat spesifik antijen (PSA), E2F, ROS, miyoblast belirleme proteini (MyoD), miyosit arttırıcı faktör-2 (MEF2), katalaz (CAT), ısı şoku proteini (HSP), piruvat karboksilaz (PC), YY1, kaspaz-7, kaspaz-12, sitokrom c (CytC), B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ve MMP ekspresyonlarını inhibe edebilir.
2. *PHB*, oksidatif koşullar altında bağırsak epitel hücrelerinde nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) ekspresyonunun düzenleyicisidir ve Nrf2'nin sürekli aktivasyonu yoluyla inflamasyonla ilişkili oksidatif stresi ve yaralanmayı önler.
3. *PHB*'nin aktivasyonun azalması, proliferasyonu azaltır ve NF κ B sinyaline bağlı bir mekanizmada apoptozu indükler.
4. Mitokondride artan *PHB* lokalizasyonuna, sitokrom c oksidaz alt birim II (COX II) düzeyinde ve MMP belirgin azalmalar eşlik eder. Ayrıca, *PHB*'nin mtDNA ile kodlanmış sitokrom c oksidaz I (COX I) alt birimleri ile etkileşimi, ana protein tarafından bozulur ve COX I aktivitesinde azalma ile sonuçlanır.
5. *PHB*, Rb/E2F'nin yanı sıra p53 düzenleyici yolları düzenleme yeteneğine sahiptir. Ayrıca *PHB*, ER α için bir transkripsiyonel baskılayıcı olarak işlev görür.
6. *PHB* ve *PHB2* eksikliği, füzyon proteini OPA1'in bozulmasına yol açar.
7. Murin transforme edilmemiş AML12 hücrelerinde *PHB*'nin yıkılması, siklin D1 ekspresyonunu, siklin D1 promotörüne E2F bağlanmasını ve proliferasyonu artırır.

8. *PHB*, PI3K/AKT ve Raf/MEK/ERK sinyal yolunun aktivasyonunda, epitel hücre adezyonunu ve göçünü modüle etmede ve kanser metastazını teşvik etmede önemli bir rol oynar.
9. HeLa hücrelerinde *PHB2*'nin RNA interferans aracılı yıkımı, Hax-1'in aşağı regülasyonu ve mitokondrinin parçalanması yoluyla kaspaz bağımlı apoptoz ile sonuçlanır.
10. *PHB*, büyüme faktörleri ve immün reseptör sinyali dahil olmak üzere PI3K sinyallemesinin düzenlenmesinde rol oynar.
11. *PHB*, E2F'nin baskılanması ve hücre büyümesi için Brg-1 ve Brm'ye ihtiyaç duyar.
12. Skp2B, *PHB*'yi inhibe ederek p53 fonksiyonunu zayıflatır.
13. CaMK IV, MEF2'nin kalmodulin bağımlı protein kinaz ailesi (CaMK) aracılı aktivasyonunun altında yatan mekanizmalardan biri olan fosforilasyon yoluyla, *PHB2*'yi düzenler (Zhou ve Qin, 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmaya 2009-2019 yılları arasında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji AD’da muayene edilip infertilite tanısı konulan, Y kromozomundaki mikrolelesyon analizi için kan örneği alınıp Tıbbi Biyoloji AD, Moleküler Genetik Laboratuvarı’nda incelemesi yapıp herhangi bir mutasyon saptanmayan, araştırmaya katılmayı kabul eden ve “örnekler daha sonraki çalışmalarda anonim olarak kullanılabilir” onayının yer aldığı onam formunu imzalayan 133 hasta grubu ile kendisinde ve ailesinde infertilite öyküsü bulunmayan, 100 sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. Çalışmamızın etik yönden uygulanabilir olduğuna Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul’unda 24.09.2019 tarihli toplantısında karar verildi (Kayıt no:19-KAEK-179). Çalışmanın tamamı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Moleküler Genetik Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tris Base (Amresco)
2. Borik asit (Amresco)
3. EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit) (Amresco)
4. NaOH (Sodyum Hidroksit) (Riedel-de Haen)
5. Etidyum Bromür (Serva)
6. 6X DNA Loading dye (yükleme boyası) (Thermo Scientific)
7. Primerler (Metabion ve Macrogen)
8. Taq DNA Polimeraz (A.B.T.)
9. Afl III restriksiyon enzimi (New England Biolabs)
10. BsmAI Alw261 restriksiyon enzimi (New England Biolabs)
11. Agaroz (Sigma, Prona)
12. dNTP mix (2.5mM) (A.B.T.)
13. dNTP mix (10mM) (Amplicon)
14. pUC 19 DNA/MspI (HpaII) marker (Thermo Scientific)
15. pUC mix marker (Fermentas)
16. 50bp DNA Marker (Gene DireX)

17. DNA izolasyon Kiti (İnvitrogen)

3.3. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. Santrifüj (Mikro 120, Hettich Zentrifugen)
2. Vorteks (VELP Scientifica, F20220176)
3. Su Banyosu (Memmert)
4. Otoklav (HMC Hirayama, HV-25L)
5. Etüv (Memmert, Beschickung-Loading 100- 800)
6. Hassas Terazı (KERN & Sohn GmbH, ABJ220-4M)
7. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (VELP ARE)
8. Mikropipet Seti (Axygen)
9. pH Metre (İhanna, 507702)
10. PZR Cihazı (Thermal Cyclers) (Techne TC-4000)
11. Yatay Elektroforez Tankı (Cleaver Scientific, MSCHOICETRIO)
12. Jel Görüntüleme Cihazı (Transilluminator) (Prizma)
13. Elektroforez Güç Kaynağı (Consort, EV261)
14. Derin Dondurucu (Arçelik)
15. Bilgisayar (Exper, intelcore)
16. Buzdolabı (İndesit, Arçelik)
17. Mikrodalga Fırın (Arçelik İntellowave, MD554)

3.4. Uygulanan Yöntemler

Hasta ve kontrol gruplarından 3'er ml lik EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden İnvitrogen DNA izolasyon kiti ile DNA'lar izole edildi. Periferik kandan izole edilen DNA örneklerinden, *HER2* ve *PHB* genlerinin polimorfizm analizleri, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile gerçekleştirildi.

3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

5X TBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu: 54 gr Tris, 27.5 gr Borik asit ve 20 ml EDTA 0.5M pH: 8 olacak şekilde karıştırılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1X TBE Tamponu: 100 ml 5X TBE solüsyonu üzerine 400 ml distile su eklendi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

0.5M EDTA pH 8,0: 18.6 gr $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$, 80 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Çözülmenin sağlanabilmesi için karışıma 2 gr NaOH eklendi. pH 8,0'a ulaşıncaya distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edildi.

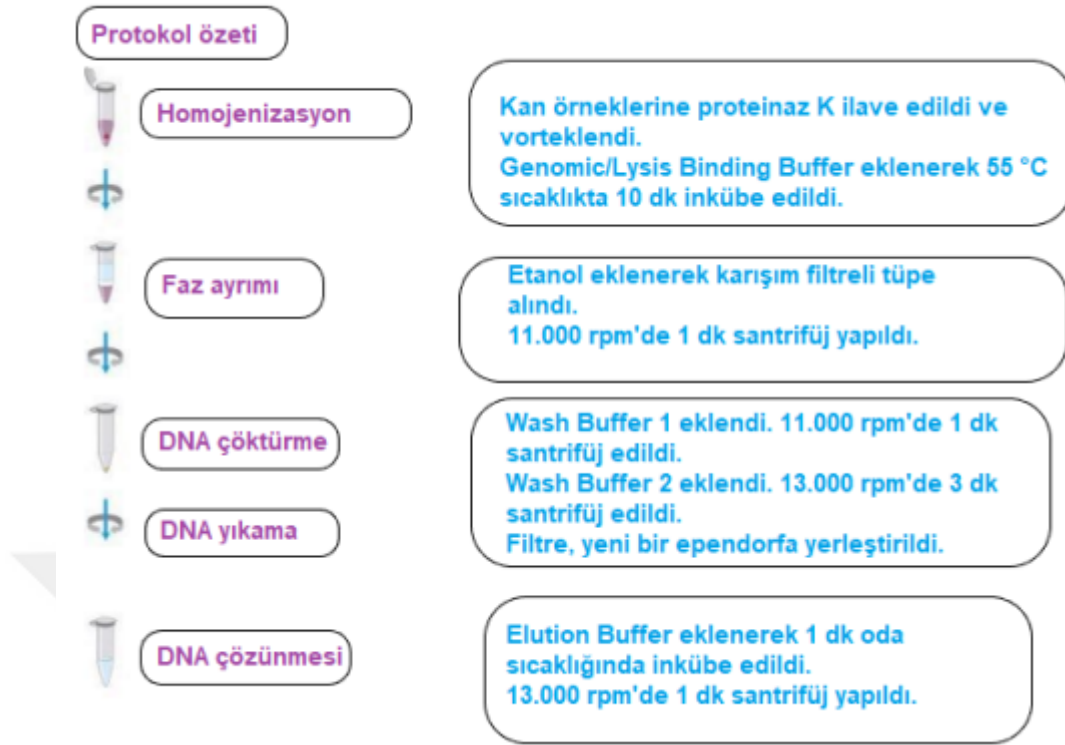
Etidyum Bromür Solüsyonu (10mg/ml): 0.1 gr etidyum bromür, 10 ml distile su içerisinde çözüldü. Eppendorf, ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanarak +4°C'de muhafaza edildi. Stok solüsyondan çalışma solüsyonu 0.5 mg/ml ye seyreltilti.

“Size markers” (Moleküler standartlar):

- 1. pUC 19 DNA/MspI (HpaII) Marker** (Thermo Scientific): 501-489, 404, 331, 242, 190, 147, 111-110, 67 ve 34 bp olmak üzere toplam 9 fragment içermektedir. 10 µl pUC 19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 40 µl steril distile su ve 10 µl 6X Loading dye ile sulandırıldı. Kuyucuklara 2 µl yüklendi.
- 2. pUC mix Marker** (Fermentas): 1118, 881, 692, 501-489, 404, 331, 242, 190, 147, 111-110 ve 67 bp olmak üzere toplam 11 fragment içermektedir. 10 µl pUC mix Marker, 40 µl steril distile su ve 10 µl 6X Loading dye ile sulandırıldı. Kuyucuklara 2 µl yüklendi.
- 3. 50bp DNA Marker** (Gene DireX): 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 ve 50 bp olmak üzere toplam 17 fragment içermektedir. Kullanıma hazır halde gelen bu markerdan kuyucuklara 4 µl yüklendi.

