



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEP -2548G>A VE LEPR Q223R POLİMORFİZMLERİNİN ERKEK
İNFERTİLİTESİ İLE OLASI İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan

Merve AKMAN

Tıbbi Biyoloji AnaBilim Dalı

Yüksek Lisans

Danışman

Doç.Dr. Nevin KARAKUŞ

TOKAT – 2020

LEP -2548G>A VE LEPR Q223R POLİMORFİZMLERİNİN ERKEK
İNFERTİLİTESİ İLE OLASI İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: / /

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Başkan :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü:

Mühür

İmza

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ 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 kaynağımı gösterdiğimi beyan ederim.

(.../.../200...)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

Merve AKMAN

İmzası

.....

TEŞEKKÜR

Tıbbi biyoloji ve genetik alanı ile ilgili edindiğim bilgilerin birçoğunu bana öğreten ve tez çalışmalarım sırasında bana her türlü destek ve yardımı sağlayan tez danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nevin KARAKUŞA'a,

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Nihan BOZKURT ve Anabilim dalımız Araştırma Görevlisi Emel ÖZSOY'a

Yüksek Lisans çalışmalarım sırasında gösterdikleri sabır ve desteklerinden dolayı anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

ÖZET

LEP -2548G>A VE LEPR Q223R POLİMORFİZMLERİNİN ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE OLASI İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve AKMAN, Yüksek Lisans Tezi

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Eylül 2020

İnfertilite, en az bir yıl içerisinde korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi durumudur. İnfertilitenin birçok sebebi arasında genetik faktörler de bulunmaktadır. Leptin (*LEP*) geninde mutasyona sahip bireylerin infertil olduğu ve Leptin Reseptör (*LEPR*) geninde mutasyona sahip olan hastaların da pubertal gelişimlerinin eksik olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma, *LEP* geni -2548G>A polimorfizmi ve *LEPR* geni Q223R polimorfizmi ile erkek infertilitesi arasında ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla yapıldı.

Bu çalışmaya infertilite hastalığı olan 137 erkek ve 100 sağlıklı erkek kontrol dahil edildi. Periferik kandan elde edilen hasta ve kontrol DNA'ları, PCR ve RFLP yöntemleri uygulanarak analiz edildi. İstatistiksel değerlendirme ki-kare ve varyans analizleri ile yapıldı.

LEP -2548G>A (rs7799039) ve *LEPR* Q223R (rs1137101) polimorfizmleri açısından hasta ve kontrollerin genotip ve allel sıklıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Yapılan kompozit genotip analizinde, GGQR kompozit genotipinin infertilite için risk oluşturabileceği saptandı ($p=0.007$).

Sonuç olarak, *LEP* -2548G>A ve *LEPR* Q223R genleri polimorfik genotiplerinin tek tek risk oluşturmaya da kompozit şeklinde infertiliteye sebep olabileceği saptanmıştır. Bu çalışmaların daha geniş populasyonlarda yapılmasıyla daha verimli ve kesin sonuçların elde edilebileceği kanaatindeyiz.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF POSSIBLE RELATIONSHIPS OF *LEP*-2548G>A AND *LEPR* Q223R POLYMORPHISMS WITH MALE INFERTILITY

Merve AKMAN, Master Thesis

Tokat Gaziosmanpaşa University, September 2020

Infertility is the situation in which pregnancy cannot be achieved despite unprotected sexual intercourse within at least one year. There are also genetic factors among many causes of infertility. It has been reported that individuals with a mutation in the leptin (*LEP*) gene are infertile and that patients with a mutation in the Leptin Receptor (*LEPR*) gene also lack pubertal development. This study was carried out to determine whether there is a relationship between *LEP* gene -2548G>A polymorphism and *LEPR* gene Q223R polymorphism and male infertility.

137 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 PCR and RFLP methods. Statistical evaluation was made by chi-square and variance analysis.

No statistically significant differences were found in the genotype and allele frequencies of patients and controls in terms of *LEP*-2548G>A(rs7799039) and *LEPR* Q223R (rs1137101) polymorphisms ($p>0.05$). In the composite genotype analysis, it was determined that the GGQR composite genotype may pose a risk for infertility ($p=0.007$).

As a result, it has been determined that the polymorphic genotypes of *LEP* -2548G>A and *LEPR* Q223R genes may cause infertility in the form of composite, although not individually. We believe that more efficient and precise results can be obtained by conducting these studies in larger populations.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
TABLolar	viii
ŞEKİLLER	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İnfertilite Tanımı	5
2.1.1. Erkek İnfertilitesi	5
2.2. İnfertilite Epidemiyolojisi	7
2.3. İnfertilitenin Etiyolojisi Ve Risk Faktörleri	8
2.3.1. Hormonal Problemler	9
2.3.2. Fiziksel Problemler	10
2.3.3. Psikolojik/Fiziksel/ Davranış Problemleri	11
2.3.4. Genetik Faktörler	11
2.4. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi	12
2.5. Erkek Üreme Sistemi Anatomisi	13
2.5.1. Erkek İç Genital Organları	15
2.5.2. Erkek Dış Genital Organları	19
2.6. Spermatogenezis	21
2.6.1. Sertoli Hücreleri	21
2.6.2. Germ Hücreleri	21
2.6.3. Spermatogenezis	21
2.6.4. Oluşan Spermin Yapısı	24
2.7. Azospermi	26
2.7.1. Pretestiküler nedenler	29
2.7.2. Testis etiyolojisi	31
2.7.3. Azosperminin testis sonrası nedenleri	37
2.8. Polimorfizm	40
2.8.1. DNA Polimorfizm Çeşitleri	41

2.8.2. DNA Markırlarının Uygulamaları	46
2.8.3. Polimorfizmlerin Tespit Yöntemleri	48
2.9. Lep/ Lepr Yapısı Ve İşlevi	50
2.9.1. Leptin ve Leptin Reseptör Sinyal İletim Yolları	51
2.9.2. LEP ve LEPR Polimorfizmlerinin Olası Etkileri	55
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
3.1. Hasta Profili Ve Biyolojik Gereç Eldesi	57
3.2. Kullanılan Kimyasal Gereçler	57
3.3. Kullanılan Cihazlar Ve Teknik Malzemeler.....	58
3.4. Uygulanan Yöntemler	59
3.4.1. Kullanılan Solusyonlar ve Bunların Hazırlanması	59
3.4.2. Kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Protokol.....	59
3.4.3. <i>LEP</i> Geninin PCR-RFLP Yöntemleri ile Genotiplenmesi.....	60
3.4.4. <i>LEPR</i> Geninin PCR-RFLP Yöntemi ile Genotiplenmesi	64
3.4.5. Agaroz Jelin Hazırlanması	66
3.4.6. Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	67
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	67
4. BULGULAR	68
4.1. Çalışma Grubu İle İlgili Demografik Karakterlerin Değerlendirilmesi	68
4.2. <i>LEP</i> Geni Polimorfizmi.....	68
4.3. <i>LEPR</i> Geni Polimorfizmi	70
4.4. <i>LEP</i> ve <i>LEPR</i> Gen Polimorfizmleri Kompozit Genotip Analizleri	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	74
6. KAYNAKLAR	79
7. EKLER	105

SİMGELER VE KISALTMALAR

AgRP	Agouti ile ilişkili protein
AMP	Adenozin mono fosfat
AMPK	AMP ile aktive edilmiş protein kinaz
ART	Yardımcı üreme teknolojisi
AZF	Azospermik faktör
CFTR	Kistik fibroz transmembran düzenleyici gen
CNV	Kopya sayı varyasyonunu
CRH	Kortikotropin salıcı hormon
Db	Diyabet fare modeli
DIO	Ölüm indükleyici gen
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
FN	Fibronektin
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	Gonadotropin salıcı hormon
HGH	Hipogonadotropik hipogonadizm
HPG	Hipotalamik hipofiz gonadal eksen
HWE	Hardy-Weinberg dengesi
ICSI	İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu
IGD	Immunoglobulin D
JAK	Janus kinaz

KS	Klinefelter sendromu
LEP	Leptin
LEPR/obRb	Leptin reseptörü
LH	Lüteinleştirici hormon
MC4R	Melanokortin 4 reseptörü
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NOA	Nonobstüktif azospermi
NPY	Nöropeptit
NTD	N- terminal domain
OA	Azospermi
Ob	Obez fare modeli
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDE	Fosfodiesteraz
PI3K	Fosfatidilinozitol 3 kinaz
POMC	Proopiomelanokortin
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
SH	Küçük hidrofobik protein
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SOCS	Sitokin sinyallerinin hücre içi baskılayıcısı
SRY	Cinsiyet belirleyici faktör
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
STR	Kısa ardışık tekrar

TESE	Testiküler sperm ekstraksiyonu
YÜT	Yardımcı üreme teknikleri



TABLÖLAR

Sayfa

Tablo 1	WHO'nun normal sperm parametresi için kriterleri	6
Tablo 2	WHO'nun semen kalitesine ilişkin terminolojileri	7
Tablo 3	Semen analizi için en düşük referans değerleri (%95 güven aralıkları).....	13
Tablo 4	Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi.....	26
Tablo 5	Azosperminin etiyojileri, mekanizmaları ve prognozları.....	28
Tablo 6	LEP geni -2548G>A polimorfizmi PCR'ı için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı.....	62
Tablo 7	LEP geni -2548G>A polimorfizmi RFLP analizi için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı	63
Tablo 8	LEPR geni Q223R polimorfizmi PCR'ı için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı.....	65
Tablo 9	LEPR geni Q223R polimorfizmi RFLP analizi için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı.....	66
Tablo 10	LEPgen polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının hasta ve kontrollerle karşılaştırılması.....	69
Tablo 11	Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin LEP -2548G>A polimorfizmine göre değerlendirilmesi.....	70
Tablo 12	LEPR gen polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının hasta ve kontrollerle karşılaştırılması.....	71
Tablo 13	Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin LEPR Q223R polimorfizmine göre değerlendirilmesi.....	72
Tablo 14	İnfertilite hasta ve kontrol gruplarının iki yönlü SNP-SNP etkileşimlerinin genotip kombinasyonları ile ilişkili “p” değerleri (Kompozit genotip analizi).....	73

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1	Yaşam şeklinin erkek üreme fonksiyonları üzerine etkisi.....9
Şekil 2	Erkek üreme sistemi. Erkek Üreme Sistemi. Erkek üreme sisteminin yapıları arasında testisler, epididimitler, penis ve meni üreten ve taşıyan kanallar ve bezler bulunur. Sperm, skrotumdan spermatik kordda paketlenmiş olan ductus deferens'den çıkar. Seminal veziküller ve prostat bezi, sperm oluşturmak için spermlere sıvı ekler.....14
Şekil 3	Testisin anatomisi. Bu sagital görünüm sperm üretim bölgesi seminifer tübülleri gösterir. Oluşturulan spermler olgunlaştıkları epididime aktarılır. Duktus deferens yoluyla bir boşalma sırasında epididimden ayrılırlar.....16
Şekil 4	Penisin kesit anatomisi. Üç erektile doku kolonu, penis hacminin çoğunu oluşturur.....20
Şekil 5	Spermatogenez.....23
Şekil 6	Sperm yapısı. Sperm hücreleri DNA içeren bir kafaya ayrılır; mitokondri içeren bir orta parça;ve hareketlilik sağlayan bir kuyruk. Akrozom ovaldir ve biraz düzleştirilmiştir.....25
Şekil 7	Hipotalamustaki STAT3 ve PI3K-PDE3B-cAMP yolları üzerinden <i>LEP</i> 'in hücre içi sinyalizasyonu şeması.....53
Şekil 8	<i>LEPR</i> yapısı.....55
Şekil 9	<i>LEP</i> geni genomik DNA dizisi ve bu gene ait bölgeyi çoğaltmada kullandığımız primerlerin gen üzerindeki bağlanma bölgeleri ile -2548G>A polimorfik bölgesi.....61
Şekil 10	<i>LEPR</i> geni genomik DNA dizisi ve bu gene ait bölgeyi çoğaltmada kullandığımız primerlerin gen üzerindeki bağlanma bölgeleri ile Q223R polimorfik bölgesi.....64
Şekil 11	<i>LEP</i> (-2548 G>A) geni polimorfizmi RFLP sonuçları. 1, 2. ve 5. kuyu GA heterozigot genotipi, 3. ve 4. kuyu AA homozigot genotipi, 6. kuyu GG homozigot genotipi göstermektedir. M: pUC Mix Marker.....69
Şekil 12	<i>LEPR</i> (Q223R) geni polimorfizmi RFLP sonuçları. 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 ve 12. kuyular QR heterozigot genotipi, 4. ve 5. kuyular QQ homozigot genotipi, 11. Kuyu ise RR homozigot genotipi göstermektedir. M: pUC Mix Marker.....71

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Amerikan Üreme ve Tıp Uygulama Komitesi Derneği (ASRM Practice Committee) tarafından infertilitenin en özlü tanımı yapılmıştır. Bu tanıma göre infertilite, en az bir yıl içerisinde korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesine denir (Taşcı ve ark., 2008, Bayer ve ark., 2008). İnfertilite bu tanıma göre, tıbbi açıdan üremeyi engelleyen bir sorun olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda bu durum bir hastalık olarak kabul edilmektedir.

İnfertilite, primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Primer infertilite, hiç gebelik oluşmaması durumuna denir. Daha önce en az bir kez başarılı gebelikten sonra herhangi bir korunma olmadan hamile kalamama sorununa sekonder infertilite denir. İnfertilite her iki cinsiyetten de kaynaklanabilmektedir. Tıbbi veriler, infertilitenin kaynağı açısından yüzde 30 erkek, yüzde 20 ovulatuvar, yüzde 20 tübal/peritoneal, yüzde 5 uterin/servikal ve yüzde 25 oranında açıklanamayan faktörün etkili olduğunu göstermektedir (Bayer ve ark., 2008). Bir başka şekilde ifade edecek olursak, infertilitenin kaynağı kadın faktörlü, erkek faktörlü ve açıklanamayan infertilite olmak üzere üçe ayrılmaktadır. İnfertiliteyi etkileyen faktörler ise yaş, ilişki zamanlaması, doğum kontrol yöntemleri, mesleki riskler, beslenme, hayat tarzı, sigara, alkol, kafein, stres vb. etkenlerdir (Bayer ve ark., 2008).

Leptin (*LEP*) geni, beyaz adipositler tarafından dolaşıma salgılanan ve enerji homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan bir protein kodlar. *LEP* geni insan kromozomunda 7q32.1 üzerinde yer alır ve 3 ekzona sahiptir. Dolaşımdaki *LEP*, beyindeki leptin reseptörüne (*LEPR*) bağlanır, bu da beslenmeyi inhibe eden ve enerji harcamasını teşvik eden sinyal yollarını aktive eder. Bu protein aynı zamanda çeşitli endokrin fonksiyonlara sahiptir ve bağışıklık ve inflamatuvar tepkiler, hematopoez, anjiyogenez, üreme, kemik oluşumu ve yara iyileşmesinin düzenlenmesinde rol oynar. Bu gen ve düzenleyici bölgelerindeki mutasyonlar, insanlarda hipogonadizm ile ciddi obezite ve morbid obeziteye neden olur (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3952>). *LEP*'in

hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksenini düzenleyerek erkek üreme sistemi ve sperm fonksiyonu üzerinde etkileri olduğu gösterilmiştir (Gonzalez-Añover ve ark., 2011). LEP'in gonadotropin salıcı hormon (GnRH), folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinizan hormon (LH) üzerindeki uyarıcı etkileri çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Cunningham ve ark., 1999, Ponzio ve ark., 2004). LEP/LEPR eksikliği olan farelerin infertil olduğu ve düşük gonadotropin seviyelerine sahip olduğu da rapor edilmiştir (Clement ve ark., 1998, Strobel ve ark., 1998). İnfertil erkek hastaların yüksek LEP konsantrasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (Jahan ve ark., 2011).

LEPR geni tarafından kodlanan protein, sitozolik STAT proteinlerinin (signal transducer and activator of transcription) aktivasyonu yoluyla gen transkripsiyonunu uyardığı bilinen gp130 sitokin reseptörlerinin ailesine aittir. *LEPR* geni insan kromozomunda 1p31.3 üzerinde yer alır ve 24 ekzona sahiptir. Bu protein, leptin için bir reseptördür ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde yer alır. Bu gendeki mutasyonlar, obezite ve hipofiz disfonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3953>). LEP, fizyolojik etkisini LEPR ile gösterir (Tartaglia ve ark., 1995). Bazı çalışmalarda testis hacmi, testosteron (T), spermatogenez, sperm sayıları, motilite ve kapasitasyon ile LEP ve/veya LEPR arasındaki ilişki bildirmiştir (Ishikawa ve ark., 2007, Aquila ve ark., 2008, Lampiao, F. and Du Plessis, S.S. 2008). Bununla birlikte, bazı çalışmalar Lep ve T seviyeleri ve sperm motilitesi ve sayımı gibi erkek üreme göstergeleri arasında ters korelasyonların varlığını göstermiştir (Ishikawa ve ark., 2007, Dhanoa ve ark., 2015, Glander ve ark., 2002, Karimova, O. 1982).

LEP geninin düzenleyici bölgesindeki genetik varyasyon LEP düzeyini etkileyebilir ki *LEP* geninde mutasyona sahip bireylerin infertil olduğu ve *LEPR* geninde mutasyona sahip olan hastaların da pubertal gelişimlerinin eksik olduğu rapor edilmiştir (Strobel ve ark., 1998, Clement ve ark., 1998). *LEP* geninin promoter bölgesindeki yaygın polimorfizmlerden biri -2548G>A (rs7799039)'dır. Geçmiş çalışmalar bu polimorfizm ile dolaşımdaki LEP ve LH konsantrasyonları arasında ilişki bildirmiştir (Yiannakouris ve ark., 2001, Su ve

ark., 2012, Hoffstedt ve ark., 2002). *LEPR* genindeki Gln223Arg (rs1137101) polimorfizmi, reseptörün ekstraselüler domaini olan kortikotropin salıcı hormon (CRH1)'da yer alır ve bu domainin *LEPR* aktivitesi ve doğru katlanması ile ilişki olduğu ve bunun KEP sinyal yolağını etkileyebileceği bildirilmiştir (Saukko ve ark., 2010, Peelman ve ark., 2006). *LEP* geni -2548G>A polimorfizminin erkek infertilitesi ile ilişkili olduğunu gösteren farklı popülasyonlarda yapılmış çalışmalar mevcuttur (Khosropour ve ark., 2017, Hodzic ve ark., 2017).

Spermatojenik disfonksiyon ve varikozel gruplarında leptin ekspresyonu en yüksek dereceye çıkarılmıştır. *LEP*üreme fonksiyonunda önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. *LEP*ile tedavi edilen erkeklerde, kontrol gruplarına kıyasla sperm sayısında belirgin artış görülmüştür (Barash ve ark.,1996).

LEP'in vücut ağırlığı homeostazı, nöroendokrin fonksiyonu ve doğurganlık üzerindeki biyolojik etkileri, hedef dokulardaki *LEPR*ile etkileşimler yoluyla gerçekleştirilir. *LEPR*, sitokin reseptörlerinin gp130 ailesine aittir. Testiste *LEPR* ekspresyonunun modeli türe özgüdür. *LEPR* immünorekresyonu sadece Leydig hücrelerine bağlıdır, oysa tübüllerde, sertoli hücrelerinde veya germ hücrelerinde sinyal tespit edilememiştir (Caprio ve ark., 2003).

Yerinde hibridizasyon teknikleri kullanılarak diğer gruplar, *LEPR* mRNA'nın yetişkin sıçanların sertoli hücrelerinde eksprese edildiğini göstermiştir (Tena-Sempere ve ark., 2001). Bu nedenle, tübüller içinde immünoreaktivite eksikliği, *LEPR*proteininin sertoli hücrelerine immünohistokimya tarafından tespit edilebilecek kadar bir seviyeye çevrilmediğini göstermiştir. Sıçan testisinin aksine, yenidoğan ve yetişkin fare testisinde, *LEPR*immünoreaktivitesinin esas olarak tübüllerde bulunduğu ve germ hücrelerine lokalize olduğu bulunmuştur (El-Hefnawy ve ark., 2000).

T. Ishikawa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *LEP*sadece kanda değil aynı zamanda seminifer tübüllerde ve germ hücrelerinde de bulunurken, Leydig hücrelerinde *LEPR* bulunmuştur (Ishikawa ve ark., 2007).

Murin testislerinde, özellikle sperm ve Leydig hücrelerinde ilk LEPR ekspresyonu gösterileri, LEPkeşfedildikten kısa bir süre sonra gerçekleşmiştir (Hoggard ve ark., 1997). Daha sonra, çeşitli çalışmalar testiste LEPR ekspresyonunun farklı türler arasında paylaşılan bir özellik olduğunu göstermiştir. Ancak işlevi ve spermatogenez ve steroidogenez gibi üreme süreçlerine katılımı henüz aydınlatılmamıştır (Rago ve ark., 2009; Gong ve ark., 2013; Ishikawa ve ark., 2007). Erkek üreme sisteminde LEPR; testis, epididim ve seminifer tübüllerde tanımlanmıştır (Rago ve ark., 2009). Özellikle insanlarda LEPR, testiküler somatik hücreler, germ hücreleri ve spermatozoada tanımlanmıştır (Ishikawa ve ark., 2007; Martins ve ark., 2015; Jope ve ark., 2003). İlginç bir şekilde, bilinmeyen bir rolü olan kısa bir izoform olan LEPRa, testis hücrelerinde bolca eksprese edilmiştir (Margetic ve ark., 2002). Tersine, bazı çalışmalar, LEPR'nin tamamen işlevsel sinyal izoformu olan LEPRb'nin testiküler dokuda bulunmadığını bildirmiştir (Yuan ve ark., 2014; Hoggard ve ark., 1997).

Bu çalışmada Türk toplumunda *LEP* geni -2548G>A (rs7799039) ve *LEPR* geni Q223R (rs1137101) polimorfizmlerin erkek infertilitesi ile olası ilişkilerinin araştırılması amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE TANIMI

Çiftlerin düzenli olarak ilişkiye girmelerine rağmen 1 yıl içinde gebeliğin gerçekleşmemesi durumuna infertilite denir. İnfertilite, primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Primer infertilite, hiç gebelik oluşmaması durumuna denir. Daha önce en az bir kez başarılı gebelikten sonra herhangi bir korunma olmadan hamile kalamama sorununa sekonder infertilite denir. İnfertilite her iki cinsiyetten de kaynaklanabilmektedir. Tıbbi veriler, infertilitenin kaynağı açısından yüzde 30 erkek, yüzde 20 ovulatuvar, yüzde 20 tübal/peritoneal, yüzde 5 uterin/servikal ve yüzde 25 oranında açıklanamayan faktörün etkili olduğunu göstermektedir (Bayer ve ark., 2008). Bir başka şekilde ifade edecek olursak, infertilitenin kaynağı kadın faktörlü, erkek faktörlü ve açıklanamayan infertilite olmak üzere üçe ayrılmaktadır. İnfertiliteyi etkileyen faktörler ise yaş, ilişki zamanlaması, doğum kontrol yöntemleri, mesleki riskler, beslenme, hayat tarzı, sigara, alkol, kafein, stres vb. etkenlerdir (Bayer ve ark., 2008).

2.1.1. Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilite tanısının konması için özellikle sperm analiz sonucuna bakılmaktadır. Fakat, bu sonuç yalnız başına etiyoloji bozukluğunun belirlenmesi için yeterli değildir. Bu sebeple, erkek infertilitenin belirlenmesinde ayrıntılı fiziksel muayene ve hasta hikayesi, hormonal tahliller, immünolojik tahliller, ultrason veya doppler çalışması, genetik ve kromozom testlerinin yapılmasına da gerek duyulup, büyük önem taşımaktadır. Sperm konsantrasyonu, sperm miktarı ve pH derecesi, motilite , progresif motilite, canlılık ve sperm morfolojisi gibi parametreler sperm analizinde etkin bir biçimde kullanılarak erkek infertilitesi değerlendirilmesi için önem taşımaktadır (Oehninger S and Kruger T ., 2007, Giwercman ve ark., 2003, Collins JA, Barnhart KT and Schlegel, 2007).

Fertil erkek topluluğu referans alınarak, sperm kalitesi kriterleri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından belirlenen parametrelere göre değerlendirilmektedir (NICE.Clinical Guideline, 2013, World Health Organization, 2010, Lewis S.E.

M, 2007, McLachlan RI ve ark., 2003). DSÖ tarafından, normal sperm parametreleri ve semen kalitesine bağlı olarak semen analizi terminolojileri 2010 yılında belirlenmiştir. Belirlenen bu terminolojiler Tablo 1 ve Tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) nün normal sperm parametresi için kriterleri

<i>Normal sperm parametresi için kriterler</i>
Semen hacmi(ml): 1,5
Toplam sperm sayısı (10^6/ejekülat): 39 (33-46)
Sperm sayısı/ml (10^6/ml): 15 (12-16)
Total motilite (%): 40 (38-42)
Progresif hareketli (%): 32 (31-34)
Morfoloji: ≥ 4 (3.0-4.0)
pH: ≥ 7.2
Canlılık(Viability): ≥ 58 (55-63)
Lökosit (iltihap hücresi) (10^6/ml): <1

Tablo 2: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) nün semen kalitesine ilişkin terminolojileri

<i>Semen analiz terminolojileri</i>
<i>Normozoospermi:</i> Alt referans limitlerine eşit veya yüksek toplam sperm sayısı (veya raporlanan sonuca göre, konsantrasyonu) , ileriye doğru hareketli (PR) ve morfolojik olarak normal spermatozoa yüzdeleri
<i>Oligozoospermi:</i> Alt referans limitinden düşük toplam sperm sayısı (veya raporlanan sonuca göre, konsantrasyonu)
<i>Asthenozoospermi:</i> Hem ileri hareketli spermilerin (PR) hem de morfolojik olarak normal spermilerin yüzdesi alt referans limitlerinden düşük
<i>Teratozoospermi:</i> Alt referans limitinden düşük yüzdede morfolojik olarak normal spermiler
<i>Oligoasthenoteratozoospermi:</i> Alt referans limitlerinden düşük toplam sperm sayısı (veya raporlanan sonuca göre, konsantrasyonu) , hem ileri hareketli (PR) hem de morfolojik olarak normal spermilerin yüzdeleri
<i>Azoospermi:</i> ejakülatta hiç sperm olmaması
<i>Aspermia:</i> semen yok (retrograd ejakülasyon var veya yok)
<i>Kriptoospermi:</i> taze preparatlarda sperm olmamasına rağmen santrifüjlenmiş pellette gözlenir
<i>Lökospermi :</i> ejakülatta eşik değer üstünde lökosit varlığı
<i>Nekrozoospermi:</i> ejakülatta düşük yüzdede canlı ve yüksek yüzdede cansız spermiler

2.2. İNFERTİLİTE EPİDEMİYOLOJİSİ

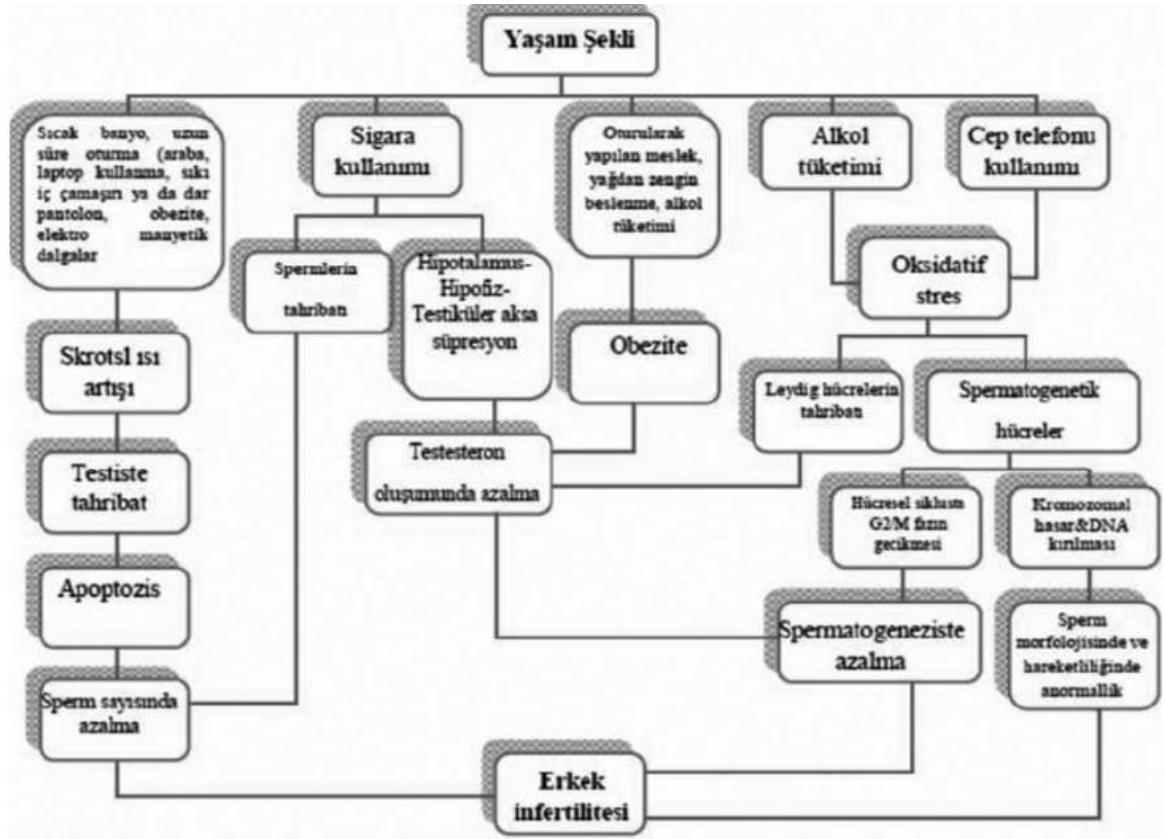
Kısırlık epidemiyolojisi üzerine ilk çalışma 1866'da Matthews Duncan tarafından İskoçya'da yayınlandı. Kitabı, Verimlilik, Doğurganlık ve Kısırlık (Duncan, 1866) ilk ve son zamanlara kadar populasyon temelli kısırlık çalışmasıydı (Templeton, 1992).Ne yazık ki kısırlık prevalansı hakkında çok az ulusal veri vardır. Sayım türü veriler çocuksuz kalan kadınların oranını göstermektedir, ancak bu veriler gönüllü çocuksuzluğun (bilinmeyen) oranı ile karıştırılmaktadır. Bu nedenle, art arda doğum kohortlarında (Kohort: Olgu,kontrol) çocuksuz kalan kadınların oranı yükselme eğilimindeyken (Botting, 1992), gönüllü kısırlık oranı da belirgin değişiklikler göstermiştir ve bazı işçilerde kısırlıkoranı 1960 ve 1970'lerde gözle

görölür bir şekilde artışın olduğu sonucuna varılmıştır. İstemsiz faktörlerden ziyade gönüllü olmaları daha muhtemeldir (Poston ve Kramer, 1983).Örneğin, ABD’de 1920’lerde ve 1930’larda gönüllü çocuksuzluk yaygındı, belki çocuksuz çiftlerin% 25-40’ını oluşturuyordu, ancak bu süreden sonra gönüllü çocuksuzluk daha az yaygınlaştı, ancak 1960’larda yeniden ortaya çıktı (Templeton, 1992). Bu nedenle, geniş çaplı nüfus temelli anketlerin nadir görülmesi nedeniyle kısırlığın yaygınlığının değerlendirilmesinde önemli zorluklar bulunmaktadır (Greenhall ve Vessey, 1990; Thonneau ve Spira, 1990). Yayınlanan verilerde, çözülmüş kısırlık prevalansına ilişkin geniş değişiklikler vardır; bu oranlar% 5-14 oranında çözülmüş primer kısırlık için ve% 3-12 oranında çözülmüş ikincil kısırlık için belirtilmiştir. Çözülmemiş kısırlık için, sırasıyla birincil ve ikincil kısırlık için% 3-9 ve% 3-7 oranları verilmiştir.

