

T.C  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

İNHİBİN POLİMORFİZMİNİN TÜP BEBEK TEDAVİSİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HABİP ASLAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. RUKSET ATTAR

İSTANBUL – 2019

## TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü


Program : Moleküler Tıp Yüksek Lisans Programı

Tez Başlığı : İnhibin Polimorfizminin Tüp Bebek Tedavisine Etkilerinin Araştırılması

Tez Sahibi : Habip ASLAN


Sınav Tarihi : 28.06.2019

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı:	Prof.Dr.Turgay İsbir Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD/ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp ABD	
Üye:	Prof. Dr. Rukset ATTAR Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD	
Üye:	Prof. Dr. Arzu ERGEN İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp ABD	

### ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28./06./2019 tarih ve 2019/11-64 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Bayram YILMAZ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımınakadar bütün safhalarda etikdışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

HABİP ASLAN



## İTHAF

Değerli Eşim Melek Cemile Aslan ve kızım Zeynep Asel Alan' a  
Kıymetli Aile Fertlerim, Sehergül Aslan, Metin Tosun Zahide Tosun' a,  
Saygıdeğer Büyüğüm Prof. Dr. Turgay İsbir' e ve değerli tez danışmanım  
Prof. Dr. Rukset Attar' a ithaf ediyorum.



## TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi ve Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, yüksek lisans eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen, saygıdeğer büyüğüm ve hocam Prof. Dr. Turgay İSBİR' e,

Tezimle ilgili araştırma ve yazım sürecinde benden desteğini esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Rukset Attar' a, ve çok değerli arkadaşım Klinik Embriyolog ALI BURAN'a ve Doç. Dr. Pinar Tulay' a

Tez çalışmam boyunca desteklerini ve deneyimlerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Ayrıca bu çalışmaya katılmayı kabul etmiş olan tüm Tüp Bebek hastalarına ve ailelerine,

Son olarak da tüm hayatım boyunca beni hep destekleyen biricik eşime ve kıymetli aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. İNSAN GAMETOGENEZİ VE FERTİLİZASYON.....	2
2.1.1. EMBRİYONİK GELİŞİM.....	2
2.1.2. SPERM OOSİT ETKİLEŞİMİ.....	3
2.1.3. SPERM AKTİVASYONU VE KAPASİTASYONU.....	3
2.1.4. AKROZOM REAKSİYONU.....	4
2.1.5. OOSİT AKTİVASYONU.....	4
2.1.5.1. ZONA PELLISUIDA.....	4
2.1.6. SPERM OOSİT BİRLEŞMESİ.....	5
2.1.7. ZİGOT OLUŞUMU.....	5
2.2. REPRODUKTİF ENDOKRİNOLOJİ.....	6
2.2.1. DIŞI REPRODUKTİF ENDOKRİNOLOJİSİ.....	6
2.2.2. ERKEK ÜREME E ENDOKRİNOLOJİSİ.....	10
2.3. AKTİVİN.....	12
2.4. İNHİBİN.....	13
2.4.1. İNHİBİN YAPISI VE RESEPTÖRLERİ.....	13

2.4.2. İNHİBİN A VE İNHİBİN B .....	14
2.4.3. HIPOFİZE İNHİBİN ETKİSİ.....	14
2.4.4. OVERDE İNHİBİN B .....	14
2.4.5. KANDA İNHİBİN SEVİYESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER... ..	15
2.4.6. BIOMARKER OLARAK İNHİBİN B.....	17
2.4.6.1. OVERDE BIOMARKER İNHİBİN B .....	17
2.4.6.2. TESTİSLERDE BIOMARKER İNHİBİN B.....	17
2.5. POLİMORFİZMLER VE İNHİBİN POLİMORFİZMİ .....	19
2.5.1. POLİMORFİZMLER... ..	19
2.5.1.1. TEK NUKLEOTİD POLİMORFİZMLERİ(SNP.....	19
2.5.1.2. DUBLİKE POLİMORFİZMLER.....	20
2.6. FSH RESEPTÖR GENİ.....	21
2.7. LH RESEPTÖR GENİ.....	22
2.8. İNHİBİN RESEPTÖR GENİ.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. ÖRNEK SEÇİMİ VE TANIMI .....	23
3.2. KULLANILAN MALZEMELER VE CİHAZLAR.....	23
3.2.1. KULLANILAN SARF MALZEMELER... ..	23
3.2.2. KULLANILAN CİHAZLAR... ..	23
3.3. YÖNTEMLER.....	24
3.3.1. KANDA GENOMİK DNA İZOLASYONU.....	24
3.3.2. DNA SAFLIK ÖLÇÜMÜ .....	24
3.3.3. EŞ ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE GENOTİPLEME.....	25
3.3.3.1. EŞ ZAMANLI PZR PROTOKOLU.....	26
3.4. İSTATİSTİKSEL HAPLOTİP ANALIZI .....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. İSTATİKSEL ANALİZLERDEN ELDE EDİLEN BULGULAR.....	28
4.2. EŞ ZAMANLI PZR SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	34

6. KAYNAKLAR...	36
7. EKLER.....	42
7.1 HAM VERILER .....	42
7.2. FORMLAR .....	59
7.2.1. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU.....	59
7.2.2. BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU .....	62
7.2.3. OLGU RAPOR FORMU.....	64
7.3. ETİK KURUL KARARI .....	65
8. ÖZGEÇMİŞ .....	66





## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1. Kadın Üreme Sisteminde rol alan hormonlar ve görevleri.....	9
Tablo 3-1. Eş Zamanlı PZR için Reaksiyon Karışımı... ..	26
Tablo 3- 2. Eş Zamanlı PZR Koşulları... ..	26
Tablo 3-3 Hastalara Ait Demografik Ve Klinik Parametreler .....	28
Tablo 3-4 Hasta Grubuna Ait SCARB1 Gen Polimorfizminin Genotip ve Allel Olarak Dağılımı... ..	29
Tablo 3-5 Hasta Grubunda Yaş Gruplarına Göre Parametrelerin Dağılımı.....	29
Tablo 3-6 Hasta Grubunda Oosit Sayısına Göre Parametrelerin Dağılımı.....	30
Tablo 3-7 Hasta Grubunda Oosit Sayısına Göre INHBB Geninin Genotipik Olarak Dağılımı... ..	31

## ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Embriyoda dördüncü haftadan sonra germ hücrelerinin hareketi (7).....	2
Şekil 2-2 Sperm yumurta birleşmesi (9).....	3
Şekil 2-3 Metafaz 2 aşamasında döllenmeye hazır yumurta (18).....	5
Şekil 2-4 Normal fertilizasyon (Döllenme) gerçekleşmiş yumurta.(19).....	6
Şekil 2-5 Döllenme işleminden 3 gün sonra 8 hücreli embriyo.(20).....	6
Şekil 2-6 Döllenme işleminden 5 gün sonra blastosit aşamasında embriyo.(21) .....	6
Şekil 2-7 Üremenin endokrin kontrol şeması (23).....	7
Şekil 2-8 Beyin – Üreme organları Hormonal aks. (24).....	8
Şekil 2-9 Normal menstural döngüde, hipofiz gonadatropinleri, österojen hormon türevi E2, progesteron ve endometriyumdaki döngüsel değişiklikler (27).....	10
Şekil 2-10 Erkek üreme sistemi Hormonal aks.....	11
Şekil 2-11 Sperm Üretimi (Spermatogenez) (29).....	11
Şekil 2-12 İnhibin B dimerik yapısı (34).....	13
Şekil 2-13 İnhibin B'nin birden fazla etkisi.....	18
Şekil 2-14 Tek Nükleotid Polimorfizimleri Oluşumu (SNP) (57).....	19
Şekil 2-15 CNV oluşumu(59).....	21
Şekil 4-1 Allelik Diskriminasyon Gösterimi .....	32
Şekil 4-2 Homozigot Mutant Genotip Işıma Grafiği .....	33
Şekil4-3 Heterozigot Genotip Işıma Grafiği.....	33

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

E2	Estradiol
FSH;	Folikül stimule edici hormon
GnRH	Gonadotropin serbestleştirici hormon
HCG	Human chorionic gonadotropin
ICSI	Intrasitoplazmik Sperm enjeksiyonu
Hmg	Human menopozal gonadotropin
HSG	Histerosalpingografi
IVF	In vitro fertilizasyon
KOH	Kontrollü Ovaryen Hiperstimülasyonu
LH	Luteinize edici hormon
MII	Metafaz 2 evresinde bulunan oosit
1PKOS	Polikistik over sendromu
RFLP	Restiriction Fragment Lenght polymorphism
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
YÜT	Yardımla üreme teknikleri
INHBB	İnhibin B geni

## ÖZET

**Aslan, H. İnhibin Polimorfizminin Tüp Bebek Tedavisinin Araştırılması .Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans. İstanbul, 2019**

İnfertilite, en az bir yıl boyunca korunmasız ilişkiye rağmen, hamile kalmanın imkansızlığı olarak tanımlanır. İnfertilite, hem implantasyon başarısızlıklarına hem de tekrarlayan düşüklere meydana getirebilmektedir. Uremeye yardımcı tedaviler bu infertil hastalara bir umut teşkil etmektedir. In vitro fertilizasyon (IVF) sikluslarından önce, yumurtalık rezervinin değerlendirilmesi ve kadınların üreme potansiyeli hakkında foliküler bazda da incelenerek, doktor hastanın spesifik infertilite tedavisine karar vermesi konusunda yardımcı olur.

Günümüze kadar, stimülasyon sonrası elde edilen oositlerin sayısını ve kalitesini araştırmak için bir çok çalışma yapılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, inhibin b gen polimorfizimleri ve serum FSH seviyelerinin korelasyonunu araştırmıştır.

Yaptığımız bu çalışmada, İnhibin B INHIBIN  $\beta$  (INHBB) rs57802235 polimorfizmi ve serum FSH seviyelerinin oosit maturasyonu üstündeki etkisini ilk kez Türk toplumunda araştırdık. Rastgele seçilen infertile hastalarda INHBB geninde %96 (50 hastada) doğal tip olan G/G alleleri gözlemlenmiştir. Heterozigot mutant allel A/G %4 saptanmıştır. Mutant allel sadece %2 olarak gözlemlenmiştir. Yaptığımız bu çalışmalar, ileriki çalışmalara ışık tutmakta ve hasta sayısı artırılarak projenin devam edilmesi planlanmaktadır.

**Anahtar kelimeler :** Aktivin, İNHBB, Polimorfizm, Tüp Bebek,

## ABSTRACT

**Aslan, H. Investigation of IVF treatment of Inhibin Polyomorphism .Yeditepe University Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine, Master's Degree. Istanbul, 2019.**

Couples are considered to be infertile when they cannot become pregnant within one year of unprotected sex. Infertility can result in implantation failures and miscarriages. Assisted reproduction technologies (ART) are one of the options that can be applied to these patients. Prior to in vitro fertilisation (IVF) cycles, the ovarian reserve of the women and the number of follicles should be assessed. The gynecologist then can decide on the optimum stimulation cycle.

Several studies have been conducted to determine the number and quality of the oocytes that can be obtained from the women following the stimulation. Recent studies have proposed that serum inhibin B levels can be a good marker to determine the development of mature oocytes as well as the pregnancy rates.

In this project, we aimed to investigate the possible correlation between INHIBIN  $\beta$  B (INHBB) gene rs57802235 polymorphism and the serum FSH level as well as the mature oocytes in the Turkish population. Infertile patients were selected randomly and 96% of these patients had G/G wild type alleles. The heterozygote mutant allele A/G was observed in 4% of the patients. Mutant allele was only observed in 2% of the patients. This project will be based on the future projects and further studies will be pe

**Key words :** Activin, In vitro fertilization, INHBB, Polymorphism

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, en az bir yıl boyunca (ya da belirli koşullar altında altı ay süreyle) sıklıkla korunmasız ilişkiye girmesine rağmen, hamile kalmanın imkansızlığı olarak tanımlanır. İnfertilite, bir kadının hamileliğini tam zamanına kadar sürdürememesi durumu olarak da gösterilebilir. (düşük yapma ile sonuçlanır). (1)

Bir in vitro fertilizasyon (IVF) programına girmeden önce, yumurtalık rezervinin değerlendirilmesi, kadınların üreme potansiyeli hakkında foliküler tükenme ve oosit kalitesi de dahil olmak üzere bilgi verir ve doktorun hastanın optimal infertilite tedavisine karar vermesine izin verebilir. (2,3)

İn vitro fertilizasyon (IVF) siklusları geçiren kadınlarda adet döngüsünün çeşitli günlerinde foliküler sıvı ve serum inhibitin-B seviyelerini karşılaştırılması, yumurtalık yanıtı ve gebelik ile korelasyonlarını saptamayı amaçlamaktadır. Folliküler Sıvı veya serum İnhibin-B Seviyesi; IVF Hastalarındaki Folliküler Gelişimini Saptamada Daha Etkili Bir Belirteçtir. (4)

İn vitro fertilizasyon (IVF) tedavisi planlanan hastaların farklı günlere takabul eden menstrüel sikluslarının folliküler sıvı ve serum inhibitin-B seviyelerini tespit ederek, bu parametrelerin over cevabı ve gebelikle ilişkilerini ortaya koymayı amaçlandı. (4)

İnhibin B, tek başına FSH tarafından uyarılmaz, ancak IGF-I(insulin benzer büyüme faktörü) varlığında FSH tarafından uyarılır. Aksine, inhibitin A, preantral folliküller tarafından salgılanmaz. FSH, küçük antral folliküllerinden inhibitin A salgısını uyarır ve inhibitin A sekresyonu, IGF-I varlığında FSH stimülasyonu tarafından tercih edilir. Böylece FSH ve büyüme faktörleri tarafından hem folikül gelişimi hem de düzenlenmesi aşaması inhibitin B ve inhibitin A'nın diferansiyel ayarlanmasına katkıda bulunur. (5)

Bu çalışmada bizim amacımız,Primer İnfertilite tanısı konulan ve IVF tedavisi gören hastalarda, İnhibin proteininin A ve B alt ünitesini kodlayan INHB A ve INHB B gen polimorfizmlerinin serum FSH ve matür oosit miktarı ile ilişkisinin araştırılarak inhibitin gen polimorfizmlerinin Türk popülasyonunda tüp bebek tedavisine yanıtta rol oynayıp oynamadığının incelenmesidir.

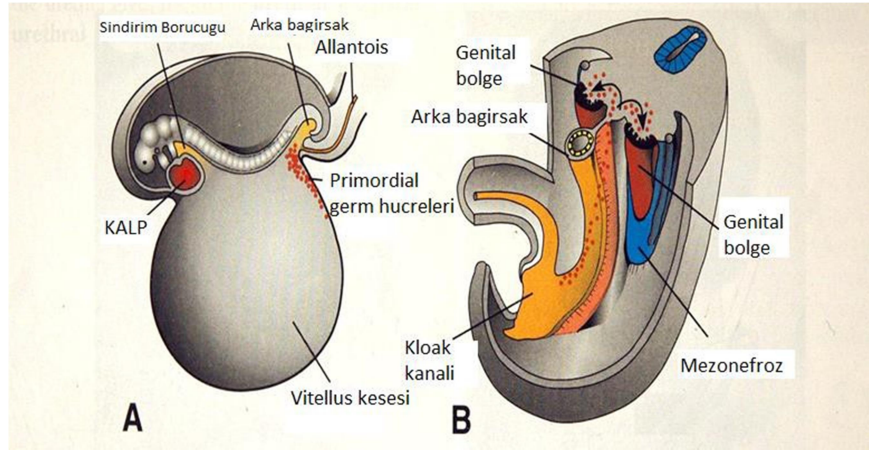
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnsan gametogenezi ve fertilizasyon

#### 2.1.1. Embriyonik gelişim

Primordial germ hücreleri, insan embriolarının gelişiminin dördüncü haftasında yolk kesesinin endoderminde görülmeye başlanır. Altıncı haftaya gelince, buradan genital bölgelere göç eden bu hücreler, primitif gonadlarla burada ilişki kurmaya başlar. Böylelikle testis veya over halini alma duruma gelirler.

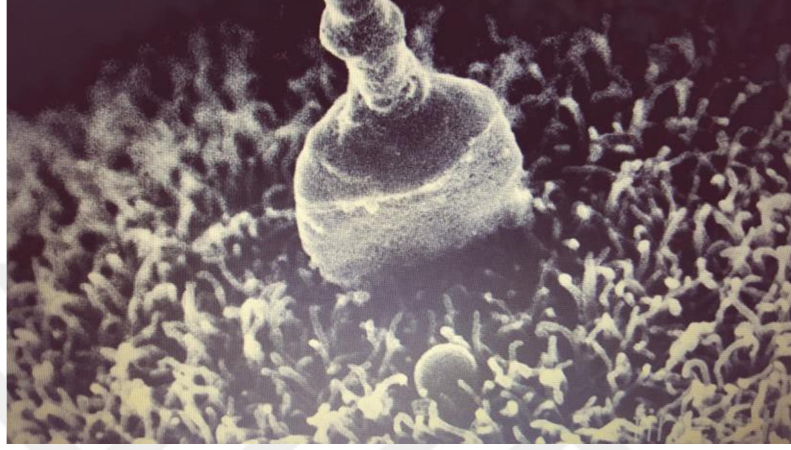
Seks kromozomlarına bağlı olarak testis ya da overe farklılaşan germ hücreleri, bu organlarda kalmaya devam ederler. Hem spermatogenez hem de oogenez mayoz bölünmeyle gerçekleşen olaylardır fakat detaylardaki ve zamanlamadaki farklılıklar yavrularda önemli klinik ve genetik sonuçlar doğurabilir. Dişilerde mayoz, fetal yaşamın başında bir kez başlatılır ve az sayıda germ hücresi mayoz girer. Buna karşın erkeklerde mayoz süreklilik arz eder ve erkeğin hayatı boyunca çok fazla germ hücresi mayoz bölünmeye girebilir. (6)



Şekil 2-1 : Embriyoda dördüncü haftadan sonra germ hücrelerinin hareketi. (7)

### 2.1.2. Sperm Oosit Etkileşimi:

Yumurtanın fertilizasyonu genelde ovulasyon anında yada takip eden 24 saat içerisinde fallop tüplerinde gerçekleşir. Spermin üzerinde bulunan bir dimerik glikoprotein olan fertilin oosit plazma membranı üzerindeki bir protein ile bağlanır ve sperm oosit birleşmesini indükleyebilir. (8)



Şekil 2-2 : Sperm yumurta birleşmesi. (9)

### 2.1.3. Sperm Aktivasyonu ve kapasitasyonu

Erkek gamet, bir oositin başarıyla döllenmesinde gerekli olan adımları başlatmadan önce, sperm hücresi kendiliğinden aktifleştirilmelidir; bu davranışsal, fizyolojik ve yapısal değişiklikler içeren bir süreçtir.

