



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE TRANSKRİPSİYONEL
VE POST-TRANSKRİPSİYONEL EPİGENETİK
DEĞİŞİMLER**

SÜHEYLA ESRA ÖZKOÇER

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

OCAK 2024



**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE TRANSKRİPSİYONEL VE
POST-TRANSKRİPSİYONEL EPİGENETİK DEĞİŞİMLER**

Süheyla Esra ÖZKOÇER

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Süheyla Esra ÖZKOÇER

12/01/2024

ERKEK İNFERTİLİTESİNDE TRANSKRİPSİYONEL VE POST- TRANSKRİPSİYONEL EPİGENETİK DEĞİŞİMLER

(Doktora Tezi)

Süheyla Esra ÖZKOÇER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2024

ÖZET

Spermin epigenetik anomalileri, erkek infertilitesiyle ilişkilidir ve tedavinin başarısını etkilemektedir. DNA metilasyonu, kromatin düzenlemeleri ve kodlanmayan RNA'lar sperm epigenomunu oluşturur. Çalışmamızda erkek infertilitesinde *MEST*, *MEST1*, *CEP41*, *GNAS*, *IGF2* ve *H19* genlerinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel epigenetik değişimlerin araştırılması amaçlanmıştır. Fertil erkeklerin (n=30) spermelerindeki DNA metilasyonu ve gen ifadenmesi, oligospermik (n=30) ve normospermik (n=30) infertil gruplarla karşılaştırılmıştır. Paternal ifadelenen *GNAS-AS* geninin 1. 3. ve 5. CpG dinükleotidlerinin hipometilasyonu, oligospermi grubunda (%33,3*; %26,7**; %26,7*) fertil gruptan (%66,7*; %66,7**; %60*) daha düşüktür (*p<0,05, **p<0,01). İmprint gen olmayan *CEP41*'in 3. CpG dinükleotidinin hipometilasyonu, normospermi grubunda (%53,3) fertil gruptan (%83,3) düşüktür (p<0,05). Tüm gruplarda *MEST1* geninin ifadenmesi, *MEST* ve *CEP41* genlerinin ifadenmeleri ile korelasyon göstermektedir (p<0,05). Tüm gruplarda, *IGF2* transkriptinin seviyesinin, *H19* transkriptinin seviyesi ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (p<0,01). Bu çalışma ile ilk defa, *GNAS-AS* ve *CEP41* genlerinin metilasyon anomalilerinin yanı sıra, DNA metilasyonu ve gen ifadenmesinin birbirleriyle olan ilişkilerinin bozulmasının erkek infertilitesinde etkili olduğu gösterilmiştir.

Bilim Kodu : 1091
Anahtar Kelimeler : DNA metilasyonu, Gen ifadenmesi, Spermatozoa
Sayfa Adedi : 115
Danışman : Prof. Dr. Ece KONAÇ

TRANSCRIPTIONAL AND POST-TRANSCRIPTIONAL EPIGENETIC CHANGES IN MALE INFERTILITY

(Ph. D. Thesis)

Süheyla Esra ÖZKOÇER

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2024

ABSTRACT

Epigenetic anomalies of sperm are associated with male infertility and affect the success of treatment. DNA methylation, chromatin rearrangements and non-coding RNAs constitute the sperm epigenome. Our study aimed to investigate transcriptional and post-transcriptional epigenetic changes of *MEST*, *MESTIT1*, *CEP41*, *GNAS*, *IGF2*, and *H19* genes in male infertility. DNA methylation and gene expression in the sperm of fertile men (n=30) were compared with oligospermic (n=30) and normospermic (n=30) infertile groups. The hypomethylated 1st, 3rd and 5th CpG dinucleotides of the paternally expressed *GNAS-AS* gene were higher in the oligospermia group (33.3%*, 26.7%***, 26.7%*) than in the fertile group (66.7%*, 66.7%***, 60%*) (*p<0.05, *** p<0.01). The hypomethylated 3rd CpG dinucleotide of *CEP41*, which is not an imprinted gene, was lower in the normospermia group (53.3%) than in the fertile group (83.3%) (p<0.05). In all groups, *MESTIT1* expression correlated with *MEST* and *CEP41* expressions (p<0.05). In all groups, *IGF2* expression correlated with *H19* expression (p<0.01). As a result, it has been shown for the first time that methylation anomalies of the *GNAS-AS* and *CEP41* genes, as well as disruption of the relationships between DNA methylation and gene expression, are effective in male infertility.

Science Code : 1091
Key Words : DNA methylation, Gene expression, Spermatozoa
Page Number : 115
Supervisor : Prof. Dr. Ece KONAÇ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgisini ve deneyimlerini cömertce aktaran, tez sürecimde karşılaştığım zorlukları tüm kaynakları seferber ederek çözen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ'a sağladığı imkanlar, bana olan inancı ve fedakârca desteği için tüm kalbimle teşekkür ederim. Mustafa Kemal Atatürk'ün yolunda, çağdaş, çalışkan, azimli bilim kadını olarak her zaman örnek aldığım hocamın izlerini hayatım boyunca taşıyacak olmaktan gururluyum. Öğrettiklerinin ışığıyla, kendi öğrencilerimi aydınlatmak için çabalayacağım.

Doktora tez çalışmam boyunca tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Nuray BOZKURT'a ve Sayın Doç. Dr. Nuray VAROL'a, süreç boyunca ayırdıkları zaman ve anlayışları için teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında dersleriyle bilgi ve becerilerimi geliştirmemi sağladıkları için Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a ve Sayın Doç. Dr. İlke ÖNEN'e teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamda sağladıkları katkılar için Sayın Prof. Dr. İsmail GÜLER'e ve Sayın Doç. Dr. Asiye UĞRAŞ DİKMEN'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca desteğini hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca gösterdikleri sabırla hayatımı kolaylaştırdıkları için başta eşim Özkan ve oğlum Aras ÖZKOÇER olmak üzere aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Doktora Tez Projesi (TDK-2021-7023) olarak desteklenmiştir, teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek Üreme Sağlığı ve İnfertilite	3
2.1.1. Erkek infertilitesi nedenleri	3
2.1.2. Erkek üreme sağlığının değerlendirilmesi	5
2.1.3. Erkek infertilitesi ve tedavi yaklaşımları	7
2.2. Epigenetik ve Erkek İnfertilitesi	7
2.2.1. DNA metilasyonu	7
2.2.2. DNA metilasyonu ve genomik imprinting.....	8
2.2.3. Histon modifikasyonları	8
2.2.4. Kromatin düzenlemeleri	9
2.2.5. Kodlanmayan RNA'lar	9
2.2.6. Epigenetik mekanizmaların erkek infertilitesi üzerinde etkileri.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	17
3.2. Gereçler	18

	Sayfa
3.2.1. Cihazlar	18
3.2.2. Sarf malzemeleri	19
3.2.3. Kimyasallar ve kitler	19
3.3. Semen Değerlendirmesi	20
3.4. Semenden Sperm Hücrelerinin Elde Edilmesi	21
3.5. Real Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi	21
3.5.1. Sperminden RNA izolasyonu	21
3.5.2. cDNA eldesi.....	22
3.5.3. qPCR analizi	22
3.6. DNA Metilasyonunun Değerlendirilmesi	24
3.6.1. Sperminden DNA İzolasyonu	24
3.6.2. DNA bisülfid modifikasyonunun yapılması	25
3.6.3. Pirosekans analizin yapılması.....	26
3.7. İstatistiksel analizlerin yapılması	31
4. BULGULAR	33
4.1. Semen Analizi Bulguları	33
4.2. Gen İfadelemesi	36
4.3. DNA Metilasyonu	37
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	61
EKLER.....	71
EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi	72
EK-2. Spearman Korelasyon Testi Bulguları	74
ÖZGEÇMİŞ	113

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Temel semen analizi değerlendirme parametreleri ve 5. persentil değerleri.....	6
Çizelge 3.1. cDNA Reverse transkriptaz kiti bileşenleri ve miktarları	22
Çizelge 3.2. RT-qPCR kit bileşenleri ve miktarları	23
Çizelge 3.3. Çalışmada incelenen genlere ait ileri ve geri primer dizileri, annealing sıcaklıkları.....	23
Çizelge 3.4. RT-qPCR işlem basamakları.....	24
Çizelge 3.5. CT Dönüşüm Reaktifı hazırlanışı.....	25
Çizelge 3.6. Pirosekans için tasarlanan ve hazır kitlerin bilgileri	27
Çizelge 3.7. PyroMark PCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları	29
Çizelge 3.8. PyroMark PCR aşamaları.....	29
Çizelge 3.9. Pirosekans karışım hazırlanışı.....	30
Çizelge 4.1. Grupların yaş ve vücut kitle indeksi verileri (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.....	33
Çizelge 4.2. Semen hacmi (ml), sperm konsantrasyonu (%), hareketliliği (%) ve normal morfoloji (%) verileri ve p değerleri.....	34
Çizelge 4.3. Gen ifadenmelerinin gruplar arasında karşılaştırılması	36
Çizelge 4.4. Metilasyon eşik değerleri	39
Çizelge 4.5. Gruplarda hipometilasyon ve hipermetilasyon yüzdelerinin karşılaştırılması	42
Çizelge 4.6. Korelasyonlar	47

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. DNA metilasyonu ile gen ifadenmesinin baskılanması	8
Şekil 2.2. Seminifer tübülün histolojik yapısı	11
Şekil 2.3. 7.kromozomun uzun kolunda bulunan <i>MEST</i> , <i>MESTIT1</i> ve <i>CEP41</i> genleri.	13
Şekil 2.4. 11. Kromozomda bulunan <i>H19</i> , <i>IGF2</i> ve <i>IGF2-AS</i> , <i>mir-675</i> genleri	14
Şekil 2.5. <i>IGF2</i> ve <i>H19</i> genlerinin ifadenmesinin kontrolü	14
Şekil 2.6. 20.kromozomda bulunan <i>GNAS</i> ve <i>GNAS-AS</i> genleri	15
Şekil 4.1. Fertil, oligospermi ve normospermi gruplarında gen ifadenmelerinin logaritmik değişimlerini gösteren kutu grafiği.....	37
Şekil 4.2. PyroMarkQ24 yazılımının yaptığı metilasyon analizinin örneği.....	38
Şekil 4.3. Metilasyon yüzdelerinde eşik değerleri belirlemek için çizilen ROC eğrileri	39
Şekil 4.4. Gruplara göre hipometile (açık renkli) ve hipermetile (koyu renkli) CpG dinökleotid frekanslarını (%) gösteren grafikler	41

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Pyromark Q24 çalışma istasyonu.....	26
Resim 4.1. Spermac boyasıyla boyanmış sperm yayması mikrografları	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Açıklamalar

° C	santigrat derece
µl	mikrolitre
bp	baz çifti
dk	dakika
g	görelî santrifüj kuvveti
ml	mililitre
ng	nanogram
rpm	revolutions per minute
sn	saniye

Kısaltmalar

Açıklamalar

ASD	Otizm spektrum bozukluğu
CASA	Bilgisayar-yardımlı sperm analizi
CBAVD	Konjenital bilateral vas deferens agenezisi
CDNA	Complementary DNA
CEP41	Sentrozomal protein 41
CTCF	CCCTC bağlayıcı faktör
CT	Döngü eşik değeri
DEPC	Dietil pirokabonat
DMR	Farklı seviyelerde metillenmiş özel bölgeler
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EDC	Endokrin bozucu kimyasallar
FSH	Folikül stimulan hormon
GNAS	Guanin nükleotid-bağlayıcı proteininin alfa alt birimi lokusu
GNAS-AS	Gnas antisense
GSa	Guanin nükleotid-bağlayıcı proteininin alfa alt birimi
ICR	İmprint kontrol bölgeleri

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ICSI	İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu
IGF2AS	İnsulin benzeri büyüme faktörü 2 antisense
IUI	Intrauterin inseminasyon
IVF	İn-vitro fertilizasyon
LH	Lüteinizan hormon
LNCRNA	Uzun kodlanmayan RNA
MEST	Mesoderm-specific transcript
MİRNA	MikroRNA
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
NESP55	Nöroendokrin salgılayıcı protein 55
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG1	Paternally expressed gene-1
PGC	Primordiyal germ hücreleri
PİRNA	Piwi-ilişkili RNA
RNA	Ribonükleik asit
RT-QPCR	Real time kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SCLB	Somatik hücre lizis tamponu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SHBG	Seks steroid bağlayıcı globulin
SİRNA	Küçük interferans RNA
SNCRNA	Küçük kodlanmayan RNA
SRS	Silver-Russell sendromu
TSGA14	Testis-spesifik gen A14
XLAS	Ekstra-large Gsa

1. GİRİŞ

İnfertilite, çiftlerin bir yıl korunmasız cinsel ilişkiye karşın çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır ve dünya genelinde çiftlerin %15-20'sini etkilemektedir. Vakaların yaklaşık yarısında erkek faktör etkisi görülmektedir [1]. Erkek infertilitesinin etiyolojisinde konjenital ya da kazanılmış nedenler bulunmaktadır. Bunların yanı sıra mekanizmaları tam olarak bilinmeyen çevresel ajanlar, stres, ilaç kullanımı, sigara gibi faktörler de erkek infertilitesiyle ilişkilidir. Bütün bu nedenler sonucunda spermin sayısı, şekil, hareketlilik gibi özelliklerinde bozulma görülür [2].

Epigenetik, DNA dizisinde değişikliğe neden olmaksızın gen ifadesini değiştirdiği için infertilite etiyolojisinde epigenetik değişimler araştırılmaktadır. Sperm epigenomu, fertilizasyon, embriyo gelişimi, implantasyon gibi üreme sağlığıyla doğrudan ilişkisinin yanında sonraki nesle aktarılması nedeniyle önemlidir [3].

Sperm epigenomu; DNA metilasyonu, kromatin düzenlemeleri, kodlanmayan RNA'ları ve RNA modifikasyonlarını içerir [4-8]. DNA metilasyonu özellikle imprint genlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. İmprint genlerdeki DNA metilasyon anomalilerinin erkek infertilitesinde risk artışına neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [9]. Kromozom lokuslarında -7,11,20- bulunan imprint genlerin ifadelenmesindeki değişimler çeşitli kanserler, sendromlar ve sistemik hastalıklarla ilişkilidir. Bu genlerin ifadelenmesinde DNA metilasyonunun yanında, ilişkili genlerin ürünleri olan kodlanmayan RNA'ların transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel etkilerinin de bulunması, epigenetik düzenlemelerin karmaşık işleyişini göstermektedir [5].

Erkek infertilitesinde; *MEST* (7q32.2), *MESTIT1* (7q32.2), *CEP41* (7q32.2), *IGF2* (11p15.5), *H19* (7q32.2), *GNAS* (20q13.32) genlerinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel değişimleri göstermek bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sağlığı ve İnfertilite

Bir yıl korunmasız cinsel ilişki sonrasında çocuk sahibi olamayan çiftler infertil olarak değerlendirilmektedir [1]. Çiftlerin yaklaşık yarısında erkek faktör etkisi görülmektedir [10]. İnfertilite prevalansını üzerine yapılan çalışmalar erkek infertilitesinin sıklığının arttığını göstermektedir [11].

2.1.1. Erkek infertilitesi nedenleri

Erkek infertilitesinin nedenleri farklı başlıklar altında değerlendirilebilir. Agarwal ve arkadaşlarını yaptığı sınıflamaya göre nedenler ve risk faktörleri şu şekilde sunulmuştur [2]:

- Konjenital etmenler
 - Anorşi (testisin yokluğu)
 - Vas deferensin konjenital yokluğu
 - Kriptoorşidizm
 - Y kromozomu mikrodelesyonları
 - Kromozomal ya da genetik anomaliler
 - Klinefelter sendromu ve varyantları (47,XXY; 46,XY/47,XXY mozaizmi)
 - Kallman sendromu
 - Robertson translokasyonu
 - Hafif androjen duyarsızlık sendromu
 - Genetik endokrinopati
 - Konjenital obstriksiyon
- Kazanılmış etmenler
 - Varikosel
 - Testiküler travma

- Testis torsiyonu
 - Germ hücresi tümörleri
 - Kazanılmış hipogonadotropik hipogonadizm
 - Tekrarlayan ürogenital enfeksiyonlar (Prostatit, prostatovezikülit)
 - Postinflamatuvar durumlar (epididimit, kabakulak orşiti)
 - Ürogenital kanal tıkanıklığı
 - Ekzojen etmenler (kemoterapi, ilaçlar, radyasyon, ısı)
 - Sistemik hastalıklar (karaciğer sirozu, böbrek yetmezliği)
 - Testis damarlarını etkileyen cerrahiler
 - Seksüel disfonksiyon (erektile ya da ejakülatuar disfonksiyon)
- İdiopatik etmenler
 - Sigara kullanımı
 - Alkol kullanımı
 - Keyif verici maddeler
 - Obezite
 - Psikolojik stres
 - İleri paternal yaş
 - Diyet etmenleri
 - Çevresel ya da mesleki toksinlere maruz kalma

Dünyanın pek çok yerinde, ilk doğumda paternal ve maternal yaşın ileri yaşlara kayması sonucunda, subfertilite artmaktadır [11]. Küreselleşmenin sonuçlarından olan çevre kirliliği de infertilite ile ilişkilidir. Endokrin bozucu kimyasalların (Endocrine Disrupting Chemicals, EDC) üreme sağlığı üzerine olumsuz etkileri pek çok insan ve hayvan çalışmasında gösterilmiştir [12]. Plasenta ve anne sütünden geçiş gösteren bazı kimyasalların epigenetik mekanizmalarla erkek infertilitesini etkileyebildiği gösterilmiştir [13]. Erkek üreme sağlığı üzerinde çevresel, genetik ve epigenetik etkilerin değerlendirilmesi için izlenmesi gereken adımlar belirlenmiştir.

2.1.2. Erkek üreme sağlığının değerlendirilmesi

Erkek üreme sağlığı; kapsamlı öykü, detaylı fizik muayene, laboratuvar ve görüntüleme testleriyle değerlendirilmektedir [11]. Her ne kadar bir erkeğin fertil olduğunu doğrulayan bir test yöntemi bulunmasa da hastaların değerlendirilmesi ve tedavilerinin planlanması için başvurulacak ileri tanı testleri de kullanılmaktadır [14].

Öykü ve fizik muayene

Çiftin ne kadar süredir çocuk sahibi olmaya çalıştıkları, geçmişte kullanılan doğum kontrol yöntemleri, erektil veya ejakülatuar disfonksiyon, hipogonadizm, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, geçirilmiş testiküler cerrahiler, sistemik hastalıklar, kullanılan ilaçlar, radyoterapi, akraba evliliği, bilinen genetik hastalıklar öykü alımı sırasında sorgulanmalıdır [14]. Çiftin, bireylerin ve aile öyküsünün dikkatli alınmasıyla kriptoorşidizm gibi çocukluk çağı hastalıkları, X'e bağlı infertilite gibi etiyolojiye yönelik ileri değerlendirmelerin daha hızlı yapılmasını sağlayacaktır [2, 14].

Fizik muayene ile genel görünüm ve jinekomasti değerlendirilmesinin yanında, boy, ağırlık ve kan basıncı ölçülür. Erkek genital sistem muayenesinde penis anatomisinin değerlendirilmesi, skrotum, prostat ve seminal vezikül muayenesi önemlidir [2, 14].

Semen analizi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), semen değerlendirmesinin nasıl yapılması gerektiğini el kitabıyla açıklamıştır [15]. En günceli olan altıncı baskıda temel semen analizi; semen hacmi, sperm hareketliliği, konsantrasyonu, morfolojisi ve canlılık değerlendirmesini içermektedir. Genişletilmiş semen analizi ise sperm antikorları, lökosit veya immatür sperm hücrelerinin saptanması, sperm anöploidi, ya da DNA kırıklarının değerlendirilmesi şeklinde özetlenebilir. Reaktif oksijen türlerinin belirlenmesi, bilgisayar-yardımlı sperm analizi (computer-assisted sperm analysis, CASA), akrozom reaksiyonu ve membran iyon kanallarının değerlendirilmesi ise ileri analizlere örnektir. Temel semen analizi için referans değerler 5 kıtada, 12 ülkeden yaklaşık 3500 fertil erkekten alınan verilere göre belirlenmiştir (Çizelge 2.1.) [16].

Çizelge 2.1. Temel semen analizi değerlendirme parametreleri ve 5. persentil değerleri

Parametreler	5.persentil değeri
Semen hacmi (ml)	1,4
Sperm konsantrasyonu (milyon/ml)	16
Toplam sayı (milyon)	39
Toplam hareketli sperm yüzdesi	42
İleri hareketli sperm yüzdesi	30
Katı kriterlere göre normal morfolojideki sperm yüzdesi	4

Hormonal değerlendirme

Erkek infertilitesinde sperm sayısı düşük olması ya da endokrinopati şüphesiyle hormonal değerlendirme yapılabilir [2]. Folikül stimülan hormon (FSH), lüteinizan hormon (LH), total ve serbest testosteron ve seks steroid bağlayıcı globulin (SHBG) ölçümü özellikle hipogonadizm ayırıcı tanısında önemli rol alır [17].

Görüntüleme tetkikleri

Erkek infertilitesinde görüntüleme yöntemlerine başvuru hastanın ihtiyacına göre yapılır. Skrotal ultrasonografi, güvenli ve ucuz olması nedeniyle en sık başvurulanan görüntüleme yöntemidir. Transrektal ultrasonografi ve kranial MRG (Manyetik Rezonans Görüntüleme) gerektiğinde başvurulanan seçeneklerdir [2].

Genetik testler

Erkek infertilitesinde vakaların yaklaşık %15'i genetik nedenlidir. Sadece spermatogenezle ilgili 2300'den fazla gen olması, fertilitenin karmaşık mekanizmasını ve genetik etkilerin heterojenliğini düşündürmektedir. Son yıllarda erkek infertilitesinde moleküler nedenlerin araştırılması, açıklanmayan infertilite grubundaki hastaların tanı almasını sağlayabileceği için umut vericidir [18].

2.1.3. Erkek infertilitesi ve tedavi yaklaşımları

Üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinin gelişmesiyle infertil çiftlerin çocuk sahibi olması mümkün olmaktadır. Intrauterin inseminasyon (IUI), in-vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) yöntemlerinden çifte uygun olan seçilerek uygulanmaktadır [19]. Bu yöntemlerde fertilizasyon şansı en yüksek spermle oositin döllenmesi amaçlanmaktadır. Üremeye yardımcı yöntemlerde fizyolojik yolların çoğu atlandığı için sperm seçimindeki doğal mekanizmalar taklit edilmeye çalışılmaktadır. Ancak bu mekanizmalara ait veriler kısıtlı olduğu için, moleküler çalışmalara ihtiyaç devam etmektedir [20]. Erkek infertilitesinde cerrahi yöntemlerle testisten ya da genital kanallardan elde edilen spermle de canlı doğum sağlanabilmektedir. Bunun yanı sıra hipotalamus-hipofiz-gonad aksında etkili ilaçlarla medikal tedavi seçenekleri de geliştirilmektedir [19].

Biyomedikal alanındaki çalışmalar erkek infertilitesinin tedavisinde umut verici gelişmeleri sağlamıştır. Yüksek çözünürlüklü 3 boyutlu cerrahi mikroskoplarının kullanılması, moleküler mekanizmaların anlaşılması, yapay zeka ve makine öğrenme algoritmalarının geliştirilmesi gibi gelişmelerin sperm seçme yöntemlerinin başarısını arttıracığı öngörülmektedir. Yakın gelecekte, canlı doğum oranlarının artması ve nesiller arası hastalık geçişinin engellenmesi beklenmektedir [19].

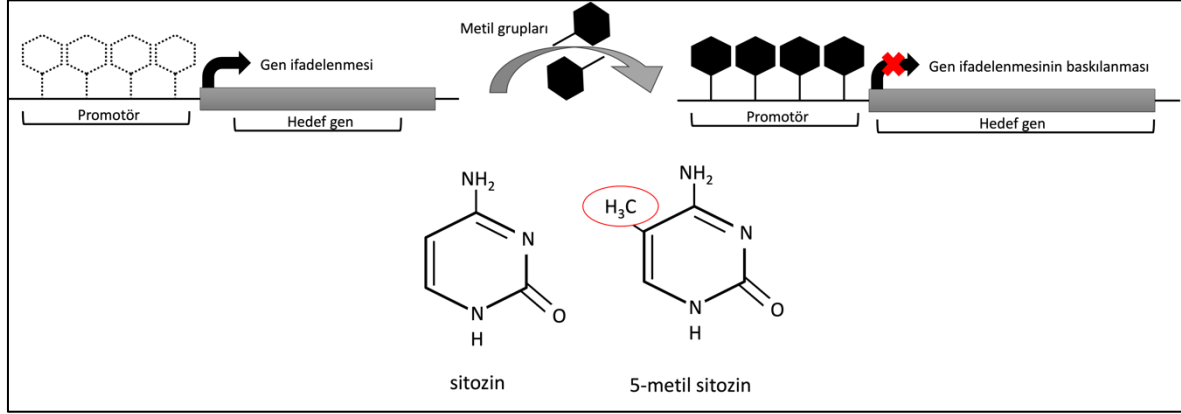
2.2. Epigenetik ve Erkek İnfertilitesi

Epigenetik; “genetiğin üstünde” anlamına gelir ve DNA dizisini değiştirmeden genlerin ifadenmesini düzenler [21]. Epigenetik değişiklikler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yeniden modellemesi, kodlanmayan RNA’lar, RNA düzenlemeleri gibi farklı şekillerde gerçekleşebilir [22].

2.2.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, sitozin (C) nükleotidin 5. karbonuna metil grubu (-CH₃) eklenerek 5-metil sitozine dönüştürülmesidir. DNA metiltransferazlar (DNMT) metil grubunu eklerken, ten-eleven translocase (TET) enzimleri metil grubunu uzaklaştırır [23, 24]. DNMT1 DNA metilasyonunun sürdürülmesi için kullanılırken, DNMT3A ve DNMT3B *de novo*

metilasyonu sağlar [25]. DNA metilasyonu CpG adalarında bulunan sitozin-guanin dinükleotidlerinde (CpG) görülür (Şekil 2.1.) [23, 24].



Şekil 2.1. DNA metilasyonu ile gen ifadenmesinin baskılanması

2.2.2. DNA metilasyonu ve genomik imprinting

Genomik imprinting, anneden ya da babadan gelen allelin seçilerek monoallelik gen ifadenmesidir. İmprint genlerde farklı seviyelerde metillenmiş özel bölgeler (DMR, differentially methylated region) bulunur. Metillenmiş alleldeki gen, “imprint gen” (baskılanmış, damgalanmış) olarak adlandırılır. Gen ifadenmesi için demetile allel kullanılır. Sperm, paternal genleri taşıdığı için paternal imprint genler hipermetile, maternal imprint genler ise hipometile durumdadır. Fertilizasyondan sonra zigotun kromozomlarında, sperm ve oositten gelen genlerin imprintlenmesi, takip eden hücre bölünmelerinde yaşam boyunca korunur. Ancak monoallelik ifadenmenin seviyesi doku tipi ve gelişim basamaklarına göre zaman içinde değiştirilebilir [4, 5]. İmprint genlerin bazıları ortak DMR’lerle kontrol edilebilir. İmprint genlerin komşuluğunda biallelik ifadenen genler de mevcuttur [4]. İmprint genlerdeki normal metilasyon şeması değiştiğinde; fertilitede azalma ve sonraki nesillere epigenetik hastalıkların aktarılması söz konusudur [5].

2.2.3. Histon modifikasyonları

Histon proteinleri, arjinin ve lizin gibi bazik aminoasitlerden zengin proteinlerdir. Histon proteinleri, bazik amino asitleri sayesinde DNA’nın pozitif yüklü fosfat gruplarıyla bir araya gelerek DNA-histon komplekslerini oluşturur. Histon proteinin “kuyruk” olarak adlandırılan amino ucu; metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon ve karbonilasyon

modifikasyonları ile düzenlenir. Bu düzenlemelerle DNA sarmalının histon proteinleriyle kurduğu ilişki değiştirilerek, gen ifadenmesi kontrol edilir [25].

2.2.4. Kromatin düzenlemeleri

Kromatin düzenlemeleri, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarından farklı olarak kovalent bağlarla düzenlenmez. ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenleme kompleksleri nükleozomların yerini veya yapısını değiştirerek gen ifadenmesini kontrol eder [6].

Kromatin düzenlemelerine bir diğer örnek sperm protaminasyonu. Sperm hücrelerine özgü bir epigenetik düzenleme olan protaminasyon tam olarak açıklanamamış bir dizi olayla gerçekleşmektedir. Spermatogenez sırasında histon proteinlerinin büyük bir kısmının önce histon varyantlarıyla, ardından da protaminlerle yer değiştirmesi kromatin kondensasyonu olarak tanımlanır. Protaminasyon sonucunda DNA'nın %5-10 gibi bir oranda histon proteinleriyle bağlı kaldığı bilinmektedir [7].