2.3.İNFERTİLİTENİN ETİYOLOJİSİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

İnfertilite nispeten yaygın olsa da, erkek infertilitesinin doğru teşhisinde var olan derin zorluklar göz önüne alındığında, erkek eşin göreceli katkısını kurmak gerçekten çok zordur. İnfertilitenin etiyojisini değerlendirmeye çalışan çoğu çalışma, DSÖ tarafından yayınlanan geleneksel semen kalitesi kriterlerini kullanmıştır.

Çiftlerde infertilite önemli bir sorundur ve yardımcı üreme teknikleri(YÜT) nin başarısında etkili olan faktörler vardır. Bu faktörler sperm kalitesi, hormonal stimölasyona cevap, kaliteli embriyo sayısı ve yaşam biçimi davranışlarıdır. İnfertil çiftlerin de katkıları ile YÜT’ün başarısında olumlu sonuçlar almak mümkündür. Erkek fertilitesi ile en çok araştırılan ve önerilen yaşam biçimi davranışları, sigara, alkol, kafein, madde bağımlılığı, obezite, zayıflık, beslenme, egzersiz, çevresel zararlı maddeler/ meslek, strestir (Revonta ve ark., 2010). Şekil 1’de yaşam şeklinin erkek üreme fonksiyonları üzerine etkileri özetlenmiştir.



Şekil 1 : Yaşam Şeklinin Erkek Üreme Fonksiyonları Üzerine Etkisi (Pramanic, 2012)

2.3.1. Hormonal Problemler

Erkek infertilitesinde hormonal sorunlara yüzdelik olarak az bir kısmı sebep olmaktadır. Vücuttaki hormonal olayların regülasyonunu hipotalamus hipofiz endokrin sistemi sağlamaktadır. Hormonal regülasyon testislerin verimli sperm üretmesini ve yaymasını sağlamaktadır. Örneğin ; gonadotropin salıcı hormon (GnRH), testosteron sentezi ve sperm üretimini sağlayan hormonal yolağı uyarmaktadır. GnRH salınım bozukluğu sperm üretimin durdurulmasına ve testosteron eksikliğine yol açmaktadır. Ayrıca, hipofiz bezi folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH)'nın yeterli miktarda üretilmemesine yol açmaktadır. Hormonal yolakta testosteron ve sperm üretiminden sorumlu olan hormonlar LH ve FSH'tır. LH tarafından uyarılmasına rağmen testis Leydig hücreleri testosteron üretemeyebilir (Poongothai ve ark. 2009, The Optimal Evaluation of the Infertile Male., 2010, Kotan ve ark. 2014, Krausz ve Chianese, 2014).

2.3.2. Fiziksel Problemler

Erkeklerde infertiliteye fiziksel problemler spermin testisterden penise olan iletimini engelleyerek ya da sperm oluşum olayını engelleyerek neden olmaktadır. Bu problemler anormal sperm morfolojisine ve/veya sperm sayısında azlığa sebep olmaktadır. Başlıca meydana gelen fiziksel problemler şunlardır;

Varikosel:Testis yapısında gerçekleşen ve doğuştan itibaren oluşanvenöz adı verilendamarsal biranomalıdır. Testislerden kirli kanı bulunduğu yerden uzaklaştıran venöz damarların eksikliği ile gerçekleşmektedir (Choi ve Kim, 2013). Varikosel, oluşan sperm hareketliliğinin bozulmasına, sperm miktarının azalmasına ve spermin yapısının bozulmasına sebep olmaktadır. Ayrıca, Leydig hücresinin(testosteron hormon salımında rol oynar) miktarındaki artışına rağmen işlevsel olarak testosteron salınımında azalma görülür.

Hasarlı sperm kanalları:Spermiler, epididim adı verilen sperm kanalında hareket kazanırlar. Vas deferens ve ejakülatuar kanallarıyla devam ederler. Bu kanallarının doğuştan hasarlı olması durumudur. İnfertil erkeklerin %7 sinde görölmektedir. Bu durum sperm kanallarındaki tek ya da her iki tüpün tıkanık olması veya eksikliğinden dolayı kaynaklanabilmektedir. Bu tıkanıklık genetik veya gelişimsel hatalardan dolayı oluşmaktadır.

Torsiyon:Testiste yumurtalıkların kendi etrafında dönmesiyle spermatik kordonun büzüşmesinden dolayı testisi besleyen kan damarlarının kan dolaşımını bozmasıyla oluşan rahatsızlıktır.Genelde testisin aşırı bir şekilde şişmesiyle karakterize olmaktadır.

Tüberküloz, brusella, bel soğukluğu, tifo, grip, suçiçeği, kızamıkçık ve frengi gibi enfeksiyon ve hastalıklar:Testiküler atrofi durumu oluşturabilmektedir. Sperm hareketliliği ve sperm sayısı miktarındaki azlık testiküler atrofiye işaret edebilmektedir. Ayrıca, testiküler hasarın diğer bir göstergesi ise yükselmiş FSH seviyesi ve diğer hormonal problemlerdir.

Retrograd ejakülasyon:Boşalma anında meninin dışarı atılmayıp, idrar kesesine gitmesi ile oluşan bir durumdur. Bu duruma sahip olan kişilerde ejakülat miktarı

azdır ve boşalma sonrası idrar örneğinde sperm hücreleri gözlemlenebilmektedir. İnfertil erkeklerin % 1.5 inde görülmektedir. Ameliyat ve ilaç yardımıyla kontrol altına alınabilir (Garcia-Velasco ve Banker, 2015).

2.3.3. Psikolojik/Fiziksel/ Davranış Problemleri

Erkek infertilitesini etkileyen birçok cinsel problem bulunmaktadır. Genellikle psikolojik problemler ve fiziksel problemler olarak bulunmaktadır ve bunları birbirinden ayırmak güçtür. Örnek verilecek olursa erken boşalma, cinsel yetersizlik, ereksiyon bozukluğu vs.

2.3.4.Genetik Faktörler

Erkek infertilite vakalarının en az %15 inde genetik faktörlerden kromozomal mutasyonlar ve tek gen mutasyonları gözlemlenmiştir (Krausz C, Escamilla AR, Chianese C, 2015).

2.3.4.1. Kromozomal Anormallikler

Sayısal (ör: trizomi) ya da yapısal (ör: inversiyonlar veya translokasyonlar) olarak kromozom anomalileri gözlemlenmektedir. Testiküler eksiklik kromozomal anomalilerin sıklığı arttıkça artmaktadır. Yapılan değerlendirme sonuçlarına bakılarak genel yoğunluğa göre, semen sayısı < 5 milyon/ml olan hastalar 10 kat daha fazla otozomal yapısal anomali göstermiştir. Farklı sperm yoğunluklarına sahip hastalarda özellikle oligospermi ve azospermi hastalarında, kromozomal anormallik sıklıkları göz önünde bulundurularak karyotip analizi büyük önem kazanmıştır ve ayrıca olumsuz gebelik sonuçlarını önlemek için karyotip analizi zorunlu kılınmıştır (Johnson MD, 1998, Clementini ve ark., 2005, Dul ve ark., 2012).

2.4. ERKEK İNFERTİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Öykü alma

Öykü alınırken çiftler beraber değerlendirmeye alınmalıdır. İnfertilite hastalığının dörtte biri sadece öykü alınmasıyla teşhis konulabilir. Ayrıca, infertil çiftlere prognoz tayini yapılarak da yönlendirme yapılabilir.

Öykü Alırken Ele Alınması Gereken Başlıklar

- İnfertilite Öyküsü: Zaman, önceki gebelikler, şuanki partner, diğer eski partnerler, önceki tedaviler.
- Cinsel Öykü: Cinsel ilişki zamanlaması, cinsel ilişki sıklığı, mastürbasyon sıklığı.
- Çocukluk ve Adolesans Öyküsü: İnmemiş testis, testiküler travma, puberte başlangıç yaşı.
- Tıbbi Öykü: Sistemik hastalıklar.
- Enfeksiyonlar: Viral, kabakulak orşiti, cinsel çeşitli hastalıklar, epididimit.
- Gonadotoksin Öyküsü: Kimyasallar (pestisid), kemoterapi, simetidin, kolşisin, alkol, termal etki.
- Aile Öyküsü : Kistik fibrozis, görme bozukluğu, Kallmann sendromu.
- Cerrahi Öykü : Orşiopeksi, mesane cerrahisi (Çiçek, 2007).

Semen Analizi

Semen analizi; sperm miktarı, sperm hareketliliği ve sperm morfolojisinin incelenmesi işlemidir. Normal değerler semen analizinde çıkan değerler ile karşılaştırılarak erkeğin fertil olup olmadığı sonucuna varılabilir, fertilitenin anlaşılabilmesi için ayrıyeten bir test ya da cihaz bulunmamaktadır. Semen analizi için en düşük referans değerleri (%95 güvenlik aralıkları) Tablo 3'te verilmiştir (Kadıoğlu, 2011; Özpak, 2011).

Erkek infertilitesi değerlendirilmesi için semen analizi öykü alınmasından sonra yapılan en önemli işlemdir. Bu işlem 4-6 hafta aralıklarla en az iki semen analizi yapılmasıdır. Bu işlem yapılmadan önce ki en önemli kural ise üç ila altı gün arasında herhangi bir şekilde cinsel ilişkisi yaşanmamasıdır ve daha sonra örnek verilmesidir. Örnek alındıktan sonra 1 saat içinde değerlendirme yapılmalıdır (Yumru ve ark., 2011).

Tablo 3 : Semen Analizi İçin En Düşük Referans Değerleri (%95 güvenlik aralıkları) (Kadıoğlu, 2011).

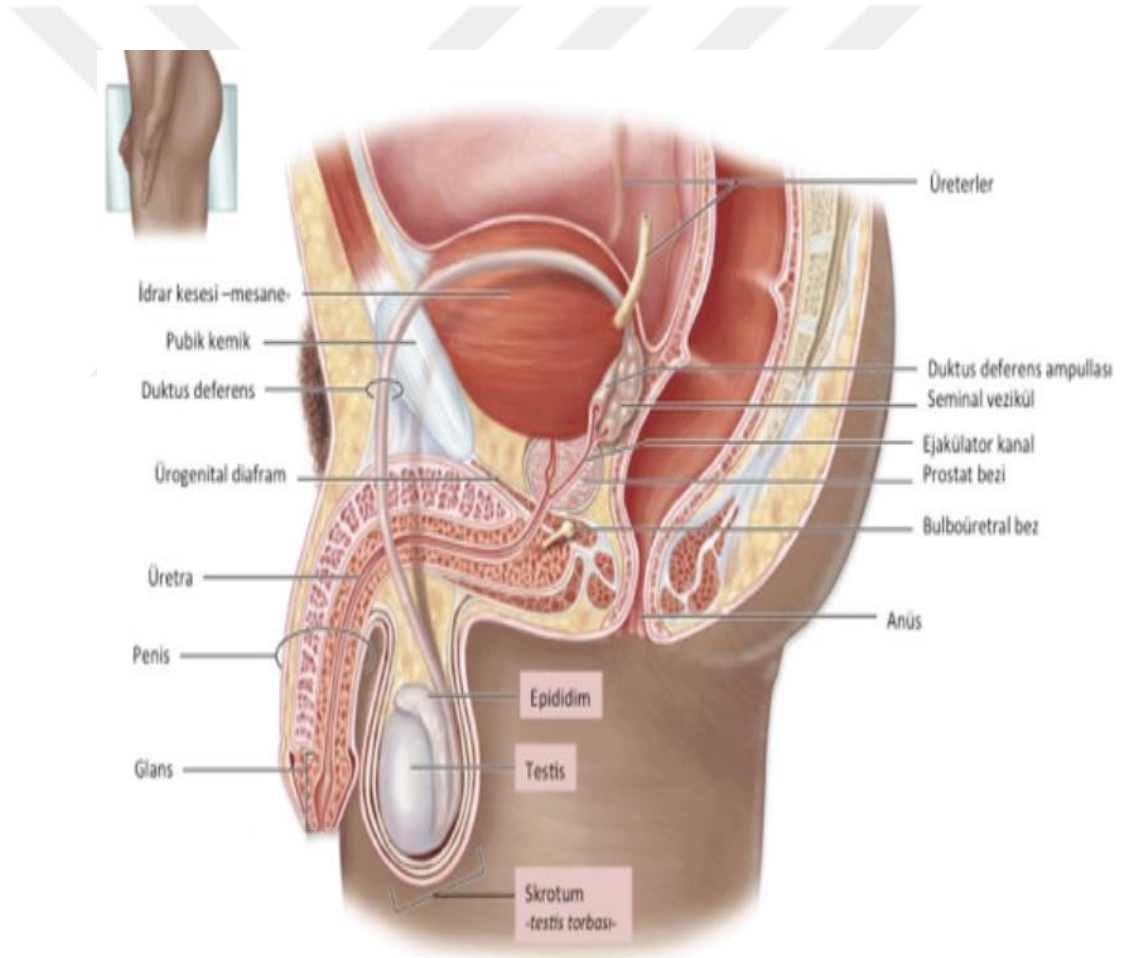
Parametreler	En düşük referans değer
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (106)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (106 / ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (106 per ml)	<1.0
MAR (Mixed antiglobulin reaction) testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakulat)	>2.4
Seminal fruktoz (µmol/ejakulat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakulat)	>20

Yapılan en az iki semen analizinde de sonuçların anormal çıkması durumunda ileri düzeyde androlojik araştırma yapılmalıdır. Bunun için anamnez, fiziki muayene, infertilite nedenlerinin araştırılması, gerek duyulması halinde genetik testler ve endokrin testler yapılması gerekir. Buna göre hastaya uygulanması gereken tedavi yöntemleri belirlenebilir (Yumru ve ark., 2011).

2.5. ERKEK ÜREME SİSTEMİ ANATOMİSİ

Genital organlar iç ve dış genital organlar olmak üzere 2 ye ayrılır. Genital bezler üreme hücrelerini hazırlarken, bu üreme hücrelerini ileten yollara iç genital organlar denir. Çiftleşme ile iki cinse ait üreme hücrelerinin

birleşmesini sağlayan organlara ise dış genital organlar denir. İnsan üremesindeki rolü için benzersiz olan bir gamet, 23 kromozom taşıyan vücut hücrelerindeki sayının yarısı olan özel bir seks hücresidir. Döllenmede, sperm (veya spermatozoon) adı verilen bir erkek gametteki kromozomlar, oosit adı verilen bir kadın gametindeki kromozomlarla birleşir. Erkek üreme sisteminin işlevi sperm üretmek ve kadın üreme sistemine aktarmaktır. Eşleştirilmiş testisler, erkek üreme fizyolojisini destekleyen hormonlar olan sperm ve androjenleri ürettikleri için bu süreçte çok önemli bir bileşendir. İnsanlarda en önemli erkek androjen testosterondur. Çeşitli aksesuar organlar ve kanallar sperm olgunlaşması sürecine yardımcı olur ve sperm ve diğer seminal bileşenleri penise taşır, bu da spermi kadın üreme sistemine iletir (Şekil 2).



Şekil 2: Erkek Üreme Sistemi. Erkek üreme sisteminin yapıları arasında testisler, epididimitler, penis ve meni üreten ve taşıyan kanallar ve bezler bulunur. Sperm, skrotumdan spermatik kordda paketlenmiş olan ductus

deferens'den çıkar. Seminal veziküller ve prostat bezi, sperm oluşturmak için spermlere sıvı ekler

(Anonim. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/27-1-anatomy-and-physiology-of-the-male-reproductive-system/>).

2.5.1. Erkek İç Genital Organları

Testis

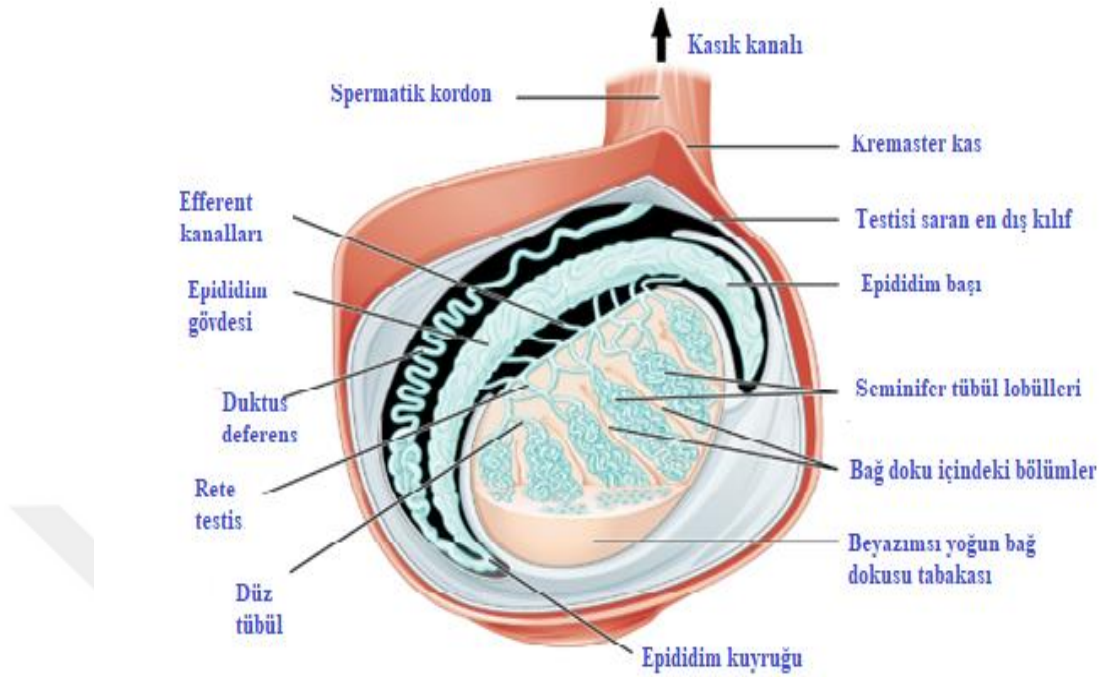
Hem sperm hem de testosteron gibi androjenler üretirler ve erkeğin üreme ömrü boyunca aktiftirler. Eşleştirilmiş ovaller, testislerin her biri yaklaşık 4-5 cm uzunluğundadır ve skrotum içinde yer alır. İki ayrı koruyucu bağ dokusu tabakası ile çevrilidir (Şekil 3). Dış tunika vaginalis, hem parietal hem de ince bir viseral tabakaya sahip seröz bir zarıdır. Tunica vaginalis'in altında, testisin kendisini kaplayan sert, beyaz, yoğun bir bağ dokusu tabakası olan tunica albuginea bulunur. Tunica albuginea sadece testisin dışını kaplamakla kalmaz, aynı zamanda testi lobül adı verilen 300 ila 400 yapıya bölen septa oluşturmak için de istila eder. Lobüllerde sperm seminifer tübül adı verilen yapılarda gelişir. Erkek bir fetüsün gelişim döneminin yedinci ayında, her testis skrotal boşluğa inmek için karın kaslarından geçer. Buna “testisin inişi” denir. Kriptorşidizm, testislerden biri veya her ikisi doğumdan önce skrotuma

inmediğinde

kullanılan

klirik

terimdir.



Şekil 3: Testisin Anatomisi. Bu sagittal görünüm sperm üretim bölgesi seminifer tübülleri gösterir. Oluşturulan sperm olgunlaştıkları epididime aktarılır. Duktus deferens yoluyla bir boşalma sırasında epididimden ayrılırlar.

Epididim

Seminifer tübüllerin lümeninden, hareketsiz sperm testis sıvısı ile çevrelenir ve yeni oluşan spermin olgunlaşmaya devam ettiği testise bağlı sarmal bir tüp olan epididime taşınır (Şekil 2). Epididim sıkıca sarılmış durumunda fazla yer almasa da, düzeltilmesiyle yaklaşık 6 m (20 feet) uzunluğundadır. Spermin epididim bobinlerinden geçmesi ortalama 12 gün sürer, insanlarda kaydedilen en kısa geçiş süresi bir gündür. Sperm epididimisin başına girer ve ağırlıklı olarak epididimal tüpleri kaplayan düz kasların kasılmasıyla hareket eder. Epididim boyunca hareket ettikçe, sperm daha da olgunlaşır ve kendi güçleri altında hareket etme yeteneği kazanır. Dişi üreme sisteminin içine girdikten sonra, bu yeteneği bağımsız olarak döllenmemiş yumurtaya doğru hareket etmek için

kullanılır. Daha olgun olan sperm daha sonra boşalma gerçekleşene kadar epididim kuyruğunda (son bölüm) saklanır.

Ductus Deferens (Vas deferens, Sperma kanalı)

Duktus deferens, skrotumun içinde bağ dokusu, kan damarları ve sinirlerle birlikte spermatik kord adı verilen bir yapıya sarılmış kalın, kaslı bir tüptür. 40-50 cm uzunluğundadır. Görevi, spermiumların iletilmesidir. Duktus deferens, skrotum içinde fiziksel olarak erişilebilir olduğundan, sperm iletimini kesmek için cerrahi sterilizasyon, duktus (vas) deferensin küçük bir bölümünü kesip kapatarak gerçekleştirilebilir. Bu işleme vazektomi denir ve erkek doğum kontrolünün etkili bir şeklidir. Her bir epididimden, her duktus deferens , karın duvarındaki kasık kanalı yoluyla karın boşluğuna doğru uzanır . Buradan duktus deferens pelvik boşluğun arkasından devam eder ve ampulla adı verilen bir bölgede genişlediği mesanenin arkasından sona erer. Ampulla, spermiumların depolanma yeridir.

Ejakülatör kanallar (Ductus Ejakulatorius)

Ejakülatuar kanal, prostat bezinde başlayan ve üretrada biten 2 santimetre uzunluğunda bir tüptür. Toplamda, erkek vücudunda iki vardır ve bunlar idrar kesesinin arkasında ve biraz altındadır. Tüplerin iç astarı, bağ dokusu ve iki kas tabakası ile çevrilidir. Seminal veziküllerin tüpleriyle birlikte üretranın prostat kısmına boşalırlar. Orada iki tüp arasındaki ayırıcı duvar incelir ve sonunda tamamen kaybolur. Boşalma kanalının ana işlevi, semeni vas deferens'ten üretraya taşımaktır ([https://encyclopedia.medicinfo.nl/spuitbuisje-\(ductus-ejaculatorius\)](https://encyclopedia.medicinfo.nl/spuitbuisje-(ductus-ejaculatorius))).

Üretra

İdrarı mesaneden vücut dışına taşıyan tüptür. Orgazm sırasında semen üretra yoluyla vücut dışına atılır.

Funiculus Spermaticus (Sperma kordonu)

Testislerin inişi sırasında beraberinde getirdikleri damarlar, sinirler ve ductus deferens kasık kanalının karın boşluğuna açılan deliğinde bir araya gelerek 20-25 cm uzunluğuunda sprema kordununu oluşturur.

Vesicula Seminalis (Seminal Veziküller)

Seminal veziküller, erkeklerde mesanenin altında ve prostata girdikleri vas deferensin sonunda yer alan bir çift bezdir. Divertikül adı da verilen, kıvrımlı ve katlanmış bir tüptür. Tüpün alt kısmı, bir boşalma kanalı oluşturmak için vücudun o tarafındaki vas deferens ile birleşen boşaltım kanalı adı verilen düz bir tüp olarak sona erer. Ejakülatuar kanallar ayrı ayrı prostat üretra verumontanuma açılmadan önce prostat bezinden geçer. Veziküller 5-10 cm boyutlarında, 3-5cm çapında ve yaklaşık 13ml hacime sahiptir. Sperm ejakülasyonda duktus deferens ampullasından geçerken, bunlar ilişkili seminal vezikülden gelen sıvıyla karışır. Eşleştirilmiş seminal veziküller, meni hacminin yaklaşık yüzde 60'ına katkıda bulunan bezlerdir. Seminal vezikül sıvısı büyük miktarlarda fruktoz içerir ve bu, sperm mitokondrileri tarafından dişi üreme yolunda harekete izin vermek için ATP üretmek için kullanılır.

Prostat Bezi

Merkezi konumdaki prostat bezi, prostatik üretrayı (idrar yolunun prostat içinde çalışan kısmı) çevreleyen mesanenin tabanında rektumun önünde bulunur. Bir ceviz büyüklüğünde, prostat hem kas hem de glandüler dokulardan oluşur, Prostat süt gibi beyaz renkte ve boşalma sırasında spermi destekleyen ve koruyan, enzimler, proteinler ve diğer kimyasalları içeren bir sıvı salgılar bu da boşalmayı takiben semeni pıhtılaştırır ve sonra döllemeyi düzeltir. Spermanın geçici olarak kalınlaşması, spermin seminal vezikül salgıları tarafından sağlanan fruktozu kullanması için zaman sağlayarak dişi üreme sisteminde tutmaya yardımcı olur.

Cowper Bezi (Bulbourethral Bez)

Bulbourethral veya Cowper bezleri, prostat bezinin altında üretranın tarafında bulunan bezelye boyutunda yapılardır. Bu bezler üretra içine doğruca boşalan açık, kaygan,alkalik bir sıvı üretir. Bu sıvı idrar yaptıktan sonra üretrada kalan idrar asidini nötralize eder ve üretrayı meni akışına hazırlamak için boşalma öncesi, cinsel uyarılma ile üretraya girer.

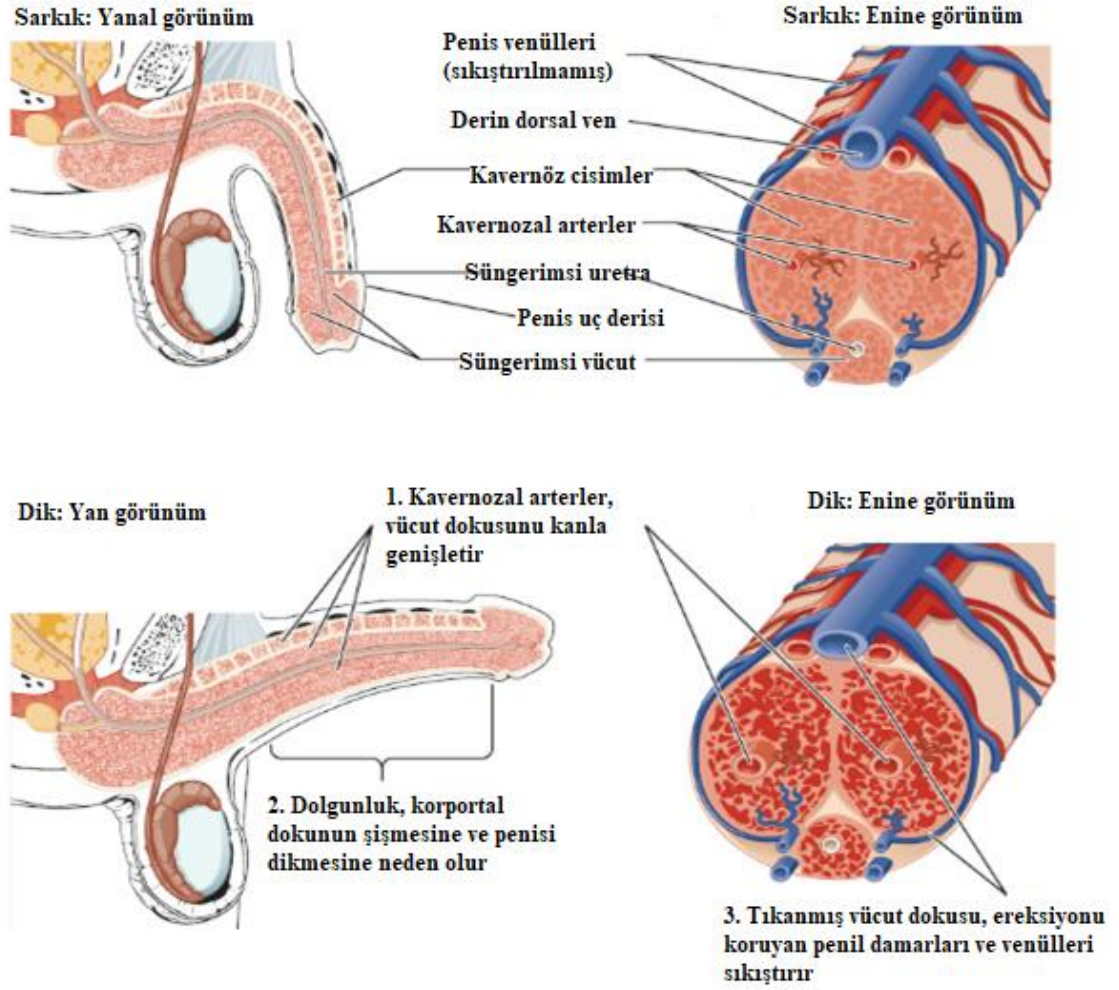
2.5.2. Erkek Dış Genital Organları

Skrotum

Testisler, penisin arkasındaki vücuttan uzanan skrotum adı verilen deri kaplı, yüksek pigmentli, kaslı bir torbada bulunur. Bu konum, testislerde meydana gelen ve testisler çekirdek vücut sıcaklığının 2 ila 4 ° C altında tutulduğunda daha verimli ilerleyen sperm üretiminde önemlidir.