Söz konusu bu adımları, motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyon, ZP penetrasyonu, oolemma bağlanma ve membran füzyonundaki değişikliklerdir. (10)

Spermatozoa ejakulasyon sonrası hemen döleme yeteneğine sahip değildir. Dişi genital kanalında belli bir zaman periyodundan sonra fertilizasyon kapasitesini (kapasitasyon) yapma kapasitesini geliştirir, Kapasitasyon sırasında, spermelere "yumurta hücresine" bağlanmak ve nüfuz etmek için "kapasite" kazandıran bir dizi değişiklik yapılır. Bu değişiklikler, membran akışkanlığı, kolesterol sızıntısı, sperm membran potansiyelini değiştiren iyon akımını, proteinlerin tirozin fosforilasyonunun artması, hiperaktif motilite indüksiyonu ve akrozom reaksiyonunu içerir. (11)



Bu olayları, cAMP, protein kinaz A, reseptör tirozinkinazları ve reseptör olmayan tirozinkinazları içeren hücreiçi sinyal yollarının aktive edilmesiyle düzenlenir. Bir dizi farklı molekül, kalsiyum, bikarbonat, reaktif oksijen türleri, progesteron, anjiyotensin ve sitokinler gibi birtakım moleküller bu olayların olmasına destekleyen faktörlerdir. (11)

#### **2.1.4. Akrozom reaksiyonu**

Akrozom, sperm kafasının ön kısmını kapsayan membrana bağlı bir başlık; Hyaluronidaz, akrosin, proakrosin, fosfataz, arilsülfataz, kollajenaz, fosfolipaz C ve  $\beta$ -galaktosidaz gibi geniş bir hidrolitik enzim dizisi içerir. Akrozom, erken spermatidin Golgi sisteminde, küçük vezikülleri bir araya getiren etrafında konsantrik olarak düzenlenmiş membranlar serisinden kaynaklanır. Ancak  $Ca^{+2}$  mevcut olduğu durumlarda akrozom reaksiyonu gerçekleşebilir. (12) Akrozom reaksiyonu sadece  $Ca^{+2}$  mevcut olduğunda oluşur. Kalsiyumun akışı akrozom zarının füzyonuna ve akrozom içeriğinin egzositozuna neden olur. Eksikositozaya yol açan olayların sırası, aşağıdakileri içererek, potansiyel ikinci işaret mekanizmasını içermektedir.

Hücre içi kalsiyumdaki değişiklikler

- cAMP ve fosfokinaz A'nın aktivasyonu

Fosfatidik asidi oluşturan Fosfolipaz D. (12)

#### **2.1.5. Oosit aktivasyonu**

##### **2.1.5.1. Zona pellusuida(zp)**

Zona pellusida, büyüyen oosit tarafından salgılanan, farklı kalınlıktaki glikoproteinlerden oluşan, oosit ve gelişimini sürdüren embriyo etrafında koruyucu bir tabaka sağlayan tabakadır. (13)

Bir yumurta eger Zona pellusidası yönünden eksik ise bu tür yumurtalara sahip dişiler infertildirler.Yumurtanın fertilizasyonunda yumurtada bulunan zona pellusuidanın fonksiyonları; üzerinde bulunan glikoproteinler tarafından gerçekleştirilir. (14) Bu glikoproteinler, glikolizasyon ve sülfatasyonu kapsayan yoğun post-translasyonel modifikasyonlara bağlı olarak heterojenite gösteren ZP1, ZP2 ve ZP3'tür. (15)

Bu glikoproteinler sperm reseptörü olarak fonksiyon görürler. ZP3 molekülünün sperm reseptörü olarak fonksiyon görmesi fertilizasyon olayının birinci basamağında anahtar rol oynar. (16)

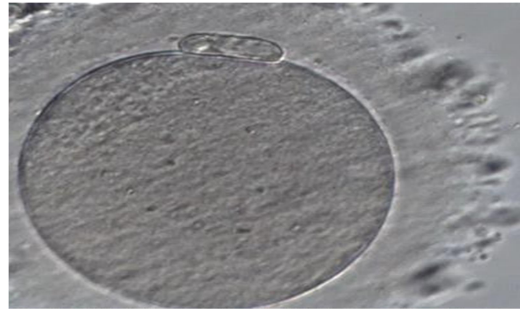
### 2.1.6. Sperm Oosit Birleşmesi

Gametler arasındaki zar füzyon işlemi, sıcaklık, pH ve  $Ca^{2+}$  bağlıdır ve iki membranın birbirine yakın olması gerekir. Füzyon, membrana bağlı proteinler tarafından aracılık edildiği veya kolaylaştırılmış gibi görünse de, glikoproteinlerin terminal sakaritleri doğrudan işlemde yer almaz. Zonanın penetrasyonu sırasında, spermatozoon akrosomal içeriğini kaybeder ve sadece iç akrosomal zar zona ile doğrudan temas halindedir. Oosit zarının yüzeyi, gamete füzyonunu kolaylaştırmak için eşit aralıklarla yerleştirilen kısa mikrovillilerde oluşur; Bu mikrovilliler, karşıt elektrostatik yüklerin üstesinden gelmeye yardımcı olabilecek küçük eğimli yarıçapına sahiptir. (12)

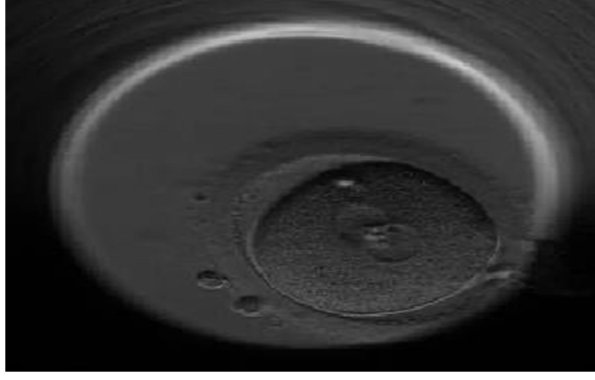
Ortamda birden fazla sperm olma ihtimalinin yüksek olmasına karşın, ovuma giren bir tek sperm, diğer spermelerin ovuma girmesini engelleyen bir seri biyokimyasal değişikliklere sebep olur.

### 2.1.7 Zigot Oluşumu

Fertilizasyon gerçekleşir gerçekleşmez mayoz 2 de bölünme devam eder ve ikinci polar cisim oluşur. Bu oluşan yapıya pronükleus'u oluşturur ve zigot adını alır. Bu aşamadan sonra zigot mitoz bölünmeyle büyür. (17) 3. gününde 8 hücreli halini alır (şekil 2-5) ve embriyonik gelişimin 5.gününde de blastosit aşamasına ulaşır (şekil k). (6)



**Şekil 2-3:** Metafaz 2 aşamasında döllenmeye hazır yumurta(18).



**Şekil 2-4:** Normal fertilizasyon (Döllenme) gerçekleşmiş yumurta. (19)



**Şekil 2-5:** Döllenme işleminden 3 gün sonra 8 hücreli embriyo. (20)



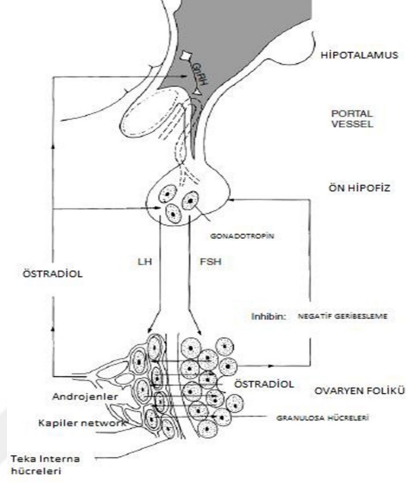
**Şekil 2-6:** Döllenme işleminden 5 gün sonra blastosit aşamasında embriyo.(21)

## **2.2.Reprodaktif Endokrinoloji**

### **2.2.1. Dişi Reprodaktif Endokrinolojisi**

Dişi reprodaktif sistemini birbirleriyle birlikte görev yapan hormonlar, overler, hipotalamus ve ön hipofiz bezi oluşturur. Hipotalamus, küçük bir peptid olan gonadotropini serbest bırakan hormonu (GnRH) salgılar, Bu hormon luteinizan

hormonunu (LH) ve follikül stimüle edici hormon (FSH) i kontrol altına alır ve düzenler. LH ve FSH de ön hipofiz bezlerinden salgılanırlar. Tüm bu hormonlar, 1 ile 4 saat arasında küçük miktarlarda salgılanırlar ve ovülasyonu destekleyip, dişi seks hormonları olan östrojen ve progesteron hormonlarının salgılanmasını stimüle ederler. (22)

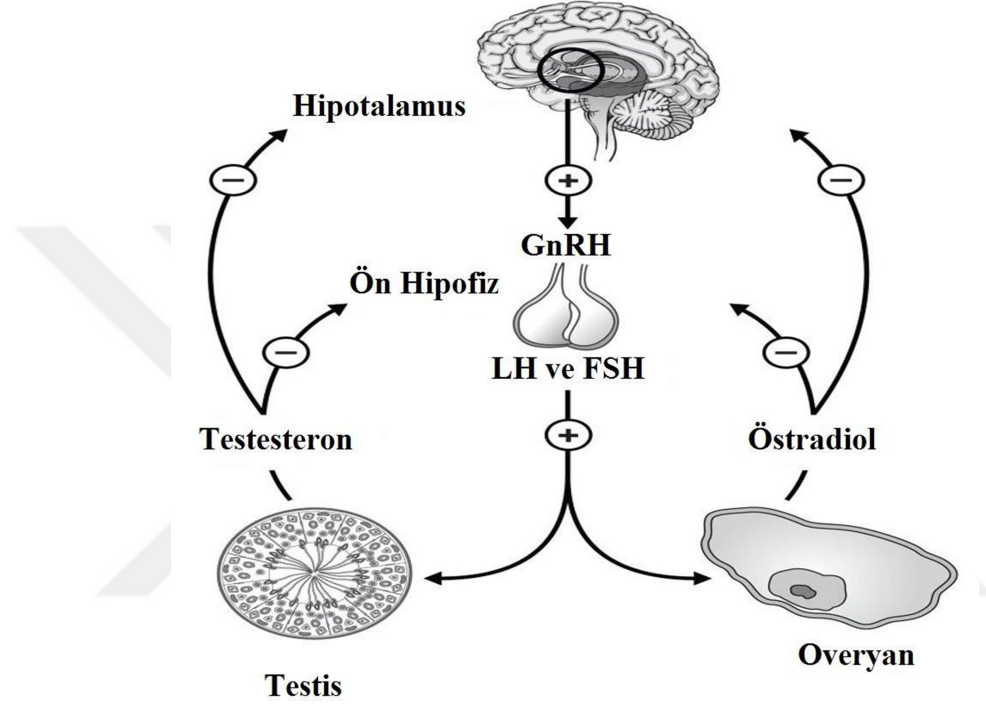


**Şekil 2-7:** Üremenin endokrin kontrol şeması. (23)

Östrojen ve progesteron hormonları kanda proteinlere bağlı olarak hareket etselerde aktif durumda değildirler. Sadece proteinlere bağlı olmayan progesteron ve östrojenin aktivitesi gözlemlenmiştir. Dişi üreme organları olan göğüs, vajina ve rahmi stimüle eden bu hormonlar, ovülasyon haricinde gonadotropin salgılanmasını inhibe ederler. (22)

Doğum sırasında kandaki LH ve FSH seviyeleri yüksekken daha sonra bu seviyeler ergenliğe kadar çok düşüktür. Ergenliğe girişi tetikleyen sebepler tam olarak kesin olmasa da, çocuklukta GnRH'nin inhibe edildiği, ergenliğe girişte salgılanmasının tekrar başladığı bilinmektedir. Ergenliğin başında GnRH östrojen ve progesterona karşı daha az duyarlıdır. Böylelikle, GnRH seviyeleri artar ve domino etkisi göstererek LH ve FSH salgılanmasına yol açar ki bu iki hormonda dişi seks hormonlarını, özellikle de östrojeni uyarır. Östrojen, bu dönemde ikincil seksüel karakteristiklerin gelişimini stimüle eder. Kasık ve koltuk altı kıllarının çoğalması bir başka hormon olan DHEA tarafından uyarılır. (22)

Kadınlar, ergenlikle beraber menapoza kadar menstural döngüye girerler. Menstrasyon, vajinadan, endometriyumunun periyodik olarak yıkılmasıyla rahimden gelen kanın dışarı atılmasıdır. Bu olay, hamilelik olmadığı durumlarda östrojen ve progesteronun ovülasyonu takiben ani bir şekilde düşüşe geçmesiyle gerçekleşir. (Şekil 2-9) Menstrual döngü overin durumuna göre fazlara ayrılır. Over foliküler, ovülatuar ve luteal fazlarından geçer ve menstural döngüyü tamamlar. (22)



**Sekil 2-8 :** Beyin – Üreme organları Hormonal aks (24).

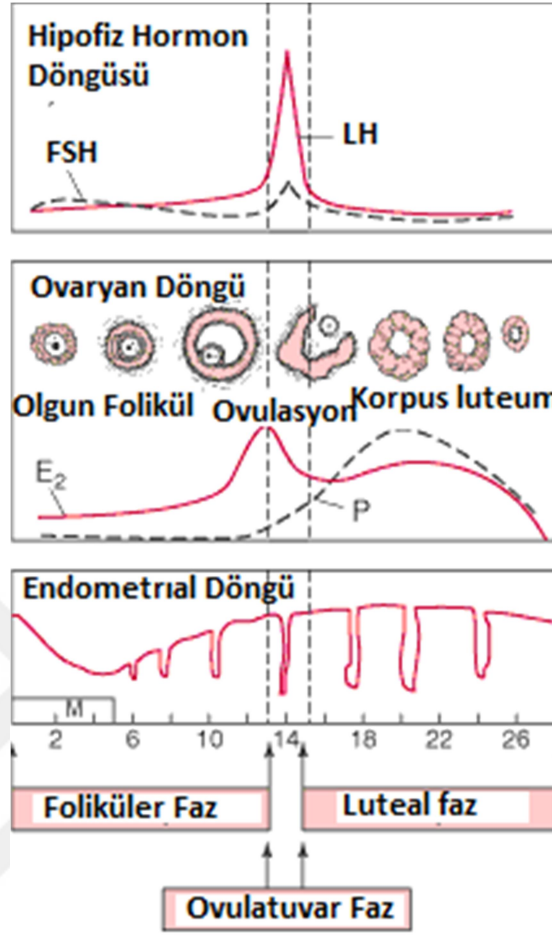
Foliküler faz süre açısından diğer fazlardan farklılık gösterir. Bu fazın ilk yarısında foliküller gelişir, ön hipofizdeki gonadotropinlerde düşük seviyede LH ve FSH vardır. Östrojen ve progesteron seviyeleri de diğer fazlara göre düşüktür. Bundan dolayı genel FSH seviyesi biraz artar ve foliküllerin büyümesi tetiklenir. FSH artışından 1-2 gün sonra kandaki LH seviyesi de artmaya başlar böylece over folikülleri estradiol üretmeye başlar. Estradiol LH ve FSH üretiminin artırmasına rağmen LH ve FSH salgılanmasını inhibe ederek kandaki LH ve FSH seviyelerini belirli sınırlar içinde kalmasını sağlar. (25) Foliküler fazın ikinci bölümünde overde seçilen folikül olgunlaşır ve hormon salgılayan granuloza hücrelerinin sayısı artar. Bu sırada FSH seviyesi düşer fakat LH seviyesi fazla etkilenmez.

Bunun sebebi estradiolun FSH'yi LH den daha fazla etkilemesidir. Buna ek olarak gelişen foliküller inhibin adı verilen bir hormon salgılar ve inhibin de FSH'nin baskılanmasında ve seviyesinin düşmesinde etkin rol oynar. İnhibin FSH seviyesini düşürürken LH seviyesine etkisi görülmemiştir, bu yüzden foliküler fazın bu bölümünde LH seviyesi daha yüksek kalır. (25)

Foliküler fazdan sonra olan ovülatuar fazda progesteron artar ve saklanmış olan LH serbest bırakılarak ani bir LH yükselmesi yaşanır. Bu dönemde FSH de ani şekilde yükselir ve düşer. Bu faz 36-48 saat sürdüğünden dolayı hormon seviyeleri çok çabuk bir şekilde eski hallerine döner. (26) Overden geçtikten sonra dominant folikül corpus luteum halini alır. Bu faz neredeyse her zaman 14 gün sürer ve hamilelik olmadığı durumlarda corpus luteum dejenere olarak vücuttan atılır. Corpus luteum periyodik olarak progesteronu yavaş yavaş artırır. Yüksek dozlardaki progesteron embriyonik implantasyonu sağlayabilmek için hormon salgıyabilen endometriyumun gelişimini stimüle eder. Progesteron termogenik olduğundan basal metabolik hızı bu dönemde 0.5 derece yükselir. Kandaki estradiol, progesteron ve inhibin seviyeleri, bu dönemde yüksek seyrettiğinden, LH ve FSH düşüş içerisindeydir. Hamiliğin olmadığı durumlarda progesteron ve estradiol bu fazın son bölümünden ani düşerek corpus luteumu corpus albicans'a dönüşmesini tetiklerler. (26).

**Tablo 2-1:** Kadın Üreme Sisteminde rol alan hormonlar ve görevleri

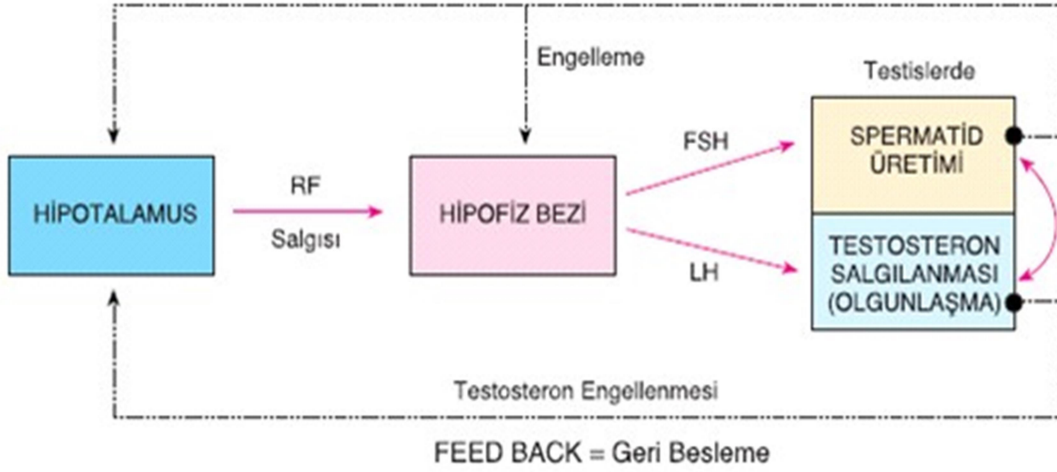
<b>KADIN ÜREME SÜRECİNDE ÖNEMİ OLAN HORMONLAR</b>		
<b>Hormon</b>	<b>Kaynak</b>	<b>Görevi</b>
GnRH	Hipotalamus	Ön hipofiz bezini uyararak FSH ve LH salgılanmasını sağlar.
FSH	Ön hipofiz	Yumurtalıkları uyararak olgunlaşmış foliküllerin gelişmesinde rol oynar, bu foliküller yüksek miktarda östrojen salgılanmasına neden olur.
LH	Ön hipofiz	Folikülden yumurtanın salınmasını sağlar. Folikül daha sonra korpus luteuma dönüşerek progesteron salgılar.
Östrojen	Yumurtalık (folikül)	Uterusun endometriyumunun onarımını uyarır.
Progesteron	Yumurtalık (korpus luteum)	Uterusun kalınlaşmasını sağlar.
Prolaktin	Ön hipofiz	Doğumdan sonraki süt üretimini sağlar.
Oksitosin	Arka hipofiz	Sütün akmasını sağlar.
Andojen	Adrenal bezleri	Cinsel dürtüyü uyarır.
Hcg	Embriyo	Progesteron üretimini uyarır.