3.4.2. Kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Protokol

1. Kan örneklerinden 200 µl alınıp 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Üzerlerine 20 µl proteinaz K ilave edildi ve vortekslendi.
2. 220 µl olan karışımın üzerine 200 µl Genomic/Lysis Binding Buffer ilave edilerek vorteksleme işlemi yapıldıktan sonra homojenizasyon için 55°C sıcaklıktaki su banyosunda 10 dk inkübasyona bırakıldı.
3. 440 µl olan karışımın üzerine 200 µl etanol (Merck, K3659586) ilave edildikten sonra homojen olana kadar vorteks yapıldı.
4. 640 µl olan karışım filtreli bir tüpe alınarak 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Bu sayede DNA'nın filtrede kalması ve diğer moleküllerin filtreden süzülmesi sağlandı.
5. Filtre, temiz bir tüpe alınarak üzerine 500 µl Wash Buffer 1 ilave edilip 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı.
6. Filtre tekrar temiz bir tüpe alınarak üzerine 500 µl Wash Buffer 2 ilave edilip 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı.
7. 200 µl Elution Buffer ilave edilip 1 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak DNA'nın eppendorfa geçmesi sağlandı. Sonuç olarak eppendorf tüpte yaklaşık 20-50 ng/µl konsantrasyonunda 200 µl DNA elde edildi. DNA örnekleri -20°C'de saklandı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. DNA izolasyonu protokol özetinin şematik gösterimi

3.4.3. *HER2* Geninin PZR-RFLP Yöntemleri ile Genotiplendirilmesi

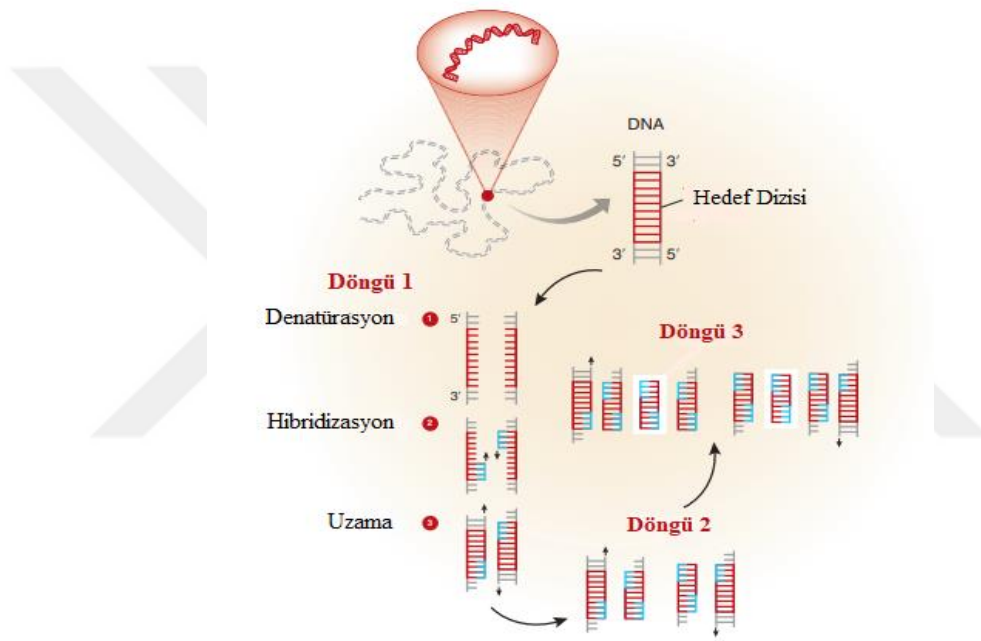
HER2 geni I655V polimorfizmi (rs1136201), PZR-RFLP yöntemi kullanılarak çalışıldı.

PZR-RFLP yöntemi;

PZR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak invitro koşullarda çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PZR; denatürasyon, hibridizasyon (annealing) ve extension (uzama) aşamalarından oluşur ve genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçasığı çoğaltılır (Şekil 3.2.) (Yılmaz ve Devran, 2016).

Reaksiyon karışımı ilk önce hedef DNA'nın iki komplementer DNA zincirinin erime noktasının üzerindeki sıcaklıkta 92-95°C'ye ısıtılır, bu da zincirlerin ayrılmasını sağlar, bu süreç denatürasyon olarak adlandırılmaktadır. Sıcaklık daha sonra spesifik primerlerin, hibridizasyon olarak bilinen bir işlem olan hedef DNA segmentlerine bağlanması için reaksiyon sıcaklığı 37-65°C'ye düşürülür. Primerler ve hedef DNA

arasındaki hibridizasyon, yalnızca dizilimde komplementer olmaları durumunda gerçekleşir (örneğin, A'nın G'ye bağlanması). Son olarak uzama aşamasında sıcaklık 72°C'ye yükseltilir, bu sırada DNA polimeraz, çoğalmakta olan DNA zincirine nükleotidler ekleyerek primerleri uzatabilir. Bu üç adımın her tekrarı ile kopyalanan DNA moleküllerinin sayısı iki katına çıkar. (Garibyan ve Avashia, 2013). RFLP ise, restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA molekülünün farklı büyüklükteki fragmentlere ayrılması ve elde edilen DNA parçalarının jel elektroforez tekniği ile görüntüleme yöntemidir (Kolören ve ark., 2017).



Şekil 3.2. PZR prensibinin şematik gösterimi (Garibyan ve Avashia, 2013)

HER2 geni PZR için kullanılan primerler Tablo 3.1. de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. *HER2* genindeki 148 bç'lik bölge için kullanılan primerler

Primerler	Primer Dizileri
Forward Primer	5'-CCAGCCCTCTGACGTCCAT-3'
Reverse Primer	5'-TCCGTTTCCTGCAGCAGTCTCCGCA-3'

HER2 genine ait baz dizisi içerisinde bulunan; I655V değişimini içeren polimorfik bölge ve primer bağlanma bölgeleri Şekil 3.3. de gösterilmiştir.

```

38701 aatatacatt cagtataaac cgtactttga ataccatac agccattctg tttttcactt
38761 ttatTTTTat ttatTTTattt atttattatt tattttgaga tgtcattttg ctggtgttac
38821 ccaggctgga gtgcaatggc gcagtcttgg ctcaccgcaa cctccacctc tcaggttcaa
38881 acgattctcc tgcttcagcc tccagagtgg ctgggattac aggcaggcac caccacaccc
38941 ggctaatttt gtatTTTTtag tagagacggg gtttctccat gttagtcagg ctggtctcga
39001 actcgagagc tcagggtgatc tgcccacctc agcctcaagc caccatgccc agccctactt
39061 tcagtattca ataaattaca tagccaggca ccgtggctca cacctgtaat cccagcactt
39121 taggaggcca aggtgggagg atcctttgag gccagaagct cgagaccagc ctgggcaaca
39181 tagtgagacc ccatttctac aaaaaataaa aaaactagct gagtgtgggt gcgtgtgtct
39241 gtagtcccag ctacttgggc agctgagggt gaaagactgc ttgagcccag aggtcagggc
39301 tgcaagtggc catgatctca ccactgcact cagcctgggc aacacagcaa ggccctgtct
39361 caaaaaataa taaataaata acacaaactt atttaacagt ttactataaa ataggctttg
39421 tgtcagatga ttctgcccac ctgtaagctg ctggcagtggt aaatgttctg agcacgtgta
39481 agccaggcta ggtgtcttaa atgcattttc agtttcaact tagaattggt ttatcaggac
39541 gtagccctct ggtgttgagg ggcattgtga ttaacagtct ccttagtgac tttttttttt
39601 ttgagatgga gtcttgcaact ggccgtagtg cagtggcaca atctcagctc actgcaacct
39661 cttgtctccc gggttcaagc gattctcctg cctcagctc ccaagtagct gggattacag
39721 gcaccacac cagccccagc taatttttgt gtgtgtgtat ttttagtaga gacgggggtt
39781 tcactatggt ggccaggctg gtctcgaaact cctgaccttg tgatctgccc acctcagact
39841 ctcaaagtgc taggattcca ggcattgagc accgcgcccc gagtccttag tgatttttac
39901 accatgaatt gttgaagccc taagccagag ccaagggcaa gattatagag aatctggaga
39961 tgccggagag gttctgattg cctacaagga gtttggaact tattgtggag gcagcgggga
40021 gccaaggcag gtttttagagt aggagagggt ccaagcctgt gggtcacctt tccgacttcc
40081 ctttccgaat gccaaacacc ttcatgtccc ccgtgggccc cctttgtccc tcccaccca
40141 aactagccct caatccctga ccctggcttc cgcccccagc cctctgacgt ccatcatctc

```

↓

5' Forward Primer 3' Polimorfik Bölge

```

40201 tgcgggtggtt ggcattctgc tggctgtggt cttgggggtg gtctttggga tcctcatcaa
40261 gcgacggcag cagaagatcc ggaagtacac gatgccgaga ctgctgcagg aaacggaggt

```

3' Reverse Primer 5'

```

40321 gaggcgggggt gaagtccctc cagcccgcgt ggggtctgca ccggcccccg gcactgacct
40381 accacccccct caccacagct ggtggagccg ctgacacctc gcggagcgat gcccaccag
40441 ggcagatgc ggatcctgaa agagacggag ctgaggaagg tgaagggtgt tggatctggc
40501 gcttttgga cagtctacaa ggtcagggcc aggtcctggg gtggcgggcc ccagaggatg
40561 gggcggtgc ctggaggggt gtggtcgga gttctgatg gaggggcaag agctggaggc
40621 agtgtttggg ggagggcagt tacagcgag aagggagcgg ggccaagccc taggggtgtg
40681 aaggatgttt ggaggacaag taatgatctc ctggaaggca ggtaggatcc agcccacgct
40741 cttctcactc atatcctcct ctttctgccc agggcatctg gatccctgat ggggagaatg
40801 tgaaaattcc agtggccatc aaagtgttga gggaaaacac atccccaaa gccaaacaaag
40861 aaatcttaga cgtaagcccc tccacctct cctgctagga ggacaggaag gacccatgg
40921 ctgcaggtct gggctctggt ctctcttcat tggggtttgg ggagatatga ctcccgcaaa

```

Şekil 3.3. *HER2* geni genomik DNA dizisinin bir kısmı ve primerlerin gen üzerindeki bağlanma bölgeleri ile I655V polimorfik bölgesi

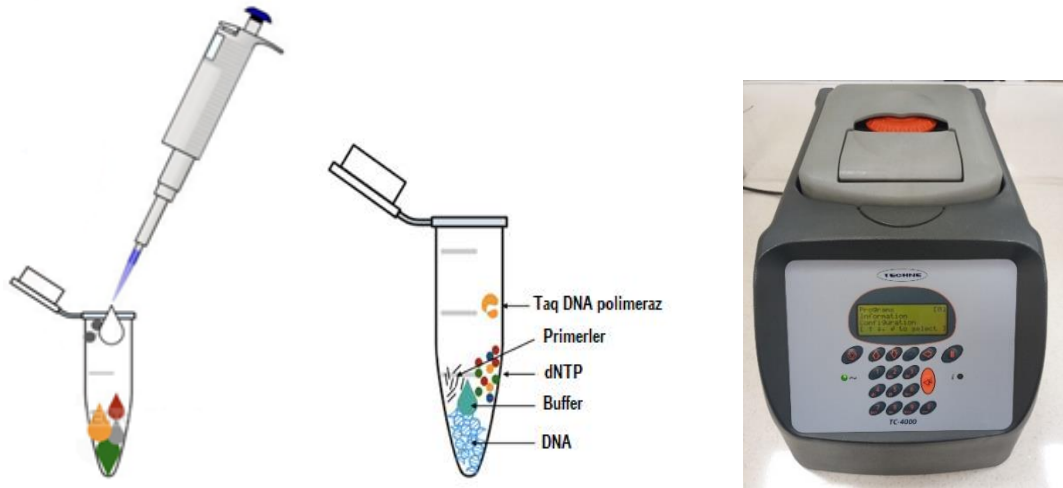
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007503.1?from=4945&to=45523&report=genbank)

HER2 geni I655V polimorfizmi PZR bileşenleri Tablo 3.2. de verilmiştir.

Tablo 3.2. *HER2* I655V polimorfizmi PZR'ı için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı

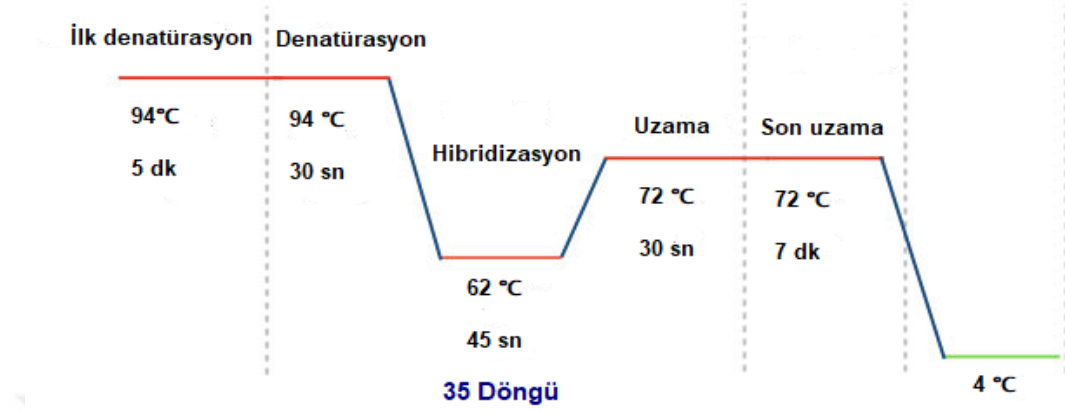
PZR Bileşeni (Stok)	25 µl	Final Konsantrasyon
10X PCR Buffer (MgCl ₂ içerir)	2.5 µl	1X PCR Buffer
dNTP mix (10mM)	0.5 µl	0.2mM
Forward Primer (20pmol)	0.25 µl	5pmol
Reverse Primer (20pmol)	0.25 µl	5pmol
Taq DNA Polimeraz (2.5U/µl)	0.4 µl	1U
Genomik DNA	2 µl	
Steril distile su	19.1µl	
Toplam	25 µl	

Steril distile su, buffer, dNTP, primerler ve enzim sırasıyla eppendorf tüpe konulduktan sonra homojen karışım sağlanması için 10 sn, sırasıyla vorteks ve santrifüj yapıldı. 23 µl reaksiyon karışımı PZR tüplerine aktarıldıktan sonra üzerlerine 2'şer µl DNA'lar eklendi. Son olarak thermal cyler cihazına yerleştirildi (Şekil 3.4.).