Penis

Penis,birleşme erkek organı (cinsel birleşme) 'dır. İdrar yapma gibi cinsel olmayan eylemler ve cinsel uyarılma ile turgid ve çubuk benzeri için sarkıktır. Dikildiğinde, organın sertliği vajinaya nüfuz etmesini ve meni kadın üreme sistemine bırakmasını sağlar.



Şekil 4: Penisin Kesit Anatomisi. Üç erektil doku kolonu, penis hacminin çoğunu oluşturur.

Penisin mili üretrayı çevreler (Şekil 4). Şaft, şaftın uzunluğunu kapsayan üç kolon benzeri erektil doku odasından oluşur. İki büyük yan odadan her birine corpus cavernosum (çoğul = corpora cavernosa) denir. Birlikte, bunlar penisin büyük kısmını oluşturur. Korpus spongiosum dik penis üzerinde yükseltilmiş sırt olarak hissedilebilir, süngerimsi veya penil, üretra çevreleyen küçük bir haznedir. Penis başı olarak adlandırılan penisin ucu, sinir uçlarının yüksek konsantrasyonuna sahiptir, bu da boşalma olasılığını etkileyen çok hassas bir cilde neden olur. Şafttan gelen cilt glansın üzerine uzanır ve prepus (veya sünnet derisi) adı verilen bir yaka oluşturur. Sünnet derisi ayrıca yoğun bir sinir uçları konsantrasyonu içerir ve glans penisinin hassas cildini hem yağlar hem de korur.

2.6. SPERMATOGENEZİS

2.6.1. Sertoli Hücreleri

Gelişmekte olan sperm hücrelerinin tüm aşamalarını çevreleyen uzun dallanan sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri, tipik olarak epitel dokusunda bulunan sustentacular hücre veya sustentocyte adı verilen bir destek hücresidir. Sertoli hücreleri, sperm üretimini destekleyen ve mikrop hücrelerinin yaşayıp yaşamadığını kontrol edebilen sinyal molekülleri salgılar. Fiziksel olarak germ hücrelerinin etrafında seminifer tübüllerin periferik bazal membranından lümene uzanırlar. Bu sustentacular hücreler arasındaki sıkı kavşaklar, kan yoluyla taşınan maddelerin mikrop hücrelerine ulaşmasını önleyen ve aynı zamanda, mikrop hücrelerinin gelişmesine neden olan yüzey antijenlerinin kan dolaşımına kaçmasını ve otoimmün bir yanıtı yol açmasını önleyen kantesti bariyerini oluşturur (Anonim. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/27-1-anatomy-and-physiology-of-the-male-reproductive-system/>).

2.6.2. Germ Hücreleri

En az olgun hücreler olan spermatogonia (tekil = spermatogonium), bazal membranı tübül içinde sıralar. Spermatogoni, testisin kök hücreleridir, bu da yetişkinlik boyunca çeşitli farklı hücre tiplerine farklılaşabildikleri anlamına gelir. Spermatogoni, birincil ve ikincil spermatositleri, daha sonra nihayet oluşan spermi üreten spermatidleri üretmek için bölünür. Sperm üretimi spermatogoniumlarla başlar ve sonucuna spermatogenez süreç denir.

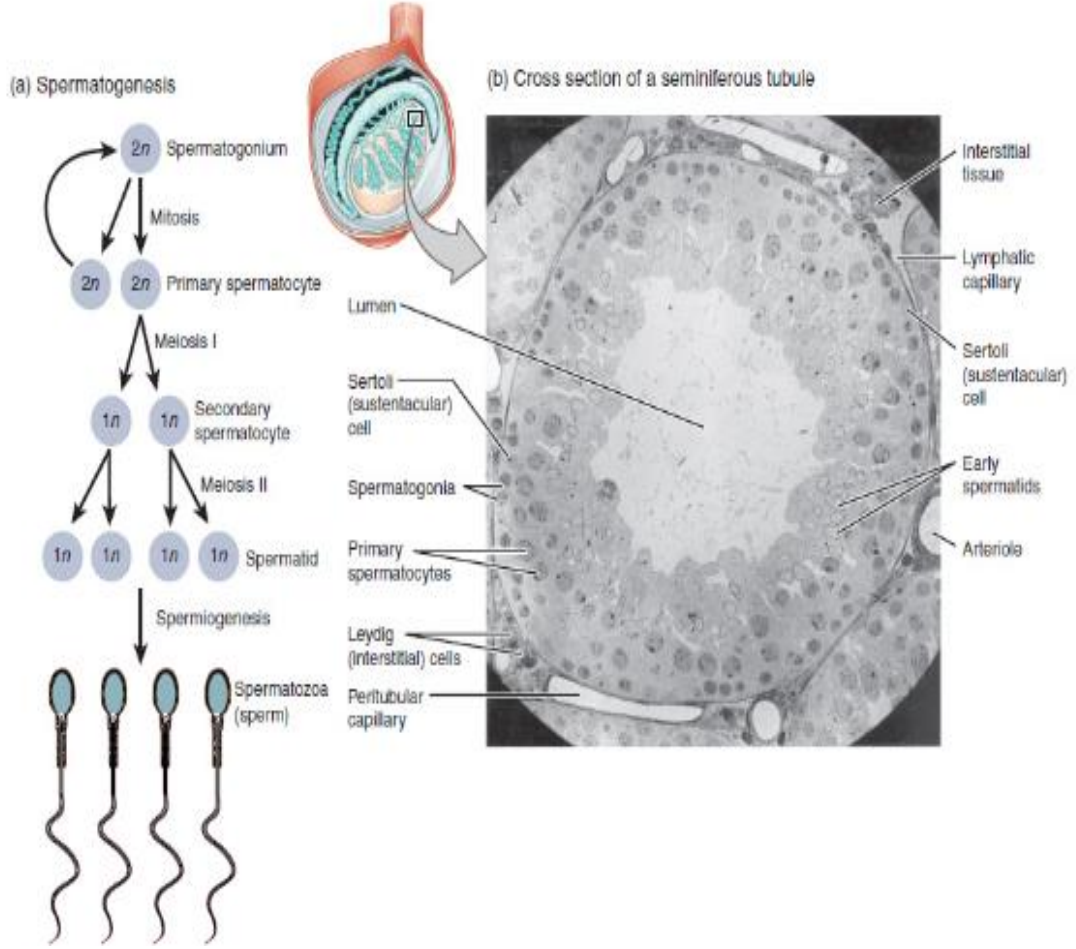
2.6.3. Spermatogenezis

Spermatogenez, her testisin hacmini oluşturan seminifer tübüllerde meydana gelir. Süreç ergenlik döneminde başlar, daha sonra sperm bir erkeğin hayatı boyunca sürekli olarak üretilir. Spermatogoniden şekillendirilmiş spermlere kadar bir üretim döngüsü yaklaşık 64 gün sürer. Bu zamanlama seminifer tübüller arasında senkronize olmasa da, yaklaşık 16 günde bir yeni bir döngü başlar. Sperm sayıları, bir erkeğin ürettiği toplam sperm sayısı, 35

yaşından sonra yavaşça azalır ve bazı çalışmalar sigara içmenin yaştan bağımsız olarak sperm sayısını azaltabileceğini göstermektedir

(Anonim. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/27-1-anatomy-and-physiology-of-the-male-reproductive-system/>).

Spermatogenez süreci diploid spermatogoninin mitozu ile başlar (Şekil 5). Bu hücreler diploid ($2n$) olduğundan, her birinin babanın genetik materyalinin tam bir kopyası veya 46 kromozomu vardır. Bununla birlikte, olgun gametler haploid (n) olup, 23 kromozom içerir, yani spermatogoninin yavru hücrelerinin mayoz süreci boyunca ikinci bir hücresel bölünmeye tabi tutulması gerekir.



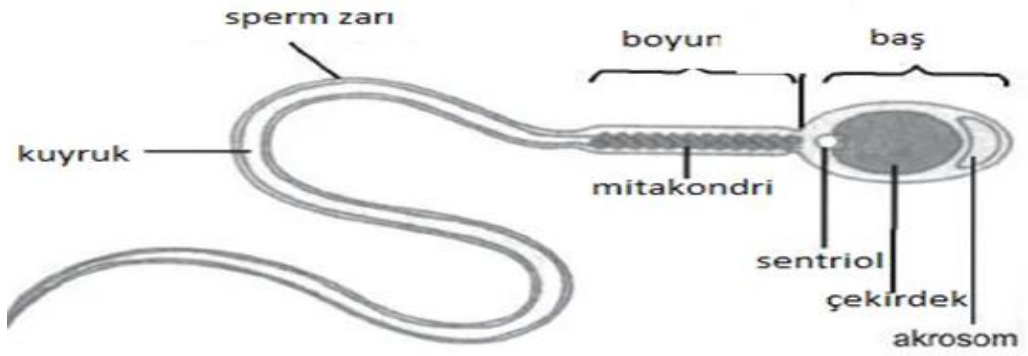
Şekil 5: Spermatogenez

Spermatogoni mitozundan iki özdeş diploid hücre ortaya çıkar. Bu hücrelerden biri spermatogonyum olarak kalır ve diğeri de spermatogenez sürecinin bir sonraki aşaması olan birincil spermatosit olur. Mitozda olduğu gibi, DNA birincil spermatositte çoğaltılır ve hücre, özdeş kromozomlara sahip iki hücre üretmek için hücre bölünmesine uğrar. Bunların her biri ikincil bir spermatositir. Şimdi, kromozom çiftlerini ayırarak ikincil spermatositlerin her ikisinde de ikinci bir hücre bölünmesi oluşur. Bu ikinci mayotik bölünme, kromozom sayısının sadece yarısına sahip toplam dört hücre ile sonuçlanır. Bu yeni hücrelerin her biri bir spermatittir. Haploid olmasına rağmen, erken spermatidler, yuvarlak şekil, merkezi çekirdek ve büyük miktarda sitoplazma ile spermatogenezin önceki aşamalarındaki hücrelere çok benzemektedir. Spermiyogenez adı verilen bu süreç, erken spermatidleri dönüştürerek

sitoplazmayı azaltır ve gerçek bir spermin parçalarının oluşumuna başlar. Germ hücresi oluşumunun (spermatozoa veya oluşan sperm) beşinci aşaması, tübülün lümene en yakın kısmında meydana gelen bu sürecin sonucudur. Sonunda, sperm lümen içine salınır ve testis içindeki bir dizi kanal boyunca sperm olgunlaşmasının bir sonraki adımı için epididim adı verilen bir yapıya doğru hareket ettirilir.

2.6.4. Oluşan Spermin Yapısı

Sperm vücuttaki çoğu hücreden daha küçüktür; aslında bir sperm hücresinin hacmi dişi gametinkinden 85.000 kat daha azdır. Her gün yaklaşık 100 ila 300 milyon sperm üretilirken, kadınlar genellikle vücuttaki çoğu hücre için geçerli olduğu gibi ayda sadece bir oosit yumurtlar, sperm hücrelerinin yapısı işlevleriyle konuşur. Sperm kendine özgü bir baş, orta parça ve kuyruk bölgesine sahiptir (Şekil 6). Spermin başı, çok az sitoplazmaya sahip son derece kompakt haploid çekirdeği içerir. Bu nitelikler spermin genel küçük boyutuna katkıda bulunur (kafa sadece 5 μm uzunluğunda). Akrozom adı verilen bir yapı, sperm hücresinin başının çoğunu, spermin döllenmeye katılması için önemli olan lizozomal enzimlerle dolu bir “kapak” olarak kapsar. Sıkı paketlenmiş mitokondri spermin orta kısmını doldurur. Bu mitokondriler tarafından üretilen ATP, boyundan ve orta parçadan sperm kuyruğuna uzanan ve tüm sperm hücresini hareket ettirmesini sağlayan flagelluma güç verecektir. Flagellumun merkezi ipliği, aksenel filaman, spermatogenezin son aşamaları sırasında olgunlaşan sperm hücresinin içindeki bir merkezden oluşur.



Şekil 6: Sperm Yapısı. Sperm hücreleri DNA içeren bir kafaya ayrılır; mitokondri içeren bir orta parça; ve hareketlilik sağlayan bir kuyruk. Akrozom ovaldir ve biraz düzleştirilmiştir.

İnfertilitenin temelinde yatan sebebin bulunabilmesi adına günümüzde semen analizi, sayı ve harekete ek olarak spermin şekil ve boyut olarak da değerlendirilmesini kapsayan sperm morfolojisine bakılıp ayrıntılı incelemeler yapılmaktadır. Sperm morfolojisi incelemesinde ışık veya elektron mikroskobu ya da değişik boyama teknikleriyle değerlendirme yapılmaktadır. Değerlendirmeleri sonucunda spermin normal ya da anormal olduğunu ortaya koyabilmek için bazı kriterlere ihtiyaç duyulmaktadır (Erdemir F, Fırat F, Gençten Y., 2011). Sperm morfolojisi ile alakalı 1980 ve 2010 yılları arasında WHO pek çok tanımlama yapmıştır. Kruger ve Menkveld ise Tygerberg kriterlerini tanımlamışlardır (Kruger ve ark., 1988). (Tablo 4).

Tablo 4: Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi

Baş	Uzunluk 5-6 mikron Genişlik 2.5-3.5 mikron
Akrozom	Başın %40-%70'ini oluşturmali
Orta parça	Genişlik 1 mikron Uzunluk 1.5 x baş uzunluğu
Kuyruk	Boyu yaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış Kırık içermeyen
Sitoplamik damlacık	Baş alanının %30-70'inden az Sadece orta parçaca lokalize

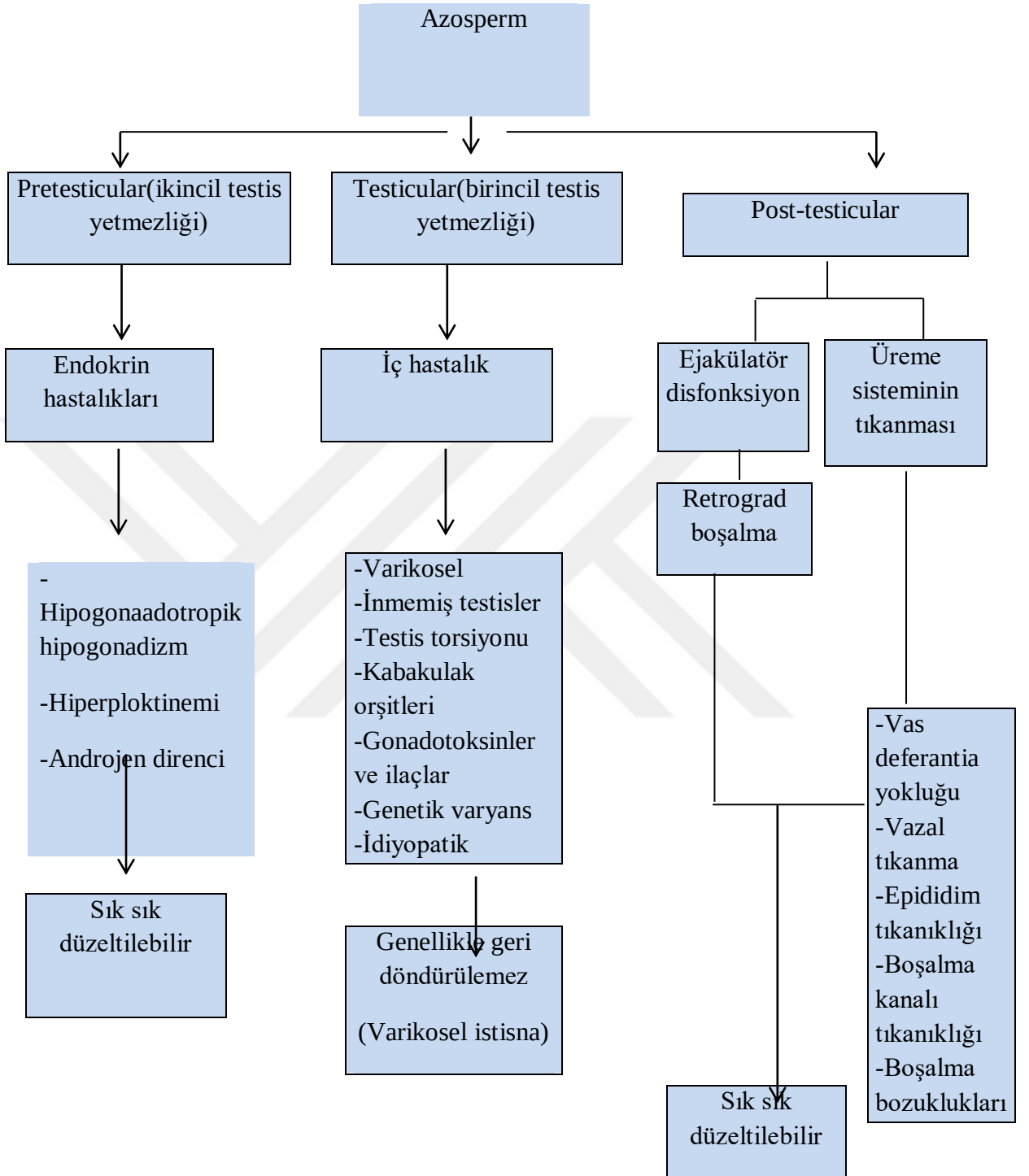
2.7. AZOSPERMİ

Ejakülatta spermin tam yokluğuna azospermi denir. Erkek kısırlığı vakalarının % 10-15'ini oluşturur ve genellikle erkek nüfusunun % 1'ini etkiler (Jarow ve ark., 2002; Jarwi ve ark., ?; Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI, 1989). Azospermi iki ana kategoriye ayrılır: genital kanal çıkış tıkanıklığı bulunan tıkayıcı azospermi (OA), spermin geçişini bloke eden tıkanıklığı olmayan ve testisin ejakülatta olgunlaşmış sperm üretmediği azotipte azospermi (NOA). Genetik faktörler azosperminin %21-29'unu oluşturmaktadır (Lee ve ark.,?). Azospermik vakaların % 12-41'i idiyopatik ve büyük olasılıkla bilinmeyen genetik faktörlerle ilişkilidir (Hernandez ve ark., 2001). Bir dizi gelişmiş tanı ve yardımcı üreme terapötik aracı kullanılarak, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının NOA ve OA için sırasıyla% 26-57 ve% 18-55 arasında olduğu bildirilmiştir (Ghazzawi ve ark., 1998; Verza S, Jr, Esteves SC., 2008; Aboulghar ve ark., 1997; Palermo ve ark., 1999; Schwarzer ve ark., 2003; Ghanem ve ark., 2005; Semiao-Francisco ve ark., 2010).

Azoospermi, farklı hastalık veya koşullardan kaynaklanabilir. Azoosperminin potansiyel nedenleri üç kategoriye ayrılabilir: pre-testiküler, testis ve post-testiküler. Testis öncesi azoospermide, testisler ve genital sistem normaldir, ancak hormonal sistem tarafından sperm üretmek için uygun şekilde uyarılmamaktadır. Testiküler azoospermide, testislerin kendileri anormal ve sperm üretemezler. Birlikte, pre-testiküler ve testiküler azoospermiye obstrüktif olmayan azoospermi denir. Post-testiküler azoospermide, obstrüktif azoospermi olarak da adlandırılır, sperm normal testisler tarafından üretilir, ancak genital sistemin tıkanması nedeniyle boşalma olmaz. Obstrüktif azoospermi, vazektomi yapan hekimler tarafından kasıtlı olarak indüklenir.

Ön testis azoospermisinde, her ikisi de beyinde bulunan hipotalamus ve / veya hipofiz bezindeki anormallikler, normal testislerin sperm yapmak için uyarılmasını önleyen hormonal bir dengesizliğe neden olur. Testiküler azoospermi, testislerin kendisinde sperm üretimi bozukluğu olduğunu ima eder. Bozukluk konjenital olabilir (yani, problem doğumdan itibaren mevcuttur) veya edinilebilir. Sperm üretimi tamamen yok olabilir veya sperm olgunlaşmasının erken veya geç evresinde durdurmayı gerektirebilir <https://www.med.unc.edu/urology/patientcare/adult-non-cancer/male-fertility/azoospermia/>). Azosperminin testis sonrası nedenleri ya sperm iletiminin engellenmesinden ya da ejakülatör fonksiyon bozukluğundan kaynaklanır (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male Reproduction and Urology. Fertil Steril. 2008 Nov; 90(5 Suppl):S121-4). Tablo 5 de azosperminin etiyolojileri, mekanizmaları ve prognozları gösterilmiştir.

Tablo 5: Azosperminin etiyolojileri, mekanizmaları ve prognozları



2.7.1. Pretestiküler nedenler

İkincil testis yetmezliği olarak da adlandırılan pretestiküler nedenler genellikle patolojik endokrin koşullardan kaynaklanır. Erkek subfertilitesinin nadir bir nedeni olmasına rağmen, infertil erkeklerin %3'üne kadar altta yatan bir endokrinopatiye sahip olacaktır (Sigman ve Jarow, 1997).

Hipogonadotropik hipogonadizm: Hipogonadotropik hipogonadizmin (HGH) tipik nedenleri Kallmann sendromu, hipofiz travması, hipofiz tümörleri ve anabolik steroid kullanımını içerir. HGH erkek infertilitesinin nadir bir nedenidir ve bozukluk konjenital veya edinsel olarak sınıflandırılabilir (Liu ve Handelsman, 2003). Kallmann sendromu HGH'nin doğuştan bir nedenidir ve orta hat kranial yapılarının malformasyonu ile ilişkilidir (Maya-Nunez ve ark., 1998). HGH'nin kazanılmış nedenleri arasında hipofiz tümörleri, hipofiz travması, panipopitüitarizm ve anabolik steroid kullanımı yer alır. Eksojen testosteron, hipotalamik-hipofiz gonadal (HPG) eksenini inhibe eder ve HPG ekseninin geri besleme döngüsü yoluyla gonadotropinleri inhibe ederek azoospermiye neden olur (Kim ve Schlegel, 2008). Anabolik steroidden aşırı eksojen androjenler, FSH seviyelerini baskılayarak ve intratestiküler testosteron seviyelerini baskılayarak spermatogenezi bozar (McLachlan ve ark., 2002). Şüpheli HGH'li hastaların ilk değerlendirmesi, bir hipofiz tümörünü ekarte etmek için bir hipofiz MRG içerebilir (Gilbaugh ve ark., 1994). Hipofiz tümörleri, anterior hipofizin lokal yıkımına neden olabilir. Serum prolaktin düzeyi ölçülmeli ve gonadotropin replasman tedavisine başlamadan önce hiperprolaktinemi ekarte edilmeli veya tedavi edilmelidir. Edinilmiş HGH hastalarında, normal spermatogenez genellikle eksojen gonadotropinler veya GnRH ile tedavi edilerek restore edilebilir (Cocuzza ve Agarwal, 2007).

Hiperprolaktinemi: Hiperprolaktinemi, aşırı prolaktin sekresyonunun neden olduğu bir HGH formudur (Burrows ve ark., 2002). Prolaktin fazlalığı GnRH'nin hipotalamik sekresyonunu inhibe eder ve üreme ve cinsel işlev bozukluğunun bir nedeni olarak rol oynar. Hiperprolaktinemi için infertil erkeklerin rutin taramasının yararlı olduğu gösterilmemiştir (Eggert-Kruse ve ark., 1991). Prolaktin erkeklerde ihmal edilebilir fizyolojik etkilere sahiptir ve ön hipofizde

üretir. Hiperprolaktinemi hem FSH hem de LH'yi bastırır ve ilaçlar, eşzamanlı tıbbi hastalıklar, trisiklik antidepresanlar, bazı antihipertansifler, stres veya hipofiz tümörlerine (makroadenom veya mikroadenom) neden olabilir; neden idiyopatik de olabilir (Siddiq ve Sigman, 2002). Hiperprolaktinemiye indükleyen en yaygın ilaçlar fenotiazinler, imipramin, metildopa ve reserpindir (Sussman ve ark., 2008). Hiperprolaktineminin en yaygın nedenleri prolaktin salgılayan mikroadenomlardır (<10 mm) ve prolaktin salgılayan makroadenomlardır (>10 mm). Prolaktinomların belirtileri infertilite, depresif libido, galaktore, baş ağrısı, yorgunluk ve erektil disfonksiyonu içerir. Prolaktin salgılayan hipofiz adenomları olan hastalarda, gonadotropin ve testosteron seviyeleri yaygın olarak bastırılırken, prolaktin seviyeleri yükselir. Prolaktin yükselme seviyesi, patolojinin türüne dair fikir verir. Prolaktin seviyeleri 250 ng / ml'den büyük, 100 ve 250 ng/ml arasında, 25 ve 100 ng/ml arasında ve 0 ve 25 ng/ml arasında en sık sırasıyla makroadenom, mikroadenom, hipofiz SAP sıkıştırma ve normal seviyelere karşılık gelir (Burrows ve ark., 2002).

Androjen direnci: Androjen direnci yaklaşık 1: 60.000 doğumda ortaya çıkar. X kromozomunda (Xq11-q12) (Bhasin ve ark., 1998) bulunan androjen reseptör geninde 300'den fazla mutasyon bulunmuştur. 8 ekzonunda lokalize iyi bilinen mutasyonlara ek olarak, gen promotör bölgesindeki mutasyonlar da bildirilmiştir (Mak ve Jarwi, 1996). Birçok mutasyon bulunduğu için, sendrom klinik olarak değişkendir ve fenotipik dışılardan (tam androjen duyarsızlığı) normalde virilize edilmiş fakat infertil erkeklere (kısmi ve minimum androjen duyarlılığı) kadar değişmektedir. Kusurun yoğunluğuna bağlı olarak, serum testosteron seviyeleri düşük, normal veya yüksek olabilir. Sperm sayısı düşük olan veya hiç olmayan erkeklerin% 40'ının birincil neden olarak hafif androjen reseptörü anormallikleri olabileceği bildirilmiştir (Aiman ve ark., 1979).

Androjen reseptörü geni üzerine yapılan modern genetik araştırma, erkek kısırlığı ile ilginç yeni klinik korelasyonlara yol açmıştır. Androjen reseptörü geninin 8 ekzonu vardır ve CAG nükleotidinin kritik bir bölgesinin, genellikle 15-30 sayı olarak tekrar ettiği ekson 1'de bulunabileceği bilinmektedir (Kupker ve ark., 1999). Bu tekrar bölgesinin uzatılması, 30 yaş civarında başlayan

nörodejeneratif bir hastalık olan spinal ve bulbar kas atrofisine (Kennedy hastalığı) yol açar; bu bozukluk, testiküler atrofiden kısırılık dahil olmak üzere kas krampı ve atrofiyi içerir. Bu CAG tekrar bölgesinde ince değişiklikler de idiyopatik infertilite bazı vakaların nedeni olabileceğini önermek için yeterli kanıt artık yoktur. Yakın zamanda normal idiyopatik azoospermili virilize edilmiş erkeklerde normal CAG nükleotid tekrarlarından daha uzun tespit edilmiştir (Yoshida ve ark., 1999). Ayrıca, azospermik hastalarda testiküler histolojinin androjen reseptör geninin poliglutamin uzunluğu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Casella ve ark., 2003).

2.7.2. Testis etiyolojisi

Yaygın olarak primer testis yetersizliği olarak adlandırılan testiküler etiyoloji, spermatogenezin kendine özgü bozukluklarıdır. Direkt testiküler patoloji varikozel kaynaklı testiküler hasar, inmemiş testisler, testis torsiyonu, kabakulak orşiti, ilaçlardan gonadotoksik etkiler, genetik anormallikler ve idiyopatik nedenlerden kaynaklanabilir. Yaygın olarak obstrüktif olmayan azospermi olarak adlandırılan azospermi ile birlikte primer testiküler yetmezlik en iyi sonuçta intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için testiküler spermin toplanmasıyla yönetilir. Bununla birlikte, mümkün olduğunda kesin etiyoloji belirlenmeli ve tedavi sperm alımının başarı oranını artırabilir.