**Şekil 2-9:** Normal menstural döngüde, hipofiz gonadatropinleri, östrojen hormon türevi E<sub>2</sub>, progesteron ve endometriyumdaki döngüsel değişiklikler. (27)

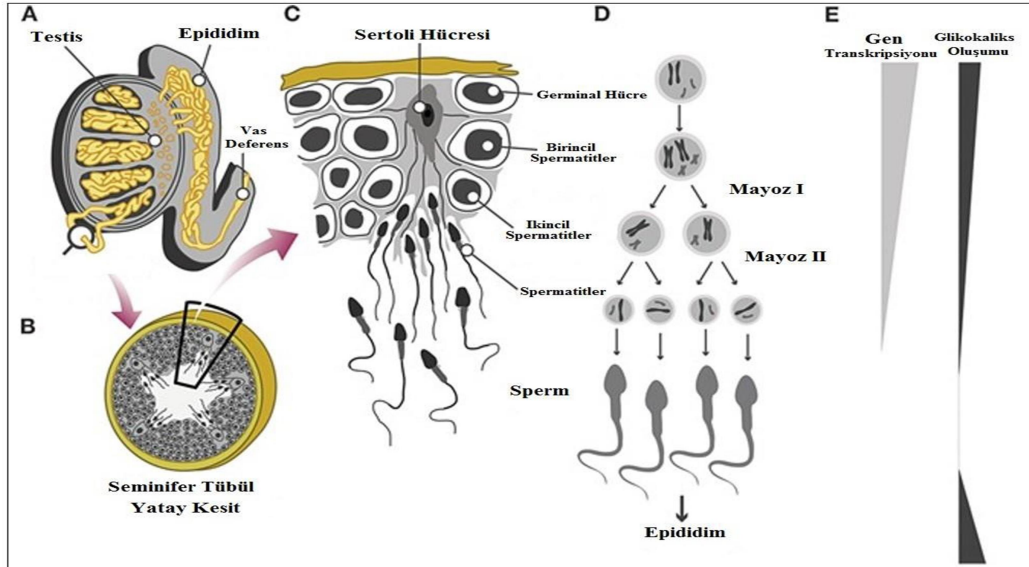
### 2.2.2. Erkek Üreme Endokrinolojisi

Erkeklerdeki üreme endokrinolojisi kadınlara göre daha basittir fakat erkeklerdeki infertilite oranı bunun tam tersini göstermektedir. Erkek embriyo SRY geni sayesinde hamileliğin 9. Haftasında gonadları geliştirmeye başlar. Ön hipotalamustan salgılanan GnRH testiküler fonksiyonları kontrol eder. GnRH aynı zamanda ön hipofizden salgılanan LH ve FSH hormonlarının üretimi ve salgılanmasını da kontrol eder. LH ve FSH kan dolaşımına ani patlamalarla verilir ve bu da Leydig ve Sertoli hücrelerindeki reseptörleri aktive ederek testosteron salgılanması ve spermatogenezi tetikler. Bu sistem, testiküler steroidler ve inhibitörler tarafından sıkı şekilde kontrol edilir ve negatif geri besleme ile sürdürülür. (28)



**Sekil 2-10:** Erkek ureme sistemi Hormonal aks.

LH, testesteron sentezlenmesini Leydig hücrelerinde bulunan G-protein ilişkili, transmembran domaini olan bir reseptör aracılığıyla gerçekleştirir. Testesteron seviyeleri kişiler arasında değişse de, testisler alındığında testesteron seviyeleri dramatik bir şekilde %95 oranında düşer. Geriye kalan testesteron ise adrenal cortex den salgılanır. (28)



**Sekil 2-11:** Sperm Üretimi (Spermatogenez)(29).



Memelilerde spermatogenez;

A) Spermatogenez testislerin içinde bulunan seminifer tubullerde baslar.  
B) Primordial germ hücreleri (spermatogonyalar); primer ,sekonder,spermatid ,spermatozoid ve spermatozooya dönüşür. C) Sertoli hücreleri spermatogenez için gerekli koşulları sağlar. D) Mayoz 1 ve Mayoz 2 şeması. E) C ve D şıklarındaki gelişmelere paralel olarak sperm maturasyon zamanındaki gen transkripsiyon miktarı ve oluşan glikokaliks formasyon değişimini göstermektedir.

Erkeklerde aynı zamanda kadınlardan daha düşük olmasına rağmen östrojen de bulunur. Erkeklerde bulunan östrojen genelde adipoz, deri, düz kas hücreleri, beyin böbrek ve iskelet kas hücrelerinden salgılanır. Östrojen, testesteron üretimini, dolayısıyla spermatogenez baskılar. Bunu, GnRH salgılanmasını ve GnRH'ye verilebilecek olan tepkileri azaltarak başarır. (28)

Erkeklerde testesteron seviyelerinin 3 belirli artış zamanı vardır. Bunlardan ilki hamileliğin 12-14 üncü haftalarında Leydig hücrelerinin fetal diferansiyasyonu sırasında olur. İkinci testesteron yükselmesi doğumdan 2 ay sonra Leydig hücrelerinin yeniden çoğalmaya başlamasıyla gerçekleşir. Sonuncusu ise Leydig hücrelerinin ergenlik diferansiyasyonu sırasında 12-13 yaşında tamamlanacak şekilde gerçekleşir. Testesteron üretildikten sonra kana karışır ve orada bir dizi proteinle etkileşime girer. İnsanlarda testesteronun %95 'i bir protein kompleksi ile birlikte bula rağmen biyolojik olarak aktif olan testesteron ise özgür testesterondur. (28)

Özgür testesteron spermatogenez tetikler. Spermatogenez, spermatogonia'dan yüksek miktarlarda spermatozoa üretmek olarak basitleştirilebilir. Testesteron, spermatogenez de etkin olan tek hormon değildir, Tüm sistemde olduğu gibi, LH, FSH, inhibin ve diğer steroidlerle beraber çalışır. (28)

### 2.3. AKTİVİN

Aktivin ve inhibin, biyolojik etkilerin hemen hemen tam tersine yakın iki protein kompleksidir. (30) Aktivin, FSH biyosentezini ve salgılanmasını artırır ve menstruasyon döngüsünün düzenlenmesine katılır. (31) Aktive edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Transforming growth factor) süper ailesinin üyeleri olan aktivin ve inhibin, canlı organizmalar arasında büyüme ve gelişme sırasında birçok aşamada çeşitli ve yaygın etkilere sahiptir. FSH sekresyonunun etkilerine dayanan bu büyüme faktörlerinin

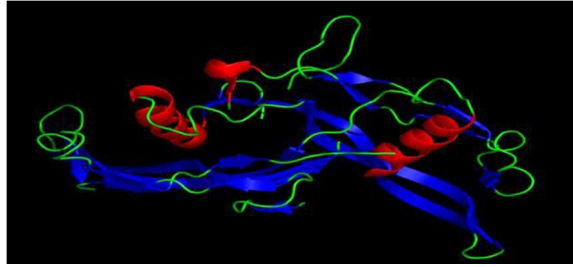
ilk izolasyonundan itibaren, bu faktörlerin yanı sıra aktivin-bağlayıcı protein follistatin'in çalışması inhibin  $\alpha$  altbirimi, Aktivin  $\beta$ A ve  $\beta$ B altbirimleri ve çeşitli organizmaların dokularındaki aktivin reseptörleri, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında otokrin ve parakrin ajanlar olarak aktivin ve inhibisyonun incelenmesine yöneliktir. Hücrelerin büyümesi ve farklılaşması üzerindeki inhibisyon etkileri, hücrelerin aktivin ile tedavisi üzerine gözlemlendiğinde, bu molekülün biyoaktivitesinin daha iyi anlaşılması ve moleküler düzeyde karakterizasyonu, hücre büyümesi ve farklılaşmasının daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olabilir. (32)

## 2.4. İNHİBİN

İnhibinler Hipofiz FSH salınımını kontrol etmeye yardım eden multifaktöryel moleküllerdir. Genel kanı FSH hormonu seviyesine göre hipofiz bezlerine negatif geri besleme (negative feedback) yoluyla fizyolojik etkide bulunur. Bunlara ek olarak, hem erkeklerde hem de kadınlarda, üreme endokrinolojisi ve üreme sistematığı konularıyla da ilgili oldukları gösterilmiştir. (33)

### 2.4.1. İnhibin yapısı ve reseptörleri

İnhibin B overlerdeki granüloza ve teka hücreleri ve testislerdeki sertoli hücreleri tarafından yapılan glikoproteinlerdir.



**Sekil 2-12:** İnhibin B dimerik yapısı. (34)

Kan dolaşımında yaygın olarak 2 farklı formda bulunurlar. Bunlardan biri inhibin A diğeri inhibin B dir. İki formu da heterodimerdir. İnhibin A  $\alpha$  ve  $\beta$ A altbirimlerinden, inhibin B ise  $\alpha$  ve  $\beta$ B altbirimlerinden oluşur. (35)

$\beta$ A ve  $\beta$ B altbirimlerinden oluşan aktivinler, aktivin tip 1 ve aktivin tip 2 reseptörlerine, ekstrasellüler domainlere bağlanırlar. İnhibinler de bu reseptörlere

bağlanarak aktivinlerin bağlanmamasını sağlar. Bununla birlikte, inhibinlerde co-reseptör olarak görev yapan betaglikanlar da bulunur. Betaglikanlar, inhibin  $\alpha$  altbirine bağlanır ve ortamdaki müsaitlik derecesini düşürür. Böylelikle heterodimer oranı , dimer oranına göre düşük kalır ve  $\beta$  dimerleri aktivin reseptörlerine bağlanarak aktivinlerin bağlanmasını engeller (36).

#### **2.4.2. İnhibin A ve İnhibin B**

İnhibinler (inhibin A, B, total inhibitör) kadın üremesinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. İnhibin A, yumurtalıklarda, böbrek üstü bezinde kemik iliği, plasenta ve fetal membranlarda üretilir. Bu peptid doğumda ana rol oynamaktadır. İnhibin B, çoğunlukla yumurtalıklarda salgılanır ve fonksiyonu jinekolojiye odaklanır. Uygulamada serum total inhibin seviyelerinin değerlendirilmesi polikistik over sendromu ve over tümörleri açısından önemlidir. Mevcut bilgilere göre inhibin A, ektopik gebelik, pre-eklampsi ve Down sendromuyla ilişkili gebelik tanısında kullanılabilir. Reprodaktif endokrinolojinin klinik pratikte inhibinlerinin kullanımını netleştirmek için ileri çalışmalara gereksinim vardır. (37)

#### **2.4.3. Hipofize inhibin etkisi**

İnhibinler keşfedilmeden on yıl önce, Keogh ve arkadaşları, testislerden elde edilen sıvıların FSH salınımını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bundan dolayı, hipofizde etki ederek FSH nin negatif geri besleme yoluyla kontrol altına alınması işlemi inhibinlerin birincil fizyolojik görevi olarak tanımlanmıştır. Buna karşılık yapılan hayvan deneylerinde de gösterildiği üzere, inhibinler FSH yi inhibe ederken LH üzerinde herhangi bir etkide bulunmamaktadırlar. (38, 39)

#### **2.4.4. Overde İnhibin B**

Daha önce bahsedildiği üzere, inhibin B overde teka ve granüloza hücrelerinde bulunur. Menstrual döngü sırasında seviyesi ve ifade edildiği hücreler değişse de, testislerle karşılaştırıldığında çok düşük seviyede kalır. İnhibinlerin overde salgılanması aslında bir steroid üretimi habercisi olarak görülebilir. Üreme regülasyonu karmaşık hormonal sistemle gerçekleştirilir: hipotalamus - pitüiter - yumurtalık. Bu sistemin düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir sürü yumurtalık peptidi vardır. Bununla birlikte, hareket mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. İnhibinler, çoğunlukla

yumurtalıklarda üretilen glikoproteinlerdir ve menstruasyon döngüsünün düzenlenmesine katılırlar. Alfa altbirimi ve iki beta altbiriminden biri olan inhibin A ve inhibin B'den oluşurlar. Üreme tıbbında inhibinlerin olası kullanımı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Son yıllardaki veriler obstetrikte inhibitör A'nın rolünü göstermektedir. İnhibin B'nin ölçümü, yumurtalık rezervi hakkında yararlı bilgiler sağlayabilir ve yardımcı üreme tekniklerinde önemli bir rol oynamaktadır. İnhibin B, hipotalamik bozukluklarda prematür over yetmezliği (POF) ve over iyileşmesinin potansiyel belirteçleri olarak da görülebilir. Hem inhibin A hem de inhibitör B, Turner sendromlu hastada over işlevinin değerlendirilmesinde faydalı bir rol oynayabilir. Polikistik over sendromu (PCOS) ve over tümörleri olan hastaların teşhisinde kan serumundaki toplam inhibitör düzeyinin belirlenmesi avantajlı görünmektedir. Reprodaktif endokrinolojinin klinik pratikte inhibinlerinin kullanımını netleştirmek için ileri çalışmalara gereksinim vardır. (40)

#### **2.4.5. Kanda İnhibin Seviyelerindeki Değişiklikler**

Postnatal gonadotropin salgılanmasıyla bağlantılı, inhibin B ve inhibin A salgılanması 18-24 aya kadar aynı seviyede devam eder. Serum inhibin B seviyesi, bu raddeden sonra, ergenliğin başına kadar artar. Bu olay aslında ergenlik öncesi foliküler artışı işaret eder. İnhibin, bir betaA altbirimine (inhibin A) veya bir betaB altbirimine (inhibin B) bağlı bir alfa-altbirimden oluşan heterodimerik bir glikoproteindir ve en az altı farklı izoformda bulunur. Bu izoformlar, immünoassay ile ayrı ayrı ölçülemez. Erkeklerde, gonadotropinlerin artışı ile eşzamanlı olarak serum inhibin B seviyeleri değişir. Gonadotropin sekresyonunun postnatal aktivasyonu ile bağlantılı olarak, erken inhibin B salınımı, 18-24 aylık yaşlara kadar sürdürülür; Bundan sonra serum konsantrasyonları düşer. İnhin erkeklerinde İnhibin A seviyeleri tespit sınırının altındadır, ancak kızlarda gonadotropin sekresyonunun postnatal aktivasyonu sırasında hem serum inhibin A hem de inhibin B konsantrasyonları ölçülebilirdir. Serum inhibin B seviyeleri pubertenin klinik başlangıcından birkaç yıl önce pozitif yönde korelasyon gösterir ve prepuberte sonrasındaki foliküler aktivitenin arttığını gösterir. (41)

Erkeklerde ise durum biraz daha farklıdır. İnsan testislerinde inhibinin 2 altbirimi de Sertoli ve Leydig hücrelerinde bulunmasına rağmen,  $\alpha$  altbirimi gonositlerde,  $\beta$  altbirimi ise Leydig hücrelerinde ifade edilir (42,43).

Sertoli hücreleri ergenlikten önce, inhibin B üretimi için gerekli olan, hem  $\alpha$  hem de  $\beta_B$  altbirimlerini üretmeye başlar. Bu yüzden sadece sertoli hücresi bulunan erkeklerde ergenlik öncesi inhibin B seviyeleri normaldir. Hamileliğin 14-16'ncı haftalarında elde edilen erkek fetal serumlarında hem inhibin A hem de inhibin B bulunmaktadır. Bu fetüslerde, inhibin B seviyesi mid-trimesterde direk olarak testesteronla koroledir. (44)

Aynı zamanda da, inhibin seviyesi ile FSH seviyesi bu dönemlerde ters bir korelasyon göstermektedir. Bu da fetal hayatta dahi, inhibin B'nin, hipofiz-testiküler bağlamında FSH yi negatif regüle ettiğini göstermektedir. Doğumdan sonra inhibin seviyesi serumda algılanabilir seviyededir. Yenidoğanlarda, serum inhibin B seviyesi erkeklerde kızlara göre daha yüksektir ve testiküler üretimi işaret eder. Fakat bu dönemde FSH ile herhangi bir korelasyonu bulunmaz. (45) Fakat 3. Veya 4. Aylarda en yüksek noktaya çıkan, FSH üretimine bağlı olarak ani bir yükseliş trendi görülür. Bu yükseliş, yerini çok ani şekilde gerçekleşen bir düşüşe bırakır. Bu ani düşüş sonrası inhibin B seviyesi kanda algılanabilir seviyede olmasına rağmen çok düşüktür. Ergenliğe gelindiğinde ise inhibin B seviyesi yükselir. En çok yükselme Tanner G1 ve Tanner G2 seviyelerinde olur. Bunun sebebi testesteron ve LH yükselmesidir. (46) Menstrual döngü sırasında kadınlarda inhibin B seviyesi, FSH seviyesine oranla serumda değişiklik gösterir. Foliküler fazda inhibin B salgılanır. Erken foliküler fazda ani bir yükseliş, FSH yükselmesiyle doruğa ulaşır ve döngünün geri kalanında progresif bir düşüş yaşanır. Aynı zamanda inhibin B seviyesi LH hormonu salgılandıktan 2 gün sonra da gözlenir ve ardına düşüş gözlenir. (47)

Menapozdan önce bazı kadınlarda FSH seviyesi overdeki foliküler rezervin azalması ve doğurganlığın düşmesi sonucu yükselir. Bunun sebebi düşen inhibin B seviyesi olabilir. Foliküler dönemde, FSH seviyesi yüksek olan yaşlanan kadınlarda inhibin B seviyesi dikkate değer şekilde düşüktür. (48,49). Erkeklerde, ergenlik sonrası inhibin B seviyesi serumda değişmez. Akut FSH enjeksiyonu da serum inhibin B seviyelerini değiştirmemiştir. (50)

## **2.4.6. Biomarker olarak inhibin B**

### **2.4.6.1. Overde Biomerker İnhibin B**

Foliküler Sıvı veya serum İnhibin-B Seviyesi: IVF Hastalarındaki Folliküler Gelişimini Saptamada Daha Etkili Bir Belirteçtir.

İn vitro fertilizasyon (IVF) tedavisi planlanan hastaların farklı günlere takabul eden menstrüel sikluslarının folliküler sıvı ve serum inhibin-B seviyelerini tespit ederek, bu parametrelerin over cevabı ve gebelikle ilişkilerini ortaya koymayı amaçlandı.