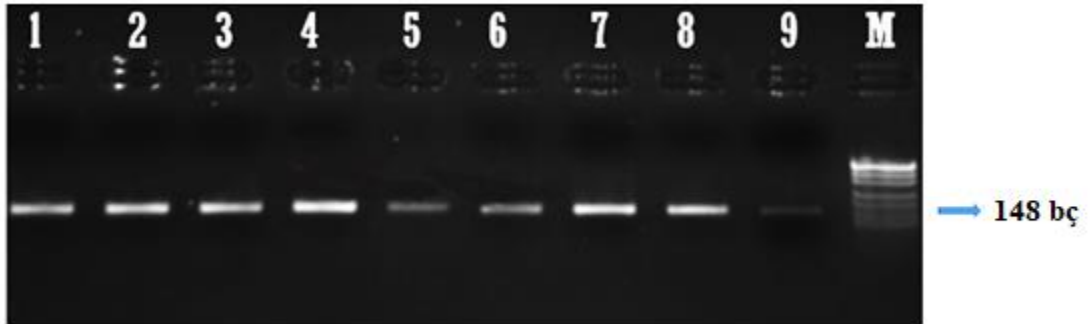
Şekil 3.4. PZR aşamalarının şematik gösterimi

En uygun PZR amplifikasyon koşulları, optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlendi (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. *HER2* I655V polimorfizmi için kullanılan PZR programı

HER2 I655V polimorfizmine ait PZR ürünleri etidyum bromür ile boyanmış %2'lik agaroz jelde yürütülerek 148 bp büyüklüğünde ürün bandı gözlendi (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. *HER2* genine ait bazı PZR ürünlerini gösteren jel fotoğrafı (M: pUC mix marker)

Amplifikasyondan sonra PZR ürünlerinin her biri Tablo 3.3. de belirtilen reaksiyon karışımı hacminde, tanıma bölgesi 5'... GTCTC K₁↓... 3' ve 3'... CAGAG K₅↑... 5' şeklinde olan *Alw26I* (*BsmAI*) kesim enzimi ile 37.5°C'de 16 saat kesime bırakıldı.

Tablo 3.3. *HER2* I655V polimorfizmi RFLP analizi için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı

RFLP bileşeni (stok)	15 µl	Final Konsantrasyon
10X Tango Buffer	1 µl	1X
Alw26I (BsmAI) (10U/ µl)	1 µl	10U
PZR Ürünü	10 µl	
Steril distile su	3 µl	
Toplam	15 µl	

RFLP ürünleri, etidyum bromür ile boyanmış %3.5'luk jelde 25 dk yürütülerek görüntülendi. Kesim sonucunda elde edilen fragment boyları Tablo 3.4. de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. 148 bç PZR ürününün kesim sonucu gözlenen fragment boyları

Gözlenen fragment boyları	
AA (İle/İle) (yabanıl) homozigot	148 bç
AG (İle/Val) heterozigot	148 bç, 116bç, 32bç
GG (Val/Val) (varyant) homozigot	116 bç, 32 bç

3.4.4. *PHB* Geninin PZR-RFLP Yöntemi ile Genotiplendirilmesi

PHB 3'UTR C>T polimorfizmi (rs6917) PZR-RFLP yöntemi kullanılarak çalışıldı. *PHB* geni PZR için kullanılan primerler Tablo 3.5. de belirtilmiştir.

Tablo 3.5. *PHB* genindeki 1237 bç'lik bölge için kullanılan primerler

Primerler	Primer Dizileri
Forward Primer	5'-AAGGTGGCTTTCTGGTGA-3'
Reverse Primer	5'-GGAAGGTCTGGGTGTCATT-3'

PHB genine ait baz dizisi içerisinde bulunan; 3'UTR C>T değişimini içeren polimorfik bölge ve primer bağlanma bölgeleri Şekil 3.7. de gösterilmiştir.

13681 aaaatgggaa aagaggggata gatttaattt tggagaatga aaacactgtg tgggcagaga
13741 cttgtgttgc tttgtatctg ccataacttc agagattata ataagtctag tacagtgcct
13801 ggtgatagta ggtatacagt aaatgtttgt tgagcaaata gacgcagggc ccagtcattt
13861 caaaattgta tgtaatttca gggaggctta atactgtctt cttcctcaca ctctgaagg
13921 tcacacgttg cagagagctg tcttcctatt gatattggta gggcaagcct aggagatctc
13981 actctgggtg cctggattct ggtcaggaac cagcctaact cacaggcagc tctaggaaca
14041 gtcaaaagtg catgctgctc ttccttagcc atcccgaggt tttttgtttg tttgtttgtt
14101 tgttttgtttg tttgtgacag ctctgtggcc caggctggag tgcaatggca tgatcatagc
14161 tcaactgcagc cttggcctcc tgggctcaag tgatcctcct gcctccgcct cccaaagtgc
14221 caggattaca ggcattgagc accacaccg gcctgtcct ggctttgatg aagtccttta
14281 gacttaaggc tggaggaaaa gatgagcctt gaggattgat tccacctttc ttttgcttct
14341 gttttccttg gccttggtt ctctggctc agagtagggt tgttaaaacta gattgcaatt
14401 aatattaatg aggactttga aataagacaa atattcctgc agccaacaga gatgtatccc
14461 tcccgtgaca aggagtgagc atgaaaggat aggggaggac tgggtggcaa tgtgctctgc
14521 ttccccccgc ttccccccgc agccatcagg aggaagtaaa ctccccgagt tccttcagga
14581 gcctgggaag **gtggctttct** **ggtga**agggc ctttggttgt agcctgacat gcggtgcct

5'Forward Primer 3'

14641 gaggtttgat ctttgtctcc acctccattc ttttaggctg agcaacagaa aaaggcggcc
14701 atcatctctg ctgagggcga ctccaaggca gctgagctga ttgccaactc actggccact
14761 gcaggggatg gctgatcga gctgcgcaag ctggaagctg cagaggacat cgcgtaccag
14821 ctctcacgct ctcggaacat cacctacctg ccagcggggc agtccgtgct cctccagctg
14881 cccagtgag ggcaccct gcctgcacct ccgcggtgct actgggccac agccccgatg
14941 attcttaaca cagccttct tctgtccca cccagaaat cactgtgaaa tttcatgatt
15001 ggcttaaagt gaaggaaata aaggtaaaat cacttcagat ctctaattag tctatcaaat
15061 gaaactcttt cattcttctc acatccatct acttttttat ccactccct accaaaaatt
15121 gccaaagtgc tatgcaaacc agctttaggt cccaattcgg ggctgctgg agttccggcc
15181 tgggcaccag catttggcag cagcaggcg gggcagtatg tgatggactg gggagcacag
15241 gtgtctgcct agatccaCgt gtggcctccg tcctgtcact gatggaagg ttcggtatga

Polimorfik Olmayan Diğer Kesim Bölgesi

15301 gggcatgtgc ggctgaactg agaaggcagg cctccgtctt cccagcgggt cctgtgcaga
15361 tgctgctgaa gagaggtgcc ggggagggc agagaggaag tggctgtct gttaccataa
15421 gtctgattct ctttaactgt gtgaccagcg gaaacagggt tgtgtgaact gggcacagat
15481 tgaagaatct gcccctgttg aggtgggtgg gcctgactgt tgccccccag ggtcctaaaa
15541 cttggatgga cttgtatagt gagagaggag gcctggaccg agatgtgagt cctgttgaag
15601 acttcctctc taccccccac cttggtccct ctgagatacc cagtggaaat ccaacttgaa
15661 ggattgcatc ctgctggggc tgaacatgcc tgccaaagaC gtgtccgacc tacgttctctg

Polimorfik bölge

15721 gccccctcgt tcagagactg cccttctcac gggctctatg cctgcactgg gaaggaaaca
15781 aatgtgtata aactgctgtc aat**aaatgac** **accagacct** **tcc**ggctcag ccatgggttg

3'Reverse Primer 5'

15841 gttttttgtt tgtgggagcc gtgggatcag aacagagtgt tctagcagtt tttgtgtgta
15901 catgtttgca ttgccagctg ggacagagtc tccagtaagg cagaaaatgc tttgttttca
15961 gaaaacactt tgtgttgtgt tccagatcca tccccaccc gaagggaatc tctgtggtag
16021 cagggtgaggt ttgtcatggg ataggcagtg aaggtaggtg gagggcagtt aacttgttct

Şekil 3.7. *PHB* geni genomik DNA dizisinin bir kısmı ve primerlerin gen üzerindeki bağlanma bölgeleri ile 3'UTR C>T polimorfik bölgesi

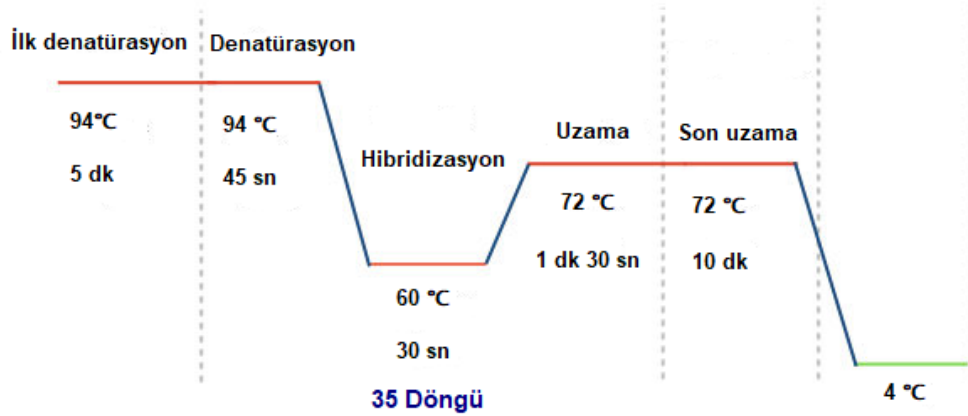
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_023046.1?from=4976&to=15833&report=genbank)

PHB geni 3'UTR C>T polimorfizmi PZR bileşenleri Tablo 3.6. da verilmiştir.

Tablo 3.6. *PHB* 3'UTR C>T polimorfizmi PZR'ı için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı

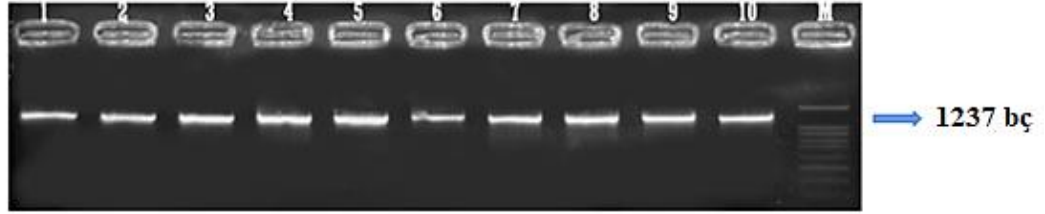
PZR Bileşeni (Stok)	25 µl	Final Konsantrasyon
10X PCR Buffer (MgCl ₂ içerir)	2.5 µl	1X
dNTP mix (2.5mM)	2 µl	0.2 mM
Forward primer (20pmol)	0.5 µl	10pmol
Reverse primer (20pmol)	0.5 µl	10pmol
Taq DNA polimeraz (2.5U/ µl)	0.4 µl	1U
Genomik DNA	2 µl	
Steril distile su	17.1 µl	
Toplam	25 µl	

En uygun PZR amplifikasyon koşulları, optimizasyon çalışmaları sonucu ile belirlendi (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. *PHB* 3'UTR C>T polimorfizmi için kullanılan PZR programı

PHB 3'UTR C>T polimorfizmine ait PZR ürünleri etidyum bromür ile boyanmış %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek 1237 bp büyüklüğündeki ürün bandı gözlemlendi (Şekil 3.9.).