Varikozel: Halen, literatürde varikosellerin testis üzerinde progresif zararlı bir etki yarattığına dair inandırıcı kanıtlar vardır ve varikosektominin testis fonksiyonunda ilerleyici düşüşü önlediği ve hasarı tersine çevirdiği gösterilmiştir (Marmar ve Benoff, 2006, Cocuzza ve ark., 2008a, b). Ek olarak, hamilelik oranlarını ve yardımcı üreme teknolojisi (ART) sonuçlarını iyileştirmek için varikozel onarımı belgelenmiştir (Esteves ve ark., 2010; Agarwal ve ark., 2007; Marmar ve ark., 2007). Bununla birlikte, varikozel tedavisinden yararlanacak olan varikozeli olan bireylerin belirlenmesi, androloglar için bir zorluk olmaya devam etmektedir.

Bir varikozel ile birlikte azospermi, erkeklerin %5 ila %10'unda (Czaplicki ve ark., 1979; Matthews ve ark., 1998; Kim ve ark., 1999) görülür. Tulloch, 1955

yılında, öncelikle azospermik bir hastada varikoselektomiden sonra ejakülat ve daha sonra ki gebelikte spermin iyileşmesini rapor eden ilk kişiydi. O zaman, bu bulgular varikozel tedavisine dikkat çekti. Bununla birlikte, varikozelin neden yıkıcı bir etkiye sahip olabileceği hala bilinmemektedir, bu da bazı hastalarda azospermiye yol açarken, varikozel ile başvuran erkeklerin %75'inde normal meni bulguları vardır (World Health Organization., 1992; Kadioglu ve ark., 2001). Varikozelin testis fonksiyonuna uyguladığı geniş etki yelpazesi, klinik varikozel ile başvuran erkekleri değerlendirmek için şu anda yeterli tanı yöntemi olmadığını göstermektedir.

Vakaların %21-55'inde varikozel onarımını takiben azospermik erkeklerin ejakülatında sperm bulunabilmesine rağmen, spontan gebelikler son derece nadirdir (Matthews ve ark., 1998; Kim ve ark., 1999, Kadioglu ve ark., 2001, Cocuzza ve ark., 2009). Bununla birlikte, bu popülasyondaki varikoselektomi, ICSI için boşalma yoluyla sperm sağlayarak, TESE gibi daha invaziv prosedürlere ihtiyaç duyulmasını önleyebilir (Schlegel ve Goldstein, 2011). Ayrıca, testiküler biyopsi veya mikrocerrahi TESE (Schlegel, 2004; Aboulghar ve ark., 1997) tarafından sağlanan sperm ile karşılaştırıldığında taze hareketli ejaküle sperm kullanıldığında gübreleme kabiliyeti ve ICSI başarı oranları üstün olarak tanımlanmıştır. Azospermik hastalar, geçici olarak spermatogenez indüksiyonu ile sonuçlanan aralıklı sperm üretimi yaşayabilirler. Bu nedenle, cerrahi sonrası ilk iyileşmeden sonra semen dondurarak saklama şiddetle önerilir (Pasqualotto ve ark., 2003). Varikozeli olan infertil erkeklerde genetik etiyolojinin bulunması, bu hastalarda uygun bir tanı sağlamak ve moleküler / genetik bir temelden dolayı testis fonksiyonunu iyileştirmede başarısız olabilecek gereksiz prosedürlere kaçınmak için Yq mikrolelesyon taramasının yapılması gerektiğini düşündürmektedir (Moro ve ark., 2000).

İnmemiş testisler: İnmemiş testisler erkeklerde en sık görülen genital malformasyondur ve yenidoğanların% 2,7'sinde ve 1 yaşındakilerin% 0,8'inde görülür (Mathers ve ark., 2009). Kriptorşid testisleri inmemiş testislerden ayırmak önemlidir, hiperaktif kremasterik kasları içeren bir durum, testislerin kasık kanalında veya yüksek skrotumda periyodik olarak bulunmasına neden

olur. Kriptorşidizme bağlı subfertilite için önerilen mekanizmalar testis disgenezi, bozulmuş endokrin eksen, immünolojik hasar ve tıkanıklığı içerir (Grasso ve ark., 1991). Erken tedavi potansiyel olarak infertilite riskini en aza indirebilir ve başarı testisin başlangıç pozisyonuna bağlıdır (Pettersson ve ark., 2007). Bu durum, çocuğun ilk doğum gününden önce hormonal ve/veya cerrahi olarak tedavi edilmelidir; ayrıca, 13 yaşından önce tedavi malignite riskini azaltmadığı için ebeveynler risk hakkında iyi bilgilendirilmelidir (Docimo ve ark., 2000). Tek taraflı inmemiş testis öyküsü olan erkeklerin çoğunluğu babalık yeteneğine sahip olsa da, orşiopekside testis hacmi ve yaşı, kriptorşidizm öyküsü olan erkeklerde doğurganlık potansiyelinin ve sperm alımının bağımsız belirleyicileridir (Grasso ve ark., 1991; Raman ve Schlegel, 2003). İnmemiş testisler için tedaviden sonra azospermi insidansı sırasıyla tek taraflı ve bilateral kriptorşidizmde yaklaşık %13 ve 34'tür. Bununla birlikte, azospermi insidansının %30 ve 80'i sırasıyla tedavi edilmemiş tek taraflı ve bilateral inmemiş testislerden kaynaklanır (Grasso ve ark., 1991).

Testis torsiyonu: Testis torsiyonu 25 yaşından önce yaklaşık 1: 4.000 erkekte görülür (Williamson, 1976). Bu hastalık acil cerrahi keşif yapılmasını gerektirir ve operasyon dışı yönetimin riskleri iyi belgelenmiştir (Watkin ve ark., 1996). Testiküler koruma genellikle semptomların başlamasından sonraki 6 saat içinde cerrahi araştırma yapılırsa sağlanır. Süreye ek olarak, rotasyon derecesi gibi diğer faktörler testis kurtarma ile ilişkili bulunmuştur (Heindel ve ark., 1990, Arap ve ark., 2000). Testis torsiyonunun en önemli komplikasyonu testis kaybıdır, bu da doğurganlığın bozulmasına neden olabilir (Visser ve Heyns, 2003). Tek taraflı testis torsiyonundan sonra şiddetli oligospermi veya azospermi nadirdir; ancak, kontralateral testis inmemiş bir testis için orchiopexy gibi daha önce herhangi bir anormallik yaşamışsa bu koşullar mümkündür (Daehlin ve ark., 1996). Endokrin testis fonksiyonunun kayıp gonad durumunda normal olması beklenir. Buna karşılık, ekzokrin testis fonksiyonu (spermatogenez) sıklıkla etkilenir (Cosentino ve ark., 1985; Lievano ve ark., 1999). Testiküler torsiyonlu hastalarda, spermatogenezde azalma ile sonuçlanan bilateral anormallikler var gibi görünmektedir (Krärup, 1978). Bu anormalliklerin, hemato-testis bariyerinin yırtılmasından sonra ortaya çıkan, antisperm

antikorlarının oluşumuna yol açan veya testiste reperfüzyonun neden olduğu hasarın bir sonucu olarak meydana gelen bir otoimmün işlem mi kaynaklandığı belirsizdir (Lievano ve ark., 1999; Becker ve ark., 1997; Arap ve ark., 2007). Kontralateral testis biyopsileri torsiyon sırasındaki vakaların% 88'inde anormaldir; bu nedenle, bazı anormalliklerin burulma başlangıcından önce bile mevcut olduğuna inanılmaktadır (Visser ve Heyns, 2003).

Kabakulak orşitleri: Kabakulak virüsüne karşı bir aşı yapılmasından bu yana, kabakulak ve komplikasyonları için risk azaltılmıştır. Öte yandan, kabakulak orşitinde pubertal ve postpubertal erkekler arasında bir artış olduğu için, skrotal şişlik vakalarında hala şüphelenilmelidir (Davis ve ark., 2010). Pubertal kabakulak orşiti hastaların% 67'sinde tek taraflı,% 33'ünde bilateral olarak görülür. Testis atrofisi bilateral olarak etkilenenlerin% 36'sında, kısırlık sadece% 13'ünde görülür (Werner, 1950a, b). Bununla birlikte, prepubertal kabakulak orşitinin gelecekteki doğurganlık üzerinde çok az etkisi vardır (Werner, 1950a). Bu nedenle ürologların / andrologların bu durumun tanı, tedavi ve komplikasyonlarına aşina olması önemlidir.

Gonadotoksinler ve ilaçlar: İlaçlar, dört ayrı mekanizma yoluyla erkek fertilitesine zarar verebilir: 1) doğrudan gonadotoksik etkiler, 2) hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) ekseninde değişiklik, 3) boşalma disfonksiyonu ve 4) libidoda azalma. Bu arada gonadotoksinler, testislerdeki germ hücrelerine doğrudan hasar vererek veya Sertoli hücrelerinin işlevine müdahale ederek spermatogenezi etkiler (Nudell ve ark., 2002). Bu nedenle, reçeteli, reçetesiz, yasadışı ve nutrasötik ilaçlar dahil olmak üzere ayrıntılı bir ilaç öyküsü alınmalıdır. Bu ilaçların büyük çoğunluğu azospermiye neden olamaz, ancak eksojen androjenler, antiandrojenler, kemoterapi ajanları veya radyasyon tedavisi kullanan veya uygulanan hastalara ve ayrıca pestisitler, fumiganlar, böcek öldürücüler ve çözücüler gibi çevresel toksinlere maruz kalan hastalara özellikle dikkat edilmelidir.

Genetik varyans: Kromozomal bozukluklar infertillerde fertil(verimli) nüfusa kıyasla daha yüksek bir frekansta görülür (Tournaye ve ark., 1996). Bu

kromozom değişiklikleri şu anda azoospermik erkeklerin %15'inde ve oligospermik erkeklerin %5'inde teşhis edilebilir ve infertil erkeklerde en sık görülen genetik kusurlardan birini temsil eder (Pandiy n N, Jequier, 1996; Peschka ve ark., 1999). Bu nedenle, bu erkeklerin spermlerinin ART için kullanılmasından önce genetik testlere tabi tutulması önemlidir.

- a. Klinefelter Sendromu: Klinefelter sendromu (KS), infertilite tedavisi isteyen erkeklerde genel erkek nüfusa göre 45 kat daha yaygındır ve erkek infertilitesinde gözlenen en yaygın sayısal kromozom anomalisidir ve 1:500 ile 1:1000 erkek arasında görülür (Van Assche ve ark., 1999). KS, X kromozomu polizomisi ile karakterizedir ve X dizomisi en yaygın varyanttır (47,XXY). KS'li erkeklerin yüzde doksanında mozaik olmayan X kromozomu polisomları vardır (Graham ve ark., 1988). İleri maternal ve baba yaşı artmış KS riski ile ilişkilendirilmiştir ve KS'li erkeklerin babalarında cinsiyet kromozomu disomik sperm sayısı (24,XY) baba yaşı arttıkça belirgin şekilde artmaktadır (Lowe ve ark., 2001; Eskenazi ve ark., 2002).

KS'li erkeklerin çok çeşitli fenotip ve sosyoekonomik geçmişe sahip oldukları ve bu farklılıkların gecikmiş teşhislerin ana nedeni olduğu bilinmektedir. Ergenlikten  nce KS'li ergenlerin sadece %10'unun teşhis edildiği tahmin edilmektedir (Lanfranco ve ark., 2004). KS'li erkeklerin klasik fenotipi, uzun boylu eunukoid vücut oranlarıyla karakterize edilir; düşük testosteron seviyeleri; ince yüz ve kasık kılı; küçük, sert testisler; bir mikropenis; kısırlık; ve hafif ila orta dereceli bilişsel açıklar (Paduch ve ark., 2009). Etkilenen erkekler de diabetes mellitus, varis ve venöz bronşit hastalığına yatkındır ve meme kanseri ve Hodgkin olmayan lenfoma nedeniyle mortalite oranları daha yüksektir (Swerdlow ve ark., 2005). Hastalar genellikle azospermiktir ancak testis sperminin ekstraksiyonu (TESE) KS erkeklerinin yaklaşık %69'unda spermatozoayı ortaya çıkarabilir (Schiff ve ark., 2005). Normal karyotipleri olan çocukların canlı doğumları bildirilmiştir (Bourne ve ark., 1997; Hinney ve ark., 1997). Mozaik varyantı

daha az şiddetlidir ve bu varyantlı hastalar normal testis ebadı, tam spermatogenez ve ejaküle edilmiş sperm varlığı ile ortaya çıkabilir.

- b. 47, XYY Sendromu: Bu sendrom, mayoz sırasında baba tarafından nondisjunction'a (Birinci mayotik bölünme esnasında homolog kromozom çiftinin birbirinden ayrılmaması) neden olduğu YY sperm ile yaklaşık olarak 1:1000 oranında meydana gelir (Turek ve Pera, 2002). Bu hastalar tipik olarak uzun boylu bir boyuta sahiptir, azalmış zekâ ve antisosyal davranış özellikleri gösterirler. Bu sendromlu erkeklerin çoğu azospermik veya ciddi oligospermiktir ve testis biyopsi bulguları sadece Sertoli hücresinden olgunlaşma durdurma paternlerine kadar değişiklik gösterir (Wong ve ark., 2008). KS'li hastaların aksine, serum testosteron düzeyleri bu hastalarda normaldir.
- c. XX Erkek Sendromu: Etiyolojik olarak, bu hastaların%90'nı, yaklaşık 1: 20.000' te meydana gelen, SRY'nin (cinsiyet belirleyici bölge) Y'den X kromozomuna translokasyonu ile ortaya çıkar. Diğer%10'da, translokasyon otozomal bir kromozomda meydana gelir veya birey SRY negatiftir (Van der Auwera ve ark., 1992). Tipik olarak, bu hastalar normal erkek dış ve iç genital organlarına ve normal bir hormonal profile sahiptir. Tüm AZF bölgesinin translokasyonu olmadığı için, bu hastalar azospermiktir ve bu nedenle testis sperminin çıkarılması için aday değildir; Bu kişilere donör sperm destekli üreme seçeneği sunulmalıdır.
- d. Karışık Gonadal Disgenezi: Karışık gonadal disgenezi olan hastalar normalde bir mozaik 45, X0 / 46, XY genotipine sahiptir ve anatomik olarak bir tarafta bir testis ve diğer tarafta tek bir gonad vardır (Turek ve Pera, 2002). Bu nadir görülen bir sendrom olmasına rağmen, normalde oluşan testis genellikle kriptorşidiktir ve canlı germ hücrelerinin bulunmadığı bir durumdur. Tek gonad gonadoblastom veya seminoma gelişme riski altındadır ve cerrahi olarak çıkarılmalıdır (Denes ve ark., 2005). Dış cinsel organın değişkenlik derecesinde belirsizlikler vardır.

- e. Y- kromozom Mikrodelesyonları: Tiepolo ve Zuffardi, Y kromozomunun silinmesini taşıyan altı azoospermik hasta hakkında bir rapor yayınlayan ve insan spermatogenezini kontrol eden faktörlerin (azoospermi faktörü; AZF) Y kromozomunun uzun kolunun ökromatin segmentinin distal kısmında (Yq11) olabileceğini öne sürmüşlerdir (Tiepolo ve Zuffardi, 1976). Yirmi yıl sonra, moleküler biyoloji teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte, ilk spermatogenez geni tespit edildi ve AZF bölgesinde aşağıdaki üç ayrı aralık eşleştirildi (proksimalden distale): Yq (AZFa, AZFb ve AZFc) (Vogt ve ark., 1992; Vogt ve ark., 1996).

Sentromere en yakın, AZFa bölgesi spermatogenez sürecinde önemli olan iki gen içerir: DDX3Y (DBY olarak da bilinir) ve USP9Y (Wimmer ve ark., 2002). AZFa bölgesindeki mikrodelenasyon, nonobstrüktif azoospermi olan erkeklerin neredeyse %1'inde görülür. Spermatojenik yetmezlik kritik klinik sonuçtur ve bugüne kadar sperm TESE bulgularını destekleyecek literatürde veri bulunmamaktadır (Hopps ve ark., 2003).

İlk başta, AZFb ve AZFc bölgeleri farklı ve örtüşmeyen bölgeler olarak görünüyordu; Bununla birlikte, P5 ila P1 aralığının kesin karakterizasyonu, bu bölgelerin gerçekten örtüşmekte olduğunu ve bu bölgedeki farklı ektopik homolog rekombinasyon bölgelerine karşılık geldiğini ortaya koymuştur (Repping ve ark., 2002).

2.7.3. Azosperminin testis sonrası nedenleri

Azosperminin testis sonrası nedenleri ya sperm iletiminin engellenmesinden ya da ejakülatör fonksiyon bozukluğundan kaynaklanır. Obstrüktif azosperminin klinik yönetimi nedenine bağlıdır ve aynı zamanda kadın partnerde bulunan infertilite faktörleri de hesaba katılmalıdır. Bu nedenle, her iki taraf da tedavi önerileri yapmadan önce dikkatlice değerlendirilmelidir. Obstrüktif azospermi ile başvuran erkekler iki yoldan biriyle baba edilebilir: engelin cerrahi olarak düzeltilmesi, çiftin doğal olarak gebe kalmasına izin verebilir veya doğrudan spermin epididim veya testisten geri alınması, ardından ART kullanımı (The management of infertility due to

obstructive azoospermia. Fertil Steril. 2008;90(5 Suppl):S121–4). Obstrüktif azosperminin cerrahi tedavisi obstrüksiyon yerine göre değişir ve vasa deferentinin yokluğu, vazal obstrüksiyon ve ejakülatör kanal obstrüksiyonu gibi patolojik durumların varlığına bağlıdır. Bu koşullar aşağıda ayrıca açıklanmaktadır.

Vasa deferentia yokluğu: Vas deferensin konjenital bilateral yokluğu (CBAVD) infertil erkeklerin% 1'inde ve obstrüktif azospermili olanların % 6'sında bulunur (Ferlin ve ark., 2007). Bu durumdan sorumlu iki olası mekanizma vardır: 1) kistik fibroz transmembran düzenleyici gen (CFTR) mutasyonları ve 2) mezonefrik kanalın farklılaşmasındaki anormallikler (McCallum ve ark., 2001).

1. Kistik fibroz (KF), Kafkasyalılarda en sık görülen otozomal resesif hastalıktır, 1: 2500 doğum insidansı ve 1:20 taşıyıcı sıklığı vardır (Mak V, Jarvi KA, 1996). CFTR geni (7q31.2) 27 ekzon içerir ve 250 baz çifti uzunluğundadır. Ekson 10'daki (delta F508) üç baz çiftli bir silme, Kafkas popülasyonunda (Uzun S, Gokce S, Wagner K, 2005) bulunan en yaygın mutasyondur, ancak tarif edilen 800'den fazla farklı mutasyon vardır. Diğer bir yaygın mutasyon, 5T adı verilen bir intron 8 anomalisinden oluşur (Lebo RV, Grody WW, 2007). Normal olarak, bu bölgede yedi ila dokuz timidin bulunur; Beş-timidin varyantına bir azalma, ekson 9'un ekinin verimini düşürür ve sonunda CFTR mRNA'da% 10-50'lik bir azalmaya yol açar (Claustres, 2005). CBAVD'li erkeklerin yüzde sekseni ve doğuştan tek taraflı vaz deferens yokluğu olan erkeklerin% 43'ü saptanabilir CFTR gen mutasyonlarına sahiptir (Mickle ve ark., 1995; Claustres, 2005).

Vazal tıkanma: Amaç dışı vazal tıkanmanın en sık nedeni, fitik onarımı sırasında istemsiz yaralanmadır. Bu komplikasyon bebeklik döneminde daha sık görülür ancak vas ve kordun manipüle edildiği herhangi bir inguinal prosedürden sonra ortaya çıkabilir (Matsuda T, Horii Y, Yoshida O, 1992). Muayene normal testis ebadı gösterdiğinde ve epididim dolu ve sıkı olduğunda tanıdan şüphelenilir. Direkt bir vasal yaralanma yerine, ağın neden olduğu postoperatif enflamatuvar yanıt, inguinal vas deferensleri hapsedebilir ve engelleyebilir. Bu sorunun tam sıklığı şu anda bilinmemektedir. Kasık fıtığı operasyonlarının%

80'i, bir 'gerilimsiz' fitık fitığı oluşturmak üzere bir örme polipropilen ağın yerleştirilmesini içerir. Protez ağ, kronik bir yabancı cisim fibroblastik yanıtı tetikleyerek zemine güç veren ve daha az nükslere yol açan skar dokusu oluşturur. Bununla birlikte, polipropilen ağın vas deferens üzerindeki uzun vadeli etkileri, özellikle doğurganlık açısından çok az bilinmektedir (Shin ve ark., 2005).

Epididim tıkanıklığı: Young sendromu, kronik sinüzit, bronşektazi ve obstrüktif azospermiyi kapsayan bir bozukluklar çemberidir. Bu sendromu olan hastalar sadece hafif bozulmuş solunum fonksiyonuna ve normal spermatogeneze sahiptir. Hastalığın patofizyolojisi belirsizdir ancak anormal siliyer fonksiyon veya anormal mukus kalitesini içerebilir. Azosperminin kesin nedeni tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır, ancak büyük olasılıkla epididimisin salgılanan salgılarla tıkanması nedeniyledir. Tanı, kistik fibroz ve immüno-silia sendromu hariç tutulduktan sonra, kronik sinopulmoner enfeksiyonların ve normal spermatogenezli persistan azosperminin ortaya çıkmasına dayanır. Sperm, Young sendromlu hastalarda normal görülmektedir ve bu hastalarda babalık belgelenmiştir (Handelsman ve ark., 1984).

Boşalma kanalı tıkanıklığı: Ejakülasyon kanalı tıkanıklığı, bir veya her iki ejakülasyon kanalının tıkanması ile karakterize patolojik bir durumdur ve konjenital veya edinsel olabilir (Pryor JP, Hendry WF, 1991; Goldwasser BZ, Weinerth JL, Carson CC, 1985). 1973'te, Farley ve Barnes başlangıçta erkek infertilitesi vakalarının %1 ila 5'inden sorumlu olan ejakülasyon kanalı tıkanıklığını tanımladılar (Porch, 1978; Farley S, Barnes R, 1973). İlk olarak azospermik erkeklerde tam tıkanıklık göstermekle birlikte, tıkanıklığın azospermi ve oligoastenospermi de dahil olmak üzere çeşitli şekillerde ortaya çıkabileceği açıktır (Smith JF, Walsh TJ, Turek PJ, 2008).

Ejakülatör kanal tıkanıklığı ile ilişkili patognomonik bulgular olmamasına rağmen, bu durumun oldukça az klinik bulgusu vardır. Düşük hacimli azospermi ile bu durum mevcut olan erkekler; dilate seminal veziküller ve normal sekonder cinsiyet özellikleri, testis boyutu ve hormonal profiller şüpheli

bir semen analiz sonuçlarına dayanarak, tanıyı doğrulamak için transrektal ultrason yapılabilir. Ejakülasyon kanalı tıkanıklığı, VAS deferens'in tıkanıklığı ile karıştırılmamalıdır; semen hacminin yaklaşık %80'i seminal veziküllerden kaynaklanan jel benzeri sıvıdır, oysa spermatozoa içeren testislerden ve epididimden gelen fraksiyon, semen hacminin sadece %5 ila %10'unu oluşturur. Bu nedenle, vazal tıkanıklık genellikle ejakülat hacmini etkilemez (Hopps CV, Goldstein M, Schlegel PN, 2002).

Boşalma bozuklukları: Her ne kadar bu, alışılmadık bir erkek kısırlığı sebebi olmasına rağmen, boşalma bozuklukları tedavi eden hekime ilginç bir zorluk oluşturmaktadır (Schuster TG, Ohl DA, 2002). Boşalma disfonksiyonu, bireysel tedavileri olan çeşitli hastalıkları içerir. Düşük hacimli (<1,0 ml) veya boşalmamış herhangi bir hastada boşalma disfonksiyonundan şüphelenilmeli ve anorgazmiden ayırt edilmelidir. Retrograd ejakülasyon, spermin ejakülasyonla birlikte anormal şekilde geriye doğru akışı olarak tanımlanabilir; etioloji anatomik, nörojenik, farmakolojik veya idiyopatik olabilir. Retrograd ejakülasyonda yer alan farmakolojik ajanlar arasında nöroleptikler, trisiklik antidepressanlar, prostatizm tedavisinde kullanılan alfa blokerleri ve bazı antihipertansifler bulunur (Schuster TG, Ohl DA, 2002; Hendry, 1998; Debruyne, 2000). Retrograd ejakülasyonun tanısı, ejakülat sonrası idrarın sperm için incelenmesiyle yapılır. Her ne kadar pozitif ejakülat sonrası idrar tahlili için spesifik kriterler belirlenmemiş olsa da, yüksek güç alanı başına 10 ila 15 spermden daha yüksek bulunması retrograd ejakülasyonun varlığını doğrular. Buna karşılık, klinik olarak teşhis edilmesi gereken emisyon yetmezliği olan bir hastanın idrarında sperm mevcut olmayacaktır.

2.8. POLİMORFİZM

Genetik polimorfizm bireyler, gruplar veya popülasyonlar arasında DNA dizilimindeki bir farktır. Kaynaklar, tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP'ler), dizi tekrarlarını, eklemeleri, silmeleri ve rekombinasyonları (örneğin, genetik bir polimorfizm, mavi gözlere karşı kahverengi gözlere veya düz saçlara karşı kıvrıkcık saçlara neden olabilir) içerir. Genetik polimorfizmler, şans işlemlerinin bir sonucu olabilir veya virüs veya radyasyon gibi harici ajanlar tarafından

indüklenmiş olabilir. Bireyler arasında DNA dizisindeki bir farkın hastalık ile ilişkili olduğu gösterilmişse, buna genellikle genetik mutasyon denir. DNA sekansındaki dış etkenlerden kaynaklandığı doğrulanan değişikliklere genellikle "polimorfizmler" yerine "mutasyonlar" da denir. Polimorfizmler mutasyonlarla ortaya çıkar. Mutasyon, bir nükleotid tipinden diğerine bir değişiklik, bir ekleme veya silme veya nükleotidlerin yeniden düzenlenmesi nedeniyle olabilir. Oluştuktan sonra, herhangi bir DNA sekansı gibi bir polimorfizm kalıtılabilir, Böylece kalıtımın ebeveynden çocuğa geçmesi sağlanır. Polimorfizmler, protein dışında kodlanmayan çok miktarda DNA'da genlerin dışında da bulunur. Gerçekten de, proteinleri kodlamayan DNA bölgeleri daha fazla polimorfizme sahip olma eğilimindedir. Bunun nedeni, proteinleri kodlayan DNA dizilerindeki bir değişimin, onu taşıyan kişi üzerinde zararlı bir etkisi olabileceğidir. Eş anlamlı polimorfizmler organizma üzerinde herhangi bir etkisi olmayan ve ikamenin üretilen proteinde amino asit değişikliğine neden olmadığından seçici olarak nötr oldukları söylenir. Buna sessiz mutasyon da denir. İsimsiz bir ikame, kodlanmış amino asidin değişmesine neden olur. Bir yanlış anlamlı mutasyon, kodonda bir değişikliğe neden olarak proteini değiştirir. Anlamsız bir mutasyon, yanlış bir sonlandırma kodonuna yol açar. Tüm kodlama dizisi SNP'lerin bir yarısı isimsiz kodon değişimlerine neden olur (<http://genomics.phrma.org/lexicon>).

2.8.1. DNA Polimorfizm Çeşitleri

Ardışık tekrar polimorfizmleri : Ardışık olarak tekrarlanan DNA dizileri, insanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli türlerin genomları boyunca yaygındır ve çoğu zaman önemli bir işleve sahip olduklarını öne sürerek oldukça korunur (Kashi ve King, 2006 ; Fondon ve ark., 2008; Usdin, 2008).

İkili tekrarlar üzerine yapılan çoğu araştırma, genetik belirteçler olarak kullanılan mikrosatellitler ve Mendel'in kalıtım paternlerinde baskın veya resesif bozukluklara neden olan tekrar genleşme mutasyonları gibi insan genomundakilere odaklanmıştır. Dinamik mutasyonlar terimi, birçok insan geninde, özellikle Huntington ve diğer poliglutamin hastalıkları, Friedreich'in ataksisi ve kırılğan X sendromu dahil olmak üzere sinir sistemini etkileyenler

gibi bir dizi tekrar genleşme bozukluğuna neden olduğu tespit edilen ardışık tekrar uzunluğundaki değişimi tanımlamak için kullanılmıştır (Sutherland ve ark., 1998; Nithianantharajah ve Hannan, 2007; Usdin, 2008).

Kırılğan(Fragile) X sendromunda yer alan bir trinükleotit genişlemesi içeren, titreme / ataksi, parkinsonizm, nöropsikiyatrik semptomlar ve erken yumurtalık yetmezliği de dahil olmak üzere daha karmaşık bozukluklarla erken kırılma tekrar uzunluklarının (kırılğan X sendromu için gerekli hastalık eşiğinin altında) daha fazla ilişkisi olduğunu gösterir (Coffey ve ark., 2008; Bourgeois ve ark., 2009).

Mendel'in kalıtım hastalıklarına doğrudan dahil olmadığı bilinen genlerde ve aralarında çok daha fazla sayıda ardışık tekrar bulunur. Ardışık tekrarlarına ayrıca basit dizi tekrarları, mikrosatellitler veya minisatellitler de denir. Bu tekrarlayan diziler ekzonlara, intronlara veya intergenik bölgelere yerleştirilebilir, gen ekspresyonunun modülasyonu için ve RNA'ların ve proteinlerin yapısı ve fonksiyonu için fırsatlar sağlar (örn. Amino asit işlemlerine çevrilmiş kodon tekrarları).