Bu çalışma göstermiştir ki, folliküler sıvı değil ancak siklusun üçüncü günü ve HCG uygulanan gün serum inhibin-B seviyeleri IVF tedavisi başlayan hastalarda folliküler gelişim ve over cevabı açısından etkili bir belirteçtir. (51)

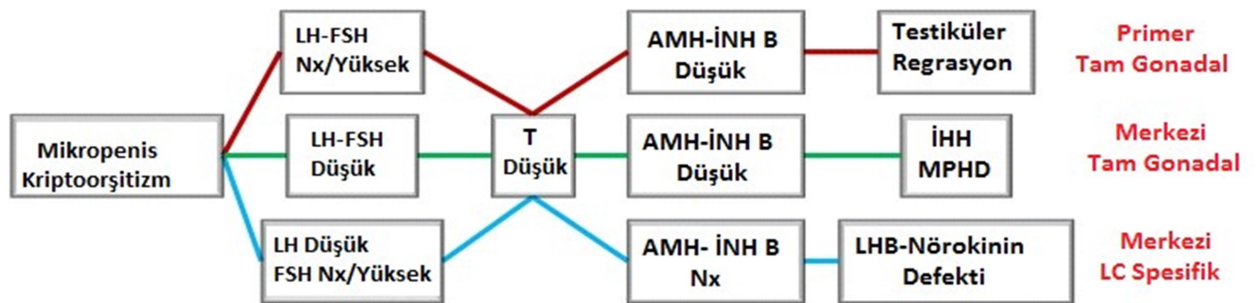
İnhibin B, bağlantılı olduğu yolaklardaki hastalıklarda serum seviyesi yada dokulardaki seviyeleri incelendiğinde, bazı durumlarda biomarker olarak kullanılabilir. Bunun en önemli örneklerinden biri, inhibin B'nin over rezervini gösteren bir biomarker olarak kullanılmasıdır. Üretildiği yere bağlı olarak fonksiyonel over rezervini gösteren en önemli hormondur. Bunun sebebi, menapoz öncesi FSH ve estradiol'den önce inhibin B seviyesinin değişmesidir. Bununla ters olarak, inhibin B, over cevabını bulmada bir biomarker olarak kullanılamaz. Son yapılan çalışmaların ışığında, over cevabını gösteren hormonlar arasında, güvenilirlik açısından en az güvenilir hormon inhibin B olarak saptanmıştır (52).

### **2.4.6.2. Testislerde Biomerker İnhibin B**

Erkeklerde ise, inhibin B spermatogenez biomarkeri olarak kullanılabilir. Frydelund-Larsen ve arkadaşlarının tek gen mutasyonlarına bağlı spermatogenez eksikliği olan hastalarda yaptığı çalışmaya göre, inhibin B seviyesi çift taraflı spermatogenez eksikliği bulunan hastalarda normal, Sertoli hücreleri dolayısıyla spermatogenez eksikliği yaşayan hastalarda ise tespit edilemez seviyelerdedir. Bu bulgular, inhibin B hormon seviyesinin, erkek üreme yollarıyla fonksiyonel bir bağlantısı olduğunu ileri sürer. Kısırlık, tüm çiftlerin yaklaşık% 15'ini etkiler. Subfertil çiftin değerlendirilmesinde spermatogenezin değerlendirilmesi merkezi bir role sahiptir. Spermatogenezin sperm analizi, testiküler biyopsi ve endokrin değerlendirme gibi

klasik belirteçlerinin tümünün tanısasal kısıtlılıkları vardır. Spermatogenezin doğru ek belirteçlerine açıkça ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda, serum inhibin B düzeyi, spermatogenezin duyarlı bir endokrin belirteçi olarak ortaya çıkmıştır. Bu yazıda, serum inhibin B'ye özel odaklanılarak spermatogenezinin farklı belirteçlerinin artıları ve eksileri özetlenmektedir. Serum inhibin B seviyesinin spermatogenezis klasik belirteçleri, özellikle testiküler histoloji ile ilişkili olduğu ve spermatogenezin en doğru endokrin belirteçi olduğunu göstermiştir. (53, 54) Bunlara ek olarak, serum ve seminal inhibin B seviyelerinin toplandığı non-obstrüktif azospermia hastalarıyla yapılan bir meta-analize göre serum inhibin B seviyesi, testiküler sperm çıkarmadaki sperm varlığını %65 hassaslıkta ve %83 özgünlükte tahmin etmeye yardımcı olur. Aynı çalışma, seminal inhibin B seviyeleriyle sperm varlığını tahmin etmenin aynı derecede başarılı olmadığını da söyler. (55)

Aynı zamanda inhibin B'nin birden fazla etkisi şekil 2 de özetlenmiştir. Önemli bir düşük olduğu durumlarda infertilite sorununa sebep olduğu gibi mikropenise, testiküler regresyona ve en önemlisi, endokrin sisteminin bozulmasına sebep olur. İnhibin B'nin yüksek yada düşük olması, kandaki diğer tüm biyokimyasal parametrelerde olduğu gibi hem çevresel hem de genetik etkilerle şekillenir. Çevresel faktörler durumsal açıdan etkilerini gösterirken, genetik faktörler kalıtsal yatkınlık olarak etki gösterir. Bunlara ek olarak çevresel faktörlerin etkilediği DNA modifikasyonları da vardır. Bunlara epigenetik faktörler denir. Tüm bunlar göz önüne alındığında inhibin B seviyelerinin karmaşık bir sistemle kontrol edildiği söylenebilir. (17, 6)



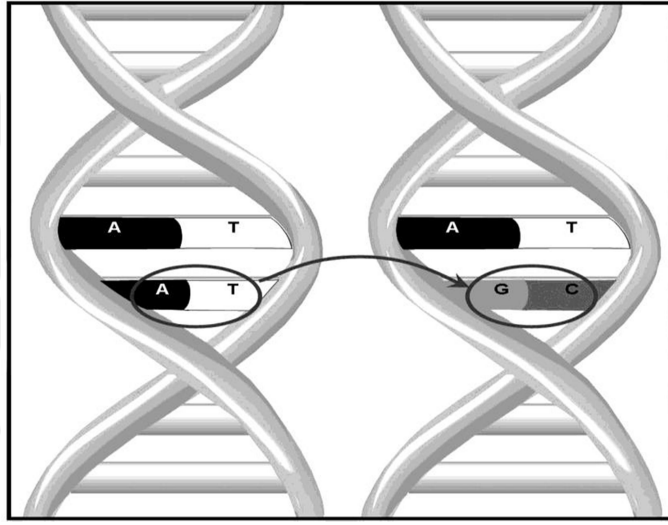
Şekil 2-13: İnhibin B'nin birden fazla etkisi

## 2.5. Polimorfizimler ve İnhibin Polimorfizimleri

### 2.5.1. Polimorfizimler

#### 2.5.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizimleri(SNP)

Polimorfizimler kendi içlerinde gruplara ayrılır. Bunlardan en yaygın olan tek nükleotid polimorfizimleri (SNP) (Şekil 2-13) ve kopya sayısı varyasyonlarıdır (CNV) (Şekil 2-14 ). Polimorfizimleri mutasyonlardan ayıran olgu, gen ve protein yapısını değiştirici özelliği olmasına rağmen, mutasyonların aksine tek başına herhangi bir hastalığa yada duruma sebebiyet vermiyor olmasıdır. (56)



Şekil 2-14: Tek Nükleotid Polimorfizimleri Oluşumu. (SNP) (57)

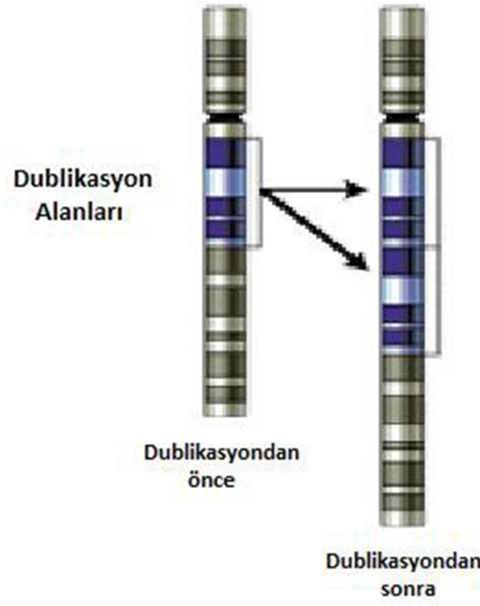
SNPler popülasyonlarda %1 frekansdan fazla bulunan tek baz değişimleridir. SNPler kendi içlerinde ikiye ayrılır. Bunlar bağlı SNPler ve sebep olan SNPlerdir. Bağlı SNPler, genlerde bulunmaz ve üretilen proteinlere etkileri yoktur. Bunlara aynı zamanda sessiz SNP de denir. Sebep olan SNPler ise gen dizilerinde bulunur ve buldukları yere göre protein sekansını yada protein katlanmasını değiştirerek etki gösterirler. SNPler her popülasyon için ayrı ayrı tanımlanırlar. Örneğin, Amerika'daki bir popülasyonda X SNP alleli yaygınken, aynı lokusta türk popülasyonunda Y SNP alleli yaygın olabilir. Bunun sebebi, bu iki popülasyonun uzun yıllardır birbirinden uzak ve ayrı yaşamasıdır. O yüzden konusu SNP olan çalışmalar yapıldıkları popülasyonlar için geçerlidir. (80) SNP genotipleme farklı yöntemlerle yapılabilir. Bunlardan günümüzde en yaygın kullanılanı array CGH yöntemidir. Bu yöntem ilk keşfedildiği



günden itibaren sürekli gelişerek şu anda milyonlarca SNPyi aynı zamanda karşılaştırabilecek SNP array çipleri geliştirilmiştir. Bu yöntem, referans genomun, çalışılan genomla karşılaştırılması sonucu, çip üzerindeki SNPlere özel kuyucuklarda hangi genomun daha fazla olduğuna bakarak çalışır. Yani çalışılan genomda bir SNP referans genomdan farklı allel ise, tespit edilir. Aynı SNP alleli olma durumunda ise çalışılan genomdaki o lokusta referans genomundaki allel var olduğu kabul edilir. Bu yönteme ek olarak kesim enzimleriyle yapılan restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemiyle, gelecek jenerasyon sekanslama (NGS) ile ve real-time PCR yöntemleriyle de SNP genotipleme yapılabilir. (78)

#### **2.5.1.2 Dublike polimorfizimler**

Diğer bir polimorfizim olan CNV ise daha büyük, yaklaşık 1 kilobazdan büyük parçaların, dublike veya silinmesiyle gerçekleşen polimorfizimlerdir. Talasemide olduğu gibi CNV direkt olarak bir hastalığa sebep olabildiği gibi genelde insan genomunda kodlanmayan bölgelerdeki DNA parçalarının sayısal değişikliği, bazı hastalıklara kalıtsal yatkınlık getirir. SNPlerin insan genomunda çok fazla olması ve yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların yeteri kadar kompleks hastalığı aydınlatamaması sonucu, son yıllarda CNVler çalışmaların odak noktası olmuştur. CNVler SNPlere oranla daha ender rastlanırlar, fakat etkileri daha fazla DNA'nın değişikliğe gitmesi sonucu büyük ihtimalle daha yüksek olur. Bunun sebebi CNVlerin yapısal bir polimorfizim gibi çalışması ve kromozomal paketlenmeyi etkilemesi gösterilebilir. (58)



**Şekil 2-15:** CNV oluşumu. (59)

CNVler de SNP ler gibi çip arrayler kullanılarak bulunur ve genotiplenir. Bunun yanı sıra komperatif genomik hibridizasyon (CGH), real-time PCR, paralogue ratio test ve NGS gibi yöntemlerde kullanılabilir. (58)

Üreme endokrinolojisinde de polimorfizimlerin etkileri literatürde saptanabilir. Bunların ilk örnekleri FSH reseptör genlerindeki SNPlerdir. (60)

## 2.6. FSH RESEPTÖR GENİ

FSH reseptörü, bir tanesi promoterde ve iki tanesi ekson 10'da olmak üzere üç tek nükleotid polimorfizmini (SNP'ler) gösterir. Ayrıca, Promoterde SNP'nin fizyolojik rolü ve şimdiye kadar alternatif eklenmiş izoformlar için herhangi bir fizyolojik rol gösterilmemesine karşın, ekson 10'daki SNPler, Thr307-Asn680, Ala307-Ser680, Ala307-Asn680 ve Ala307-Asn680 amino asit kombinasyonları ile karakterize edilen dört ayrı alellik varyant ile sonuçlanır ve Thr307-Ser680. Birkaç çalışma, ilk iki alellik varyantın Kafkas popülasyonunda çok sık (sırasıyla yaklaşık % 60 ve % 40) olduğunu göstermiştir. Daha seyrek Ala307-Asn680 ve Thr307-Ser680 varyantları Çinlilerde daha az sıklıkta (<% 5) görülür. Erkeklerde FSH reseptör varyantları, testis hacmi, serum FSH veya serum inhibin B seviyeleri ile ilişkili değildir. Normal polikistik over sendromlu veya prematür over yetmezliği bulunan normal kadınlarda ve polimorfizimlerin frekans dağılımı halen araştırılmaktadır. Homozigot Ala307-Ser680

varyantı, yardımcı üreyen kadınlarda yumurtalık stimülasyonu için gerekli olan daha yüksek bazal serum FSH düzeyleri ve daha yüksek FSH ile ilişkili görünmektedir. Bu, FSH reseptör genotipinin FSH uyarısına karşı yumurtalık tepkisini etkileyebileceğini düşündürmektedir. FSH faaliyetini modifiye edebilen FSH reseptör genindeki SNP'lerin varlığı, ileride hastaya uyarlanmış, genotip temelli hormon terapilerinin yolunu açmaktadır

FSH reseptör genindeki polimorfizimlerin erkeklerde de sperm kalitesi düşüklüğü, infertilite ve hipogonadizme sebep olabileceği gösterildi. (61, 62)

## **2.7. LH RESEPTÖR GENİ**

Buna ek olarak, LH reseptör genindeki polimorfizimlerin Leydig hücresi hipoplasisine sebep olduğu gösterilmiştir (63). LH reseptörü (LHR), FSH ile birlikte yumurtalık fonksiyonunu düzenleyen iki temel hipofiz gonadotropinini oluşturan LH eylemlerine aracılık eder. FSH reseptörleri (FSHR) sadece granülosa hücrelerinde (GC) ifade edilirken, her iki reseptör de G proteine bağlı reseptörlerdir ancak LHR, aktif reseptörün üretimi artırdığı theca ve interstisyel hücreler üzerinde yapısal olarak eksprese edilir. Androjenler , İnsan preovulatar foliküllerinde, LHR de GC'de ifade edilir ve progesteron ve östradiolün follüküler üretimine katkıda bulunur. (64)

## **2.8. İNHİBİN RESEPTÖR GENİ**

İn situ ligand olarak bağlanma çalışmalarında, leyding hücrelerinde bulunan inhibin  $\beta$ A reseptörüne, sıçan testis gelişimi boyunca ,spesifik olarak bağlandığı gösterilmiştir. Bu sonuç, inhibinin, Leydig hücrelerinin farklılaşmış bir fonksiyonunun regülatörü olarak kabul edilmiştir (65,66).Son zamanlarda yapılan bir calismada, inhibin spesifik bağlayıcı proteinler ile isaretlenmiş, hipofiz ve Leydig hücrelerinde tespit edilmiştir (67, 68) Inhibini bağlayan bu reseptörler ;  $\beta$ -glikan reseptörleri (TGFB tip III reseptör) InhBP / P120 (bir zara bağlı proteoglikan) olarak tanımlanmıştır ve hepsi Leydig hücrelerinde bulunmaktadır.

İnhibinlerde polimorfizim çalışmaları gözde konulardan biridir. Her ne kadar da inhibinleri etkileyen polimorfizimler gösterilmiş olsa da, inhibin genlerindeki

polimorfizimler tam olarak karakterize edilmemiştir. (69) Bu yüzden inhibin B genindeki olası polimorfizimlerin etkileri bilinmemektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Örnek Seçimi ve Tanımı

Çalışma kapsamında kontrol grubu (n=0) ve Primer İnfertilite Hastalığı tanısı konmuş (n=50) hasta grubu ile çalışıldı. Hasta grubuna ait kan örnekleri Çalışmaya Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Üreme Sağlığı Merkezi'ne başvuran hastalar, sağlık kontrolleri ve check-up kontrolü yapıldıktan sonra Çalışma grubuna dahil edildi. Çalışma kapsamında kullanılacak hasta ve kontrol grubuna ait kan örnekleri için Yeditepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır (Etik Kurul Karar No: 616). Muayene ile Primer İnfertilite Tanısı konmuş hastalar, IVF merkezi tarafından ultrasonografisi yapıldıktan sonra hastanın geçmişi ve foliküler düzeyi kontrol edilerek çocuk sahibi olamayan hastalar dahil edilmiştir.

#### 3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

##### 3.2.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

İzolasyon karışımı pH 8,8 olan 10,5mM Tris-Cl, 10,5mM NaCl, 10,5nM EDTA, 8M Guanidiniumhydrochloride, 1,12mg/ml Proteinaz K'dan oluştu. DNA İzolasyon sistemi (iPrep Purelink, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc)

##### 3.2.2. Kullanılan Cihazlar

DNA İzolasyon Robotu (iPrep Purelink, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc), NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc), Gerçek Zamanlı PZR (Fast Real Time 7500, Applied Biosystems), Lipoprint Dikey Elektrophorez Tankı (Quantimetrix Model 1500), 7,6cm boyunda ve 0,5cm çapında hazır cam kolonlar, Elektrophorez güç kaynağı (EC 100 XL, Thermo Fisher Scientific Inc), Densinometre (Artiscan M1 Microtek), Lipoprint Analiz Programı (V1.82 ImageSXM, Quantimetrix), Bilgisayar Apple), Santrifüj (Centrifuge 22R, Beckman Coulter), +4 C<sup>0</sup> Buzdolabı (Haier), -20 C<sup>0</sup> Buzdolabı (Haier), Ultra saf su cihazı (Purelab option Q, Elga), Vorteks (V.I. Plus Biosan), Pipet Takımı (Thermo Fisher Scientific Inc).

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Kandan Genomik DNA izolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından 5 cc' lik EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri DNA izolasyonu yapılana kadar +4 C0 de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Örneklerden DNA izolasyonu, iPrep DNA ekstraksiyon robotu (Invitrogen) ile iPrep kandan genomik DNA izolasyon kiti (iPrep gDNA Blood kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) kullanılarak elde edilmiştir. Bu sistem, bir çalışmada 13 örnekten DNA izolasyonu etme kapasitesine sahiptir. Ortamdaki tamponun pH'üzerinden yüzeye bağlı manyetik boncuk tabanlı teknoloji olarak adlandırılan robotik sistemde herbir örnek için 350µl periferik kan kullanılarak DNA izole edilmiştir. Düşük pH' larda pozitif yüklü CST® (ChargeSwitchTechnology®) negatif yüklü nükleik asit iskeletine bağlanır. Bu nedenle proteinler ve diğer kontaminantlar bağlanamaz ve sıvı yıkama tamponu ile yıkanır. Nükleik asitleri temizlemek için; boncuk yüzeyinin yükü, pH'ı tuzlu yıkama (elution) tamponu kullanılarak pH 8,5' e yükselttilerek nötralize edilir. İzole edilmiş oleik asit zaman kaybetmeden yıkama tamponuna geçer ve çalışmalarda kullanılmak üzere hazır hale gelmiş olur. İzole edilen DNA örnekleri uygun tüplere alındıktan sonra +4C0 buzdolabında saklanmıştır (70).