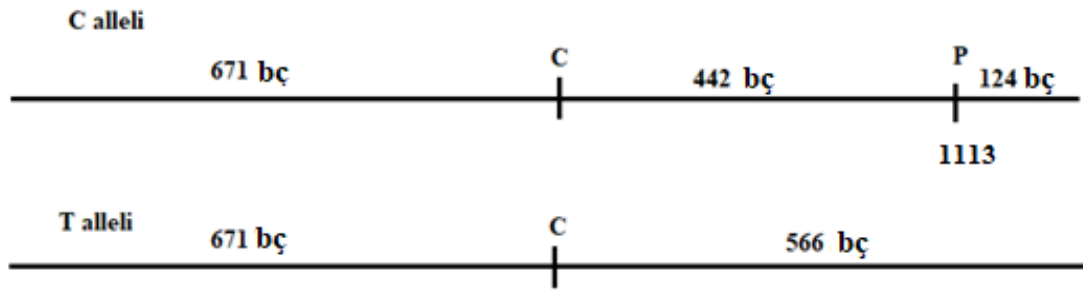
Şekil 3.9. *PHB* genine ait bazı PZR ürünlerini gösteren jel fotoğrafı (M:50bp DNA Marker Gene DireX)

Amplifikasyondan sonra PZR ürünlerinin her biri Tablo 3.7. de belirtilen reaksiyon karışımı hacminde, tanıma bölgesi 5'... A↓CRYGT... 3' ve 3'... TGYRC↑A... 5' şeklinde olan *Afl III* kesim enzimi ile 37.5°C' de 16 saat kesime bırakıldı.

Tablo 3.7. *PHB* 3'UTR C>T polimorfizmi RFLP analizi için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı

RFLP bileşeni (stok)	15 µl	Final Konsantrasyon
10X NE Buffer3	1.5 µl	1X
BSA (10 mg/ml)	0.15 µl	100 µg/ml
Afl III (5U/ µl)	0.4 µl	2U
Steril distile su	12.95 µl	
Toplam	15 µl	

RFLP ürünleri, etidyum bromür ile boyanmış %2'lik jelde 35 dk yürütülerek görüntülendi. Kesim sonucunda oluşan bantlar Şekil 3.10. daki gibi yorumlandı.



Şekil 3.10. 1237 bç PZR ürününün kesim sonucu gözlenen fragment boyları (C her iki allelede sabit olan kesim bölgesidir. P ise polimorfik bölgedir)

Homozigot CC	}	671 bç, 442bç, 124bç
Heterozigot CT		671 bç, 566 bç, 442 bç, 124 bç
Homozigot TT		671 bç, 566 bç

3.4.5. Agaroz Jelin Hazırlanması

Çalışmamız için %1,5'luk, %2'lik ve %3,5'luk agaroz jeller hazırlandı. Jeller için sırasıyla 1.5 gr, 2 gr ve 3.5 gr agaroz, hassas terazi de tartıldı. Ayrı erlen mayerlere alınan agarozların üzerine 100 ml 1X TBE eklenerek mikrodalga fırına alınıp agaroz eriyinceye kadar kaynatıldı. 60°C'ye ulaşınca üzerlerine 8 µl EtBr (0.5 mg/ml'lik çalışma solüsyonundan) eklendi ve jel iyice karıştırılıp tarakları yerleştirilmiş olan jel kasetine döküldü. Jeller iyice donduktan sonra taraklar çıkarılarak kuyucuklara PZR ve RFLP ürünleri yüklendi.

3.4.6. Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

10 µl PZR ürünü 2 µl 6X DNA loading dye ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklardan birisine, HER2 bölgesi için 2 µl pUC mix marker, PHB bölgesi için 4 µl 50bp DNA Marker yüklendi. 15 µl RFLP ürünü 3 µl 6X DNA loading dye ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklardan birisine HER2 bölgesi için 2 µl pUC 19 DNA/MspI (HpaII) marker, PHB bölgesi için 2 µl pUC mix marker yüklendi. Elektroforez 125 volt'da sırasıyla PZR, HER2 geni için 15 dk, PHB geni için 20 dk, HER2 I655V polimorfizmi için 25 dk, PHB 3'UTR C>T polimorfizmi için 35 dk süreyle yapıldı.

Elektroforez sonunda, DNA'ların ve markerların fragment uzunluklarının hesaplanması için jel fotoğrafları, UV görüntü analiz sisteminde görüntülendi.

3.5. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analizleri belirlemek için IBM SPSS İstatistik Paket Programı (versiyon 20.0) ve Openepi (versiyon 3.0) (www.openepi.com) yazılım programları kullanılarak klinik bulgular ile genotipler arasında korelasyon analizi yapıldı. Kontrol ve hasta grupları arasındaki allel ve genotip frekanslarını karşılaştırmak üzere Ki kare, varyans analizleri (ANOVA testleri), Olasılık Oranları (OR), % 95 Güven Aralığı (CI) ve p değeri hesaplandı. Kompozit genotip analizi, openepi programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen sonuçlara bakılarak erkek infertilitesinin polimorfik bölgeler ile ilişkisi olup olmadığı değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, *HER2* I655V (A>G) ve *PHB* 3'UTR C>T polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ile ilişkisinin araştırılması amacıyla 133 infertil erkek hasta ile 100 sağlıklı erkek kontrol incelendi. Kontrollerin yaş ortalaması 41.52 ± 7.82 (en düşük 20, en yüksek 60), hastaların yaş ortalaması 32.35 ± 6.76 (en düşük 17, en yüksek 54) idi. Total hastaların klinik değerlerinin ortalaması FSH için 15.48 ± 17.59 IU/L, LH için 8.53 ± 7.72 IU/L, Prolaktin için 11.24 ± 6.14 ng/ml, Estradiol için 23.90 ± 13.29 ng/ml ve Total testesteron için 3.64 ± 2.26 ng/ml idi.

4.1. *HER2* Geni Polimorfizmi

HER2 I655V (A>G) polimorfizmi analizi için çalışılan 133 hastanın 102'sinin (%76.6) AA (Ile/Ile) homozigot, 31'inin (%23.3) AG (Ile/Val) heterozigot, 100 kontrolün ise 77'sinin (%77.0) AA (Ile/Ile) homozigot, 22'sinin (%22.0) AG (Ile/Val) heterozigot, 1'nin (%1.0) GG (Val/Val) homozigot genotipe sahip olduğu bulundu. Hasta grubunda ise GG (Val/Val) homozigot genotipine hiç rastlanılmadı. Kontrol ve hasta grubunun genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında, infertilite ile *HER2* I655V (A>G) polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (sırasıyla $p=0.503$ ve $p=0.909$).

Genotiplerden, AA'ya karşılık AG+GG'ye bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanılmadı ($p=0.956$). Kontrol ve hasta grubunun SNP dağılımı, Hardy-Weinberg Dengesi (HWE) ile uyumluydu (sırasıyla $p=0.128$ ve $p=0.676$) (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. *HER2* I655V (A>G) polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırılması

Polimorfizm	Hastalar (n=133) (%)	Kontroller (n=100) (%)	P	OR (%95 CI)
<i>HER2</i> (I655V) A>G	HWE p=0.128	HWE p= 0.676		
Genotip				
AA	102 (76.6)	77 (77.0)	0.503	
AG	31 (23.3)	22 (22.0)		
GG	0	1 (1.0)		
AA: AG+GG	102:31 (76.6:23.3)	77:22 (77.0:22.0)	0.956	1.02 (0.55-1.9)
Allel				
A	235 (88.3)	176 (88.0)	0.909	0.97 (0.55-1.72)
G	31 (11.6)	24 (12.0)		

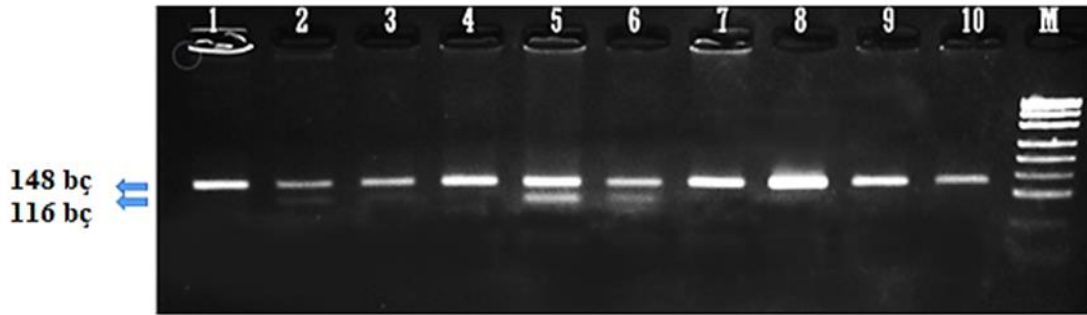
HER2 I655V (A>G) polimorfizmi ile, hastaların yaş ve klinik özellikleri (FSH, LH, Prolaktin, Estradiol, Total testesteron) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanılmadı (p>0.05) (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin *HER2* I655V (A>G) polimorfizmine göre değerlendirilmesi

<i>HER2</i> I655V (A>G)				
Klinik Özellikler	Total	AA	AG+GG	P
	n=133	n=102	n=31	Değeri
Yaş Ortalaması (Yıl)	32.35±6.76	32.27±7.06	32.58±5.76	0.826
FSH (IU/L)	15.48±17.59	16.51±19.24	12.11±10.08	0.267
LH (IU/L)	8.53±7.72	8.85±8.56	7.47±3.79	0.429
Prolaktin (ng/ml)	11.24±6.14	11.43±6.24	10.68±5.97	0.629
Estradiol (ng/ml)	23.90±13.29	23.69±14.88	24.48±7.72	0.841
Total Testesteron (ng/ml)	3.64±2.26	3.52±2.45	4.0±1.5	0.336

Veriler SPSS (ver 20.0) yazılım programı, varyans analizi ile değerlendirildi. Yaş, FSH, LH, Prolaktin, estradiol, Total testesteron için ortalama ± standart sapma değerleri verildi. FSH: Folikül uyarıcı hormon, LH: Lüteinleştirici hormon

RFLP Yöntemi ile çalışılan örneklerin bazılarının genotiplerini gösteren jel fotoğrafı Şekil 4.1. de verilmiştir.



Şekil 4.1. *HER2* I655V polimorfizminin RFLP sonuçları (1,3,4,7,8,9,10. kuyular AA homozigot genotipi, 2,5,6. kuyular ise AG heterozigot genotipini göstermektedir) (M:pUC 19 DNA/MspI (HpaII) Marker)

4.2. *PHB* Geni Polimorfizmi

PHB 3'UTR C>T polimorfizmi analizi için, çalışılan 133 hasta grubunun 90'ının (%67.6) CC homozigot, 36'sının (%27.1) CT heterozigot, 7'sinin (%5.3) TT homozigot; 100 kontrol grubun ise 65'inin (%65.0) CC homozigot, 32'sinin (%32.0) CT heterozigot, 3'ünün (%3.0) ise TT homozigot genotipe sahip olduğu bulundu. Kontrol ve hasta grubunun genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında, infertilite ile *PHB* 3'UTR C>T polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanılmadı (sırasıyla $p=0.544$ ve $p=0.956$).