Ardışık tekrarların büyük bir kısmı intronlarda ve intergenik bölgelerde bulunur. Farklı yineleme motifleri ve genomik dağılım düzenleri konusunda da bazı özellikler vardır. Örneğin, trinükleotit ve heksanükleotit tekrarlarının özellikle eksonlarda ve kodlama bölgelerinde bulunma olasılığı daha yüksektir, burada genleşmeleri veya büzülmeleri değiştirilmiş amino asit koşuları uzunluğuna yol açacaktır (örneğin polihistidin yolları), ancak karmaşık çerçeve değişimleri olmayacaktır (Subramanian ve ark., 2003; Salichs ve ark., 2008). İkili tekrarlar terimi, basit dizi tekrarları veya uydu DNA'sı (hem mikrosatellitler hem de minisatellitler içeren) olarak da bilinen ikili tekrarlanan DNA dizilerini tanımlamak için kullanılır. Ardışık tekrarları, mononükleotitleri, dinükleotitleri, trinükleotitleri (üçüzler), tetranükleotitleri vb. içerebilir. Mikrosatellitler, 1-5 ila 1-10 bp uzunluğundadır. Bu nedenle, tandem tekrarlar, mikrosatellitler (yani> 10 baz çifti uzunluğunda) için üst sınırdan daha uzun bir motifle genellikle minisatellitler olarak adlandırılır. Ardışık tekrarlayan polimorfizmler veya SSR

polimorfizmleri, değişken sayıdaki ardışık tekrarlar veya tekrarlayan polimorfizmler olarak da adlandırılır.

Kısa ardışık tekrarlar: Kısa ardışık tekrarları (STR'ler), insan genomu boyunca çeşitli yerlerde arka arkaya tekrarlanan çok kısa DNA uzantılarıdır. Tipik olarak, tekrarlayan dizinin uzunluğu sadece 2, 3 veya 4 bp'dir ve arka arkaya bulunan kopya sayısı geniş bir aralıkta değişkendir. Kodlama genlerinin DNA dizilerinin durumundan farklı olarak, genomdaki herhangi bir spesifik STR için 'doğru' tekrar sayısı yoktur; bunlar sadece varyasyonun normal ve sağlıklı olduğu genom içindeki alanlardır. Herhangi bir özel STR için, her bir kiři, birisinin gebe kaldığı annesinden, diğerinin de babasından miras alan iki kopyası olacaktır. STR'ler adli ve babalık testlerinde yardımcıdır. Çünkü STR'lerde birçok doğal varyasyon vardır. İki kişinin STR'lerinin her iki kalıtsal kopyası üzerindeki tam tekrar sayısı ile eşleşme şansı oldukça dūřüktür. Genomdaki birçok STR'nin analizini birleştirirken, iki kişinin rastgele tesadūflerle eşleşme olasılığının aşırı dūřük olduğu bulunmuştur.

Y-kromozom STR lokuslarının kullanımı adli bilimde giderek yaygınlaşmaktadır, kısmen lokuslar mayoz sırasında rekombinasyonsuz ve paternal olarak kalıtılır. Potansiyel baba ilişkilerinin babalık testinde Y-kromozom STRs analizi, özellikle potansiyel bir babanın mevcut olmadığı durumlarda çok önemlidir. Cinsel saldırı vakalarında, erkek suçluyu tanımlamak için Y-kromozom STRs kullanılır (Betz ve ark., 2001). İnsan evriminde bulunan erkek DNA'sının, Y-kromozom STR analizi ile 1 : 2000 (erkek : kadın) oranında saptanabilir olduğunu bildirmiştir (Anslinger ve ark., 2000; Prinz ve ark.,1997; Jobling ve Tyler-Smith, 1995).

Kopya sayı polimorfizmi veya çeşitliliği: Genetik ilişkilendirme çalışmaları genellikle aynı türün bireyleri arasındaki belirli genomik lokasyonlardaki tek nükleotidlerdeki varyasyon olan SNP'leri değerlendirir. Son sonuçlar, insan genomunun başka bir sık polimorfizm türü, kopya sayı varyasyonları içerdikini göstermektedir (Conrad ve ark., 2010). Bir CNV, bir DNA segmentinin, farklı bireylerin genomlarındaki çeşitli kopya numaralarında bulunabileceği bir

varyasyondur. CNV'lerin boyutu, birkaç yüz nükleotidden birkaç megabaza kadar değişmektedir. SNP'lerle karşılaştırıldığında, CNV'ler genomun daha önemli bir kısmını etkiler ve daha sık ortaya çıkar. Bu nedenle, CNV'ler insan evrimi, genetik çeşitlilik ve artan sayıda fenotipik özelliğe önemli ölçüde katkıda bulunur (Stankiewicz ve Lupski, 2010).

DNA dizilerinin CNV'leri doğal popülasyonlarda bol miktarda bulunur ve işlevsel olarak önemlidir, ancak yine de tam olarak tanımlanması gerekir. Bir CNV, hem rekombinasyon hem de replikasyon mekanizmaları hem de SNP'den daha yüksek bir Novo lokusa özgü mutasyon oranı ile üretilir. Mendel, CNV'lerin sporadik veya hastalıklı etkilere neden olabileceğini ve gen çoğalmasını, ekzon karışımını ve genom çeşitliliğini ve evrimini etkileyebileceğini söylemiştir (Zhang ve ark., 2009). İnsanlarda CNV evrimine neden olan değişikliklerin mekanizmaları, kromozomal segmentlerin silinmesi ve çoğaltılması yoluyla tarif edilmiştir. (Hastings ve ark., 2009).

Tek nükleotid polimorfizmi: Belirli bir nükleotid bölgesinde tek bir nükleotid polimorfizmi bulunur. Popülasyondaki DNA molekülleri genellikle bir bölgeyi işgal eden nükleotid çiftinin kimliğinde farklılık gösterir. Örneğin, aynı popülasyondaki bazı DNA molekülleri belirli bir nükleotid bölgesinde bir T-A baz çiftine sahip olabilirken, aynı popülasyondaki diğer DNA molekülleri aynı bölgede bir C-G baz çiftine sahip olabilir. Bu fark bir SNP oluşturmaktadır. SNP, popülasyondaki bireyler arasında üç genotip olabileceği iki alleli tanımlar; homozigot kromozomlar veya bir kromozomda T-A ve homolog kromozomda C-G ile heterozigot kromozomlar.

İnsan genomunda, rastgele seçilen herhangi iki DNA molekülünün, kodlamayan DNA'da her 1000 bp'de bir SNP bölgesinde ve protein kodlayan DNA'da her 3000 bp'de bir SNP bölgesinde farklılaşma gösterebilir. DNA moleküllerinin bir nükleotit bölgesinde farklı olması gerektiğini belirten bir SNP'nin tanımı, bir popülasyondaki DNA moleküllerinin% 1'inden daha azında bulunan türün nadir genetik varyasyonlarını hariç tutar. Dışlamanın nedeni, çok nadir görülen

genetik varyantların, genetik analizde, daha yaygın olan varyantlar kadar faydalı olmamasıdır. SNP'ler insanlar arasında en yaygın genetik farklılık şeklidir.

İnsan popülasyonunda nispeten yaygın olan yaklaşık 3 milyon SNP tanımlanmıştır, bunların yaklaşık 1 milyonu tipik olarak diyabet veya yüksek tansiyon gibi kompleks hastalıklarla ilişkili olabilecek SNP'lerin aranmasında kullanılmaktadır (Cargill ve ark., 1999). Bazı durumlarda, bir genin değişken bir formu türlere evrimsel bir avantaj sağlayabilir ve sonunda türlerin çoğu üyesi için DNA'ya dahil edilebilir ve değişken formun etkileri, türüne bağlı olarak hem yararlı hem de zararlı olabilir. Örneğin, heterozigot bir orak hücre mutasyonu sıtmaya direnç gösterir, ancak homozigos orak hücre mutasyonu genellikle öldürücüdür. Birçok durumda, hem progenitör hem de varyant formlar hayatta kalır ve bir tür popülasyonunda bir arada bulunur. Genetik bir dizinin çoklu formlarının bir arada bulunması, SNP'ler de dahil olmak üzere genetik polimorfizmlere yol açar.

SNP, bir nükleotid değişimi ile polimorfik bir bölge ortaya çıkarabilir. Değiştirmeler geçişler olabilir. Bir geçiş, bir pürin nükleotidinin başka bir pürin nükleotidi veya bir pirimidin başka bir pirimidin ile değiştirilmesidir. Bir SNP, 'indel' olarak adlandırılan tek bir temel ekleme veya silme varyantı da olabilir (Weber ve ark., 2002). Eş anlamlı bir kodon değişimi veya sessiz mutasyon/SNP ('mutasyon' veya 'polimorfizm', 'mutant' ve 'varyasyon' terimleri birbirinin yerine kullanılır), genetik kodun dejenerasyonu nedeniyle amino asit değişikliğine neden olmayan bir durumdur. Bir amino asit için bir kodon kodlamasını farklı bir amino asit için kodona dönüştüren bir ikame (yani, isimsiz bir kodon değişikliği) bir missense mutasyonu olarak adlandırılır. Anlamsız bir mutasyon, bir durdurma kodonunun oluştuğu, böylece bir polipeptid zincirinin erken sonlandırılmasına ve kesilmiş bir proteinin oluşumuna yol açan, isimsiz bir kodon değişikliği türüdür. Bir okuma mutasyonu, bir durdurma kodonunun tahrip edilmesine neden olan ve böylece uzatılmış bir polipeptit ürünü ile sonuçlanan başka bir isimsiz mutasyon kodon değişikliği türüdür. Snp'ler biallelik, triallelik veya tetra-allelik olabilir, ancak SNP'lerin büyük çoğunluğu

bialleliktir ve bu nedenle sıklıkla 'biallelik markers' veya 'diallelik markers' olarak adlandırılır (Goto ve ark., 2001).

Bir hastalıktan sorumlu SNP'ler mutlaka kodlama bölgelerinde meydana gelmek zorunda değildir; örneğin, bir nükleik asit tarafından kodlanan proteinin ifadesini, yapısını ve/veya aktivitesini etkileyebilecek herhangi bir genetik bölgede ortaya çıkabilirler. Bu tür genetik bölgeler, örneğin transkripsiyona dahil olanları içerir. Örnekler, transkripsiyon faktörü bağlama alanlarındaki, destekleyici bölgelerdeki, intron–ekson sınırlarındaki snp'ler gibi transkript işlemede yer alan alanlarda, hatalı eklemeye neden olabilecek Snp'lerdir veya poliadenilasyon sinyal bölgeleri gibi mRNA işleme sinyal dizilerindedir (Li ve Pritchard, 2000; Artiga ve ark., 2002).

2.8.2. DNA Markırlarının Uygulamaları

Multifaktör hastalıkları ile hastalık gen risk faktörleri: İnsan genetiğinde DNA polimorfizmlerini araştırmanın ana amacı, kalıtsal hastalıklarla ilişkili mutant genlerin kromozomal konumunu belirlemektir. Kalp hastalığı, kanser, diyabet, depresyon gibi çoklu genetik ve çevresel faktörlerin etkileşiminin neden olduğu bozukluklardan dolayı, zararlı bir allelin artması, hastalık için risk faktörü olarak düşünülmektedir. Özellikle genetik risk faktörlerine genellikle hastalık genleri denildiği için bunun vurgulanması gerekir.

SNP'ler hastalığa neden olmaz; ancak, birisinin belirli bir hastalığı geliştirme olasılığını belirlemeye yardımcı olabilirler. Alzheimer hastalığı, apolipoprotein E veya *ApoE* ile ilişkili genlerden biri, SNP'lerin hastalık gelişimini nasıl etkilediğinin iyi bir örneğidir. *ApoE*, bu gen için üç olası alel ile sonuçlanan iki SNP içerir: E2, E3 ve E4. Her alel, bir DNA bazına göre farklılık gösterir ve her genin protein ürünü, bir amino asit ile değişir. Her birey *ApoE*'nin birer kopyasını hem anneden hem babadan alır. Araştırmalar, en az bir E4 allelini alan bir kişinin, Alzheimer hastalığı geliştirme şansının daha yüksek olacağını göstermiştir. Görünüşe göre, E4 proteinindeki bir amino asidin değişimi, yapısını ve hastalığın gelişmesini daha olası hale getirmek için yeterli işlevi değiştirir. Bununla birlikte, E2 allelinin kalıtılması, bir kişinin Alzheimer

hastalığına yakalanma olasılığının daha düşük olduğunu göstermektedir (Coon ve ark., 2007).

Genetik haritalama ve bağlanma: Her DNA polimorfizmi, kromozomdaki kendi konumu için genetik bir markır olarak görev yapar. Genetik bağlantının önemi, hastalık genine yeterince yakın olan DNA markırlarının, hastalık geni ile birlikte miras kalma eğiliminde olacağı ve markırlar ne kadar yakınsa bu ilişkinin de o kadar güçlü olacağıdır. Hastalık geninin tanımlanmasındaki ilk yaklaşım, genetik haritalama olarak bilinen bir prosedür olan kromozomal konumunu tanımlamak için genetik olarak hastalıkla bağlantılı DNA markırlarını bulmaktır. Kromozomal pozisyonu bilindiğinde, hastalık geninin kendisini saptamak ve fonksiyonunu incelemek için başka yöntemler kullanılabilir. İnsan genomu ~30.000 gen içerir. Genetik bağ olmasaydı, o zaman bir hastalık genini tanımlamak için her gende bir tane olan 30.000 DNA polimorfizmini incelememiz gerekirdi.

Farmakogenetik ve uygulamaları: Bir ilaca bireysel cevap genetik, yaş, cinsiyet, çevre ve hastalık gibi birçok faktör tarafından yönetilir. Genetik faktörlerin bir ilacın tepkisi üzerindeki etkisi bilinen bir gerçektir. Genetik faktörlerin ilaç cevabı ve metabolizma üzerindeki etkisinin incelenmesi farmakogenetik olarak adlandırılır. Farmakogenetik bilgisi ilaç dozajı veya ilaç seçimi sırasında uygulanırsa, olumsuz reaksiyonlardan kaçınılabilir, toksisite veya terapötik başarısızlık tahmin edilebilir ve bu nedenle klinik sonuçlarda iyileşme ile terapötik etkinliği arttırabilir (Abraham ve Adithan, 2001). İlaç metabolize eden enzimler tarafından sergilenen polimorfizm iyi bilinen bir olgudur. Halen, farmakogenetik alanındaki keşif, temel olarak, ilaç biyotransformasyonundan sorumlu enzimlerin karakterizasyonuna ve ayrıca enzim aktivitesindeki çeşitli değişkenlik kaynaklarını tanımlamaya odaklanmaktadır (Ma ve ark., 2002). Farmakogenetik, beklenmeyen ilaç etkilerine yol açan genetik varyasyonları belirlemeye, altta yatan moleküler mekanizmaları netleştirmeye, klinik uygunluğu değerlendirmeye ve uygun fenotipleme ve genotipleme testlerini geliştirmeye çalışmaktadır (Linder ve ark., 1997).

SNP'ler, geniş metabolizör ve zayıf metabolizör fenotipinde ifade edilebilir. Buna göre SNP'ler, bir popülasyondaki protein fonksiyonlarından birinin veya daha fazlasının, diğer popülasyondakilerden farklı olduğu bir proteinin alel varyasyonlarına yol açabilir. Böylece SNP'ler ve kodlanmış varyant peptitler, tedavi yöntemini etkileyebilecek genetik bir yatkınlığı tespit etmeyi hedefler. Örneğin, ligand bazlı bir tedavide SNP'ler, ligand bağlanmasında az veya çok aktif olan bir reseptörün amino terminal hücre dışı alanlarına ve / veya diğer ligand bağlanma bölgelerine yol açabilir ve böylece sonraki protein aktivasyonunu etkileyebilir. Buna göre ligand dozajı, belirli SNP allellerini veya haplotiplerini içeren belirli bir popülasyondaki terapötik etkiyi en üst düzeye çıkarmak için mutlaka değiştirilecektir. Genotiplemeye alternatif olarak, alternatif SNP allelleri tarafından kodlanan değişken amino asit dizilerini içeren spesifik değişken proteinler tanımlanabilir. Bu nedenle, bir bireyin farmakogenomik karakterizasyonu, bireyin SNP genotipine dayanan profilaktik veya terapötik kullanımlar için etkili bileşiklerin ve bu tür bileşiklerin etkili dozajlarının seçilmesine izin verir, böylece terapinin etkinliğini artırır ve optimize eder (Pfoest ve ark., 2000).

2.8.3. Polimorfizmlerin Tespit Yöntemleri

Kesim parçası uzunluk polimorfizmi: SNP'lerin çoğunun çalışılması için DNA dizilimi gerektirmesine rağmen, bir kesim bölgesinde bulunanlar bir kesim enzimi kullanılarak analiz edilebilir. Örneğin bir SNP, bazı moleküllerdeki bir T-A nükleotid çiftinden ve diğerlerinde bir C-G çiftinden oluşur. Bu örnekte, polimorfik nükleotid bölgesi, Eco RI (5'-GAATTC-3') kesim enzimi için bir bölünme yerine dahil edilir. Bu tür bir durumda, SNP'de T-A bulunan DNA molekülleri, hem çevre bölgelerinde hem de orta bölgede bölünerek iki adet Eco RI kesim parçasını verir. Alternatif olarak, SNP'de C – G'ye sahip DNA molekülleri her iki yan bölgede de bölünecek ancak orta bölgede bölünmeyecektir (çünkü C – G'nin varlığı EcoRI kesim bölgesini yok eder) ve bu nedenle yalnızca bir tane daha büyük kesim parçası üretecektir. Bir kesim bölgesini ortadan kaldıran bir SNP, bir kesim parçası uzunluk polimorfizmi olarak bilinir. Kesim parçası uzunluk polimorfizmleri, bir kesim enzimi ile sindirim yoluyla üretilen DNA parçalarının sayısını ve boyutunu

değiştirdiğinden, Southern blotlamaprosedürü ile tespit edilebilirler. Bu durumda etiketli prob DNA, en soldaki kesim alanının yakınında hibridize olur ve bu kesim parçasının elektroforez jel içinde pozisyonunu tanımlar. 'Allel A' etiketli dubleks molekül, ortada bir kesim bölgesine sahiptir ve bölündüğünde ve elektroforeze maruz kaldığında, prob DNA'sına homolog sekanslar içeren küçük bir bant verir. 'Allel' etiketli dubleks molekül orta kesim bölgesinden yoksundur ve daha büyük bir bant verir. Bu durumda, homolog kromozomlarda hangi allellerin bulunduğuyla ilgili olarak üç genotip AA, Aa veya aa olabilir ve üç genotipin tümü, heterozigot genotip Aa'daki her allelin bir kopyası olarak ayırt edilebilir (Hartl ve Jones, 2009).

Dinamik allele özgü hibridizasyon: İlk adımda, bir genomik segment güçlendirilir ve bir biyotinlenmiş primer ile bir PCR reaksiyonu yoluyla bir boncuğa bağlanır. İkinci adımda, güçlendirilmiş ürün bir streptavidin sütununa bağlanır ve biyotinlenmemiş ipliği çıkarmak için NaOH ile yıkanır. Bir allele özgü oligonükleotit daha sonra çift sarmallı DNA'ya bağlandığında flüoresan bir molekülün varlığında eklenir. Yoğunluk daha sonra T_m belirlenene kadar sıcaklıkta bir artış ile ölçülür. Bir SNP varlığı beklenenden daha düşük bir T_m ile sonuçlanır. Dinamik alele özgü hibridizasyon genotipleme, T_m'de ölçülebilir bir değişimi ölçtüğü için, sadece SNP'leri değil, her türlü mutasyonu ölçebilir. Dinamik alele özgü hibridizasyonun diğer faydaları arasında, etiketsiz problemlerle çalışma kabiliyeti ve basit tasarımı ve performans koşulları bulunmaktadır (Howell ve ark., 1999).

Tek nükleotid polimorfizm mikroarray: Bu teknikte, küçük bir çip üzerinde dizilmiş binlerce prob kullanılır, dolayısıyla birçok SNP'nin aynı anda algılanmasına izin verir. Hedef DNA'nın farklı hibridizasyon miktarını bu fazlalayıcı problemlerin her biriyle karşılaştırarak, spesifik homozigot ve heterozigot allelleri belirlemek mümkündür (Rapley ve Harbron, 2004). Affymetrix Human SNP 5.0 (Santa Clara, California, ABD) GeneChip, 500.000'den fazla insan SNP'sini genotipleyebilen genom çapında bir test yapmak için kullanılır (Affymetrix, 2007). Mikroarray ayrıca genetik çeşitlilik ve ilaç yanıtlarını karakterize etmek, yeni ilaç hedeflerini tanımlamak ve

kimyasalların ve ilaçların toksikolojik özelliklerini değerlendirmek için kullanılır.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için moleküler işaretler: Bu moleküler işaretlerin benzersiz tasarımı, belirli bir yerde SNP'leri tanımlamak için basit bir teşhis tahlili sağlar. Bir moleküler işaret, vahşi tip bir allele ve başka bir allelin mutantına uyacak şekilde tasarlanmışsa, ikisi bir bireyin genotipini tanımlamak için kullanılabilir. Test sırasında sadece ilk probun floresan dalga boyu tespit edilirse, birey vahşi tipe homozigot olur. Sadece ikinci probun dalga boyu tespit edilirse, birey mutant allele homozigot olur. Son olarak, her iki dalga boyu tespit edilirse, her iki moleküler işaretçi de tamamlayıcılarına hibridize edilmelidir ve bu nedenle birey her iki alleli de içermelidir ve heterozigot olmalıdır.

Sekanslama:Prosekans gibi yeni nesil dizileme teknolojileri, bir okumadaki 250 bazdan daha az dizilim yapar, bu da bütün genomları dizileme yeteneklerini sınırlar. Bununla birlikte, gerçek zamanlı olarak sonuç üretme kabiliyetleri ve kitlesel olarak ölçeklendirilme potansiyelleri, SNP genotiplemesi yapmak için küçük bölgeleri sekanslamak için uygun bir seçenek haline getirir. Diğer SNP genotipleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında, dizileme, genomun oldukça polimorfik majör histo-uyumluluk kompleksi bölgesi gibi küçük bir bölgedeki çoklu SNP'lerin tanımlanması için özellikle uygundur (Rapley ve Harbron, 2004).

2.9.LEP/ LEPR YAPISI ve İŞLEVİ

LEP, protein kodlayan bir gen türüdür. Genomdaki yeri 7q32.1 dir. 23.351 nükleotidden ve 3 eksondan oluşur. OMİM: 164160 dir. UniProtKB - P41159 dur. LEPR, leptin için bir reseptördür. Genomdaki yeri 1p31.3 dir. 227.995 nükleotidden ve 24 eksondan oluşur. OMİM: 601007dir. UniProtKB- P48357dir. LEP ve LEPR, vücut ağırlığı ve enerji homeostazının düzenlenmesinde anahtar oyuncular (Zhang ve ark., 1994). LEP esas olarak adipositlerde üretilir ve kan seviyeleri vücut yağ miktarı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Considine ve ark., 1996). LEP, hipotalamustaki nöronlar üzerindeki reseptörüne bağlanarak besin

alımını ve enerji homeostazını düzenler (Allison ve Myers, 2014). LEPR'nin proopiomelanokortin (POMC) / kokain ve amfetamin tarafından düzenlenen transkript nöronları üzerindeki aktivasyonu, melanokortin-4 reseptörünü (MC4R) aktive eden ve böylece tokluk sinyallerini indükleyen α -melanosit uyarıcı hormonun üretimiyle sonuçlanır. Nöropeptid-Y / agouti ile ilişkili protein (AgRP) nöronları üzerindeki LEPR aktivasyonu oreksijenik peptidlerin üretiminin azalmasına yol açar (Schwartz ve ark., 2000; Dubern ve Clement, 2012).

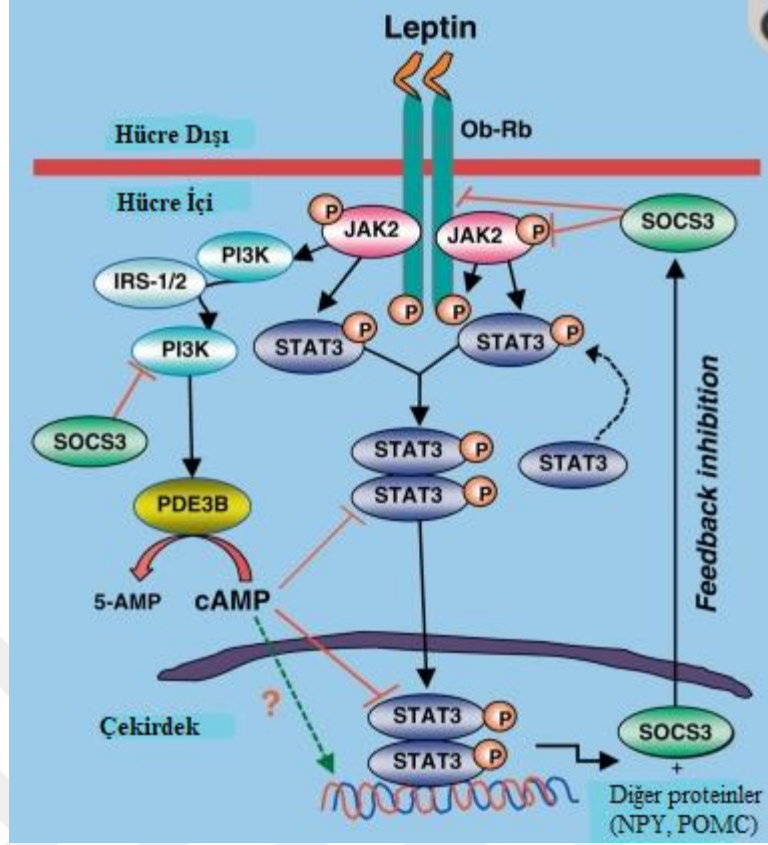
LEP, hipotalamustaki anahtar düzenleyici merkezlere beslenme durumunu bildirir ve enerji homeostazının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Merkezi veya çevresel olarak LEP uygulaması, çeşitli hayvanlarda gıda alımını ve vücut ağırlığını azaltır. Önemlisi, LEP veya LEPR'deki mutasyonlar kemirgenlerde ve insanlarda obeziteye neden olur ve LEP sinyalinin vücut ağırlığı regülasyonundaki zorunlu rolünü kanıtlar (Friedman ve Halaas, 1998). Enerji homeostazındaki ana rolünün yanı sıra LEP, üreme, büyüme, kemik oluşumu ve kardiyovasküler ve immün regülasyon gibi diğer birçok fizyolojik fonksiyonda da rol oynar (Sahu, 2003; Yadav ve ark., 2009). Son zamanlarda LEP ve kanser arasında bir ilişki de ortaya çıkmıştır (Cao ve ark., 2010). LEP'in bu işlevlerinin tümü olmasa da çoğu hipotalamus düzeyinde aracılık edilir. Bu nedenle, hipotalamustaki LEP sinyalizasyonu, çok sayıda nükleer grup, hücre tipi ve sinyal yollarını içeren yoğun araştırma konusu olmuştur.

2.9.1 Leptin ve Leptin Reseptör Sinyal İletim Yolları

Altı izoformdan oluşan LEPR, sınıf 1 sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir (Tartaglia, 1997). Sinyalleme kapasitesine sahip reseptör (ObRb), LEP hedef nöronlarının çoğunda, çeşitli hipotalamik bölgelerde yüksek oranda eksprese edilir (Elmqvist ve ark., 1998; Caron ve ark., 2010). LEPR'nin keşfini takiben, Janus kinaz-2 (JAK2) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT3), hipotalamusta önemli bir LEP sinyal yolu olarak hızlı bir şekilde kurulmuştur (Friedman ve Halaas, 1998). Daha sonra, PI3K, PDE3B-cAMP, rapamisin'in memeli hedefi (mTOR), AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) ve SH içeren protein tirozin fosfataz-2 (SHP2) dahil olmak üzere hipotalamusta STAT3 olmayan birkaç leptin sinyal yolu MAPK yolları

tanımlanmıştır (Myers ve ark., 2009; Morton ve ark., 2006; Zhao ve ark., 2002; Myers ve ark., 2008; Rahmouni ve ark., 2009).

LEP'in LEPR'ye (Ob-Rb) bağlanması, JAK2'nin aktivasyonunu, reseptör dimerizasyonunu ve LEPR'nin hücre içi kısmının JAK2 aracılı fosforilasyonunu ardından STAT3 aktivasyonunu indükler. Aktive olmuş STAT3, çekirdeğe dimerize olur, yer değiştirir ve SOCS3, NPY ve POMC dahil hedef genleri transaktive eder. Yapılan çalışmalar, LEP'in ayrıca PI3K ve PDE3B'yi aktive ettiğini, cAMP seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir. cAMP düzeylerindeki düşüş, LEP tarafından STAT3 aktivasyonu için önemli görülmektedir, çünkü PDE3 inhibisyonu, LEP'in hipotalamustaki bu etkisini tersine çevirir. Ayrıca, LEP kaynaklı PDE3B aktivasyonuna bağlı cAMP seviyelerinde azalma POMC, NT, NPY ve diğer genler için bir hipotezin deneysel olarak test edilmesi gerekir. SOCS3, merkezi LEP direncinin ve DIO'nun gelişiminde önemli bir rol oynayan, bir mekanizma olan hipotalamusta LEP sinyalleşmesinin hem STAT3 hem de PI3K yollarının negatif düzenleyici olarak görev yapar (Sahu, 2003). Hipotalamustaki STAT3 ve PI3K-PDE3B-cAMP yolları üzerinden LEP hücre içi sinyalizasyonunun şeması Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7: Hipotalamustaki STAT3 ve PI3K-PDE3B-cAMP yolları üzerinden LEP hücre içi sinyalizasyonunun şeması.

LEPR izoformları

Bugüne kadar, insan LEPR'sinin dört zara bağlı ve bir çözünür izoformu tanımlanmıştır (Tartaglia ve ark., 1995). Özellikle, türler arasında ve aynı zamanda türler içinde literatürde tutarsız isimlendirme kullanılmıştır. LEPRb, 20 eksonluk kanonik transkript ile kodlanır. Tercümesi, transkriptin 3. eksonunda başlar. LEPRb, açıkça tanımlanmış işlevselliğe sahip tek izoformdur ve bu nedenle çoğu araştırmanın odak noktasıdır (Allison ve Myers, 2014).