#### 3.3.2. DNA Saflık Ölçümü

50 ng/µl (µg/ml) çift iplikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik dansite (OD) verdiği tespit edilmiştir. DNA örneklerin saflığı Nanodrop2000 cihazı ile ölçüldü DNA örneklerinin saflığı OD260/OD280 oranı analiz edilerek gerçekleştirildi. 27 Genotipleme için uygun saflıkta kabul edilen DNA' nı OD260/OD280 değeri 1,7-1,9arasında tespit edilen örnekler temiz olarak kabul edildi (71). Spektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo Scientific Inc) cihazında;

- 1) Nanodropun bağlı olduğu bilgisayar açılır ve spektrofotometre programı başlatılır
- 2) Program açıldığında örnekteki DNA' nın ölçülmesi için ekrandaki tablodanDNA analiz kımı seçilir.

- 3) Rutin dalga boyu doğrulama testi yapılır ve işlem bittikten sonra Nanodrop sensöründe herhangi bir kirletici madde olmadığından emin olunur.
- 4) Nanodrop kolu açılır ve sensör temizlenir. İşlem bittikten sonra kol yavaşça kapatılır.
- 5) Örneklerin konsantrasyonları ölçülmeden önce blank alınır. Bunun için Nanodrop kolu kaldırılır ve 1,5 µl blank solüyonu Nanodrop sensöre bırakılır.
- 6) Blank solüyonu yüklendikten sonra kol indirilir ve bilgisayar programının sol üstündeki blank kısmı seçilir.
- 7) İşlem tamamlandıktan sonra Nanodrop sensörü temizlenir ve 1,5 µl örnek Nanodrop sensöre eklenir ve kol kapatılır.
- 8) Bilgisayar programının sol üst kısmında bulunan ölç sekmesi seçilerek DNA konsantrasyonu analiz edilir.
- 9) Programı kapatmadan önce blank alınır ve sensör iyice temizlenir.

### **3.3.3. Eş Zamanlı PZR Yöntemi ile Genotipleme Çalışması**

Genotipleme analizi Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (EZ-PZR) yöntemiyle 7500 Fast- Real Time PCR (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, PZR reaksiyonun her döngüsü sırasında amplifikasyon ürünlerinin üretimini izlemek için floresans moleküllerini kullanır. Bu sistem DNA çoğalması ve saptanması adımlarını tek bir assayda birleştirir ve amplifikasyon ürünlerinin saptamak için jel elektroforezine gerek duymaz. Amplifikasyon sırasında floresans sinyalleri hedef sekansın miktarı ile ilişkili olarak ulaşır. Eş zamanlı PZR için kullanılan floresans problemlerde yabancı allel ve mutant allel için 2 farklı sekans ve 2 farklı dalga boyunda boya mevcuttur (72).

Genotipleme yapılan gen bölgeleri; INHBB geni için rs 57802235 (A>G) dir ve bu bölgelerde spesifik primer ve prob setleri olarak “TaqMan Genotyping Assays” kullanılmıştır, rs numaralarına ait polimorfik bölge dizileri ve problemleri floresans boyaları aşağıda verilmiştir;

INHBB rs 57802235 :

CTGGGCTGGAGGTGGGCAGCTGGGA(A/G)GAAGGCCAGTCCAGGTGTCCAG  
GTT (REW)

### 3.3.3.1. Eş Zamanlı PZR Protokolü

**Reaksiyon Karışımı:** Total reaksiyon karışımı kuyucuk başına 20µl olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 2).

**Tablo 3-1 : Eş Zamanlı PZR için Reaksiyon Karışımı**

Reaksiyon için Kullanılan Malzeme	Miktar
Master Mıx	10 µl
DNase, RNase içermeyen su	8,5 µl
Template DNA	1 µl
TaqMan Assay	0,5 µl

Eş zamanlı PZR koşulları: 95 C' de 10 dakika bekleme ve her bir döngü için 92 C' de 15 saniye denatürasyon, 60 C' de ise 1 dakika Bağlanma/Uzama aşması; Tablo 3.

**Tablo 3-2: Eş Zamanlı PZR Koşulları.**

	Bekleme	Denatürasyon	Bağlanma/Uzama
<b>Sıcaklık</b>	95 C	92 C	60 C
<b>Süre</b>	10 dakika	15 saniye	1 dakika

40 Döngü

### 3.4. İstatistiksel ve Haplotip Analizi

Genotipleme sonucunda elde edilen veriler istatistiksel analiz için SPSS 21.0 programı ile değerlendirildi. Genotip ve allelerin gruplar arasında görülme sıklıklarının değerlendirilmesinde Ki Kare, Fisher's Exact Test kullanılmıştır. Gruplar arası genotipler arasındaki ilişkinin incelenmesi için Haploview programı kullanılarak haplotip analizi yapılmıştır.





## 4. BULGULAR

Tüp bebek tedavisine başvurmuş IVF hastalarının arasından İnfertil ve İnfertilite nedeni olarak kadın Tubal faktörü olanlar gruba dahil edilmiştir. Yaş ortalaması  $32,12 \pm 4,04$  dır. Tablo 4.1’de olgulara ait bilgiler verilmiştir.

Tüp Bebek tedavisi başlatılan hastalara herhangi rutin tedavileri dışında herhangi farklı bir tedavi yapılmamıştır.

Çalışma grubundaki hastaların değerlendirilmesinde, İnhibin geninde polimorfizmi 48(%96) homozigot doğal , 2(%4) heterozigot mutant ve 0(%0) vakada ise homozigot mutant saptanmıştır.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta grubundan,tedavisi sonrasında ortalama toplanan yumurta sayısı 8.02 ve olgun yumurta sayısı ise 6.58 dır. Hastalardan adetlerinin 3.günlerinde alınan kan örneği ile saptanan FSH değerleri ile İnhibin genotip sonuçları ve yumurta sayıları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

### 4.1. İstatistiksel Analizlerden Elde Edilen Bulgular

Tez çalışmasının grubunu Primer İnfertil tanısı almış (n=50) hastalar oluşturmaktadır. Hastalara ait demografik veriler Tablo 4’de verilmiştir.

**Tablo 3-3:** Hastalara Ait Demografik Ve Klinik Parametreler

Yaş (yıl)	$32,12 \pm 4,04$
<b>PARAMETRELER</b>	<b>Primer infertil hasta grubu</b>
FSH düzeyi (IU/L)	$7,06 \pm 2,58$
Oosit sayısı (n)	$8,02 \pm 5,34$
Olgun Oosit sayısı (n)	$6,58 \pm 4,90$

Tablo 3-3’de görüldüğü üzere, Primer infertil hasta grubunda yaş, FSH, oosit sayısı ve olgun oosit sayısı parametreleri incelenmiştir. Primer infertil hasta grubunda yaş ortalaması  $32,12 \pm 4,04$  görülmüştür. İncelenen FSH düzeyi hasta grubunda ortalama olarak  $7,06 \pm 2,58$  saptanmış olup oosit sayısı  $8,02 \pm 5,34$  belirlenmiş olup olgun oosit sayısı  $6,58 \pm 4,90$  değer ile oosit sayısından daha düşük olarak gözlenmiştir.

**Tablo 3-4: Hasta Gurubuna Ait INHBB Gen Polimorfizminin Genotip ve Allel Olarak Dağılımı**

<b>GENOTİP DAĞILIMI (n=50)</b>		
Doğal tip (G/G) n (%)	Heterozigot mutant tip (A/G) n (%)	Homozigot mutant tip (A/A) n (%)
48 (%96)	2 (%4)	0 (% 0)
<b>ALLEL DAĞILIMI</b>		
Doğal tip (G)	Mutant tip (A)	
Birey n= 50 (%100)	Birey n= 2 (%2)	
Allel n= 98 (%98)	Allel n= 2 (%2)	

Tablo 3-4’de görülen genotip ve allel dağılımına baktığımızda, INHBB genine ait genotip dağılımında doğal tip (G/G) genotipinin görülme oranı (% 96, n=48) iken heterozigot mutant tip (A/G) genotipinin görülme oranı (% 4, n=2) olarak belirlenmiştir. Homozigot mutant tip (A/A) genotipine ait herhangi bir birey saptanmamıştır (% 0, n=0)

Tablo 3-4’de allellik dağılıma baktığımızda ise doğal tip G alleline sahip bireylerin sayısı 50, görülen allel sayısı ise 98 (%98) olarak görülmekte yani bu sayı tüm hasta grubunu (%100) kapsayacak niteliktedir. Mutant tip allel olan A alleline baktığımızda bu oran 2 bireyde gözlenmektedir. Mutant tip A alleli sayısı ise 2 ve oranı %2’dir. Bu durumda primer infertilitesi olan hastalarda INHBB genine ait rs57802235 genotipine ait allellerin görülme sıklığı açısından G alleli A alleline göre anlamlı düzeyde hasta grubunda yüksek gözlenmiştir şeklinde açıklayabiliriz.

**Tablo 3-5: Hasta Grubunda Yaş Gruplarına Göre Parametrelerin Dağılımı**

Yaş	<35 (n=37)	≥35 (n=13)	P Value	%95 CI
<b>FSH (IU/L)</b>	6,50±2,29	8,63±2,77	0,009*	0,55616 - 3,69635
<b>OOSİT SAYISI (n)</b>	9,51±5,26	3,77±2,62	<0,001*	2,66998 – 8,81859
<b>OLGUN OOSİT SAYISI (n)</b>	7,84±4,81	3,00±3,14	0,001*	1,95234 – 7,72334

Tablo 3-5’de görüldüğü üzere hasta grubunda yaşları <35 ve ≥35 olmak üzere iki gruba ayırarak parametreler arası değerlendirme yapılmıştır. Tabloda da görüldüğü üzere FSH değerleri <35 yaş grubundaki hastalarda 6,50±2,29 olarak görülmüş ve ≥35

hastalara göre (8,63±2,77) düşük gözlenmiştir. FSH değerlerindeki bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmektedir (p = 0, 009). Bunun sonucu olarak da FSH değeri yaşa bağlı olarak artmaktadır.

Tablo 3-5’de baktığımız diğer bir parametre olan oosit sayısı ise yaş gruplarının dağılımına göre istatistiksel olarak anlamlı çıkan diğer bir belirteçtir. Oosit sayısı <35 yaş grubundaki hastalarda 9,51±5,26 gözlenirken, bu değer ≥35 hastalarda 3,77±2,62 olarak gözlenmiştir. Aradaki fark oosit sayısının yaşa bağlı olarak azaldığının göstergesidir. (p < 0,01)

Tablo 3-5’de baktığımız son parametre ise olgun oosit sayısıdır. Bu oran da diğer parametreler gibi istatistiksel olarak anlamlı değer vermiştir. Olgun oosit sayısı <35 yaş grubunda 7,84±4,81 görülmüştür. ≥35 yaş grubu hastalarda olgun oosit değeri 3,00±3,14 ile çok düşük gözlenmiştir. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlılık belirtmektedir. (p = 0,001) Olgun oosit sayısının yaşa bağlı olarak azaldığı sonucuna varılmaktadır.

**Tablo 3-6: Hasta Grubunda Oosit Sayısına Göre Parametrelerin Dağılımı**

	≤3 oosit (n=11)	>3 oosit (n=39)	P değeri	%95 CI
<b>FSH (IU/L)</b>	8,48±3,21	6,65±2,25	0,036*	0,12634-3,53711
<b>OOSİT SAYISI (n)</b>	1,81±0,40	9,76±4,73	<0,001*	5,05477-10,84733
<b>OLGUN OOSİT SAYISI (n)</b>	0,63±0,80	8,25±4,20	<0,001*	5,04030-10,19980

Tablo 3-6’de görüldüğü üzere hasta grubunda oosit sayısı ≤ 3 olan (n=11) ve >3 oosit (n=39) olmak üzere iki gruba ayırarak parametreler arası değerlendirme yapılmıştır. Tabloda da görüldüğü üzere FSH değerleri oosit sayısı ≤ 3 olan hasta grubunda 8,48±3,21 olarak görülmüş ve >3 oosit sayısına sahip hastalarda bu oran 6,65±2,25 ile daha düşük gözlenmiştir. FSH değerlerindeki bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmektedir (p = 0, 036). Bunun sonucu olarak da FSH oosit sayısına göre azalmaktadır diyebiliriz.

Tablo 3-6’de baktığımız diğer bir parametre olan oosit sayısı yine oosit sayısının 3 ile sınırlandırıldığı hasta grubunda değerlendirilmesidir. Oosit sayısı ≤ 3 olan hasta grubunda toplam oosit sayısı 1,81±0,40 olarak belirlenmiştir. >3 oosit sayısına sahip

hastalarda toplam oosit sayısı ise  $9,76 \pm 4,73$  görülmüştür. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlılık göstermektedir ( $p < 0,001$ ).

Tablo 3-6’de baktığımız son parametre ise olgun oosit sayısıdır. Bu oran da diğer parametreler gibi istatistiksel olarak anlamlı değer vermiştir. Toplam olgun oosit sayısı, oosit sayısı  $\leq 3$  olan hasta grubunda  $0,63 \pm 0,80$  değer ile oldukça düşük seviyede kalmıştır.  $>3$  oosit sayısına sahip hastalarda toplam olgun oosit sayısı ise  $8,25 \pm 4,20$  görülmüştür. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlılık belirtmektedir ( $p < 0,001$ ).

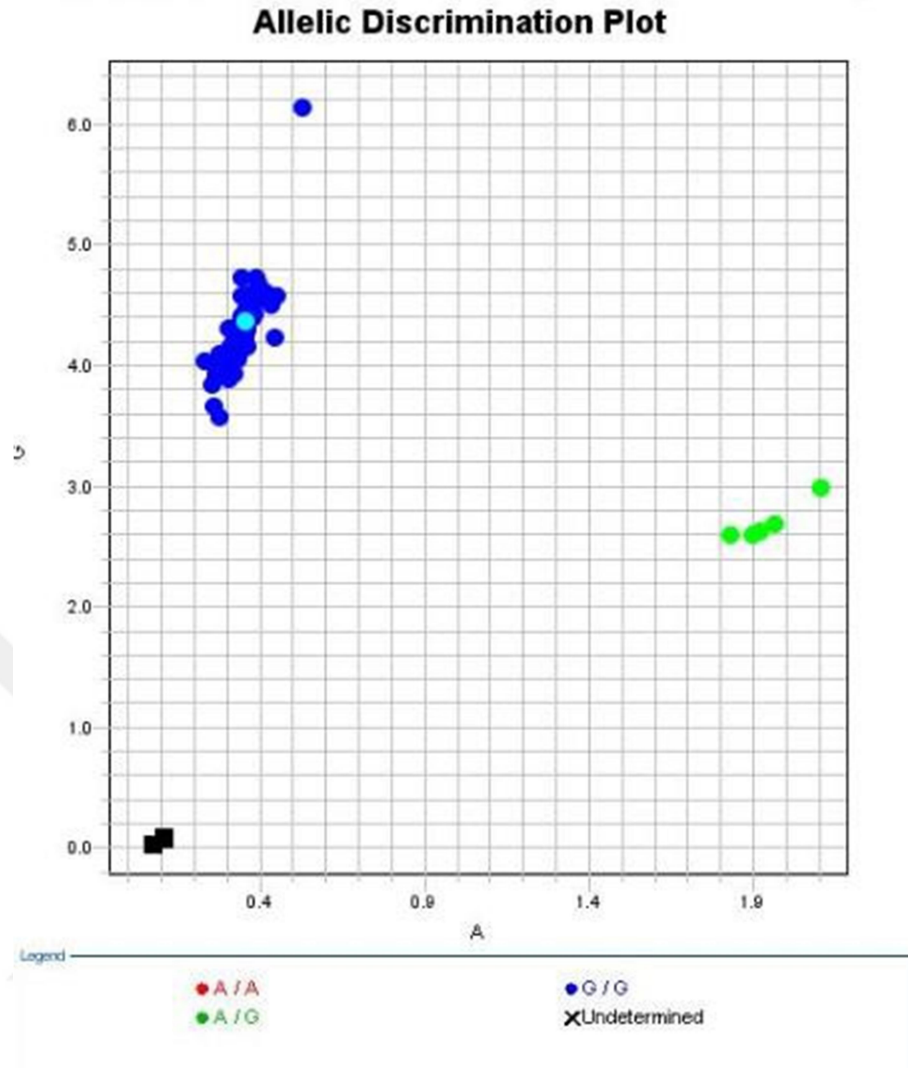
**Tablo 3-7: Hasta Grubunda Oosit Sayısına Göre INHBB Geninin Genotipik Olarak Dağılımı**

	<b>Doğal tip (GG)</b> n (%)	<b>Heterozigot mutant (AG)</b> n (%)	<b>Homozigot mutant tip (AA)</b> n (%)
<b><math>\leq 3</math> oosit</b>	11 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
<b><math>&gt;3</math> oosit</b>	37 (%96)	2 (%4)	0 (%0)

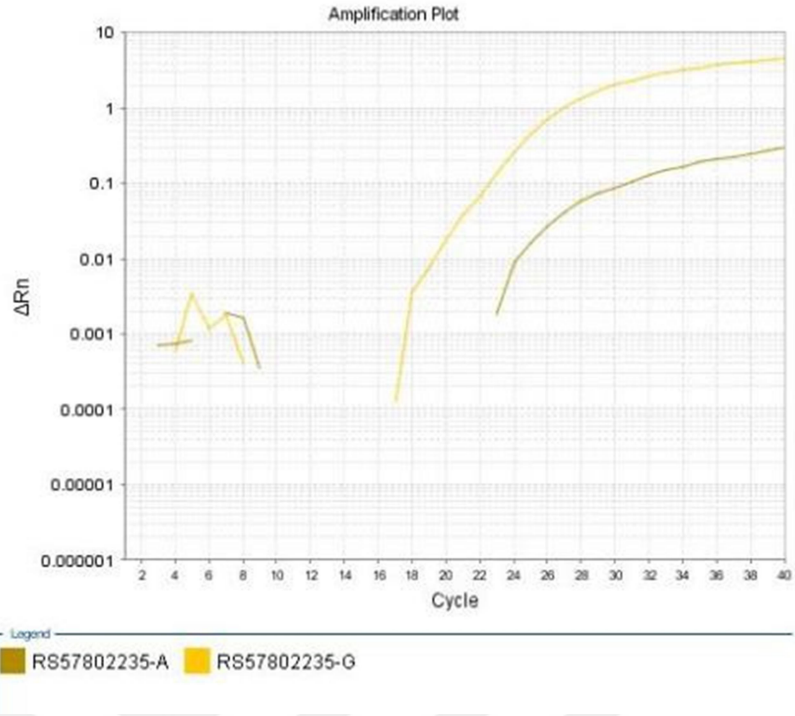
Tablo 3-7’de oosit sayısı  $\leq 3$  olan grubu ile oosit sayısı  $>3$  olan hasta grupları arasında INHBB genine ait genotipler arasındaki farklılık araştırılmıştır. Bunun sonucu olarak oosit sayısı  $\leq 3$  olan hasta grubunda doğal tip olan GG genotipinin görülme oranı %100, birey sayısı ise  $n=11$  olarak gözlenmiştir. Bu gruptaki tüm bireyler GG genotipine sahiptir. Oosit sayısı  $>3$  olan hasta grubunda ise GG genotipine sahip birey sayısı  $n=37$  (%96) ve heterozigot mutant tip AG genotipine sahip birey sayısı ise  $n=2$  (%4) olarak gözlenmiştir. Her iki grupta da homozigot mutant genotipe ait bireye rastlanmamıştır.