2.2.5. Kodlanmayan RNA'lar

Kodlanmayan RNA'lar, hücrelerde işlevlerini translasyona uğramadan yürüten, son ürünleri protein olmayan RNA dizileridir. Boyutlarına göre sınıflandırılırlar. 200 baz çiftinden uzun olanlar “uzun kodlanmayan RNA (long non-coding RNA, lncRNA)”, kısa olanlar ise “küçük kodlanmayan RNA (small non-coding RNA, sncRNA)”. Küçük kodlanmayan RNA'lar, mikroRNA (miRNA), küçük interferans RNA(siRNA) ve Piwi-ilişkili RNA (piRNA) gibi alt gruplara ayrılır [8]. Erkek infertilitesinde sncRNA'ların translasyonun arttırılması ya da baskılanması, transkriptlerin kesimlenmesi, transpozonların susturulması gibi farklı etkileri görülmüştür. Apoptoz ve hücre döngüsünde duraklama sonucunda sperm sayısında azalma, şekil bozuklukları ve hareketli spermilerin azalması gibi belirtiler görülür [26].

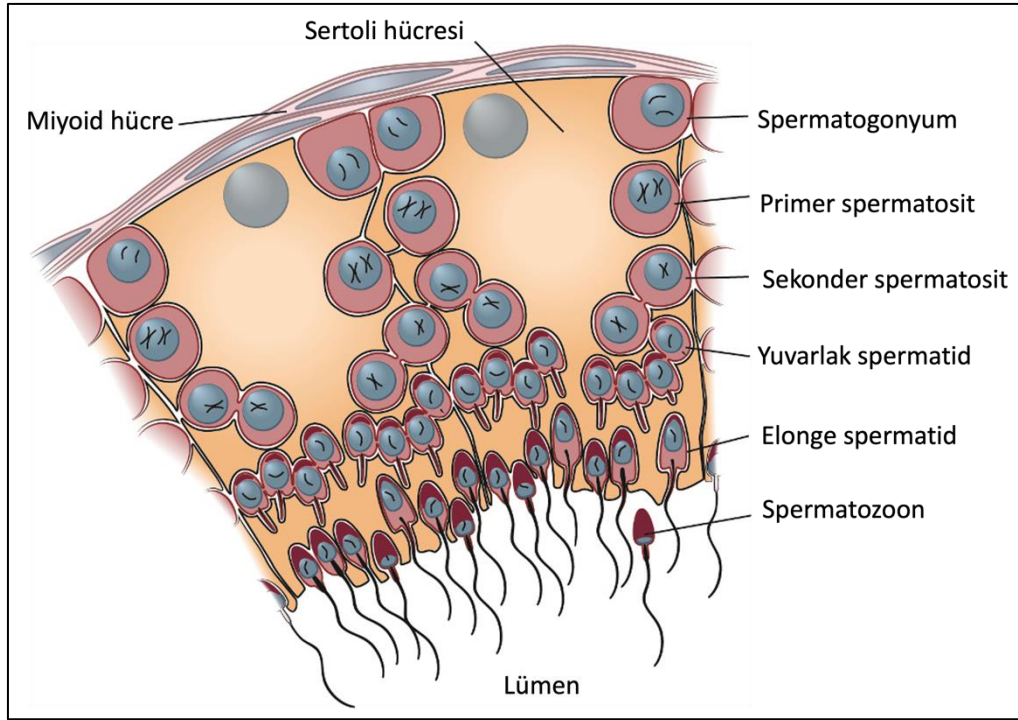
LncRNA transkripsiyonu RNA polimeraz II ile yapılır, bazen mRNA'lar gibi 5'başlık, kesimlenme ve poliadenillenme gibi modifikasyonlar görülebilir. LncRNA'lar genomdaki konumlarına göre intergenik, doğal antisense, pseudogen, intronik, promotör- ilişkili ve enhanser transkriptler olarak beş gruba ayrılır. Gen ifadenmesinin düzenlenmesinde ise farklı yollar üzerinden etki gösterirler. DNA metilasyonu ve kromatin modifikasyonlarını kontrol ederek gen ifadenmesini transkripsiyonel düzeyde düzenlerler. Post-

transkripyonel etkilerini miRNA'lar ve alternatif kesimleme üzerinden gösterirken; translasyonel ve post-translasyonel düzeyde de etkileri görülmüştür [8, 26].

2.2.6. Epigenetik mekanizmaların erkek infertilitesi üzerinde etkileri

Gonad gelişimi, hipotalamus-hipofiz gonad arkı, spermatogenez ve sperm maturasyonu üzerinde etkili olan epigenetik düzenlemeler erkek infertilitesi, implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkileri araştırmalarla gösterilmektedir [5].

Spermatogenez, spermatogonyumdan mitoz ve mayoz bölünmelerle sperm oluşmasıdır. Testiste, seminifer tübüllerde gerçekleşir (Şekil 2.2). Seminifer tübüllerin dışında bulunan Leydig hücreleri, peritübüler miyoid hücreler, kapiller endotelleri ve makrofajlar spermatogenezi dolaylı olarak etkileyen testiküler somatik hücrelerdir. Seminifer tübül epitelinin parçası olan Sertoli hücreleri, spermatogenik seri hücrelerine metabolik ve yapısal destek sağlarlar. Primordiyal germ hücreleri (PGC) erken embryonik dönemde gonositlere, gonositler de doğum sonrasında spermatogonial kök hücrelere farklılaşır. Spermatogenez sırasında, spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşır. Mayoz bölünme sonrası spermatositlerden spermatidler oluşur. Yuvarlak spermatidler flajella uzaması ile elonge spermatidlere dönüşür. Elonge spermatidler yapısal farklılaşmalarını tamamladıktan sonra spermatozoon olarak lümene bırakılır. Sperm maturasyonu ise epididimiste tamamlanır [27]. Spermin taşıdığı epigenetik bilgi doğrudan veya dolaylı olarak bu süreçte etkilenmektedir.



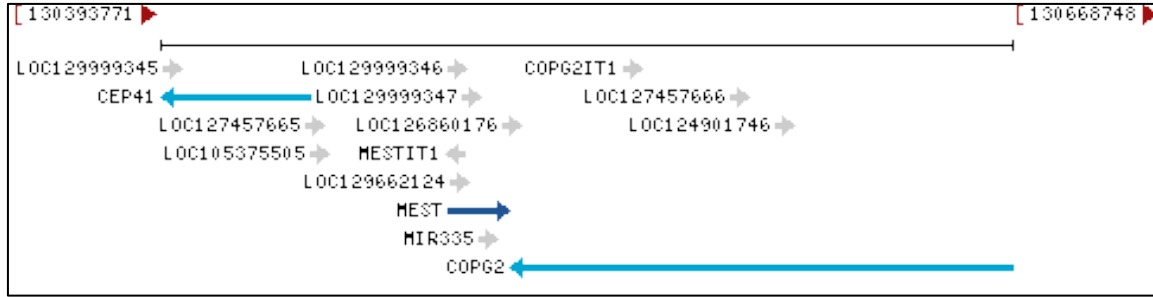
Şekil 2.2. Seminifer tübülün histolojik yapısı [27]

Sperm epigenomu, spermin yapısını, işlevini ve sayısını etkilemektedir. Klinikte tanı ve tedavide yeni epigenetik belirteçlerin saptanması konusunda araştırmalar yaygınlaşmaktadır [28]. Epigenomun yaş ve çevresel faktörlerle değişmesi göz önünde bulundurulması gereken bir diğer noktadır. İnsan dokularının çoğunda epigenetik saat; DNA metilasyonu yaş biyobelirteci olarak kullanılmaktadır. Stres faktörlerinin dokulardaki yaşlanmayı farklı hızlarda etkilemesi, stres faktörlerinin yaşlanma ivmesini değiştirmesi gibi etkiler epigenomun karmaşık mekanizmalarını göstermektedir [29].

Spermatogenez sırasında primordiyal germ hücrelerinde DNA demetilasyonu iki adımda gerçekleşir. Bunlardan ilki metillenmiş sitozinde genel bir azalma, ikincisi ise imprint kontrol bölgelerinin (ICR: Imprinting Control Region) ve mayoz bölünmeyle ilişkili genlerin demetilasyonudur. Bu hücrelerde 11.haftada metilasyon seviyesi %7 civarında iken, 19. haftada de novo metilasyonla tekrar metilasyon başlar. Primatlarda yapılan çalışmalar bu sürecin doğum sonrasında da devam ettiğini göstermektedir. PGC’lerde bu süreçte oluşan hataların spermilere yansıdığı düşünülmektedir. [30]

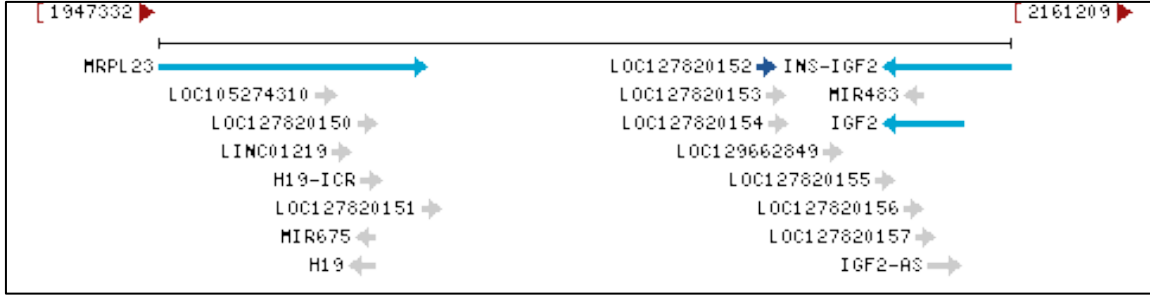
“Human mesoderm-specific transcript (MEST)”, 7q32.2 bölgesinde bulunan imprint bir gendir. Paternal alleli ifadelenen bu gen “Paternally expressed gene-1 (PEG1)” olarak da

isimlendirilir. *MEST* geninin son ürünü α/β -hidrolaz ailesinden bir enzimdir. [31]. *MEST* izoform 1 paternal ifadelenirken, *MEST* izoform 2 fetal plasenta, böbrek ve lenfoblastoid hücre hattında paternal ifadelenirken, diğer dokularda her iki allelden ifadelenir. Spermatogenez sırasında *MEST* metillenmiş bölgeler fetal spermatogoniyal evreden önce silinir ve olgun spermatozoada demetile haldedir [32]. Silver-Russell Sendromu'nda (SRS) aday imprint genlerden biri olan *MEST* ile aynı kromozomda bulunan diğer imprint genlerin araştırılması sırasında başka bir transkript keşfedilmiştir. *MEST* intronik transkript 1 (*MESTIT1*), paternal ifadelenen kodlanmayan antisense RNA'dır [33]. SRS, doğum ağırlığı düşük, kısa boylu, ekstremit ve baş anomalilerinin görüldüğü bir sendromdur. 7. Kromozomda bulunan *MESTIT1* geninin transkriptlerinin *MEST* ifadelmesini düzenleyerek SRS fenotipine neden olduğu gösterilmiştir [34]. Meme kanseri [35] ve servikal neoplazi [36] gibi hastalıklarla da ilişkisi araştırılmaktadır. *MESTIT1* transkriptinin testis ve olgun spermden fazla miktarda bulunması, sperm fizyolojisi ve fertilizasyonda önemi olduğunu düşündürmektedir [37]. 7. kromozomun uzun kolunda "otizm duyarlılık lokusu" olarak değerlendirilen bölgede, *MEST*'in komşuluğunda testis-spesifik gen A14 (*TSGA14*) bulunur [38, 39]. *TSGA14* geni sentrozomal mikrotübül bağlayıcı bir protein kodlaması nedeniyle sentrozomal protein 41(*CEP41*) olarak da adlandırılır [40]. *TSGA14* (*CEP41*) her iki allelden ifadelendiği için imprint gen değildir ve insan fetal testis ve beyin dokusunda yüksek düzeyde ifadelanmaktadır [38, 41]. *CEP41* primer silyada bulunan ve post-translasyonel modifikasyonlarda işlevsel rolü bulunan bir proteindir [42]. *CEP41* genindeki değişikliklerin klinik etkileri; bir çeşit siliyopati olan Joubert Sendromunda [43], kolorektal kanserde [44], *in vitro* anjiogenez deneylerinde [45], Otizm Spektrum Bozukluğu'nda (ASD, Autism Spectrum Disorder) [46], kalıtsal sendromik retinopatilerde [47] görülmüştür. *CEP41* geninin insan ve primat serebral kortekslerinde hipometile olduğu gösterilmiştir. 2017 yılında yayınlanan bir meta-analizde, *MEST* geninin DMR metilasyonunun infertil erkeklerde fertil erkeklere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak bu çalışmada *MEST* DMR'lerinde anormal metilasyonun istatistiksel olarak anlamlı bir risk artışına neden olmadığı belirtilmiştir [9]. *MEST* geni DNA metilasyonunun erkek infertilitesi üzerine etkilerinin inceleyen çalışmalar devam etmektedir. Bu genin komşuluğunda bulunan ve testiste ifadelenen *MESTIT1* ve *CEP41* genlerinin metilasyonu ile erkek infertilitesi arasındaki ilişkilere dair çalışmalar kısıtlıdır (Şekil 2.3.).

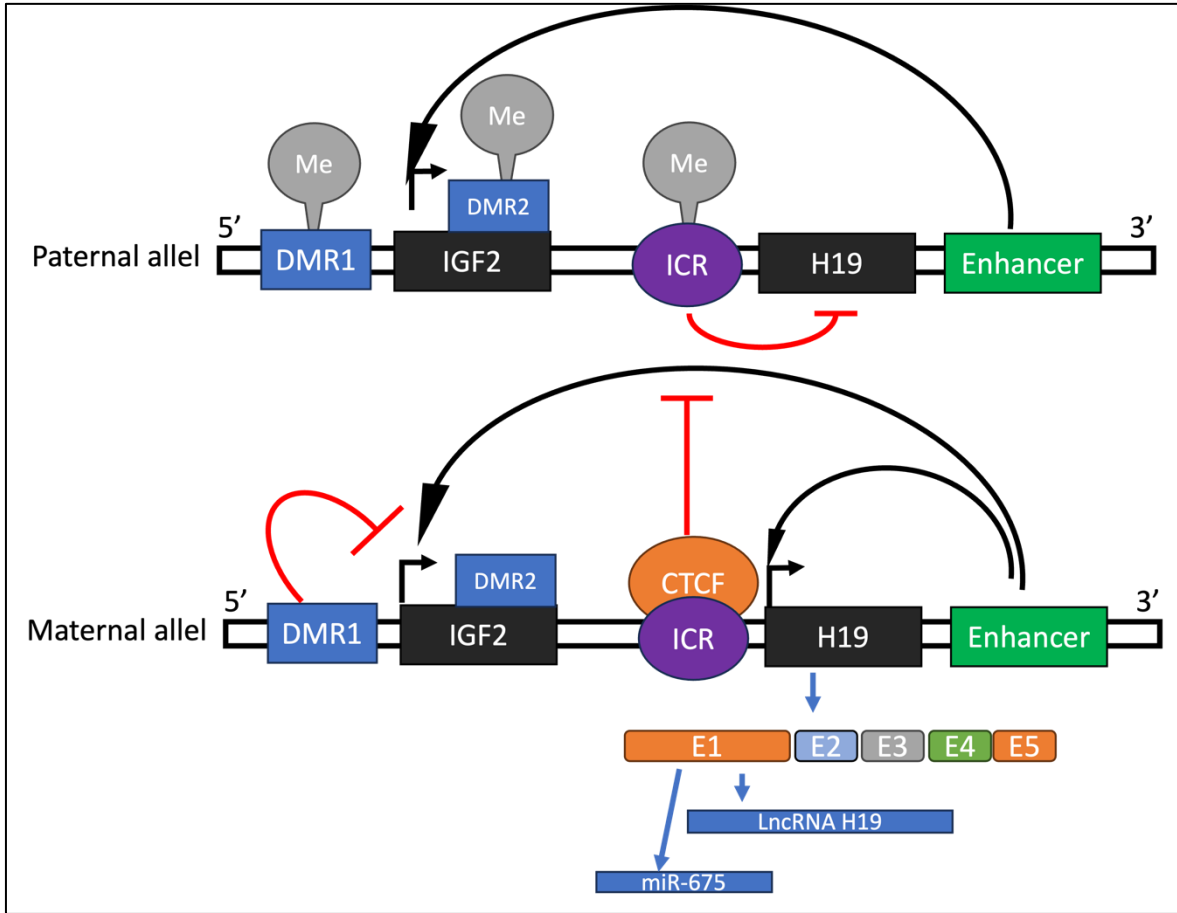


Şekil 2.3. 7.kromozomun uzun kolunda bulunan *MEST*, *MESTIT1* ve *CEP41* genleri [48]

LncRNA *H19*, ökaryotlarda ilk imprint gen olarak tanımlanmıştır ve insanda 11. kromozomun kısa kolunda bulunur. Maternal allelden ifadelenen *H19* başka bir imprint gen olan İnsülin- benzeri büyüme faktörü-2 (*IGF2*) geniyle aynı kromozomda bulunur (Şekil 2.4). *IGF2* paternal ifadelenen ve protein kodlayan bir gendir. *H19* ifadelенmesinin kontrolü bir promotor ve ICR olarak da adlandırılan DMR'den kontrol edilir. *IGF2* ve *H19* aynı dokuda farklı allelden ifadelенmesi bir çinko- parmak proteini olan CCCTC bağlayıcı faktör (CTCF) tarafından düzenlenmektedir. Paternal allelde ICR metilasyonu CTCF bağlanmasını engellediği için *H19* ifadelенmesi baskılanır. *IGF2*'nin 5' ucundaki DMR1'in metilasyonu sonrasında ifadelенmesi azalır. *IGF2*'nin artırıcı özellikteki DMR2 bölgesi metilasyonla aktif hale gelir ve *IGF2* ifadelенir. Maternal allelde ise ICR demetiledir. CTCF bağlanabilir ve *H19* ifadelенir. 3' uçtaki artırıcının *IGF2* üzerindeki etkisi baskılanır (Şekil 2.5.). *H19*'un 1. ekzonu kesimlenerek mir-675 elde edilir [49]. *H19* ifadelенmesi embriyo gelişimi sırasında yüksek seviyede, doğum sonrasında kısa sürede azalır [50]. *H19* transkriptlerinin plasentanın gelişmesini ve işlevini düzenlediği gösterilmiştir [51]. *H19* RNA'larının kesimlenerek mir-675'in oluşturulması *H19* transkriptlerinin azaltılmasının yanı sıra, miRNA'nın çeşitli düzenleyici etkileri bulunmaktadır [50]. mir-675'in farklı dokularda, histon deasetilaz ifadelенmesinin baskılanması ya da *IGF2* geninin baskılanması gibi farklı etkileri gösterilmiştir [52]. *H19* geninin mikrolelesyonu ve maternal hipermetilasyonu; konjenital aşırı büyüme ve embriyonik tümörlerin görüldüğü Beckwith-Wideman sendromuyla ilişkilidir [53]. İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 antisense (*IGF2AS*) *IGF2* geninin tamamlayıcı DNA zincirinden transkripsiyona uğrar. LncRNA *IGF2AS*, ilk olarak Wilms tümöründe paternal ifadelenen imprint gen olarak tanımlanmıştır. Erken gebelik kaybında, plasental villusların *IGF2AS* promotör metilasyonu artmış ve genin ifadelенmesi azalmış olarak bulunmuştur [54].



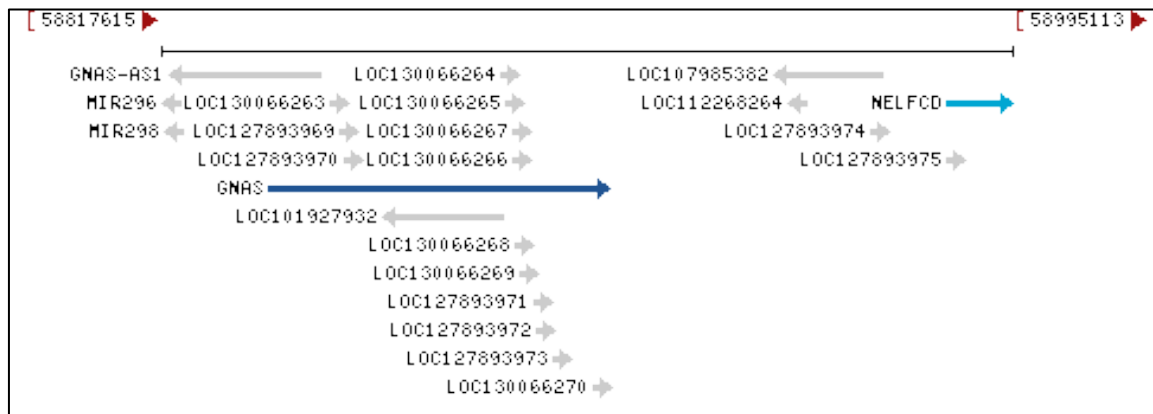
Şekil 2.4. 11. Kromozomda bulunan *H19*, *IGF2* ve *IGF2-AS*, *mir-675* genleri [55]



Şekil 2.5. *IGF2* ve *H19* genlerinin ifadenemesinin kontrolü [49, 51, 56]

GNAS, 20. kromozomdan ifadelenen çok sayıda gen içeren bir bölgedir (Şekil 2.6.). Uyarıcı Guanin nükleotid- bağlayıcı proteininin alfa alt birimi (*Gsα*), ekstra-büyük *Gsα* (*XLαs*), nöroendokrin salgılayıcı protein (*NESP55*), A/B transkript ve *GNAS-AS1* olmak üzere farklı transkriptleri farklı allellerden ifadelendir. *GNAS-AS* psödohipoparatiroidizm tip Ib hastalığıyla ilişkili bir gendir [57]. *GNAS* lokusundaki genlerin ifadenemesinin düzenlenmesi *IGF/H19* lokusunun karşılıklı düzenlenmesine benzerlikler göstermektedir

[58]. *GNAS* DMR'leri genellikle genlerin promotör bölgelerinde bulunur. Bu bölgelerin metillenmesi genlerin susturulmasıyla sonuçlanır. *XLas*, *A/B* ve *GNAS-AS1* paternal ifadelenirken, *NESP55* maternal ifadelenir [59]. DNA metilasyonu ile oluşmuş 5-metilsitozin, TET proteinleri ile okside olduğunda 5-hidroksimetilsitozin oluşur. Anormal morfolojiye sahip spermelerde *GNAS* genindeki 5-hidroksimetilsitozin paterni, normal morfolojideki spermere göre farklıdır. *GNAS* metilasyon paternindeki değişimler sperm fenotipini etkileyerek infertiliteye neden olduğu düşünülmektedir [60]. Yardımcı üreme tedavilerinde *GNAS* metilasyonundaki değişimlerin önemi, göbek kordonu kanı kullanılarak araştırılmıştır. Yardımcı üreme teknikleriyle doğan erkeklerde *GNAS-NESP* DMR hipermetile, *GNAS-XL* DMR hipometile bulunmuştur. Kızlarda ise *GNAS-NESP*, *GNAS-XL*, *GNAS-A/B* imprint kontrol bölgeleri hipometile bulunmuştur. *GNAS-AS1* DMR metilasyonu ise her iki cinsiyette yardımcı üreme tekniklerinden etkilenmemiştir [61].



Şekil 2.6. 20.kromozomda bulunan *GNAS* ve *GNAS-AS* genleri [62]

Günümüzde spermin sadece genetik değil epigenetik bilgiyi de sonraki nesle aktardığı bilinmektedir. Ancak bu aktarımın gerçekleşmesi için fertilizasyon, implantasyon, gebelik ve canlı doğum gerekmektedir. İnfertilite tedavilerinin günümüzde geldiği nokta kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarından uzaktır. Canlı doğum ve sağlıklı bireyler için sperm epigenomunun anlaşılması tedavilerin kişiselleşmesine yardımcı olacaktır. [3]. Spermde imprint genlerde anormal DNA metilasyonun erkek infertilitesiyle ilişkisi gösterilmiştir. [9, 63]. Yardımcı üreme teknikleriyle doğan çocuklarda klinik önemi ortaya konulmasa da başta imprint genler olmak üzere DNA metilasyon anomalileri saptanmaktadır [57]. DNA metilasyonunun erkek infertilitesinde etkililerini gösteren çalışmalar, bu genlerinin transkriptlerinin değişimini göstermemektedirler. Literatürdeki bu ihtiyaçtan yola çıkarak bu

tez çalışmasında, *MEST*, *MESTIT1*, *CEP41*, *IGF2*, *H19*, *GNAS* genlerinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel epigenetik değişimlerin gösterilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan izinle (Tarih:25.02.2021, Sayı: 04) ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi desteği (TDK-2021-7023) ile yürütüldü. Gazi Üniversitesi Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezine başvuran infertil çiftlerden ve kontrol grubu olarak fertil erkeklerden çalışmaya katılmaya onam verenler çalışmaya dahil edildi. Katılımcılardan yaş, boy, ağırlık bilgileri, partnerlerinin yaşı, cinsel perhiz süreleri bilgileri alındı. Ardından semen örnekleri alındıktan sonra deneylerin yapılması için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarlarına götürüldü. Deneyler, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarları ve Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarlarında yapıldı.

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada kontrol grubu (Grup1) fertil erkeklerden, deney grupları ise Gazi Üniversitesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezine başvuran erkeklerden sperm sayısı az olanlardan (oligospermi, Grup2) ve sperm sayısı normal olanlardan (normospermi, Grup3) oluşturuldu.

Gönüllüleri dahil etme kriterleri:

Grup1 (Kontrol Grubu, fertil, n=30)

- 18 yaş üstü üreme çağındaki erkekler
- Son iki yıl içinde eşinin kendiliğinden gebe kalmış olması/ çocuk sahibi olması

Grup2 (Oligospermi Grubu, n=30)

- 18 yaş üstü üreme çağındaki erkekler
- İnfertilite şikayetinin olması
- Sperm konsantrasyon değerinin 16milyon/ml'den az olması [15]

Grup3 (Normospermi Grubu, n=30)

- 18 yaş üstü üreme çağındaki erkekler
- İnfertilite şikayetinin olması
- Sperm konsantrasyon değerinin 16milyon/ml ve üzerinde olması [15]

Gönüllüleri dışlama kriterleri:

Erkek infertilitesi ile ilgili bilinen bir neden olması

Gönüllülerin araştırmadan çıkarılma kriterleri:

Sperm konsantrasyonunun RNA ve DNA izolasyonu yapmaya yeterli olmadığı durumlarda gönüllüler araştırmadan çıkarıldı.

3.2. Gereçler

3.2.1. Cihazlar

- Buzdolabı (Arçelik)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo)
- Hassas terazi (Precisa)
- Isıtıcı blok (Biosan)
- Karbondioksitli etüv (Sanyo)
- Kurabo Quick Gene Mini-80 Nükleik Asit İzolasyon Sistemi
- LEİCA DM4000 Görüntüleme Sistemi
- Mikropipetler (Dragonlab, Isotherm)
- pHmetre (Isolab)
- Pyromark Q24 (Qiagen)
- Santrifüj (Hettich Mikro 22R)
- SenseQuest Termal Döngü Cihazı
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22R)
- Spin vorteks (Biosan)
- Tshaker (Euro Clone)

- ABI 7500 FAST
- ABI Veriti 96

3.2.2. Sarf malzemeleri

- Costar plate
- Lamlar
- Mikrosantrifüj tüpleri (2ml, 1,5ml, 0,2ml)
- Pastör pipetler (1,5ml, 3ml)
- Pipet uçları
- Pyromark Q24 plakası
- Santrifüj tüpleri (15ml)
- Kapatıcı (Sealing) filmler

3.2.3. Kimyasallar ve kitle

- Pirosekans için kullanılan malzemeler:
 - Annealing Tamponu (Annealing Buffer)
 - Bağlama Tamponu (Binding Buffer)
 - Denatürasyon Solüsyonu
 - PCR ve Sekans Primerleri
 - Pyrosekans Gold Reagent
 - Pyrosekans PCR Kiti
 - Pyrosekans Q24 Plakları
 - Yıkama Tamponu
- Dietil Pirokarbonat Suyu (DEPC)
- DNA izolasyon kiti (FujiFilm):
 - Doku lizis tamponu: MDT
 - Elüsyon tamponu
 - Lizis tamponu: LDT
 - ProteinazK
 - Yıkama tamponu: WDT

- Etanol
- EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research)
- Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline, PBS)
- İzopropanolol
- Kloroform
- Sensifast cDNA Kit (Bioline,UK)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
- TRIzol
- Triton-X
- SpermacStain
- SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit

3.3. Semen Değerlendirmesi

Gönüllülerden alınan semen örnekleri 37°C’de 30 dakika likefiye edildikten sonra semen hacmi ölçüldü. Makler sayım kamerasında 10µl semen örneğinde sperm sayısı ve hareketli sperm yüzdesi değerlendirildi. 10µl semen temiz bir lama yayılarak kurutuldu. Spermac boyama basamaklarına uygun şekilde boyandı. Morfoloji değerlendirildi. Spermac yöntemi boyama basamakları şu şekildedir:

1. Havada kurutulan yaymalar formaldehit içeren fiksatif çözeltisi ile tespit edildi.
2. Akar suyun altında yıkandı.
3. A solüsyonunda 1 dakika bekletildi.
4. Akar suyun altında yıkandı.
5. B solüsyonunda 1 dakika bekletildi.
6. Akar suyun altında yıkandı.
7. C solüsyonunda 1 dakika bekletildi.
8. Akar suyun altında yıkandı.
9. Kurutulan yaymalar 100x objektif altında immersiyon yağı kullanılarak incelendi. Leica DM4000 Görüntüleme Sistemi (Almanya) ile 200 sperm sayılarak normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi belirlendi.