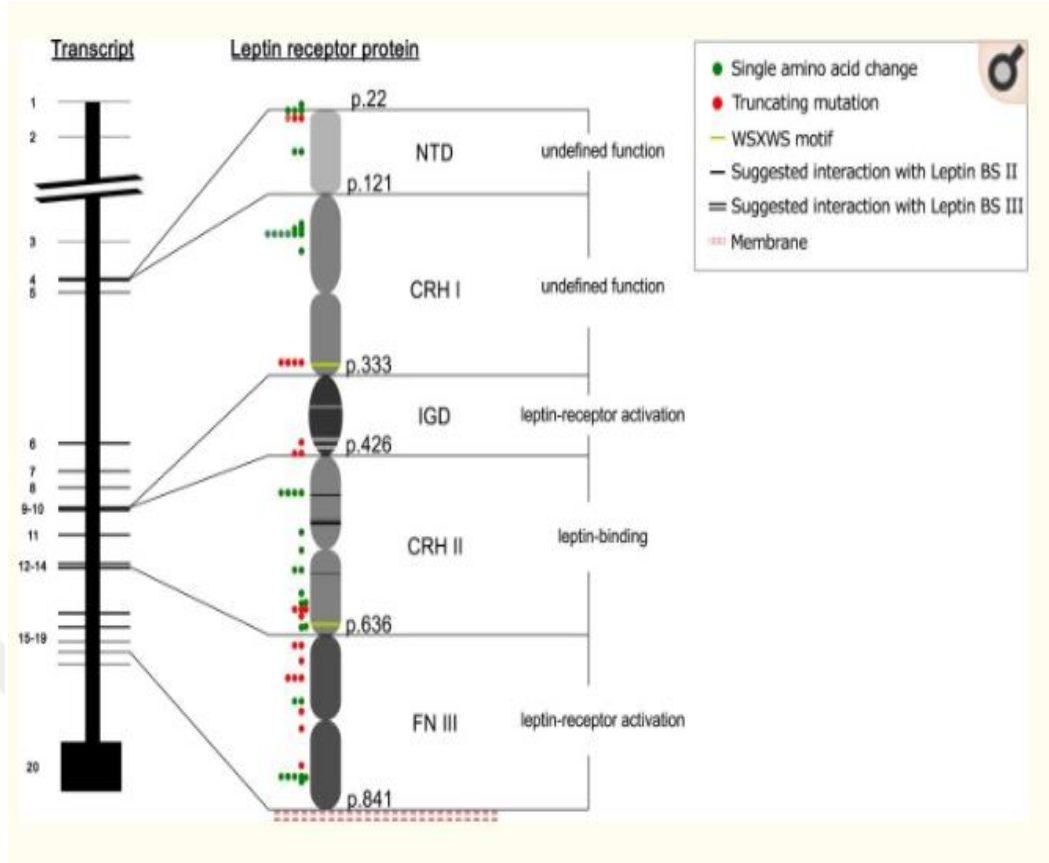
Yapısal olarak, tüm izoformlar aynı hücre dışı alanı 820 amino asit (aa) uzunluğunda paylaşır (Şekil 8). Membrana bağlı izoformlar, bir 21-aa transmembran alanına ve 871 ila 879 pozisyonları etrafında bir kutu 1 motifine ve ardından 891 pozisyonundan alternatif birleştirme nedeniyle değişken C terminal uzunluklarına sahiptir. Çözünür LEPR, proteolitik ekto alan atımının bir

ürünüdür (Wauman ve ark., 2011) Hücre içi kalıntıları ve bir transmembran alanı olmaksızın tarif edilen tek izoformdur ve kan dolaşımında dolaşır (Chua ve ark., 1997).

LEP ve Reseptör Yapısı / İşlevi

LEPR bir sınıf I sitokin [Janus kinaz (JAK) / sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT)] reseptörüdür (Tartaglia ve ark., 1995).

Hücre dışı alan altı alt alana bölünmüştür (Şekil 8). N-terminal alanı, LEP bağlanması veya sinyalleme için gerekli değildir ve şu anda tanımlanmamış bir işleve sahiptir. In vitro çalışmalar, sonraki CRHI alanının silinmesinin LEP sinyallemesini azalttığını ancak ortadan kaldırmadığını göstermektedir. Bu kısmen, azalmış hücre yüzeyi ekspresyonundan kaynaklanıyor gibi görünmektedir (Peelman ve ark., 2014; Moharana ve ark., 2014; Carpenter ve ark., 2012; Zabeau ve ark., 2004). LEP, reseptörünü devreye sokmak için I ile III olarak adlandırılan üç bağlanma sahası kullanır. Bağlanma bölgesi I tanımlanmamış bir işleve sahiptir ve mutasyonları, reseptör aktivasyonunu yalnızca marjinal olarak etkiler. Bağlanma bölgesi II, LEPR CRHII alanı ile etkileşime girerek reseptör bağlanması için gereklidir. Bağlanma bölgesi III, aksine, LEPR immünoglobülin benzeri alanla etkileşime girerek reseptör aktivasyonundan sorumludur (Şekil 8) (Peelman ve ark., 2014, 2006, 2004). LEPR aktivasyonu ayrıca membran yakınlığında iki fibronektin tip III (FNIII) alanı gerektirir (Zabeau ve ark., 2004; Peelman ve ark., 2006; Fong ve ark., 1998). Hücre içi alan, JAK2'nin bağlanması için kinaz aktivitesi olmayan bir kutu 1 motifinden ve karşılıklı fosforilasyon ve sinyalleme kaskadlarının aktivasyonu için değişken sayıda tirozin tortusundan oluşur. LEPRb, üç tirozin kalıntısına (Y986, Y1079, Y1141) sahiptir ve STAT sinyallemesini indükleyebilen tek izoformdur (Peelman ve ark., 2014, Lee ve ark., 1996; Chen ve ark., 1996; Cioffi ve ark., 1996).



Şekil 8: LEPR yapısı

2.9.2 LEP ve LEPR Polimorfizmlerinin Olası Etkileri

LEP G2548A promoter polimorfizmi yakın özgüllük protein-1 (SP-1) transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi (Gong ve ark., 1996; Hoffstedt ve ark., 2002), insan yağlanmalarından türetilen çekirdek özütlerinin –2548G>A polimorfik bölgeyi kapsayan bir DNA parçasını bağlayabildiğini bildirdi. Bu nedenle *LEP*-2548G>A polimorfizminin *LEP* gen transkripsiyonunu ve ekspresyonunu etkileyebilmesi, dolayısıyla *LEP* sentezini ve adipoz doku tarafından salgılanmasını etkilemesi mümkündür (Cummings ve Schwartz, 2003; Hoffstedt ve ark., 2002).

LEPR ile ilgili olarak 668A/G polimorfizmiyle 223'te CGG'ye bir glutamini bir argine (Gln / Q'dan Arg / R'ye) dönüştürerek konservatif olmayan bir değişikliğe neden olur (Gotoda ve ark.,1997). *LEPR* 668A/G SNP, yükte değişikliklere, yani nötrden pozitifte yol açar ve *LEPR* geninin hücre dışı alanındaki *LEP* bağlama

bölgesinde bulunur. Bu nedenle, aminoasitteki değişiklikler, reseptörlerin tüm izoformlarını etkiler ve T2DM'ye duyarlılığı artırmak için yeterli olan bozulmuş sinyal transdüksiyonuna bağlanabilir (Yiannakouris ve ark., 2001).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTA PROFİLİ VE BİYOLOJİK GEREÇ ELDESİ

Bu çalışmaya 2009-2019 yılları arasında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniğinde muayene edilip infertilite tanısı almış, Y kromozomundaki mikrolelesyon analizi için kan örneği alınıp Tıbbi Biyoloji AD Laboratuvarında incelemesi yapıp herhangi bir mutasyon saptanamayan, rutin inceleme sırasında imzaladığı onam formunda “örnekler daha sonraki çalışmalarda anonim olarak kullanılabilir” onayı bulunan 137 hasta dahil edildi. Kontrol grubu ise, infertilite dışındaki herhangi bir nedenle Üroloji polikliniğine başvuran, çocuk sahibi olan, bilinen herhangi bir genetik veya kronik hastalığı olmayan, araştırmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden ve onam formunu imzalayan 100 erkek bireyden oluşmaktaydı. 19-KAEK-179 kayıt numaralı alışmamızın etik yönden uygulanabilir olduğuna 24.09.2019 tarihli GOPÜ etik kurulunda oy birliği ile karar verildi.Çalışmanın tamamı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı’nda Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi etik kurulu yönergeleri doğrultusunda yapıldı.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL GEREÇLER

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir.

1. Tris Base (Amresco)
2. Borik asit (Amresco)
3. EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit) (Amresco)
4. NaOH (Sodyum Hidroksit) (Riedel-de Haen)
5. Etidyum Bromid (Serva)
6. Loading dye (yükleme boyası) (Vivantis)
7. Primerler
8. Taq DNA Polimeraz enzimi (Gene Direx)
9. MspI restriksiyon enzimi (Thermo Scientific)
10. HhaI kesim enzimi (New England Biolabs)
11. Agaroz (Sigma, Prona)

12. dNTP mix (10mM) (Thermo Scientific)
13. pUC mix marker (Femantas)
14. DNA İzolasyon Kiti (İnvitrogen)

3.3. KULLANILAN CİHAZLAR VE TEKNİK MALZEMELER

Aşağıda listesi verilen ve bu çalışmada kullanılan cihazlar ve teknik malzemeler, araştırmanın yapıldığı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında bulunmaktadır.

1. Otoklav(HMC Hirayama, HV-25L)
2. Santrifüj (Mikro 120, Hettich Zentrifugen)
3. Hassas terazi (KERN, ABJ220-4M)
4. Vorteks (VELP Scientifica, F20220176)
5. Su banyosu (Memmert)
6. pH metre (İhanna, 507702)
7. Etüv(Memmert, Beschickung-Loading 100- 800)
8. Otomatik pipetler (Axygen)
9. PCR cihazı (Thermal Cycler) (5 Prime Thermal Cycler, 5PRİMEG102)
10. Yatay elektroforez tankı (Cleaver Scientific, MSCHOİCE)
11. Elektroforez güç kaynağı(Thermo Scientific, EC 300 x L)
12. Jel görüntüleme cihazı (Transilluminator)(QUANTUM-ST4, 1000/20M-09200806)
13. Bilgisayar (Exper, intelcore)
14. Buzdolabı (İndesit, Arçelik)
15. Derin dondurucu (Arçelik)
16. Mikrodalga fırın (Arçelik MD554)

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

Onay formu imzalatılan hasta ve kontrollerden 5'er ml EDTA'lı kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden İnvitrogen DNA izolasyon kiti yardımıyla DNA saflaştırıldı. Periferik kandan saflaştırılan DNA örneklerinden *LEP* ve *LEPR* genleri polimorfizm analizleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) ile gerçekleştirildi.

3.4.1. Kullanılan Solusyonlar ve Bunların Hazırlanması

5×TBE: 54 gr Tris, 27.5 gr Borik asit ve 20 ml EDTA 0.5M pH: 7.5 karıştırılıp bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

1×TBE: 100 ml 5×TBE solüsyonu üzerine 400 ml bidistile su eklendi. Oda ısısında saklandı.

Ethidium bromid solüsyonu(10mg/ml): 1 gr ethidium bromid, 10 ml distile su içinde çözündü. Işık almayan bir şişe içinde +4°C'de saklandı. Stok solüsyondan, çalışma solüsyonu 0.5mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

0.5M EDTA pH 7.5: 18.6 gr disodyum EDTA, 80 ml bidistile su içinde çözündü. Solüsyona 2 gr NaOH tableti atılarak eritildi. pH 7.5'a ulaşıncı bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildi ve +4°C'de saklandı.

3.4.2.Kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Protokol

1. EDTA içeren kan örneklerinden 200 µl kan 1.5 ml'lik ependrof tüplere alındı. Üzerine 20 µl proteinaz K ilave edildi ve vortekslendi.
2. 240 µl olan karışımın üzerine 200 µl Genomic/Lysis Binding Buffer ilave edilerek homojenizasyon için vorteksleme işlemi yapıldıktan sonra 55 derece sıcaklıktaki su banyosunda 10 dk bekletildi.
3. 440 µl olan karışımın üzerine 200 µl saf etanol (Merck, K3659586) ilave edildikten sonra homojen olana kadar vorteks yapıldı.

4. 640 µl olan karışım filtreli tüpe alınarak 11.000 rpm’de (dakikadaki devir) 1 dk vorteks yapıldı. Böylece DNA’nın filtrede kalması ve diğer moleküllerin filtreden süzülmesi sağlandı.
5. Filtre, temiz bir tüpe alınarak üzerine 500 µl Wash Buffer 1 (yıkama solüsyonu 1) ilave edildi ve 11.000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı.
6. Filtre tekrar temiz bir tüpe alınarak üzerine 500 µl Wash Buffer 2 (yıkama solüsyonu 2) ilave edilip 13.000 rpm’de 3 dk santrifüj yapıldı.
7. Filtre temiz bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 200 µl Elution Buffer (ayırıştırma tamponu) ilave edilip 1 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 13.000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılarak DNA’nın ependorfa sızması sağlandı. Sonuçta ependorf tüpte yaklaşık 20-50 ng/µl konsantrasyonda 200µl DNA elde edilmiş oldu.

3.4.3.LEP Geninin PCR-RFLP Yöntemleri ile Genotiplenmesi

LEP geni promotor bölgesi -2548’deki G>A polimorfizmi(rs7799039), PCR-RFLP yöntemi ile çalışıldı. *LEP* genindeki 242 bç’lik bölge için PCR analizi 5’-TTT CCT GTA ATT TTC CCA TGA G-3’ (forward) ve 5’-AAA GCA AAG ACA GGC ATA AAA A-3’ (reverse) primerleri kullanılarak yapıldı. Bu primerlerin, 23.351 nükleotidden oluşan ve 3 ekzon içeren *LEP* geni üzerindeki bağlanma bölgeleri Şekil 7’de belirtilmiştir.

LEP geni -2548G>A polimorfizmi, PCR yöntemi için yapılan optimisyon çalışmaları sonucunda 25 µl’lik reaksiyon karışımı içindeki girdilerin miktarları Tablo 6’da gösterildiği gibi belirlendi.

```

1861 aacacataac aaaaatcatc tctatggtgt gtgttggtcc tgggggtcaa ttcagcaaatt
1921 tttccctggg caccatgtg ttcttggtac tggaaaagta ccgggactga aacagttgat
1981 ggcccaatcc ctgtcctctt aaaacctaag ggaggagatg gaaaggggca cccaaccag
2041 actgagagac aggaattagc tgcaagggga actaggaaaa gcttctttaa ggatggagag
2101 gccctagtgg aatggggaga ttcttcggg agaagcgatg gatgcacagt tgggcatccc
2161 cacagacgga ctggaaagaa aaaaggcctg gaggaatcaa tgtgcaatgt atgtgtgttc
2221 cctggttcaa gggctgggaa ctttctctaa agggccaggt agaaaacatt ttaggtcttc
2281 taagccaagg caaaattgag gatattacat gggacttat acaacaagaa taaacaattt
2341 acacaatttt ttgttgacag aattcaaaac tttatagaca cagaaatgca aatttctgtg
5'
2401 aattttccca tgagaactat tcttcttttg tttgttttg cgacagggtt gcgctgatcc
forward primer 3' polimorfik bölge
2461 tcccgctca gtctccctaa gtgctgagat gttgcaggaa gtcagggacc ccgaacagag
2521 agatcggtg gagccgtggc agaggaacat aaattttgaa gatttcattt taatatggac
2581 acttatcagt tcccaaataa tacttttata attttttatg cctgtctttg ctttaattctc
3' reverse primer 5'
2641 ttaatcctgt tatcttcata agctaaggat gtacgtcacc tcaggaccac tgtgataatt
2701 gtgttaactg tacagattga ttgcaaaaca tgtgtgtttg aacaatatga aatcagtgc
2761 ccttgaaaaa gagcagaata acagcaattt ttagggaaca aggggaagaca actataaggt
2821 ctgactgcct gcggggtcgg gcaaagggag ccatattttt cttcttgag agagcctata
2881 aatagacctg caagtaggag agatattgct aatttctttt gctagcatgg aatattaata
2941 ttaacaccct gggaaaggaa tgcatctcct gggggagggtc tataaatggc cgctctggga
3001 atgtctatcc tacgcaatgg agataaggac tgagatacgc cctggtctcc tgcagtaccc
3061 tcaggcttac tagggtggtg aaaaactccg ccctggtaaa tttgtgtgca gaccagtttt
3121 ctgctctcga aactgtttt ctgttggtta agatgtttat caagacaata cgtgcaccgc
3181 tgaacacaga cccttatcag tagttctcct ttttgccctt tgaagcatgt gatctactcc

```

Şekil 9: *LEP* geni genomik DNA dizisinin bir kısmı ve bu gene ait bölgeyi çoğaltmada kullandığımız primerlerin gen üzerindeki bağlanma bölgeleri ile -2548G>A polimorfik bölgesi

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007450.1?from=5001&to=21352&report=genbank)

Tablo 6: *LEP* geni-2548G>A polimorfizmi PCR'ı için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı

PCR bileşeni (stok)	25 µl karışımdaki miktar	Final konsantrasyon
10×PCR buffer	2.5 µl	1xPCR buffer
dNTP mix (10mM)	0.5 µl	200 µM
Primer forward (20 pmol)	1 µl	20 pmol
Primer reverse (20 pmol)	1 µl	20 pmol
Genomik DNA	2 µl	
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0.2 µl	1U
Steril bidistile su	17.8 µl	
Toplam	25 µl	

Reaksiyon karışımları ve elde edilen DNA'lar PCR tüplerine konduktan sonra PCR cihazına yerleştirildi. En uygun PCR amplifikasyon koşulları, optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlendi. Amplifikasyon koşulları; 94°C' de 4dk ilk denatürasyon, 30 döngülük: 94°C' de 45 sn denatürasyon, 52°C' de 45 sn hibridizasyon, 72°C'de 45 sn uzama ve son olarak 72°C' de 5 dk son uzama şeklinde gerçekleştirildi. *LEP* geni -2548G>A polimorfizmine ait PCR ürünleri etidium bromid ile boyanmış %2'lik agaroz jelde yürütülerek 242 bp büyüklüğündeki ürün bandı gözlemlendi. Amplifikasyondan sonra PCR ürünlerinin her biri Tablo 7'de belirtilen reaksiyon karışımı oluşturulup tanıma bölgesi 5'...GCG↓C...3' ve 3'...C↑GCG...5' şeklinde olan *HhaI* kesim enzimi ile 37°C' de 15 saat kesime bırakıldı.

Tablo 7: *LEP* geni-2548G>A polimorfizmi RFLP analizi için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı

RFLP bileşeni (stok)	15 µl karışımdaki miktar	Final konsantrasyon
10xNE Buffer 4	1.5 µl	1xNE Buffer 4
BSA (10mg/ml)	0.15 µl	100 µg/ml
<i>HhaI</i> kesim enzimi (20U/µl)	0.25 µl	5U
PCR ürünü	10 µl	
Steril bidistile su	3.1 µl	
Toplam	15 µl	

RFLP ürünleri, etidium bromid ile boyanmış %3'lük jelde 22 dk yürütülerek görüntülendi. Kesim sonucunda oluşan parçalar aşağıdaki gibi yorumlandı.

Gözlenen fragment boyları

AA (yabanıl) homozigot:	242 bç
GA heterozigot:	242 bç, 182 bç, 60 bç
GG (varyant) homozigot:	182 bç, 60 bç

3.4.4. LEPR Geninin PCR-RFLP Yöntemi ile Genotiplenmesi

LEPR geni Q223R polimorfizmi(rs1137101), PCR-RFLP yöntemi ile çalışıldı. *LEPR* genindeki 80 bç'lik bölge için PCR analizi 5'-AAA CTC AAC GAC ACT CTC CTT-3' (forward) ve 5'-TGA ACT GAC ATT AGA GGT GAC-3' (reverse) primerleri kullanılarak yapıldı. Bu primerlerin 227.995 nükleotidden oluşan ve 24 ekzon içeren *LEPR* geni üzerindeki bağlanma bölgesi Şekil 8'de belirtilmiştir.

LEPR geni Q223R polimorfizmi PCR yöntemi için yapılan optimisyon çalışmaları sonucunda 25 µl'lik reaksiyon karışımı içindeki girdilerin miktarı Tablo 8'de gösterildiği gibi belirlendi.

```
176401 gttttattat tttagtgggt gctttagcat ttataatatt tgccttcaat ttattatagt
176461 ccaagagata gtatacctct aagtgatatc ataccacttc gtgtaagaac attacaaatt
176521 tctccctcc caagcttggt actaatgcc tacattttac tttacctac gttgtaaaact
176581 ccacaccacg gatctattat ttttgcttta aacaatcaat aaatatttat cattttagtt
176641 aaatttaatt tctttgtgtg aaaccacatt tctatctgct gtcatttttt tttttttttt
176701 tttgcctgat ggattgcctt tagcattttt tatagtgcac gtctgatggt gacgaattat
176761 ttttgctttg gtatgtctga aaaaaaagc ctttatttca tcattatttt gaaagctggt
176821 ttcgctgggt ataggatttt agaattgcag tttttctttt atttttagtac ttcactttta
176881 cgtcattatc tttttgctta tggtattcct gatgattaac ctgctgtaat ctttatcttt
176941 gttttttctaa tgtagggttt ttttttttca gatacccttt aagctgggtg tcccaaatag
177001 tttacttcaa ttagtattta gtatcctgct ttaaaagcct atccagtatt ttcatatctg
177061 ttttaaatatt tagctcttat ttttcaatat aggcctgaag tgtagaaga ttcacctctg
177121 gttccccaaa aaggcagttt tcagatgggt cactgcaatt gcagtgttca tgaatgttgt
177181 gaatgtcttg tgccgtgtgc aacagccaaa ctcaacgaca ctctccttat gtgtttgaaa
                    5' forward primer 3'
```

```
177241 atcacatctg gtggagtaat tttccagtca cctctaattgt cagttcagcc cataaatatg
                    polimorfik 3' reverse primer 5'
                    bölge
```

```
177301 ggtaagttat gcactaaaat gatgataata ggtctaaaca tcagtcatat ataaaggtta
177361 aaaattgctt acaaaaatat ttgctagctt atctcacttt gcttaacact gtaatgatgg
177421 tagatgtagt actgggggta ttaagagtgg cttctagaat gatttaacaa tgggtatgtat
177481 atctctgcc a ttgtcactta aattctgttt tgaaaaactgt tttctttcaa tccctggatct
177541 atgtaatgga tgtatattga ttggatatca ctttttcaca tctcagataa ctatttttga
177601 aaatagtagc atgtttcttg cctgaattta ttccttcaat aaatattttct tagaggctca
177661 tgtttgctag agactgctcc aggagctgga aaaagagtgg gacattagac atagttccca
177721 cctcagagag cagggacaaa caatagtagg cagagacaat gataaaagag taaatgagta
177781 atttactgta caaacatgat tacaaaaaac ttcaataat agacaacact ctgttttctt
```

Şekil 10: *LEPR* geni genomik DNA dizisinin bir kısmı ve bu gene ait bölgeyi çoğaltmada kullandığımız primerlerin gen üzerindeki bağlanma bölgeleri ile Q223R polimorfik bölgesi

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_015831.2?from=5088&to=221929&report=genbank)

Tablo 8: *LEPR* geni Q223R polimorfizmi PCR'ı için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı

PCR bileşeni (stok)	25 µl karışımdaki miktar	Final konsantrasyon
10×PCR buffer	2.5 µl	1xPCR buffer
dNTP mix (10mM)	0.5 µl	200 µM
Primer forward (20 pmol)	1 µl	20 pmol
Primer reverse (20 pmol)	1 µl	20 pmol
Genomik DNA	2 µl	
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0.2 µl	1U
Steril bidistile su	17.8 µl	
Toplam	25 µl	

Reaksiyon karışımları ve elde edilen DNA'lar PCR tüplerine konulduktan sonra PCR cihazına yerleştirildi. En uygun PCR amplifikasyon koşulları, optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlendi. Amplifikasyon koşulları; 95°C' de 3 dk ilk denatürasyon, 35 döngülük: 95°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C'de 38 sn hibridizasyon, 72°C'de 45 sn uzama ve son olarak 72°C'de 5 dk son uzama şeklinde gerçekleştirildi. *LEPR*'ye ait olan PCR ürünleri etidium bromid ile boyanmış %2'lik jelde 12 dk yürütülerek 80 bç büyüklüğünde ürün bandı gözlemlendi. Amplifikasyondan sonra *LEPR*'ye ait PCR ürünlerinin her biri Tablo 9'da belirtilen reaksiyon karışımı oluşturulup tanıma bölgesi 5'...C↓CGG...3' ve 3'...GGC↑C...5' şeklinde olan *MspI* kesim enzimi ile 37°C'de 15 saat kesime bırakıldı.

Tablo 9: *LEPR* geni Q223R polimorfizmi RFLP analizi için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı

RFLP bileşeni (stok)	15 µl karışımdaki miktar	Final konsantrasyon
10xBuffer Tango	1.5 µl	1xBuffer Tango
<i>Msp</i> I (10U/µl)	0.5 µl	5U
PCR ürünü	10 µl	
Steril bidistile su	3 µl	
Toplam	15 µl	

RFLP kesim ürünleri, etidium bromid ile boyanmış %3.5'luk agaroz jelde 25dk yürütülerek görüntülendi. Kesim sonucunda oluşan parçalar aşağıdaki şekilde yorumlandı.

Gözlenen fragment boyları

QQ (yabanıl) homozigot:	80 bç
QR heterozigot:	80 bç, 57 bç, 23 bç
RR (varyant) homozigot:	57 bç, 23 bç

3.4.5. Agaroz Jelin Hazırlanması

Çalışmamız için %2'lik, %3'lük ve %3.5'luk agaroz jeller hazırlandı. Bunlar için sırasıyla 2 gr, 3 gr ve 3.5 gr agaroz tartıldı. Ayrı erlen mayerlere alınan agarozların üzerine 100 ml 1xTBE eklenerek iyice çözünmesi için mikrodalga fırına alınıp 1 taşım kaynatıldı. Daha sonra soğumaya bırakılan jeller 80°C'ye ulaşınca üzerlerine sırasıyla 2.5 µl, 3.5 µl ve 4 µl EtBr (0.5 mg/ml'lik çalışma solüsyonundan) eklendi ve jel iyice karıştırılıp tarakları yerleştirilmiş olan jel kaplarına döküldü. Jeller iyice donduktan sonra taraklar çıkarılarak jelde oluşan kuyulara PCR ürünleri yüklendi.

3.4.6. Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

15 µl PCR ürünü ve RFLP ürünü 3 µl loading dye ile karıştırılarak jeldeki kuyulara yüklendi. Kuyulardan birisine 3 µl pUC Mix marker (moleküler belirteç) yüklendi. Elektroforez 125 volt'da sırasıyla PCR (*LEP* geni için 22dk, *LEPR* geni için 12dk), RFLP (*LEP* polimorfizmi için 22dk, *LEPR* polimorfizmi için 25dk) süreyle yapıldı. Elektroforez sonunda, DNA'ların ve moleküler belirteçlerin gittikleri mesafelerin ve DNA fragment uzunluklarının hesaplanması için jel fotoğrafları, UV görüntü analiz sisteminde çekildi.

3.5 İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

IBM SPSS İstatistik Paket Program Versiyon 20.0 ve Openepi 3.01 (www.openepi.com) yazılım programları kullanılarak klinik bulgular ile genotipler arasında bağıntı(korelasyon) analizi yapıldı. Bir de hasta ve kontrol grupları arasındaki allel ve genotip frekanslarını karşılaştırmak üzere Ki kare, OR(olasılık oranları) ve p değeri hesaplandı. Ayrıca kompozit genotip analizi Ki kare testi ile yapıldı. Elde edilen sonuçlara bakılarak infertilitenin polimorfik bölgeler ile ilişkisi olup olmadığı değerlendirildi.

4. BULGULAR

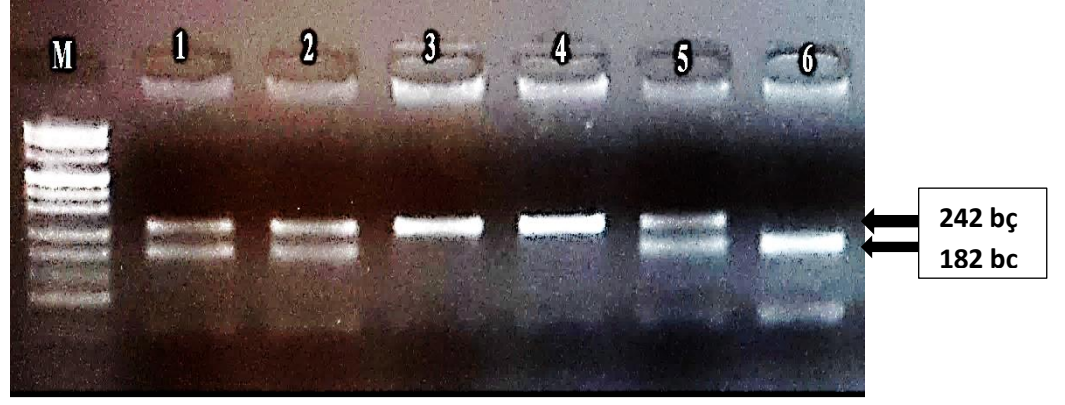
4.1. ÇALIŞMA GRUBU İLE İLGİLİ DEMOGRAFİK KAREKTERLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada, *LEP* (-2548G>A) ve *LEPR*(Q223R) polimorfizmlerinin infertilite ile olan ilişkisinin araştırılması amacıyla 137 infertil erkek hasta ile kendisinde ve ailesinde infertilite öyküsü olmayan sağlıklı ve 18 yaş üstü 100 erkek kontrol incelendi. Hastaların yaş ortalaması 32,39±6,682 (en düşük 17, en yüksek 54), kontrollerin yaş ortalaması ise 41,52±7,826 (en düşük 20, en yüksek 60) idi.