#### **4.2. Eş Zamanlı PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

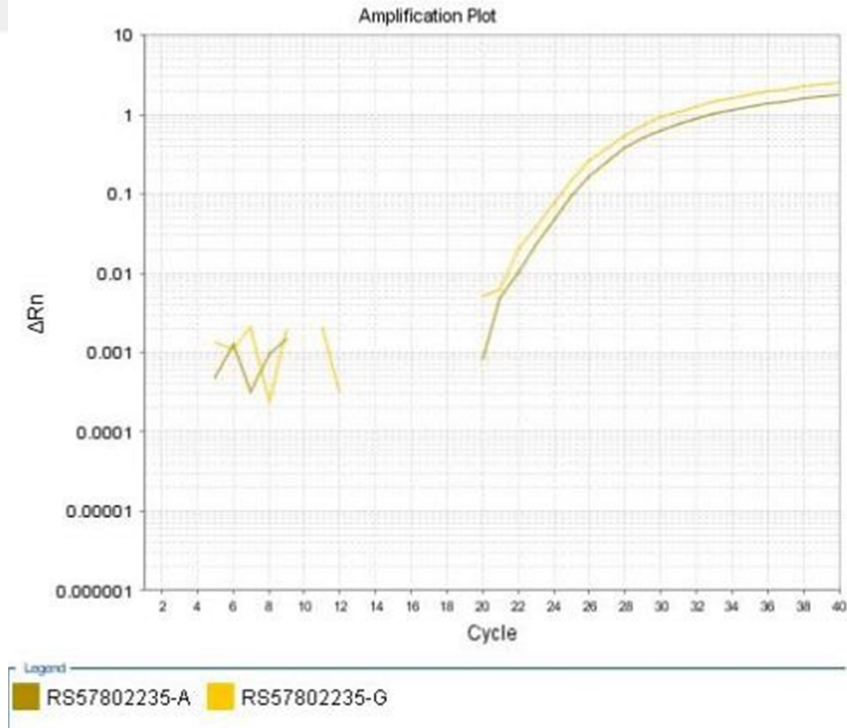
Allelik diskriminasyon, problarda bulunan boyaların yaptığı floresans ışımaların 7500 Fast-Real Time PCR cihazının yazılımı tarafından otomatik olarak okunup yorumlanması şeklinde yapılmıştır. Ancak diskrimine edilemeyen bazı örnekler, ışıma eğrileri incelenip yorumlanarak allelik ayrımı yapılmıştır (Şekil 4-1). Homozigot Mutant Genotip Işıma grafiği Şekil 4-2’de ve Heterozigot Genotip Işıma Grafiği Şekil 4-3’de gösterilmiştir.



Şekil 4-1 : Allelik Diskriminasyon Gösterimi.



Şekil 4-2 : Homozigot Mutant Genotip Işıma Grafiği



Şekil 4-3 : Heterozigot Genotip Işıma Grafiği.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Inhibin hormon seviyelerinin incelenmesi özellikle son yıllarda hamile kadınlara ikili ve üçlü teste destek olarak dörtlü test içerisinde yapılmaya başlanmıştır. Ancak inhibin geninde bulunan polimorfizmler farklı populasyonlarda değişiklik göstermiştir. Günümüze dek Türk populasyonunda bu polimorfizmin sıklığı araştırılmamıştır. Yaptığımız bu çalışmanın amacı infertil hastalarda inhibin genindeki polimorfizmlerin sıklığını Türk populasyonunda araştırmaktır. Dolayısıyla bu çalışmada rastgele seçilen infertil hastalarda inhibin genindeki polimorfizm oranı araştırılmış ve çok düşük bulunmuştur.

Çalışma grubundaki hastaların ortalama yaşı 32 olup, FSH düzeyleri yaklaşık 7 IU/L olarak tesbit edilmiştir. Ortalama oosit sayısı 8 olup, olgun oosit sayısı ortalama 6.62'dir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, düşük bazal FSH seviyesi olan hastalarda ortalama 6.7 oosit sayısı bulunduğu gösterilmiştir(73) (Ebrahim vd., 1993). Bunun yanı sıra yaş grubuna göre FSH seviyelerinde ve oosit sayılarında, hastalarda istatistiksel olarak fark gözlemlenmiştir. Hastaların 35 yaş üstü FSH seviyesi artarken, toplanan oosit ve olgun oosit sayıları anlamlı olarak düşüş göstermiştir. Yüksek FSH seviyesi olan hastalarda oosit sayısının düşük olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (73)(Ebrahim vd., 1993). Bunun yanı sıra, 3ten az sayıda oositi olan hastalarda FSH seviyesinin 8'in üstünde olduğu gösterilmiştir.

Yaptığımız bu çalışmada, hastalardan alınan kan örneklerinden DNA elde edilip, INHIBIN  $\beta$  B (INHBB) genindeki rs57802235 polimorfizminin sıklığı ve genotipini ilk kez Türk toplumunda araştırdık. Rastgele seçilen infertile hastalarda INHBB geninde %96 (50 hastada) doğal tip olan G/G alleleri gözlemlenmiştir. Heterozigot mutant allel A/G %4 saptanmıştır. Mutant allel sadece %2 olarak gözlemlenmiştir. Bu polimorfizm farklı toplumlarda bazı hasta gruplarıyla ilişkilendirilmiştir. Avustralyada yapılan bir çalışmada Preeklampsi hastalarında INHBB tek nükleotid polimorfizme bakılmış (inhibin beta B geni) rs 12711941 (T>G), rs 7576192 (A>G) ve rs 7579169 (T>C) ) ve sonuç olarak rs7579169 CC genotipi kontrol gruplarından farklı olarak yüksek frekans sinyali vermiştir.(74)(Q.Wang ,G.Wang C.Guo,X.Cao,L.An,M.Du, 2015)

2012 yılında Korede yapılan bir çalışmada prematur ovaryan hasarlı hastalar ile polimorfizmine bakılmış ve aralarında anlamlı farklılık bulunmamıştır.(75-77)(Sang Ho

Yoon vd.2012). Yeni zelanda ve slovenya populasyonlarında yapılan baska bir calismada ise inhibin  $\alpha$  geni promotor bolge (rs 35118453) C-T bazi ile (rs11893842) A-G bazi polimorfizmi oldugu gorulmustur bu iki allelin frekansi -16T ve -124 G dir.(76)(Harris et al.,2005;Woad et al.,2009)

Gunumuze kadar yapılan bu calismalar, INHBB ve Inhibin  $\alpha$  genindeki polimorfizmlerin farkli hasta gruplariyla iliskili olabilecegini gostermistir. Bizim calismamizda Turk toplumunda INHBB geninde bulunan polimorfizmin orani cok dusuk bulunmustur. Bu calisma ilerki calismalar icin yol gostererek preeklampsi veya dusuk overyan reserve gibi hasta gruplarında bu polimorfizm calisilabilecektir. Boylece, hem bu polimorfizmin Turk populasyonundaki frekansi hem de farkli hastaliklarla iliskisi anlasilabilecektir



## 6. KAYNAKLAR

- 1 ) Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends, *Fertil Steril* 56 : 192, 1991
- 2 ) Tinkanen H, Blauer M, Laippala P, et al. Prognostic factors in controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1999; 72: 932-6.
- 3 ) Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod* 2006; 12: 685-718.
- 4 ) Selen TAFLAN1, Ebru ZÜLFİKAROĞLU1, Sevtap KILIÇ1 Eur J Surg Sci Follicular Fluid or Serum Level of Inhibin-B: Which One is an Effective Marker of Follicular Development in IVF Patients 2011;2(2):32-37
- 5 ) C. KW. ELT AND A. L. SCHNEYER Differential Regulation of Inhibin B and Inhibin A by Follicle-Stimulating Hormone and Local Growth Factors in Human Granulosa Cells from Small Antral Follicles The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism. Copyright by The Endocrine Society 2001 ; 0021-972X/01/03.00/
- 6 ) Ben Pansky. Development of The Female Genital System: Ovarian Differentiation Review of Medical Embryology. *Synched Release with GeneCards, Apr 05, 2017*
- 7) Fragilis Model Systems, Stem Cell BiologyTags BMP4 treatments, oogonia, primordial germ cells, Stella. gonadal ridge formation; infertility February 16, 2015Categories
- 8) Pregnancy and Embryology in Mammals. Fertilization and Early Embryonic Development: Introduction and Index. Fertilization. Last updated on April 1, 2000; *Pathophysiology of the Reproductive System*.
- 9 ) Klinik emb.Ali Buran tarafından SEM ile .Yeni yuzyil universitesi 2015.
- 10) Gianaroli L,osti E, Magli C, Ferrarreti A, Dale B fertilization current in the human oocyte.*MolecularReproduction and Development*(1994); 38: 209–214
- 11) Gur Y, Breitbart H Mammalian spermtranslate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes.*Genes and Development*(2006); 20(4): 411–416
- 12) Lennarz WJ, how manydifferent molecules are involved in gamete interactionand. *Fertilization in sea urchins:usion Zygote* 1994; 2(1): 1–4.
- 13) Le, Conner SJ, Salpekar A,et al. Four zonapellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction* 2004; 19: 1580–1586.
- 14) Wassarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, et al. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool* 1999; 285(3):251-258.
- 15 ) Prasad SV, Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J, Dunbar BS. Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs* 2000; 166(2):148-164.

- 16 ) Maro B, Gueth-Hallonet C, Aghion J, Antony C Cellpolarity and microtubule organization during mouse early embryogenesis. *Development Supplement Molecular mechanism of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. Developmental Biology (1991) 10: 17–25. Myles DG (1992) 158: 35–45*
- 17 ) Grinspon RP, Loreti N, Braslavsky D, et al. Spreading the clinical window for diagnosing fetal-onset hypogonadism in boys. *Front Endocrinol (Lausanne) 2014;5:51. doi:10.3389/fendo.2014.00051*
- 18 ) Şekil Yeditepe Üniversitesi Hastanesi IVF merkezinde de çekilmiştir.
- 19) Şekil Yeditepe Üniversitesi Hastanesi IVF merkezinde de çekilmiştir.
- 20) Şekil Yeditepe Üniversitesi Hastanesi IVF merkezinde de çekilmiştir.
- 21) Şekil Yeditepe Üniversitesi Hastanesi IVF merkezinde de çekilmiştir.
- 22 ) Robert G. Brzyski, MD, PhD, Jennifer Knudtson M. Female Reproductive Endocrinology - Female Reproductive Endocrinology - Merck Manual Professional Version. Merck Man Prof Gynecology Obstet Published Online First. [merckmanuals.com/professional/gynecology-and-obstetrics/female-reproductive-endocrinology/female-reproductive-endocrinology2013](http://www.merckmanuals.com/professional/gynecology-and-obstetrics/female-reproductive-endocrinology/female-reproductive-endocrinology2013). [http://www\(accessed2 Jun 2015\)](http://www.accessed2).
- 23 ) Johnson MH., *Essential Reproduction* , 6th edn. *Blackwell Publications , Oxford , 2007.*
- 24 ) Minerva Endocrinol. Author manuscript; available in in final edited form as: *Minerva Endocrinol PMC; 2013 Jan 17. Published . 2010 Jun; 35(2): 109–125.*
- 25 ) Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reprod Biomed Online 2014;28:714–22. doi:10.1016/j.rbmo.2014.02.003*
- 26 ) Yding Andersen C, Vilbourn Andersen K. Improving the luteal phase after ovarian stimulation: reviewing new options. *Reprod Biomed Online 2014;28:552–9. doi:10.1016/j.rbmo.2014.01.012*
- 27 ) Normal physiology of the reproductive system. In *Endocrinology and Metabolism Continuing Education Program, American Association of Clinical Chemistry, November 1982. Copyright 1982 by the American Association for Clinical Chemistry; reprinted with permission.*)
- 28) Regulation of spermatogenesis. an evolutionary biologist's perspective. *(HA2014 May;29:2-16. doi: 10.1016/j.semcd.2014.03.007. Epub 2014 Mar 28.*
- 29) *Mol Reprod Dev. Published 2015 Jun 9. doi: 2015 Sep; 82(9): 635–650 10.1002/mrd.22500*
- 30 ) Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J "Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid". *Nature. (1986). 321 (6072): 776–9. doi:10.1038/321776a0.*

- 31 ) Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Chung J, Ying SY "Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis". *Experimental Biology and Medicine*. (May 2006). 231 (5): 534–44.
- 32 ) Ying SY1, Zhang Z, Furst B, Batres Y, Huang G, Li G.Proc Soc; Activins and activin receptors in cell growth.*Exp Biol Med*. 1997 Feb;214(2):114-22.
- 33 ) Luisi S, Florio P, Reis FM, et al. Inhibins in female and male reproductive physiology: Role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 2005;11:123–35. doi:10.1093/humupd/dmh057
- 34 ) Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F (2005). *Reprod Update* 2005;11:123
- 35 ) Hayes FJ, Hall JE, Boepple PA, et al. Clinical review 96: Differential control of gonadotropin secretion in the human: *endocrine role of inhibin*. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1835–41. doi:10.1210/jcem.83.6.4884
- 36 ) Lewis KA, Gray PC, Blount AL, et al. Betaglycan binds, inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. Nature citation in 2002: *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Oct 31;196(1-2):79-93 *J Neuroendocrinol*. 2012 Jun;24(6):962-72. doi:10.1111/j.1365- 2 826.2012.02289.x
- 37 ) Pol Merkur Lekarski. [The role of inhibins in functions and dysfunctions of female reproduction-- Part II].*[Article in Polish]* 2009 Jun;26(156):676-8
- 38 ) J, Vale W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. (accessed 2 Jun2015; *Science* 1986;234:205–8.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3092356>
- 39 ) . *J Endocrinol* Kishi H, Okada T, Otsuka M, et al. Induction of superovulation by immunoneutralization of endogenous inhibin through the increase in the secretion of follicle-stimulating hormone in the cyclic golden hamster; 1996;151:65–75.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943770> (accessed 2 Jun2015).
- 40 ) Pol Merkur Lekarski The role of inhibins in functions and dysfunctions of female reproduction. Part I ; 2009 Mar;26(153):258-62.*[Article in Polish]*
- 41 ) Raivio T, Dunkel L. Inhibins in childhood and puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16:43–52. doi:10.1053/beem.2001.0179
- 42 ) Rabinovici J, Goldsmith PC, Roberts VJ, et al. Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1141–9. doi:10.1210/jcem-73-5-1141
- 43 ) Anderson RA, Cambray N, Hartley PS, et al. Expression and localization of inhibin alpha, inhibin/activin betaA and betaB and the activin type II and inhibin beta-glycan receptors in the developing human testis. *Reproduction* 2002;123:779–88.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052232> (accessed 2 Jun2015).
- 44 ) Muttukrishna S, Jauniaux E, McGarrigle H, et al. In-vivo concentrations of inhibins, activin A and follistatin in human early pregnancy. *Reprod Biomed* 2004;8:712–9.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15169590> (accessed 2 Jun2015).

- 45 ) De Schepper J, Verlinde F, Cortvrindt R, Eur J Pediatr et al. Serum inhibin B in normal term-born male and female neonates during the first week of life. (*accessed 2 Jun2015*);159:465–9.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867856>
- 46 ) Chada M, Průsa R, Bronský J, et al. Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone during childhood and puberty in males: changes in serum concentrations in relation to age and stage of puberty. *Physiol Res*(*accessed 2 Jun2015*). ;52:45–51.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12625806>
- 47 ) Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M J Clin , et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *Endocrinol Metab* 1996;81:1401–5. doi:10.1210/jcem.81.4.8636341
- 48 ) Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, et al. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2742–5. doi:10.1210/jcem.81.7.8675606
- 49 ) Reame NE, Wyman TL, Phillips DJ, et al. Net increase in stimulatory input resulting from a decrease in inhibin B and an increase in activin A may contribute in part to the rise in follicular phase follicle-stimulating hormone of aging cycling women. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3302–7. doi:10.1210/jcem.83.9.5130
- 50 ) Kinniburgh D, Anderson RA. Differential patterns of inhibin secretion in response to gonadotrophin stimulation in normal men. *Int J Androl* 2001;24:95–. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298843> (*accessed 2 Jun2015*).
- 51 ) Eur J Surg Sci 2011;2(2):32-3732.Selen TAFLAN1, Ebru ZÜLFİKAROĞLU, Sevtap KILIÇ1 Follicular Fluid or Serum Level of Inhibin-B: Which One is an Effective Marker of Follicular Development in IVF Patients ; July 31, 2011 • Accepted: August 06, 2011 1 Department of Obstetrics and Gynecology, Ankara Dr. Zekai Tahir Burak Women's Teaching and Research Hospital, Ankara, Turkey(70)
- 52 ) Iliodromiti S, Nelson SM. Biomarkers of ovarian reserve. *Biomark Med*2013;7:14758. doi:10.2217/bmm.12.97
- 53 ) Frydelund-Larsen L, Krausz C, Leffers H, et al. Inhibin B: a marker for the functional state of the seminiferous epithelium in patients with azoospermia factor C microdeletions. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5618–24. doi:10.1210/jc.2002-020737.*Ann Med.* 2003;35(1):12-20 *Inhibin B: a novel marker of spermatogenesis Pierik FH1, Burdorf A, de Jong FH, Weber RF*
- 54 David Handelsman Valeri, Claraa; Schteingart, Helena F.a; Rey, Rodolfo A.a,b Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity: *ANDROGENS: Edited June 2013 - Volume 20 - Issue 3 - p 224–233*doi: 10.1097/MED.0b013e328360be2c
- 55 ) Toulis K a., Iliadou PK, Venetis C a., et al. Inhibin B and anti-Müllerian hormone as markers of persistent spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia: A meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Hum Reprod Update* 2010;16:713–24. doi:10.1093/humupd/dmq024
- 56 ) Ding C, Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping. *Methods Mol Biol* 2009;578:245–54. doi:10.1007/978-1-60327-411-1\_16

- 57 ) Surgery. Author manuscript; available in PMC 2011 Apr 1. Published in final edited form as: *Surgery*. 2010 Apr; 147(4): 469–474. Published online 2009 Dec 3. doi: 10.1016/j.surg.2009.10.026
- 58 ) Winchester L, Yau C, Ragoussis J. Comparing CNV detection methods for SNP arrays. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2009;8:353–66. doi:10.1093/bfgp/elp017
- 59 ) The American Journal of Human Genetics. 77 (1): 78–88. doi:10.1086/431652)
- 60 ) Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update*;8:413–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12398222> (accessed 2 Jun 2015).
- 61 ) Asatiani K, Gromoll J, Eckardstein S V, et al. Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men. *Andrologia* 2002;34:172–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12059813> (accessed 2 Jun 2015).
- 62 ) Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. Simoni M1, Nieschlag E, Gromoll J. *Hum Reprod Update*. 2002 Sep-Oct;8(5):413-21. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Aug; 97(8): E1524–. Published online 2012 Jun 1. doi: 10.1210/jc.2012-1427
- 63 ) Richter-Unruh A, Martens JWM, Verhoef-Post M, et al. Leydig cell hypoplasia: cases with new mutations, new polymorphisms and cases without mutations in the luteinizing hormone receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;56:103–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849253> (accessed 2 Jun 2015).
- 64 ) LH-Receptor Gene Expression in Human Granulosa and Cumulus Cells from Antral and Preovulatory Follicles Janni Vikkelsø Jeppesen, Stine Gry Kristensen, Maria Eilsø Nielsen, Peter Humaidan, Maria Dal Canto, Rubens Fadini, Kirsten T. Schmidt, Erik Ernst, and Claus Yding Andersen *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Aug; 97(8): E1524–E1531. Published online 2012 Jun 1. doi: 10.1210/jc.2012-1427? July 31, 2011 • Accepted: August 06, 2011 *Eur J Surg Sci* 2011;2(2):32-3732
- 65) Lejeune H, Chuzel F, Sanchez P, Durand P, Mather JP, Saez JM "Stimulating effect of both human recombinant inhibin A and activin A on immature porcine Leydig cell functions in vitro". *Endocrinology*. (November 1997). 138 (11): 4783–91. PMID 9348206. doi:10.1210/en.138.11.4783. Jump up ^
- 66) Pierson TM, Wang Y, DeMayo FJ, Matzuk MM, Tsai SY, Omalley BW "Regulable expression of inhibin A in wild-type and inhibin alpha null mice". *Mol. Endocrinol*. (July 2000). 1075–85. PMID 10894156. doi:10.1210/me.14.7.1075. Jump up ^
- 67) Chong H, Pangas SA, Bernard DJ, Wang E, Gitch J, Chen W, Draper LB, Cox ET, "Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system". *Endocrinology*. Woodruff TK (July 2000). 141 (7): 2600–7. PMID 10875264. doi:10.1210/en.141.7.2600. Jump up ^
- 68) Bernard DJ, Chapman SC, Woodruff TK (February 2002). "Inhibin binding protein (InhBP/p120), betaglycan, and the continuing search for the inhibin receptor". *Mol. Endocrinol*. 16 (2): 207–12. PMID 11818494. doi:10.1210/me.16.2.207.