3.4. Semenden Sperm Hücrelerinin Elde Edilmesi

Semen değerlendirmesinin ardından, sperm hücrelerinin elde edilmesi ve varsa somatik hücrelerin temizlenmesi amacıyla kalan semen sperm konsantrasyonu 10 milyon/ml'den az olacak şekilde 15ml'lik tüpe aktarıldı [64]. 2000g 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 1ml PBS eklendi. 1600g 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 1ml somatik hücre lizis tamponu (SCLB) (%0.5 Tritonx-100, %0.1 SDS) eklenerek karıştırıldı. SCLB eklenerek 13ml'ye tamamlandı. Buz içinde 30 dakika bekletildi. 1600g 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 600µl PBS eklenerek karıştırıldı. Makler sayım kamarasıyla sayım yapıldı. Karışımdan 1 milyon sperm hücresi içeren miktarlar RNA ve DNA izolasyonu yapmak için ayrıldı. Kalan kısım -80°C'de saklandı.

3.5. Real Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Spermlerden RNA izolasyonu yapıldı. RNA konsantrasyonu ölçümü yapıldıktan sonra cDNA sentezi yapıldı ve cDNA'lar RT-qPCR işleminde kullanılarak hedef genlerin ifadelenmeleri değerlendirildi.

3.5.1. Spermden RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için ayrılan örneklerle sırasıyla üretici önerilerine uygun şekilde şu basamaklar uygulandı:

- 1ml TRIzol eklenerek karıştırıldı.
- 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 200µl kloroform eklenerek 15sn vorteksle karıştırıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 12000g +4°C 15 dakika santrifüj edildi.
- Üst fazdan 500µl yeni tüpe aktarıldı.
- 0,5ml isopropanol eklendikten sonra hafifçe alt üst yapıldı
- -20 °C gece boyunca bekletildi.
- 12000g +4°C 10 dakika santrifüj edildi.

- Supernatant atıldı.
- 1ml %75 etanol eklendi.
- 7500g +4°C 5 dakika santrifüj edildi.
- Etanol atıldıktan sonra 5 dakika kurutuldu.
- Isıtılmış DEPC water eklenerek 56°C 10 dakika RNA çözüldü.
- NanoDrop ile RNA saflığı ve miktarı ölçüldükten sonra -80 °C dondurucuda saklandı.

3.5.2. cDNA eldesi

Elde edilen ve saklanan RNA’lardan Sensifast (Bioline) cDNA Kit bileşenleri belirtilen oranlarda karıştırılarak (Çizelge 3.1) aşağıdaki basamaklar uygulandı.

Çizelge 3.1. cDNA Reverse transkriptaz kiti bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Total RNA	Değişken
5x TransAmp tamponu	4µl
Reverse Transkriptaz	1µl
Nükleaz içermeyen su	20µl ’ye tamamlandı.

Buz üzerinde karışım hazırlandıktan sonra termal döngü cihazı ile aşağıdaki protokol izlendi:

- 25 °C’de 10 dakika primer bağlandı.
- 42 °C’de 15 dakika reverse transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi.
- 85 °C’de 5 dakika enzim inaktivasyonu yapıldıktan sonra elde edilen cDNA ürünleri -20 °C’de saklandı.

3.5.3. qPCR analizi

Elde edilen cDNA’lardan seçilen genler için SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit bileşenleri belirtilen oranlarda karıştırıldı (Çizelge 3.2.). İncelenen genlerin primer dizileri ve RT-qPCR basamak bilgileri Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4.’te sunulduğu şekilde uygulandı. Reaksiyonlar üç kez tekrar edildi. Reaksiyon sonrası ışıma grafiklerinden tespit edilen döngü

eşik (CT,cycle treshold) değerlerinden Livak metodu ile gen ifadenmeleri değerlendirildi [65].

Çizelge 3.2. RT-qPCR kit bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Derişim	Miktar 1X
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	2x Mastermix (1,5) buffer	10 µl
mRNA MixB (Primer)	Forward ve Reverse	5 µl
cDNA	10-50 ng	5 µl

Çizelge 3.3. Çalışmada incelenen genlere ait ileri ve geri primer dizileri, annealing sıcaklıkları

Primer Adı	Sekans (5'->3')	Uzunluk	Tm °C
MESTIT-hsa-F	ACAACACAGGCCAGAAACAC	20	65 °C
MESTIT-hsa-R	TCCAGTCTGCCCCACTTGAT	19	
MEST-hsa-F	TGTCAAATGGAGGTATCTTT	20	65 °C
MEST-hsa-R	AAGTTCATCAGTCGTGTG	18	
GNAS-hsa-R	GAGATGAGTTTCTGAGGAT	19	62,5 °C
GNAS-hsa-R	CAGGTGAAATGAGGGTAG	18	
TSGA14-hsa-F	GATCATCCAAGTTGCTTCC	19	57 °C
TSGA14-hsa-R	GCAGAATCATTGTCTTCCA	19	
H19-hsa-F	CCTTCCTGAACACCTTAG	18	59 °C
H19-hsa-R	GTAGCACCATTCTTTTCAT	19	
IGF2-hsa-R	GAAACAGCACTCCTCAAC	18	61 °C
IGF2-hsa-R	CAGACACCAATGGGAATC	18	
ACTB-hsa-F	TGAAGATCAAGATCATTGCT	20	59 °C
ACTB-hsa-R	ATACTCCTGCTTGCTGAT	18	

Çizelge 3.4. RT-qPCR işlem basamakları

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık/Derece	Tekrar
Başlangıç	Denatürasyon	95°C-5dk	1
PCR Aplikasyon	Denatürasyon	95°C-10sn	40
	Bağlanma	57-65°C-30sn(Okuma)	
Sonlandırma	Erime	95°C-10sn	1
		65°C-5sn	1
		95°C-5sn	1

3.6. DNA Metilasyonunun Değerlendirilmesi

Spermillerden elde edilen DNA, bisülfıt modifikasyonu yapıldıktan sonra PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Pirosekans yöntemiyle hedef CpG dinükleotidlerinde metilasyon yüzdeleri belirlendi [66].

3.6.1. Spermden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için QuickGene DNA izolasyon kiti (FujiFilm) kullanılarak örneklere sırasıyla üretici önerilerine uygun şekilde şu basamaklar uygulandı:

- Örneğe 180µl MDT solüsyonu eklenerek karıştırıldı.
- 20µl proteinaz K eklenerek 15 saniye vortekslendi.
- 56 °C 1 saat inkübe edildi.
- 180µl LDT solüsyonu eklenerek vortekslendi.
- 70 °C 10 dakika inkübe edildi.
- 240µl %100 etanol ile karıştırıldı.
- Karışım Kurabo QuickGene Mini80 cihazında filtreye aktarıldı. Cihaz çalıştırılarak karışım filtrelendi.
- Lizat atık tüpüne tamamen aktıktan sonra filtreye yıkama tamponu WDT 750µl eklendi. Cihaz çalıştırılarak filtre yıkandı. Yıkama işlemi aynı şekilde 2 kez daha tekrarlandı.

- Yıkanan filtrede bulunan DNA, 50µl elüsyon tamponu eklenerek 10 dakika inkübe edildi. Cihaz çalıştırarak DNA toplandı.
- NanoDrop ile DNA saflığı ve miktarı ölçüldükten sonra -80°C dondurucuda saklandı.

3.6.2. DNA bisülfite modifikasyonunun yapılması

EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research), kullanılarak aşağıdaki protokol adımları takip edilerek bisülfite modifikasyonu yapıldı.

- CT Dönüşüm Reaktifi oda sıcaklığında hazırlandı. (Çizelge 3.5)

Çizelge 3.5. CT Dönüşüm Reaktifi hazırlanışı

Bileşenler	Miktar
M-Seyreltme Tamponu	300µl
M-Dissolving Buffer	50µl
CT Dönüşüm Reaktifi	Tüm içerik
Su	900µl

- 130µl CT Dönüşüm Reaktifi ve 20µl DNA PCR tüpünde karıştırıldı. DNA miktarı 200- 300ng olacak şekilde hesaplandı.
- Termal döngü cihazında aşağıdaki reaksiyonlar gerçekleştirildi:
 - 98°C’de 10 dakika
 - 64 °C’de 2,5 saat
 - 4 °C de 20 saate kadar saklama
- Zymo-Spin™ IC kolonuna 600µl M-Bağlanma Tanponu eklendi.
- PCR tüpündeki karışım kolona aktarıldı.
- 10000g 30 sn santrifüj edildi.
- 100µl M-Yıkama tamponu kolona eklendi ve 10000g 30 sn santrifüj edildi.
- 200µl M-Desülfanasyon tamponu kolona eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. 10000G 30 sn santrifüj edildi.
- 200µl M-Yıkama tamponu kolona eklendi ve 10000G 30 sn santrifüj edildi. Bu basamak 2 kez tekrarlandı.

- Kolon 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 15µl elüsyon tamponu kolona eklendi. 10000G 30sn santrifüj edildi.
- Bisülfıt modifikasyonu yapılan DNA'lar -20 °C'de saklandı.

3.6.3. Pirosekans analizinin yapılması

İlgili genlerin belirlenmiş bölgelerindeki CpG dinükleotidlerinin metilasyonun ölçülmesi için öncelikle PCR ile hedef bölgeler çoğaltıldı. Ardından PyroMark Q24 cihazı (Resim 3.1) ile pirosekans yapıldı.

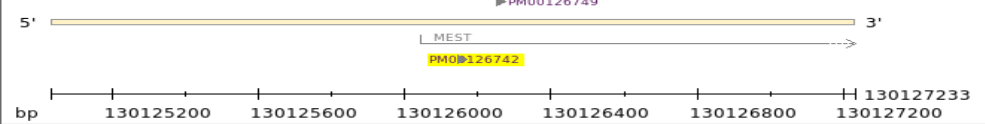
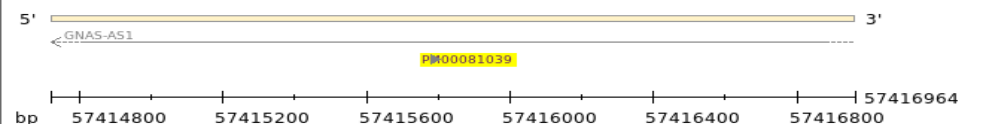
PCR aşaması

İlk olarak bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA örnekleri, hedef primerler (Çizelge 3.6.) kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Çizelge 3.7., Çizelge 3.8.). PCR ürünleri -20 °C'de saklandı.

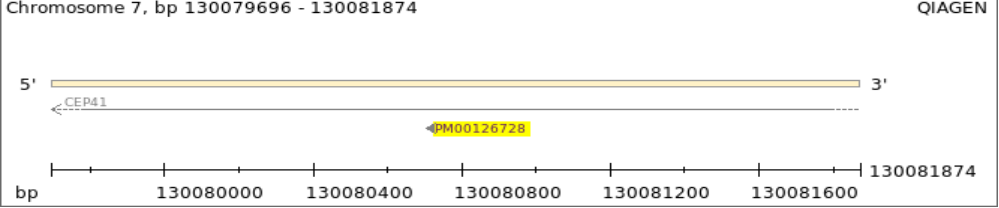
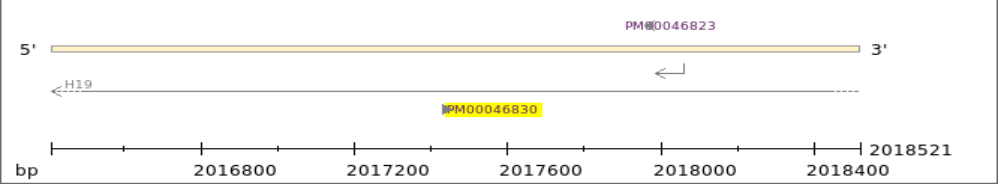


Resim 3.1. Pyromark Q24 çalışma istasyonu. A: Sekans ünitesi, B: Vakum motoru, C: El probu, D: Yıkama ünitesi, E: Atık ünitesi [67]

Çizelge 3.6. Pirosekans için tasarlanan ve hazır kitlerin bilgileri

Bölge	Diziler
MESTIT1	Tasarım gene ait bilgiler: Forward pcr primer dizisi: GGTGTGTTATAAAGTTGGTT Reverse pcr primer dizisi: CTAATTCCTACTATAAATCTTA Sekans primer dizisi: GACGGCTTTCGCAAGCACGGAGGCTCAGGGCCGCGT Analiz dizisi: GACGGCTTTCGCAAGCACGGAGGCTCAGGGCCGCGTGTTTGGGGAAAACGGTT AGTCCTGAGCCGGC Analiz edilecek bisülfittenmiş dizi: GAYGGTTTTYGTAAAGTATGGAGGTTAGGGTYGYGTGT Dağıtım dizisi: TGATCGTCGTCAGATATCATGTAGTCGTCG
MEST	Chromosome 7, bp 130125034 - 130127233 QIAGEN  Hs_MEST_04_PM PyroMark CpG assay GeneGlobeId:PM00126742 Katalog Numarası: 978746 Amplikon uzunluğu: 199 bp Sekans dizisi: sense Biotin Modifikasyonu: reverse PCR primer Kromozom bölgesi: 7, BP 1301261XX-1301261XX Analiz edilecek sekans: AGCGCATGCGCAACCGGTTCTCCGA Bisülfittenmiş sekans: AGYGTATGYGTAATYGGTTTTTYGA CpG sayısı: 4 Nükleotid dağıtımı: TAGTCGTCAGTGTCTGATATCGTTTCG
GNAS-AS	Chromosome 20, bp 57414721 - 57416964 QIAGEN  Hs_GNASAS_02_PM PyroMark CpG assay GeneGlobeId:PM00081039 Katalog Numarası: 978746 Amplikon uzunluğu: 243 bp Sekans dizisi: sense Biotin Modifikasyonu: reverse PCR primer Kromozom bölgesi: 20, BP 574158XX-574158XX Analiz edilecek sekans: CGGCGTCGCTGCAAGCCAAAGAAGCCCACCCGCCGT Bisülfittenmiş sekans: YGGYGTGTTGTAAGTTAAAGAAGTTTATTYGTGT CpG sayısı: 5 Nükleotid dağıtımı: GTCGTCGTCGTCTAGATAGTAAGAGTAGTCGTCG

Çizelge 3.6. (devam) Pirosekans için tasarlanan ve hazır kitlerin bilgileri

CEP41 (TSGA14)	 Chromosome 7, bp 130079696 - 130081874 QIAGEN 5' 3' bp 130080000 130080400 130080800 130081200 130081600 130081874
	Hs_TSGA14_01_PM PyroMark CpG assay GeneGlobeId:PM00126728 Katalog Numarası: 978746
	Amplikon uzunluğu: 178 bp
	Sekans dizisi: antisense
	Biotin Modifikasyonu: reverse PCR primer
	Kromozom bölgesi: 7, BP 1300808XX-1300808XX
	Analiz edilecek sekans:CCGTGAGGCTAGAACCCCGAACGTGGTCGGT
	Bisülfittenmiş sekans:
	TYGTGAGGTTAGAATTTYGAAYGTGGTYGGT
	CpG sayısı: 4
	Nükleotid dağıtımı:ATCGTGATGTCTGAGATTCGATCGATGTCG
hsa-mir-675 H19	 Chromosome 11, bp 2016411 - 2018521 QIAGEN 5' 3' bp 2016800 2017200 2017600 2018000 2018400 2018521
	Hs_hsa-mir-675_02_PM PyroMark CpG assay GeneGlobeId:PM00046830 Katalog Numarası: 978746
	Amplikon uzunluğu: 110 bp
	Sekans dizisi: sense
	Biotin Modifikasyonu: reverse PCR primer
	Kromozom bölgesi: 11, BP 20174XX-20174XX
	Analiz edilecek sekans: TGGCSCGSCRGCGGTCTGGGCAGGGCCGCGT
	Bisülfittenmiş sekans:TGGTKYGKTRGGGYGGTTTGGGTAGGGTYGYGT
	CpG sayısı: 4
	Nükleotid dağıtımı:ATGTGTCGTTAGGTCGTCTGTATGTCGTCG

Çizelge 3.6. (devam) Pirosekans için tasarlanan ve hazır kitlerin bilgileri

IGF2AS	Chromosome 11, bp 2160315 - 2162528 QIAGEN 5' 3' PM00046018 IGF2-AS PM00046011 bp 2160400 2160800 2161200 2161600 2162000 2162400 2162528
Hs_IGF2AS_01_PM PyroMark CpG assay GeneGlobeId:PM00046011 Katalog Numarası: 978746 Amplikon uzunluğu: 213 bp Sekans dizisi: sense Biotin Modifikasyonu: reverse PCR primer Kromozom bölgesi: 11, BP 21615XX-21614XX Analiz edilecek sekans: CGCGAGTTCGGTCTCGGGGCCACCACGA Bisülfittenmiş sekans: YGYGAGTTYGGTTTYGGGGGTTATTAYGA CpG sayısı: 5 Nükleotid dağıtımı: GTCGTCGAGATCGTTCGGTATATCG	

Çizelge 3.7. PyroMark PCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar
PyroMark PCR Temel karışımı	12,5µl
Derişik CoralLoad	2,5µl
PyroMark PCR primeri	5,5µl
Bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA	2µl

Çizelge 3.8. PyroMark PCR aşamaları

Aşamalar	Süre	Sıcaklık
Başlangıç	15 dk	95 °C
Denatürasyon	30 sn	94 °C
Bağlanma	45 döngü 30 sn	55 °C
Uzatma	30 sn	72 °C
Son Uzatma	10 dk	72 °C

Pirosekans aşaması

PyroMarkQ24 cihazı ile pirosekans işlemi yapıldı.

- PyroMarkQ24 yazılımı ile her işlem için reaksiyon tasarlandı. Tasarıya uygun olacak şekilde pirosekans yapıldı.
- Pirosekans için her bir kuyucuk için sefaroze bilyeleri içeren karışım hazırlandı (Çizelge 3.9.) 24 kuyucuklu PCR plakasının her bir kuyusuna 70µl karışım ve incelenecek PCR ürününden 10µl eklendi.

Çizelge 3.9. Pirosekans karışım hazırlanışı

Bileşenler	Miktar
Streptavidin Sefaroz bilyeler	2µl
Bağlayıcı tampon	40µl
Distile su	28µl

- 10 dakika oda sıcaklığında 1400rpm’de çalkalanarak PCR ürününün sefaroze bilyelere bağlanması sağlandı.
- PyroMark Q24 plakasının kuyularına tasarıya uygun şekilde 2,5µl sekans primeri ve 22.5µl annealing tamponu karıştırıldı.
- Sefaroz bilyelere bağlı amplikonlar vakumlu el probu ile 15sn çekildi.
- %70 etanol ile 5sn yıkama yapıldı.
- Denatürasyon solüsyonunda 5sn bekletildi.
- Yıkama tamponu ile 10sn bekletildi.
- El ünitesi dikey biçimde 90°’yi geçkin bir açıyla 5 sn tutarak sıvı uzaklaştırıldı.
- El ünitesi Q24 plakasına konularak 10sn çalkalandı.
- 70ml su ile problemler yıkandı.
- Q24 plakası önceden 80°C’de 2 dk ısıtıldı.
- Q24 plakası 5dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Tasarıma göre nükleotid, enzim ve substrat içeren kartuş hazırlanarak Q24 cihazına yüklendi.
- Q24 plakası PyroMark Q24 cihazına yerleştirildikten tasarıya uygun pirosekans işleminin gerçekleştirilmesi için cihaz çalıştırıldı.
- Programda sonuçların analizi yapıldı. Metilasyon yüzdeleri belirlendi.

3.7. İstatistiksel Analizlerin Yapılması

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 26.0 (IBM) programı ile yapıldı. Gruplar arası farklar Shapiro Wilk testi ile belirlenen veri dağılımının özelliğine göre ANOVA ya da Kruskal Wallis testi ile belirlendi. DNA metilasyon değerleri için ROC analizi yapılarak eşik değerler belirlendi. Post hoc analizler Bonferroni ve Tamhane testleriyle yapıldı. Parametreler arasındaki ilişki veri dağılımına uygun korelasyon testleriyle belirlendi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma Mart 2021- Mart 2022 arasında araştırmaya dahil olma kriterlerini karşılayan 90 kişi katıldı. Yaş ve vücut kitle indeksi verileri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Yaş ortalaması fertil grupta (37,63) diğer gruplardan daha yüksektir (oligo-:35,26; normo-: 34,43) fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,119$). Vücut kitle indeksi ortalaması oligospermi grubunda (26,03) diğer gruplardan (fertil: 25,81; normo-: 25,70) yüksek olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,803$).

Çizelge 4.1. Grupların yaş ve vücut kitle indeksi verileri (ortalama±standart sapma) ve p değerleri

	Grup 1 (fertil)	Grup 2 (oligo-)	Grup 3 (normo-)	p değeri
Yaş (yıl)	37,63±4,72	35,26±7,26	34,43±6,21	0,119
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	25,81±1,68	26,03±2,07	25,70±2,17	0,803

4.1. Semen Analizi Bulguları

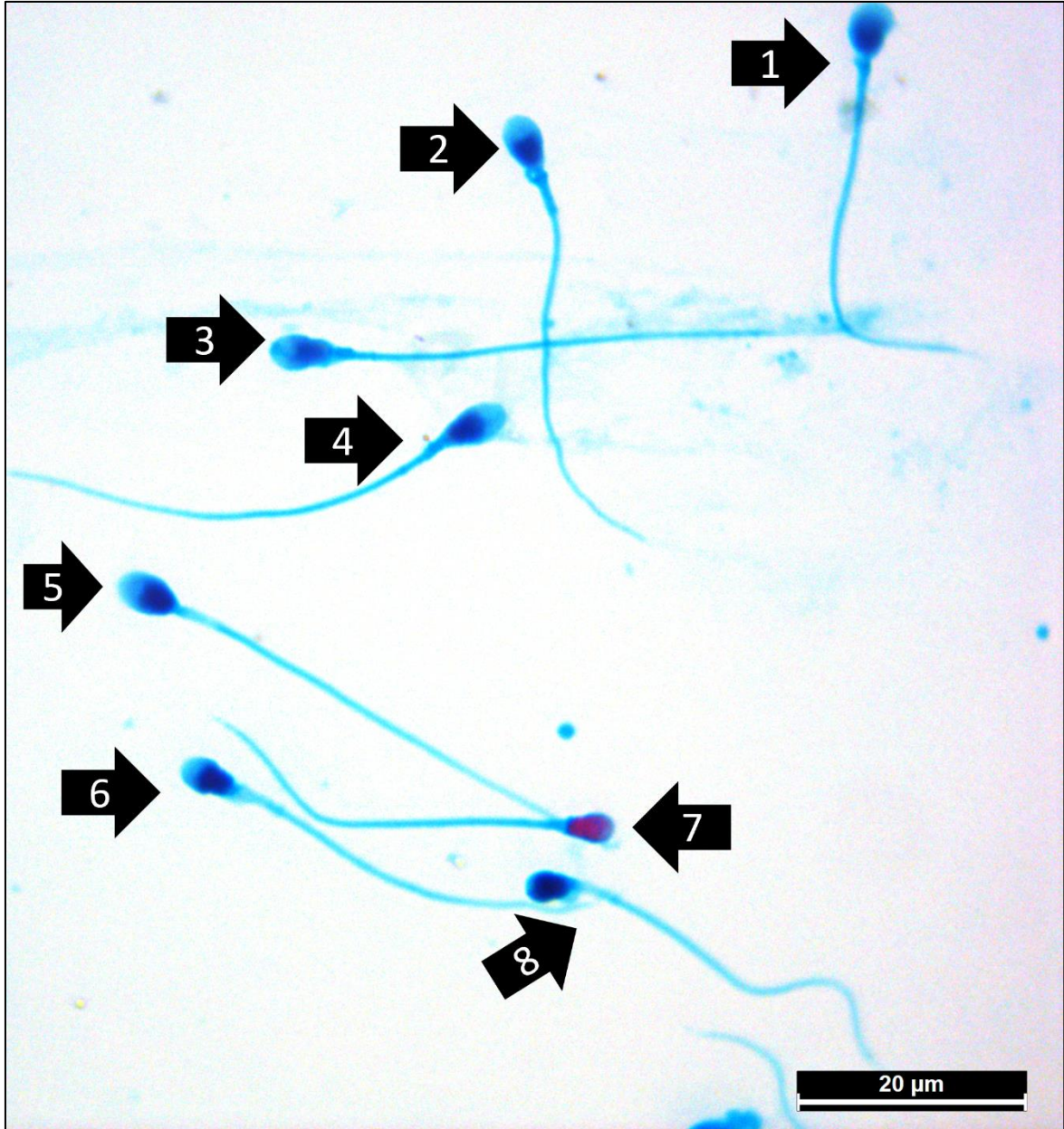
Semen analizi ile semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, sperm hareketliliği ve sperm morfolojisi değerlendirilmiştir. Semen hacmi gruplar arasında anlamlı değişim göstermemektedir ($p=0,118$). Sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı oligozoospermi grubunda (10,5 milyon/ml, 27,5 milyon), normozoospermi grubundan (50 milyon/ml, 130,25 milyon) ve fertil gruptan (35,5 milyon/ml, 101,5 milyon) anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0,0001$). Normozoospermi ve fertil grupları arasındaki farklar anlamlı değildir ($p=0,232$, $p=0,150$). Sperm hareketliliği normozoospermi grubunda (%64) fertil (%55, $p=0,003$) ve oligozoospermi (%56, $p=0,037$) gruplarından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Tüm gruplarda ortalama sperm hareketliliği DSÖ’ün referans değerinden (%42) yüksektir. Fertil ve oligozoospermi gruplarında sperm hareketliliği açısından anlamlı fark görülmemiştir ($p=0,367$). Fertil grupta normal morfolojideki sperm yüzdesi (%5), oligozoospermi (%0), ve normozoospermi (%0) gruplarından anlamlı olarak yüksektir ($p=0,0001$), infertil gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,232$). Semen analizi bulguları Çizelge 4.2’de, Spermac boyamasıyla incelenen sperm morfolojisine ilişkin mikrogram örneği Resim 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Semen hacmi (ml), sperm konsantrasyonu (%), hareketliliği (%) ve normal morfoloji (%) verileri ve p değerleri

	Grup (fertil)	1 Grup (oligo-)	2 Grup (normo-)	3 p değeri
Semen hacmi (ml)	3 (1)	3 (1,38)	3 (2)	0,118
Sperm konsantrasyonu (milyon/ml)	35,5 (33,75)	10,5 (10)	50 (15)	0,0001* 0,0001(p1) 0,0001(p2) 0,232(p3)
Toplam sperm sayısı (milyon)	101,5 (112,38)	27,5 (35,38)	130,25 (87,63)	0,0001* 0,0001(p1) 0,0001(p2) 0,150(p3)
Sperm hareketliliği (%)	55 (9,75)	56 (10)	64(15)	0,009* 0,367(p1) 0,037(p2) 0,003(p3)
Normal morfoloji (%)	5 (2)	0 (0,75)	0 (2)	0,0001* 0,0001(p1) 0,232(p2) 0,0001(p3)

* p1: Grup1 ve grup2'nin karşılaştırılması, p2: Grup2 ve grup3'ün karşılaştırılması, p3: Grup3 ve grup1'in karşılaştırılması

Veriler ortanca (çeyrekler arası fark) olarak sunulmuştur.



Resim 4.1. Spermac boyasıyla boyanmış sperm yayması mikrografları. 1,2,3,4 ve 6: Baş ve boyun anomali. 5: Normal. 7,8: Akrozom anomali

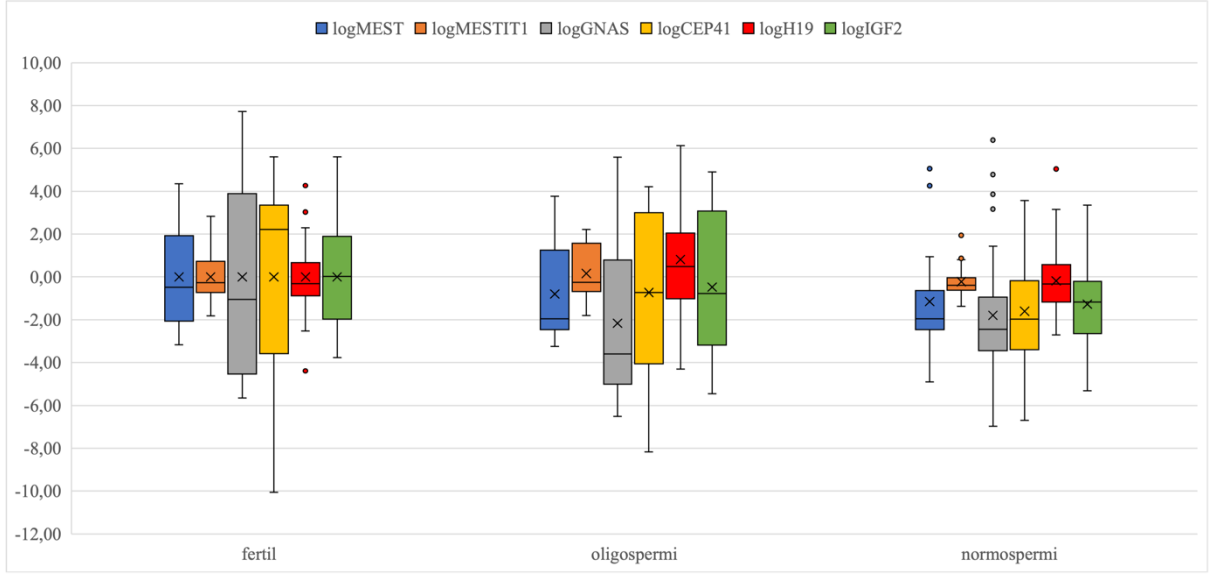
4.2. Gen İfadelenmesi

Oligozoospermi ve normozoospermi gruplarında *MESTIT1*, *MEST*, *GNAS*, *CEP41*, *H19* ve *IGF2* genlerinin ifadenmesi fertil grupla karşılaştırılarak sonucu kat değişimleri (fold change, FC) bulunmuştur. Veriler Çizelge 4.3. ve Şekil 4.1.'de sunulmuştur. Oligozoospermi grubunda *MESTIT1*(1,1 FC) ve *H19* (1.8) genlerinin ifadenmesi fertil gruba göre artarken, *MEST* (0,5 FC), *GNAS* (0,2 FC), *CEP41* (0,6 FC) ve *IGF2* (0,7 FC) genlerinin ifadenmesi azalmıştır. Normozoospermi grubunda *MESTIT1* (0,9 FC), *MEST* (0,4 FC), *CEP41* (0,3 FC), *GNAS* (0,3 FC), *H19* (0,9 FC) ve *IGF2* (0,4 FC) genlerinin ifadenmeleri fertil gruba göre azalmıştır. Gen ifadenmelerinin gruplar arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.3. Gen ifadenmelerinin gruplar arasında karşılaştırılması

		Grup 1 (fertil)	Grup 2 (oligo-)	Grup 3 (normo-)	
<i>MESTIT1</i>	FC	1	1,1	0,9	0,766
	ortalama±SS		1.16±1,18	0,87±0,36	0,934(p1) 0,097(p2) 0,454(p3)
<i>MEST</i>	FC	1	0,5	0,4	0,119
	ortalama±SS		1,54±3,54	2,9±0,36	0,724 (p1) 0,869(p2) 1,000(p3)
<i>GNAS</i>	FC	1	0,2	0,3	0,129
	ortalama±SS		3,01±1,08	2,1±5,89	0,245(p1) 0,999(p2) 0,281(p3)
<i>CEP41</i>	FC	1	0,6	0,3	0,139
	ortalama±SS		3,18±5,43	1,07±2,31	0,403(p1) 0,114(p2) 0,058(p3)
<i>H19</i>	FC	1	1,8	0,9	0,251
	ortalama±SS		2,74±6,06	2,46±6,22	0,181(p1) 0,253(p2) 0,993(p3)
<i>IGF2</i>	FC	1	0,7	0,4	0,257
	ortalama±SS		2,68±5,79	1,07±2,12	0,981(p1) 0,058(p2) 0,322(p3)

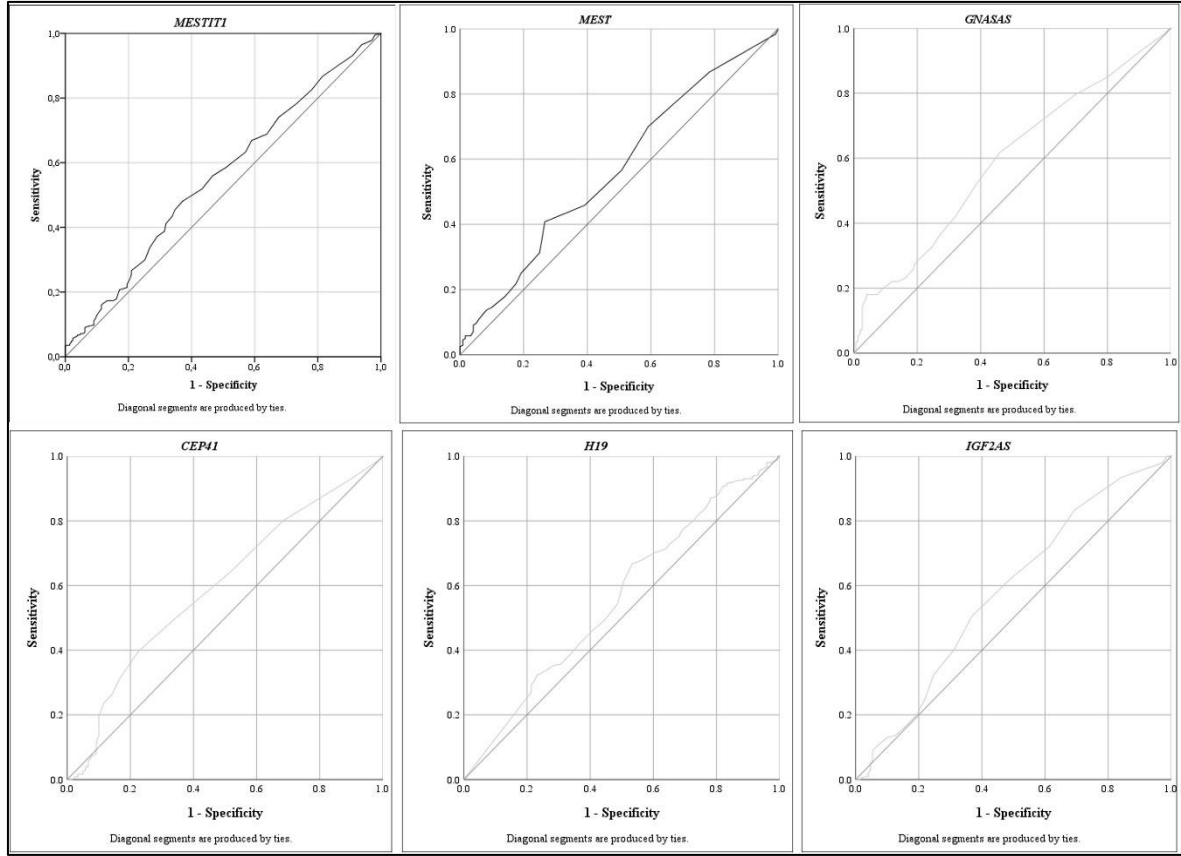
Kat değişimi (Fold change, FC), SS: Standart Sapma p1: Grup1 ve grup2'nin karşılaştırılması, p2: Grup2 ve grup3'ün karşılaştırılması, p3: Grup3 ve grup1'in karşılaştırılması



Şekil 4.1. Fertil, oligospermi ve normospermi gruplarında gen ifadenmelerinin logaritmik değişimlerini gösteren kutu grafiği

4.3. DNA Metilasyonu

PyroMarkQ24 yazılımı ile her CpG dinükleotidinin metilasyon seviyeleri bulunmuştur (Şekil 4.2.). Fertil grupla infertil gruplar toplu olarak karşılaştırılarak her gen için ROC eğrileriyle eşik metilasyon değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.3., Çizelge 4.4.).



Şekil 4.3. Metilasyon yüzdelерinde eşik değеrleri belirlemek için çizilen ROC eğrileri

Çizelge 4.4. Metilasyon eşik değеrleri

	Eşik metilasyon değeri	Hassasiyet	Özgüllük	p
MESTIT1	14,5	0,560	0,533	0,027
MEST	4,5	0,567	0,492	0,039
GNAS-AS	6,5	0,617	0,54	0,002
CEP41	3,5	0,642	0,483	0,003
H19	87,5	0,543	0,513	0,044
IGF2AS	5,5	0,623	0,507	0,005

Her CpG belirlenen eşik değеrden fazla metillenmiş ise hipermetile, az metillenmişler ise hipometile olarak sınıflandırılmıştır. Gruplarda her CpG için hipermetilasyon, hipometilasyon yüzdeleri belirlenmiştir. Fertil grupta *MESTIT1* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %43,3 (CpG1), %73,3(CpG2), %80 (CpG3), %70 (CpG4), %23,3 (CpG5), %16,7 (CpG6), %40 (CpG7) olarak bulunmuştur. Oligospermi grubunda *MESTIT1* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %56,7 (CpG1), %60 (CpG2), %83,3 (CpG3), %80 (CpG4), %30 (CpG5),

%20 (CpG6), %53,3 (CpG7) olarak bulunmuştur. Normospermi grubunda *MESTIT1* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %53 (CpG1), %63,3 (CpG2), %83,3 (CpG3), %73,3 (CpG4), %30 (CpG5), %23,3 (CpG6), %56,7 (CpG7) olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Fertil grupta *MEST* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %33,3 (CpG1), %43,3 (CpG2), %70 (CpG3), %56,7 (CpG4) olarak bulunmuştur. Oligospermi grubunda *MEST* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %43,3 (CpG1), %43,3 (CpG2), %63,3 (CpG3), %63,3 (CpG4) olarak bulunmuştur. Normospermi grubunda *MEST* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %43,3 (CpG1), %53,3 (CpG2), %70 (CpG3), %73,3 (CpG4) olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Fertil grupta *CEP41* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %76,7 (CpG1), %76,7 (CpG2), %16,7 (CpG3), %33,3 (CpG4) bulunmuştur. Oligospermi grubunda *CEP41* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %73,3 (CpG1), %53,3 (CpG2), %26,7 (CpG3), %53,3 (CpG4) olarak bulunmuştur. Normospermi grubunda *CEP41* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %43,3 (CpG1), %80 (CpG2), %46,7 (CpG3), %63,3 (CpG4) olarak bulunmuştur. Normospermi grubunun 3.CpG'sindeki hipermetilasyon sıklığı fertil gruptakinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazladır ($p=0,036$). Diğer farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

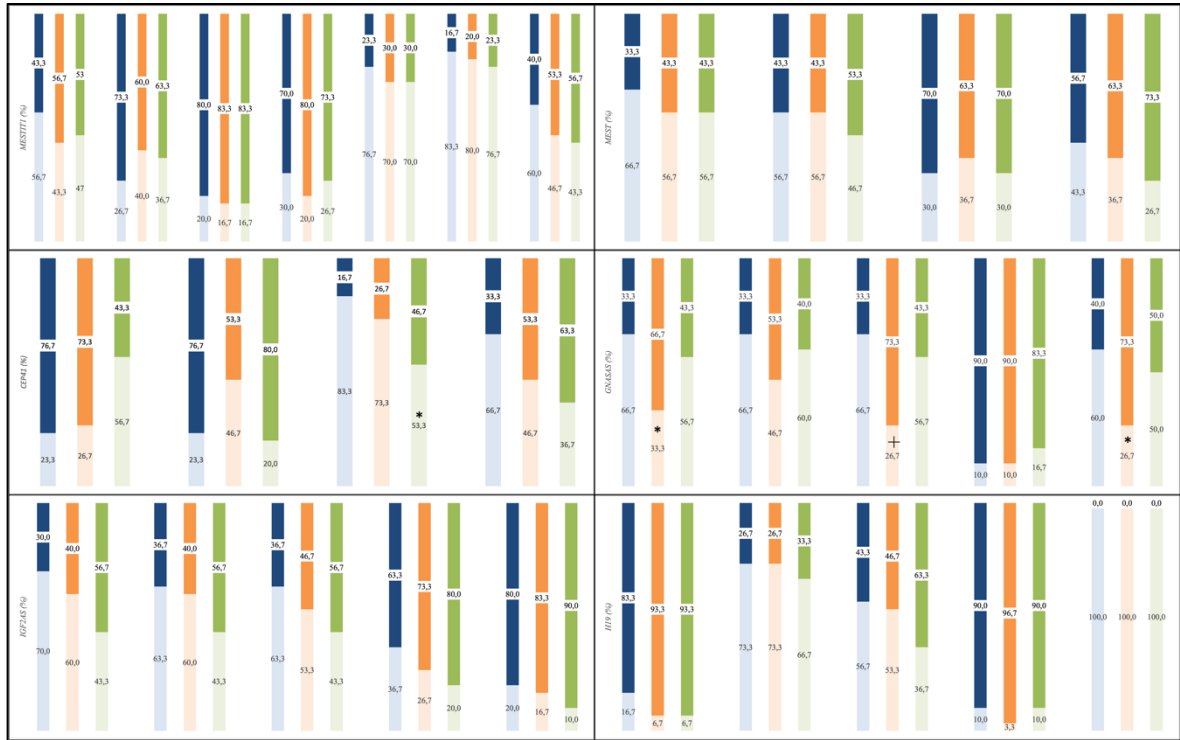
Fertil grupta *GNAS-AS* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %33,3 (CpG1), %33,3 (CpG2), %33,3 (CpG3), %90 (CpG4), %40 (CpG5) bulunmuştur. Oligospermi grubunda *GNAS-AS* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %66,7 (CpG1), %53,3 (CpG2), %73,3 (CpG3), %90 (CpG4), %73,3 (CpG5) bulunmuştur. Normospermi grubunda *GNAS-AS* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %43,3 (CpG1), %40 (CpG2), %43,3 (CpG3), %83,3 (CpG4), %50 (CpG5) bulunmuştur. Oligospermi grubunun 1. 3. ve 5. CpG'lerinde hipermetilasyon sıklığı fertil gruptan anlamlı olarak fazladır ($p=0,028$, $p=0,005$, $p=0,026$). Diğer farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Fertil grupta *IGF2AS* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %30 (CpG1), %36,7 (CpG2), %36,7 (CpG3), %63,3 (CpG4), %80 (CpG5) bulunmuştur. Oligospermi grubunda *IGF2AS* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %40 (CpG1), %40 (CpG2), %46,7 (CpG3), %73,3 (CpG4), %83,3 (CpG5) bulunmuştur. Normospermi grubunda *IGF2AS* hipermetilasyon

yüzdeleri sırasıyla %56,7 (CpG1), %56,7 (CpG2), %56,7 (CpG3), %80 (CpG4), %90 (CpG5) bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Fertil grupta *H19* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %83,3 (CpG1), %26,7 (CpG2), %43,3 (CpG3), %90 (CpG4), %0 (CpG5) bulunmuştur. Oligospermi grubunda *H19* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %93,3 (CpG1), %26,7 (CpG2), %46,7 (CpG3), %96,7 (CpG4), %0 (CpG5) bulunmuştur. Normospermi grubunda *H19* hipermetilasyon yüzdeleri sırasıyla %93,3 (CpG1), %33,3 (CpG2), %63,3 (CpG3), %90 (CpG4), %0 (CpG5) bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$).

Metilasyon verilerine ait grafikler Şekil 4.4'te ve istatistiksel veriler Çizelge 4.5'te sunulmuştur.



Şekil 4.4. Gruplara göre hipometile (açık renkli) ve hipermetile (koyu renkli) CpG dinükleotid frekanslarını (%) gösteren grafikler (Fertil grup mavi, oligospermi grubu turuncu ve normospermi grubu yeşil renkle gösterilmiştir)

Çizelge 4.5. Gruplarda hipometilasyon ve hipermetilasyon yüzdelерinin karşılaştırılması

		Grup 1 (fertil)	Grup 2 (oligo-)	Grup 3 (normo-)	p
<i>MESTIT1_1</i>	Hipometile %	56,7	43,3	47	0,565
	Hipermetile %	43,3	56,7	53	
<i>MESTIT1_2</i>	Hipometile %	26,7	40	36,7	0,531
	Hipermetile %	73,3	60	63,3	
<i>MESTIT1_3</i>	Hipometile %	20	16,7	16,7	0,928
	Hipermetile %	80	83,3	83,3	
<i>MESTIT1_4</i>	Hipometile %	30	20	26,7	0,667
	Hipermetile %	70	80	73,3	
<i>MESTIT1_5</i>	Hipometile %	76,7	70	70	0,803
	Hipermetile %	23,3	30	30	
<i>MESTIT1_6</i>	Hipometile %	83,3	80	76,7	0,814
	Hipermetile %	16,7	20	23,3	
<i>MESTIT1_7</i>	Hipometile %	60	46,7	43,3	0,397
	Hipermetile %	40	53,3	56,7	
<i>MEST_1</i>	Hipometile %	66,7	56,7	56,7	0,662
	Hipermetile %	33,3	43,3	43,3	
<i>MEST_2</i>	Hipometile %	56,7	56,7	46,7	0,672
	Hipermetile %	43,3	43,3	53,3	
<i>MEST_3</i>	Hipometile %	30	36,7	30	0,818
	Hipermetile %	70	63,3	70	
<i>MEST_4</i>	Hipometile %	43,3	36,7	26,7	0,402
	Hipermetile %	56,7	63,3	73,3	
<i>CEP41_1</i>	Hipometile %	23,3	26,7	56,7	0,942
	Hipermetile %	76,7	73,3	43,3	
<i>CEP41_2</i>	Hipometile %	23,3	46,7	20	0,789
	Hipermetile %	76,7	53,3	80	
<i>CEP41_3</i>	Hipometile %	83,3	73,3	53,3	0,037* 0,733(p1) 0,299(p2) 0,036(p3)
	Hipermetile %	16,7	26,7	46,7	
<i>CEP41_4</i>	Hipometile %	66,7	46,7	36,7	0,063
	Hipermetile %	33,3	53,3	63,3	
<i>GNASAS_1</i>	Hipometile %	66,7	33,3	56,7	0,031* 0,028 (p1) 0,199 (p2) 0,819 (p3)
	Hipermetile %	33,3	66,7	43,3	

Çizelge 4.5. (devam) Gruplarda hipometilasyon ve hipermetilasyon yüzdelерinin karşılaştırılması

		Grup 1 (fertil)	Grup 2 (oligo-)	Grup 3 (normo-)	p
GNASAS_2	Hipometile %	66,7	46,7	60	0,283
	Hipermetile %	33,3	53,3	40	
GNASAS_3	Hipometile %	66,7	26,7	56,7	0,006* 0,005 (p1) 0,053 (p2) 0,819 (p3)
	Hipermetile %	33,3	73,3	43,3	
GNASAS_4	Hipometile %	10	10	16,7	0,664
	Hipermetile %	90	90	83,3	
GNASAS_5	Hipometile %	60	26,7	50	0,030* 0,026 (p1) 0,182 (p2) 0,829 (p3)
	Hipermetile %	40	73,3	50	
H19_1	Hipometile %	16,7	6,7	6,7	0,333
	Hipermetile %	83,3	93,3	93,3	
H19_2	Hipometile %	73,3	73,3	66,7	0,807
	Hipermetile %	26,7	26,7	33,3	
H19_3	Hipometile %	56,7	53,3	36,7	0,256
	Hipermetile %	43,3	46,7	63,3	
H19_4	Hipometile %	10	3,3	10	0,542
	Hipermetile %	90	96,7	90	
H19_5	Hipometile %	100	100	100	1
	Hipermetile %	0	0	0	
IGF2AS_1	Hipometile %	70	60	43,3	0,11
	Hipermetile %	30	40	56,7	
IGF2AS_2	Hipometile %	63,3	60	43,3	0,252
	Hipermetile %	36,7	40	56,7	
IGF2AS_3	Hipometile %	63,3	53,3	43,3	0,304
	Hipermetile %	36,7	46,7	56,7	
IGF2AS_4	Hipometile %	36,7	26,7	20	0,353
	Hipermetile %	63,3	73,3	80	
IGF2AS_5	Hipometile %	20	16,7	10	0,557
	Hipermetile %	80	83,3	90	

* p1: Grup1 ve grup2'nin karşılaştırılması, p2: Grup2 ve grup3'ün karşılaştırılması, p3: Grup3 ve grup1'in karşılaştırılması

Fertil, oligospermi ve normospermi gruplarında, parametrelerin birbirleriyle olan ilişkileri Spearman korelasyon testiyle gösterildi. Parametreler arasındaki ilişkiler Çizelge 4.6.'da ve ayrıntılı olarak Ek-2'de sunulmuştur. Her gen için incelenen CpGlerin genel ve tekli hipermetilasyon karşılaştırmaları yapılmıştır.

Fertil ve oligospermi gruplarında toplam sperm sayısı fazla olan erkeklerde *CEP41* metilasyonunun arttığı görülmüştür. Ancak fertil grupta bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p=0,414$), oligospermi grubunda anlamlı bulunmuştur ($p=0,046$). Normospermi grubunda ise toplam sperm sayısı fazla olan erkeklerde *CEP41* metilasyonu azalmasına karşın bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,642$). *CEP41* metilasyonu ile ifadenmesi arasında fertil grupta istatistiksel olarak anlamlı olmayan ters ilişki görülmüştür ($p>0,05$). İnfertil gruplarda metilasyonun arttığı spermelerde ifadenmede artış görülmüştür. Normospermi grubunda bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,044$). *CEP41* CpG'lerinin metilasyonu teker teker incelenmesiyle ile *CEP41* ifadenmesi arasında anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$). *CEP41* ifadenmesi ile toplam sperm sayısı ve sperm hareketliliği arasında fertil, oligospermi, normospermi gruplarında anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$).

Fertil ve oligospermi gruplarında sperm hareketliliği yüksek olan erkeklerin spermelerinde *MEST* metilasyonunun azaldığı bulunmuştur. Fertil grupta bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı iken ($p=0,025$), oligospermi grubunda anlamlı değildir ($p=0,456$). Normospermi grubunda ise sperm hareketliliğinin arttığı erkeklerde *MEST* metilasyonunun azaldığı görülmüştür, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,251$).

Fertil grupta, *MEST* metilasyonun arttığı spermelerde *MEST* ifadenmesi fazla olmasına karşın bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,448$). Oligospermi ($p=0,019$) ve normospermi ($p=0,001$) gruplarında ise, *MEST* metilasyonu artarken ifadenmesinin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. *MEST* CpG'leri ile ifadenme ilişkisine bakıldığında normospermi grubunda 1. ve 2. CpG'lerle anlamlı ilişki görülmüştür ($p<0,01$) Diğer CpGlerle ve diğer gruplarda anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$).

Fertil ve normospermi gruplarında yaşlı erkeklerde *MESTIT1* metilasyonunun arttığı, oligospermi grubunda ise azaldığı görülmüştür. Ancak fertil grupta bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p=0,679$), oligospermi ($p=0,024$) ve normospermi gruplarında ($p=0,003$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Vücut kitle indeksinin arttığı fertil erkeklerde *MESTIT1* metilasyonunun anlamlı olarak azaldığı ($p=0,00$) ancak, oligospermi grubunda bu ilişkinin anlamlı olmadığı ($p=0,07$),

normospermi grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan zıt ilişki görülmüştür ($p=0,11$).

Sperm konsantrasyonu fazla olan oligospermik erkeklerde *MESTIT1* metilasyonunun anlamlı olarak arttığı görülürken ($p=0,021$), fertil ($p=0,981$) ve normospermik ($p=0,448$) erkeklerde bu ilişki tersine dönmüştür ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Normal morfoloji yüzdesi fazla olan fertil erkeklerde *MESTIT1* metilasyonunun artışı istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p=0,238$), oligospermi ($p=0,032$) ve normospermi ($p=0,047$) gruplarında bu ilişki anlamlı olarak tersine dönmüştür.

MESTIT1 metilasyonunun arttığı spermelerde *MESTIT1* ifadenmesinin azalması fertil grupta anlamlı değilken ($p=0,308$), normospermi grubunda anlamlıdır ($p=0,045$), oligospermi grubunda ise bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde tersine dönmüştür ($p=0,524$). *MESTIT1* CpGleri tek tek incelendiğinde ifadenme ile anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$). Fertil grupta yaşlı erkeklerde *MESTIT1* ifadenmesinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir ($p=0,014$). İnfertil gruplarda görülen zıt ilişki ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Fertil grupta *H19* metilasyonun arttığı spermelerde hareketliliğin anlamlı şekilde arttığı ($p=0,007$), *H19* ifadenmesinin ise anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür ($p=0,045$). Oligospermi grubunda *H19* metilasyonun arttığı spermelerde hareketliliğin azaldığı, *H19* ifadenmesinin arttığı görülmüştür ancak bu ilişkiler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Normospermi grubunda ise *H19* metilasyonunun arttığı spermelerde hareketin ve gen ifadenmesinin azaldığı görülmüştür, ancak ilişkiler anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). *H19* CpG'lerinin metilasyonlarının gen ifadenmesi ile ilişkisi ayrı ayrı incelendiğinde hiçbir grupta anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$). *H19* ifadenmesinin arttığı oligospermik erkeklerde toplam sperm sayısı azalmaktadır ($p=0,019$). Fertil grupta ve normospermi grubunda ise anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$).

Fertil grupta yaşlı bireylerin spermelerinde *IGF2AS* metilasyonunun anlamlı şekilde azaldığı ($p<0,001$), oligospermi grubunda anlamlı şekilde arttığı ($p=0,044$), normospermi grubunda görülen azalmanın ise anlamlı olmadığı ($p=0,374$) bulunmuştur.

Fertil grupta *IGF2AS* metilasyonunun arttığı bireylerde sperm konsantrasyonu, toplam sayısı anlamlı şekilde azalırken ($p<0,01$), *IGF2* ifadenmesinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0,05$). İnfertil gruplarda *IGF2AS* metilasyonu ile sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Oligospermi grubunda *IGF2AS* metilasyonunun arttığı spermelerde *IGF2* ifadenmesi anlamlı artış gösterirken ($p<0,01$), normospermi grubunda anlamlı olmayan ters ilişki görülmüştür ($p=0,107$). *IGF2* ifadenmesi ile *H19* ve *IGF2AS* CpG adalarının metilasyonu arasındaki ilişki tek tek incelenmiştir. *IGF2AS* geninin 2. CpG bölgesinde metilasyonun arttığı spermelerde *IGF2* transkripti anlamlı olarak artmış bulunmuştur ($p<0,05$), diğer CpG'lerin metilasyonu ile anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$). İnfertil gruplarda da anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$). *IGF2* ile ifadenmesinin arttığı fertil erkeklerde *H19* geninin 1.*,2.* ve 4.** CpG metilasyonunun anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (* $p<0,05$, ** $p<0,01$), diğer CpG'lerde ve infertil erkeklerde anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Fertil grupta *GNAS-AS* metilasyonunun yüksek olduğu bireylerin daha yaşlı olduğu, oligospermi grubunda ise daha genç olduğu görülmüştür. Ancak bu ilişkiler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Normospermi grubunda ise yaşlı bireylerde *GNAS-AS* metilasyonunun anlamlı şekilde az olduğu görülmüştür ($p=0,001$).

Fertil grupta ve normospermi grubunda *GNAS-AS* metilasyonunun arttığı örneklerde artmış *GNAS* ifadenmesi anlamlı bulunmamışken ($p>0,05$), oligospermi grubunda anlamlıdır ($p=0,012$). CpG metilasyonları tek tek incelendiğinde ifadenme ile anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$).

MEST1, *MEST* ve *CEP41* ifadenmeleri tüm gruplarda anlamlı pozitif ilişki göstermektedir ($p<0,05$). *H19* ve *IGF2* ifadenmeleri de tüm gruplarda anlamlı pozitif ilişki göstermektedir ($p<0,05$).

Çizelge 4.6. Korelasyonlar (r: Korelasyon katsayısı, *p<0.05, **p<0.01)

		Grup1 (fertil)	Grup2 (oligo-)	Grup3 (normo-)
<i>CEP41</i> metilasyonu	Toplam Sperm Sayısı	0,075	0,182*	-0,043
<i>CEP41</i> metilasyonu	<i>CEP41</i> ifadenmesi	-0,007	0,046	0,184*
<i>CEP41</i> ifadenmesi	<i>CEP41</i> _ CpG1 metilasyonu	0,222	0,048	0,351
<i>CEP41</i> ifadenmesi	<i>CEP41</i> _ CpG2 metilasyonu	0,179	-0,153	0,154
<i>CEP41</i> ifadenmesi	<i>CEP41</i> _ CpG3 metilasyonu	-0,164	0,028	0,27
<i>CEP41</i> ifadenmesi	<i>CEP41</i> _ CpG4 metilasyonu	-0,232	0,256	0,036
<i>CEP41</i> ifadenmesi	Toplam Sperm Sayısı	0,194	-0,234	0,242
<i>CEP41</i> ifadenmesi	Sperm hareketliliği (%)	-0,136	0,052	-0,097
<i>MEST</i> metilasyonu	Sperm hareketliliği (%)	-0,205*	-0,069	0,105
<i>MEST</i> metilasyonu	<i>MEST</i> ifadenmesi	0,074	-0,226*	-0,296**
<i>MEST</i> ifadenmesi	<i>MEST</i> _ CpG1 metilasyonu	0,172	-0,326	-,509**
<i>MEST</i> ifadenmesi	<i>MEST</i> _ CpG2 metilasyonu	-0,029	-0,187	-,506**
<i>MEST</i> ifadenmesi	<i>MEST</i> _ CpG3 metilasyonu	0,172	-0,207	-0,076
<i>MEST</i> ifadenmesi	<i>MEST</i> _ CpG4 metilasyonu	0,005	-0,207	-0,091
<i>MESTIT1</i> metilasyonu	Yaş (yıl)	0,029	-0,156*	0,206**
<i>MESTIT1</i> metilasyonu	VKİ	-0,254**	-0,125	0,111
<i>MESTIT1</i> metilasyonu	Sperm konsantrasyonu	-0,002	0,159*	-0,053
<i>MESTIT1</i> metilasyonu	Normal Morfoloji (%)	0,082	-0,153*	-0,137*
<i>MESTIT1</i> metilasyonu	<i>MESTIT1</i> ifadenmesi	-0,072	0,044	-0,139*
<i>MESTIT1</i> ifadenmesi	<i>MESTIT1</i> _ CpG1 metilasyonu	-0,167	0,043	-0,301
<i>MESTIT1</i> ifadenmesi	<i>MESTIT1</i> _ CpG2 metilasyonu	0,032	0,063	-0,316
<i>MESTIT1</i> ifadenmesi	<i>MESTIT1</i> _ CpG3 metilasyonu	-0,041	-0,031	-0,227
<i>MESTIT1</i> ifadenmesi	<i>MESTIT1</i> _ CpG4 metilasyonu	-0,321	-0,058	-0,179
<i>MESTIT1</i> ifadenmesi	<i>MESTIT1</i> _ CpG5 metilasyonu	-0,056	0,004	0,122

Çizelge 4.6. (devam) Korelasyonlar (r: Korelasyon katsayısı, *p<0.05, **p<0.01)

		Grup1 (fertil)	Grup2 (oligo-)	Grup3 (normo-)
<i>MESTIT1</i> ifadenmesi	MESTTIT1 _ CpG6 metilasyonu	0,132	0,087	0,077
<i>MESTIT1</i> ifadenmesi	MESTIT1 _ CpG7 metilasyonu	-0,085	0,201	-0,214
<i>MESTIT1</i> ifadenmesi	Yaş (yıl)	-0,467*	0,021	0,072
<i>H19</i> metilasyonu	Sperm hareketliliği (%)	0,219**	-0,087	-0,011
<i>H19</i> metilasyonu	<i>H19</i> ifadenmesi	-0,167*	0,051	-0,088
<i>H19</i> ifadenmesi	H19_ CpG1 metilasyonu	-0,273	-0,081	-0,195
<i>H19</i> ifadenmesi	H19_ CpG2 metilasyonu	-0,24	0,304	-0,195
<i>H19</i> ifadenmesi	H19_ CpG3 metilasyonu	-0,218	0,008	-0,187
<i>H19</i> ifadenmesi	H19_ CpG4 metilasyonu	-0,284	0,023	-0,095
<i>H19</i> ifadenmesi	Toplam Sperm Sayısı	0,32	-0,433*	-0,224
<i>IGF2AS</i> metilasyonu	Yaş (yıl)	-0,331**	0,165*	-0,073
<i>IGF2AS</i> metilasyonu	Sperm konsantrasyonu (%)	-0,229**	0,036	0,038
<i>IGF2AS</i> metilasyonu	Toplam Sperm Sayısı	-0,219**	-0,014	0,063
<i>IGF2AS</i> metilasyonu	<i>IGF2</i> ifadenmesi	0,194*	0,212**	-0,135
<i>IGF2</i> ifadenmesi	IGF2AS_ CpG1 metilasyonu	0,092	0,236	-0,192
<i>IGF2</i> ifadenmesi	IGF2AS_ CpG2 metilasyonu	0,399*	0,189	-0,293
<i>IGF2</i> ifadenmesi	IGF2AS_ CpG3 metilasyonu	0,26	0,324	-0,126
<i>IGF2</i> ifadenmesi	IGF2AS_ CpG4 metilasyonu	0,195	0,122	-0,02
<i>IGF2</i> ifadenmesi	IGF2AS_ CpG5 metilasyonu	0,092	0,253	0,014
<i>IGF2</i> ifadenmesi	H19_ CpG1 metilasyonu	-0,371*	-0,185	-0,228
<i>IGF2</i> ifadenmesi	H19_ CpG2 metilasyonu	-0,378*	0,157	-0,260
<i>IGF2</i> ifadenmesi	H19_ CpG3 metilasyonu	-0,335	-0,046	-0,187
<i>IGF2</i> ifadenmesi	H19_ CpG4 metilasyonu	-0,474**	-0,011	-0,149
<i>GNAS-AS</i> metilasyonu	Yaş (yıl)	0,155	-0,033	-0,272**
<i>GNAS-AS</i> metilasyonu	Sperm konsantrasyonu	-0,153	-0,045	-0,015

Çizelge 4.6. (devam) Korelasyonlar (r: Korelasyon katsayısı, *p<0.05, **p<0.01)

		Grup1 (fertil)	Grup2 (oligo-)	Grup3 (normo-)
<i>GNAS</i> - <i>AS</i> metilasyonu	<i>GNAS</i> ifadenmesi	0,078	0,216*	0,029
<i>GNAS</i> ifadenmesi	<i>GNASAS_ CpG1</i> metilasyonu	0.160	0.197	0.237
<i>GNAS</i> ifadenmesi	<i>GNASAS_ CpG2</i> metilasyonu	0.160	0.352	0.126
<i>GNAS</i> ifadenmesi	<i>GNASAS_ CpG3</i> metilasyonu	0.160	0.163	-0.058
<i>GNAS</i> ifadenmesi	<i>GNASAS_ CpG4</i> metilasyonu	0.027	0.036	0.005
<i>GNAS</i> ifadenmesi	<i>GNASAS_ CpG5</i> metilasyonu	-0.093	0.304	-0.166
<i>MEST1</i> ifadenmesi	<i>MEST</i> ifadenmesi	0,437*	0,817**	0,702**
<i>MEST1</i> ifadenmesi	<i>CEP41</i> ifadenmesi	0,483*	0,582**	0,407*
<i>CEP41</i> ifadenmesi	<i>MEST</i> ifadenmesi	0,864**	0,754**	0.494**
<i>H19</i> ifadenmesi	<i>IGF2</i> ifadenmesi	0,610**	0,856**	0,547**

5. TARTIŞMA

Erkek infertilitesinde transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel değişimleri incelediğimiz bu çalışmada; aralarında kodlanmayan RNA'ların da bulunduğu hedef genlerden infertil gruplarda DNA metilasyonunun anlamlı olarak değiştiği genler tespit edilmiştir.

El Hajj ve arkadaşları, infertil erkeklerin spermlerinde *GNAS-AS* metilasyonunun kontrol grubundan yüksek olmasına karşın bu artışı istatistiksel olarak anlamlı bulmamışlardır [68]. Çalışmamızda *GNAS-AS* geninin 1.,3. ve 5. CpG dinükleotidlerinde hipermetilasyonun oligospermi grubunda, fertil gruptan fazla olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Çalışmamızın, El Hajj ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan [68] farklı sonuçlar göstermesi farklı nedenlere bağlı olabilir. Öncelikle El Hajj ve arkadaşları kontrol grubunu; infertilite şikâyeti olan çiftlerden, tekrarlayan semen analizinde normal sonuçları olan ve kadın faktörü tanımlananlardan oluşturmuştur. Bizim çalışmamızda ise fertil erkekler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Ayrıca çalışmamızda hipermetilasyonun oligospermi grubunda normospermi grubundan yüksek bulmamız ($p>0,05$), El Hajj ve arkadaşlarının bulgularıyla benzerlik göstermektedir [68]. El Hajj ve arkadaşları, oligospermi sınırı 20 milyon/ml olarak belirlemişken [68], bizim çalışmamızda sınır 16 milyon/ml'dir. El Hajj ve arkadaşları, metilasyon yüzdesi değerlendirmiştir. Çalışmamızda metilasyon değerleri ROC eğrisiyle saptanan eşik değere göre hipometile ve hipermetile olarak sınıflandırılmıştır. Fertil kontrol kullanmamız eşik değerleri bulmamızı sağlamıştır.

Zhang ve arkadaşları, alkol kullanan kişilerde *GNAS* metilasyonunun azaldığını, metilasyonun ve sperm konsantrasyonu ile ters ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [69]. Çalışmamızda tüm gruplarda *GNAS-AS* metilasyonu ile sperm konsantrasyonu ters ilişkili bulunmuştur($p>0,05$). Çalışmamızda *GNAS* geninin 4. CpG dinükleotidinin tüm gruplarda hipermetile bulunması bu ilişkinin anlamlı olmasını etkilemiş olabilir. Zhang ve arkadaşları, nikotin ve alkol tüketenlerde de *GNAS* metilasyonunun azaldığını göstermişlerdir, ancak bu grupta metilasyon ve sperm konsantrasyonu arasında anlamlı ilişki gösterememişlerdir. Alkol ve nikotin tüketen grup 63 kişiden oluşurken, sadece alkol tüketenler 16 kişiyle sınırlıdır. Kalabalık gruplarda metilasyon ve sperm konsantrasyonu arasındaki ilişkinin, verilerin heterojenliğine bağlı olarak bozulduğunu düşündürmüştür [69].

Becker ve arkadaşları, oligoastenospermik spermelerde miRNA-23a-3p'nin normospermik spermelerden daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bu grupta *CEP41* ifadenmesinin azalması, miRNA-23a-3p'nin *CEP41* ifadenmesini kontrol ettiğini düşündürmüştür [70, 71]. Çalışmamızda fertil grupta *CEP41* gen ifadenmesi artarken, infertil gruplarda azalmıştır. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fertil grupta *CEP41* ifadenmesi çok yüksek olan örneklerin varlığı bu farka sebep olmuş olabilir. Becker ve arkadaşları, *CEP41* ifadenmesinin sperm sayısı ve hareketliliği ile doğrusal ilişkili olduğunu göstermişlerdir [70]. Çalışmamızda fertil grupta *CEP41* ifadenmesi ile toplam sperm sayısı arasında doğrusal ilişki görülmüştür. Ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir. Fertil grupta, sperm sayısı ve *CEP41* ifadenmesi arasında ters ilişki bulunmuştur. Ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir. Normospermi grubunda, *CEP41* metilasyonu ile sperm sayısı ve hareketliliği arasındaki ilişki fertil gruptakine benzerdir, oligospermi grubunda ise tersine dönmüştür. Ancak bu ilişkiler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler bulamamamız, Becker ve arkadaşlarının daha genç ve fazla sayıda örnekte araştırma yapmalarına bağlı olabilir [70]. Becker ve arkadaşlarının çalışmasında, mikroRNA'ların gen ifadenmesi üzerine etkisi gösterilmişken, çalışmamızda DNA metilasyonunun etkisi incelenmiştir. İncelenen 4 CpG dinükleotidinden üçüncüsünde hipometile CpG dinükleotidi yüzdesi fertil grupta normospermi grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir. Bu bulgular *CEP41* metilasyonunun sperm işlevini etkileyen mekanizmalarda araştırılması gerekliliğini düşündürmüştür. *CEP41* metilasyonu ile sperm sayısı arasındaki doğrusal ilişki oligospermi grubunda, istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0,046$); fertil grupta anlamlı bulunmamıştır ($p=0,414$). Ancak, bu ilişki normospermi grubunda ters orantılı olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Normospermik spermelerin ICSI için seçiminde hareket ve morfoloji özelliklerine bağlı kalınmaktadır. Normospermi grubunda *CEP41* geninin metilasyonunu farklı bulmamız ve metilasyondaki değişimin spermin özellikleriyle anlamlı ilişki göremememiz bu spermelerin ICSI için seçilme riskinin olduğunu düşündürmüştür. Otizm bozukluklarıyla ilişkili olduğu düşünülen *CEP41* geni ile ilgili verilemiz, yardımcı üreme tedavileri ile ASD ilişkilerinin aydınlatılması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu düşündürmektedir.

Marques ve arkadaşları, normospermik ve oligospermik erkeklerin spermelerinde *MEST* geninin CpG dinükleotidlerinde; maternal imprintin başarılı bir şekilde silindiğini

göstermişlerdir [72]. Bir başka çalışmada, mayoz bölünme tamamlandıktan sonra *MEST* DMR'leri hipometile halde kalmaya devam ettiği gösterilmiştir [73]. Hammoud ve arkadaşları, oligospermi grubunda fertil kontrollere göre *MEST* genini 2. CpG dinükleotidinin metilasyonunda anlamlı artış tespit etmelerine karşın, incelenen diğer *MEST* CpG dinükleotitlerinde metilasyon farkı saptamamışlardır [74]. Montjean ve arkadaşları, oligospermi grubunda *MEST* metilasyonunda artış saptamışlardır [75]. Amjadian ve arkadaşları da benzer şekilde; oligospermi grubunda *MEST* metilasyonunun arttığını göstermişlerdir. Tüm örnekler üzerinden yaptıkları korelasyon analizinde ise; sperm konsantrasyonu, sperm sayısı, ileri hareketli sperm yüzdesi, normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi gibi parametrelerin *MEST* metilasyonu ile negatif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır [31]. Xu ve arkadaşları infertil erkekleri astenospermi ve kontrol grubu olarak incelediklerinde, astenospermi grubunda *MEST* metilasyonunun kontrol grubundan düşük bulmuşlardır [76]. Yayınlanan meta-analiz çalışmasında infertil erkeklerde *MEST* DMR metilasyonunun infertil erkeklerde fertil erkeklerden daha yüksek olduğunu göstermiştir, ancak göreceli riski anlamlı bulunmamıştır [9]. Cannarella ve arkadaşlarının yaptığı meta-analiz ise; *MEST* metilasyonunun infertil erkeklerde arttığı ancak yaş ve sperm konsantrasyonundan bağımsız olduğunu bulmuşlardır. Üremeye yardımcı tedavilerinin epigenetik risklerin değerlendirilmesi için kullanılabileceğini önermişlerdir [77]. Çalışmamızda *MEST* hipermetilasyonu hem CpG dinükleotidlerinde, hem de gruplar arasında farklılıklar göstermektedir. İncelenen CpG dinükleotidlerinden 1.,2. ve 4.'sünde hipometile yüzdesi fertil grupta infertil gruplardan yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamızda DSÖ'nün son kriterlerini kullanmamız ve sayıya bağlı sınıflandırma yapmamız, *MEST* metilasyonunda anlamlı fark bulamamızı açıklayabilir.

Marques ve arkadaşları, spermatogenik seride ilerlemenin durduğu hastaların biyopsilerinden izole ettikleri spermatositlerde *MEST* hipermetilasyonu bulunan vakalar göstermişlerdir [78]. Minor ve arkadaşları; azospermik hastaların testiküler spermalarında *MEST* metilasyonunun fertil grupla karşılaştırıldığında anlamlı fark göstermediğini belirtmişlerdir [79]. Paraplejik hastalardan elektroejakülasyonla alınan sperm örneklerinde *MEST* hipermetile bulunmuştur. Ancak bu hastalar hipermetilasyonun patofizyolojik süreçlerle ilişkisi ortaya konulamamıştır [53]. DNA metilasyonu, ilaçlardan da etkilenmektedir. Temozolomide, evre 4 astrositom ve malign melanom tedavisinde

kullanılan alkilleyici bir ajandır. Anaplastik oligodendrogliom tedavisi için temozolomide kullanılan bir vakanın bir yılı geçen takibinde *MEST* metilasyonunun değişmediği buna karşın H19 hipometilasyonunun ilaç kesildikten sonra bile devam ettiği görülmüştür [80]. Alkol kullanan erkeklerin sperm konsantrasyonu ile spermelerde *MEST* metilasyonu ters ilişki göstermektedir [69]. Laqqan ve arkadaşları, oligospermi grubunda 7. kromozomun cg25750688 bölgesinde DNA metilasyonu ve sperm hareketliliği arasında anlamlı doğrusal ilişki göstermişlerdir [81]. Montjean ve arkadaşlarından [75] farklı olarak çalışmamızda, sperm konsantrasyonu ve *MEST* metilasyonu arasında anlamlı ilişki görülmemiştir. Ancak fertil grupta *MEST* metilasyonu ve sperm hareketliliği ters ilişkili bulunmuştur. İnfertil gruplarda ise *MEST* metilasyonu ve sperm hareketliliği ilişkili bulunmamıştır. Paternal ifadelenen *MEST* geninde metilasyonun artması ile sperm hareketinin azalması, metilasyon paterni normal olan spermelerin fertilizasyon şansını arttıracak bir özelliktir. Ancak infertil grupta bu ilişkinin görülmemesi *MEST* hipermetile olan spermin ICSI için kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu durumda fertilizasyon ve implantasyon başarısının etkilenmesi mümkündür.

Ankolkar ve arkadaşları; tekrarlayan düşüklerin etiyolojisinde sperm DNA metilasyon anomalisini inceledikleri çalışmalarında; tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan 26 çift ile 26 fertil erkeğin spermelerinde *MEST* metilasyonunun gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermediğini belirtmişlerdir [82]. Khambata ve arkadaşları ise tekrarlayan gebelik kayıplarında spermelerde *MEST* metilasyonunun arttığını göstermişlerdir [83]. Nelissen ve arkadaşları, plasenta dokularında IVF/ICSI grubunda kontrole göre *MEST* hipometilasyonu görürken, gen ifadelenmesinin ise değişmediğini saptamışlardır [84]. Valcarce ve arkadaşları, spermde gebelik belirteçlerinden biri olarak gösterdikleri *MEST* transkriptlerinin kriyoprezervasyon sonrası azaldığını göstermişlerdir [85]. Bizim çalışmamızda ise spermde *MEST* ifadelenmesi infertil gruplarda azalmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. *MEST* metilasyonu ile *MEST* ifadelenmesi infertil gruplarda ters ilişkili bulunmuştur. Fertil grupta ise anlamlı olmayan doğrusal ilişki göstermiştir. Spermin taşıdığı mRNA'ların testis kökenlidir. Spermde DNA metilasyonunun, fertilizasyondan sonraki gen ifadelenmesini düzenlediği düşünülmektedir [86]. Fertil ve infertil gruplarda *MEST* metilasyonu ve ifadelenmesi ile ilişkilerin değişmesi, spermatogenik hücrelerdeki epigenetik mekanizmaları düşündürmektedir. Ayrıca literatürde infertilite ve *MEST* metilasyonu arasında farklı bilgilerin bulunması [82, 83, 87],.

değerlendirilen bölgenin ve yöntemin değişmesi ile ilişkili olabilir. bunun yanı sıra DSÖ'nün belirlediği kriterlerin zaman içinde değişmesi de çalışmalarda heterojeniteyle sonuçlanmaktadır.

Çalışmamızda gruplar arasında *MEST1T1* metilasyonu ve ifadelenmesi açısından anlamlı fark göstermemiştir. Fertil grupta, *MEST1T1* metilasyonu ile vücut kitle indeksi arasında ters ilişki varken, infertil gruplarda anlamlı ilişki görülmemiştir. IVF/ICSI ile çocuk sahibi olan erkeklerin dahil olduğu bir çalışmada; paternal vücut kitle indeksinin sperm imprint genlerinin metilasyonlarına etkisini incelenmiştir. Sonuç olarak maternal ifadelenen *MEG3-IG DMR* metilasyonu vücut kitle indeksi ile doğrusal ilişki görülmüştür. *MEST* ve *H19* genlerinde ise anlamlı bir ilişki bulunmamıştır [88]. *MEST1T1* metilasyonu ile sperm konsantrasyonu, oligospermi grubunda doğrusal, diğer gruplarda anlamlı olmayan ters ilişki göstermektedir. *MEST1T1* metilasyonu ile normal morfoloji arasındaki ilişki infertil gruplarda anlamlı negatif iken fertil grupta anlamlı ilişki göstermemektedir. Spermde hipermetilasyonun iyi semen kalitesiyle ilişkili olduğu çalışmaların yanı sıra [89], metilasyon silinmesinin tam olmadığı bireylerde semen kalitesinin azaldığı da [90] gösterilmiştir. *MEST1T1* ifadelenmesi ile metilasyonu arasında normospermi grubunda anlamlı ters ilişki varken, diğer gruplarda anlamlı ilişki görülmemiştir. Tüm gruplarda *MEST1T1* genini ifadelenmesi ile 7.kromozomda bulunan diğer genlerin (*MEST* ve *CEP41*) ifadelenmeleri arasında doğrusal ilişki görülmüştür. Bu genlerin ifadelenmelerinin ortak süreçlerle düzenlendiğini düşündürmüştür. LncRNA'lar hedef genlerin ifadelenmelerini de arttırabilir [91]. *MEST1T1* transkriptlerinin *CEP41* ve *MEST* üzerinde bu etkileri invitro çalışmalarla araştırılmalıdır.

Maternal ifadelenen *H19* erkek infertilitesi etiyolojisinde sıklıkla araştırılmıştır. Oligospermide ve hipospermatogeneze bağlı azospermide *H19* metilasyonunun düşük olduğu gösterilmiştir [53, 72]. *H19* hipometilasyonu obstruktif azospermide de görülür [79]. *H19* anormal metilasyonu ve *IGF2-H19* DMR hipometilasyonu tekrarlayan düşüklerle ilişkilendirilmiştir [83, 92]. İnfertil erkeklerde ise astenospermi ile normospermi grupları arasında *H19* metilasyonunun değişimi anlamlı fark göstermemektedir [76]. Laurentino ve arkadaşları, spermelerde *H19* metilasyonunun maternal allel epimutasyonlarına etkisiyle oluştuğuna yönelik veriler sunmuşlardır [93]. Leita ve arkadaşları ise; daha sonra yaptıkları araştırma verileriyle spermelerde DNA metilasyonu anomalilerinin somatik hücre DNA

kontaminasyonu ve genetik varyasyonlardan kaynaklı artmış bulunduğuna yönelik görüşlerini bildirmişlerdir [30]. İnfertil erkeklerde *H19* DMR'sinin ortalama metilasyon seviyesi fertil erkeklerden istatistiksel olarak anlamlı olarak düşüktür. Meta-analizin sonucunda *H19* DMR metilasyon anomalisinin erkeklerde infertilite riskini 9,91 kat arttırdığı saptanmıştır [9]. Daha güncel bir meta-analizde infertilitede sperm *H19* metilasyonunun azaldığı gösterilmiş; fakat metilasyon yaşla ilişkili bulunmamıştır [5]. Çalışmamızda *H19* CpG dinükleotidlerinin hipermetilasyonu gruplar arasında anlamlı fark göstermemiştir. Fertil grupta *H19* metilasyonu ile sperm hareketliliği anlamlı doğrusal ilişki göstermektedir. Fertil grupta *H19* metilasyonu ile ifadenmesi arasında ters ilişki gösterilmiştir. Bu ilişkiler infertil gruplarda görülmemiştir. Literatürde semende reaktif oksijen türlerinin arttığı kişilerde, *H19* DMR metilasyonunda azalma görülmüştür. Buna bağlı olarak *H19* ifadenmesi artarken, *IGF2* ifadenmesi azalmış olarak bulunmuştur [94]. *H19* geninden köken alan mir-675 plasenta gelişimi için önemlidir. *mir-675-5p* plasenta gelişiminde ekstrasvillöz trofoblastların invazyonunu artırır [95]. Plasentada *H19/MIR675* DMR metilasyonunun maternal insülin duyarlılığı üzerinde etkili olduğunu gösteren çalışma, babanın epigenetik anomalilerinin anneyi de etkilemesine örnektir [96]. Çalışmamızda *H19* ifadenmesinin oligospermi grubunda arttığı, fertil ve normospermi grubunda azaldığı; *IGF2* ifadenmesinin ise fertil grupta artarken, infertil gruplarda azaldığı görülmüştür. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bunun yanı sıra tüm gruplarda *H19* ve *IGF2* ifadenmeleri anlamlı doğrusal ilişki göstermektedir. Cannarella ve arkadaşları; 22 erkeğin spermalarında *IGF2* ve *IGFR1* mRNA seviyelerini değerlendirdikleri çalışmada, mRNA seviyeleriyle sperm sayısı arasında pozitif korelasyon göstermişlerdir. Bu çalışmalarında *H19*'un hipermetile olması nedeniyle ifadenmesinin azaldığı, buna bağlı olarak da lncRNA olan *H19*'un *IGFR1* geni üzerindeki baskılayıcı etkisinin azalıp *IGFR1* ifadenmesinin arttığını iddia etmişlerdir. Ancak *H19* ifadenmesini değerlendirmemişlerdir [97]. Bizim çalışmamızda somatik hücrelerde farklı allellerden ifadelenen *IGF2* ve *H19* genlerinin, pozitif korelasyon göstermesi spermatogenez sırasındaki epigenetik düzenlemelerin somatik hücrelerden farklılık gösterdiğini düşündüren başka bir bulgudur. Bu farkların ortaya konulabilmesi için spermatogenik seri hücrelerini inceleyen çalışmalar planlanmalıdır. Oligospermi grubunda, toplam sperm sayısı ile *H19* ifadenmesi arasında ters ilişki görülürken diğer gruplarda bu ilişkinin olmaması spermatogenez sırasında epigenetik değişikliklerin araştırılmasını gerektiren bulgularımızdandır.

Kanser araştırmalarında, *IGF2AS*'nin büyüme faktörü olan *IGF2*'nin ifadenmesini baskıladığı görülmüştür [98]. Gebelerde depresif duygu durumu ve buna bağlı kortizol yüksekliğinin, plasentada *IGF2AS* metilasyonu ile doğrusal ilişki gösterdiği saptanmıştır [99]. Erken dönem gebelik kayıplarının ardından incelenen plasental villuslarda *IGF2AS* metilasyon anomalisi görülmüştür [54]. Çalışmamızda *IGF2AS* metilasyonu gruplar arasında anlamlı fark göstermemiştir. *IGF2AS* ifadenmesi değerlendirmemekle birlikte fertil grupta *IGF2* ifadenmesi ile *IGF2AS* metilasyonu doğrusal ilişki göstermektedir ($p<0,05$). Oligospermi grubunda doğrusal ilişki korunurken ($p<0,05$), normospermi grubunda bu ilişkinin tersine döndüğü görülmüştür ($p>0,05$). Bu bulgular spermatogeneizde *IGF2* ve *IGF2AS* genlerinin epigenetik düzenlenmelerinin birbirlerine ve fertiliteye etkilerininin açıklanmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu düşündürmüştür.

Yaşı bağlı olarak üreme sağlığında görülen değişimler, kadında daha belirgindir. Erkeklerde ise yaşın semen parametrelerine etkisi inceleyen bir çalışmada artan yaşı bağlı olarak sperm konsantrasyonu arttığı, toplam sperm sayısının azaldığı ve DNA fragmentasyonunun arttığı görülmüştür [100, 101]. Paternal yaşın 40 üstü olması bir yıl içindeki spontan gebelik şansını, 20 yaş altındakilere göre anlamlı olarak azaltmaktadır [102]. Bu çalışmada tüm gruplarda ortalama yaş 40'ın altındadır. Gruplar arasındaki yaş farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sperm DNA metilomunda yaşı bağlı değişim gösteren çok sayıda bölge gösterilmiştir. Bu bölgeler incelenirken, genç (18-38 yaş) ve yaşlı (46-71 yaş) erkekler çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, metilasyonu yaşı bağlı değişen genler arasında bizim çalışmamızdaki genler bulunmamaktadır [103]. Çalışmamızda fertil grupta *GNAS-AS* metilasyonu ile yaş arasında doğrusal ilişki görülmüşken ($p>0,05$), infertil gruplarda bu ilişki tersine dönmüştür ve normospermi grubunda anlamlıdır ($p<0,05$). Fertil grupta *IGF2AS* metilasyonu ile yaş ters ilişki göstermektedir ($p<0,01$), normospermi grubunda ise ters ilişki anlamlı değildir. Oligospermi grubunda *IGF2AS* metilasyonu ile yaş arasındaki ilişki doğrusaldır. *MESTIT1* metilasyonu ve yaş arasındaki ilişki, normospermi grubunda anlamlı doğrusal iken oligospermi grubunda tersine dönmüştür. Fertil grupta, *MESTIT1* metilasyonu ve yaş arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Cao ve arkadaşlarının sınıflandırmasına göre çalışmamızda grupların yaş ortalaması genç grubuna yakındır [103]. Çalışmamızda fertil grupta izlenen ilişkilerin, infertil gruplarda değişmesinin nedenleri açıklanmamıştır. Ancak spermatogenez sırasında bozulan mekanizmaların

fizyolojik etkilerin tersine çevrilmesine ve infertiliteyle sonuçlanabileceğini düşündürmüştür.

Yaş açısından benzer gruplarda bulduğumuz transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel değişimler, epigenetik mekanizmaların erkek fertilitesi için doğrudan, fetüs ve anne sağlığı açısından dolaylı etkilerinin inceleneceği yeni araştırmalar için önemli veriler sağlamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fertil, oligospermi ve normospermi gruplarında paternal ifadelenen *GNAS-AS* CpG dinükleotidlerinde bulduğumuz anlamlı metilasyon farkları, sperm sayısının azaldığı infertilite mekanizmasında etkili olan yeni bir bölge bulunması açısından önemlidir. Normospermi grubunda imprint bir gen olmayan *CEP41* dinükleotidlerinde saptanan metilasyon anomalisi ise sperm işlevini hedef alan mekanizmaların önemini göstermiştir. İncelenen genlerde metilasyonun farklı fenotipik özelliklerle anlamlı ilişkiler göstermeleri, bu ilişkilerin fertil ve infertil gruplarda değişmesi, infertilitenin karmaşık düzenlenme mekanizmalarının araştırılması için yeni sorular oluşturmıştır.

Bu çalışmamızla somatik hücrelerde tanımlanmış epigenetik mekanizmaların germ hücrelerine doğrudan uyarlanması yeterli olmayacağına dair örnekler vardır. Spermilerin taşıdıkları epigenom, spermatogenik seri ve genital kanallardan izler taşımaktadır. *MEST1*, *H19*, *GNAS* ve *IGF2AS* gibi kodlanmayan RNA'ların, DNA metilasyonları ile kendi transkriptlerinin ve hedef genlerinin ifadenmeleri arasındaki korelasyonlar; spermatogenez sürecindeki epigenetik değişikliklerin moleküler düzeyde araştırılması için temel veriler teşkil etmektedir.

Günümüzde üremeye yardımcı tekniklerde kullanılan sperm morfoloji ve hareketlilik gibi özellikleri değerlendirilerek yapılmaktadır. Ancak bu sperm çalışmamızda gördüğümüz üzere epigenetik anomaliler taşıyabilir. Canlı doğum oranlarının artması, komplikasyonların azalması için sperm moleküler özelliklerini değerlendirecek yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Spermelerde DNA metilasyonu ve gen ifadenmesini birlikte inceleyen bu tez çalışmasıyla *GNAS* ve *CEP41* hipermetilasyonu erkek infertilitesi için yeni bulgular olarak ortaya koyulmuştur. Fertil erkeklerde *IGF2* gen ifadenmesinin *H19* ve *IGF2AS* metilasyonu ile ilişki iken infertil gruplarda bu ilişkinin bozulmuş olması erkek infertilitesinde epigenetiğin önemini vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Mazzilli, R., Rucci, C., Vaiarelli, A., Cimadomo, D., Ubaldi, F. M., Foresta, C., Ferlin, A. (2023). Male factor infertility and assisted reproductive technologies: indications, minimum access criteria and outcomes. *Journal of endocrinological investigation*, 46(6), 1079-1085.
2. Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., Shah, R. (2021). Male infertility. *Lancet*, 397(10271), 319-333.
3. Rando, O. J. (2016). Intergenerational Transfer of Epigenetic Information in Sperm. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.*, 6(5).
4. Kitamura, A., Miyauchi, N., Hamada, H., Hiura, H., Chiba, H., Okae, H., Sato, A., John, R. M., Arima, T. (2015). Epigenetic alterations in sperm associated with male infertility. *Congenital anomalies.*, 55(3), 133-144.
5. Cannarella, R., Crafa, A., Barbagallo, F., Lundy, S. D., La Vignera, S., Condorelli, R. A., Calogero, A. E. (2023). H19 Sperm Methylation in Male Infertility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 24(8).
6. Rajender, S., Avery, K., Agarwal, A. (2011). Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation research*, 727(3), 62-71.
7. Carrell, D. T. (2012). Epigenetics of the male gamete. *Fertility and sterility*, 97(2), 267-274.
8. Joshi, M., Rajender, S. (2020). Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility. *Reproductive biology and endocrinology*, 18(1), 103.
9. Santi, D., De Vincentis, S., Magnani, E., Spaggiari, G. (2017). Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. *Andrology*, 5(4), 695-703.
10. Choy, J. T., Eisenberg, M. L. (2018). Male infertility as a window to health. *Fertility and sterility*, 110(5), 810-814.
11. Eisenberg, M. L., Esteves, S. C., Lamb, D. J., Hotaling, J. M., Giwercman, A., Hwang, K., Cheng, Y. S. (2023). Male infertility. *Nature reviews. Disease primers*, 9(1), 49.
12. Ozkocer, S. E., Konac, E. (2021). The current perspective on genetic and epigenetic factors in sperm maturation in the epididymis. *Andrologia*, 53(3), e13989.
13. Thacharodi, A., Hassan, S., Acharya, G., Vithlani, A., Hoang Le, Q., Pugazhendhi, A. (2023). Endocrine disrupting chemicals and their effects on the reproductive health in men. *Environmental research*, 236(Pt 2), 116825.
14. Pathak, U. I., Gabrielsen, J. S., Lipshultz, L. I. (2020). Cutting-Edge Evaluation of Male Infertility. *The Urologic clinics of North America*, 47(2), 129-138.
15. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. (2021). (H. World Health Organization Editör 6th).

16. Wang, C., Mbizvo, M., Festin, M. P., Björndahl, L., Toskin, I. (2022). Evolution of the WHO "Semen" processing manual from the first (1980) to the sixth edition (2021). *Fertility and sterility*, 117(2), 237-245.
17. Esteves, S. C., Achermann, A. P. P., Simoni, M., Santi, D., Casarini, L. (2023). Male infertility and gonadotropin treatment: What can we learn from real-world data? *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 86, 102310.
18. Calogero, A. E., Cannarella, R., Agarwal, A., Hamoda, T. A. A., Rambhatla, A., Saleh, R., Boitrelle, F., Ziouziou, I., Toprak, T., Gul, M., Avidor-Reiss, T., Kavoussi, P., Chung, E., Birowo, P., Ghayda, R. A., Ko, E., Colpi, G., Dimitriadis, F., Russo, G. I., Martinez, M., Calik, G., Kandil, H., Salvio, G., Mostafa, T., Lin, H., Park, H. J., Gherabi, N., Phuoc, N. H. V., Quang, N., Adriansjah, R., La Vignera, S., Micic, S., Durairajanayagam, D., Serefoglu, E. C., Karthikeyan, V. S., Kothari, P., Atmoko, W., Shah, R. (2023). The Renaissance of Male Infertility Management in the Golden Age of Andrology. *The world journal of men's health*, 41(2), 237-254.
19. Diaz, P., Dullea, A., Chu, K. Y., Zizzo, J., Loloi, J., Reddy, R., Campbell, K., Li, P. S., Ramasamy, R. (2022). Future of Male Infertility Evaluation and Treatment: Brief Review of Emerging Technology. *Urology*, 169, 9-16.
20. Baldini, D., Ferri, D., Baldini, G. M., Lot, D., Catino, A., Vizziello, D., Vizziello, G. (2021). Sperm Selection for ICSI: Do We Have a Winner? *Cells*, 10(12).
21. Dada, R., Kumar, M., Jesudasan, R., Fernández, J. L., Gosálvez, J., Agarwal, A. (2012). Epigenetics and its role in male infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29, 213-223.
22. Tahmasbpour Marzouni, E., Ilkhani, H., Beigi Harchegani, A., Shafaghatian, H., Layali, I., Shahriary, A. (2022). Epigenetic Modifications, A New Approach to Male Infertility Etiology: A Review. *International journal of fertility & sterility*, 16(1), 1-9.
23. Garrido, N., Boitrelle, F., Saleh, R., Durairajanayagam, D., Colpi, G., Agarwal, A. (2023). Sperm epigenetics landscape: correlation with embryo quality, reproductive outcomes and offspring's health. *Panminerva medica*, 65(2), 166-178.
24. Ni, K., Dansranjavin, T., Rogenhofer, N., Oetzuerk, N., Deuker, J., Bergmann, M., Schuppe, H. C., Wagenlehner, F., Weidner, W., Steger, K., Schagdarsurengin, U. (2016). TET enzymes are successively expressed during human spermatogenesis and their expression level is pivotal for male fertility. *Human reproduction*, 31(7), 1411-1424.
25. Zhou, S., Feng, S., Qin, W., Wang, X., Tang, Y., Yuan, S. (2021). Epigenetic Regulation of Spermatogonial Stem Cell Homeostasis: From DNA Methylation to Histone Modification. *Stem cell reviews and reports*, 17(2), 562-580.
26. Zhou, G., Zhang, M., Zhang, J., Feng, Y., Xie, Z., Liu, S., Zhu, D., Luo, Y. (2022). The gene regulatory role of non-coding RNAs in non-obstructive azoospermia. *Frontiers in endocrinology*, 13, 959487.
27. Trost, N., Mbengue, N., Kaessmann, H. (2023). The molecular evolution of mammalian spermatogenesis. *Cells & development*, 175, 203865.

28. Pollard, C. A., Jenkins, T. G. (2020). Epigenetic mechanisms within the sperm epigenome and their diagnostic potential. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 34(6), 101481.
29. Horvath, S., Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature reviews. Genetics*, 19(6), 371-384.
30. Leitão, E., Di Persio, S., Laurentino, S., Wöste, M., Dugas, M., Kliesch, S., Neuhaus, N., Horsthemke, B. (2020). The sperm epigenome does not display recurrent epimutations in patients with severely impaired spermatogenesis. *Clinical epigenetics*, 12(1), 61.
31. Amjadian, T., Yaghmaei, P., Nasim, H. R., Yari, K. (2023). Impact of DNA methylation of the human mesoderm-specific transcript (MEST) on male infertility. *Heliyon*, 9(10), e21099.
32. Kerjean, A., Dupont, J. M., Vasseur, C., Le Tessier, D., Cuisset, L., Paldi, A., Jouannet, P., Jeanpierre, M. (2000). Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Human molecular genetics*, 9(14), 2183-2187.
33. Nakabayashi, K., Bentley, L., Hitchins, M. P., Mitsuya, K., Meguro, M., Minagawa, S., Bamforth, J. S., Stanier, P., Preece, M., Weksberg, R., Oshimura, M., Moore, G. E., Scherer, S. W. (2002). Identification and characterization of an imprinted antisense RNA (MESTIT1) in the human MEST locus on chromosome 7q32. *Human molecular genetics*, 11(15), 1743-1756.
34. Meyer, E., Wollmann, H. A., Eggermann, T. (2003). Searching for genomic variants in the MESTIT1 transcript in Silver-Russell syndrome patients. *Journal of medical genetics*, 40(5), e65.
35. Gao, S., Lu, X., Ma, J., Zhou, Q., Tang, R., Fu, Z., Wang, F., Lv, M., Lu, C. (2021). Comprehensive Analysis of lncRNA and miRNA Regulatory Network Reveals Potential Prognostic Non-coding RNA Involved in Breast Cancer Progression. *Frontiers in genetics*, 12, 621809.
36. Bosire, C., Vidal, A. C., Smith, J. S., Jima, D., Huang, Z., Skaar, D., Valea, F., Bentley, R., Gradison, M., Yarnall, K. S. H., Ford, A., Overcash, F., Murphy, S. K., Hoyo, C. (2021). Association between PEG3 DNA methylation and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Infectious agents and cancer*, 16(1), 42.
37. Li, T., Vu, T. H., Lee, K. O., Yang, Y., Nguyen, C. V., Bui, H. Q., Zeng, Z. L., Nguyen, B. T., Hu, J. F., Murphy, S. K., Jirtle, R. L., Hoffman, A. R. (2002). An imprinted PEG1/MEST antisense expressed predominantly in human testis and in mature spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, 277(16), 13518-13527.
38. Schneider, E., Mayer, S., El Hajj, N., Jensen, L., Kuss, A., Zischler, H., Kondova, I., Bontrop, R., Navarro, B., Fuchs, E. (2012). Methylation and expression analyses of the 7q autism susceptibility locus genes MEST, COPG2, and TSGA14 in human and anthropoid primate cortices. *Cytogenetic and genome research*, 136(4), 278-287.

39. Schneider, E., Mayer, S., El Hajj, N., Jensen, L. R., Kuss, A. W., Zischler, H., Kondova, I., Bontrop, R. E., Navarro, B., Fuchs, E., Zechner, U., Haaf, T. (2012). Methylation and expression analyses of the 7q autism susceptibility locus genes MEST , COPG2, and TSGA14 in human and anthropoid primate cortices. *Cytogenetic and genome research*, 136(4), 278-287.
40. Alholle, A., Brini, A. T., Gharanei, S., Vaiyapuri, S., Arrigoni, E., Dallol, A., Gentle, D., Kishida, T., Hiruma, T., Avigad, S., Grimer, R., Maher, E. R., Latif, F. (2013). Functional epigenetic approach identifies frequently methylated genes in Ewing sarcoma. *Epigenetics*, 8(11), 1198-1204.
41. Yamada, T., Kayashima, T., Yamasaki, K., Ohta, T., Yoshiura, K., Matsumoto, N., Fujimoto, S., Niikawa, N., Kishino, T. (2002). The gene TSGA14, adjacent to the imprinted gene MEST, escapes genomic imprinting. *Gene*, 288(1-2), 57-63.
42. Lee, J. E., Silhavy, J. L., Zaki, M. S., Schroth, J., Bielas, S. L., Marsh, S. E., Olvera, J., Brancati, F., Iannicelli, M., Ikegami, K., Schlossman, A. M., Merriman, B., Attié-Bitach, T., Logan, C. V., Glass, I. A., Cluckey, A., Louie, C. M., Lee, J. H., Raynes, H. R., Rapin, I., Castroviejo, I. P., Setou, M., Barbot, C., Boltshauser, E., Nelson, S. F., Hildebrandt, F., Johnson, C. A., Doherty, D. A., Valente, E. M., Gleeson, J. G. (2012). CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. *Nature genetics*, 44(2), 193-199.
43. Aksu Uzunhan, T., Ertürk, B., Aydın, K., Ayaz, A., Altunoğlu, U., Yarar, M. H., Gezdirici, A., İçağasıoğlu, D. F., Gökpınar İli, E., Uyanık, B., Eser, M., Kutbay, Y. B., Topçu, Y., Kılıç, B., Bektaş, G., Arduç Akçay, A., Ekici, B., Chousein, A., Avcı, Ş., Yüksel, A., Kayserili, H. (2023). Clinical and genetic spectrum from a prototype of ciliopathy: Joubert syndrome. *Clinical neurology and neurosurgery*, 224, 107560.
44. Barfield, R., Huyghe, J. R., Lemire, M., Dong, X., Su, Y. R., Brezina, S., Buchanan, D. D., Figueiredo, J. C., Gallinger, S., Giannakis, M., Gsur, A., Gunter, M. J., Hampel, H., Harrison, T. A., Hopper, J. L., Hudson, T. J., Li, C. I., Moreno, V., Newcomb, P. A., Pai, R. K., Pharoah, P. D. P., Phipps, A. I., Qu, C., Steinfeld, R. S., Sun, W., Win, A. K., Zaidi, S. H., Campbell, P. T., Peters, U., Hsu, L. (2022). Genetic Regulation of DNA Methylation Yields Novel Discoveries in GWAS of Colorectal Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 31(5), 1068-1076.
45. Ki, S. M., Kim, J. H., Won, S. Y., Oh, S. J., Lee, I. Y., Bae, Y. K., Chung, K. W., Choi, B. O., Park, B., Choi, E. J., Lee, J. E. (2020). CEP41-mediated ciliary tubulin glutamylation drives angiogenesis through AURKA-dependent deciliation. *EMBO reports*, 21(2), e48290.
46. Patowary, A., Won, S. Y., Oh, S. J., Nesbitt, R. R., Archer, M., Nickerson, D., Raskind, W. H., Bernier, R., Lee, J. E., Brkanac, Z. (2019). Family-based exome sequencing and case-control analysis implicate CEP41 as an ASD gene. *Translational psychiatry*, 9(1), 4.

47. Sanchez-Navarro, I., L, R. J. d. S., Blanco-Kelly, F., Zurita, O., Sanchez-Bolivar, N., Villaverde, C., Lopez-Molina, M. I., Garcia-Sandoval, B., Tahsin-Swafiri, S., Minguez, P., Riveiro-Alvarez, R., Lorda, I., Sanchez-Alcudia, R., Perez-Carro, R., Valverde, D., Liu, Y., Tian, L., Hakonarson, H., Avila-Fernandez, A., Corton, M., Ayuso, C. (2018). Combining targeted panel-based resequencing and copy-number variation analysis for the diagnosis of inherited syndromic retinopathies and associated ciliopathies. *Scientific reports*, 8(1), 5285.
48. İnternet: Gene. *MEST*. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=4232#summary> adresinden 15 Aralık 2023 tarihinde alınmıştır.
49. Wang, Y., Hylemon, P. B., Zhou, H. (2021). Long Noncoding RNA H19: A Key Player in Liver Diseases. *Hepatology*, 74(3), 1652-1659.
50. Cai, X., Cullen, B. R. (2007). The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *Rna*, 13(3), 313-316.
51. Xiang, M., Ma, Y., Lei, H., Wen, L., Chen, S., Wang, X. (2019). In vitro fertilization placenta overgrowth in mice is associated with downregulation of the paternal imprinting gene H19. *Molecular reproduction and development*, 86(12), 1940-1950.
52. Wang, B., Suen, C. W., Ma, H., Wang, Y., Kong, L., Qin, D., Lee, Y. W. W., Li, G. (2020). The Roles of H19 in Regulating Inflammation and Aging. *Frontiers in immunology*, 11, 579687.
53. Marques, C. J., Francisco, T., Sousa, S., Carvalho, F., Barros, A., Sousa, M. (2010). Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertility and sterility*, 94(2), 585-594.
54. Wu, A. H., Guo, L. Y., Lu, S., Chen, X. L., Wang, A. A., Wang, X. Y., Liang, X. F. (2020). Aberrant methylation of IGF2-AS promoter in early pregnancy loss. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology* 59(1), 109-114.
55. İnternet: Gene. H19. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/283120> adresinden 15 Aralık 2023 tarihinde alınmıştır.
56. Macdonald, W. A. (2012). Epigenetic mechanisms of genomic imprinting: common themes in the regulation of imprinted regions in mammals, plants, and insects. *Genetics research international*, 2012, 585024.
57. Cannarella, R., Crafa, A., Condorelli, R. A., Mongioì, L. M., La Vignera, S., Calogero, A. E. (2021). Relevance of sperm imprinted gene methylation on assisted reproductive technique outcomes and pregnancy loss: a systematic review. *Systems biology in reproductive medicine*, 67(4), 251-259.
58. Li, T., Vu, T. H., Zeng, Z. L., Nguyen, B. T., Hayward, B. E., Bonthron, D. T., Hu, J. F., Hoffman, A. R. (2000). Tissue-specific expression of antisense and sense transcripts at the imprinted Gnas locus. *Genomics*, 69(3), 295-304.
59. Turan, S., Bastepe, M. (2015). GNAS Spectrum of Disorders. *Current osteoporosis reports*, 13(3), 146-158.

60. Wang, X. X., Sun, B. F., Jiao, J., Chong, Z. C., Chen, Y. S., Wang, X. L., Zhao, Y., Zhou, Y. M., Li, D. (2015). Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine modification pattern is a novel epigenetic feature of globozoospermia. *Oncotarget*, 6(9), 6535-6543.
61. Rahimi, S., Shao, X., Chan, D., Martel, J., Bérard, A., Fraser, W. D., Simon, M. M., Kwan, T., Bourque, G., Trasler, J. (2023). Capturing sex-specific and hypofertility-linked effects of assisted reproductive technologies on the cord blood DNA methylome. *Clinical epigenetics*, 15(1), 82.
62. İnternet: Gene. GNAS. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2778> adresinden 15 Aralık 2023 tarihinde alınmıştır.
63. He, W., Sun, Y., Zhang, S., Feng, X., Xu, M., Dai, J., Ni, X., Wang, X., Wu, Q. (2020). Profiling the DNA methylation patterns of imprinted genes in abnormal semen samples by next-generation bisulfite sequencing. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 37(9), 2211-2221.
64. Bianchi, E., Stermer, A., Boekelheide, K., Sigman, M., Hall, S. J., Reyes, G., Dere, E., Hwang, K. (2018). High-quality human and rat spermatozoal RNA isolation for functional genomic studies. *Andrology*, 6(2), 374-383.
65. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
66. Karaca, M. Z., Konac, E., Yurteri, B., Bozdag, G., Sogutdelen, E., Bilen, C. Y. (2017). Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene promoter hypermethylation and the risk of idiopathic male infertility. *Andrologia*, 49(7).
67. Amoako, K. K. (2015). Application of Pyrosequencing® in Food Biodefense. In U. Lehmann & J. Tost (Editörler). *Pyrosequencing: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, s. 363-375.
68. El Hajj, N., Zechner, U., Schneider, E., Tresch, A., Gromoll, J., Hahn, T., Schorsch, M., Haaf, T. (2011). Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 5(2), 60-69.
69. Zhang, W., Li, M., Sun, F., Xu, X., Zhang, Z., Liu, J., Sun, X., Zhang, A., Shen, Y., Xu, J., Miao, M., Wu, B., Yuan, Y., Huang, X., Shi, H., Du, J. (2019). Association of Sperm Methylation at LINE-1, Four Candidate Genes, and Nicotine/Alcohol Exposure With the Risk of Infertility. *Frontiers in genetics*, 10, 1001.
70. Becker, L. S., Al Smadi, M. A., Koch, H., Abdul-Khaliq, H., Meese, E., Abu-Halima, M. (2023). Towards a More Comprehensive Picture of the MicroRNA-23a/b-3p Impact on Impaired Male Fertility. *Biology (Basel)*, 12(6).
71. Abu-Halima, M., Becker, L. S., Ayesh, B. M., Meese, E. (2022). MicroRNA-targeting in male infertility: Sperm microRNA-19a/b-3p and its spermatogenesis related transcripts content in men with oligoasthenozoospermia. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 973849.

72. Marques, C. J., Carvalho, F., Sousa, M., Barros, A. (2004). Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet*, 363(9422), 1700-1702.
73. Marques, C. J., João Pinho, M., Carvalho, F., Bièche, I., Barros, A., Sousa, M. (2011). DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics*, 6(11), 1354-1361.
74. Hammoud, S. S., Purwar, J., Pflueger, C., Cairns, B. R., Carrell, D. T. (2010). Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertility and sterility*, 94(5), 1728-1733.
75. Montjean, D., Ravel, C., Benkhalifa, M., Cohen-Bacrie, P., Berthaut, I., Bashamboo, A., McElreavey, K. (2013). Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. *Fertility and sterility*, 100(5), 1241-1247.
76. Xu, J., Zhang, A., Zhang, Z., Wang, P., Qian, Y., He, L., Shi, H., Xing, Q., Du, J. (2016). DNA methylation levels of imprinted and nonimprinted genes DMRs associated with defective human spermatozoa. *Andrologia*, 48(9), 939-947.
77. Cannarella, R., Leanza, C., Crafa, A., Barbagallo, F., La Vignera, S., Condorelli, R. A., Calogero, A. E. (2023). Sperm Mesoderm Specific Transcript Gene Methylation Status in Infertile Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The world journal of men's health*.
78. Marques, P. I., Fernandes, S., Carvalho, F., Barros, A., Sousa, M., Marques, C. J. (2017). DNA methylation imprinting errors in spermatogenic cells from maturation arrest azoospermic patients. *Andrology*, 5(3), 451-459.
79. Minor, A., Chow, V., Ma, S. (2011). Aberrant DNA methylation at imprinted genes in testicular sperm retrieved from men with obstructive azoospermia and undergoing vasectomy reversal. *Reproduction*, 141(6), 749-757.
80. Berthaut, I., Montjean, D., Dessolle, L., Morcel, K., Deluen, F., Poirot, C., Bashamboo, A., McElreavey, K., Ravel, C. (2013). Effect of temozolomide on male gametes: an epigenetic risk to the offspring? *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(6), 827-833.
81. Laqqan, M., Tierling, S., Alkhaled, Y., LoPorto, C., Hammadeh, M. E. (2017). Alterations in sperm DNA methylation patterns of oligospermic males. *Reproductive biology*, 17(4), 396-400.
82. Ankolkar, M., Salvi, V., Warke, H., Vundinti, B. R., Balasinor, N. H. (2013). Methylation status of imprinted genes DLK1-GTL2, MEST (PEG1), ZAC (PLAGL1), and LINE-1 elements in spermatozoa of normozoospermic men, unlike H19 imprinting control regions, is not associated with idiopathic recurrent spontaneous miscarriages. *Fertility and sterility*, 99(6), 1668-1673.
83. Khambata, K., Raut, S., Deshpande, S., Mohan, S., Sonawane, S., Gaonkar, R., Ansari, Z., Datar, M., Bansal, V., Patil, A., Warke, H., Balasinor, N. H. (2021). DNA methylation defects in spermatozoa of male partners from couples experiencing recurrent pregnancy loss. *Human reproduction*, 36(1), 48-60.

84. Nelissen, E. C., Dumoulin, J. C., Daunay, A., Evers, J. L., Tost, J., van Montfoort, A. P. (2013). Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at the H19 and MEST differentially methylated regions. *Human reproduction*, 28(4), 1117-1126.
85. Valcarce, D. G., Cartón-García, F., Herráez, M. P., Robles, V. (2013). Effect of cryopreservation on human sperm messenger RNAs crucial for fertilization and early embryo development. *Cryobiology*, 67(1), 84-90.
86. Santiago, J., Silva, J. V., Howl, J., Santos, M. A. S., Fardilha, M. (2021). All you need to know about sperm RNAs. *Human reproduction update*, 28(1), 67-91.
87. Rotondo, J. C., Lanzillotti, C., Mazziotta, C., Tognon, M., & Martini, F. (2021). Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 689624. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689624>
88. Potabattula, R., Dittrich, M., Schorsch, M., Hahn, T., Haaf, T., El Hajj, N. (2019). Male obesity effects on sperm and next-generation cord blood DNA methylation. *PLoS One*, 14(6), e0218615.
89. Montjean, D., Zini, A., Ravel, C., Belloc, S., Dalleac, A., Copin, H., Boyer, P., McElreavey, K., Benkhalifa, M. (2015). Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology*, 3(2), 235-240.
90. Houshdaran, S., Cortessis, V. K., Siegmund, K., Yang, A., Laird, P. W., Sokol, R. Z. (2007). Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One*, 2(12), e1289.
91. Hashemi, M., Moosavi, M. S., Abed, H. M., Dehghani, M., Aalipour, M., Heydari, E. A., Behroozaghdam, M., Entezari, M., Salimimoghdam, S., Gunduz, E. S., Taheriazam, A., Mirzaei, S., Samarghandian, S. (2022). Long non-coding RNA (lncRNA) H19 in human cancer: From proliferation and metastasis to therapy. *Pharmacological research*, 184, 106418.
92. Ankolkar, M., Patil, A., Warke, H., Salvi, V., Kedia Mokashi, N., Pathak, S., Balasinor, N. H. (2012). Methylation analysis of idiopathic recurrent spontaneous miscarriage cases reveals aberrant imprinting at H19 ICR in normozoospermic individuals. *Fertility and sterility*, 98(5), 1186-1192.
93. Laurentino, S., Beygo, J., Nordhoff, V., Kliesch, S., Wistuba, J., Borgmann, J., Buiting, K., Horsthemke, B., Gromoll, J. (2015). Epigenetic germline mosaicism in infertile men. *Human molecular genetics*, 24(5), 1295-1304.
94. Darbandi, M., Darbandi, S., Agarwal, A., Baskaran, S., Dutta, S., Sengupta, P., Khorram Khorshid, H. R., Esteves, S., Gilany, K., Hedayati, M., Nobakht, F., Akhondi, M. M., Lakpour, N., Sadeghi, M. R. (2019). Reactive oxygen species-induced alterations in H19-Igf2 methylation patterns, seminal plasma metabolites, and semen quality. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(2), 241-253.