4.2. *LEP* GENİ POLİMORFİZMİ

LEP geni -2548 G>A polimorfizmi analizi için çalışılan 137 hastanın 24'ünün (%17.5) GG homozigot, 61'inin (%44.5) GA heterozigot, 52'sinin (%38.0) AA homozigot; 100 kontrolün ise 10'unun (%10.0) GG homozigot, 51'inin (%51.0) GA heterozigot, 39'unun (%39.0) AA homozigot genotipe sahip olduğu tespit edildi (Tablo 10). Kontrol ve hasta grubunun genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında da infertilite ile *LEP* geni -2548 G>A polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (sırasıyla p=0.246 ve p=0.343). Genotiplerden, GG'ye karşılık GA+AA veya GG+GA'ya karşılık AA karşılaştırıldığında da hasta ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi (sırasıyla p=0.103 ve p=0.870) (Tablo 10). Kontrol ve hasta grubunun SNP dağılımı, Hardy-Weinberg Dengesi (HWE) ile uyum içindeydi (sırasıyla p=0.256 ve p=0.408).

PCR-RFLP yöntemleri ile çalışılan örneklerin bazılarının genotiplerini gösteren jel fotoğrafları Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11: *LEP*(-2548 G>A) geni RFLP sonuçları. 1, 2, ve 5. kuyu GA heterozigot genotipi, 3. ve 4. kuyu AA homozigot genotipi, 6. kuyu GG homozigot genotipi göstermektedir. M: pUC Mİx Marker.

Tablo 10: *LEP* geni -2548G>A polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının hasta ve kontrollerde karşılaştırılması

Polimorfizm	Hastalar (n=137) (%)	Kontroller (n=100) (%)	P	OR (%95 CI)
<i>LEP</i> (-2548				
G>A)	HWE p=0.408	HWE p=0.256		
Genotip				
GG	24 (17.5)	10 (10.0)	0.246	
GA	61 (44.5)	51 (51.0)		
AA	52 (38.0)	39 (39.0)		
GG : GA+AA	113 : 24	90: 10	0.103	0.52 (0.24 - 1.15)
GG+GA : AA	52 : 85	39 : 61	0.870	0.96 (0.56 - 1.62)
Allel				
G	165 (60.2)	129 (64.5)	0.343	0.83 (0.57 - 1.21)
A	109 (39.8)	71 (35.5)		

Hastaların yaş ve klinik özellikleri (FSH, LH, Prolaktin, Estradiol, Total testesteron) ile *LEP* geni -2548G>A polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı (p>0,05) (Tablo 11).

Tablo 11. Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin *LEP* -2548G>A polimorfizmine göre değerlendirilmesi

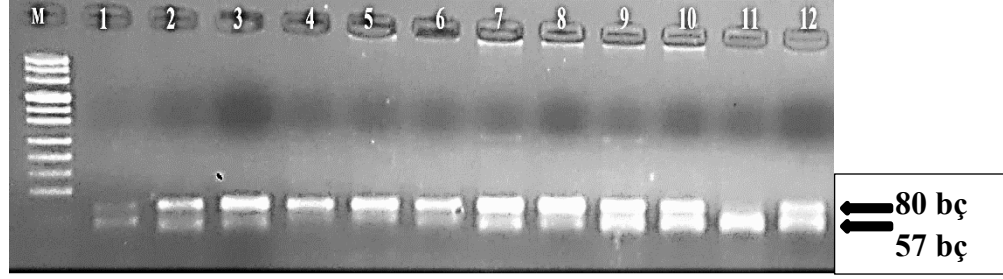
<i>LEP</i> -2548G>A					
Klinik özellikler	Total n=137	GG n=24	GA n=61	AA n=52	P değeri
Yaş ortalaması (yıl)	32,34±6,68	33,13±5,22	32,36±7,48	32,08±6,35	0,819
FSH (IU / L)	15,57±17,54	20,41±17,48	14,56±17,11	14,48±18,16	0,400
LH (IU / L)	8,59±7,72	10,85±6,67	7,81±6,32	8,42±9,34	0,331
Prolaktin (ng/ml)	11,24±6,15	12,34±7,64	12,16±6,06	9,56±5,13	0,170
Östrodiol (pg / mL)	23.90±13,29	22,42±11,47	24,16±13,08	24,09±14,67	0,946
Total Testesteron (ng / mL)	3,64±2,25	3,33±1,19	3,68±2,54	3,75±2,31	0,787

Veriler varyans analiziyle değerlendirildi. Yaş, FSH, LH, Prolaktin, Östrodiol, Total testesteron için ortalama ± standart sapma değerleri verildi. FSH: Folikül uyarıcı hormon, LH: Lüteinleştirici hormon

4.3. *LEPR* GENİ POLİMORFİZMİ

LEPR (Q223R) geni polimorfizmi çalışılan 137 hastanın 49'nun (%35.8) QQ homozigot, 72'sinin (%52.6) QR heterozigot, 16'sının (%11.7) RR homozigot; 100 kontrolün ise 42'sinin (%42.0) QQ homozigot, 48'inin (%48.0) QR heterozigot, 10'nun (%10.0) RR homozigot genotipe sahip olduğu tespit edildi. Kontrol ve hasta grubunun genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında da infertilite ile *LEPR* geni Q223R polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (sırasıyla p=0.616 ve p=0.376). Genotiplerden, QQ'ya karşılık QR+RR veya QQ+QR'ye karşılık RR karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi (sırasıyla p=0.330 ve 0.683) (Tablo 12). Kontrol ve hasta grubunun SNP dağılımı, HWE ile uyum içindeydi (sırasıyla p=0.487 ve p=0.175)

PCR-RFLP yöntemleri ile çalışılan örneklerin bazılarının genotiplerini gösteren jel fotoğrafları Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12: *LEPR* (Q223R) gen polimorfizmi RFLP sonuçları. 1, 2, 3, 6,7, 8, 9, 10 ve 12. kuyular QR heterozigot genotipi, 4 ve 5. kuyular QQ homozigot genotipi, 11. Kuyu ise RR homozigot genotipi göstermektedir. M: pUC Mix Marker.

Tablo 12: *LEPR* geni Q223R polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının hasta ve kontrollerle karşılaştırılması

Polimorfizm	Hastalar (n=137) (%)	Kontroller (n=100) (%)	P	OR (%95 CI)
<i>LEPR</i> (Q223R)				
HWE p=0.175 HWE p=0.487				
Genotip				
QQ	49 (35.8)	42 (42.0)	0.616	
QR	72 (52.6)	48 (48.0)		
RR	16 (11.7)	10 (10.0)		
QQ : QR+RR	88 : 49	58 : 42	0.330	1.3 (0.76 - 2.21)
QQ+QR : RR	16:121	10:90	0.683	1.19 (0.52 - 2.74)
Allel				
Q	104 (38.0)	68 (34.0)	0.376	1.19 (0.81 - 1.74)
R	170 (62.0)	132 (66.0)		

Hastaların yaş ve klinik özellikleri (FSH, LH, Prolaktin, Estradiol, Total testesteron) ile *LEPR* geni Q223R polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı ($p>0,05$) (Tablo 13).

Tablo 13. Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin *LEPR* Q223R polimorfizmine göre değerlendirilmesi

<i>LEPR</i> Q223R					
Klinik özellikler	Total n=137	QQ n=24	QR n=61	RR n=52	P değeri
Yaş ortalaması (yıl)	32.39±6.68	31.73±6.43	32.90±7.15	32.06±5.25	0.630
FSH (IU / L)	15.57±17.54	19.25±22.08	12.90±13.15	15.89±17.87	0.208
LH (IU / L)	8.59±7.72	9.97±10.02	7.70±6.06	8.25±5.54	0.353
Prolaktin (ng/ml)	11.24±6.15	10.86±6.51	11.37±5.52	11.92±7.63	0.874
Östrodiol (pg / mL)	23.90±13.29	24.06±13.90	22.62±12.84	29.08±14.03	0.516
Total Testesteron (ng / mL)	3.64±2.25	3.59±2.76	3.57±2.00	4.14±1.53	0.704

Veriler varyans analiziyle değerlendirildi. Yaş, FSH, LH, Prolaktin, Östrodiol, Total testesteron için ortalama ± standart sapma değerleri verildi. FSH: Folikül uyarıcı hormon, LH: Lüteinleştirici hormon

4.4 *LEP* ve *LEPR* GEN POLİMORFİZMLERİ KOMPOZİT GENOTİP ANALİZLERİ

Kompozit genotip analizinde, ikili genotiplerden *LEP* geni -2548 G>A / *LEPR* geni Q223R polimorfizmleri kompozit genotip sıklıkları hasta ve kontroller arasında karşılaştırıldı (Tablo 14).

13 örnekte görülen GG/QR kompozit genotipinin 12'si (%8.8) hastalarda, 1'i (%1.0) ise kontrollerde bulunmaktaydı (Tablo 14). Hasta ve kontroller karşılaştırıldığında GG/QR kompozit genotipinin, hastalarda

kontrollere göre yaklaşık 8 kat daha fazla görüldüğü ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (p=0.007).

Tablo 14. İnfertilite Hasta ve Kontrol Gruplarının İki Yönlü SNP-SNP Etkileşimlerinin Genotip Kombinasyonları ile İlişkili “p” Değerleri (Kompozit Genotip Analizi)

Hasta(n=137)		Kontrol(n=100)		p	
Genotip	n	%	n	%	
-2548G>A / Q223R					
GG/QQ	8	5,8	8	8	0,53
GG/QR	12	8,8	1	1	0,007
GG/RR	4	2,9	1	1	0,360
GA/QQ	25	18,2	21	21	0,597
GA/QR	31	22,6	22	22	0,909
GA/RR	5	3,6	8	8	0,146
AA/QQ	16	11,7	13	13	0,759
AA/QR	29	21,2	25	25	0,487
AA/RR	7	5,1	1	1	0,093

Veriler Ki-Kare analiziyle değerlendirildi. Kompozit genotip sonucunda anlamlı fark bulunan veri koyu renkte yazılmıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma, *LEP* geni -2548G>A polimorfizmi ve *LEPR* geni Q223R polimorfizmi ile infertilite arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapıldı.

LEP'in hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksenini düzenleyerek erkek üreme sistemi ve sperm fonksiyonu üzerinde etkileri olduğu belgelenmiştir (Gonzalez - Añoover ve ark.,2011;Aquila ve ark., 2008).

LEP'nin gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinizan hormon (LH) üzerindeki uyarıcı etkileri çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Cunningham ve ark., 1999; Ponzio ve ark., 2004).

Clement ve arkadaşlarının ayrıca Strobel ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar sonucunda *LEP* veya *LEPR* eksik farelerin infertil olduğu ve düşük gonadotropin seviyelerine sahip olduğu da belgelenmiştir (Clément ve ark.,1998; Strobel ve ark., 1998).

Akhter ve arkadaşları 2014'de kadınlara kıyasla erkeklerin gonadotropik hücrelerde *LEPR*'nin silinmesine daha az duyarlı olduğunu ve *LEPR*'nin mutant gonadotropinleri olan erkeklerde doğurganlık için daha az anlamlı olduğunu bildirmişlerdir.

Erkek üreme sisteminde, *LEP* ve *LEPR* proteini ve mRNA, *LEP*'nin olası parakrin ve otokrin etkilerini gösteren seminifer tübüllerde, Sertoli, Leydig ve testiküler germ hücrelerinde, hücre zarı ve kuyruğunda, seminal plazmada, prostat bezinde ve seminal vezikülde tespit edilmiştir (Ishikawa ve ark., 2007; Joep ve ark., 2003; Dhanoa ve ark., 2015). Ayrıca, bazı çalışmalar *LEP* ve / veya *LEPR* arasındaki testis hacmi, testosteron (T), spermatogenez, sperm sayısı, motilite ve kapasitasyon ile ilişki olduğunu bildirmiştir (Aquila ve ark., 2008; Ishikawa ve ark., 2007; Lampiao ve Du Plessis, 2008). Bununla birlikte, bazı çalışmalar *LEP* ile T düzeyleri ve sperm motilitesi ve sayısı gibi erkek üreme göstergeleri arasında ters korelasyonların olduğunu göstermiştir

(Ishikawa ve ark.,2007;Glander ve ark.,2002;Dhanoa ve ark.,2015;Karimova, 1982).

Jahan ve arkadaşları 2011 de yaptıkları çalışmalarda infertil erkek hastalarda yüksek konsantrasyonda LEP bulmuştur (Jahan ve ark.,2011).

Daha önce ki çalışmalar, LEP'nin üreme sistemi üzerindeki fonksiyonel etkileşim alanlarını incelemiştir. Hipotalamus, üreme eksenindekiLEP için ana hedef olduğu söylenmiştir (Hausman ve ark.,2012).

Strobel ve arkadaşları, *LEP* geninin düzenleyici bölgesindeki genetik varyasyonun, LEP seviyesini ve erkek fertilitasını etkileyebilir olabileceğini söylemiştir (Strobel ve ark.,1998).

Clement ve arkadaşları ise, *LEP* geninde mutasyonu olan bireylerin kısır olduğunu, *LEPR* gen mutasyonu olan hastalarda pubertal gelişimin olmadığını bildirmiştir (Clément ve ark.,1998).

LEP'in erkek üreme sistemi üzerindeki metabolik etkileri de incelenmiştir. Martins ve arkadaşları 2015'deLEP'nin insan sertoli hücrelerinin asetat üretimi ve glikolitik aktivitesi üzerindeki modülatör rolünü bildirmiştir. Normal spermatogenez için sertoli hücrelerinin glikolitik aktivitesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. LEP ve LEPR'nin sertoli hücrelerinin metabolik durumunu doğrudan modüle edebileceğini ve böylece spermatogenezi etkileyebileceğini bildirmişlerdir (Martins ve ark.,2015). LEP ve reseptörü için bu yeni rol, erkek kısırlığı ve obezite arasındaki bağlantıyı açıklayabilir. Özellikle, obezite ile indüklenen hormonal düzensizlik, erkek doğurganlığının azalması ile ilişkilendirilmiştir (Alves ve ark.,2016).

LEP geninin ortak promotör bölgesi polimorfizmlerinden biri -2548G>A'dır (rs7799039). Yapılan çalışmalar, bu polimorfizm ile dolaşımdaki LEP ve LH konsantrasyonları, yağ dokusu, mRNA ve salgı seviyeleri arasında anlamlı ilişkiler olduğunu bildirmiştir (Yiannakouris ve ark.,2003; Su ve ark., 2012; Hoffstedt ve ark., 2002).

Saeid Khosropour ve arkadaşlarının 2016'da İran populasyonunda yaptığı çalışmaya göre, *LEP* -2548G>A polimorfizminin değerlendirilmesi, fertil ve infertil erkeklerde *LEP* -2548G>A genotiplerinin sıklığının istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermiştir. AA genotipinin sıklığının infertil grupta fertil bireylere göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak, infertil grupta fertil gruba göre daha düşük AG taşıyıcıları görülmüştür. Lojistik regresyon analizine dayanarak, AG genotipi koruyucu bir etkiye sahip olabileceği ve muhtemelen erkek kısırlığı riskini yaklaşık 3 (1 / 0.326) kat azaltılabilir olabileceğini düşündürmüştür. Önceki çalışmalar AA genotipi olan erkeklerde *LEP* düzeyinin AG genotipini taşıyan erkeklerden daha yüksek olduğunu göstermiştir (Mammes ve ark.,2000). Ayrıca, *LEP* ekspresyonunun sperm sayıları ile negatif korelasyonu bildirilmiştir (Ishikawa ve ark.,2007). Bizim yaptığımız çalışma sonucunda ise, kontrol ve hasta gruplarında *LEP* -2548G>A genotiplerinin sıklığı istatistiksel olarak farklı değildi. Ayrıca, kontrol ve hasta grubunun genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Ek olarak 668A/G, 668. pozisyonda adenin (A)'nin guanin (G) ile ifade edildiği *LEPR* gen polimorfizmidir. Bu polimorfizm, kortikotropin salıcı hormon reseptörü 1 (reseptör CRH1)'in hücre dışı alanında bir değişikliğe yol açar, böylece 223. pozisyonadaki glutamin (Q) (Gln223Arg, rs1137101) arginin (R) ile değiştirilir. CRH1 alanı *LEPR* aktivitesinde ve doğru katlanmasında rol oynar, bu nedenle Gln223Arg polimorfizmi gibi bu alandaki herhangi bir değişiklik *LEP* sinyallemesini etkileyebilir olduğu gözlemlenmiştir (Saukko ve ark.,2010; Peelman ve ark., 2006). Çalışmalar, bu polimorfizmin *LEP* direncine neden olan *LEP* için azalan bağlanma afinitesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Hoffstedt ve ark.,2002).

Saeid Khosropour ve arkadaşlarının 2016'da İran populasyonunda yaptığı çalışmaya göre, *LEPR* Gln223Arg bölgesi, QQ, QR ve RR genotiplerinin fertil ve infertil gruplardaki frekansları istatistiksel olarak farklı değildi. Ayrıca, polimorfik alellerin iki grup arasında dağılımında anlamlı bir fark yoktu. Ayrıca lojistik regresyon analizi, erkek kısırlığı ile *LEPR* Gln223Arg

polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki göstermemiştir. Bu sonuçlar *LEPR* Gln223Arg polimorfizminin erkek fertilitesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını düşündürmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada da benzer şekilde *LEPR* Q223R bölgesinde kontrol ve hasta gruplarında genotip sıklığı farklı değildi. Kontrol ve hasta grubunun genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Saeid Khosropour ve arkadaşlarının 2016'da İran popülasyonunda yaptığı çalışmada *LEPR*'nin QQ ve QR genotip taşıyıcılarına kıyasla RR genotipini taşıyan erkeklerde progresif hareketli sperm yüzdesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu gözlemlere uygun olarak (Jope ve ark.,2003), insan spermatozoasının kuyruğundaki *LEPR*'nin immünohistokimyasal lokalizasyonunu rapor etmişlerdir. Kuyruk segmentinin fonksiyonları sperm motilitesi için kritik olduğundan, *LEPR* polimorfizminin sperm hücresi hareketini etkileyebileceği gözlemlenmiştir. Yiannakouris ve arkadaşları bu polimorfizmin motiliteyi etkilemesi için iki olasılık olduğunu düşünmüşlerdir. İlk olasılık, bir Gln223Arg polimorfizmi *LEPR*'nin hücre dışı alanının segment kodlamasında bulunduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, 223. pozisyonda glutamin (Q, nötr yük) yerine arginin (R, pozitif yük) kullanılması *LEPR* işlevini, sinyalleme kapasitesini değiştirmesi ve hareketliliği arttırdığı düşünülmüştür (Yiannakouris ve ark.,2001). İkinci olasılık ise, bu polimorfizm belki de leptin bağlanma yeri içeren ve LEP direncine neden olan LEP için azalan bağlanma afinitesi ile ilişkili olan *LEPR*'nin hücre dışı segmentinde bulunduğu düşünülmüştür (Yiannakouris ve ark.,2001). LEP ile sperm motilitesi arasında ters bir korelasyon olduğu, LEP direncinin *LEPR* aracılı bozulma ile oluşturulabileceği üzerine yorumlamalar yapılmıştır (Gonzalez-Bulnes ve ark.,2012). Ayrıca, insan üreme bozuklukları ile leptin direnci arasında bir ilişki gözlemlenmiştir (Gonzalez-Añover ve ark., 2011). Bu nedenle RR genotipi olan bireyler LEP'den daha az etkilenebilir ve bu nedenle daha yüksek sperm motilitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca, bizim yaptığımız çalışmada kompozit gen analizinde, ikili genotiplerden *LEP* -2548G>A / *LEPR* Q223R genleri GGQR kompozit genotipinin görüldüğü 13 örneğin 12'sini (8.8%) hastalar, 1'ini (1%) ise kontroller oluşturmaktaydı.

Hasta ve kontroller karşılaştırıldığında GGQR kompozit genotipinin hastalarda kontrollere göre yaklaşık 8 kat daha fazla görüldüğü ve infertiliteye yatkınlığına sebep olabileceği saptandı ($p=0,007$)

İnfertilitede *LEP* ve *LEPR* gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bu çalışma, literatür tarama sonuçlarına göre dünyada 3. , Türkiye’ de ise tek ve özgün çalışmadır.

İnfertilitede, *LEP* ve *LEPR* gen polimorfizmlerinin analizi, bunların hastalığa yatkınlıkla ve ciddiyetle ilişkisinin belirlenmesi, hastalık etiyolojisi ve riskini önceden tespit etmek ve yeni tedavi yöntemleri geliştirmek konularında bizlere fayda sağlayabilecektir.

Sonuç olarak; dünya ve ülkemiz genelinde, infertil hastalarda *LEP* ve *LEPR* gen polimorfizmleriyle ilgili çalışmaların daha geniş çaplı olmasıyla beraber daha verimli ve kesin sonuçların elde edileceği kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Fahmy I, Kamal A, Tawab NA, et al. Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. *Fertil Steril*. 1997;68(1):108–11.
- Abraham BK, Adithan C. Genetic polymorphism of CYP2D6. *Indian J Pharmacol*. 2001;33:147–169
- Agarwal A, Deepinder F, Cocuzza M, Agarwal R, Short RA, Sabanegh E, et al. Efficacy of varicocelelectomy in improving semen parameters: new meta-analytical approach. *Urology*. 2007;70(3):532–8.
- Aiman J, Griffin JE, Gazak JM, Wilson JD, MacDonald PC. Androgen insensitivity as a cause of infertility in otherwise normal men. *N Engl J Med*. 1979;300(5):223–7.
- Allison MB, Myers MG Jr. 20 Years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *J Endocrinol*. 2014;223(1): T25-T35
- Alves, M.G., Jesus T.T., Sousa, M., Goldberg, E., Silva, B.M., Oliveira, P.F. (2016) Male fertility and obesity: are ghrelin, leptin and glucagon-like peptide-1 pharmacologically relevant? *Curr Pharm* 22: 783–91.
- Anonim, 2007. Genome-Wide Human SNP Array 5.0 [online]. Available at: http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/genome_wide/genome_wide_snp_5.affx [Accessed on 20 March 2012]
- Anonim, 2014. <https://www.populermedikal.com/2014/07/14/erkek-ureme-sisteminin-yapisi/>
- Anonim. [https://encyclopedia.medicinfo.nl/spuitbuisje-\(ductus-ejaculatorius\)](https://encyclopedia.medicinfo.nl/spuitbuisje-(ductus-ejaculatorius))
- Anonim. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/27-1-anatomy-and-physiology-of-the-male-reproductive-system/>

- Anslinger K, Keil W, Weichhold G, Eisenmenger W. Y-chromosomal STR haplotypes in a population sample from Bavaria. *Int J Legal Med.* 2000;113:189–192
- Aquila, S., Rago, V., Guido, C., Casaburi, I., Zupo, S. and Carpino, A. (2008) Leptin and leptin receptor in pig spermatozoa: evidence of their involvement in sperm capacitation and survival. *Reproduction* 136: 23 –32.
- Arap M, Cocuzza M, Mesquita J, Arap S. Testicular torsion - Analysis of 30 cases comparing doppler ultrasound to pre operatory clinical diagnosis. *Acta Urol Port.* 2000;17:55–8.
- Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, et al. Late Hormonal Levels, Semen Parameters and Presence of Antisperm Antibodies in Patients Treated for Testicular Torsion. *J Androl.* 2007
- Artiga MJ, Saez AI, Romero C, Sanchez-Beato M, Mateo MS, Navas C, et al. A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol.* 2002;160:1371–1380
- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144– 3147.
- Bayer SR, Alper MM, Penzias AS. (2008) *Boston IVF İnfertilite El Kitabı.* (2.Baskı) (Çev. Işık Ahmet Zeki, Vicdan Kubilay) İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
- Becker EJ, Prillaman HM, Turner TT. Microvascular blood flow is altered after repair of testicular torsion in the rat. *J Urol.* 1997;157(4):1493–8.
- Betz A, Bassler G, Dietl G, Steil X, Weyermann G, Pflug W. DYS STR analysis with epithelial cells in a rape case. *Forensic Sci Int.* 2001;118:126–130
- Bhasin S, Ma K, Sinha I, Limbo M, Taylor WE, Salehian B. The genetic basis of male infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998;27(4):783–805, viii.

- Botting, B.J. (1992) Reproductive trends in the UK. In Templeton, A.A. and Drife, J.O. (eds), Infertility. Springer-Verlag, London, pp. 3-21
- Bourgeois JA, Coffey SM, Rivera SM, Hessel D, Gane LW, Tassone F, et al. A review of fragile X premutation disorders: expanding the psychiatric perspective. *J Clin Psychiatry*. 2009;70:852–862
- Bourne H, Stern K, Clarke G, Pertile M, Speirs A, Baker HW. Delivery of normal twins following the intracytoplasmic injection of spermatozoa from a patient with 47,XXY Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod*. 1997;12(11):2447–50.
- Burrows PJ, Schrepferman CG, Lipshultz LI. Comprehensive office evaluation in the new millennium. *Urol Clin North Am*. 2002;29(4):873–94.
- Cao L, Liu X, Lin EJ, Wang C, Choi EY, Riban V, Lin B, During MJ. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell*. 2010;142:52–64.
- Caprio M, Fabbrini E, Ricci G, Basciani S, Gnessi L, Arizzi M, Carta AR, De Martino MU, Isidori AM, Frajese GV, Fabbri A. (2003) Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells. *Biol Reprod* 68:1199–1207.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*. 1999;22:231–238
- Caron E, Sachot C, Prevot V, Bouret SG. Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. *J Comp Neurol*. 2010;518:459–476.
- Carpenter B, Hemsworth GR, Wu Z, Maamra M, Strasburger CJ, Ross RJ, Artymiuk PJ. Structure of the human obesity receptor leptin-binding domain reveals the mechanism of leptin antagonism by a monoclonal antibody. *Structure*. 2012;20(3):487–497.
- Casella R, Maduro MR, Misfud A, Lipshultz LI, Yong EL, Lamb DJ. Androgen receptor gene polyglutamine length is associated with testicular histology in infertile patients. *J Urol*. 2003;169(1):224–7.

- Chandley AC. Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as causal factors in male infertility. *Hum Reprod* 1998; 13:45-50.
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell*. 1996;84(3):491–495.
- Choi WS, Kim SW. Current Issues in Varicocele Management: a Review. *World J Mens Health*. 2013;Vol. 31, No. 1.
- Chua SC Jr, Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ, Chung WK, Leibel RL. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics*. 1997;45(2):264–270.
- Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med*. 1996;2(5):585–589.
- Claustres M. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(1):14–41.
- Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., et al. (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392: 398–401.
- Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stuppia L, Guanciali-Franchi P, Tiboni GM. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod*. 2005; 20(2): p. 437-42
- Cocuzza M, Agarwal A. Nonsurgical treatment of male infertility: specific and empiric therapy. *Biologics*. 2007;1(3):259–69.
- Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Pagani R, Sikka SC, Lucon AM, et al. Impact of clinical varicocele and testis size on seminal reactive oxygen species

- levels in a fertile population: a prospective controlled study. *Fertil Steril*. 2008;90(4):1103–8.
- Cocuzza M, Cocuzza MA, Bragais FM, Agarwal A. The role of varicocele repair in the new era of assisted reproductive technology. *Clinics*. 2008;63(3):395–404.
- Cocuzza M, Pagani R, Lopes RI, Athayde KS, Lucon AM, Srougi M, et al. Use of subinguinal incision for microsurgical testicular biopsy during varicocelectomy in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2009;91(3):925–8.
- Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, et al. Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:1009–1016
- Collins JA, Barnhart KT and Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?, *Fertility and Sterility*. 2007;vol.89,no.4
- Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010;464:704–712
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. . Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334(5):292–295.
- Coon KD, Myers AJ, Craig DW, Webster JA, Pearson JV, Lince DH, et al. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*. 2007;68:613–618
- Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol*. 1985;133(5):906–11.
- Cunningham. M.J., Clifton. D.K., and Steiner. R.A. (1999) Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 60: 216–222.

- Czaplicki M, Bablok L, Janczewski Z. Varicocelelectomy in patients with azoospermia. Arch Androl. 1979;3(1):51–5.
- Çiçek N. Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite. Ankara: Palme Yayıncılık 2007, 109-148.
- D.E. Cummings, M.W. Genetics and pathophysiology of human obesity Ann. Rev. Med., 54 (2003), pp. 453-471
- D.W. Gong, S. Bi, R.E. Pratley, B.D. Weintraub Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene J. Biol. Chem., 271 (1996), pp. 3971-3974
- Daehlin L, Ulstein M, Thorsen T, Hoisaeter PA. Follow-up after torsion of the spermatic cord. Scand J Urol Nephrol. 1996;179:139–42.
- Davis NF, McGuire BB, Mahon JA, Smyth AE, O'Malley KJ, Fitzpatrick JM. The increasing incidence of mumps orchitis: a comprehensive review. BJU Int. 2010;105(8):1060–5.
- Debruyne FM. Alpha blockers: are all created equal. Urology. 2000;56(5 Suppl 1):20–2.
- Denes FT, Cocuzza MA, Schneider-Monteiro ED, Silva FA, Costa EM, Mendonca BB, et al. The laparoscopic management of intersex patients: the preferred approach. BJU Int. 2005;95(6):863–7.
- Dhanao, J.K., Mukhopadhyay, C., Arora, J.S. and Kaur, S. (2015) Expression Profile of Leptin and Aromatase-P450 Genes and Association with Sperm Motility in Fresh Bovine Ejaculates. Proc Natl Acad Sci, India, Sect B Biol Sci 86: 611–616.
- Docimo SG, Silver RI, Cromie W. The undescended testicle: diagnosis and management. Am Fam Physician. 2000;62(9):2037–44. 47–8.
- Dubern B, Clement K. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. Biochimie. 2012;94(10):2111–2115.

- Dul EC, Groen H, van Ravenswaaij-Arts CM, Dijkhuizen T, van Echten-Arends J, Land JA. The prevalence of chromosomal abnormalities in subgroups of infertile men. *Hum Reprod.* 2012; 27(1): p. 36-43
- Duncan, J.M. (1866) *Fecundity, Fertility and Sterility*. A. and C. Black, Edinburgh
- Eggert-Kruse W, Schwalbach B, Gerhard I, Tilgen W, Runnebaum B. Influence of serum prolactin on semen characteristics and sperm function. *Int J Fertil.* 1991;36(4):243–51.
- El-Hefnawy T, Ioffe S, Dym M (2000) Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology* 141:2624–2630.
- Elmqvist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol.* 1998;395:535–547.
- Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi. *Turk Urol Sem* 2011; 2: 11-17.
- Eskenazi B, Wyrobek AJ, Kidd SA, Lowe X, Moore D, 2nd, Weisiger K. Sperm aneuploidy in fathers of children with paternally and maternally inherited Klinefelter syndrome. *Hum Reprod.* 2002;17(3):576–83.
- Esteves SC, Oliveira FV, Bertolla RP. Clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection in infertile men with treated and untreated clinical varicocele. *J Urol.* 2010;184(4):1442–6.
- Farley S, Barnes R. Stenosis of ejaculatory ducts treated by endoscopic resection. *J Urol.* 1973;109(4):664–6.
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online.* 2007;14(6):734–45.
- Fondon JW III, Hammock EA, Hannan AJ, King DG. Simple sequence repeats: genetic modulators of brain function and behavior. *Trends Neurosci.* 2008;31:328–334

- Fong TM, Huang RR, Tota MR, Mao C, Smith T, Varnerin J, Karpitskiy VV, Krause JE, Van der Ploeg LH. Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol*. 1998; 53 (2): 234–240.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395:763–770.
- Garcia-Velasco J ve Banker M. *Infertility Management Series: Practical Management of Male Infertility*. 2015
- Ghanem M, Bakr NI, Elgayaar MA, El Mongy S, Fathy H, Ibrahim AH. Comparison of the outcome of intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia in the first cycle: a report of case series and meta-analysis. *Int J Androl*. 2005;28(1):16–21.
- Ghazzawi IM, Sarraf MG, Taher MR, Khalifa FA. Comparison of the fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998;13(2):348–52.
- Gilbaugh JH, 3rd, Lipshultz LI. Nonsurgical treatment of male infertility. An update. *Urol Clin North Am*. 1994;21(3):531–48.
- Giwerzman A., Richthoff J, Hjøllund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, and Marcello Spano. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertility and Sterility*. 2003;Vol. 80, No. 6
- Glander, H.J., Lammert, A., Paasch, U., Glasow, A. and Kratzsch, J. (2002) Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia* 34: 227–233.
- Goldwasser BZ, Weinerth JL, Carson CC., 3rd Ejaculatory duct obstruction: the case for aggressive diagnosis and treatment. *J Urol*. 1985;134(5):964–6.
- Gong, Y., Luo, Z., Zhu, Q.L., Zheng, J.L., Tan, X.Y., Chen, Q.L. et al. (2013) Characterization and tissue distribution of leptin, leptin receptor and leptin receptor overlapping transcript genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Gen. Comp. Endocrinol*. 182,1 –6

- Gonzalez-Añoover, P., Encinas, T., Torres-Rovira, L., Sanz, E., Pallares, P., Ros, J., et al. (2011) Patterns of corpora lutea growth and progesterone secretion in sows with thrifty genotype and leptin resistance due to leptin receptor gene polymorphisms (Iberian pig). *Reprod Domest Anim* 46: 1011–1016.
- Goto Y, Yue L, Yokoi A, Nishimura R, Uehara T, Koizumi S, Saikawa Y. A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1952–1956
- Graham JM, Jr, Bashir AS, Stark RE, Silbert A, Walzer S. Oral and written language abilities of XXY boys: implications for anticipatory guidance. *Pediatrics.* 1988;81(6):795–806.
- Grasso M, Buonaguidi A, Lania C, Bergamaschi F, Castelli M, Rigatti P. Postpubertal cryptorchidism: review and evaluation of the fertility. *Eur Urol.* 1991;20(2):126–8.
- Greenhall, E. and Vessey, M. (1990) The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil. Steril.*, 54, 978-983.
- Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR. Young's syndrome. Obstructive azoospermia and chronic sinopulmonary infections. *N Engl J Med.* 1984;310(1):3–9.
- Hartl DL, Jones EW. Genetics analysis of genes and genomes. Chapter 2. DNA Structure and Genetic Variation. 20097th ed. MA, USA Jones and Bartlett Publishers Inc:42–87
- Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SU, Grzegorz I. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet.* 2009;10:551–564
- Hausman, G.J., Barb, C.R. and Lents, C.A. (2012) Leptin and reproductive function. *Biochimie* 94: 2075–81.

- Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN, Cosentino MJ. The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. *J Urol.* 1990;144(2 Pt 1):366–9.
- Hendry WF. Disorders of ejaculation: congenital, acquired and functional. *Br J Urol.* 1998;82(3):331–41.
- Hernandez Uribe L, Hernandez Marin I, Cervera-Aguilar R, Ayala AR. [Frequency and etiology of azoospermia in the study of infertile couples] *Ginecol Obstet Mex.* 2001;69:322–6.
- Hinney B, Guttenbach M, Schmid M, Engel W, Michelmann HW. Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection with sperm from a man with a 47,XXY Klinefelter's karyotype. *Fertil Steril.* 1997;68(4):718–20.
- Hodžić A, Ristanović M, Zorn B, Tulić C, Maver A, Novaković I, Plaseska-Karanfilska D, Peterlin B. Genetic variation in leptin and leptin receptor genes as a risk factor for idiopathic male infertility. *Andrology.* 2017 Jan;5(1):70-74.
- Hoffstedt, J., Eriksson, P., Mottagui-Tabar, S. and Arner, P. (2002) A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Horm Metab Res* 34: 355–359.
- Hoggard, N., Mercer, J.G., Rayner, D.V., Moar, K., Trayhurn, P. and Williams, L.M. (1997) Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 383–387
- Hopps CV, Goldstein M, Schlegel PN. The diagnosis and treatment of the azoospermic patient in the age of intracytoplasmic sperm injection. *Urol Clin North Am.* 2002;29(4):895–911.
- Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1660–5.

Howell W, Jobs M, Gyllensten U, Brookes A. Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms. *Nat Biotechnol.* 1999;17:87–88

<http://genomics.phrma.org/lexicon>

<https://www.med.unc.edu/urology/patientcare/adult-non-cancer/male-fertility/azoospermia/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3952>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3953>

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_007450.1?report=graph

<https://www.omim.org/entry/164160#molecularGenetics>

Ishikawa, T., Fujioka, H., Ishimura, T., Takenaka, A. and Fujisawa, M. (2007) Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrologia* 39: 22 –27.

Jahan, S., Bibi, R., Ahmed, S. and Kafeel, S. (2011) Leptin levels in infertile males. *J Coll Physicians Surg Pak* 21: 393–397.

Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol.* 1989;142(1):62–5.

Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *J Urol.* 2002;167(5):2138–44.

Jarvi K, Lo K, Fischer A, Grantmyre J, Zini A, Chow V, et al. CUA Guideline: The workup of azoospermic males. *Can Urol Assoc J.* 4(3):163–7.

Jobling MA, Tyler-Smith C. Fathers and sons? The Y chromosome and human evolution. *Trends Genet.* 1995;11:449–456

- johnson MD. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril*.1998; 70(3): p. 397-411
- Joep, T., Lammert, A., Kratzsch, J., Paasch, U. and Glander, H.J. (2003) Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int. J. Androl*. 26, 335–341
- Kadioğlu A. (ed.) WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi. 5. Baskı. İstanbul: Türk Üroloji Derneği, 2011; 254-270.
- Kadioglu A, Tefekli A, Cayan S, Kandirali E, Erdemir F, Tellaloglu S. Microsurgical inguinal varicocele repair in azoospermic men. *Urology*. 2001;57(2):328–33.
- Karimova, O. (1982) [Functional state of the ovaries in diabetes mellitus]. *Probl Endokrinol* 29:3 –6.
- Kashi Y, King DG. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genet*. 2006;22:253–259
- Khosropour S, Hamidi M, Fattahi A, Khodadadi I, Karami M, Fazilati M, Vaisi-Raygani A, Tavilani H. Leptin and leptin-receptor polymorphisms in fertile and infertile men. *Syst Biol Reprod Med*. 2017 Feb;63(1):7-14.
- Kim ED, Leibman BB, Grinblat DM, Lipshultz LI. Varicocele repair improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. *J Urol*. 1999;162(3 Pt 1):737–40.
- Kim HH, Schlegel PN. Endocrine manipulation in male infertility. *Urol Clin North Am*. 2008;35(2):303–18, x.
- Kotan Ld, Hutchins Bi, Ozkan Y, Demirel F, Stoner H, Cheng Pj, Esen I, Gurbuz F, Bicakci Yk, Mengen E, Yuksel B, Wray S, Topaloglu Ak. Mutations In Fezf1 Cause Kallmann Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2014 Sep 4;95(3):326-31.

- Krurup T. The testes after torsion. *Br J Urol.* 1978;50(1):43–6.
- Krausz C, Chianese C. Genetic testing and counselling for male infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014; Jun;21(3):244–50
- Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction.* 2015; Nov;150(5):R159–74
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112.
- Kupker W, Schwinger E, Hiort O, Ludwig M, Nikolettos N, Schlegel PN, et al. Genetics of male subfertility: consequences for the clinical work-up. *Hum Reprod.* 1999;14 Suppl 1:24–37.
- Lampiao, F. and Du Plessis, S.S. (2008) Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. *Asian J Androl* 10: 799–807.
- Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet.* 2004;364(9430):273–83.
- Lebo RV, Grody WW. Variable penetrance and expressivity of the splice altering 5T sequence in the cystic fibrosis gene. *Genetic testing.* 2007;11(1):32–44.
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 1996;379(6566):632–635.
- Lee JY, Dada R, Sabanegh E, Carpi A, Agarwal A. Role of genetics in azoospermia. *Urology.* 77(3):598–601.
- Lewis S.E. M. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility, *Society for Reproduction and Fertility.* 2007;134 31–40

- Li M, Pritchard PH. Characterization of the effects of mutations in the putative branchpoint sequence of intron 4 on the splicing within the human lecithin: cholesterol acyltransferase gene. *J Biol Chem.* 2000;275:18079–18084
- Lievano G, Nguyen L, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. New animal model to evaluate testicular blood flow during testicular torsion. *J Pediatr Surg.* 1999;34(6):1004–6.
- Linder MW, Clin Chem RA, Valdes R. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing the therapeutic efficiency. *Clin Chem.* 1997;43:254–266
- Liu PY, Handelsman DJ. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Hum Reprod Update.* 2003;9(1):9–23.
- Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A, Wyrobek AJ. Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefelter syndrome. *Am J Hum Genet.* 2001;69(5):1046–54.
- M. Heo, R.L. Leibel, K.R. Fontaine, B.B. Boyer, W.K. Chung, M. Koulu, *et al.* A meta-analytic investigation of linkage and association of common leptin receptor (LEPR) polymorphisms with body mass index and waist circumference *Int. J. Obesity*, 26 (2002), pp. 640-646
- Ma MK, Woo MH, Mcleod HL. Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm.* 2002;59:2061–2069
- Mak V, Jarvi KA. The genetics of male infertility. *J Urol.* 1996;156(4):1245–56. discussion 56-7.
- Mammes, O., Betoulle, D., Aubert, R., Herbeth, B., Siest, G. and Fumeron, F. (2000) Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet* 64: 391–394.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G. and Hill, R.A. (2002) Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 1407–1433

- Marmar JL, Agarwal A, Prabakaran S, Agarwal R, Short RA, Benoff S, et al. Reassessing the value of varicocelelectomy as a treatment for male subfertility with a new meta-analysis. *Fertil Steril*. 2007
- Marmar JL, Benoff S. Varicoceles. *J Urol*. 2006;175(3 Pt 1):818–9.
- Martins, A.D., Moreira, A.C., Sá, R., Monteiro, M.P., Sousa, M., Carvalho, R.A. et al. (2015) Leptin modulates human Sertoli cells acetate production and glycolytic profile: a novel mechanism of obesity-induced male infertility? *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1824–1832
- Mathers MJ, Sperling H, Rubben H, Roth S. The undescended testis: diagnosis, treatment and long-term consequences. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(33):527–32.
- Matsuda T, Horii Y, Yoshida O. Unilateral obstruction of the vas deferens caused by childhood inguinal herniorrhaphy in male infertility patients. *Fertil Steril*. 1992;58(3):609–13.
- Matthews GJ, Matthews ED, Goldstein M. Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelelectomy in men with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Fertil Steril*. 1998;70(1):71–5.
- Maya-Nunez G, Zenteno JC, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mendez JP. A recurrent missense mutation in the KAL gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(5):1650–3.
- McCallum T, Milunsky J, Munarriz R, Carson R, Sadeghi-Nejad H, Oates R. Unilateral renal agenesis associated with congenital bilateral absence of the vas deferens: phenotypic findings and genetic considerations. *Hum Reprod*. 2001;16(2):282–8.
- McLachlan RI, Baker HW, Clarke GN, Harrison KL, Matson PL, Holden CA, de Kretser DM. Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathology*. 2003;35(1):25-33.

- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de K, Pratis K, et al. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *J Androl.* 2002;23(2):149–62.
- Mickle J, Milunsky A, Amos JA, Oates RD. Congenital unilateral absence of the vas deferens: a heterogeneous disorder with two distinct subpopulations based upon aetiology and mutational status of the cystic fibrosis gene. *Hum Reprod.* 1995;10(7):1728–35.
- Moharana K, Zabeau L, Peelman F, Ringler P, Stahlberg H, Tavernier J, Savvides SN. Structural and mechanistic paradigm of leptin receptor activation revealed by complexes with wild-type and antagonist leptins. *Structure.* 2014;22(6):866–877.
- Moro E, Marin P, Rossi A, Garolla A, Ferlin A. Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;161(1-2):67–71.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006;443:289–295.
- Mosher, W.D. and Pratt, W.F. (1991) Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil. Steril.*, 56, 192-193.
- Mostafa, T. (2010). Cigarette smoking and male infertility. *Journal of Advanced Research*, 1(3): 179–186.
- Myers MG, Cowley MA, Munzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:537–556.
- Myers MG, Jr, Munzberg H, Leininger GM, Leshan RL. The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell Metab.* 2009;9:117–123.
- NICE.Clinical Guideline: Fertility assessment and treatment for people with fertility problems.2013;RCOP publishers, London, UK.

- Nudell DM, Monoski MM, Lipshultz LI. Common medications and drugs: how they affect male fertility. *Urol Clin North Am*. 2002;29(4):965–73.
- Oehninger S and Kruger T. Male Infertility: Diagnosis and Treatment. 2007; S:117134
- Özpak L, Pazarbaşı A. Erkek İnfertilitesinin Sitogenetiği. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 2011; 20: 230.
- Paduch DA, Bolyakov A, Cohen P, Travis A. Reproduction in men with Klinefelter syndrome: the past, the present, and the future. *Semin Reprod Med*. 2009;27(2):137–48.
- Palermo GD, Schlegel PN, Hariprashad JJ, Ergun B, Mielnik A, Zaninovic N, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod*. 1999;14(3):741–8.
- Pandiyan N, Jequier AM. Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile men. *Hum Reprod*. 1996;11(12):2604–8.
- Pasqualotto FF, Lucon AM, Hallak J, Goes PM, Saldanha LB, Arap S. Induction of spermatogenesis in azoospermic men after varicocele repair. *Hum Reprod*. 2003;18(1):108–12.
- Peelman F, Iserentant H, De Smet AS, Vandekerckhove J, Zabeau L, Tavernier J. Mapping of binding site III in the leptin receptor and modeling of a hexameric leptin.leptin receptor complex. *J Biol Chem*. 2006;281(22):15496–15504.
- Peelman F, Van Beneden K, Zabeau L, Iserentant H, Ulrichs P, Defeau D, Verhee A, Catteeuw D, Elewaut D, Tavernier J. Mapping of the leptin binding sites and design of a leptin antagonist. *J Biol Chem*. 2004;279(39):41038–41046.
- Peelman F, Zabeau L, Moharana K, Savvides SN, Tavernier J, *J Endocrinol*. 2014 Oct; 223(1):T9-23.

- Peschka B, Leygraaf J, Van der Ven K, Montag M, Schartmann B, Schubert R, et al. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999;14(9):2257–63.
- Pettersson A, Richiardi L, Nordenskjold A, Kaijser M, Akre O. Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(18):1835–41.
- Pfost DR, Boyce-Jacino MT, Grant DM. A SNPshot: pharmacogenetics and the future of drug therapy. *Trends Biotechnol.* 2000;18:334–338
- Ponzo, O.J., Reynoso, R., Rondina, D., Szwarcfarb, B., Carbone, S., Scacchi, P., et al. (2004) Effect of leptin on LH levels and hypothalamic release of GnRH. Its relationship with the hypothalamic neurotransmitter amino acids system in adult male rats. *Endocr Res* 30: 179–187.
- Poongothai, J., Gopenath, T.S. and Manonayaki, S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med. J.* 2009;50, 336–347
- Porch PP., Jr Aspermia owing to obstruction of distal ejaculatory duct and treatment by transurethral resection. *J Urol.* 1978;119(1):141–2.
- Poston, D.L. and Kramer, K.B. (1983) Voluntary and involuntary childlessness in the United States, 1955–1973. *Soc. Biol*, 30, 290–306.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male Reproduction and Urology. *Fertil Steril.* 2008 Nov; 90(5 Suppl):S121–4.
- Pramanic, P. (2012). Impact of adulthood lifestyle on male infertility: A critical review of the current literature. *International Journal of Life Science & Pharma research*, 2(4): 51–61.
- Prinz M, Boll K, Baum H, Shaler B. Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Sci Int.* 1997;85:209–218

- Pryor JP, Hendry WF. Ejaculatory duct obstruction in subfertile males: analysis of 87 patients. *Fertil Steril*. 1991;56(4):725–30.
- Rago, V., Aquila, S., Guido, C. and Carpino, A. (2009) Leptin and its receptor are expressed in the testis and in the epididymis of young and adult pigs. *Anat. Rec.* 292, 736–745
- Rahmouni K, Sigmund CD, Haynes WG, Mark AL. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes*. 2009;58:536–542.
- Raman JD, Schlegel PN. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection is successful for the treatment of nonobstructive azoospermia associated with cryptorchidism. *J Urol*. 2003;170(4 Pt 1):1287–90.
- Rapley R, Harbron S *Molecular Analysis and Genome Discovery*. 2004 Chichester John Wiley & Sons Ltd
- Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet*. 2002;71(4):906–22.
- Revonta, M. ve ark. (2010). Health and life style among infertile men and women. *Sexual & Reproductive Healthcare*, 1(3): 91-98.
- Saeid Khosropour, Maryam Hamidi, Amir Fattahi, Iraj Khodadadi, , Asad Vaisi-Raygani &Heidar Tavailani. (2016) Leptin and leptin-receptor polymorphisms in fertile and infertile men.
- Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24:225–253.
- Salichs E, Ledda A, Mularoni L, Albà MM, de la Luna S. Genome-wide analysis of histidine repeats reveals their role in the localization of human proteins to the nuclear speckles compartment. *PLoS Genet*. 2008;5:e1000397

- Saukko, M., Kesäniemi, Y.A. and Ukkola, O. (2010) Leptin receptor Lys109Arg and Gln223Arg polymorphisms are associated with early atherosclerosis. *Metab Syndr Relat Disord* 8: 425–430.
- Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Goldstein M, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6263–7.
- Schlegel PN, Goldstein M. Alternate indications for varicocele repair: non-obstructive azoospermia, pain, androgen deficiency and progressive testicular dysfunction. *Fertil Steril*. 2011;96(6):1288–93.
- Schlegel PN. Causes of azoospermia and their management. *Reprod Fertil Dev*. 2004;16(5):561–72.
- Schuster TG, Ohl DA. Diagnosis and treatment of ejaculatory dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2002;29(4):939–48.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661–671.
- Schwarzer JU, Fiedler K, Hertwig I, Krusmann G, Wurfel W, Muhlen B, et al. Male factors determining the outcome of intracytoplasmic sperm injection with epididymal and testicular spermatozoa. *Andrologia*. 2003;35(4):220–6.
- Semiao-Francisco L, Braga DP, Figueira Rde C, Madaschi C, Pasqualotto FF, Iaconelli A, Jr, et al. Assisted reproductive technology outcomes in azoospermic men: 10 years of experience with surgical sperm retrieval. *Aging Male*. 2010;13(1):44–50.
- Shin D, Lipshultz LI, Goldstein M, Barme GA, Fuchs EF, Nagler HM, et al. Herniorrhaphy with polypropylene mesh causing inguinal vasal obstruction: a preventable cause of obstructive azoospermia. *Ann Surg*. 2005;241(4):553–8.
- Siddiq FM, Sigman M. A new look at the medical management of infertility. *Urol Clin North Am*. 2002;29(4):949–63.

- Sigman M, Jarow JP. Endocrine evaluation of infertile men. *Urology*. 1997;50(5):659–64.
- Smith JF, Walsh TJ, Turek PJ. Ejaculatory duct obstruction. *Urol Clin North Am*. 2008;35(2):221–7, viii.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*. 2010;61:437–455
- Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M. and Strosberg, A.D. (1998) A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18: 213 –215.
- Su, P.-H., Yang, S.-F., Yu, J.-S., Chen, S.-J. and Chen, J.-Y. (2012) Study of leptin levels and gene polymorphisms in patients with central precocious puberty. *Pediatr Res* 71:361–367.
- Subramanian S, Mishra RK, Singh L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol*. 2003;4:R13.1–R13.10
- Sussman EM, Chudnovsky A, Niederberger CS. Hormonal evaluation of the infertile male: has it evolved. *Urol Clin North Am*. 2008;35(2):147–55, vii.
- Swerdlow AJ, Schoemaker MJ, Higgins CD, Wright AF, Jacobs PA. Cancer incidence and mortality in men with Klinefelter syndrome: a cohort study. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(16):1204–10.
- T. Gotoda, B.S. Manning, A.P. Goldstone, H. Imrie, A.L. Evans, A.D. Strosberg, P. M. McKeigue, J. Scott, T.J. Aitman Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population *Hum. Mol. Genet.*, 6 (1997), pp. 869-876
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83(7):1263–1271.

Tartaglia LA. The leptin receptor. J Biol Chem. 1997;272:6093–6096.

Taşçı E, Bolsoy N, Kavlak O, Yücesoy F. (2008) İnfertil kadınlarda evlilik uyumu, Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi 2:105-110.

Templeton, A. A. (1992) The epidemiology of infertility. In Templeton, A.A. and Drife, J.O. (eds), Infertility. Springer-Verlag, Berlin, pp. 23-34.

Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Gonzalez LC, Dieguez C, Huhtaniemi I, Aguilar E (2001) Molecular mechanism of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptininduced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. J Endocrinol 170:413–423.

The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. Fertil Steril. 1992;57(6):1289–93.

The management of infertility due to obstructive azoospermia. Fertil Steril. 2008;90(5 Suppl):S121–4.

The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement.2010

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2012). Smoking and infertility: A committee opinion, http://www.asrm.org/Smoking_and_infertility/ (28.01.2013).

Thonneau, P. and Spira, A. (1990) Prevalence of infertility: International data and problems of measurement. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 38, 43-52

Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum Genet. 1976;34(2):119–24.

Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, Van Assche E, Devroey P, Bonduelle M, et al. Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients. Hum Reprod. 1996;11(8):1644–9.

- Tulloch WS. Varicocele in subfertility; results of treatment. *Br Med J*. 1955;2(4935):356–8.
- Turek PJ, Pera RA. Current and future genetic screening for male infertility. *Urol Clin North Am*. 2002;29(4):767–92.
- Usdin K. The biological effects of simple tandem repeats: lessons from the repeat expansion diseases. *Genome Res*. 2008;18:1011–1019
- Uzun S, Gokce S, Wagner K. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Tohoku J Exp Med*. 2005;207(4):279–85.
- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod*. 1996;11 Suppl 4:1–24. discussion 5-6.
- Van der Auwera B, Van Roy N, De Paepe A, Hawkins JR, Liebaers I, Castedo S, et al. Molecular cytogenetic analysis of XX males using Y-specific DNA sequences, including SRY. *Hum Genet*. 1992;89(1):23–8.
- Verza S, Jr, Esteves SC. Sperm defect severity rather than sperm Source is associated with lower fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Int Braz J Urol*. 2008;34(1):49–56.
- Visser AJ, Heyns CF. Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU Int*. 2003;92(3):200–3.
- Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet*. 1992;89(5):491–6.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet*. 1996;5(7):933–43.

- Watkin NA, Reiger NA, Moisey CU. Is the conservative management of the acute scrotum justified on clinical grounds. *Br J Urol*. 1996;78(4):623–7.
- Wauters J, De Ceuninck L, Vanderroost N, Lievens S, Tavernier J. RNF41 (Nrdp1) controls type 1 cytokine receptor degradation and ectodomain shedding. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 6):921–932
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2002;71:854–862
- Werner CA. Mumps orchitis and testicular atrophy; a factor in male sterility. *Ann Intern Med*. 1950;32(6):1075–86.
- Werner CA. Mumps orchitis and testicular atrophy; occurrence. *Ann Intern Med*. 1950;32(6):1066–74.
- Williamson RC. Torsion of the testis and allied conditions. *Br J Surg*. 1976;63(6):465–76.
- Wimmer R, Kirsch S, Weber A, Rappold GA, Schempp W. The Azoospermia region AZFa: an evolutionary view. *Cytogenet Genome Res*. 2002;99(1-4):146–50.
- Wong EC, Ferguson KA, Chow V, Ma S. Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male. *Hum Reprod*. 2008;23(2):374–8.
- World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research
WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010
- Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, Confavreux C, Klemmensen KC, Tanaka KF, Gingrich JA, Guo XE, Tecott LH, Mann JJ, Hen R, Horvath TL, Karsenty G. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell*. 2009;138:976–989.

- Yiannakouris, N., Yannakoulia, M., Melistas, L., Chan, J.L., Klimis-Zacas, D. and Mantzoros, C.S. (2001) The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4434–4439.
- Yiannakouris, N., Melistas, L., Yannakoulia, M., Mungai, K. and Mantzoros, C.S. (2003) The-2548G/A polymorphism in the human leptin gene promoter region is associated with plasma free leptin levels; interaction with adiposity and gender in healthy subjects. *Hormones (Athens)* 2: 229–236.
- Yoshida KI, Yano M, Chiba K, Honda M, Kitahara S. CAG repeat length in the androgen receptor gene is enhanced in patients with idiopathic azoospermia. *Urology*. 1999;54(6):1078–81.
- Yuan, M., Huang, G., Li, J., Zhang, J., Li, F., Li, K. et al. (2014) Hyperleptinemia directly affects testicular maturation at different sexual stages in mice, and suppressor of cytokine signaling 3 is involved in this process. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 15
- Yumru ve ark. İnfertilite ve İVF’e Hasta Seçimi. *JAREM* 2011; 1: 57-60.
- Zabeau L, Defeau D, Van der Heyden J, Iserentant H, Vandekerckhove J, Tavernier J. Functional analysis of leptin receptor activation using a Janus kinase/signal transducer and activator of transcription complementation assay. *Mol Endocrinol*. 2004;18(1):150–161.
- Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:451–481
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. 1994; 372 (6505): 425–432.

Zhao AZ, Huan JN, Gupta S, Pal R, Sahu A. A phosphatidylinositol 3-kinase phosphodiesterase-3B cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nat Neurosci.* 2002;5:727–728.



7. 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 Kromozomu 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 kullanılmayın

Uluslararası ilkelere uygun olarak isimsiz (anonim) olarak kullanılsın

☐☐

Katılımcı

Adı, Soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Görüşme Tanığı

Adı, soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Katılımcı İle Görüşen Araştırmacı

Adı, Soyadı, Ünvanı :
Adres :
Telefon :
İmza :

ETİK KURUL RAPORU

	T.C. TOKAT GAZİÖSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : 83116987 - 627	11.10.2019
Konu : Etik Kurul Kararı	
Toplantı Tarihi : 24.09.2019	
Toplantı No : 2019/13	
Proje No : 19-KAEK-179	

Sayın, Doç.Dr. Nevin KARAKUŞ

Etik Kurulumuzun 24.09.2019 tarihli toplantısında görüşülen 19-KAEK-179 kayıt numaralı **"HER2, LEP, LEPR ve PHB Genlerindeki Polimorfizmlerin Erkek İnfertilitesi ile Olası İlişkilerinin Araştırılması"** başlıklı çalışmanız gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmeliğin 14-4. maddesi ve yönergemizin 18-3. maddesine göre çalışmanız tamamlandıktan sonra sonuç raporunun tarafımıza en geç 90 gün içerisinde bildirilmesi gerekmektedir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. Faruk KUTLUER
Başkan

8. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	Merve AKMAN
Doğum Tarihi ve Yeri	16.11.1992 / BATMAN
Medeni Hali	Bekâr
E-mail	mrv.akman06@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

2017-2020	Yüksek Lisans, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD
2012-2017	Lisans, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
2006-2010	Lise, Diyarbakır Yunus Emre Lisesi; Adıyaman İMKB Lisesi