Genotiplerden, CC'ye karşılık CT+TT'ye bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.669$). Kontrol ve hasta grubunun SNP dağılımı, HWE ile uyumluydu (sırasıyla $p=0.191$ ve $p=0.691$) (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. *PHB* 3'UTR C>T polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırılması

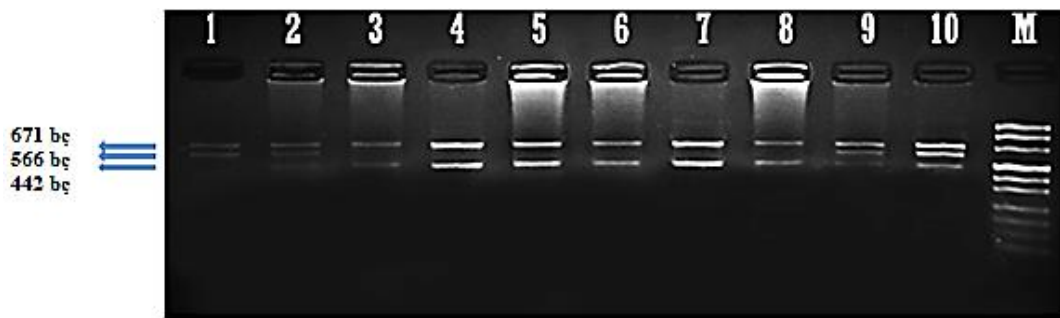
Polimorfizm	Hastalar (n=133) (%)	Kontroller (n=100) (%)	P	OR (%95 CI)
<i>PHB</i> 3'UTR C>T	HWE $p=0.191$	HWE $p=0.691$		
Genotip				
CC	90 (67.6)	65 (65.0)	0.544	
CT	36 (27.1)	32 (32.0)		
TT	7 (5.3)	3 (3.0)		
CC: CT+TT	90:43 (67.6:32.4)	65:35 (65.0:35.0)	0.669	0.89 (0.51-1.54)
Allel				
C	216 (81.2)	162 (81.0)	0.956	0.99 (0.62-1.58)
T	50 (18.7)	38 (19.0)		

PHB 3'UTR C>T polimorfizmi ile, hastaların yaş ve klinik özellikleri (FSH, LH, Prolaktin, Estradiol, Total testesteron) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin *PHB* 3'UTR C>T polimorfizmine göre değerlendirilmesi

<i>PHB</i> 3'UTR C>T				
Klinik Özellikler	Total n=133	CC n=90	CT+TT n=43	P Değeri
Yaş Ortalaması (Yıl)	32.35±6.76	32.64±6.84	31.72±6.62	0.463
FSH (IU/L)	15.48±17.59	16.18±18.66	14.02±15.25	0.547
LH (IU/L)	8.53±7.72	8.34±8.21	8.91±6.66	0.720
Prolaktin (ng/ml)	11.24±6.14	11.45±6.22	10.86±6.09	0.679
Estradiol (ng/ml)	23.90±13.29	23.54±13.66	24.88±12.57	0.732
Total Testesteron (ng/ml)	3.64±2.26	3.68±2.47	3.56±1.80	0.803

RFLP Yöntemleri ile çalışılan örneklerin bazılarının genotiplerini gösteren jel fotoğrafı Şekil 4.2. de verilmiştir.



Şekil 4.2. *PHB* 3'UTR polimorfizminin RFLP sonuçları (1. kuyu TT homozigot, 3,4,5,6,7,8. kuyular CC homozigot, 2,9,10. kuyular CT heterozigot genotipini göstermektedir) (M: pUC Mix Marker)

4.3. *HER2* ve *PHB* Gen Polimorfizmlerinin Kompozit Genotip Analizleri

Kompozit genotip analizinde, ikili genotiplerden *HER2* I655V (A>G) / *PHB* 3'UTR C>T gen polimorfizmleri kompozit genotip sıklıkları hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldı. Analiz sonucunda, ikili genotiplerden *HER2* I655V (A>G) / *PHB* 3'UTR C>T gen polimorfizmleri kompozit genotip sıklıkları açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanılmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. *HER2* I655V (A>G) / *PHB* 3'UTR C>T gen polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarının iki yönlü SNP-SNP etkileşimlerinin kompozit genotip analizi

		Hasta (n=133)		Kontrol (n=100)		P
Genotip		n	%	n	%	
I655V (A>G) / 3'UTR C>T						
CC/AA		67	50.3	52	52	0.806
CT/AA		30	22.5	21	21	0.776
CC/AG		23	17.2	14	14	0.496
TT/AA		5	3.7	2	2	0.711
CT/AG		6	4.5	9	9	0.167
TT/AG		2	1.5	1	1	0.790

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma *HER2* I655V ve *PHB* 3'UTR C>T gen polimorfizmleri ile erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapıldı.

HER2, EGFR ailesine aittir ve intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Bu ailenin üyeleri, sinyal iletim yolunda önemli işlevlerde rol oynadıkları için farklılaşma ve proliferasyon gibi çeşitli hücrel fonksiyonları düzenlemektedir. *HER2*, MAPK ve PI3K kaskadlarını içeren çeşitli hücrel sinyal yollarını tetikler. *HER2* geninde kodon 655'indeki SNP, transmembran alanı kodlama bölgesinde izolösin ile valin yer değiştirmesini (I655V) gösterir ve bu polimorfik bölgenin genellikle meme kanseri riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Bhatt ve ark., 2021).

HER2 I655V (rs1136201) genetik polimorfizminin, sinyal iletimini ve dolayısıyla hücre döngüsü düzenlemesini değiştirebilen reseptör yapısını ve aktivasyonunu değiştirebileceği bildirilmiştir (de Almeida ve ark., 2018).

EGF, Sertoli hücrelerinde eksprese edilen ErbB1, ErbB2 ve ErbB4 gibi reseptörler aracılığıyla spermatogonyal proliferasyonda anahtar rol oynamaktadır. EGF, hem epidermal hem de mezotelyal hücrelerin çoğalmasını teşvik eder. Apoptoz ve farklılaşma gibi diğer biyolojik süreçlere aracılık ederek, insan sperm kapasitesi üzerinde uyarıcı etkiye sahiptir. Yapılan bir çalışmada; serum EGF'nin elimine edilmesiyle, spermatogenezi baskıladığı ve yetişkin farelerde sperm motilitesini azalttığı görülmüştür. Azalmış EGFR ekspresyonu, erkek infertilitesi ile bağlantılı olmakla birlikte ve EGF, hücreler arası iletişim için gerekli olan spermatojenik hücrelerde gap junction oluşumunu düzenlemektedir (Aminmalek ve ark., 2021).

Shin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan ve sıçan testislerinde dört erb tip-1 tirozin kinaz reseptöründe (*HER1*, *HER2*, *HER3* ve *HER4*) ekspresyon seviyelerinde değişiklikler gözlenmiştir. *HER2* ekspresyonu insan testislerinde bol miktarda bulunmuştur ve *HER2*'nin insan testisinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. İnsan testisinin peritübüler hücrelerinde *HER2* bulunmaktadır, bu da *HER2*'nin, EGF reseptörleri ile etkileşiminin yetişkin seminifer tübüllerin kasılmasında olası bir rolünü

göstermektedir. Plazma membranında lokalize olduğundan ve kanser hücrelerinde transkripsiyon için bir transaktivatör görevi görebildiğinden, erkek germ hücrelerinin gelişiminde de transkripsiyonel bir transaktivatör olarak olası bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Shin ve ark., 2011).

Aynı zamanda, bu proteinin ekspresyonu, primer spermatosit aşamasına kadar hızlı proliferasyonları sırasında spermatojenik hücrelerde tespit edilmiştir (Syvyk ve Syvyk, 2019).

Çalışmamızın *HER2* I655V (A>G) polimorfizmine ait verileri incelendiğinde, genotip dağılımında hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.503$). 100 kontrol grubunda 77 AA, 22 AG ve 1 GG genotipine rastlandı. 133 hasta grubunda ise 102 AA, 31 AG genotipine rastlandı. Fakat hasta ve kontrol gruplarına bakıldığında GG genotipine hasta grubunda hiç rastlanmazken kontrol grubunda az da olsa rastlanmıştır. Ayrıca allel sıklıkları bakımından incelendiğinde de hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.909$).

Yapılan çalışmalara baktığımızda, Kara ve arkadaşları Türk popülasyonunda meme kanseri ve *HER2* I655V (A>G) polimorfizmi üzerine yaptıkları çalışmada 192 kontrol grubunda 141 AA, 48 AG ve 3 GG genotipine rastlamışlardır (Kara ve ark., 2010). de almeida ve arkadaşları, Brezilya popülasyonunda meme kanseri ve *HER2* I655V (A>G) polimorfizmi üzerine yaptıkları çalışma ile 150 kontrol grubunun 107 AA, 39 AG ve 4 GG genotipine sahip olduklarını bulmuşlardır (de Almeida ve ark., 2018). Watrowski ve arkadaşları, Kafkasya popülasyonunda yumurtalık kanseri ve *HER2* I655V (A>G) polimorfizmi üzerine yaptıkları çalışma ile 100 kontrol grubunda 63 AA, 34 AG ve 3 GG genotipine rastlamışlardır (Watrowski ve ark., 2016). Mojtehadı ve arkadaşları, İran popülasyonunda yumurtalık kanseri ve *HER2* I655V (A>G) polimorfizmi üzerine yaptıkları çalışma ile 130 kontrol grubunda 97 AA, 30 AG ve 3 GG genotipine rastlamışlardır (Mojtehadı ve ark., 2013). Kruszyna ve arkadaşları, Polonya popülasyonunda servikal kanser ve *HER2* I655V (A>G) polimorfizmi üzerine yaptıkları bir çalışmada 220 kontrol grubunda 138 AA, 78 AG ve 4 GG genotipi tespit etmişlerdir (Kruszyna ve ark., 2010). Bhatt ve arkadaşları ise, Hint popülasyonunda meme kanseri

ve *HER2* I655V (A>G) polimorfizmi üzerine yaptıkları bir çalışmada 104 kontrol grubunda 79 AA, 22 AG ve 3 GG genotipi saptamışlardır (Bhatt ve ark., 2021). Bu çalışmalarda saptanan genotip sıklıklarının bizim kontrol grubumuzdaki genotip sıklıkları ile benzerlik taşıdığı görülmektedir.

Çalışmamıza ait diğer bir gen ve polimorfik bölge *PHB* 3'UTR C>T dir.

PHB, hem E2F transkripsiyon faktörlerini hem de p53 proteinini düzenleyen ve proliferatif ve apoptotik yolları birbirine bağlayan 30 kDa'luk bir proteini kodlamaktadır. Rb tümör baskılayıcı proteinin ve E2F aracılı transkripsiyonun baskılanmasına yol açan aile üyelerine bağlanır ve ayrıca p53 proteini ile etkileşime girerek p53 aracılı transkripsiyonel aktiviteyi arttırmaktadır. Ek olarak, *PHB* geninin 3'UTR'si, bir trans- etkili düzenleyici RNA molekülünü kodlamaktadır (Jakubowska ve ark., 2007).

3'UTR'ler mRNA lokalizasyonu, mRNA stabilitesi ve transkripsiyon gibi mRNA tabanlı süreçleri düzenlemektedir. Ayrıca, 3'UTR'ler, 3'UTR aracılı protein-protein etkileşimleri (PPI'ler) oluşturabilir ve böylece 3'UTR'ler de kodlanan genetik bilgiyi proteinlere iletebilir. 3'UTR'lerin bu özelliği, protein kompleksi oluşumu veya translasyon sonrası modifikasyonlar dahil olmak üzere çeşitli protein özelliklerini düzenlemektedir ve aynı zamanda protein konformasyonlarını değiştirmektedir. Bu nedenle, 3'UTR aracılı bilgi aktarımı, amino asit dizisinde kodlanmayan protein özelliklerini düzenleyebilmektedir (Mayr, 2019).

İnsan spermatozoaları, orta parça aksonem etrafında sarmal olarak düzenlenmiş 22-28 tane mitokondri içermektedir. Mitokondriler, optimal ROS ve ATP seviyeleri üreterek sperm hareketliliğinin korunmasını sağlamaktadırlar. *PHB*, yüksek oranda korunmuş bir majör mitokondriyal iç zar proteinidir ve mitokondriyal membran proteinlerini ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemini (OXPHOS) stabilize etmek için şaperon benzeri bir işlev uygulayarak mitokondriyal işlevin sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Germ hücrelerindeki eksikliği, mitokondriyal membran depolarizasyonu ve artan ROS üretimi ile ilişkilidir. Sperm kalitesi düşük olan infertil

erkeklerde, MMP deki bir değişiklik ve buna bağlı olarak PHB ekspresyonundaki azalmanın eşlik edebileceği öne sürölmektedir (Chai ve ark., 2017).

Thompson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, PHB proteini ile ubiquitinasyon modifikasyonu arasında bir bağlantı olabileceği bildirilmiştir. PHB, memeli spermatozoasında, yüksek moleküler kütleli bir izoform olarak ifade edilir ve ökaryotik hücrelerin bölünmesinde antiproliferatif aktiviteye sahiptir. Ubikitinasyon, yanlış katlanmış veya uzun ömürlü proteinlerin bir veya daha fazla ubiquitin molekülünün kovalent bağlanmasıyla parçalanmak üzere etiketlendiği, protein geri dönüşümü için çok yönlü ve evrensel bir mekanizmadır. Spermatogenez sırasında ubiquitinasyon, hücre sinyalizasyonu ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Ubikuitin, insan seminal plazmasında ve kusurlu spermatozoasının yüzeyinde bulunmaktadır. Ubikuitin-prohibitin komplekslerinin, oositin proteolitik bozunma sisteminin, maternal mitokondriyi etkilemeden spesifik olarak sperm mitokondrisini hedeflediği sinyali sağlayabileceği gösterilmiştir. Sertoli ve Leydig hücrelerinde PHB proteinin eksprese edildiği, ayrıca PHB transkriptlerinin ve proteininin germ hücresi gelişimi sırasında farklı şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, sperm mitokondriyal proteini olarak PHB'nin tanımlanması, infertilitenin anlaşılması için önemli etkilere sahip olabileceği tartışılmıştır (Thompson ve ark., 2003).

Çalışmamıza ait *PHB* 3'UTR C>T verileri incelendiğinde, genotip dağılımında hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.544$). Ayrıca allel sıklıkları bakımından incelendiğinde de hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.956$). 100 kontrol grubunda 65 CC, 32 CT ve 3 TT genotipine rastlandı. 133 hasta grubunda ise, 90 CC, 36 CT ve 7 TT genotipine rastlandı. Her ne kadar genotip dağılımlarında anlamlı bir ilişki saptanmamış olsa da TT genotipi ve T alleli hasta grubunda, kontrol grubuna kıyasla yüksek oranda bulundu.

Yapılan çalışmalara baktığımızda ise, Karakuş ve arkadaşları, Türk popölasyonunda meme kanseri ve *PHB* 3'UTR C>T polimorfizmi üzerine yaptıkları bir çalışmada, 154 kontrol grubunda 101 CC, 47 CT ve 6 TT genotipine rastlamışlardır (Karakuş ve ark., 2008). Grimm ve arkadaşları, Kafkas popölasyonunda yumurtalık

kanseri ve *PHB* 3'UTR C>T polimorfizmi üzerine yaptıkları bir çalışmada 129 kontrol grubunda 84 CC, 39 CT ve 6 TT genotipine rastlamışlardır (Grimm ve ark., 2008). Spurdle ve arkadaşları ise, Avusturya popülasyonunda yumurtalık kanseri ve *PHB* 3'UTR C>T polimorfizmi üzerine yaptıkları bir çalışmada 291 kontrol grubunda 196 CC, 87 CT ve 8 TT genotipine sahip olduklarını bulmuşlardır (Spurdle ve ark., 2003). Bu çalışmalarda saptanan genotip sıklıklarının bizim kontrol grubumuzdaki genotip sıklıkları ile benzerlik taşıdığı görülmektedir.

HER2 I655V / *PHB* 3'UTR C>T kompozit genotip analizine baktığımızda da bütün olasılıklar için $p>0.05$ olduğundan bu kompozit genotiplerin de infertilite için bir risk oluşturmayaacağı saptandı.

Literatür tarandığı kadarıyla *HER2* I655V (rs1136201) ve *PHB* 3'UTR C>T (rs6917) genetik polimorfizmleri ile erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu yönüyle hem Türkiye'de hem de dünyada ilk olma özelliği taşımaktadır. Her ne kadar tek tek polimorfizmler ve erkek infertilitesi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemese de, polimorfizmlerin toplumlar arasında farklılık gösterebildiği ve bu farklılıkların da hastalığa yatkınlık gösterdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Dolayısıyla hem polimorfizm çalışmalarının farklı ırk ve etnik kökenlerde değişmesi, hem de çalıştığımız hastalık ve polimorfik bölgelere ait çalışmalar olmaması sebebiyle bu çalışmanın daha fazla sayıda örnek grupları ve farklı etnik kökenlerde tekrarlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- AGARWAL, A., MULGUND, A., HAMADA, A., & CHYATTE, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology*. 13(1): 1-9.
- AGARWAL, A., BASKARAN, S., PAREKH, R., CHO, C. L., HENKEL, R., VIJ, S., et al. (2021). Male infertility. *The Lancet*. 397(10271): 319-333
- AHMAD, A., AHMED, A., & PATRIZIO, P. (2013). Cystic fibrosis and fertility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 25(3): 167-172.
- AİTKEN, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7(4): 659-668.
- AJAYİ, A. F., & AKHİGBE, R. E. (2020). In vivo exposure to codeine induces reproductive toxicity: role of HER2 and p53/Bcl-2 signaling pathway. *Heliyon*. 6(11): e05589.
- AKSGLÆDE, L., WİKSTRÖM, A. M., MEYTS, E. R. D., DUNKEL, L., SKAKKEBÆK, N. E., & JUUL, A. (2006). Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Human reproduction update*. 12(1): 39-48.
- ALLAİS-BONNET, A., & PAİLHOUX, E. (2014). Role of the prion protein family in the gonads. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2: 56.
- AL-MATOUQ, J., AL-HAJ, L., AL-SAİF, M., & KHABAR, K. S. (2021). Post-transcriptional screen of cancer amplified genes identifies ERBB2/Her2 signaling as AU-rich mRNA stability-promoting pathway. *Oncogenesis*. 10(9): 1-11.
- ALSAİKHAN, B., ALRABEEAH, K., DELOUYA, G., & ZİNİ, A. (2016). Epidemiology of varicocele. *Asian journal of andrology*, 18(2), 179-181.
- ALTİERİ, F., ARCARI, P., & RİPPA, E. (2012). Gastric cancer: Molecular pathology state. *Current topics in Gastritis*. 242.
- ALVAREZ, S. (2015). Do some addictions interfere with fertility?. *Fertility and sterility*. 103(1): 22-26.
- AMİNMALEK, M., MASHAYEKHİ, F., & SALEHİ, Z. (2021). Epidermal growth factor +61A/G (rs4444903) promoter polymorphism and serum levels are linked to idiopathic male infertility. *British Journal of Biomedical Science*. 78(2): 92-94.
- ASADİ, F., GİLANİ, M. A. S., GHAHERİ, A., SAFFARİ, J. R., & ZAMANİAN, M. (2017). The prevalence of Y chromosome microdeletions in Iranian infertile men with azoospermia and severe oligospermia. *Cell Journal (Yakhteh)*. 19(1): 27-33.

- BAO, R., NG, A., SASAKI, M., SELVAN, M. E., KATTI, A., LEE, H., et al. (2021). Functional Common and Rare ERBB2 Germline Variants Cooperate in Familial and Sporadic Cancer Susceptibility. *Cancer Prevention Research*. 14(4): 441-454.
- BAYER, S. R., ALPER, M. M., & PENZIAS, A. S. (2008). Boston IVF İnfertilite El Kitabı. (2. Baskı) (Çev. Işık Ahmet Zeki, Vicdan Kubilay) İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
- BENKSİM, A., ELKHOUDRİ, N., ADDİ, R. A., BAALİ, A., & CHERKAOUİ, M. (2018). Difference between primary and secondary infertility in Morocco: frequencies and associated factors. *International journal of fertility & sterility*. 12(2): 142-146.
- BHATT, D., VERMA, A. K., BHARTI, P. S., GOYAL, Y., ALSAHLİ, M. A., ALMATROUDİ, A., et al. (2021). BCL-2 (-938C> A), BAX (-248 G>A), and HER2 Ile655Val Polymorphisms and Breast Cancer Risk in Indian Population. *Journal of Oncology*. 2021: 1-8.
- BOJESEN, A., JUUL, S., & GRAVHOLT, C. H. (2003). Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 88(2): 622-626.
- BOURGES, I., RAMUS, C., MOUSSON DE CAMARET, B., BEUGNOT, R., REMACLE, C., CARDOL, P., et al. (2004). Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. *Biochemical Journal*. 383(3): 491-499.
- BUDİARTO, B. R. (2016). Detection of HER2 Gene Polymorphism in Breast Cancer: PCR Optimization Study. *Scientia pharmaceutica*. 84(1): 103-111.
- CAMPBELL, I. G., ALLEN, J., & ECCLES, D. M. (2003). Prohibitin 3' untranslated region polymorphism and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 12(11): 1273-1274.
- CARGNELLO, M., & ROUX, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews*. 75(1): 50-83.
- CARP, H. J., SELMİ, C., & SHOENFELD, Y. (2012). The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *Journal of autoimmunity*. 38(2-3): J266-J274.
- CHAI, R. R., CHEN, G. W., SHİ, H. J., O, W. S., MARTİN-DELEON, P. A., & CHEN, H. (2017). Prohibitin involvement in the generation of mitochondrial superoxide at complex I in human sperm. *Journal of cellular and molecular medicine*. 21(1): 121-129.

- CHEN, H., ZHAO, H. X., HUANG, X. F., CHEN, G. W., YANG, Z. X., SUN, W. J., et al. (2012). Does high load of oxidants in human semen contribute to male factor infertility?. *Antioxid. Redox Signal.* 16: 754-759.
- CHEN, Y., LIU, L., NI, R., & ZHOU, W. (2019). Advances in HER2 testing. *Advances in clinical chemistry.* 91: 123-162.
- COCUZZA, M., ALVARENGA, C., & PAGANI, R. (2013). The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics.* 68: 15-26.
- COLLODEL, G., MORETTI, E., FONTANI, V., RINALDI, S., ARAVAGLI, L., SARAGO, G., et al. (2008). Effect of emotional stress on sperm quality. *Indian Journal of Medical Research.* 128(3): 254-261.
- DAKS, A. A., FEDOROVA, O. A., SHUVALOV, O. Y., PARFENEV, S. E., & BARLEV, N. A. (2020). The Role of ERBB2/HER2 Tyrosine Kinase Receptor in the Regulation of Cell Death. *Biochemistry (Moscow).* 85(10): 1277-1287.
- DAMSEH, N., QUERCIA, N., RUMMAN, N., DELL, S. D., & KIM, R. H. (2017). Primary ciliary dyskinesia: mechanisms and management. *The application of clinical genetics.* 10: 67-74.
- DART, D. A., SPENCER-DENE, B., GAMBLE, S. C., WAXMAN, J., & BEVAN, C. L. (2009). Manipulating prohibitin levels provides evidence for an in vivo role in androgen regulation of prostate tumours. *Endocrine-related cancer.* 16(4): 1157-1169.
- DE ALMEIDA, F. C., BANIN HIRATA, B. K., ARIZA, C. B., LOSI GUEMBAROVSKI, R., DE OLIVEIRA, K. B., SUZUKI, K. M., et al. (2018). HER2 Ile655Val polymorphism is negatively associated with breast cancer susceptibility. *Journal of clinical laboratory analysis.* 32(6): 1-6.
- DE ROSA, M., ZARRILLI, S., DI SARNO, A., MILANO, N., GACCIONE, M., BOGGIA, B., et al. (2003). Hyperprolactinemia in men. *Endocrine.* 20(1): 75-82.
- DEVESA-PEIRÓ, A., SÁNCHEZ-REYES, J. M., & DÍAZ-GIMENO, P. (2020). Molecular biology approaches utilized in preimplantation genetics: real-time PCR, microarrays, next-generation sequencing, karyomapping, and others. In *Human Reproductive Genetics* (pp. 49-67). Academic Press.
- DURAIRAJANAYAGAM, D., SINGH, D., AGARWAL, A., & HENKEL, R. (2021). Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia.* 53: 1-15
- ELEY, A., PACEY, A. A., GALDIERO, M., GALDIERO, M., & GALDIERO, F. (2005). Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm?. *The Lancet infectious diseases.* 5(1): 53-57.

- FERNANDEZ, A., KARAVİTAKİ, N., & WASS, J. A. (2010). Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clinical endocrinology*. 72(3): 377-382.
- FLETCHER, C. E., DART, D. A., SİTA-LUMSDEN, A., CHENG, H., RENNİE, P. S., & BEVAN, C. L. (2012). Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer. *Human molecular genetics*. 21(14): 3112-3127.
- FURRER, D., LEMİEUX, J., CÔTÉ, M. A., PROVENCHER, L., LAFLAMME, C., BARABÉ, F., et al. (2016). Evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in normal and breast tumor tissues and their link with breast cancer prognostic factors. *The Breast*. 30: 191-196.
- GAO, Y., TANG, X., CAO, J., RONG, R., YU, Z., LİU, Y., et al. (2019). The effect of *HER2* single nucleotide polymorphisms on cervical cancer susceptibility and survival in a Chinese population. *Journal of Cancer*. 10(2): 378-387.
- GARİBYAN, L., & AVASHİA, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 133: 1-4.
- GEİSSLER, R., & GRİMSON, A. (2016). A position-specific 3' UTR sequence that accelerates mRNA decay. *RNA biology*. 13(11): 1075-1077.
- GORE, A. C., CHAPPELL, V. A., FENTON, S. E., FLAWS, J. A., NADAL, A., PRİNS, G. S., et al. (2015). EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine reviews*. 36(6): E1-E150.
- GÖK, Ö., ASLAN, A., & ERMAN, O., (2017). İnsan ENCODE, HapMap ve 1000 Genom Projeler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*. 33(2): 35-42.
- GRİMM, C., POLTERAUER, S., ZEİLLİNGER, R., TEMPFER, C., SLİUTZ, G., REİNTHALLER, A., & HEFLER, L. A. (2008). The prohibitin 3' untranslated region polymorphism in patients with ovarian cancer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 137(2): 236-239.
- GUO, H., GERMAN, P., BAİ, S., BARNES, S., GUO, W., Qİ, X., et al. (2015). The PI3K/AKT pathway and renal cell carcinoma. *Journal of genetics and genomics*. 42(7): 343-353.
- HART, R. J. (2016). Physiological aspects of female fertility: role of the environment, modern lifestyle, and genetics. *Physiological reviews*. 96(3): 873-909.
- HİNDS, D. A., STUVE, L. L., NİLSEN, G. B., HALPERİN, E., ESKİN, E., BALLİNGER, D. G., et al. (2005). Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*. 307(5712): 1072-1079.

- HOU, C. C., WEI, C. G., LU, C. P., GAO, X. M., YANG, W. X., & ZHU, J. Q. (2017). Prohibitin-mediated mitochondrial ubiquitination during spermiogenesis in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Oncotarget*. 8(58): 98782-98797.
- IGLESIAS, P., CARRERO, J. J., & DÍEZ, J. J. (2012). Gonadal dysfunction in men with chronic kidney disease: clinical features, prognostic implications and therapeutic options. *Journal of nephrology*. 25(1): 31-42.
- INHORN, M. C., & PATRIZIO, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update*. 21(4): 411-426.
- ISMAIL, S., & ESSAWI, M. (2012). Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*. 1(2): 57-63.
- JAKUBOWSKA, A., GRONWALD, J., GÓRSKI, B., HUZARSKI, T., BYRSKI, T., BENNER, A., et al. (2007). The 3' untranslated region C> T polymorphism of prohibitin is a breast cancer risk modifier in Polish women carrying a BRCA1 mutation. *Breast cancer research and treatment*. 104(1): 67-74.
- JAKUBOWSKA, A., GRONWALD, J., MENKISZAK, J., GÓRSKI, B., HUZARSKI, T., BYRSKI, T., et al. (2008). Ovarian cancer risk in Polish BRCA1 mutation carriers is not associated with the prohibitin 3'untranslated region polymorphism. *BMC cancer*. 8(1): 1-5.
- JENSEN, C. F. S., ØSTERGREN, P., DUPREE, J. M., OHL, D. A., SØNKSEN, J., & FODE, M. (2017). Varicocele and male infertility. *Nature Reviews Urology*. 14(9): 523-533.
- JONGMANS, M. C. J., VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M. A., PITTELOUD, N., OGATA, T., SATO, N., CLAAHSEN-VAN DER GRINTEN, H. L., et al. (2009). CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome—the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clinical genetics*. 75(1): 65-71.
- JÓŹKÓW, P., & ROSSATO, M. (2017). The impact of intense exercise on semen quality. *American journal of men's health*. 11(3): 654-662.
- JUNGWIRTH, A., GIWERCMAN, A., TOURNAYE, H., DIEMER, T., KOPA, Z., DOHLE, G., et al. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*. 62(2): 324-332.
- JUPE, E. R., LIU, X. T., KIEHLBAUCH, J. L., MCCLUNG, J. K., & DELL'ORCO, R. T. (1996). Prohibitin in Breast Cancer Cell Lines: Loss of Antiproliferative Activity Is Linked to 3'Untranslated Region Mutations. *Cell Growth & Differentiation*. 7: 871-878.

- KARA, N., KARAKUŞ, N., ULUSOY, A. N., OZASLAN, C., GUNGOR, B., & BAGCI, H. (2010). P53 codon 72 and HER2 codon 655 polymorphisms in Turkish breast cancer patients. *DNA and cell biology*. 29(7): 387-392.
- KARAKUŞ, N., KARA, N., & ULUSOY, A. N. (2008). Lack of Association between Prohibitin 3' Untranslated Region C→ T Polymorphism and Breast Cancer in a Turkish Population. *DNA and cell biology*. 27(8): 449-452.
- KARINEN, L., POUTA, A., HARTIKAINEN, A. L., BLOIGU, A., PALDANIUS, M., LEINONEN, M., et al. (2004). Association between Chlamydia trachomatis antibodies and subfertility in the Northern Finland Birth Cohort 1966 (NFBC 1966), at the age of 31 years. *Epidemiology & Infection*. 132(5): 977-984.
- KARS, M., SOUVEREIN, P. C., HERINGS, R. M. C., ROMIJN, J. A., VANDENBROUCKE, J. P., DE BOER, A., & DEKKERS, O. M. (2009). Estimated age-and sex-specific incidence and prevalence of dopamine agonist-treated hyperprolactinemia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 94(8): 2729-2734.
- KASASHIMA, K., SUMITANI, M., SATOH, M., & ENDO, H. (2008). Human prohibitin maintains the organization and stability of the mitochondrial nucleoids. *Experimental cell research*. 314(5): 988-996.
- KATHIRIA, A. S., BUTCHER, L. D., FEAGINS, L. A., SOUZA, R. F., BOLAND, C. R., & THEISS, A. L. (2012). Prohibitin 1 modulates mitochondrial stress-related autophagy in human colonic epithelial cells. *PloS one*. 7(2): 1-49.
- KIZILAY, F., & ALTAY, B. (2019). Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları. *Androl Bul*. 21: 177-184
- KİM, S. Y., KİM, Y., HWANG, H. Y., & KİM, T. Y. (2007). Altered expression of prohibitin in psoriatic lesions and its cellular implication. *Biochemical and biophysical research communications*. 360(3): 653-658.
- KOLÖREN, Z., ELİF, Ç. İ. L., EMİNE, A. Y. A. Z., & KARAMAN, Ü. (2017). RFLP Yönteminin Parazitolojide Uygulama Alanları. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 7(2): 215-225.
- KRAUSZ, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 25(2): 271-285.
- KRAUSZ, C., & RIERA-ESCAMILLA, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*. 15(6): 369-384.
- KRISHNAMURTI, U., & SILVERMAN, J. F. (2014). HER2 in breast cancer: a review and update. *Advances in anatomic pathology*. 21(2): 100-107.

- KRUSZYNA, Ł., LIANERÍ, M., ROSZAK, A., & JAGODZIŃSKI, P. P. (2010). HER2 codon 655 polymorphism is associated with advanced uterine cervical carcinoma. *Clinical biochemistry*. 43(6): 545-548.
- KURODA, S., USUI, K., SANJO, H., TAKESHIMA, T., KAWAHARA, T., UEMURA, H., & YUMURA, Y. (2020). Genetic disorders and male infertility. *Reproductive Medicine and Biology*. 19(4): 314-322.
- KÜNZLE, R., MUELLER, M. D., HÄNGGI, W., BIRKHÄUSER, M. H., DRESCHER, H., & BERSINGER, N. A. (2003). Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertility and sterility*. 79(2): 287-291.
- LEE, H. S., & SEO, J. T. (2012). Advances in surgical treatment of male infertility. *The world journal of men's health*. 30(2): 108-113.
- LEVINE, B., & KROEMER, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 132(1): 27-42.
- LI, X. H., CHAI, R. R., CHEN, G. W., ZHANG, L. F., TAN-TAI, W. J., SHI, H. J., et al. (2020). Prohibitin (PHB) interacts with AKT in mitochondria to coordinately modulate sperm motility. *Asian Journal of Andrology*. 22(6): 583-589.
- LIU, D., LIN, Y., KANG, T., HUANG, B., XU, W., GARCÍA-BARRIO, M., et al. (2012). Mitochondrial dysfunction and adipogenic reduction by prohibitin silencing in 3T3-L1 cells. *PloS one*. 7(3): e34315.
- MA, W., & MAYR, C. (2018). A membraneless organelle associated with the endoplasmic reticulum enables 3' UTR-mediated protein-protein interactions. *Cell*. 175(6): 1492-1506.
- MAHAT, R. K., ARORA, M., BHALE, D. V., HOLKAR, S., KUMAR, S., & YADAV, T. (2016). Risk factors and causes of male infertility-a review. *Biochem Anal Biochem*. 5(2): 1-5.
- MANJESHWAR, S., BRANAM, D. E., LERNER, M. R., BRACKETT, D. J., & JUPE, E. R. (2003). Tumor suppression by the prohibitin gene 3' untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer research*. 63(17): 5251-5256.
- MANJESHWAR, S., LERNER, M. R., ZANG, X. P., BRANAM, D. E., PENTO, J. T., LANE, M. M., ... & JUPE, E. R. (2004). Expression of prohibitin 3' untranslated region suppressor RNA alters morphology and inhibits motility of breast cancer cells. *Journal of Molecular histology*. 35(6): 639-646.
- MASCARENHAS, M. N., FLAXMAN, S. R., BOERMA, T., VANDERPOEL, S., & STEVENS, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*. 9(12): e1001356.

- MAYR, C. (2019). What are 3' UTRs doing?. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 11(10): a034728.
- MCGLYNN, K. A., GRAUBARD, B. I., KLEBANOFF, M. A., & LONGNECKER, M. P. (2006). Risk factors for cryptorchism among populations at differing risks of testicular cancer. *International journal of epidemiology*. 35(3): 787-795.
- MCPHERSON, N. O., & LANE, M. (2015). Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity?. *Asian journal of andrology*. 17(3): 450-458.
- MILLER, A. C., COMELLAS, A. P., HORNICK, D. B., STOLTZ, D. A., CAVANAUGH, J. E., GERKE, A. K., et al. (2020). Cystic fibrosis carriers are at increased risk for a wide range of cystic fibrosis-related conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117(3): 1621-1627.
- MISHRA, R. K., VERMA, H. P., SINGH, N., & SINGH, S. K. (2012). Male infertility: lifestyle and oriental remedies. *Journal of Scientific Research*. 56: 93-101.
- MISHRA, S., MURPHY, L. C., NYOMBA, B. G., & MURPHY, L. J. (2005). Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends in molecular medicine*. 11(4): 192-197.
- MOASSER, M. M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 26(45): 6469-6487.
- MOJTAHEDI, Z., ERFANI, N., MALEKZADEH, M., HAGHSHENAS, M. R., GHADERI, A., & DEHAGHANI, A. S. (2013). HER2 Ile655Val single nucleotide polymorphism in patients with ovarian cancer. *Iranian Red Crescent medical journal*. 15(1): 1-3.
- MUCIACCIA, B., BOITANI, C., BERLOCO, B. P., NUDO, F., SPADETTA, G., STEFANINI, M., et al. (2013). Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. *Biology of reproduction*. 89(3): 1-10.
- NADEEM, F., FAHIM, A., & BUGTI, S. (2012). Effects of cigarette smoking on male fertility. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 42(2): 1400-1405.
- NAKAJIMA, M., SAWADA, H., YAMADA, Y., WATANABE, A., TATSUMI, M., YAMASHITA, J., et al. (1999). The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 85(9): 1894-1902.
- NICHOLSON, K. M., & ANDERSON, N. G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling*. 14(5): 381-395.

- OHLANDER, S. J., LINDGREN, M. C., & LIPSHULTZ, L. I. (2016). Testosterone and male infertility. *Urologic Clinics*. 43(2): 195-202.
- OKUTMAN, O., RHOUMA, M. B., BENKHALIFA, M., MULLER, J., & VIVILLE, S. (2018). Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 35(11): 1939-1951.
- OMBELET, W., COOKE, I., DYER, S., SEROUR, G., & DEVROEY, P. (2008). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human reproduction update*. 14(6): 605-621.
- OMU, A. E. (2013). Sperm parameters: paradigmatic index of good health and longevity. *Medical Principles and Practice*. 22(1): 30-42.
- OSMAN, C., HAAG, M., POTTING, C., RODENFELS, J., DIP, P. V., WIELAND, F., et al. (2009). The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *Journal of Cell Biology*. 184(4): 583-596.
- PANNER SELVAM, M. K., AMBAR, R. F., AGARWAL, A., & HENKEL, R. (2021). Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. *Andrologia*. 53(1): e13706.
- PAPEWALIS, J., NIKITIN, A. Y., & RAJEWSKY, M. F. (1991). G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene. *Nucleic acids research*. 19(19): 5452.
- PLOTNIKOV, A., FLORES, K., MAIK-RACHLINE, G., ZEHORAI, E., KAPRI-PARDES, E., BERTI, D. A., et al. (2015). The nuclear translocation of ERK1/2 as an anticancer target. *Nature communications*. 6(1): 1-11.
- PYLYP, L. Y., ZUKIN, V. D., & BILKO, N. M. (2013). Chromosomal segregation in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 30(9): 1141-1145.
- QUENBY, S. M., GAZVANI, M. R., BRAZEAU, C., NEILSON, J., LEWIS-JONES, D. I., & VINCE, G. (1999). Oncogenes and tumour suppressor genes in first trimester human fetal gonadal development. *Molecular human reproduction*. 5(8): 737-741.
- RAJALINGAM, K., & RUDEL, T. (2005). Ras-Raf signaling needs prohibitin. *Cell cycle*. 4(11): 1503-1505.
- RIZWANI, W., ALEXANDROW, M. G., & CHELLAPPAN, S. P. (2009). Prohibitin physically interacts with MCM proteins and inhibits mammalian DNA replication. *Cell Cycle*. 8(10): 1621-1629.

- ROTHBERG, J. M., HINZ, W., REARICK, T. M., SCHULTZ, J., MILESKE, W., DAVEY, M., et al. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 475(7356): 348-352.
- SALLMÉN, M., SANDLER, D. P., HOPPIN, J. A., BLAIR, A., & BAIRD, D. D. (2006). Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology*. 17(5): 520-523.
- SAVINAINEN, K. J., SARAMÄKI, O. R., LINJA, M. J., BRATT, O., TAMMELA, T. L., ISOLA, J. J., & VISA KORPI, T. (2002). Expression and gene copy number analysis of ERBB2 oncogene in prostate cancer. *The American journal of pathology*. 160(1): 339-345.
- SCHLEICHER, M., SHEPHERD, B. R., SUAREZ, Y., FERNANDEZ-HERNANDO, C., YU, J., PAN, Y., et al. (2008). Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *The Journal of cell biology*. 180(1): 101-112.
- SCHRAML, P., KONONEN, J., BUBENDORF, L., MOCH, H., BISSIG, H., NOCITO, A., et al. (1999). Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clinical Cancer Research*. 5(8): 1966-1975.
- SEMET, M., PACI, M., SAÏAS-MAGNAN, J., METZLER-GUILLEMAIN, C., BOISSIER, R., LEJEUNE, H., & PERRIN, J. (2017). The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology*. 5(4): 640-663.
- SHARPE, R. M. (2010). Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365(1546): 1697-1712.
- SHIN, I., KIM, H. J., NAH, W. H., PARK, H. J., GYE, M. C., & PARK, H. Y. (2011). Expression of activated HER2 in human testes. *Fertility and sterility*. 95(8): 2725-2728.
- SHUIN, T., MISAKI, H., KUBOTA, Y., YAO, M., & HOSAKA, M. (1994). Differential expression of protooncogenes in human germ cell tumors of the testis. *Cancer*. 73(6): 1721-1727.
- SIEVERS, C., BILLIG, G., GOTTSCHALK, K., & RUDEL, T. (2010). Prohibitins are required for cancer cell proliferation and adhesion. *PLoS One*. 5(9): e12735.
- SIRISENA, N. D., ADEYEMO, A., KURUPPU, A. I., NETHTHIKUMARA, N., SAMARANAYAKE, N., & DISSANAYAKE, V. H. (2018). Genetic determinants of sporadic breast cancer in Sri Lankan women. *BMC cancer*, 18(1), 1-8.

- SKAKKEBÆK, A., WALLENTIN, M., & GRAVHOLT, C. H. (2021). Klinefelter syndrome or testicular dysgenesis: Genetics, endocrinology, and neuropsychology. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 181, pp. 445-462). Elsevier.
- SMURTHWAITE, K., & BAGHERI, N. (2017). Using geographical convergence of obesity, cardiovascular disease, and type 2 diabetes at the neighborhood level to inform policy and practice. *Preventing chronic disease*, 14: E91.
- SPURDLE, A. B., PURDIE, D. M., CHEN, X., & CHENEVIX-TRENCH, G. (2003). The prohibitin 3' untranslated region polymorphism is not associated with risk of ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 90(1): 145-149.
- SYVYK, A. E., & SYVYK, T. L. (2019). Inducible dominant negative ErbB2 rat spermatogonial line for generation of transgenic rat model and dissecting ERBB2 tyrosine kinase mediated pathways. *Experimental oncology*. 41(2): 95-105.
- TEAMA, S. (2018). DNA polymorphisms: DNA-based molecular markers and their application in medicine. *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*: 25.
- THOMPSON, W. E., RAMALHO-SANTOS, J., & SUTOVSKY, P. (2003). Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biology of reproduction*. 69(1): 254-260.
- THORPE, L. M., YUZUGULLU, H., & ZHAO, J. J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews Cancer*. 15(1): 7-24.
- TOURNAYE, H., KRAUSZ, C., & OATES, R. D. (2017). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 5(7): 544-553.
- TSATSANIS, C., DERMITZAKI, E., AVGOUSTINAKI, P., MALLIARAKI, N., MYTARAS, V., & MARGIORIS, A. N. (2015). The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Hormones*. 14(4): 549-562.
- TÝČ, J., FAKTOROVÁ, D., KRÍGOVÁ, E., JÍRKŮ, M., VÁVROVÁ, Z., MASLOV, D. A., & LUKEŠ, J. (2010). Probing for primary functions of prohibitin in *Trypanosoma brucei*. *International journal for parasitology*. 40(1): 73-83.
- VALDES-SOCIN, H., RUBIO ALMANZA, M., TOMÉ FERNÁNDEZ-LADREDA, M., DEBRAY, F. G., BOURS, V., & BECKERS, A. (2014). Reproduction, smell, and neurodevelopmental disorders: genetic defects in different hypogonadotropic hypogonadal syndromes. *Frontiers in endocrinology*. 5: 109.

- VANDER BORGHT, M., & WYNS, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*. 62: 2-10.
- WALCZAK-JĘDRZEJOWSKA, R., SŁOWIKOWSKA-HILCZER, J., MARCHLEWSKI, K., OSZUKOWSKA, E., & KULA, K. (2007). During seminiferous tubule maturation testosterone and synergistic action of FSH with estradiol support germ cell survival while estradiol alone has pro-apoptotic effect. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 45(I): 59-64
- WANG, L., HABUCHI, T., TAKAHASHI, T., KAMOTO, T., ZUO, T., MITSUMORI, K., et al. (2002). No association between HER-2 gene polymorphism at codon 655 and a risk of bladder cancer. *International journal of cancer*. 97(6): 787-790.
- WANG, M. J., OU, J. X., CHEN, G. W., WU, J. P., SHI, H. J., O, W. S., et al. (2012). Does prohibitin expression regulate sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and male fertility?. *Antioxid Redox Signal*. 17(3): 513-519.
- WATROWSKI, R., CASTILLO-TONG, D. C., SCHUSTER, E., FISCHER, M. B., SPEISER, P., & ZEILLINGER, R. (2016). Association of HER2 codon 655 polymorphism with ovarian cancer. *Tumor Biology*. 37(6): 7239-7244.
- YARIM, G. F., & KAZAK, F. (2016). Epidermal Büyüme Faktörü. *Kocatepe Veterinary Journal*. 9(3): 215-225.
- YILMAZ, S., & DEVRAN, Z. (2016). POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) VE BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE YAYGIN UYGULAMALARI. *Derim*. 20(1): 31-42.
- ZEGERS-HOCHSCHILD, F., ADAMSON, G. D., DYER, S., RACOWSKY, C., DE MOUZON, J., SOKOL, R., et al. (2017). The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human reproduction*. 32(9): 1786-1801.
- ZHOU, T. B., & QIN, Y. H. (2013). Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 33(1): 28-36.
- ZHOU, T. B., YIN, S. S., HUANG, J. J., & OU, C. (2012). Relationship between the prohibitin 3'untranslated region C>T gene polymorphism and cancer susceptibility-results of a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 13(7): 3319-3323.
- ZHU, B., FUKADA, K., ZHU, H., & KYPRIANOU, N. (2006). Prohibitin and cofilin are intracellular effectors of transforming growth factor β signaling in human prostate cancer cells. *Cancer research*. 66(17): 8640-8647.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5245>, (10.02.2021).
- <https://www.bilgial.com/erkek-ureme-sistemi-organlari-ve-gorevleri-nelerdir/>, (08.03.2021).

<https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15441-azoospermia>, (05.04.2021).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>, (09.04.2021).

<https://www.biyolojidersim.com/gametogenez-1-spermatogenez/> (19.06.2021).

<https://www.uniprot.org/uniprot/P04626>, (17.07.2021).

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERBB2>, (25.07.2021).

<https://www.rcsb.org/>, (02.08.2021).

<https://www.uniprot.org/uniprot/P35232>, (13.08.2021).

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PHB>, (15.09.2021).

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007503.1?from=4945&to=45523&report=genbank, (30.10.2021).

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_023046.1?from=4976&to=15833&report=genbank (30.10.2021).

EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

TARİH :

Bu form, katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek üzere hazırlanmıştır. Formun düzenlenmesinde, araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir. Yeterli görmediğiniz açıklamalar ya da sorularınız varsa, bu formu okuduktan sonra araştırmacıya sorabilirsiniz, size her türlü bilgi aktarılacaktır.

Çalışmanın Adı: Y Kroozomu Mikrodelesyon Analizi

Y Kromozomu üzerindeki mikrodelesyonlar Klinefelter sendromundan sonra en sık görülen spermatogenesis eksikliği sebebidir. Y kromozomundaki Ydq11.23 bölgelerinin (AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd) V ve VI tekrarlanan bölgeleri spermatogenesis sorumlu genlerini içermektedir. Bu bölgelerdeki mikrodelesyonlar azospermia'ya neden olmaktadır.

Yukarıda anlatılan nedenlerden dolayı, Erkek infertilitesi tanısı konan hastalardan rutin olarak Y mikrodelesyon analizi yapılmaktadır. Tedaviniz için de önemli olan bu test için, sizden bir kereye mahsus 5ml (1 tatlı kaşığı kadar) kan almamız gerekmektedir. Bu kandan DNA izolasyonu yapılacak ve Y kromozomundaki özel bölgelerin delete olup olmadığı tespit edilecektir. Araştırmaya katılmak tamamen hastanın kendi rızası ile olacaktır ve hiçbir yükümlülük getmeyecektir.

ONAM FORMU

Gönüllüye, araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşulda bahsedilen araştırma ve diğer genetik testlerin yapılmasını kabul ediyorum. Çalışmada elde edilen DNA'larım:

☐

Başka amaçla izinsiz olarak kullanılmasın

Uluslararası ilkelere uygun olarak isimsiz (anonim) olarak kullanılsın

☐

Katılımcı

Adı, Soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Görüşme Tanığı

Adı, soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Katılımcı ile Görüşen Araştırmacı

Adı, Soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

EK