95. Ogoyama, M., Ohkuchi, A., Takahashi, H., Zhao, D., Matsubara, S., Takizawa, T. (2021). LncRNA H19-Derived miR-675-5p Accelerates the Invasion of Extravillous Trophoblast Cells by Inhibiting GATA2 and Subsequently Activating Matrix Metalloproteinases. *International journal of molecular sciences*, 22(3).
96. Hivert, M. F., Cardenas, A., Allard, C., Doyon, M., Powe, C. E., Catalano, P. M., Perron, P., Bouchard, L. (2020). Interplay of Placental DNA Methylation and Maternal Insulin Sensitivity in Pregnancy. *Diabetes*, 69(3), 484-492.
97. Cannarella, R., Condorelli, R. A., La Vignera, S., Bellucci, C., Luca, G., Calafiore, R., Calogero, A. E. (2020). IGF2 and IGF1R mRNAs Are Detectable in Human Spermatozoa. *The world journal of men's health*, 38(4), 545-551.
98. Zhang, Y., Yan, H., Jiang, Y., Chen, T., Ma, Z., Li, F., Lin, M., Xu, Y., Zhang, X., Zhang, J., He, H. (2021). Long non-coding RNA IGF2-AS represses breast cancer tumorigenesis by epigenetically regulating IGF2. *Experimental biology and medicine / Society for Experimental Biology and Medicine*, 246(4), 371-379.
99. Vangeel, E. B., Izzi, B., Hompes, T., Vansteelandt, K., Lambrechts, D., Freson, K., Claes, S. (2015). DNA methylation in imprinted genes IGF2 and GNASXL is associated with prenatal maternal stress. *Genes, brain, and behavior*, 14(8), 573-582.
100. Ajayi, A. F., Onaolapo, M. C., Omole, A. I., Adeyemi, W. J., Oluwole, D. T. (2023). Mechanism associated with changes in male reproductive functions during ageing process. *Experimental Gerontology*, 179, 112232.
101. Gao, J., Yuan, R., Yang, S., Wang, Y., Huang, Y., Yan, L., Jiang, H., Qiao, J. (2021). Age-related changes in human conventional semen parameters and sperm chromatin structure assay-defined sperm DNA/chromatin integrity. *Reproductive BioMedicine Online*, 42(5), 973-982.
102. Chan, P. T. K., Robaire, B. (2022). Advanced Paternal Age and Future Generations. *Frontiers in endocrinology*, 13, 897101.
103. Cao, M., Shao, X., Chan, P., Cheung, W., Kwan, T., Pastinen, T., Robaire, B. (2020). High-resolution analyses of human sperm dynamic methylome reveal thousands of novel age-related epigenetic alterations. *Clinical epigenetics*, 12(1), 192.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU									
ETİK KURUL İLETİŞİM BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi (GÜ) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu							
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık (GÜTF) Binası 06500 Beşevler/Ankara							
	TELEFON	0312 202 69 58							
	FAKS	0312 202 46 73							
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr							
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Erkek infertilitesinde transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel epigenetik değişimler							
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ece KONAÇ							
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI /UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı / GÜTF							
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)								
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Dr.Süheyla Esra Özkoçer- Doç.Dr. Nuray Varol- Prof.Dr.Nuray Bozkurt- Doç.Dr.Ismail Güler							
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar-Bireysel araştırma projesi							
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili					
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	25.01.2021	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐					
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	25.01.2021	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐					
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı				Açıklama				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒							
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐							
	DİĞER	☐							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 194		Toplantı tarihi: 22.02.2021						
	"Erkek infertilitesinde transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel epigenetik değişimler" başlıklı başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına GÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.								
	KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU								
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI		Prof. Dr. D. Berrin GÜNAYDIN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırmayla ilişkisi		Katılım			
Prof. Dr. D. Berrin GÜNAYDIN BAŞKAN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Farmakoloji Bilim Dr.	GÜTF	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐				

EK-1. (devam) Etik Kurul Onay Belgesi

Prof. Dr. Gülten TAÇOY BAŞKAN YARD.	Kardiyoloji Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Murat UÇAR BİLDİRİMDEN SORUMLU ÜYE	Radyoloji Anabilim Dalı	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nevzat YÜKSEL ÜYE	Psikiyatri Anabilim Dalı	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN ÜYE	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Ö. Sezai LEVENTOĞLU ÜYE	Genel Cerrahi Anabilim Dalı	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nuriye ÖZDEMİR ÜYE	İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL ÜYE	Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Ebru ARHAN ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Nöroloji Bilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Gökçe S. ÖZTÜRK FİNCAN ÜYE	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒
Doç. Dr. Elçin ÖZGÜR BÜYÜKATALAY ÜYE	Biyofizik Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒
Uzm. Dr. Emine AVCI ÜYE	Halk Sağlığı	Halk Sağlığı Genel Müd.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
İpek GÜVENÇ ÜYE	Hukukçu	Ankara Barosu	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐
İ. Nüket EKŞİ ÜYE	Sivil Temsilci	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐

EK-2. Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations									
gruplar				MESTIT1_FC	MEST_FC	GNAS_FC	CEP41_FC	H19_FC	IGF2_FC
fertile	Spearman's rho	MESTIT1_FC	Correlation Coefficient	1,000	,437*	,467*	,582**	,460*	,657**
			Sig. (2-tailed)		0,023	0,011	0,001	0,012	0,000
		MEST_FC	Correlation Coefficient	,437*	1,000	,884**	,864**	0,101	,587**
			Sig. (2-tailed)	0,023		0,000	0,000	0,615	0,001
		GNAS_FC	Correlation Coefficient	,467*	,884**	1,000	,877**	0,218	,666**
			Sig. (2-tailed)	0,011	0,000		0,000	0,257	0,000
		CEP41_FC	Correlation Coefficient	,582**	,864**	,877**	1,000	0,346	,692**
			Sig. (2-tailed)	0,001	0,000	0,000		0,066	0,000
		H19_FC	Correlation Coefficient	,460*	0,101	0,218	0,346	1,000	,610**
			Sig. (2-tailed)	0,012	0,615	0,257	0,066		0,000
		IGF2_FC	Correlation Coefficient	,657**	,587**	,666**	,692**	,610**	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations									
				MESTIT1_FC	MEST_FC	GNAS_FC	CEP41_FC	H19_FC	IGF2_FC
oligozoospermia	Spearman's rho	MESTIT1_FC	Correlation Coefficient	1,000	,833**	,706**	,648**	,579**	,581**
			Sig. (2-tailed)		0,000	0,000	0,000	0,001	0,001
		MEST_FC	Correlation Coefficient	,833**	1,000	,789**	,754**	,562**	,618**
			Sig. (2-tailed)	0,000		0,000	0,000	0,003	0,001
		GNAS_FC	Correlation Coefficient	,706**	,789**	1,000	,793**	,480*	,600**
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000		0,000	0,013	0,001
		CEP41_FC	Correlation Coefficient	,648**	,754**	,793**	1,000	,647**	,759**
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000
		H19_FC	Correlation Coefficient	,579**	,562**	,480*	,647**	1,000	,856**
			Sig. (2-tailed)	0,001	0,003	0,013	0,000		0,000
		IGF2_FC	Correlation Coefficient	,581**	,618**	,600**	,759**	,856**	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations									
				MESTIT1_FC	MEST_FC	GNAS_FC	CEP41_FC	H19_FC	IGF2_FC
normozoospermia	Spearman's rho	MESTIT1_FC	Correlation Coefficient	1,000	,702**	,474**	,407*	0,232	,552**
			Sig. (2-tailed)		0,000	0,008	0,026	0,227	0,002
		MEST_FC	Correlation Coefficient	,702**	1,000	,448*	,494**	0,353	,605**
			Sig. (2-tailed)	0,000		0,013	0,006	0,061	0,001
		GNAS_FC	Correlation Coefficient	,474**	,448*	1,000	,761**	0,098	,465*
			Sig. (2-tailed)	0,008	0,013		0,000	0,613	0,011
		CEP41_FC	Correlation Coefficient	,407*	,494**	,761**	1,000	0,148	,478**
			Sig. (2-tailed)	0,026	0,006	0,000		0,443	0,009
		H19_FC	Correlation Coefficient	0,232	0,353	0,098	0,148	1,000	,547**
			Sig. (2-tailed)	0,227	0,061	0,613	0,443		0,003
		IGF2_FC	Correlation Coefficient	,552**	,605**	,465*	,478**	,547**	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,002	0,001	0,011	0,009	0,003	
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).									
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).									

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m 2)	semen volume (ml)	sperm concentrati on (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morpholo gy (%)	MESTIT1_F C	MESTIT1 methylation
fertile	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	0,015	-0,107	,322**	,246**	0,034	,142*	-,339**	0,029
			Sig. (2-tailed)		0,833	0,122	0,000	0,000	0,627	0,040	0,000	0,679
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	0,015	1,000	-0,033	,282**	,203**	-,150*	-0,100	,242**	-,254**
			Sig. (2-tailed)	0,833		0,639	0,000	0,003	0,029	0,149	0,000	0,000
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,107	-0,033	1,000	0,013	,440**	-,238**	0,072	,267**	-0,099
			Sig. (2-tailed)	0,122	0,639		0,852	0,000	0,001	0,296	0,000	0,154
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	,322**	,282**	0,013	1,000	,886**	,188**	,253**	-0,005	-0,002
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,852		0,000	0,006	0,000	0,949	0,981

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
				Age(year)	BMI(kg/m ²)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	MESTIT1_FC	MESTIT1 methylation
fertile	Spearman's rho	total sperm count (million)	Correlation Coefficient	,246**	,203**	,440**	,886**	1,000	0,027	,232**	0,092	-0,036
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,003	0,000	0,000		0,700	0,001	0,190	0,601
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	0,034	-,150*	-,238**	,188**	0,027	1,000	,156*	-,252**	0,017
			Sig. (2-tailed)	0,627	0,029	0,001	0,006	0,700		0,023	0,000	0,812
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	,142*	-0,100	0,072	,253**	,232**	,156*	1,000	-0,080	0,082
			Sig. (2-tailed)	0,040	0,149	0,296	0,000	0,001	0,023		0,255	0,238
		MESTIT1_FC	Correlation Coefficient	-,339**	,242**	,267**	-0,005	0,092	-,252**	-0,080	1,000	-0,072
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,000	0,949	0,190	0,000	0,255		0,308
		MESTIT1 methylation	Correlation Coefficient	0,029	-,254**	-0,099	-0,002	-0,036	0,017	0,082	-0,072	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,679	0,000	0,154	0,981	0,601	0,812	0,238	0,308	

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
				Age(year)	BMI(kg/m 2)	semen volume (ml)	sperm concentrati on (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morpholo gy (%)	MESTIT1_F C	MESTIT1 methylation
oligozoospermic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,183**	-0,051	0,114	0,082	-,417**	,144*	,164*	-,156*
			Sig. (2- tailed)		0,008	0,462	0,098	0,238	0,000	0,044	0,017	0,024
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,183**	1,000	,247**	-0,046	0,073	0,071	0,002	-,198**	-0,125
			Sig. (2- tailed)	0,008		0,000	0,510	0,290	0,303	0,976	0,004	0,070
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,051	,247**	1,000	,271**	,613**	,197**	-0,076	-,343**	0,001
			Sig. (2- tailed)	0,462	0,000		0,000	0,000	0,004	0,292	0,000	0,987
		sperm concentratio n (million/ml)	Correlation Coefficient	0,114	-0,046	,271**	1,000	,867**	,194**	-,196**	-,322**	,159*
			Sig. (2- tailed)	0,098	0,510	0,000		0,000	0,005	0,006	0,000	0,021

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentrati on (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	MESTIT 1_FC	MESTIT1 methylation
oligozoospermia	Spearman's rho	total sperm count (million)	Correlation Coefficient	0,082	0,073	,613**	,867**	1,000	,231**	-,218**	-,408**	0,053
			Sig. (2-tailed)	0,238	0,290	0,000	0,000		0,001	0,002	0,000	0,444
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,417**	0,071	,197**	,194**	,231**	1,000	-,218**	0,042	0,090
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,303	0,004	0,005	0,001		0,002	0,550	0,194
		normal morphol ogy (%)	Correlation Coefficient	,144*	0,002	-0,076	-,196**	-,218**	-,218**	1,000	0,119	-,153*
			Sig. (2-tailed)	0,044	0,976	0,292	0,006	0,002	0,002		0,098	0,032
		MESTIT 1_FC	Correlation Coefficient	,164*	-,198**	-,343**	-,322**	-,408**	0,042	0,119	1,000	0,044
			Sig. (2-tailed)	0,017	0,004	0,000	0,000	0,000	0,550	0,098		0,524
		MESTIT 1 methylation	Correlation Coefficient	-,156*	-0,125	0,001	,159*	0,053	0,090	-,153*	0,044	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,024	0,070	0,987	0,021	0,444	0,194	0,032	0,524	

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	MESTIT1_FC	MESTIT1 methylation
normozoospermic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,304**	-,208**	-0,068	-0,116	-,347**	-0,059	0,072	,206**
			Sig. (2-tailed)		0,000	0,002	0,330	0,094	0,000	0,397	0,301	0,003
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,304**	1,000	,429**	0,034	,224**	,309**	-0,016	-,329**	0,111
			Sig. (2-tailed)	0,000		0,000	0,627	0,001	0,000	0,819	0,000	0,110
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-,208**	,429**	1,000	0,006	,673**	0,095	-,219**	-,169*	0,023
			Sig. (2-tailed)	0,002	0,000		0,929	0,000	0,168	0,001	0,014	0,737
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	-0,068	0,034	0,006	1,000	,663**	0,050	0,061	,254**	-0,053
			Sig. (2-tailed)	0,330	0,627	0,929		0,000	0,475	0,378	0,000	0,448
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	-0,116	,224**	,673**	,663**	1,000	0,002	-,138*	0,129	0,012
			Sig. (2-tailed)	0,094	0,001	0,000	0,000		0,973	0,046	0,062	0,861

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	MESTIT1_FC	MESTIT1 methylation
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,347**	,309**	0,095	0,050	0,002	1,000	-0,019	-,275**	0,022
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,168	0,475	0,973		0,788	0,000	0,749
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	-0,059	-0,016	-,219**	0,061	-,138*	-0,019	1,000	0,065	-,137*
			Sig. (2-tailed)	0,397	0,819	0,001	0,378	0,046	0,788		0,352	0,047
		MESTIT1_FC	Correlation Coefficient	0,072	-,329**	-,169*	,254**	0,129	-,275**	0,065	1,000	-,139*
			Sig. (2-tailed)	0,301	0,000	0,014	0,000	0,062	0,000	0,352		0,045
		MESTIT1 methylation	Correlation Coefficient	,206**	0,111	0,023	-0,053	0,012	0,022	-,137*	-,139*	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,003	0,110	0,737	0,448	0,861	0,749	0,047	0,045	
		**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).										
		*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).										

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	MEST_FC	MEST methylation
fertile	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	0,015	-0,107	,322**	,246**	0,034	0,142	-,219*	0,047
			Sig. (2-tailed)		0,874	0,245	0,000	0,007	0,715	0,123	0,023	0,608
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	0,015	1,000	-0,033	,282**	,203*	-0,150	-0,100	,312**	-0,078
			Sig. (2-tailed)	0,874		0,724	0,002	0,026	0,101	0,277	0,001	0,397
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,107	-0,033	1,000	0,013	,440**	-,238**	0,072	,285**	0,003
			Sig. (2-tailed)	0,245	0,724		0,889	0,000	0,009	0,432	0,003	0,974
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	,322**	,282**	0,013	1,000	,886**	,188*	,253**	0,000	0,037
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,002	0,889		0,000	0,039	0,005	0,996	0,691
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	,246**	,203*	,440**	,886**	1,000	0,027	,232*	0,083	0,070
			Sig. (2-tailed)	0,007	0,026	0,000	0,000		0,772	0,011	0,395	0,446
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	0,034	-0,150	-,238**	,188*	0,027	1,000	0,156	-,281**	-,205*
			Sig. (2-tailed)	0,715	0,101	0,009	0,039	0,772		0,088	0,003	0,025
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,142	-0,100	0,072	,253**	,232*	0,156	1,000	0,162	0,048
			Sig. (2-tailed)	0,123	0,277	0,432	0,005	0,011	0,088		0,094	0,600
		MEST_FC	Correlation Coefficient	-,219*	,312**	,285**	0,000	0,083	-,281**	0,162	1,000	0,074
			Sig. (2-tailed)	0,023	0,001	0,003	0,996	0,395	0,003	0,094		0,448
		MEST methylation	Correlation Coefficient	0,047	-0,078	0,003	0,037	0,070	-,205*	0,048	0,074	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,608	0,397	0,974	0,691	0,446	0,025	0,600	0,448	

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	MEST_FC	MEST methylation
oligozo osper mic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,183*	-0,051	0,114	0,082	-,417**	0,144	0,130	0,087
			Sig. (2-tailed)		0,045	0,580	0,213	0,375	0,000	0,130	0,181	0,344
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,183*	1,000	,247**	-0,046	0,073	0,071	0,002	-0,069	-0,168
			Sig. (2-tailed)	0,045		0,006	0,620	0,426	0,438	0,982	0,480	0,067
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,051	,247**	1,000	,271**	,613**	,197*	-0,076	-,388**	0,129
			Sig. (2-tailed)	0,580	0,006		0,003	0,000	0,031	0,428	0,000	0,159
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	0,114	-0,046	,271**	1,000	,867**	,194*	-,196*	-0,074	0,100
			Sig. (2-tailed)	0,213	0,620	0,003		0,000	0,034	0,039	0,445	0,277
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	0,082	0,073	,613**	,867**	1,000	,231*	-,218*	-,303**	0,119
			Sig. (2-tailed)	0,375	0,426	0,000	0,000		0,011	0,021	0,001	0,196
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,417**	0,071	,197*	,194*	,231*	1,000	-,218*	0,071	-0,069
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,438	0,031	0,034	0,011		0,021	0,465	0,456
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,144	0,002	-0,076	-,196*	-,218*	-,218*	1,000	0,093	-0,079

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	MEST_FC	MEST methylation
			Sig. (2-tailed)	0,130	0,982	0,428	0,039	0,021	0,021		0,357	0,407
		MEST_FC	Correlation Coefficient	0,130	-0,069	-,388**	-0,074	-,303**	0,071	0,093	1,000	-,226*
			Sig. (2-tailed)	0,181	0,480	0,000	0,445	0,001	0,465	0,357		0,019
		MEST methylation	Correlation Coefficient	0,087	-0,168	0,129	0,100	0,119	-0,069	-0,079	-,226*	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,344	0,067	0,159	0,277	0,196	0,456	0,407	0,019	
normo zoospe rmic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,304**	-,208*	-0,068	-0,116	-,347**	-0,059	-0,079	-0,096
			Sig. (2-tailed)		0,001	0,022	0,464	0,208	0,000	0,524	0,392	0,298
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,304**	1,000	,429**	0,034	,224*	,309**	-0,016	-0,047	0,020
			Sig. (2-tailed)	0,001		0,000	0,714	0,014	0,001	0,863	0,611	0,831
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-,208*	,429**	1,000	0,006	,673**	0,095	-,219*	-0,178	,200*
			Sig. (2-tailed)	0,022	0,000		0,946	0,000	0,300	0,016	0,052	0,028
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	-0,068	0,034	0,006	1,000	,663**	0,050	0,061	,224*	0,094
			Sig. (2-tailed)	0,464	0,714	0,946		0,000	0,591	0,507	0,014	0,310
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	-0,116	,224*	,673**	,663**	1,000	0,002	-0,138	0,028	,192*
			Sig. (2-tailed)	0,208	0,014	0,000	0,000		0,980	0,133	0,765	0,036
			N	120	120	120	120	120	120	120	120	120

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	MEST_FC	MEST methylation
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,347**	,309**	0,095	0,050	0,002	1,000	-0,019	-0,123	0,105
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,001	0,300	0,591	0,980		0,840	0,182	0,251
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	-0,059	-0,016	-,219*	0,061	-0,138	-0,019	1,000	,304**	-0,001
			Sig. (2-tailed)	0,524	0,863	0,016	0,507	0,133	0,840		0,001	0,990
		MEST_FC	Correlation Coefficient	-0,079	-0,047	-0,178	,224*	0,028	-0,123	,304**	1,000	-,296**
			Sig. (2-tailed)	0,392	0,611	0,052	0,014	0,765	0,182	0,001		0,001
		MEST methylation	Correlation Coefficient	-0,096	0,020	,200*	0,094	,192*	0,105	-0,001	-,296**	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,298	0,831	0,028	0,310	0,036	0,251	0,990	0,001	
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).												
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).												

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	IGF2_FC	IGF2AS methylation
fertile	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	0,015	-0,107	,322**	,246**	0,034	0,142	-,243**	-,331**
			Sig. (2-tailed)		0,859	0,192	0,000	0,002	0,682	0,084	0,003	0,000
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	0,015	1,000	-0,033	,282**	,203*	-0,150	-0,100	0,088	0,052
			Sig. (2-tailed)	0,859		0,693	0,000	0,013	0,066	0,224	0,290	0,524
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,107	-0,033	1,000	0,013	,440**	-,238**	0,072	,396**	0,002
			Sig. (2-tailed)	0,192	0,693		0,875	0,000	0,003	0,378	0,000	0,985
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	,322**	,282**	0,013	1,000	,886**	,188*	,253**	-0,023	-,229**
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,875		0,000	0,021	0,002	0,782	0,005
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	,246**	,203*	,440**	,886**	1,000	0,027	,232**	0,140	-,219**
			Sig. (2-tailed)	0,002	0,013	0,000	0,000		0,745	0,004	0,093	0,007
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	0,034	-0,150	-,238**	,188*	0,027	1,000	0,156	-,262**	-0,136
			Sig. (2-tailed)	0,682	0,066	0,003	0,021	0,745		0,056	0,001	0,097

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	IGF2_FC	IGF2AS methylation
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,142	-0,100	0,072	,253**	,232**	0,156	1,000	-0,102	-0,067
			Sig. (2-tailed)	0,084	0,224	0,378	0,002	0,004	0,056		0,221	0,414
		IGF2_FC	Correlation Coefficient	-,243**	0,088	,396**	-0,023	0,140	-,262**	-0,102	1,000	,194*
			Sig. (2-tailed)	0,003	0,290	0,000	0,782	0,093	0,001	0,221		0,019
		IGF2AS methylation	Correlation Coefficient	-,331**	0,052	0,002	-,229**	-,219**	-0,136	-0,067	,194*	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,524	0,985	0,005	0,007	0,097	0,414	0,019	
oligozoo spermic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,183*	-0,051	0,114	0,082	-,417**	0,144	0,056	,165*
			Sig. (2-tailed)		0,025	0,535	0,163	0,320	0,000	0,089	0,496	0,044
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,183*	1,000	,247**	-0,046	0,073	0,071	0,002	,176*	-0,002
			Sig. (2-tailed)	0,025		0,002	0,579	0,373	0,385	0,980	0,031	0,977
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,051	,247**	1,000	,271**	,613**	,197*	-0,076	-,185*	0,111
			Sig. (2-tailed)	0,535	0,002		0,001	0,000	0,016	0,374	0,023	0,178
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	0,114	-0,046	,271**	1,000	,867**	,194*	-,196*	-,212**	0,036
			Sig. (2-tailed)	0,163	0,579	0,001		0,000	0,017	0,020	0,009	0,662

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	IGF2_FC	IGF2AS methylation
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	0,082	0,073	,613**	,867**	1,000	,231**	-,218**	-,344**	-0,014
			Sig. (2-tailed)	0,320	0,373	0,000	0,000		0,005	0,010	0,000	0,865
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,417**	0,071	,197*	,194*	,231**	1,000	-,218**	0,036	-0,005
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,385	0,016	0,017	0,005		0,010	0,663	0,954
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,144	0,002	-0,076	-,196*	-,218**	-,218**	1,000	0,130	-0,065
			Sig. (2-tailed)	0,089	0,980	0,374	0,020	0,010	0,010		0,126	0,448
		IGF2_FC	Correlation Coefficient	0,056	,176*	-,185*	-,212**	-,344**	0,036	0,130	1,000	,212**
			Sig. (2-tailed)	0,496	0,031	0,023	0,009	0,000	0,663	0,126		0,009
		IGF2AS methylation	Correlation Coefficient	,165*	-0,002	0,111	0,036	-0,014	-0,005	-0,065	,212**	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,044	0,977	0,178	0,662	0,865	0,954	0,448	0,009	

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	IGF2_FC	IGF2AS methylation
normozoospermic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,304**	-,208*	-0,068	-0,116	-,347**	-0,059	-,217**	-0,073
			Sig. (2-tailed)		0,000	0,010	0,412	0,158	0,000	0,475	0,009	0,374
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,304**	1,000	,429**	0,034	,224**	,309**	-0,016	-,234**	-0,088
			Sig. (2-tailed)	0,000		0,000	0,682	0,006	0,000	0,847	0,005	0,282
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-,208*	,429**	1,000	0,006	,673**	0,095	-,219**	-0,147	0,025
			Sig. (2-tailed)	0,010	0,000		0,940	0,000	0,245	0,007	0,077	0,757
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	-0,068	0,034	0,006	1,000	,663**	0,050	0,061	,226**	0,038
			Sig. (2-tailed)	0,412	0,682	0,940		0,000	0,547	0,458	0,006	0,644
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	-0,116	,224**	,673**	,663**	1,000	0,002	-0,138	0,014	0,063
			Sig. (2-tailed)	0,158	0,006	0,000	0,000		0,977	0,093	0,863	0,445
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,347**	,309**	0,095	0,050	0,002	1,000	-0,019	-,194*	-0,090
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,245	0,547	0,977		0,821	0,019	0,272
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	-0,059	-0,016	-,219**	0,061	-0,138	-0,019	1,000	0,160	-,327**
			Sig. (2-tailed)	0,475	0,847	0,007	0,458	0,093	0,821		0,055	0,000
		IGF2_FC	Correlation Coefficient	-,217**	-,234**	-0,147	,226**	0,014	-,194*	0,160	1,000	-0,135
			Sig. (2-tailed)	0,009	0,005	0,077	0,006	0,863	0,019	0,055		0,107

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	IGF2_FC	IGF2AS methylation
		IGF2AS methylation	Correlation Coefficient	-0,073	-0,088	0,025	0,038	0,063	-0,090	-,327**	-0,135	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,374	0,282	0,757	0,644	0,445	0,272	0,000	0,107	
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).												
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).												

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	H19 FC	H19 methylation
fertile	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	0,015	-0,107	,322**	,246**	0,034	0,142	,192*	0,082
			Sig. (2-tailed)		0,859	0,192	0,000	0,002	0,682	0,084	0,021	0,319
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	0,015	1,000	-0,033	,282**	,203*	-0,150	-0,100	-0,138	-0,106
			Sig. (2-tailed)	0,859		0,693	0,000	0,013	0,066	0,224	0,099	0,195
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,107	-0,033	1,000	0,013	,440**	-,238**	0,072	,361**	-0,119
			Sig. (2-tailed)	0,192	0,693		0,875	0,000	0,003	0,378	0,000	0,147
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	,322**	,282**	0,013	1,000	,886**	,188*	,253**	,221**	-0,083
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,875		0,000	0,021	0,002	0,008	0,311
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	,246**	,203*	,440**	,886**	1,000	0,027	,232**	,329**	-0,118
			Sig. (2-tailed)	0,002	0,013	0,000	0,000		0,745	0,004	0,000	0,151
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	0,034	-0,150	-,238**	,188*	0,027	1,000	0,156	-0,124	,219**
			Sig. (2-tailed)	0,682	0,066	0,003	0,021	0,745		0,056	0,138	0,007
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,142	-0,100	0,072	,253**	,232**	0,156	1,000	0,016	-0,034
			Sig. (2-tailed)	0,084	0,224	0,378	0,002	0,004	0,056		0,846	0,680
		H19 FC	Correlation Coefficient	,192*	-0,138	,361**	,221**	,329**	-0,124	0,016	1,000	-,167*

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	H19 FC	H19 methylation
oligozoo spermic	Spearman's rho	H19 methylation	Sig. (2-tailed)	0,021	0,099	0,000	0,008	0,000	0,138	0,846		0,045
			Correlation Coefficient	0,082	-0,106	-0,119	-0,083	-0,118	,219**	-0,034	-,167*	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,319	0,195	0,147	0,311	0,151	0,007	0,680	0,045	
		Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,183*	-0,051	0,114	0,082	-,417**	0,144	0,110	0,130
			Sig. (2-tailed)		0,025	0,535	0,163	0,320	0,000	0,089	0,188	0,113
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,183*	1,000	,247**	-0,046	0,073	0,071	0,002	0,052	0,124
			Sig. (2-tailed)	0,025		0,002	0,579	0,373	0,385	0,980	0,531	0,130
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,051	,247**	1,000	,271**	,613**	,197*	-0,076	-,215**	0,109
			Sig. (2-tailed)	0,535	0,002		0,001	0,000	0,016	0,374	0,009	0,184
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	0,114	-0,046	,271**	1,000	,867**	,194*	-,196*	-,313**	0,026
			Sig. (2-tailed)	0,163	0,579	0,001		0,000	0,017	0,020	0,000	0,748
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	0,082	0,073	,613**	,867**	1,000	,231**	-,218**	-,431**	0,076
			Sig. (2-tailed)	0,320	0,373	0,000	0,000		0,005	0,010	0,000	0,352
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,417**	0,071	,197*	,194*	,231**	1,000	-,218**	-0,093	-0,087
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,385	0,016	0,017	0,005		0,010	0,264	0,289

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	H19 FC	H19 methylation
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,144	0,002	-0,076	-,196*	-,218**	-,218**	1,000	0,155	0,060
			Sig. (2-tailed)	0,089	0,980	0,374	0,020	0,010	0,010		0,072	0,483
		H19 FC	Correlation Coefficient	0,110	0,052	-,215**	-,313**	-,431**	-0,093	0,155	1,000	0,051
			Sig. (2-tailed)	0,188	0,531	0,009	0,000	0,000	0,264	0,072		0,541
		H19 methylation	Correlation Coefficient	0,130	0,124	0,109	0,026	0,076	-0,087	0,060	0,051	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,113	0,130	0,184	0,748	0,352	0,289	0,483	0,541	
normoz oosper mic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,304**	-,208*	-0,068	-0,116	-,347**	-0,059	-,282**	0,105
			Sig. (2-tailed)		0,000	0,010	0,412	0,158	0,000	0,475	0,001	0,200
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,304**	1,000	,429**	0,034	,224**	,309**	-0,016	0,014	0,038
			Sig. (2-tailed)	0,000		0,000	0,682	0,006	0,000	0,847	0,865	0,644
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-,208*	,429**	1,000	0,006	,673**	0,095	-,219**	-0,133	0,112
			Sig. (2-tailed)	0,010	0,000		0,940	0,000	0,245	0,007	0,112	0,173

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	H19 FC	H19 methylation
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	-0,068	0,034	0,006	1,000	,663**	0,050	0,061	-0,138	0,109
			Sig. (2-tailed)	0,412	0,682	0,940		0,000	0,547	0,458	0,099	0,185
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	-0,116	,224**	,673**	,663**	1,000	0,002	-0,138	-,229**	,176*
			Sig. (2-tailed)	0,158	0,006	0,000	0,000		0,977	0,093	0,006	0,031
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,347**	,309**	0,095	0,050	0,002	1,000	-0,019	0,125	-0,011
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,245	0,547	0,977		0,821	0,134	0,895
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	-0,059	-0,016	-,219**	0,061	-0,138	-0,019	1,000	,379**	-0,096
			Sig. (2-tailed)	0,475	0,847	0,007	0,458	0,093	0,821		0,000	0,243
		H19 FC	Correlation Coefficient	-,282**	0,014	-0,133	-0,138	-,229**	0,125	,379**	1,000	-0,088
			Sig. (2-tailed)	0,001	0,865	0,112	0,099	0,006	0,134	0,000		0,293
		H19 methylation	Correlation Coefficient	0,105	0,038	0,112	0,109	,176*	-0,011	-0,096	-0,088	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,200	0,644	0,173	0,185	0,031	0,895	0,243	0,293	
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).												
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).												

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	GNAS_FC	GNASAS methylation
fertile	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	0,015	-0,107	,322**	,246**	0,034	0,142	-0,082	0,155
			Sig. (2-tailed)		0,859	0,192	0,000	0,002	0,682	0,084	0,329	0,058
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	0,015	1,000	-0,033	,282**	,203*	-0,150	-0,100	,280**	-0,123
			Sig. (2-tailed)	0,859		0,693	0,000	0,013	0,066	0,224	0,001	0,134
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,107	-0,033	1,000	0,013	,440**	-,238**	0,072	,176*	0,051
			Sig. (2-tailed)	0,192	0,693		0,875	0,000	0,003	0,378	0,034	0,533
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	,322**	,282**	0,013	1,000	,886**	,188*	,253**	0,154	-0,153
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,875		0,000	0,021	0,002	0,064	0,061
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	,246**	,203*	,440**	,886**	1,000	0,027	,232**	,179*	-0,090
			Sig. (2-tailed)	0,002	0,013	0,000	0,000		0,745	0,004	0,031	0,271
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	0,034	-0,150	-,238**	,188*	0,027	1,000	0,156	-0,139	0,016
			Sig. (2-tailed)	0,682	0,066	0,003	0,021	0,745		0,056	0,095	0,843

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	GNAS_FC	GNASAS methylation
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,142	-0,100	0,072	,253**	,232**	0,156	1,000	,194*	0,117
			Sig. (2-tailed)	0,084	0,224	0,378	0,002	0,004	0,056		0,020	0,156
		GNAS_FC	Correlation Coefficient	-0,082	,280**	,176*	0,154	,179*	-0,139	,194*	1,000	0,078
			Sig. (2-tailed)	0,329	0,001	0,034	0,064	0,031	0,095	0,020		0,350
		GNASAS methylation	Correlation Coefficient	0,155	-0,123	0,051	-0,153	-0,090	0,016	0,117	0,078	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,058	0,134	0,533	0,061	0,271	0,843	0,156	0,350	
oligozoo spermic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,183*	-0,051	0,114	0,082	-,417**	0,144	-0,133	-0,033
			Sig. (2-tailed)		0,025	0,535	0,163	0,320	0,000	0,089	0,123	0,685
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,183*	1,000	,247**	-0,046	0,073	0,071	0,002	-0,021	-0,064
			Sig. (2-tailed)	0,025		0,002	0,579	0,373	0,385	0,980	0,808	0,437
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,051	,247**	1,000	,271**	,613**	,197*	-0,076	-,338**	-,240**
			Sig. (2-tailed)	0,535	0,002		0,001	0,000	0,016	0,374	0,000	0,003

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	GNAS_FC	GNASAS methylation
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	0,114	-0,046	,271**	1,000	,867**	,194*	-,196*	-0,005	-0,045
			Sig. (2-tailed)	0,163	0,579	0,001		0,000	0,017	0,020	0,950	0,588
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	0,082	0,073	,613**	,867**	1,000	,231**	-,218**	-,210*	-,194*
			Sig. (2-tailed)	0,320	0,373	0,000	0,000		0,005	0,010	0,015	0,018
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,417**	0,071	,197*	,194*	,231**	1,000	-,218**	,245**	0,002
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,385	0,016	0,017	0,005		0,010	0,004	0,983
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,144	0,002	-0,076	-,196*	-,218**	-,218**	1,000	0,006	-0,058
			Sig. (2-tailed)	0,089	0,980	0,374	0,020	0,010	0,010		0,945	0,496
		GNAS_FC	Correlation Coefficient	-0,133	-0,021	-,338**	-0,005	-,210*	,245**	0,006	1,000	,216*
			Sig. (2-tailed)	0,123	0,808	0,000	0,950	0,015	0,004	0,945		0,012
		GNASAS methylation	Correlation Coefficient	-0,033	-0,064	-,240**	-0,045	-,194*	0,002	-0,058	,216*	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,685	0,437	0,003	0,588	0,018	0,983	0,496	0,012	

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	GNAS_FC	GNASAS methylation
normoz oosper mic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,304**	-,208*	-0,068	-0,116	-,347**	-0,059	-,216**	-,272**
			Sig. (2-tailed)		0,000	0,010	0,412	0,158	0,000	0,475	0,008	0,001
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,304**	1,000	,429**	0,034	,224**	,309**	-0,016	-0,097	-,193*
			Sig. (2-tailed)	0,000		0,000	0,682	0,006	0,000	0,847	0,239	0,018
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-,208*	,429**	1,000	0,006	,673**	0,095	-,219**	0,063	0,055
			Sig. (2-tailed)	0,010	0,000		0,940	0,000	0,245	0,007	0,442	0,506
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	-0,068	0,034	0,006	1,000	,663**	0,050	0,061	,251**	-0,015
			Sig. (2-tailed)	0,412	0,682	0,940		0,000	0,547	0,458	0,002	0,851
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	-0,116	,224**	,673**	,663**	1,000	0,002	-0,138	,218**	-0,003
			Sig. (2-tailed)	0,158	0,006	0,000	0,000		0,977	0,093	0,007	0,970
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,347**	,309**	0,095	0,050	0,002	1,000	-0,019	-,162*	0,119
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,245	0,547	0,977		0,821	0,048	0,147
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	-0,059	-0,016	-,219**	0,061	-0,138	-0,019	1,000	0,037	-0,054
			Sig. (2-tailed)	0,475	0,847	0,007	0,458	0,093	0,821		0,655	0,510

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	GNAS_FC	GNASAS methylation
		GNAS_FC	Correlation Coefficient	-,216**	-0,097	0,063	,251**	,218**	-,162*	0,037	1,000	0,029
			Sig. (2-tailed)	0,008	0,239	0,442	0,002	0,007	0,048	0,655		0,729
		GNASAS methylation	Correlation Coefficient	-,272**	-,193*	0,055	-0,015	-0,003	0,119	-0,054	0,029	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,001	0,018	0,506	0,851	0,970	0,147	0,510	0,729	
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).												
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).												

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	CEP41_FC	CEP41 methylation
fertile	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	0,015	-0,107	,322**	,246**	0,034	0,142	-0,147	0,092
			Sig. (2-tailed)		0,874	0,245	0,000	0,007	0,715	0,123	0,114	0,318
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	0,015	1,000	-0,033	,282**	,203*	-0,150	-0,100	0,153	-0,069
			Sig. (2-tailed)	0,874		0,724	0,002	0,026	0,101	0,277	0,101	0,457
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,107	-0,033	1,000	0,013	,440**	-,238**	0,072	,241**	0,047
			Sig. (2-tailed)	0,245	0,724		0,889	0,000	0,009	0,432	0,009	0,610
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	,322**	,282**	0,013	1,000	,886**	,188*	,253**	0,090	0,053
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,002	0,889		0,000	0,039	0,005	0,335	0,565
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	,246**	,203*	,440**	,886**	1,000	0,027	,232*	0,142	0,075
			Sig. (2-tailed)	0,007	0,026	0,000	0,000		0,772	0,011	0,128	0,414
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	0,034	-0,150	-,238**	,188*	0,027	1,000	0,156	-0,162	0,146
			Sig. (2-tailed)	0,715	0,101	0,009	0,039	0,772		0,088	0,083	0,111

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	CEP41_FC	CEP41 methylation
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,142	-0,100	0,072	,253**	,232*	0,156	1,000	0,135	0,101
			Sig. (2-tailed)	0,123	0,277	0,432	0,005	0,011	0,088		0,148	0,273
		CEP41_FC	Correlation Coefficient	-0,147	0,153	,241**	0,090	0,142	-0,162	0,135	1,000	-0,007
			Sig. (2-tailed)	0,114	0,101	0,009	0,335	0,128	0,083	0,148		0,939
		CEP41 methylation	Correlation Coefficient	0,092	-0,069	0,047	0,053	0,075	0,146	0,101	-0,007	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,318	0,457	0,610	0,565	0,414	0,111	0,273	0,939	
oligozo osperm ic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,183*	-0,051	0,114	0,082	-,417**	0,144	,224*	0,141
			Sig. (2-tailed)		0,045	0,580	0,213	0,375	0,000	0,130	0,015	0,126
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,183*	1,000	,247**	-0,046	0,073	0,071	0,002	0,142	-0,105
			Sig. (2-tailed)	0,045		0,006	0,620	0,426	0,438	0,982	0,127	0,255
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,051	,247**	1,000	,271**	,613**	,197*	-0,076	-,278**	,241**
			Sig. (2-tailed)	0,580	0,006		0,003	0,000	0,031	0,428	0,003	0,008

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	CEP41_FC	CEP41 methylation
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	0,114	-0,046	,271**	1,000	,867**	,194*	-,196*	-0,151	0,125
			Sig. (2-tailed)	0,213	0,620	0,003		0,000	0,034	0,039	0,105	0,173
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	0,082	0,073	,613**	,867**	1,000	,231*	-,218*	-,303**	,182*
			Sig. (2-tailed)	0,375	0,426	0,000	0,000		0,011	0,021	0,001	0,046
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,417**	0,071	,197*	,194*	,231*	1,000	-,218*	-0,121	0,119
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,438	0,031	0,034	0,011		0,021	0,196	0,197
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,144	0,002	-0,076	-,196*	-,218*	-,218*	1,000	0,059	0,102
			Sig. (2-tailed)	0,130	0,982	0,428	0,039	0,021	0,021		0,545	0,285
		CEP41_FC	Correlation Coefficient	,224*	0,142	-,278**	-0,151	-,303**	-0,121	0,059	1,000	0,046
			Sig. (2-tailed)	0,015	0,127	0,003	0,105	0,001	0,196	0,545		0,622
		CEP41 methylation	Correlation Coefficient	0,141	-0,105	,241**	0,125	,182*	0,119	0,102	0,046	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,126	0,255	0,008	0,173	0,046	0,197	0,285	0,622	

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	CEP41_FC	CEP41 methylation
normoz oosper mic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-,304**	-,208*	-0,068	-0,116	-,347**	-0,059	-,282**	-0,053
			Sig. (2-tailed)		0,001	0,022	0,464	0,208	0,000	0,524	0,002	0,563
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-,304**	1,000	,429**	0,034	,224*	,309**	-0,016	-0,023	0,101
			Sig. (2-tailed)	0,001		0,000	0,714	0,014	0,001	0,863	0,806	0,272
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-,208*	,429**	1,000	0,006	,673**	0,095	-,219*	0,098	-0,015
			Sig. (2-tailed)	0,022	0,000		0,946	0,000	0,300	0,016	0,287	0,873
		sperm concentration (million/ml)	Correlation Coefficient	-0,068	0,034	0,006	1,000	,663**	0,050	0,061	,262**	-0,002
			Sig. (2-tailed)	0,464	0,714	0,946		0,000	0,591	0,507	0,004	0,982
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	-0,116	,224*	,673**	,663**	1,000	0,002	-0,138	,238**	-0,043
			Sig. (2-tailed)	0,208	0,014	0,000	0,000		0,980	0,133	0,009	0,642
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,347**	,309**	0,095	0,050	0,002	1,000	-0,019	-0,104	-0,043
			Sig. (2-tailed)	0,000	0,001	0,300	0,591	0,980		0,840	0,257	0,641
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	-0,059	-0,016	-,219*	0,061	-0,138	-0,019	1,000	,192*	-0,060
			Sig. (2-tailed)	0,524	0,863	0,016	0,507	0,133	0,840		0,035	0,513

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations												
groups				Age(year)	BMI(kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentration (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morphology (%)	CEP41_FC	CEP41 methylation
		CEP41_FC	Correlation Coefficient	-,282**	-0,023	0,098	,262**	,238**	-0,104	,192*	1,000	,184*
			Sig. (2-tailed)	0,002	0,806	0,287	0,004	0,009	0,257	0,035		0,044
		CEP41 methylation	Correlation Coefficient	-0,053	0,101	-0,015	-0,002	-0,043	-0,043	-0,060	,184*	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,563	0,272	0,873	0,982	0,642	0,641	0,513	0,044	
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).												
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).												

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

				Correlations												
Groups				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentrati on (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morpho logy (%)	GNAS_ FC	GNASAS_ CpG1	GNASAS_C pG2	GNASAS_C pG3	GNASAS_C pG4	GNASAS_C pG5
fertile	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	0,015	-0,107	0,322	0,246	0,034	0,142	-0,087	0,213	0,213	0,213	-0,103	0,237
			Sig. (2- tailed)		0,939	0,573	0,083	0,190	0,860	0,455	0,653	0,258	0,258	0,258	0,588	0,208
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	0,015	1,000	-0,033	0,282	0,203	-0,150	-0,100	0,264	-0,155	-0,155	-0,155	-0,225	-0,039
			Sig. (2- tailed)	0,939		0,864	0,132	0,281	0,428	0,599	0,166	0,413	0,413	0,413	0,233	0,837
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,107	-0,033	1,000	0,013	,440*	-0,238	0,072	0,177	0,051	0,051	0,051	0,226	-0,024
			Sig. (2- tailed)	0,573	0,864		0,946	0,015	0,206	0,704	0,359	0,790	0,790	0,790	0,229	0,898
		sperm concentratio n (million/ml)	Correlation Coefficient	0,322	0,282	0,013	1,000	,886**	0,188	0,253	0,148	-0,172	-0,172	-0,172	-0,161	-0,185
			Sig. (2- tailed)	0,083	0,132	0,946		0,000	0,319	0,178	0,444	0,364	0,364	0,364	0,397	0,328
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	0,246	0,203	,440*	,886**	1,000	0,027	0,232	0,174	-0,098	-0,098	-0,098	-0,019	-0,165
			Sig. (2- tailed)	0,190	0,281	0,015	0,000		0,888	0,218	0,366	0,606	0,606	0,606	0,920	0,383
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	0,034	-0,150	-0,238	0,188	0,027	1,000	0,156	-0,134	0,020	0,020	0,020	0,154	-0,071

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

				Correlations														
Groups				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentrati on (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morpho logy (%)	GNAS_ FC	GNASAS_ CpG1	GNASAS_C pG2	GNASAS_C pG3	GNASAS_C pG4	GNASAS_C pG5		
			Sig. (2-tailed)	0,860	0,428	0,206	0,319	0,888		0,409	0,490	0,914	0,914	0,914	0,415	0,709		
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,142	-0,100	0,072	0,253	0,232	0,156	1,000	0,191	0,163	0,163	0,163	0,138	0,036		
			Sig. (2-tailed)	0,455	0,599	0,704	0,178	0,218	0,409		0,321	0,388	0,388	0,388	0,466	0,849		
		GNAS_FC	Correlation Coefficient	-0,087	0,264	0,177	0,148	0,174	-0,134	0,191	1,000	0,160	0,160	0,160	0,027	-0,093		
			Sig. (2-tailed)	0,653	0,166	0,359	0,444	0,366	0,490	0,321		0,406	0,406	0,406	0,889	0,630		
		GNASAS_C pG1	Correlation Coefficient	0,213	-0,155	0,051	-0,172	-0,098	0,020	0,163	0,160	1,000	1,000**	1,000**	0,236	,722**		
			Sig. (2-tailed)	0,258	0,413	0,790	0,364	0,606	0,914	0,388	0,406				0,210	0,000		
		GNASAS_C pG2	Correlation Coefficient	0,213	-0,155	0,051	-0,172	-0,098	0,020	0,163	0,160	1,000**	1,000	1,000**	0,236	,722**		
					Sig. (2-tailed)	0,258	0,413	0,790	0,364	0,606	0,914	0,388	0,406				0,210	0,000
				GNASAS_C pG3	Correlation Coefficient	0,213	-0,155	0,051	-0,172	-0,098	0,020	0,163	0,160	1,000**	1,000**	1,000	0,236	,722**
					Sig. (2-tailed)	0,258	0,413	0,790	0,364	0,606	0,914	0,388	0,406				0,210	0,000

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations																
Groups				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentrati on (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morpho logy (%)	GNAS_ FC	GNASAS_ CpG1	GNASAS_C pG2	GNASAS_C pG3	GNASAS_C pG4	GNASAS_C pG5
		GNASAS_C pG4	Correlation Coefficient	-0,103	-0,225	0,226	-0,161	-0,019	0,154	0,138	0,027	0,236	0,236	0,236	1,000	0,272
			Sig. (2- tailed)	0,588	0,233	0,229	0,397	0,920	0,415	0,466	0,889	0,210	0,210	0,210		0,146
		GNASAS_C pG5	Correlation Coefficient	0,237	-0,039	-0,024	-0,185	-0,165	-0,071	0,036	-0,093	,722**	,722**	,722**	0,272	1,000
			Sig. (2- tailed)	0,208	0,837	0,898	0,328	0,383	0,709	0,849	0,630	0,000	0,000	0,000	0,146	
oligoz oospe rmic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-0,183	-0,051	0,114	0,082	-,417*	0,144	-0,172	0,049	-0,120	-0,026	-0,155	0,044
			Sig. (2- tailed)		0,333	0,789	0,547	0,668	0,022	0,464	0,392	0,796	0,527	0,891	0,415	0,819
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-0,183	1,000	0,247	-0,046	0,073	0,071	0,002	-0,024	-0,319	0,008	-0,113	0,096	0,052
			Sig. (2- tailed)	0,333		0,188	0,811	0,700	0,707	0,991	0,904	0,086	0,968	0,551	0,613	0,784
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,051	0,247	1,000	0,271	,613**	0,197	-0,076	-0,345	-0,308	-0,239	-0,310	-0,013	-0,310
			Sig. (2- tailed)	0,789	0,188		0,148	0,000	0,297	0,702	0,078	0,098	0,204	0,096	0,945	0,096
		sperm concentratio n (million/ml)	Correlation Coefficient	0,114	-0,046	0,271	1,000	,867**	0,194	-0,196	-0,030	-0,185	-0,194	0,075	0,149	0,013
			Sig. (2- tailed)	0,547	0,811	0,148		0,000	0,304	0,318	0,882	0,328	0,304	0,696	0,433	0,945
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	0,082	0,073	,613**	,867**	1,000	0,231	-0,218	-0,230	-0,340	-0,294	-0,140	0,064	-0,201
			Sig. (2- tailed)	0,668	0,700	0,000	0,000		0,220	0,265	0,249	0,066	0,115	0,462	0,736	0,288
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-,417*	0,071	0,197	0,194	0,231	1,000	-0,218	0,265	-0,108	-0,067	-0,013	0,333	-0,013
			Sig. (2- tailed)	0,022	0,707	0,297	0,304	0,220		0,266	0,182	0,570	0,726	0,944	0,072	0,944

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

				Correlations												
Groups				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentrati on (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morpho logy (%)	GNAS_ FC	GNASAS_ CpG1	GNASAS_C pG2	GNASAS_C pG3	GNASAS_C pG4	GNASAS_C pG5
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	0,144	0,002	-0,076	-0,196	-0,218	-0,218	1,000	-0,012	0,194	-0,006	-0,121	-0,359	-0,121
			Sig. (2- tailed)	0,464	0,991	0,702	0,318	0,265	0,266		0,953	0,323	0,976	0,540	0,061	0,540
		GNAS_FC	Correlation Coefficient	-0,172	-0,024	-0,345	-0,030	-0,230	0,265	-0,012	1,000	0,197	0,352	0,163	0,036	0,304
			Sig. (2- tailed)	0,392	0,904	0,078	0,882	0,249	0,182	0,953		0,325	0,072	0,417	0,857	0,123
		GNASAS_C pG1	Correlation Coefficient	0,049	-0,319	-0,308	-0,185	-0,340	-0,108	0,194	0,197	1,000	,614**	,693**	0,236	,533**
			Sig. (2- tailed)	0,796	0,086	0,098	0,328	0,066	0,570	0,323	0,325		0,000	0,000	0,210	0,002
		GNASAS_C pG2	Correlation Coefficient	-0,120	0,008	-0,239	-0,194	-0,294	-0,067	-0,006	0,352	,614**	1,000	,645**	0,356	,645**
			Sig. (2- tailed)	0,527	0,968	0,204	0,304	0,115	0,726	0,976	0,072	0,000		0,000	0,053	0,000
		GNASAS_C pG3	Correlation Coefficient	-0,026	-0,113	-0,310	0,075	-0,140	-0,013	-0,121	0,163	,693**	,645**	1,000	,553**	,830**
			Sig. (2- tailed)	0,891	0,551	0,096	0,696	0,462	0,944	0,540	0,417	0,000	0,000		0,002	0,000
		GNASAS_C pG4	Correlation Coefficient	-0,155	0,096	-0,013	0,149	0,064	0,333	-0,359	0,036	0,236	0,356	,553**	1,000	,553**

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations																
Groups				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentrati on (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morpho logy (%)	GNAS_ FC	GNASAS_ CpG1	GNASAS_C pG2	GNASAS_C pG3	GNASAS_C pG4	GNASAS_C pG5
			Sig. (2-tailed)	0,415	0,613	0,945	0,433	0,736	0,072	0,061	0,857	0,210	0,053	0,002		0,002
		GNASAS_C pG5	Correlation Coefficient	0,044	0,052	-0,310	0,013	-0,201	-0,013	-0,121	0,304	,533**	,645**	,830**	,553**	1,000
			Sig. (2-tailed)	0,819	0,784	0,096	0,945	0,288	0,944	0,540	0,123	0,002	0,000	0,000	0,002	
normo zoosp ermic	Spearman's rho	Age(year)	Correlation Coefficient	1,000	-0,304	-0,208	-0,068	-0,116	-0,347	-0,059	-0,213	-0,324	-0,213	-0,223	-,457*	-0,267
			Sig. (2-tailed)		0,103	0,269	0,723	0,542	0,060	0,758	0,258	0,080	0,258	0,237	0,011	0,154
		BMI(kg/m2)	Correlation Coefficient	-0,304	1,000	,429*	0,034	0,224	0,309	-0,016	-0,095	-0,183	-0,267	-,424*	0,005	-0,104
			Sig. (2-tailed)	0,103		0,018	0,859	0,235	0,097	0,933	0,617	0,334	0,153	0,020	0,978	0,584
		semen volume (ml)	Correlation Coefficient	-0,208	,429*	1,000	0,006	,673**	0,095	-0,219	0,061	0,144	0,032	-0,076	0,160	0,056

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

				Correlations												
Groups				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentratio n (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morpho logy (%)	GNAS_ FC	GNASAS_ CpG1	GNASAS_C pG2	GNASAS_C pG3	GNASAS_C pG4	GNASAS_C pG5
			Sig. (2-tailed)	0,269	0,018		0,974	0,000	0,616	0,245	0,748	0,448	0,865	0,690	0,400	0,771
		sperm concentratio n (million/ml)	Correlation Coefficient	-0,068	0,034	0,006	1,000	,663**	0,050	0,061	0,258	-0,070	-0,177	-0,066	0,264	0,035
			Sig. (2-tailed)	0,723	0,859	0,974		0,000	0,795	0,748	0,169	0,713	0,349	0,728	0,159	0,855
		total sperm count (million)	Correlation Coefficient	-0,116	0,224	,673**	,663**	1,000	0,002	-0,138	0,221	-0,012	-0,126	-0,144	0,305	0,035
			Sig. (2-tailed)	0,542	0,235	0,000	0,000		0,990	0,468	0,240	0,951	0,508	0,448	0,101	0,856
		sperm motility (%)	Correlation Coefficient	-0,347	0,309	0,095	0,050	0,002	1,000	-0,019	-0,164	0,172	0,233	0,082	0,067	0,066
			Sig. (2-tailed)	0,060	0,097	0,616	0,795	0,990		0,922	0,386	0,365	0,216	0,667	0,723	0,730
		normal morphology (%)	Correlation Coefficient	-0,059	-0,016	-0,219	0,061	-0,138	-0,019	1,000	0,033	-0,093	-0,040	0,137	-0,106	-0,197
			Sig. (2-tailed)	0,758	0,933	0,245	0,748	0,468	0,922		0,864	0,626	0,833	0,471	0,579	0,297
		GNAS_FC	Correlation Coefficient	-0,213	-0,095	0,061	0,258	0,221	-0,164	0,033	1,000	0,237	0,126	-0,058	0,005	-0,166
			Sig. (2-tailed)	0,258	0,617	0,748	0,169	0,240	0,386	0,864		0,207	0,508	0,760	0,978	0,382

EK-2. (devam) Spearman Korelasyon Testi Bulguları

Correlations																
Groups				Age (year)	BMI (kg/m2)	semen volume (ml)	sperm concentrati on (million/ml)	total sperm count (million)	sperm motility (%)	normal morpho logy (%)	GNAS_ FC	GNASAS_ CpG1	GNASAS_C pG2	GNASAS_C pG3	GNASAS_C pG4	GNASAS_C pG5
		GNASAS_C pG1	Correlation Coefficient	-0,324	-0,183	0,144	-0,070	-0,012	0,172	-0,093	0,237	1,000	,934**	,729**	0,211	,605**
			Sig. (2- tailed)	0,080	0,334	0,448	0,713	0,951	0,365	0,626	0,207		0,000	0,000	0,264	0,000
		GNASAS_C pG2	Correlation Coefficient	-0,213	-0,267	0,032	-0,177	-0,126	0,233	-0,040	0,126	,934**	1,000	,796**	0,183	,544**
			Sig. (2- tailed)	0,258	0,153	0,865	0,349	0,508	0,216	0,833	0,508	0,000		0,000	0,334	0,002
		GNASAS_C pG3	Correlation Coefficient	-0,223	-,424*	-0,076	-0,066	-0,144	0,082	0,137	-0,058	,729**	,796**	1,000	,391*	,471**
			Sig. (2- tailed)	0,237	0,020	0,690	0,728	0,448	0,667	0,471	0,760	0,000	0,000		0,033	0,009
		GNASAS_C pG4	Correlation Coefficient	-,457*	0,005	0,160	0,264	0,305	0,067	-0,106	0,005	0,211	0,183	,391*	1,000	,447*
			Sig. (2- tailed)	0,011	0,978	0,400	0,159	0,101	0,723	0,579	0,978	0,264	0,334	0,033		0,013
		GNASAS_C pG5	Correlation Coefficient	-0,267	-0,104	0,056	0,035	0,035	0,066	-0,197	-0,166	,605**	,544**	,471**	,447*	1,000
			Sig. (2- tailed)	0,154	0,584	0,771	0,855	0,856	0,730	0,297	0,382	0,000	0,002	0,009	0,013	
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).																
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).																
FC: Fold Change																

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZKOÇER, Süheyla Esra
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Tıpta Uzmanlık	Gazi Üniversitesi / Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2018
Lisans	Hacettepe Üniversitesi / Tıp Fakültesi	2013
Lise	İstanbul Atatürk Fen Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2022-devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Dr. Öğr. Üyesi
2018-2022	Gazi Üniversitesi	Öğretim Gör. Dr.
2014-2018	Gazi Üniversitesi	Araştırma Gör. Dr.
2013-2014	Ağrı Toplum Sağlığı Merkezi	Tabip

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Microneedling Alone: An Experimental Study

Pasinlioğlu B., Çenetoğlu İ. S., Karasu O., ÖZKOÇER S. E., ELMAS Ç. Plastic and Reconstructive Surgery, cilt.151, sa.6, ss.1233-1241, 2023 (SCI-Expanded)

2. Immunohistochemical analysis with apoptosis and autophagy markers in periodontitis and peri-implantitis: Clinical comparative study

Ozkocer O., Özkoçer S. E., Guler B., Uraz Corekci A., Elmas Ç., Yalım M. Journal of Periodontal Research, cilt.58, sa.2, ss.456-464, 2023 (SCI-Expanded)

3. Effects of recurrent ketamine exposure on brain histopathology in juvenile rats

Arpaci A. H., Özkoçer S. E., Güneş E., Elmas Ç., Işık B. Turkish Journal of Medical Sciences, cilt.53, sa.1, ss.19-28, 2023 (SCI-Expanded)

4. The Effect of Ultrasonic Liposuction Energy Levels on Fat Graft Viability

Genç İ. G., Fındıkçioğlu K., Sadioğlu A., Erdal A. I., Özkoçer S. E., Elmas Ç. Aesthetic Plastic Surgery, cilt.46, sa.5, ss.2509-2516, 2022 (SCI-Expanded)

5. Effects of chitosan and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an animal model

Şahin M. M., Cayonu M., Dinc S. K., Ozkocer E., Ilhan M., Uzunoğlu E., Elmas Ç., Yılmaz M., Akkol E. European Archives Of Oto-Rhino-Laryngology, cilt.279, sa.2, ss.987-994, 2022 (SCI-Expanded)

6. Use of Erythropoietin and Fibrin Glue Mixture for Peripheral Nerve Repair

Erdal A. I., Findikcioglu K., Karasu O., Özkoçer S. E., Elmas C. Plastic And Reconstructive Surgery, cilt.149, sa.2, ss.395-403, 2022 (SCI-Expanded)

7. The current perspective on genetic and epigenetic factors in sperm maturation in the epididymis.

Ozkocer S. E., Konac E. Andrologia, cilt.53, 2021 (SCI-Expanded)

8. Comparison of Large-Gauge Needle, Corneal Knife, and No. 11 Blade for Percutaneous Achillotomies: An Experimental Study

Alpay Y., Yildirim T., Akbulut D., Cukurlu M., Özkoçer S. E., Elmas Ç. Journal Of The American Podiatric Medical Association, cilt.111, sa.2, 2021 (SCI-Expanded)

9. Repair within the first 48 h in the treatment of acute Achilles tendon ruptures achieves the best biomechanical and histological outcomes

Misir A., Kizkapan T. B., Arikan Y., Akbulut D., Onder M., Yildiz K. I., Özkoçer S. E. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy, cilt.28, sa.9, ss.2788-2797, 2020 (SCI-Expanded)

10. Capsular contracture around silicone miniimplants following bacterial contamination: an in vivo comparative experimental study between textured and polyurethane implants

Manav S., Ayhan M. S., Deniz E., Özkoçer E., Elmas Ç., Yalinay M., Sahin E. Journal Of Plastic Reconstructive And Aesthetic Surgery, cilt.73, sa.9, ss.1747-1757, 2020 (SCI-Expanded)

Hobiler

Yürümek



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