- 69 ) Raja-Khan N, Kunselman AR, Demers LM, et al. A variant in the fibrillin-3 gene is associated with TGF- $\beta$  and inhibin B levels in women with polycystic ovary syndrome. ;*Fertil Steril* 2010;94:2916–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.05.047
- 70) Witt S, Neumann J, Zierdt H, Gebel G, Röscheisen C, Establishing a novel automated magnetic bead-based method for the extraction of DNA from a variety of forensic samples. ;*Forensic Sci Int Genet*, 2012; 6(5): 539-457.
- 71 ) Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, Zhu L, Wu G, Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem*. 2014; 451: 18-24.
- 72 ) Mhlanga, M.M, Malmberg, L. Using molecular beacons to detect singlenucleotide polymorphisms with; *real-time PCR. Methods*, 2001; 25: 463-471.
- 73) Selen TAFLAN1, Ebru ZÜLFİKAROĞLU1, Sevtap KILIÇ Eur J Surg Follicular Fluid or Serum Level of Inhibin-B: *Which One is an Effective Marker of Follicular Development in IVF Patients?* *Sci* 2011;2(2):32-37
- 74) Seifer DB, Lambert LG, Hogan JW, et al. Day 3 serum inhibin B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. ;*Fertil Steril* 1997; 67: 110-4
- 75) Wunder DM, Guibourdenche J, Birkhäuser MH, Bersinger NA. Anti-Müllerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. ;*Fertil Steril* 2008; 90: 2203-10
- 76) Ebrahim A1, Rienhardt G, Morris S, Kruger TF, Lombard CJ, Van der Merwe JP., J Assist Reprod Genet. Follicle stimulating hormone ;*levels on cycle day 3 predict ovulation stimulat ion response*.1993 Feb;10(2):130-6.
- 77) Sang Ho Yoon.Young Min Choi , Min A.Hong ,Jin Ju Kim,Hyoung june Im,Gyoung Hoon Lee,Byung Moon Kang and Shin Yong Moon.*Inhibin a gene promoter polymorphisms in korean women with idiopathic premature ovarian failure*.march 2012.
- 78) "single-nucleotide polymorphism/SNP|LearnScienceat Scitable". www.nature.com. Retrieved 2015-11-1 ;

## 7. EKLER

### 7.1. HAM VERİLER

#### CROSSTABS

```
/TABLES=grup BY Genotip AA AG GG A G  
/FORMAT=AVALUE TABLES  
/STATISTICS=CHISQ KAPPA RISK MCNEMAR  
/CELLS=COUNT EXPECTED ROW COLUMN TOTAL  
/COUNT ROUND CELL.
```

#### Crosstabs

##### Notes

Output Created		24-MAR-2017 08:39:23
Comments		
Input	Data	C:\Users\seda.gulec\Desktop\HABİB TEZ BELGELER 23.03.2017\habib -inhibin tez İstatistik 23.03.2017 SADECE OLGULAR.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	50
	Missing Value Handling	Definition of Missing
	Cases Used	Statistics for each table are based on all the cases with valid data in the specified range(s) for all variables in each table.

Syntax		CROSSTABS /TABLES=grup BY Genotip AA AG GG A G /FORMAT=AVALUE TABLES /STATISTICS=CHISQ KAPPA RISK MCNEMAR /CELLS=COUNT EXPECTED ROW COLUMN TOTAL /COUNT ROUND CELL.
Resources	Processor Time	00:00:00,00
	Elapsed Time	00:00:00,00
	Dimensions Requested	2
	Cells Available	524245

### Warnings

No measures of association are computed for the crosstabulation of grup \* Genotip. At least one variable in each 2-way table upon which measures of association are computed is a constant.

No measures of association are computed for the crosstabulation of grup \* AA. At least one variable in each 2-way table upon which measures of association are computed is a constant.

No measures of association are computed for the crosstabulation of grup \* AG. At least one variable in each 2-way table upon which measures of association are computed is a constant.

No measures of association are computed for the crosstabulation of grup \* GG. At least one variable in each 2-way table upon which measures of association are computed is a constant.

No measures of association are computed for the crosstabulation of grup \* A. At least one variable in each 2-way table upon which measures of association are computed is a constant.



No measures of association are computed for the crosstabulation of grup \* G. At least one variable in each 2-way table upon which measures of association are computed is a constant.

### Case Processing Summary

	Cases		Missing		Total	
	Valid					
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
grup * Genotip	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%
grup * AA	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%
grup * AG	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%
grup * GG	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%
grup * A	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%
grup * G	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%

### grup \* Genotip

#### Crosstab

		Genotip			
		AG	GG	Total	
Grup	Hasta	Count	2	48	50
		Expected Count	2,0	48,0	50,0
		% within grup	4,0%	96,0%	100,0%
		% within Genotip	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	4,0%	96,0%	100,0%
Total		Count	2	48	50
		Expected Count	2,0	48,0	50,0
		% within grup	4,0%	96,0%	100,0%
		% within Genotip	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	4,0%	96,0%	100,0%

### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	a		
McNemar-Bowker Test	.	.	b
N of Valid Cases	50		

a. No statistics are computed because grup is a constant.

b. Computed only for a PxP table, where P must be greater than 1.

### Symmetric Measures

	Value	Asymptotic Standard Error <sup>b</sup>	Approximate T <sup>c</sup>
Measure of Agreement Kappa	,000 <sup>a</sup>	,000	.
N of Valid Cases	50		

a. No statistics are computed because grup is a constant.

b. Not assuming the null hypothesis.

c. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

### Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for grup (hasta /.)	. <sup>a</sup>

a. No statistics are computed because grup is a constant.

### grup \* AA Crosstab

Grup	Hasta	AA		Total
		AA yok		
	Count	50		50
	Expected Count	50,0		50,0
	% within grup	100,0%		100,0%
	% within AA	100,0%		100,0%
	% of Total	100,0%		100,0%
Total	Count	50		50
	Expected Count	50,0		50,0
	% within grup	100,0%		100,0%
	% within AA	100,0%		100,0%
	% of Total	100,0%		100,0%

### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	a		
McNemar-Bowker Test	.	.	b
N of Valid Cases	50		

- a. No statistics are computed because grup and AA are constants.
- b. Computed only for a PxP table, where P must be greater than 1.

**Symmetric Measures**

		Value
Measure of Agreement	Kappa	a
N of Valid Cases		50

- a. No statistics are computed because grup and AA are constants.

**Risk Estimate**

		Value
Odds Ratio for grup (hasta /.)		. <sup>a</sup>

- a. No statistics are computed because grup and AA are constants.

**grup \* AG  
Crosstab**

		AG		Total	
		AG yok	AG var		
Grup	Hasta	Count	48	2	50
		Expected Count	48,0	2,0	50,0
		% within grup	96,0%	4,0%	100,0%
		% within AG	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	96,0%	4,0%	100,0%
Total		Count	48	2	50
		Expected Count	48,0	2,0	50,0
		% within grup	96,0%	4,0%	100,0%
		% within AG	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	96,0%	4,0%	100,0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	a		
McNemar-Bowker Test	.	.	b
N of Valid Cases		50	

- a. No statistics are computed because grup is a constant.

b. Computed only for a PxP table, where P must be greater than 1.

### Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standard Error <sup>b</sup>	Approximate T <sup>c</sup>
Measure of Agreement	Kappa	,000 <sup>a</sup>	,000	.
N of Valid Cases		50		

a. No statistics are computed because grup is a constant.

b. Not assuming the null hypothesis.

c. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

### Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for grup (hasta /.)	. <sup>a</sup>

a. No statistics are computed because grup is a constant.

### grup \* GG Crosstab

		GG		Total	
		GG yok	GG var		
Grup	Hasta	Count	2	48	50
		Expected Count	2,0	48,0	50,0
		% within grup	4,0%	96,0%	100,0%
		% within GG	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	4,0%	96,0%	100,0%
Total		Count	2	48	50
		Expected Count	2,0	48,0	50,0
		% within grup	4,0%	96,0%	100,0%
		% within GG	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	4,0%	96,0%	100,0%

### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	a		

McNemar-Bowker Test	.	.	b
N of Valid Cases	50		

- a. No statistics are computed because grup is a constant.
- b. Computed only for a PxP table, where P must be greater than 1.

### Symmetric Measures

Measure of Agreement	Kappa	Value	Asymptotic Standard Error <sup>b</sup>	Approximate T <sup>c</sup>
		,000 <sup>a</sup>	,000	.
N of Valid Cases		50		

- a. No statistics are computed because grup is a constant.
- b. Not assuming the null hypothesis.
- c. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

### Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for grup (hasta /.)	. <sup>a</sup>

- a. No statistics are computed because grup is a constant.

### grup \* A

#### Crosstab

Grup	Hasta	Count	A		Total
			A YOK	ALLEL VAR	
		Count	48	2	50
		Expected Count	48,0	2,0	50,0
		% within grup	96,0%	4,0%	100,0%
		% within A	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	96,0%	4,0%	100,0%
Total		Count	48	2	50
		Expected Count	48,0	2,0	50,0
		% within grup	96,0%	4,0%	100,0%
		% within A	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	96,0%	4,0%	100,0%

### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	a		
McNemar-Bowker Test	.	.	b
N of Valid Cases	50		

a. No statistics are computed because grup is a constant.

b. Computed only for a PxP table, where P must be greater than 1.

1.

### Symmetric Measures

	Value	Asymptotic Standard Error <sup>b</sup>	Approximate T <sup>c</sup>
Measure of Agreement Kappa	,000 <sup>a</sup>	,000	.
N of Valid Cases	50		

a. No statistics are computed because grup is a constant.

b. Not assuming the null hypothesis.

c. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

### Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for grup (hasta /.)	. <sup>a</sup>

a. No statistics are computed because grup is a constant.

grup \* G

Crosstab

G

Total

		G ALLEL VAR		
Grup	Hasta	Count	50	50
		Expected Count	50,0	50,0
		% within grup	100,0%	100,0%
		% within G	100,0%	100,0%
		% of Total	100,0%	100,0%
Total		Count	50	50
		Expected Count	50,0	50,0
		% within grup	100,0%	100,0%
		% within G	100,0%	100,0%
		% of Total	100,0%	100,0%

### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	a		
McNemar-Bowker Test	.	.	b
N of Valid Cases	50		

a. No statistics are computed because grup and G are constants.

b. Computed only for a PxP table, where P must be greater than 1.

### Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standard Error <sup>b</sup>	Approximate T <sup>c</sup>
Measure of Agreement	Kappa	,000 <sup>a</sup>	,000	.
N of Valid Cases		50		

a. No statistics are computed because grup and G are constants.

b. Not assuming the null hypothesis.

c. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

### Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for grup (hasta /.)	. <sup>a</sup>

a. No statistics are computed because grup and G are constants.

/VARIABLES=FSH Oocyte M\_Oocyte  
/CRITERIA=CI(.95).

DESCRIPTIVES VARIABLES=Age FSH Oocyte M\_Oocyte  
/STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.

## Descriptives

### Notes

Output Created		24-MAR-2017 08:50:40
Comments		
Input	Data	C:\Users\seda.gulec\Desktop\HABİB TEZ BELGELER 23.03.2017\habib -inhibin tez İstatistik 23.03.2017 SADECE OLGULAR.sav
	Active Dataset	DataSet3
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	50
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	All non-missing data are used.
Syntax		DESCRIPTIVES VARIABLES=Age FSH Oocyte M_Oocyte /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
Resources	Processor Time	00:00:00,02
	Elapsed Time	00:00:00,02

### Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Age	50	23,00	39,00	32,1200	4,03879
FSH	50	2,56	16,22	7,0558	2,57568
Oocyte	50	1,00	22,00	8,0200	5,33946



M_Oocyte	50	,00	17,00	6,5800	4,89935
Valid N (listwise)	50				

T-TEST GROUPS=YAŞARALIĞI(0 1)  
 /MISSING=ANALYSIS  
 /VARIABLES=FSH Oocyte M\_Oocyte  
 /CRITERIA=CI(.95).

### T-Test

#### Notes

Output Created		24-MAR-2017 08:50:56
Comments		
Input	Data	C:\Users\seda.gulec\Desktop\HABİB TEZ BELGELER 23.03.2017\habib -inhibin tez İstatistik 23.03.2017 SADECE OLGULAR.sav
	Active Dataset	DataSet3
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	50
	Missing Value Handling	Definition of Missing
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST GROUPS=YAŞARALIĞI(0 1) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=FSH Oocyte M_Oocyte /CRITERIA=CI(.95).
Resources	Processor Time	00:00:00,00
	Elapsed Time	00:00:00,00

### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
FSH	Equal variances assumed	,080	,779	-2,723	48	,009	-2,12626	,78090	-3,69635	-,55616
	Equal variances not assumed			-2,484	18,126	,023	-2,12626	,85604	-3,92384	-,32867
Oocyte	Equal variances assumed	7,041	,011	3,757	48	,000	5,74428	1,52902	2,66998	8,81859
	Equal variances not assumed			5,085	42,017	,000	5,74428	1,12973	3,46442	8,02415
M_Oocyte	Equal variances assumed	3,188	,081	3,371	48	,001	4,83784	1,43512	1,95234	7,72334
	Equal variances not assumed			4,116	32,614	,000	4,83784	1,17550	2,44519	7,23049

## T-Test

### Notes

Output Created		24-MAR-2017 08:51:14
Comments		
Input	Data	C:\Users\seda.gulec\Desktop\HABİB TEZ BELGELER 23.03.2017\habib -inhibin tez İstatistik 23.03.2017 SADECE OLGULAR.sav
	Active Dataset	DataSet3
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	50
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST GROUPS=OOSİTSAYIAR ALIĞI(0 1) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=FSH Oocyte M_Oocyte /CRITERIA=CI(.95).
Resources	Processor Time	00:00:00,00
	Elapsed Time	00:00:00,00

### Group Statistics

	OOSİTSAYIARALI ĞI	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
FSH	<=3 OOSİT	11	8,4845	3,21426	,96914
	3' den fazla oosit	39	6,6528	2,25348	,36085
Oocyte	<=3 OOSİT	11	1,8182	,40452	,12197
	3' den fazla oosit	39	9,7692	4,73765	,75863
M_Oocyte	<=3 OOSİT	11	,6364	,80904	,24393
	3' den fazla oosit	39	8,2564	4,20349	,67310

### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
FSH	Equal variances assumed	,855	,360	2,160	48	,036	1,83172	,84818	,12634	3,53711
	Equal variances not assumed			1,771	12,900	,100	1,83172	1,03413	-,40415	4,06760
Oocyte	Equal variances assumed	18,504	,000	-5,520	48	,000	-7,95105	1,44048	-10,84733	-5,05477
	Equal variances not assumed			-10,348	39,889	,000	-7,95105	,76837	-9,50412	-6,39797

M_Oocyte	Equal variances assumed	16,014	,000	-5,939	48	,000	-7,62005	1,28305	-10,19980	-5,04030
	Equal variances not assumed			-10,643	45,645	,000	-7,62005	,71594	-9,06145	-6,17864

## Frequencies

### Notes

Output Created	24-MAR-2017 08:56:36	
Comments		
Input	Data	C:\Users\seda.gulec\Desktop\HABİB TEZ BELGELER 23.03.2017\habib -inhibin tez İstatistik 23.03.2017 SADECE OLGULAR.sav
	Active Dataset	DataSet3
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	50
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data.
Syntax	FREQUENCIES VARIABLES=Genotip AA AG GG A G /STATISTICS=STDDEV MEAN /ORDER=ANALYSIS.	
Resources	Processor Time	00:00:00,02
	Elapsed Time	00:00:00,03

## Statistics

		Genotip	AA	AG	GG	A	G
N	Valid	50	50	50	50	50	50
	Missing	0	0	0	0	0	0
Mean		1,9600	,0000	,0400	,9600	,0400	1,0000
Std. Deviation		,19795	,00000	,19795	,19795	,19795	,00000

## Frequency Table

### Genotip

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	AG	2	4,0	4,0	4,0
	GG	48	96,0	96,0	100,0
	Total	50	100,0	100,0	

### AA

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	AA yok	50	100,0	100,0	100,0

### AG

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	AG yok	48	96,0	96,0	96,0
	AG var	2	4,0	4,0	100,0
	Total	50	100,0	100,0	

### GG

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	GG yok	2	4,0	4,0	4,0
	GG var	48	96,0	96,0	100,0

Total	50	100,0	100,0	
-------	----	-------	-------	--

**A**

			Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	ALLEL YOK	48	96,0	96,0	96,0
	A	ALLEL VAR	2	4,0	4,0	100,0
	Total		50	100,0	100,0	

**G**

			Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	G	ALLEL VAR	50	100,0	100,0	100,0

## 7.2. FORMLAR

### 7.2.1. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

#### Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Sayın Hastamız,

- Bu belge bilgilendirilme ve aydınlatılmış onam haklarınızdan yararlanabilmenizi amaçlamaktadır.
- Size gerçekleştirilebilecek klinik araştırmalar amaçlı girişimler konusunda, tüm seçenekler ile bu girişimlerin yarar ve muhtemel zararları konusunda anlayabileceğiniz şekilde **bilgi alma hakkınız ve bir kopyasını isteme hakkınız** vardır.
- Yasal ve tıbbi zorunluluk taşıyan durumlar dışında **bilgilendirmeyi reddedebilirsiniz**. Yazılı bildirmek koşulu ile bilgi almama veya yerinize güvendiğiniz bir kimsenin bilgilendirilmesini talep etme hakkına sahipsiniz.
- klinik araştırmalara katılım konusunda bilgilendirildikten sonra bunu kabul edebilirsiniz. Ya da **karar verebilmek için uygun zaman talep edebilirsiniz**.
- Hayatınız veya hayati organlarınız tehlikede olmadığı sürece onamınızı (yazılı talep etme koşulu ile) **dilediğiniz zaman geri alabilir** ya da önceden kabul etmediğiniz herhangi bir tanı/tedavi amaçlı girişimi **tekrar talep edebilirsiniz**.
- Hastanemizde verilen hizmetleri **Hastane Tanıtım Broşüründen** edinebilirsiniz. Ayrıca Hastane personeli hakkında <http://www.yeditepehastanesi.com.tr/> ve [www.sureyyapasa.gov.tr/](http://www.sureyyapasa.gov.tr/) web sayfalarından daha detaylı bilgilere ulaşabilirsiniz.
- Burada belirtilenlerden başka sorularınız varsa bunları yanıtlamak görevimizdir.

#### TANIMLAMA

**Araştırmanın Adı:** Konu: INHİBİN POLİMORFİZMİNİN TÜP BEBEK TEDAVİSİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Araştırmaya Katılımcı Sayısı:** 100

**Bu araştırmanın Amacı:** Bu çalışmada bizim amacımız, Primer İnfertilite tanısı konulan ve IVF tedavisi gören hastalarda, İnhibin proteininin özellikle beta-A alt ünitesini kodlayan INHBA gen polimorfizmlerinin serum FSH ve matür oosit miktarı ile ilişkisinin araştırılarak inhibin gen polimorfizmlerinin tüp bebek tedavisine yanıtta rol oynayıp oynamadığının incelenmesidir.

**Süresi:** 1 Yıl

**İzlenecek Yöntem/Yöntemler:**

Yöntem:

DNA ELDESI;

Primer IVF Tanısı konulmuş hastalarda 5ml EDTA 'lı tüplere yaklaşık 350 ml'lik periferik kan alınacaktır DNA izolasyonu için (iPrep Pure link, invitrogen ) izolasyon robotu kullanılacaktır. Elde



edilen DNA' ların konsantrasyonları nanodrop (Themoscientific) cihazı ile belirlenecektir. Safılık ölçümleri için Nano Drop cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçüm yapılacaktır. DNA ' lar çalışma gününe kadar +4 C' de bekletilecektir.

#### GENOTİP ANALİZİ :

Inhibin genotiplemesi applied bioscience 7500 Fast Real Time cihazı kullanılarak Real time PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile yapılacak ve hedef varyasyonlarındaki olası mutasyonların belirlenebilmesi için özel pirimer dizileri kullanılacaktır.

#### İSTATİKSEL ANALİZ :

Çalışmanın istatistiki analizi için SPSS 21.0 kullanılacak Hasta gurubu ve control gurubu katılımcılarının karşılaştırılmalarında allel fonksiyonlarının ve genotiplerin karşılaştırılması için ki kare testi kullanılacaktır. Hasta ve control gurubu anlamlılık ölçümü için student ' s t test kullanılacaktır. Anlamlılık seviyesi  $p < 0,05$  kabul edilecektir.

**Araştırma Sonunda Beklenen Fayda** Bu çalışmada bizim amacımız,Primer Infertilite tanısı konulan ve IVF tedavisi gören hastalarda, Inhibin proteininin özellikle beta-A alt ünitesini kodlayan INHBA gen polimorfizmlerinin serum FSH ve matür oosit miktarı ile ilişkisinin araştırılarak inhibin gen polimorfizmlerinin tüp bebek tedavisine yanıtta rol oynayıp oynamadığının incelenmesidir.

Primer Infertilite, bir çiftin minimum 1 yıl boyunca korunmasız ilişkiye rağmen hamileliğin sağlanamaması veya hamile kalınsa bile düşüklerin oluşması durumunda konulan tanıdır. Dolayısıyla 1 yıl boyunca hem hamile kalamayan hem de spontane düşükler ve ölü doğumlar yapan kadınlar primer infertilite tanısı almaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle primer infertilitede genetik faktörlerin önemine değinilmektedir. Ayrıca folüküler stümulan Hormon başta olmak üzere çeşitli genlerin mutasyonlarının primer infertilitede rol oynadıkları gözükümüştür. Yapılan çalışmalarda başta Foliküler Stimulan Hormon olmak üzere çeşitli genlerin mutasyonlarının primer infertilitede rol oynadıkları gözükümüştür (1) .

TGF-b süperailisine ait olan Inhibin Proteini, disülfid bağlarıyla dimerik yapıda bulunan ve alfa, beta-A, beta-B, beta-C ve beta-E alt üniteri bulunan bir protein olup, en önemli özelliği gonadlardan ve hipofiz bezinden FSH sentezini downregüle etmesi ve FSH salgısını inhibe etmesidir (2). Inhibin beta-A alt ünitesi Alfa alt ünitesiyle birleşerek hipofiz-FSH inhibitörü oluştururlar. Son çalışmalarda serum Inhibin seviyesinin tüp bebek tedavisinin uygulanmasında önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir (3).

Bu çalışmada bizim amacımız,Primer Infertilite tanısı konulan ve IVF tedavisi gören hastalarda, Inhibin proteininin özellikle beta-A alt ünitesini kodlayan INHBA gen polimorfizmlerinin serum FSH ve matür oosit miktarı ile ilişkisinin araştırılarak inhibin gen polimorfizmlerinin tüp bebek tedavisine yanıtta rol oynayıp oynamadığının incelenmesidir.

**Bu Çalışmada Herhangi Bir Alternatif Tedavi yada Girişimde Bulunulmayacaktır.**

**Bu Araştırma Gönüllüler İçin Hiçbir Risk Teşkil Etmemekte ve Hiçbir Rahatsızlığa Sebep olmamaktadır.**

**ONAM (RIZA)**

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu durumda hastanenin çalışma düzeni ve hastalara verilen bakımda aksaklık olmayacağı konusunda bilgilendirildim. Bu araştırmaya katılırken zorlama, maddi çıkar ve ast üst ilişkisine dayalı herhangi bir baskı olmaksızın bu çalışmaya katıldığımı beyan ederim. Bu bilimsel çalışmanın devamı esnasındaki süreçle ilgili olarak ayrıca eklenen çalışma protokolü ile bilgilendirildim. Tarafımdan alınan kan ve doku örneklerinin daha sonra başka araştırma çalışmalarında kullanılmasında herhangi bir sakınca yoktur.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

**Gönüllünün:**

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

**Açıklamaları Yapan Kişinin:**

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

**Gerekliyse Otur İşlemine Tanık Olan Kişinin:**

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

**Gerekliyse Yasal Temsilcinin :**

Adı Soyadı:

İmzası:

## 7.2.2. BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU

Biyolojik Materyal Transfer Formu 1  
(Biological Material Transfer Form)  
01.09.2015 Versiyon 1.0

### KLİNİK ARAŞTIRMALARDA KULLANILACAK BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER ANLAŞMASI

### AGREEMENT FOR TRANSFER OF BIOLOGICAL MATERIAL TO BE USED IN CLINICAL TRIALS

Araştırmanın Açık Adı: İNHİBİN POLİMORFİZMİNİN TÜP BEBEK TEDAVİSİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Full name of the clinical trial:

Protokol Numarası :

Protocol code :

Summary of the clinical trial:

**Araştırmanın Özeti :** Primer infertilite, bir çiftin minimum 1 yıl boyunca korunmasız ilişkiye rağmen hamileliğin sağlanamaması veya hamile kalınsa bile düşüklerin oluşması durumunda konulan tanıdır. Dolayısıyla 1 yıl boyunca hem hamile kalamayan hem de spontane düşüklükler ve ölü doğumlar yapan kadınlar primer infertilite tanısı almaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle primer infertilitede genetik faktörlerin önemine değinilmektedir. Ayrıca foliküler stümulan Hormon başta olmak üzere çeşitli genlerin mutasyonlarının primer infertilitede rol oynadıkları gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda başta Foliküler Stümulan Hormon olmak üzere çeşitli genlerin mutasyonlarının primer infertilitede rol oynadıkları gözlemlenmiştir (1).

Click here on enter text

By this agreement, the investigator and the institution who send the biological material requires the CONSIGNEE and CONSIGNOR to agree on the below terms before sending (Specify biological material type and amount) which shall be used for to be dispatched to the address of

TGF- $\beta$  süperailisine ait olan İnhibin Proteini, disülfid bağlarıyla dimerik yapıda bulunan ve alfa, beta-A, beta-B, beta-C ve beta-E alt üniteleri bulunan bir protein olup, en önemli özelliği gonadlardan ve hipofiz bezinden FSH sentezini downregüle etmesi ve FSH salgısını inhibe etmesidir (2). İnhibin beta-A alt ünitesi Alfa alt ünitesiyle birleşerek hipofiz-FSH inhibitörü oluştururlar. Son araştırmalarda serum İnhibin seviyesinin tüp bebek tedavisinin uygulanmasında önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir (3).  
Bu çalışmada bizim amacımız, Primer infertilite tanısı konulan ve IVF tedavisi gören hastalarda, İnhibin proteininin özellikle beta-A alt ünitesini kodlayan İNHBA gen polimorfizmlerinin serum FSH ve matür oosit miktarı ile ilişkisinin araştırılarak inhibin gen polimorfizmlerinin tüp bebek tedavisine yanıtta rol oynayıp oynamadığının incelenmesidir.

1. Delivered biological materials shall be used only for the above-mentioned purposes. CONSIGNEE shall use those materials only for secondary purposes, which are initially approved by the CONSIGNOR in written.
2. Prior to the dispatch of the biological materials to the CONSIGNEE, Turkish Medicines and Medical Devices Agency and Ethics Committee approved informed consent forms, which belong to the persons for whom the biological material is provided, should be obtained. This consent form should explain all the purposes of use of the biological samples.
3. CONSIGNEE cannot provide the biological material to the third parties without prior written approval of the CONSIGNOR.
4. Biological materials shall be dispatched by the CONSIGNOR to the CONSIGNEE without the identity or any descriptive information of the individuals.
5. CONSIGNEE shall use the biological materials in accordance with as the United Nations Human Genome and Universal Declaration of Human Rights.
6. CONSIGNEE acknowledges and agrees that the biological materials to be dispatched under this agreement shall be utilized for research purposes and have some risks associated with their usage. Appropriate preventive actions should be taken for those risks.
7. CONSIGNOR and CONSIGNEE shall mutually agree that the biological materials cannot be used as a source for any commercial profit and the rights relating to a joint publication or a patent right that may arise may be the only exception for that. CONSIGNOR and CONSIGNEE shall mutually agree on those rights prior to trial initiation.
8. CONSIGNEE agrees to return or dispose of all materials and to evidence such acts accordingly in the event of termination of the agreement or withdrawal of written consent of the volunteer referred in Item 2.
9. This agreement shall be terminated in the event of, termination of the trial, violation on the terms of related regulations or noncompliance with agreement clauses of either of the parties.
10. CONSIGNEE and CONSIGNOR shall be responsible from the execution of this Agreement and performances hereunder. In case of conflict, both countries of the parties' courts are authorized.

Metin girmek için burayı tıklayın.

İşbu anlaşma ile biyolojik materyali gönderen araştırmacı ve kurum "İNHİBİN POLİMORFİZMİNİN TÜP BEBEK TEDAVİSİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" isimli araştırmada kullanılmak üzere gönderilecek 5ml miktarda araştırma amacı ile kullanılması üzere Yeditepe Üniversitesi 26 Ağustos Yerleşkesi adresindeki Tıbbi Biyoloji merkezine göndermeden önce GÖNDERİCİ ve ALICI'danaşağıdaki koşulları kabul etmesi istenmektedir;

1. Gönderilen biyolojik materyaller yalnızca yukarıda yazılı amaç için kullanılabilir. ALICI biyolojik materyallerin alınma amacından dışında ikincil amaç için kullanıma isteklerini GÖNDERİCİ'ye yazılı olarak bildirecektir.
2. Biyolojik materyaller ALICI'ya gönderilmeden önce biyolojik materyalin sağlandığı gönüllülere ait Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu ve Etik Kurul'un onayladığı tüm kullanım amaçlarına yönelik olarak düzenlenmiş bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun her bir gönüllüden alınmış olması gerekmektedir.
3. ALICI biyolojik materyali GÖNDERİCİ'nin yazılı izni olmadan üçüncü kişilere veremeyecektir.
4. Biyolojik materyaller GÖNDERİCİ tarafından bireyin kimlik ve tanımlayıcı bilgileri olmaksızın ALICI'ya gönderilecektir.
5. ALICI biyolojik materyalleri Birleşmiş Milletler İnsan Genomu ve İnsan Hakları Evrensel

## Biyolojik Materyal Transfer Formu 2

(Biological Material Transfer Form)

01.09.2015 Versiyon 1.0

Beyannamesine uygun olarak kullanacaktır.

- Bu anlaşma ile gönderilecek biyolojik materyalin araştırma için kullanılacak olduğu ve biyolojik materyal kullanımına ait risklerin var olduğu ALICI tarafından kabul edilmektedir. Söz konusu risklere karşı uygun önlemlerin alınması gerekmektedir.
- GÖNDERİCİ ve ALICI gönderilen biyolojik materyalin herhangi bir şekilde ticari kazanç kaynağı olarak kullanılmayacağı ancak elde edilebilecek fikri mülkiyet ve patent haklarının bu durumdan istisna olduğu kabul etmektedir. GÖNDERİCİ ve ALICI söz konusu haklarını araştırma başlangıcında karşılıklı olarak belirleyecektir.
- ALICI bu anlaşmanın sonlanması veya biyolojik materyalin sağlandığı gönüllülere ait anlaşmanın 2. maddesinde belirtilen olurun geri çekilmesi halinde bütün materyalleri geri vermeyi veya ortadan kaldırmayı ve bunu belgelemeyi kabul eder.
- Bu anlaşma, araştırmanın sonlanması, ilgili mevzuat hükümlerine uyulmaması veya ilgili tarafların anlaşma hükümlerine uymaması durumlarında son bulacaktır.
- Bu anlaşmanın yürütülmesinde ALICI ve GÖNDERİCİ yetkilileri sorumludur. Anlaşmazlık halinde ihtilafın çözümü için her iki ülke mahkemeleri de yetkilidir.

### BİYOLOJİK MATERYALİ GÖNDEREN ARAŞTIRMACI BİLGİSİ

Adı Soyadı ve Unvanı : Rukset Altar  
Uzmanlık Alanı : Kadın Hastalıkları ve Doğum  
Kurumu : Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı  
Adresi : İçerenköy Mahallesi Hastane Yolu Sokak no:102-104 Ataşehir-İstanbul  
Telefon : 05378401900  
Faks :  
E-posta :ruksetaltar@hotmail.com

### BİYOLOJİK MATERYALİ ALAN ALICI BİLGİSİ

Adı Soyadı ve Unvanı :  
Uzmanlık Alanı :  
Kurumu :  
Adresi :  
Telefon :  
Faks :  
E-posta :

Bu anlaşmada belirtilen koşulları okudum ve anladım. Gönderilen materyalde bu anlaşmada belirtilen koşullara uyacağımı taahhüt ederim.

	GÖNDERİCİ	ALICI
--	-----------	-------

### INFORMATION REGARDING THE INVESTIGATOR SENDING THE BIOLOGICAL MATERIAL

Name Surname and Title :  
Specialization :  
Institution :  
Address :  
Telephone :  
Fax :  
E-mail :

### INFORMATION REGARDING THE CONSIGNEE RECEIVING THE BIOLOGICAL MATERIAL

Name Surname and Title :  
Specialization :  
Institution :  
Address :  
Telephone :  
Fax :  
E-mail :

I read and understood the terms under this agreement. I hereby agree and undertake that I will act in accordance with the terms of this agreement with respect to the dispatched materials.

	CONSIGNOR			CONSIGNEE
	Consignor Investigator	Consignor Sponsor Company Official or Legal Representative	Chief/ Head of the Department	Chief Officer of the Institution/ Rector or Assigned Person
Name Surname and Title in Handwriting				Consignee Institution Official
Date				
Signature				

Note: Instead of the signature of the consignee representative, a signed "end use certificate" including clauses similar to this agreement's to be issued by the consignee institution may also be accepted.

### 7.2.3. OLGU RAPOR FORMU

 YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ	Olgu Rapor Formu
---	------------------

<p>ÇALIŞMAYA /ARAŞTIRMAYA DAHİL <u>EDİLME</u> KRİTERLERİ</p> <p>Deney Grupları Gönüllü Olma Primer IVF Hastası olma 18-40 Yaş aralığında olma Yukarıda belirtilenler haricinde bir hastalığa sahip olmama</p> <p>Kontrol gurubu için; Gönüllü olma Sağlıklı olma (yukarıda belirtilenlerde dahil olmak üzere hiç bir hastalığa sahip olmama) 18-40 yaş aralığında olma</p>
<p>ÇALIŞMAYA /ARAŞTIRMAYA DAHİL <u>EDİLMEME</u> KRİTERLERİ</p> <p>Gönüllü olmama 18-40 yaş aralığı dışında olma Belirtilenler dışında bir hastalığa sahip olma</p>

### 7.3. ETİK KURUL KARARI



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

Sayı : 37068608-6100-15-1218  
Konu: Klinik Araştırmalar  
Etik kurul Başvurusu hk.

05/05/2016

İlgili Makama (Habip Aslan)

Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda görevli Habip Aslan'ın sorumlu olduğu "**Inhibin Polimorfizminin Tüp Bebek Tedavisine Etkisinin Araştırılması**" isimli araştırma projesine ait Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (KAEK) Başvuru Dosyası ( **1193** kayıt Numaralı KAEK Başvuru Dosyası ), Yeditepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından **04.05.2016** tarihli toplantıda incelenmiştir.

Kurul tarafından yapılan inceleme sonucu, yukarıdaki isimi belirtilen çalışmanın yapılmasının etik ve bilimsel açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir ( **KAEK Karar No: 616** ).

Prof. Dr. Turgay ÇELİK

Yeditepe Üniversitesi  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Habip	<b>Soyadı</b>	Aslan
<b>Doğ.Yeri</b>	Pazarcık	<b>Doğ.Tar.</b>	15.11.1976
<b>Uyruğu</b>	Türkiye Cumhuriyeti	<b>TC Kim No</b>	10643341484
<b>Email</b>	<a href="mailto:habibaslan78@gmail.com">habibaslan78@gmail.com</a>	<b>Tel</b>	0506 889 1290 96407700091463

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum Adı	Mez.Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Üniversite</b>	Kafkas Üniversitesi –Fen Edebiyat Fakültesi/Biyoloji	2002
<b>Lise</b>	Atatürk Lisesi	1996

### İş Deneyimi (Sondan Geçmişe Doğru Sıralayım)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
1. Embriyolog	Faruk Medikal city	2015-
2. Embriyolog	Acıbadem -Adana	2014-2014
3. Embriyolog	Bahçeci Tüp Bebek Merkezi	2007-2014

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanlar
İngilizce	Orta	İyi	Orta		

\*Çok İyi, İyi, Orta, Zayıf Olarak Değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>ALES Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Orta

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri)