



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİNDE *FSHR* GENİ
EKZON 10 MUTASYONLARININ OVARYEN CEVABA
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülhan ORHAN ÇAYCI

**Samsun
Haziran-2016**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİNDE FSHR GENİ
EKZON 10 MUTASYONLARININ OVARYEN CEVABA
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülhan ORHAN ÇAYCI

Danışman

Öğr. Gör. Dr. Şengül TURAL

**Samsun
Haziran-2016**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Gülhan ORHAN ÇAYCI tarafından Öğr.Gör. Dr. Şengül TURAL danışmanlığında hazırlanan Yardımcı Üreme Tekniklerinde *FSHR* Geni Ekzon 10 Mutasyonlarının Ovaryen Cevaba Etkisi başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 11/07/2016 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :Yrd. Doç. Dr. Akın TEKCAN, Ahi Evran Üniversitesi

Üye :Öğr. Gör. Dr. Şengül TURAL, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye :Doç. Dr. Davut GÜVEN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye :Yrd. Doç. Dr. Akın TEKCAN, Ahi Evran Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /

Prof. Dr. Ahmet UZUN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile beni yetiştiren, bu tezin gerçekleştirilmesinde, başlangıcından sonuna kadar karşılaştığım problemlerin çözümünde, tez çalışmalarımın istatistiksel analizinde ve her konuda bana yardım ve desteğini büyük özveriyle gösteren çok değerli danışman hocam Öğr.Gör.Dr. Şengül TURAL'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda çalışma grubunun oluşturulmasında yardım ve desteğini özveriyle sağlayan hocam Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezi Sorumlusu Doç. Dr. Davut GÜVEN'e, ayrıca Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezi çalışanlarına yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresi boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sitogenetik Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nurten KARA'ya çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresi boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji Öğretim üyelerine çok teşekkür ederim. Çalışmalarım esnasında birbirimize sürekli destek olup bilgi alışverişinde bulunduğumuz arkadaşlarım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yük. Lis. Öğr. Işıl ÇAKIR ve Elvan YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Yeni nesil DNA dizi analizi uygulamasındaki desteklerinden dolayı KİTAM (Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma Merkezi)'a teşekkür ederiz.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında gösterdikleri sonsuz sabır ve desteklerinden dolayı eşim Aykuthan ÇAYCI'ya, anneme, kayınvalideme, kardeşim Serhan'a ve tüm aileme, Merzifon Karamustafa Paşa Devlet Hastanesi Laboratuvar bölümündeki çalışma arkadaşlarıma ve hemşirelere, Uzm. Dr. Alper ÖZDEMİR ve Uzm. Dr. Göksenin ÜNLÜGÜZEL ÜSTÜN'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.15.029 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİNDE *FSHR* GENİ EKZON 10 MUTASYONLARININ OVARYEN CEVABA ETKİSİ

Amaç: Yardımcı üreme teknikleri tedavisinde yeterli sayıda ve kalitede yumurta elde edilemeyen olgularda *FSH* (Folikül Uyarıcı Hormon) reseptöründeki genetik değişimlerin yumurta oluşumu ve ovulasyona etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp bebek Merkezinde yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören ve istenilen sayı ve kalitede yumurta elde edilemeyen 27 kadın hasta ve sağlıklı gebelik elde edilen 30 kadın kontrol olmak üzere toplam 57 kişiden kan alındı. Kan örneklerinden kit yöntemi ile DNA elde edildikten sonra PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve sonrasında DNA dizileme yöntemleri uygulanarak *FSH* Geni ekzon 10 bölgesi incelendi. Elde edilen sonuçlar SPSS ve Ki-kare analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: *FSHR* geni ekzon 10 bölgesi DNA dizilemesi sonucunda, rs6166 mutant bölgesi bakımından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, rs747317735 bölgesi TT genotipi bakımından istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptandı ($p=0,033$, $\chi^2=6,834$). *FSHR* geni rs747317735 bölgesi T allel frekansı da hasta grubunda kontrol grubundan daha yüksek frekansta saptandı ($p=0,008$, $\chi^2=2,897$). Ayrıca TT genotipine sahip bireylerin primer infertilite grubunda daha yüksek frekansta olduğu saptandı ($T=0,046$).

Sonuç: Çalışmamızın sonucuna göre, yardımcı üreme teknikleri tedavisi sürecinde *FSHR* geni rs747317735 bölgesi bakımından T allelli ve TT genotipine sahip bireylerde yeterli sayıda ve kalitede yumurta oluşturulamadığı ve bu bireylerin primer infertilite bakımından risk grubunda olduğu saptandı. Sonuçların kesinlik kazanması için daha büyük ve farklı popülasyonlarda doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fshr; infertilite; ovulasyon; yardımcı üreme teknikleri

Gülhan ORHAN ÇAYCI, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2016

ABSTRACT

EFFECTS OF *FSHR* GENE EXON 10 MUTATIONS ON OVARIAN RESPONSE IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNIQUES

Aim: We aimed to evaluate the effects of *FSHR* gene variants on the cases of could not have enough and quality ovum during assisted reproductive technics.

Material and Method: We evaluated 57 cases in this study 27 of them could not have quality and enough ovum during assisted reproductive technology in Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, IVF Center and 30 control cases have healthy pregnancy. After DNA isolated from peripheric blood samples of via kit procedure sall the cases. Polimerase Chain Reaction and following DNA sequencing methods performed for *FSHR* gene exon 10 analysis. SPSS and Chi-square analysis performed for statistical analysis.

Results: As a result of DNA sequence, there was no statistical significance rs6166 and study groups. However we detected statistically significant difference between patients and control groups for *FSHR* gene exon 10 rs747317735 variant ($p=0.033$, $\chi^2=6.834$). T allele frequency was also higher in the patient group ($p=0.008$, $\chi^2=2.897$).

Conclusion: During assisted reproductive technics, the patients have T allele or TT genotype of *FSHR* gene rs747317735 variant could not have enough ovum for application. These results should be confirmed by other researches groups. We also found that, frequency of patients have TT genotype was higher in the primery infertile group.

Keywords: Art; fshr; gene infertility; ovulation

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
A	: Adenin
Ala	: Alanin
Arg	: Arjinin
Asn	: Asparajin
Asp	: Aspartate
ATP	: Adenozin 5'-trifosfatın
Bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
Camp	: Adenozin 3',5'-monofosfat
CRE	: cAMP cevap elemanları familyası
CREB	: Siklik AMP düzenleyici protein bağlanma proteini
Cys	: Sistein
E2	: Ostradiol
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ERGIC	: ER-Golgi ara kompleksine
FSH	: Follikül Stimüle edici Hormonu
FSHR	: Follikül Stimüle Hormon Reseptörü
G	: Guanin
Gly	: Glisin
GnRH	: Hipotalamustan gonadotropin-salgılayan hormon

GPCR	: G protein çifti reseptörlerine
Gr	: Gram
GS	: Stimülatuar G proteini
GTP	: Guanosil trifosfat
hCG	: İnsan koryonik gonadotropin
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)
Ile	: İzolosin
INR	: İnitiatör
IUI	: Aşılama
IVF	: İn-vitro fertilizasyon
KOH	: Kontrollü over hiper stimulasyonu
Leu	: Losin
LH	: Lüteinize edici hormon
LI	: Lüteinizasyon inhibitörü
LRR	: Lösün-zengin tekrarlar
M	: Molar
mA	: Miliamper
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
°C	: Santigrat derece
OMİ	: Oosit matürasyon inhibitörü
PCR	: Polimeraz zincirleme reaksiyonu

pg/ml	: Pikogram/ mililitre
PKA	: Protein kinaz A
Pro	: Prolin
QCS	: ER kalite kontrol sistemi
Rpm	: Devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sulfat
Ser	: Serin
SF-1	: Steroidogenik factor-1
SLBS	: Steroidogenik factor-1 (SF-1)-benzeri bağlanma bölgesi
T	: Timin
Taq	: Thermus aquaticus bakterisi
Thr	: Triptofan
TM	: Transmembran bölge
TSH	: Tirotropik hormonu
TSH	: Tiroidi uyarıcı hormon
V	: Volt
Val	: Valin
YÜT	: Yardımcı üreme tekniği
Mg	: Mikrogram
µg/ml	: Mikrogram/ mililitre
µL	: Mikrolitre

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite	3
2.2. Yardımcı Üreme Teknikleri	4
2.2.1. Aşılama	4
2.2.2. IVF (tüp bebek)	4
2.2.3. Mikroenjeksiyon (ICSI)	4
2.2.4. GIFT.....	4
2.2.5. Mikro cerrahi ile sperm aspirasyonu (MESA)	5
2.2.6. Testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE)	5
2.2.7. Perkütan Sperm Aspirasyonu (PESA)	5
2.2.8. Destekli Yuvalama Tedavisi (Assisted Hatching)	5
2.3. Menstrual Döngü ve Endokrin Kontrolü	7
2.3.1. Folliküler Faz	7
2.3.2. Primordial Follikül.....	8
2.3.3. Preantral Follikül	9
2.3.4. Antral Follikül	10
2.4. İki Hücre İki Gonadotropin Sistemi.....	11
2.5. Dominant Follikül Seçimi.....	11
2.6. Preovulatuvar Follikül	13
2.7. Ovulasyon	14
2.8. Luteal Faz.....	15
2.9. Menstrual Faz.....	16
2.10. Ovulasyona Etki Eden Genetik Faktörler	16
2.10.1. Follikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü	17
2.10.2. FSHR'nün Moleküler Yapısı	17
2.10.3. Ekstrasellüler Bölge (N-terminal bölge).....	18

2.10.4. <i>FSHR</i> Geninin Promotoru.....	22
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler.....	28
3.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması	28
3.4. Dna İzolasyon Yöntemi	29
3.4.1. Hazırlık.....	29
3.4.2. Protokol	29
3.5. DNA Miktarının Tayini	30
3.6. <i>FSHR</i> Geni ekzon 10 bölgesi PCR Amplifikasyonu:	30
3.7. Agaroz Jelin Hazırlanışı	30
3.8. Yeni Nesil DNA Dizi Analizi (Nextera XT DNA Kütüphanesi Hazırlama).....	31
3.8.1. Taqment Genomik DNA	31
3.8.2. Kütüphaneyi Çoğaltma.....	31
3.8.3. Kütüphane Yıkaması (Clean Up)	32
3.8.4. Kütüphanelerin Kontrolü.....	33
3.8.5. Kütüphanenin Normalizasyonu	33
3.8.6. Kütüphane Havuzu	34
3.9. Biyoinformatik Analiz	35
3.10. İstatistiksel Değerlendirme	35
4. BULGULAR	37
4.1. Çalışma Grubu İle İlgili Demografik Karakterlerin Değerlendirilmesi	40
4.2. <i>FSHR</i> Yeni nesil DNA Dizi Analizi Sonuçları	41
4.2.1. <i>FSHR</i> Geni Polimorfizmi	41
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
7. KAYNAKLAR	52
8. EKLER	56
8.1. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu Örneği	56
8.2. Etik Kurul	59
9. ÖZGEÇMİŞ	60

1.GİRİŞ

İnfertilite, düzenli koruyucusu olmayan seksüel temastan 12 ay sonra ortaya çıkan bir olgu olarak tanımlanır. (Zegers-Hochschild et al., 2009). Toplumda sağlıklı çiftlerin %10-15 inde infertilite problemi bulunmaktadır ve dünyada 80 milyon çiftten daha fazlası infertildir. (Rosenbluth et al., 2011).

Yetmişli yıllardan itibaren uygulanmaya başlanan in-vitro fertilizasyon (IVF) ve 1992'den itibaren uygulanan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemleri erkek faktör infertilitesi başta olmak üzere günümüzde çeşitli nedenlere bağlı olarak infertilitede kullanılan en yaygın yöntemler olmuştur.

Yardımcı üreme tekniği (YÜT) kullanılacak hastalarda kontrollü over hiper stimulasyonu (KOH) ile çoklu folliküllerin, bunun sonucunda çok sayıda oosit ve embriyoların elde edilebilmesi ile YÜT başarısını arttırmak amaçlanmıştır.

Ovulasyonun gonadotropinlerle uyarılması infertilite tedavisinde başarılı olmakla birlikte, aşılama (IUI: In Utero İnseminasyon) ve tüp bebek (IVF: In vitro Fertilizasyon) uygulanan hastalarda aynı doz gonadotropin uygulamasında farklı sayıda ve kalitede yumurta oluşumu gerçekleşebilmektedir. Farklı kişilerde farklı sayıda ve kalitede yumurta oluşumu tedavi sürecini olumsuz etkileyebilmektedir. Bazı olgularda yetersiz sayıda ve kalitede yumurta oluşumu IUI ya da IVF'nin tekrarlanmasını gerektirmektedir (Swati et al., 2009; Palaban et al., 2014).

Farmakogenetik, her bireyin ayrı bir genetik yapısının olması nedeniyle kişiye özel ilaç tedavisini öngören bir bilim dalıdır. Bireyler arasında var olan genetik farklılıklar, ilaç alımı sonucunda oluşan etkiler, ilacın aktivitesi üzerine en büyük etkiye sahiptir. Farmakogenomik testler ile hastaya uygun olan ilaç ve doz tercihi yapılarak hastaya etkisi olmayan ilaçlara harcanan bütçede ve oluşacak yan etkilerin sağaltımı için harcanan bütçede önemli küçülmeler sağlanmaktadır (Liedo et al., 2014).

Folikül Stimüle edici Hormon (FSH), hipofiz bezinden salgılanan ve doğrudan yumurtalıklar üzerine etki eden bir hormondur; kadında yumurta, erkekte ise sperm gelişimini sağlar. Moleküler Tıp alanındaki çalışmalar göstermiştir ki, sadece FSH seviyesinin ölçülmesi bu hormon ile ilgili olarak yumurta ya da sperm yapımı hakkında yeterli bir değerlendirme sağlamamaktadır. FSH reseptörü üretiminden sorumlu genin analiz edilmesiyle bu genlere ait bazı bozuklukların (mutasyonlar) ve varyasyonların

(polimorfizmler) yumurta yapımının bozulmasına yol açtıkları ortaya konulmuştur (Swati et al., 2009; Palaban et al., 2014).

Bu nedenle çalışmamızda, yardımcı üreme teknikleri ile yeterli sayıda ve kalitede yumurta elde edilemeyen olgularda *FSHR* genindeki değişimlerin yumurta oluşumu ovulasyona etkisinin incelenmesi amaçlandı. İlgili hormon yada hücre içi haberci molekülün yeterince var olması durumunda bile reseptörün yapısında oluşmuş olan genetik bir bozukluk nedeniyle reseptörle etkileşime geçememesi gereken cevabın oluşmasına ya da gerekenden fazla cevap oluşumuna neden olabilmektedir. Dolayısıyla ilacın etkisi kişiden kişiye farklılık göstermekte aynı doz ilaç farklı kalitede yumurta oluşturmasına neden olabilmektedir. Bu çalışmada da ovulasyona (yumurta oluşumuna) *FSHR* (Folikül Stimüle Hormon Reseptörü) genindeki değişimlerin (varyantların) etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmanın sonucunda *FSHR* genindeki ekzon 10 varyantları bakımından kaliteli ve normal sayıda yumurta elde edilen bireylerle, normal gebelik elde edilen bireyler karşılaştırıldığında genetik farklılık saptanırsa, tedavi öncesinde bu genlerin analizinden sonra uygulanacak dozun belirlenmesi IUI ya da IVF tedavisinin başarı oranını yükseltecek, hastaların zaman kaybını ve olumsuz sonuçlardan psikolojik olarak etkilenmesini önleyecek ve aşırı yumurta oluşumu sendromu gibi komplikasyonların önüne geçilmiş olacaktır.

Çalışmamızda, çocuk sahibi olma isteği ile, 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tüp Bebek Merkezine (UYTEM – Üremeye Yardımcı Tedaviler Merkezi) başvuran ve ovulasyon indüksiyonu uygulanan hastalarda *FSHR* geni ekzon 10 rs747317735 bölgesi mutasyon varlığının ovaryen cevaba etkisinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.İnfertilite

İnfertilite, üreme döneminde olan çiftlerin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmadan, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye girmelerine rağmen gebeliğin oluşmaması durumudur (Wright ve ark., 2010). Çiftlerin yaklaşık % 15'inde herhangi bir neden saptanamamaktadır. Bu duruma idiopatik kısırlık (açıklanamayan kısırlık) denmektedir.

Gebeliğin hiç olmadığı durumlara "primer infertilite" denir. Daha önce bir gebeliğin elde edildiği fakat devamında gebeliğin elde edilemediği durumlara ise "sekonder infertilite" denir. Daha önce elde edilmiş olan gebelik gerek normal devam edip canlı doğumla sonuçlanan bir gebelik olabileceği gibi, erken veya geç düşük, dış gebelik gibi istenmeyen türden gebelikler de olabilir.

Bilinen yöntemlerle hamile kalması imkansız olan çiftlere ise "sterilite" denir.

Evlü çiftlerin %15'i kısırdır. Bu durum %40 kadına, %40 erkeğe, %20 oranında ise hem kadın hem erkeğe bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Evliliğin ilk ayında gebelik ihtimali % 20'dir ve bu oran birinci yılın sonuna doğru %80'lere varmaktadır.

Doğal yollardan hamile kalamayan çiftlerde uygulanan tıbbi yöntem ve tedaviler yardımıyla üreme teknikleri (Assisted Reproductive Techniques, ART, YTÜ) olarak adlandırılır. Yardımcı üreme teknikleri ile kadın vücudunda üretilen yumurta hücrelerinin alınarak erkeğin spermi ile laboratuvar ortamında döllenişi ve elde edilen embriyonun kadın rahmi içine geri verilmesi ile gebelik oluşturulması sağlanır.

Geçmişte spermin ya da embriyonun laparoskopi ile tüplerin içine verilmesi (GIFT/ZIFT) gibi teknikler uygulanırken modern tıpta en çok tercih edilen yardımcı üreme teknikleri tüp bebek (IVF) ve mikroenjeksiyondur (ICSI: intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu). Tüp bebek ve mikroenjeksiyon teknikleri arasındaki tek fark dölleniş şeklidir. Tüp bebek yönteminde spermler ve yumurtalar bir araya getirilerek döllenişin spontan olması beklenirken mikroenjeksiyon yönteminde ise her bir yumurtanın içine tek bir sperm mikroskopik olarak katater ile enjekte edilir.

2.2.Yardımcı Üreme Teknikleri

2.2.1. Aşılama

Aşılama, eşin rahmine girmeyen yeterli sayıdaki sağlıklı spermın doğrudan fallop kanalına yerleştirilmesidir. Enjeksiyondan önce sperm daha fazla dölleme yeteneğine sahip olması için laboratuvarda hazırlanır. Aşılama çok düşük sayıda sperm üretildiğinde ya da sağlıklı sperm sayısı azalmış olduğunda uygulanır. Şiddetli erkek infertilitesinde aynı teknik, donör (bir vericiden alınan sperm) sperm ile uygulanabilir. Dünya genelinde donör spermi ile aşılama yapılmış yaklaşık 1 milyon çocuk bulunduğu tahmin edilmektedir. Son yıllarda bu tekniklerle her yıl 20 bin ile 40 bin arasında doğum olmaktadır.

2.2.2. IVF (tüp bebek)

Aşılama gibi IVF ve benzer tekniklerde de sperm, laboratuvar koşullarında uygun şekilde hazırlanarak yumurtalar, en yüksek kalitede hareketli spermle karşılaştırılır. IVF yalnızca kalitesi nispeten iyi ve yeterince hareketli sperm olduğunda uygulanabilir.

2.2.3. Mikroenjeksiyon (ICSI)

ICSI gibi mikroenjeksiyon teknikleri tek bir spermın laboratuvar koşullarında bir yumurtanın içine enjekte edilmesi temeline dayanır. Çok az sayıda ve/veya dölleme yeteneği zayıf sperm olduğunda kullanılır. Bu teknikler spermın yumurtanın içine girmesini kolaylaştırır ve dölleme mikroskop altında yapılır.

2.2.4. GIFT

GIFT, gametlerin (yumurta veya sperm) fallop tüplerine transferi anlamına gelmektedir. Gamet, dişi veya erkeğin üreme hücresidir (yumurta veya sperm). GIFT sırasında sperm ve yumurta bir araya getirilir ve fallop tüplerinden birine veya her ikisine transfer edilir.

Dölleme fallop tüplerinde doğal üremedeki seyrini izler. GIFT'te tedavi basamakları tüp bebek tedavisi gibi yumurtalıkları uyarmakla başlar. Tüp bebekte elde edilen embriyolar 2-3 gün sonra rahime transfer edilir. GIFT'te ise sperm ve yumurtalar fallop tüplerine nakledilir. GIFT için en uygun adaylar, normal, sağlıklı fallop tüplerine sahip kadınlardır. Ayrıca açıklanamayan infertilite, hafif endometriozis, erkek faktörü,

rahim boynuna bağlı veya immünolojik nedenli infertilitede iftler GIFT işlemi için aday olabilirler. GIFT işlemi sırasında fallop tüplerine yerleştirilmeyen ekstra yumurta ve spermeler vücud dışında d llenebilir ve sonraki bir tarihte transfer edilmek üzere dondurulabilir.

2.2.5. Mikrocerrahi İle Sperm Aspirasyonu (MESA)

Testiste normal ya da normale yakın sperm üretimi olduğu halde kanallar tıkalı ya da kanal yoksa sperm kanallarından ince iğnelerle mikroskop altında sperm alınmasıdır. Bu hastalardan mikro cerrahi ile sperm elde edilir. MESA işlemi lokal anestezi (bölgesel uyuşturma) altında uygulanır ve erkek cinsel sağlığına olumsuz bir etkisi yoktur.

2.2.6. Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE)

Sperm kanallarında sperm bulunmadığı ya da sperm kanallarının olmadığı durumlarda sperm testisten alınan bir parça (biyopsi) ile elde edilir. Lokal anestezi altında uygulanan bu işlem ile testisin farklı bölgelerinden küçük doku parçaları alınır. Bu parçalar özel yöntemler ile ayrıştırılarak elde edilen sperm hücreleri ile mikroenjeksiyon işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemin erkek cinsel sağlığına olumsuz bir etkisi yoktur. TESE işlemi menisinde hiç sperm olmayana vakalar dışında menisinde hiç normal yapıda veya canlı spermi olmayan vakaların tedavisinde de uygulanabilir .

2.2.7. Perkütan Sperm Aspirasyonu (PESA)

Genişlemiş olan tıkalı kanala ya da testis dokusuna cilt üzerinden bir iğne ile girerek sperm toplanmasıdır.

2.2.8. Destekli Yuvalama Tedavisi (Assisted Hatching)

Destekli yuvalama tedavisi, gebelik oranlarının (implantasyonun) yükselmesi için yapılan bir mikromanipulasyon metodudur. Burada, embriyolog yumurtanın en dış zarını (zona pellucida) mikroskop altında lazerle açarak bölünmüş embriyonun rahim duvarına tutunmadan önce çıkmasına olanak sağlar. Gebeliğin oluşumunda en önemli basamak gelişen embriyonun anne rahmine tutunmasıdır. Anne rahmine tutunmadan önce embriyonun etrafında bulunan zona adı verilen tabaka incelerek kaybolur ve hücreler dışarıya doğru tomurcuklanarak anne rahmine tutunur. Bu işleme yardımcı olabilmek amacı ile zona tabakasında bir pencere açılabilir. Mekanik veya asit gibi

çeşitli kimyasallar kullanılarak yapılan bu işlem günümüzde embriyoya zarar vermeden lazer yardımı ile gerçekleştirilebilmektedir. Lazer yardımı ile açılan pencereden embriyo içine girilerek fragman adı verilen atıklar temizlenebilmekte ve genetik analiz için hücre örneği alınabilmektedir. Assisted hatching implantasyon etkinliğini artırarak sonuçta daha yüksek gebelik oranı oluşmasını sağlamaktadır.

Hormon terimi ilk kez Bayliss ve Starling tarafından söylenmiştir. Hormonlar, vücudun bir bölgesinde yapıp dolaşım yolu ile organ ve dokulara geçerek onların etkinliğini düzenleyen kimyasal maddelerdir. Şu ana kadar bulunan bütün hormonlar her iki cinsten de bulunur. Cinsiyet farklılığının oluşmasına neden olan bir hormonun varlığı ya da yokluğu değil, o hormonun miktarında ve salınımındaki değişimlerdir. Üreme sisteminin düzgün çalışması, overler ve testislerdeki gerekli hormonların salınımını sağlayan uygun bir genetik programlamayla olur. Hormonlar dolaşımında çok düşük seviyelerde bulunurlar. Düşük seviyelerdeki hormonlar, hedef dokularda, hormona yüksek ilgi ile bağlanan özgün reseptörler ile hedef dokulara hareket ederler. Üreme işlevi; gonadlarda steroid sentezi ve gametogenezi regüle eden hipofiz (pitüiter) kaynaklı gonadotropinler, FSH, LH ve bu iki hormonun çeşitli şekillerde düzenlenmesiyle kontrol edilir (Bükülmez ve Arıcı, 1996).

Ergenlik ve menopoz arasındaki dönemde, hipotalamus-hipofiz bezlerinin kontrolündeki yumurtalık, düzenli olarak aktivite gösterir. Hipotalamustan gonadotropin-salgılayan hormon (GnRH), hipotalamus-hipofiz portal damarlarına pulsatil bir şekilde salgılanır. GnRH regülasyonu ile hipofizin gonadotrop hücreleri pulsatil bir şekilde lüteinize edici hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormonu (FSH) salgılar (Buffet ve Bouchard, 2001). FSH ve LH, overlerdeki follikül gelişimini, ovulasyonu, korpus luteum oluşumunu ve östrojen, progesteron, inhibin A ve inhibin B'nin düzenli olarak salınımını uyarır. FSH salınımının negatif geri bildirimlerle baskılanması, tek bir matür oosit gelişimi için önem arz eder. Menstrüal döngünün folliküler evresi; adet birinci günü başlar, çok sayıda follikülün ön seçimi, dominant follikülün ortaya çıkışı ve endometrial proliferasyon dönemlerini kapsar ve preovulatuvar LH ani artış günü sona erer. LH'daki ani artıştan bir gün sonra luteal faz başlar, korpus luteum formasyonu, progesteron salgılanması ve ilk önce endometriumda implantasyon hazırlığı, gebelik oluşmadığı takdirde, korpus luteumun gerilemesiyle birlikte kan desteğinin kaybı ve kalınlaşan endometrium dokusunun bozulması ile karakterize

menstrüasyon gibi organizeli bir seri değişimlerle karakterizedir (Strauss ve Barbieri, 2006).

2.3. Menstrual Döngü ve Endokrin Kontrolü

Menstrual döngü düzenli aralıklarla görülen siklik adetlerle özgündür. Adetlerin düzenli olması hipotalamus, hipofiz (pituitar bez) ve over arasındaki organizasyona ve buna bağlı olarak hedef organ endometriumdaki siklik değişikliklere bağlıdır. Her bir siklus adetin 1.günü başlar ve bir sonraki adetin başlayacağı gün öncesi sona erer. Ortalama siklus 28 gündür (Kutlukhan, 1996).

Döngü esnasında preovulatar dönemde overde oluşan değişikliklere folliküler faz, endometriumdaki oluşan değişimler sürecine proliferatif faz denirken, overde postovulatar fazda oluşan değişimlere luteal faz, endometriumdaki oluşan değişimler sürecine sekretuar faz denilmektedir.

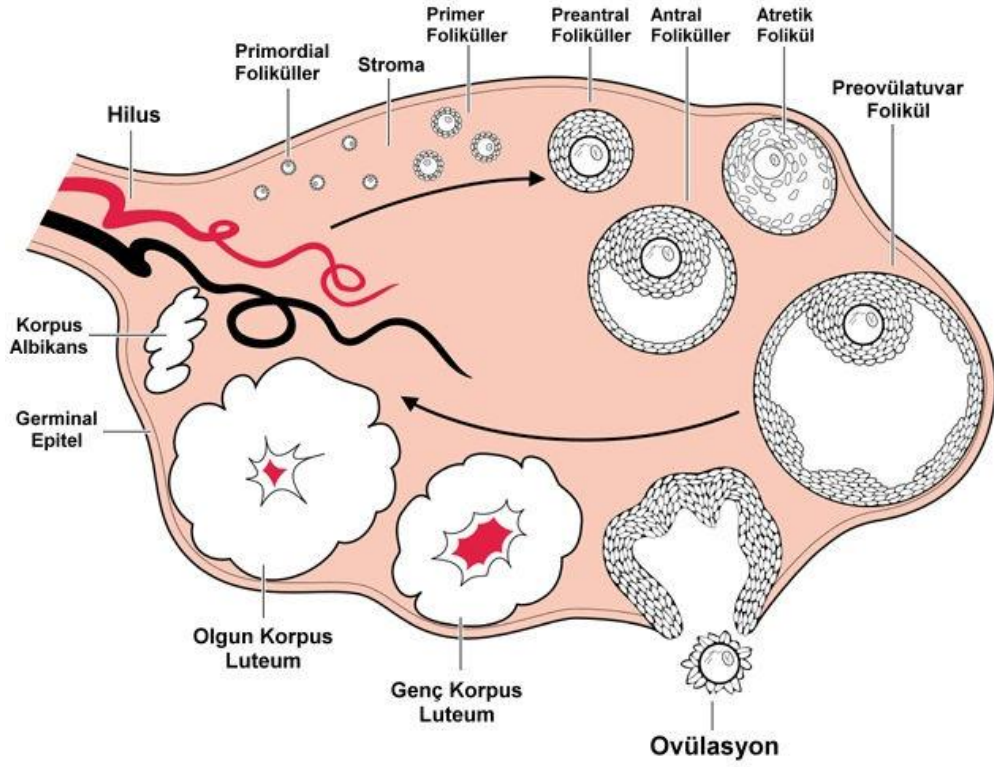
Bir adet döngüsünde birbirini takip eden 4 faz vardır:

- 1) Folliküler faz (Proliferatif)
- 2) Ovulasyon
- 3) Luteal faz (Sekretuar)
- 4) Menstrual faz

(Sivaslıoğlu, 2004).

2.3.1. Folliküler Faz

Folliküler faz esnasında ovulasyon için uygun sayıda follikülün meydana gelmesi için bir seri olaylar gerçekleşir. Yumurtalıklarda folliküler gelişim sonucunda (genelde) 1 tane yaşayan olgun follikül meydana gelir. 10-14 gün devam eden bu evre primordial follikül, preantral, antral ve preovulatar follikül süreçlerinden oluşur (Speroff ve ark., 2005) (Şekil 1). Gelişmeye başlayan folliküllerin ortaya çıkması bir önceki döngüde korpus luteumun regresyonundan sonraki birkaç gün içerisinde olur. Bu sürede progesteron, östradiol ve inhibin seviyeleri düşer. Bu düşüşle yeni gonadotropin sistemi aktive olur. Bu fizyolojik aktivasyon FSH ve LH seviyelerinde artışa neden olur (Sivaslıoğlu, 2004).



Şekil 1. Follikül gelişim aşamaları, ovulasyon ve korpus luteum (Berek'den uyarlanmıştır, 1996).

2.3.2. Primordial Follikül

Primordial üreme hücreleri, vitellus (yolk) kesesinin endoderm hücreleri, allantois ve embriyonun hindgut kısmından orijin alır ve hamileliğin 5-6. haftasından itibaren genital kabartıya göç eder. Gebeliğin 6-8. haftalarında üreme hücreleri hızlı bir şekilde mitotik olarak çoğalır ve 16-20. haftalarda her bir yumurtalıkta 6-7 milyon oosit oluşur. Primordial follikül, mayotik profazın diploten evresinde areste olmuş ve tek tabakalı iğ şeklinde (yassı) granüloza hücreleri ile çevrili bir oosit oluşur. Gebeliğin 16-20. haftalarında pik seviyesinde bulunan oositler hızlıca azalır. En hızlı azalma doğumdan önce meydana gelir ve 6-7 milyon olan oosit sayısı doğumda 1-2 milyon, ergenlikte ise 300,000'e kadar iner. Bir kadının üreme yaşamı esnasında bu geniş havuzdan sadece 400-500 kadar follikül ovule olmaktadır. Primordial gelişim esnasında oosit büyür ve granüloza hücreleri iğ şeklinden kübik (küboid) hale dönüşür. Bu olaylar gerçekleşirken granüloza hücreleri ve oosit arasında 'gap junction' denen bağlantı noktaları meydana gelir. Bu bağlantı noktaları ile granüloza hücreleri ve oosit arasında besin ve metabolit değişimi gerçekleşir (Speroff ve ark., 2005). Primordial follikül içindeki oosit yaklaşık 25µm çapında, küre biçiminde bir hücredir. Bu hücreler mayoz

bölünmenin birinci profaz evresindedir (Junqueira ve Carneiro, 2006). Küboid granüloza hücrelerinin çoğalması ile primordial follikül primer folliküle farklılaşır. Granüloza tabakası stromal tabakadan 'bazal lamina' diye adlandırılan bir tabaka ile ayrılır. Zona pellusida oluşur. Folliküler gelişim gonadotropinlerden bağımsız olarak başlar. Bu gelişim büyük ölçüde sınırlandırılır ve atrezi ile devam eder. Sınırlandırılan gelişme ve atrezinin bir kısmı, menstrual döngünün başında, bir grup follikül hormonal değişimleri cevapladığında kesilir. Bu evredeki en önemli hormonal olay 'FSH' seviyesindeki artıştır. Luteal faz steroidogenezinde ve inhibin sekresyonundaki azalma FSH artışına izin verir ve folliküllerin bir kısmı atreziden kurtulur (Sivaslıoğlu, 2004; Speroff ve ark., 2005).

2.3.3. Preantral Follikül

Büyüme başladığında follikül preantral aşamaya geçer. Bu esnada granüloza hücreleri proliferasyon olarak çok katlı bir tabaka oluştururken, teka tabakası da stromadan farklılaşmaya (organize) devam eder, teka interna ve teka eksterna olarak farklılaşır. Bu büyüme gonadotropinlere bağımlıdır ve artan östrojen üretimi ile ilişkilidir. Preantral folliküllerin granüloza hücreleri, androjen, progesteron ve östrojen olmak üzere 3 tip steroid sentezler, fakat progesteron ve androjene kıyasla östrojen daha fazla üretilir. Bir aromataz enzim sistemi androjenleri östrojene çevirmektedir. Aromatizasyon FSH ile indüklenir veya aktive olur. FSH'nin reseptörüne bağlanması ve adenilat siklaz aracılı sinyalin aktivasyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonundan sorumlu proteinleri kodlayan mRNA senteziyle takip edilir. Buna göre FSH, hem granüloza hücrelerinde steroidogenezi (östrojen sentezi) hem de granüloza hücre büyümesini ve proliferasyonunu başlatmaktadır. FSH'nin özgün reseptörleri preantral sürece kadar granüloza hücre yüzeyinde bulunmaz ve preantral follikül sınırlı miktardaki androjene aromatize ederek kendi östrojenik mikroçevresini meydana getirmek için FSH'ya ihtiyaç duyar. Östrojen üretimi bu şekilde FSH reseptör içeriği ile de sınırlandırılmaktadır. FSH reseptörleri granüloza hücrelerinin plazma membranında follikül büyümeye başladığı zaman ortaya çıkar ve hızlıca her bir granüloza hücresinde 1500 reseptör olacak seviyeye ulaşır (Sivaslıoğlu, 2004; Speroff ve ark., 2005).

2.3.4. Antral Follikül

Östrojen ve FSH'nin sinerjetik etkisi ile granülozanın intrasellüler boşluğunda biriken folliküler sıvı üretiminde artış meydana gelir, bir boşluk oluşur ve follikül antral aşamaya geçer. Folliküler sıvı birikimi, her follikülün özgün mikro çevresinde oosit ve çevresindeki granüloza hücrelerinin beslenmesini sağlar. FSH varlığında, östrojen, FSH yokluğunda ise androjen folliküler sıvıda baskın olur. LH, normalde döngü ortasına (mid-cycle) kadar folliküler sıvıda bulunmaz. Eğer LH plazmada ve antral sıvıda zamanından önce artarsa granüloza hücrelerinin mitotik fonksiyonu azalır, dejeneratif değişiklikler gerçekleşir ve intrafolliküler androjen miktarı artar. Bu yüzden FSH ve östrojenin baskın olması granüloza hücrelerinin aralıksız proliferasyonu ve folliküler gelişme için önemlidir. Granüloza hücre proliferasyonu fazla olan antral folliküllerde, yüksek östrojen miktarı ve düşük androjen/östrojen seviyesi bulunur. Bu durum sağlıklı oosit için önemlidir. Androjenik çevre östrojenin indüklediği granüloza proliferasyonunu azaltır, eğer devam ederse oositte dejeneratif değişiklikleri harekete geçirir.

Steroid hormonların sentezi follikül içinde bölümlere ayrılır. Bu durumu "iki hücre iki gonadotropin sentez sistemi" açıklar.

çeker. FSH'daki azalma, daha az gelişmiş olan folliküllerde FSH-bağımlı aromataz etkinliğini azaltır, östrojen üretimini sınırlandırır. Az gelişmiş follikül, östrojen uygun mikroçevreyi oluştursa bile azalan FSH granüloza proliferasyonunu ve fonksiyonunu engellerken, androjenik mikroçevreye dönüşümü artırır, böylece atretik değişim indüklenir. Atrezide meydana gelen ilk olay granüloza tabakasındaki FSH reseptörünün azalmasıdır. Östrojenin FSH üstündeki negatif geri bildirim baskın follikül dışındaki tüm folliküllerin gelişimini engeller. Seçilmiş olan follikül FSH'a bağımlıdır ve azalan FSH, plazma seviyeleri karşısında preovulatar gelişimini tamamlamalıdır. Baskın follikülün iki önemli avantajı vardır. *i)* Granüloza proliferasyon oranından dolayı FSH reseptör içeriği fazladır *ii)* Lokal parakrin/otokrin peptidlerce FSH etkisi güçlenmektedir. Dolayısı ile aromatisasyonun uyarılması sürerken, aynı zamanda daha az gelişen folliküllerden FSH geri çekilir ve daha az gelişen folliküller atreziye uğrar. Granüloza hücrelerindeki boşluğun artmasına tekal damarlanma (vaskülarizasyon) da katılır. 9. günden itibaren baskın folliküldeki tekal damarlanma antral folliküldekinin iki katıdır. Bu olay gonadotropinlerin folliküle seçilimli aktarımına müsaade eder, baskın follikülün FSH'a yanıt verme yeteneğini sürdürür ve azalan gonadotropin miktarlarına karşın gelişim ve fonksiyon devam eder. Ovulatar artışa yanıt vermek ve başarılı bir korpus luteum için granüloza hücreleri LH reseptörlerine hakim olmalıdır. Büyük antral follikül granüloza hücrelerine FSH, LH reseptör gelişimi için indükler. Burada otokrin/ parakrin peptidler ve östrojen temel organizatördür. Follikül içinde yükselen östrojen seviyesi FSH ve LH reseptör üretimine odaklanır (Speroff ve ark., 2005).

Östrojen ve peptid üretimi aracılığı ile baskın follikül ne yapacağını kendisi belirler. Feed back mekanizmaları aracılığı ile gonadotropin salınımindaki değişim follikülün çevresini az gelişmiş olan folliküller için zararlı hale getirir. GnRH'ın gonadotropin salınıminin kontrolünde önemi büyüktür, fakat menstrual döngüde oluşan gonadotropin sekresyonu baskın follikülden orjinlenen hipotalamus ve anterior hipofiz ile etkili olan steroid ve peptidlerin feed back değişimlerinin bir sonucudur. GnRH'daki artış LH artışına sebep olur ve bu da östrojenin pozitif geri bildiriminin hem hipofiz hem de hipotalamik bölgeler üstünde etkilidir. Östrojen inhibitör GnRH'ın pulsatil salınımı ve ayrıca GnRH hipofiz cevabını azaltarak hem hipotalamus hem de anterior hipofizi üstündeki rolü büyüktür. FSH sekresyonu östrojenin negatif inhibitör etkisine

son derece hassastır. Artmış seviyelerde östrojen inhibin ile FSH'ı baskılar (Speroff ve ark., 2005).

2.6. Preovulatuvar Follikül

Preovulatuvar follikülde bulunan teka hücreleri vakuolize olurken granüloza hücreleri büyür ve preovulatuvar folliküle hiperemik bir şekil verir. Oosit mayoza devam eder. Preovulatuvar follikül östrojeni yüksek miktarlarda üretir. Geç folliküler faz esnasında östrojen, önce yavaşça yükselir, ovulasyondan 24-36 saat önce de en yüksek seviyeye ulaşır. Östrojen pik yaptığında LH konsantrasyonu yükselir. Seçilen foliküle ovulatuvar uyarıyı iletmek için, LH artışı geri kalan östrojen ve FSH içeriği düşük, androjen seviyesi yüksek olan folliküllerin kaderini belirler. LH kendi reseptörü aracılığı ile baskın folliküldeki granüloza hücrelerindeki lüteinizasyonu yükseltir ve progesteron üretimi oluşur. LH reseptörü bir kez eksprese olduğunda hücre büyümesi inhibe olur, steroidogenez aracılığıyla enerji üretilir. Progesteron, östrojene pozitif feed back etkisini zamana ve doza bağlı olarak ortaya çıkarır. Yeterli miktarda östrojen primingden sonra progesteron pozitif geri bildirim cevabını hipofiz üstünde direkt bir etki ile kolaylaştırır ve östradiolün eşik altı değerlerde bulunması LH artışını indükleyebilir (Bir hormon, diğer bir hormona olan sensitivitesini artırabilir. Bu priming olarak adlandırılır. Östrojenler, miyometrium ve endometriumdaki progesteron reseptörlerinin miktarını artırır.). Progesteron LH üzerindeki kolaylaştırıcı etkisiyle beraber döngü ortasındaki FSH yükselmesinde de etkilidir. Progesteronun bu hareketi ile follikül üzerinde FSH etkisi sonlanır. Preovulatuvar süreç, plazma 17α -hidroksiprogesteron miktarının artışından sorumludur. 17α -hidroksiprogesteron teka androjen üretimi için etkin olan P450scc ve P450c17 enzimlerinin LH uyarılmasının işaretidir. Ovulasyondan sonra bazı teka hücreleri lüteinleşerek korpus luteumun parçası olur ve P450c17 eksprese etme özelliğini kaybeder. Diğer lüteinize teka hücreleri P450c17 etkinliğini korur ve aromatisasyon için östrojene, androjen üretmeye devam eder. Az gelişen folliküller atreziye uğradıklarında teka hücreleri stromal dokunun komponenti olmaya devam eder ve P450 etkinliği ile LH'a cevap verme ve steroid üretme yeteneklerine devam eder. İntra ovaryen androjen, granüloza hücre ölümünü ve folliküler atreziyi hızlandırır. Buna göre androjenlerin ovulasyon için tek bir baskın follikül gelişiminde regüle edici rolleri vardır (Speroff ve ark., 2005).

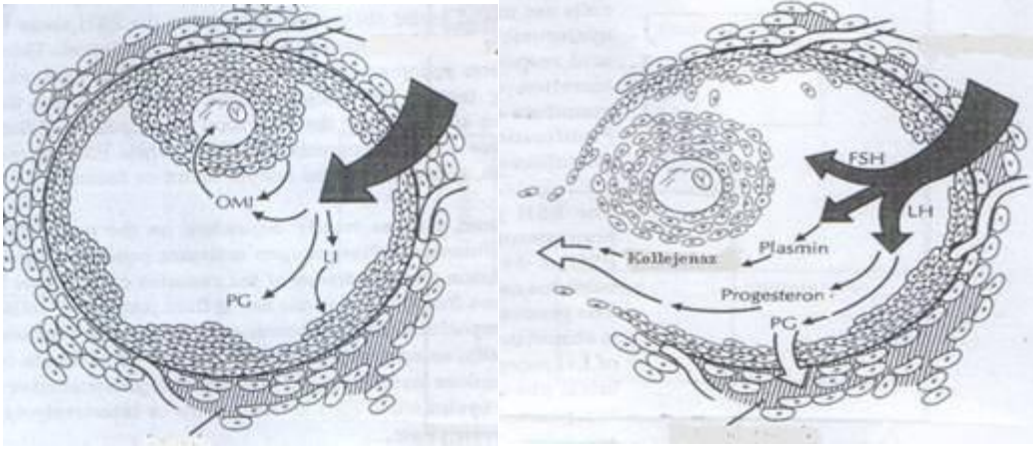
2.7. Ovulasyon

Östrojenle olgunlaşmasından sonra preovulatar follikül kendi ovulatar uyarımını yapabilir. Ovulasyon LH pikinden 10-12 saat ve östradiol pikinden 24-36 saat sonra oluşmaya başlar. LH artışı ovulasyonun en temel ölçütüdür ve follikül çatlamasından 34-36 saat önce meydana gelir. Gonadotropin yükselişi ovulasyon, oositin salınımı ve granüloza hücrelerinin kümülüs yığına sebep olan olayları başlatır (Speroff ve ark., 2005).

Oluşan baskın follikül çok az progesteron salgılamaya başlar. Az miktarda salgılanan progesteron folliküler fazın sonlarına doğru FSH ve LH miktarını yükseltir. LH seviyesinin yükselmesi mayozun bitmesine, granüloza hücrelerinin lüteinleşmesine ve follikül çatlamasında görevli prostaglandinlerin sentezinde etkindir. Prematür oosit matürasyonu ve lüteinizasyonu lokal faktörlerce engellenir. Folliküler sıvı içindeki granüloza hücrelerinden kaynaklanan “oosit matürasyon inhibitörü” (OMİ) LH artışına kadar birinci mayoz bölünmeyi engeller. LH’ın başlattığı cAMP aktivitesi OMİ’nin ve lüteinizasyon inhibitörünün (LI) bu lokal engelini yener ve oositte bekleyen birinci mayoz sonlanır (Sivaslıoğlu, 2004). LH’ın yükselmesiyle etkilenen progesteron follikül duvarının elastikleşmesini sağlar. Ovumun kaçıışı follikül duvarındaki kollojenin bozulmasıyla ilgilidir ve ovulasyondan hemen önce follikül duvarı incelir. FSH, LH ve progesteron proteolitik enzimleri etkiler ve follikül duvarındaki kollajenin sindirimi başlar. Gonadotropin artışıyla granüloza ve teka hücreleri plazminojen aktivatörlerini sentezler. Plazminojen aktivatörleri plazmin sentezi için folliküler sıvıdaki plazminojeni aktifleştirir (Speroff ve ark., 2005). Plazmin ve diğer proteazlar kolejenaz aktivitesini tetikleyerek folikül duvarında bağ doku dejenere olur (Sivaslıoğlu, 2004).

Granüloza hücrelerinde plazminojen aktivatör sentezi yalnızca preovulatar evrede LH’a karşılık oluşturulur. Tekal ve interstisiyal hücrelerde daha çok etkin olan inhibitör sistem plazminojenin uygunsuz aktivasyonunu ve büyüyen follikülün dejenerasyonunu sağlar (Speroff ve ark., 2005).

Sonunda follikül yüzeyinde meydana gelen stigmanın çatlaması ile oosit ve antral sıvı LH artışının başlangıcından yaklaşık 34-36 saat, LH pikinden de yaklaşık 18-26 saat sonra tubaya doğru atılarak ovulasyon bitirilir. (Şekil 3.)



Şekil 3. Follikül rüptürü (Speroff ve ark., 2005).

Primordial follükülerden preovulatar follükül meydana gelerek siklusun 14. gününde ovulasyon oluşur. Oosit atılımından sonra follükülün yeni bir organizasyonu (follüküldeki granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve yağ dolu lüteal hücrelerin oluşması) korpus luteum meydana gelir (Sivaslıoğlu, 2004).

2.8. Luteal Faz

Follükül çatlaması ve oosit salgılanmasından sonra follükülde granüloza hücrelerindeki değişimle lüteinizasyon ve korpus luteum meydana gelir. Korpus luteum olur olmaz apoptoza uğrar. Eğer korpus luteum duvarlarındaki LH reseptörleri uyarılmazsa atreziye gider, uyarılırsa progesteron salınımına yol açar. Progesteron miktarı gitgide artarak LH yükselişinden yaklaşık 7 gün sonra pik yapar. Progesteron hem lokal hem de santral etkileşimle yeni follükül oluşumunu baskılar. Progesteron, östrojen etkisini östrojen reseptörlerinin azalmasıyla antagonize ettiğinden östrojene bağlı follüküler mekanizmalar engellenir. Progesteron ve östrojenin negatif geri besleme etkinlikleriyle düşük miktardaki gonadotropin seviyeleri de luteal fazda yeni follüküllerin gelişiminin başlamasını engeller. Lüteal granüloza hücrelerinden salınan ve miktarı artan inhibin; FSH miktarlarının lüteal evrede en az seviyeye inmesine neden olur. Oluşumundan 10-12 gün sonra eğer korpus luteum üstündeki LH reseptörleri uyarılmazsa LH reseptörlerini yitirir ve korpus albikansa dönüşerek giderek kaybolur. Bu olay lüteolizis olarak adlandırılır. Eğer oosit fertilize olduysa bu dönemde endometriyumda blastokist implantasyona başlar ve implante olmuş embriyonun

trofoblastik hücrelerinden salınan β -hCG korpus luteumun LH reseptörlerini uyararak progesteron salgılanmasını sağlar (Sivaslıoğlu, 2004).

2.9. Menstrual Faz

Menstrasyon üreme sisteminin onarım ve reorganizasyonun tekrarlandığı luteal dönemden folliküler döneme geçişin olduğu fazdır. Mens başlangıcından 2 gün önce progesteron, östrodiol ve inhibin miktarlarında azalış FSH miktarlarında artış meydana gelerek bir sonraki döngü için folliküler gelişim başlamış olur. Korpus luteum steroidleri ve inhibin miktarlarındaki azalışla GnRH-gonadotropin sistemi yeniden aktifleşir ve FSH/LH oluşumuna başlar. Luteal dönemin 10. gününden sonra lenfositler endometriumu infiltre eder ve endometrial stromada lokal granülosit (K hücreleri) çoğalma başlar. Stroma progresif olarak gevşer ve ödemlenir böylece premenstrual desidüal reaksiyonun özgün özellikleri meydana gelir. Steroidlerdeki azalış progesteronun prostiglandin sentezi üstündeki inhibitör etkisini azaltır ve lokal prostanoid miktarları yükselir. Endometriumu besleyen spiral arterlerde kasılma oluşur, kapillerlere olan kan akımı bozularak doku iskemik ve nekrotikleşir. Doku fragmentasyonu ile fonksiyonel tabaka bozulmaya başlar ki bu olay mens olarak adlandırılır (Sivaslıoğlu, 2004).

Hücreler kimyasal sinyallerle birbirleriyle iletişim kurarlar. Bu sinyal molekülleri hedef hücre yüzeylerindeki özgün reseptörlere bağlanır. Sonrasında sinyal molekülü reseptör proteinini aktifleştirir, bu olay özgün ekstrasellüler mesajcı tarafından taşınan sinyalin aktarımını sağlar. Anterior hipofiz bezi tarafından üretilen FSH, önemli sinyallerden biridir. Bu gonadotropin, glikoproteinlerle (FSH, TSH, LH) ilgili bir familyanın üyesidir. Bu tropik hormonların reseptörleri G-protein çifti reseptör familyasına mensuptur. Granüloza ve Sertoli hücreleri FSH'ın ilgilendiği hücrelerdir. Yumurtalıkta FSH granüloza hücre fonksiyonunu regüle eder, ovaryan foliküllerin olgunlaşmasını, seçimini, oosit maturasyonunu ve LH ile beraber ovulatuvar olayları düzenler (Ulloa-Aguirre ve Timossi, 1998).

2.10. Ovulasyona Etki Eden Genetik Faktörler

Üreme başarısı için sağlıklı bir ovulasyon gereklidir. Son yıllarda rat ve fareler üzerinde yapılan deneylerde ovulasyonda etkili olan gen profilleri gösterilmiştir.

Ovulasyonda etkili genlerin en önemlilerinden birisi de *FSHR* (Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü) genidir (Liedo ve ark., 2014).

2.10.1. Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü

FSHR'ü üreme dokularında üretilir ve hipofiz bezinden salgılanan FSH'a cevap olarak üreme olaylarını kontrol eder. Kadınlarda FSHR gelişen follikülün granüloza hücrelerinde bulunur ve FSH'a yanıt olarak granüloza hücrelerinin bölünmesini artırır ve folliküler steroid hormonları üretmesi için düzenleme yapar. FSHR gelişen folliküllerde çok fazla seviyede bulunurken, kaybolan foliküllerde hızla azalır (Chedrese, 2009).

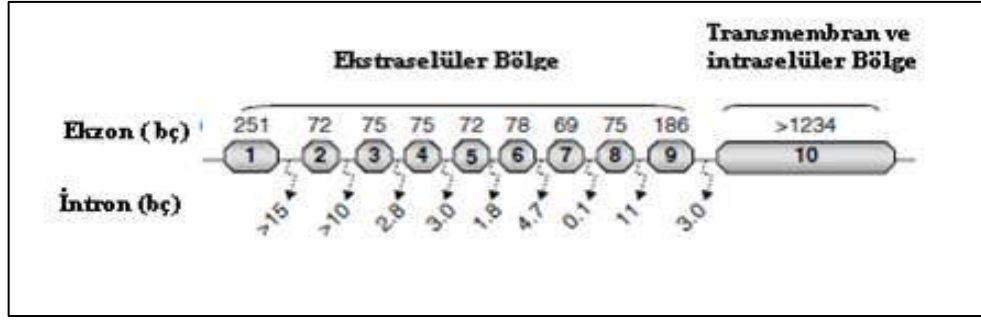
FSH ve LH, insan koryonik gonadotropin (hCG) ve tirotropik hormonu (TSH) da içeren glikoprotein hormon familyasına mensuptur (Tapanainen ve ark., 1998).

Bunlar heterodimerik hormonlardır, ortak bir α ve her hormona fonksiyonel özgünlük kazandıran β alt ünitesine sahiptir. Glikoprotein hormonları hedef hücre yüzeyindeki G-protein çifti reseptörleri aracılığı ile görev yapar (Ghadami ve ark., 2008).

2.10.2. FSHR'nin Moleküler Yapısı

FSHR G protein çifti reseptör familyasının bir üyesidir (Lussiana ve ark., 2008). Reseptörlerin protein yapısı; hormon bağlanma ilgisi ve özgünlüğüyle ilgili büyük bir ekstrasellüler bölge, reseptör aktivasyonundan ve sinyal taşınmasından sorumlu yedi transmembran bölge ve küçük bir karboksi terminal intrasellüler bölge ile karakterizedir (Ghadami ve ark., 2008). İnsan FSHR proteini 695 aminoasitten oluşur. İlk 17 aminoasit hidrofobik sinyal peptidini kodlamaktadır. Bu nedenle olgun protein 678 aminoasitle karakterizedir (Simoni ve ark.,1997; Lussiana ve ark., 2008).

FSH reseptör geni insanda 2p21 kromozom bölgesinde bulunur. FSH reseptör geni 10 ekzon ve 9 introndan meydana gelir. İnsan reseptörünün ekstrasellüler bölgesi 69-251 bp arasında uzunluğa sahip 9 ekzon tarafından kodlanmaktadır (Şekil 4). Ekstrasellüler bölgenin C-terminal kısmı, transmembran ve intrasellüler bölgeler 10. Ekzon tarafından kodlanmaktadır (Simoni ve ark,1997; Lussiana ve ark., 2008).



Şekil 4. İnsan *FSHR* geninin yapısal organizasyonu (Ulloa-Aguirre ve ark'ından uyarlanmıştır 2007).

FSHR büyük hidrofilik bölgeyi takip eden membranı yedi kez saran bir hidrofobik kısma sahiptir. Sekansın C terminali ise oldukça bazik sitozolik bir bölümdür. Reseptörün ekstrasellüler bölgesi 349 aminoasitten oluşur, bu bölgeyi 264 aminoasidin kodladığı transmembran bölge izler. Karbosi-terminal intraselüler bölge ise 65 aminoasit tarafından kodlanmaktadır (Simoni ve ark,1997).

2.10.3. Ekstrasellüler Bölge (N-terminal bölge)

Glikoprotein hormon reseptörleri büyük ligandlara bağlanmaktadır ve bu nedenle reseptörler büyük, glikozile ve 1. transmembran bölgeye bağlı bir ekstrasellüler bölümden oluşur (Chedrese, 2009). Gonadotropin reseptörlerinin ekstrasellüler NH₂ bölgesinde yüksek afinite ile bağlanma ile ilişkili lösin-zengin tekrarlar (LRR) bulunmaktadır (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999). Her bir LRR 20-25 aminoasitten oluşmaktadır. Bu aminoasitlerin büyük bir kısmı lösin kalıntılarıdır. Her LRR kısa sekanslı bir aminoasit segmenti aracılığıyla bir α -heliksten oluşur (Chedrese, 2009). FSHR'deki lösin zengin tekrarlar özgün protein-protein etkileşimi için amfipatik peptid yüzeyi meydana getirir. Bu bölgenin yapısı ve hormonun β -alt ünitesinin tanınması esnasındaki yapısal değişim reseptörün aktive olmasını sağlar (Ulloa-Aguirre ve Timossi., 1998). Reseptörün konkav iç yüzeyi 10 LRR'den oluşan düzgün " β -sheet" yapısından meydana gelir, fakat " β -sheet" yapısının N-terminal kısmı (LRR1-7) düz, C-terminal bölgesi (LRR7-10) ise at nalı şeklinde kıvrımlıdır. FSHR FSH'a konkav iç yüzey aracılığı ile bağlanır. Reseptörün N-terminal paralel β -kenarları (strand) (LRR2-8) hormon molekülünün merkezdeki kısmı (α -alt ünitesinin C-terminal segmenti ve β -alt ünitesinin 'seat-belt' segmenti) ile ilişki kurar. LRR6'da GpHR'lerin (glikoprotein hormon reseptörü) değişmez asidik rezidüleri olan X3 ve X5 pozisyonları (FSHR'nde

D150 ve D153) GpH'lerin ortak α - alt ünitesinin bazik K91 ve K51 rezidüleri ile tuz köprüleri meydana getirir. Bu etkileşimler tüm GpH'lerde (glikoprotein hormon) korunmuş olduğundan bağlanmanın spesifitesi β -alt ünitesinin 'seat-belt' kısmı ile sağlanmaktadır. β -alt ünitesinin "determinant loop" bölgesi korunmuş asidik kalıntı (FSH'da D93) içermektedir. Bu kalıntılar LRR4' ün X5 konumundaki (FSHR'nde K104) polar aminoasit ile etkileşime girer. Buna göre FSHR ve FSH arasındaki özgün etkileşimler L55 (LRR2'de X5) ve E76 (LRR3'de X3) ile L99 ve R97 arasındaki hidrofobik ve iyonik etkileşimlerdir. Bunlar hormonun C-terminal loop konumunda bulunmaktadır. K179 (LRR7'de X5) ile "determinant loop" taki S89 ve D90 arasında da elektrostatik etkileşim bulunur (Caltabiano ve ark., 2008). FSHR'nin ekstrasellüler bölgesindeki 2'den 9'a kadar olan ekzonlarda en az 10 adet hasarlı (imperfect) LRR motifi vardır. Korunmuş kısımlar, Ile, Leu, Val, Ala ve Phe gibi alifatik aminoasitler tarafından tutulmuştur. Amfipatik yapılarından dolayı tekrarlar hem hormon hem de transmembran bölümlerle etkileşim sağlar (Simoni ve ark., 1997). Glikoprotein hormon reseptörleri N-terminal bölüm ve membran ilişkili bölümden oluşur. N-terminal segment tek başına yüksek ilgide ligand bağlanmasıyla ilişkilidir, membran ilişkili bölüm ise reseptör aktivasyonunun olduğu kısımdır. Glikoprotein hormonları ilk olarak N-terminal kısma bağlanırlar. Hormon ve N-terminal segment kompleksi yapısal değişimler geçirir ve membran ilişkili bölge ile ikincil etkileşime girer, böylece sinyal oluşturulur. Bu ikincil interaksyonlar liganda bağlanmış N-terminal segment ile "ekzoloop" 1-3 arasında meydana gelir (Ji ve ark., 1998).

Hormon bağlanması reseptörü harekete geçirir. Bu tek aşamalı görünen olay sinyal oluşumu, sinyal propagasyonu (yayılmı) ve sinyal transferini içeren birkaç basamaktan oluşur. Hormon bağlanması hormon reseptör ara yüzünde yapısal değişimlere sebep olur. Buna sinyal oluşumu denir. Reseptördeki yapısal değişiklik sinyali TM bölgesi aracılığı ile reseptörün sitoplazmik bölümüne iletir. Bunu sinyal propagasyonu olarak adlandırıyoruz (Yi ve ark., 2002).

İnsan FSHR'si TM-2 bölümünden çıkan ekzoloop 1'inde lokalize olan bazı amino asit rezidüleri hormon bağlanması (His407) ve reseptör aktifleşmesiyle (Asp405, Thr408 ve Lys409) ilgilidir. Bu bölümler dışında LH/CG reseptörlerinde hormon bağlanması ve sinyal iletilmesiyle ilgili olan TM-2 (Asp391), TM-6 (Asp564) ile ekzoloop 3 ve TM-7'nin ortak yüzeyinde bulunan (Lys591) kısımlarında glikoprotein

hormon reseptörlerinin yapısal ve fonksiyonel benzerliklerinden dolayı FSHR'nin hormon bağlanması ve reseptör aktivasyonu ile ilgili olabileceği üstünde durulmaktadır (Ulloa-Aguirre ve Timossi., 1998).

GPCR(G protein çifti reseptörleri)'ler fonksiyonel protein yapısını sabitleyen disülfid köprüleri oluşturan farklı sayıda Cys kalıntılara sahiptir. Glikoprotein hormon reseptörleri gibi ligand bağlanma bileşenleri ekstrasellüler NH₂-terminali kısmındaki reseptörlerde korunmuş Cys kalıntıları ekstrasellüler bölümdedir ve ligand tanınması ve etkileşimine müsaade eden bağlanma cebinin organizasyonuna yardımcı olur. Bir çok GPCR, N-bağımlı glikozilasyon için (Asn-Xaa-Ser/Thr) konsensus sekanslarına sahiptir (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999).

G-protein çifti reseptörlerinin hayatı, sentezlendikleri, katlandıkları endoplazmik retikulumda (ER) başlamaktadır. Düzgün olarak katlanmış reseptörler bir araya toplanır ve ER-derive COPII- kaplı veziküllere paketlenir. Transport vezikülleri reseptörleri ER'den ER-Golgi ara kompleksine (ERGIC), Golgi aparatına ve trans-Golgi ağına iletilir. Bu taşınım sırasında reseptör olgunlaşabilmek için glikozilasyon gibi post-translasyonel değişiklikler geçirir. Olgun reseptörler daha sonra trans-Golgi ağından plazma membranlarına taşınır. NXS/T konsensus dizilerinde oluşan N-bağımlı glikozilasyon GPCR'lerin en yaygın post-translasyonel değişiklikleridir (Dong ve ark., 2007).

Proteinler ER'de oluştuktan sonra katlanır ve ER'den dışarıya aktarılacak şekilde stabilleşirler. ER kalite kontrol sistemi (QCS) özel yapıları bilir ve olgunlaşmamış proteinin hücredeki kaderini çizer. ER kalite kontrol sistemi proteinleri olgunlaşma hallerine göre bilir ve ayırır. Moleküler şaperonlar yeni oluşan proteinlerin konformasyon işleminde ER kalite kontrol sisteminin yardımcı üyeleridir. Moleküler şaperonlar yanlış katlanmış olan proteinleri bilir ve imha ederler. Kalneksin ve kalretikulin FSHR'ne bağlanan moleküler şaperonlardır. Bu şaperonlar etkinliklerini yeni sentezlenen proteinin üzerinde bulunan ve katlanmış proteine hidrofobik özelliklik kazandıran N-glikanlar üzerinde gerçekleştirirler (Conn ve ark., 2007).

FSHR N-bağımlı glikozilasyonu reseptörün hücre-yüzey ekspresyonu için önemlidir, glikozilasyon kısmındaki bir mutasyon reseptörün plazma membranına iletilmesine mani olur bu yüzden mutasyona uğramış reseptör perinükleer bölgede birikir (Dong ve ark., 2007). FSHR'nin ekstrasellüler bölgesinde N-bağımlı

glikozilasyon için 191, 199 ve 293. pozisyonlarda her türde korunmuş 3 önemli kısım vardır (Simoni ve ark.,1997). FSHR'nün glikozilasyonu reseptör protein katlanması, ve membrana iletilmesi için önemlidir (Lussiana ve ark., 2008).

Transmembran Bölge: Hepta helikal veya serpetin transmembran bölge yapısal motifi G-protein çifti reseptör süper familyası üyeleri için karakteristiktir. Bu grubun her bir üyesinde motif, transmembran α heliks yapmak için 20-25 aminoasitlik yedi hidrofobik gerilim bölgesi (stretches) ile tipiktir, bunlar alternatif ekstrasellüler ve intraselüler ilmekle (loop) bağlıdır. FSHR birinci ve ikinci ekstrasellüler sıklus da molekül içinde disülfid köprüleri meydana getirmek için yüksek oranda korunmuş iki tane Cys (sistein) kalıntısından oluşur ve bunlar proteini sıkı şekilde tutmaktadır. Yüksek oranda korunmuş Asp-Arg-Tyr triplet motifinin reseptör ve G protein arasındaki etkileşimde etkin olduğu bilinmektedir (Simoni ve ark.,1997; Lussiana ve ark., 2008). FSHR'ünde Asp yerine Glu mevcuttur, bu substitüsyon LH ve TSH reseptörlerinde de aynıdır (Simoni ve ark.,1997). Yedi transmembran bölge (TM), bir ekstrasellüler NH₂, bir intraselüler COOH-terminali ve üç ekstrasellüler ve intraselüler bağlama bölgesi bulunan fiçli şeklinde ligand bağlanmasıyla ilişkili bir yapıdır. Transmembran bölgeler hidrofobiklik olma durumlarına göre de çeşitlilik gösterir. I, IV ve VII TM'ler sadece bir hidrofilik rezidüye sahiptir ve II, III, V ve VI. TM'lerden daha fazla hidrofobiktirler. Bu familyanın mensupları arasında yüksek oranda korunmuş olan rezidüler reseptör yapı ve işlevi için önemli yapısal bileşenleridir. Örneğin rhodopsin/badrenergik familyası reseptörlerinde TM-II Asp ve TM-I ve VII'deki Asn rezidüleri yüksek oranda korunmuştur. Bu rezidülerin konumu ve aralarındaki interaksiyon 2. Ve 7. helikslerin bir arada kalması için önemlidir ve reseptör aktivasyonuna ve sinyal taşımına müsaade eder. Aynı TM bölgesinde veya TM bölgeleri arasında hidrojen bağları da mevcuttur. Bu TM bağları ya da köprüleri TM korunun sıkı halde tutulması için gereklidir (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999).

C-Terminal Bölge: C-terminal intraselüler kısım 65 aminoasitten meydana gelir. Bu bölge fosforilasyon bölgeleri olan Ser ve Thr rezidüsüne zengindir. Bu kısım özgün intraselüler kinazlar ile fosforile olduğunda FSH/FSHR bağlanmasından kaynaklanan sinyal iletimini regüle eder (Lussiana ve ark., 2008). Transmembran bölgede disülfid bağı oluşturan özgün Cys kalıntıları bulunmuştur, fakat COOH-terminalin membran başlangıç kısmındaki Cys rezidülerinin palmitolasyona

uğradığından önemli olabileceği üstünde durulmaktadır. Bu kısımdaki palmitolasyon dördüncü bir intrasellüler ilmek meydana getirir ve membran çapası (anchor) oluşumuna müsaade eder. Reseptör palmitolasyonunun fizyolojik etkinliğinin ne olduğu bulunamamış olsa da b-adrenergik reseptörlerinde palmitolasyonunu engelleyen mutasyonların G protein aktivasyon yitimine ve reseptör ayrılmasına (*uncoupling*) sebep olduğu bulunmuştur (Ulloa-Aguirre ve ark.,1999). G protein bağlı reseptörlerde intrasellüler COOH-terminal kısmı fosforilasyon bölgeleri olan Ser ve Thr bakımından fazladır. Özgün agonistlerine bağlandıklarında b-adrenergik familyası reseptörleri stimülatuar G proteini (Gs) aktifleştirir, bu olay neticesinde de efektör olan adenilil siklaz aktive olur. Enzim ekstrasellüler sinyallerin hücre içi araçlarından biri olan adenozin 3',5'-monofosfat (cAMP) 'ı meydana getirir (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999).

2.10.4. FSH Reseptör Geninin Promotoru

FSHR gen ifadesi dokuya özgündür ve farklı hormonal uyarılara bağımlıdır. İnsanda ana transkripsiyon başlama bölgesi -99. pozisyonda, translasyon başlama bölgesine yakın olarak konumlanmıştır. Bütün türlerde fazladan, alternatif olan ya da daha az kullanılan transkripsiyon başlama bölgeleri mevcuttur. İnsan *FSHR* mRNA'sı testis ve yumurtalıkta aynıdır. Gen ifadesinin cinsiyete özgün ekspresyonu farklı transkripsiyon başlama bölgelerinin olmasından dolayıdır (Simoni, 1997).

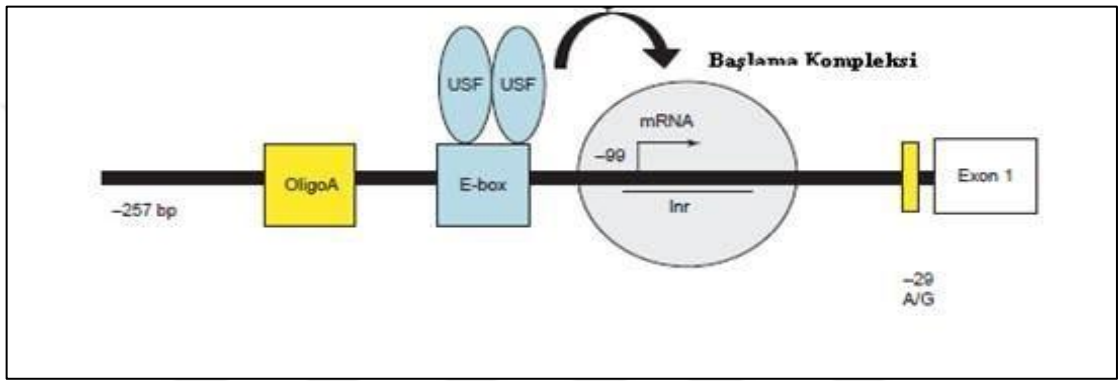
FSHR promotoru TATA ve CCAAT kutusu olmayan promotor grubuna mensuptur ve bir kaç transkripsiyonel başlama bölgesi vardır (Simoni, 1997; Simoni ve ark.,2002; Gromoll ve Simoni, 2005).

FSHR gen yapısının aksine insan *FSHR* gen promotor bölgesi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. İnsan *FSHR* promotor kısmıyla ilgili çalışmalar -184, -114, -99, -83 ve -79'da beş adet transkripsiyonel başlama kısmı olduğunu ve -99'un ana transkripsiyon başlama bölgesi olduğu söylenmiştir. Rat, fare ve koyun *FSHR* genlerinin kor promotor bölgesiyle ilgili çalışmalarda, E- kutusu elementi, AP-1 bölgesi, InR elementi, E2F elementi, GATA bölgeleri, CACC kutusu ve iki steroidogenik factor-1 (SF-1)-benzeri bağlanma bölgesi (SLBS) gibi önemli düzenleyici bölgeler bulunmuştur fakat E- kutusu dışında bu bölgeler insan *FSHR* geninde mevcut değildir (Wunsch ve ark., 2005).

Hücre özgünlüğü göstermeyen ve en yüksek transkripsiyonel etkinlik gösteren insan *FSHR*'nün kor promotor kısmı -225 ve -1 bölgeleri arasındadır ve translasyon bölgesine yakındır. Bugüne kadar kor promotor bölgesinde iki cevap elementi

bulunmuştur. Bir E-kutusu konsensus dizisi (CACATG), USF gibi bazik *helix-loop-helix* transkripsiyonel faktörlerinin bir familyasıyla etkileşim gösterir, bu etkileşim tüm promotor etkinliği için önemlidir. İkinci element ise transkripsiyonel başlama bölgesini saran initiatör (Inr) elementidir ve housekeeping genler için karakteristiktir (Gromoll ve Simoni, 2005) (Şekil 5).

FSHR'ü gibi TATA kutusundan yoksun genlerde transkripsiyon farklı kısımlardan başlar ve Inr elemanları RNA polimeraz II'nin uygun pozisyona yerleştirilmesinde etkindir (Heckert ve Griswold, 2002).



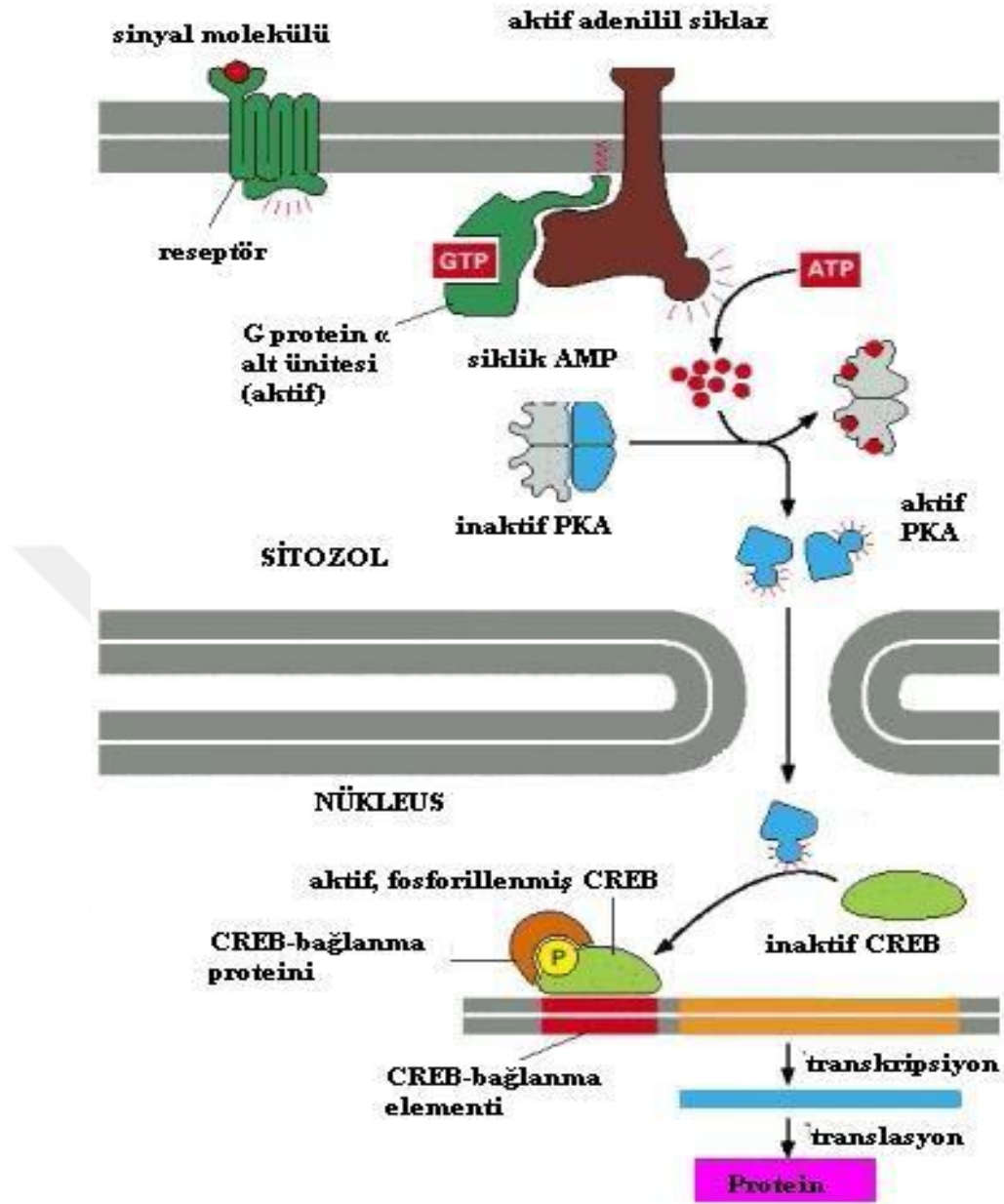
Şekil 5. FSHR gen promotor bölgesi (Gromoll ve simoni'den uyarlanmıştır 2005).

Birçok sinyal kaskadı içsel ve dışsal sinyalleri hücre içi yanıtlara dönüştürmek için G protein çifti reseptörlerine (GPCR) ihtiyaç duyar. GPCR'ler tipik olarak reseptörden enzim ve iyon kanalları gibi hücresel efektörlere gelen mesajı transdüksiyone ederek G-proteinlerinin (*guanine-nucleotide-binding signal transducing proteins*) bir veya daha fazla elemanını etkinleştirir. Bu efektörler hücre büyümesi ve farklılaşması gibi hücresel olguların büyük bir kısmını regüle eden ikincil mesajcıların miktarını belirler (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999).

FSHR insan granüloza hücrelerinin plazma membranında konumlanmıştır, FSH'a bağlandıktan sonra bir cAMP bağımlı negatif geri bildirim siklusu, hücre yüzeyinde reseptör ifadesinin "*down-regülasyon*"una sebep olur. FSHR proteini granüloza hücrelerinde eksprese olur, glikozillenir daha sonra hücre yüzeyine iletilir. FSH'a bağlanma ve sinyal iletimi reseptörün farklı özellikleridir. Hormona bağlandıktan sonra, FSHR bir G protein ile etkileşime girer, ko-faktör guanosil trifosfata (GTP) bağlanır ve adenilil siklaz enzimini ikincil mesajcı olan siklik AMP (cAMP) eksprese etmesi için tetikler. Granüloza veya Sertoli hücrelerinde artan cAMP

FSHR'nün etkinliğini ortaya koymada önemlidir. Bundan sonra yapısal proteinleri, enzimleri ve transkripsiyon modölatörlerini fosforilleyecek olan protein kinaz A (PKA) etkinleştirilir. cAMP cevap elemanları familyası (CRE), bağlanma proteinleri (CREB) FSH sinyalinin ikincil efektörleri olarak etkindir. Granüloza hücrelerinde, FSH intraselüler Ca^{+2} miktarını yükseltir, bu durum cAMP etkinliğini yükseltir (Lussiana ve ark., 2008).

cAMP, FSH, LH, koryonik gonadotropin (hCG), tiroidi uyarıcı hormon (TSH) için hücre içi mesajcıdır. Tropik hormonun hücre membran reseptörü ile birleşmesi membran duvarındaki adenilat siklaz enzimini aktifleştirir ve hücre içindeki adenozin 5'-trifosfatın (ATP) siklik AMP (cAMP)'ye dönüşümüne sebep olur. Uyarının özgünlüğü, hücre duvarındaki reseptörün yapısı ve fonksiyonundaki değişimlerle farklılaşabilir. Salınan cAMP özgün olarak sitoplazma reseptör proteinine bağlanır ve cAMP reseptör protein kompleksi protein kinazı aktifleştirir. Protein kinaz, 2 regüle edici alt ünite ve 2 katalitik alt üniteye sahiptir ve inaktif formda bulunur. cAMP'nin regüle edici alt kısımlara bağlanması ile katalitik üniteleri salınır ve regüle edici alt üniteler dimer olarak kalır. Katalitik alt üniteler, enzimler, mitokondriyal ve kromatin proteinleri gibi hücresel proteinlerin fosforilasyonunu katalizler. Fizyolojik olaylar bu cAMP-aracılı enerji üretim olaylarını takip eder. cAMP daha sonra fosfodiesteraz enzimi tarafından inaktif olan 5'-AMP'ye bozunur.



Şekil 6. cAMP sistemi (Alberts ve ark., 2002)

DNA katalitik alt üniteler tarafından fosforillenmiş proteinlere bağlanan ve gen ifadesinin aktivasyonu ile sonuçlanan cevap elemanlarını bulundurmaz. cAMP cevap elemanı (CRE) transkripsiyonun başlama bölgesinin yukarı bölgesi (upstreaminde) enhancer olarak görevlidir. Transkripsiyon faktörlerinin büyük bir ailesi CRE ile etkileşim göstererek gen ifadesi için önemli bir regüle edici kısımdır. cAMP, siklik AMP düzenleyici protein bağlanma proteini (CREB) olan özgün bir transkripsiyon

faktörünü aktifleştirir. CREB'in CRE' ye bağlanması bir çok genin ifadesini aktive eder (Speroff ve ark., 2005) (Şekil 6).

Kadın ve erkek üreme sisteminin temelini hipotalamus-hipofiz-gonodal aks meydana getirir. Bu sistemin bozulması gonadların patofizyolojisini bozarak kısırlığa ve bazı durumlarda malignansilere sebep olabilir (Strauss ve Barbieri, 2006).



3. MATERYAL VE METOT

Eylül 2015 - Haziran 2016 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD'da infertilite tanısı konularak, Tüp bebek Merkezinde yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören ve istenilen sayı ve kalitede yumurta elde edilemeyen 27 hasta ve sağlıklı gebelik elde edilen 30 kadın kontrol, toplam 57 kişiden kan alındı. Tüm olguların, yaşları, aile öyküleri, FSH, LH, Estradiol hormon sonuçları, evlilik yılı, infertilite tipi, oosit sayısı gibi bilgileri sorgulayan ayrıntılı bir anemnez alınmıştır. Tüm olgular çalışma hakkında bilgilendirilerek çalışmaya katılmaları konusunda aydınlatılmış onayları alındı. Bu çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onay alınmıştır (Ek2.).

Çalışma ve kontrol grubu bireylerinden EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden DNA'lar saflaştırıldı. DNA eldesi kit yöntemi ile yapıldı (Nükleospin, Kandan DNA izolasyon kiti 74951.50). DNA örnekleri çalışılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

- Magnezyum Klorür (MgCl₂.6H₂O) (Merck)
- EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (Merck)
- Saf etanol (Riedel-de Haen)
- Taq DNA Polimeraz (ThermoScientific)
- Primerler (Fermentas)
- dNTP Mix (Thermo)
- DNA İzolasyon Kiti (blood) (Nükleospin)
- UltraPure™ Agaroz (Prona)
- DNA Ladder (Fermentas)
- 6X Loading Dye Solution (Sigma)
- Etidyum bromid(ETBr) (Sigma)
- Master Mix (One Taq)

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler

Aşağıda verilen ve bu çalışmada kullanılan cihazlar ve teknik malzemeler, araştırmanın yapıldığı yer olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunmaktadır.

- Otoklav (Nüve)
- Bidistile su cihazı (Nüve)
- Santrifüj (Sigma 3-15)
- Mikrosantrifüj (Hettich)
- Hassas terazi (Mettler AJ 100)
- Isıtıcı (Hotplate)
- Otomatik pipetler (Ependorf, Socorex, Rainin)
- Yatay elektroforez tankı ve güç kaynağı (Scie-Plas)
- Spektrofotometre (Jenway Genova Nano)
- UV görüntü analiz sistemi (Biolab)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Derin dondurucu (Ariston)
- Dijital Isı Bloğu (VWR Digital Hetblock)
- Thermal Cycler (Applied Biosystems GeneAmp 9700 PCR System)
- Vorteks (Clifton Cyclone)
- Vorteks (Boeco)
- Vorteks (Nüve NM 110)

3.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

10XTBE: 108 gr. Tris, 55 gr. Borik asit, 40 ml. EDTA 0.5M pH: 8 karıştırılıp toplam hacim 1000 ml. olacak şekilde bidistile su ile tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

1XTBE: 100 ml 10XTBE solüsyonu üzerine 900 ml. bidistile su eklenir. Oda ısısında saklanır.

%70 Etil alkol: 70 ml. % 99,5 etil alkol alınır ve üzerine 30 ml bidistile su eklenir.

Ethidium bromid solüsyonu (10 mg/ml): 1 gr. ethidium bromid, 10 ml. distile su içinde çözünür. Işık almayan bir şişe içinde +4°C'de saklanır. Çalışma solüsyonu, hazırlanan stok solüsyonundan konsantrasyon 0,5 mg/ml. olacak şekilde hazırlanır 0°C'de saklanır.

3.4.DNA İzolasyon Yöntemi

3.4.1.Hazırlık

1. Wash Buffer B5 üzerine 28 ml saf alkol ilave edildi.
2. Proteinaz K (liyofilize) 1,35ml Proteinaz buffer ile çözüldü.
3. Elution Buffer BE 70 °C'de ısıtıldı.

3.4.2.Protokol

Lizis:

1. 1.5 ml ependorf tüpüne 200 µl tüm kan + 25 µl Proteinaz K + 200 µl Buffer B3 ilave edildi.
2. 10-20 sn. kuvvetli vorteks yapıldı (Siemed, Clifton, England).
3. Örnekler 70 °C'de 10-15dk. ya da 30dk. inkübe edildi (VWR dijital ısı bloğu, USA).

DNA Bağlanma:

4. Örnekler üzerine 210 µl saf alkol ilave edildi ve vortekslendi.
5. Örnekler toplama tüpü içindeki kolonlara aktarıldı ve 11000xg de 1 dk. santrifüj edildi.

Yıkama:

6. Toplama tüpleri atıldı, yeni toplama tüpleri (2ml) yerleştirildi.
7. 500 µl Buffer BW ilave edildi ve 11000xg'de 1 dk. santrifüj edildi ve toplama tüpleri atıldı (Nüve, Türkiye).
8. Yeni toplama tüpleri alındı ve örnekler üzerine 600 µl Buffer B5 ilave edildi ve 11000xg de 1 dk. santrifüj edildi.
9. Alkolü uzaklaştırmak için santrifüj işlemi bir kez daha yapıldı.

Ayrılma:

10. Toplama tüpleri atıldı ve örnekleri taşıyan kolonlar 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
11. Önceden 70 °C'de ısıtılmış olan Buffer BE'den 100 µl ilave edildi.
12. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edildi. 11000xg de 1 dk. santrifüj yapıldı.
13. Kolonlar atıldı ve DNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

3.5. DNA Miktarının Tayini

DNA miktar tayini Nanodrop (Jenway, Genova, Nano, UK) UV spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirildi. Cihaz açıldıktan sonra 2 µL distile suyla körleme yapıldı. Daha sonra 2 µL DNA örneği ile 260 ve 280 nm dalga boylarında (OD260/280) ölçüm yapıldı.

3.6. *FSHR* Geni ekzon 10 bölgesi PCR Amplifikasyonu

PCR reaksiyonu 25µL'lik total volum içerisinde, 50-100ng kalıp gDNA, her primerden 0.2-0.4µM, 1-2mM 1xPCR Buffer (Mg² içeren) ve 0.625U Taq polimeraz içermektedir.

Tablo 1. *FSHR* Geni PCR Termal Cyclus programı

Başlangıç Denatürasyonu	Denatürasyon-Bağlanma- Uzama (35 Döngü)			Son uzama	Saklama
94°C	94°C	60-62°C	71°C	72°C	4°C
120 sn.	30 sn.	30 sn.	35 sn.	420 sn.	∞

PCR amplifikasyonu Tablo 1'de gösterildiği gibi ön-ısı döngüsü 94°C'de 3 dk. ve sonra 35 döngü 94°C'de 30 sn. denaturasyon, 60-62°C'de 30 sn bağlanma, 71°C'de 35 sn. uzama şeklinde gerçekleştirilerek ve son uzama 72°C'de 7 dk. şeklinde uygulandı (Applied Biosystems, Singapur). Daha sonra her PCR ürününden 5µl %1'lik agaroz jelle yüklemeye yapıldı. Jel görüntüsü analiz edildi ve her reaksiyon DNA dizi analizinde kullanıldı.

3.7. Agaroz Jelin Hazırlanışı

Çalışmamız için % 2'lik agaroz jel hazırlandı. 2 gr agaroz tartıldı. Erlen mayere alınan agaroz üzerine 100 ml 1XTBE eklenip mikrodalgada iyice çözünene kadar kaynatıldı. Sonradan soğumaya bırakılan jelin sıcaklığı 80°C'ye ulaşınca üzerine (çeker ocak açık haldeyken) 100µl EtBr (0,5mg/ml'lik çalışma solüsyondan) eklendi. Jel iyice çalkalanıp tarağı yerleştirilmiş olan jel kabına döküldü. En az 1 saat beklenip jel donduktan sonra taraklar çıkarılıp jelde oluşan kuyulara PCR ürünleri yüklendi.

Primer dizileri:

F: 5-TTTGTGGTCATCTGTGGCTGC-3;

R: 5-CAAAGGCAAGGACTGAATTATCATT-3

3.8.Yeni Nesil DNA Dizi Analizi (Nextera XT DNA Kütüphanesi Hazırlama)

Yeni nesil DNA dizileme yöntemi (illumina Miseq) Ondokuz Mayıs Üniversitesi KİTAM'de (Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma Teknikleri Merkezi) uygulanmıştır.

3.8.1.Taqment Genomik DNA**Hazırlık:**

Aşağıdaki tagmentasyon programı termal cycler'a kaydedildi.

1. Kapak ön ısıtma opsiyonu seçildi.
2. 5 dk. boyunca 55°C'de durdu.
3. 10°C'de bekletildi.

Prosedür:

1. PCR plate'ine TD (Taqment DNA Buffer)'den 10µl, gDNA'dan 5 µl eklendi.
2. Karıştırmak için pipetlendi.
3. 5 µl ATM (Amplicon Tagment Mix) eklendi ve karıştırmak için pipetlendi.
4. 1 dk. boyunca 20°C'de 280 x g' de santrifüj edildi.
5. Termal cycler'a yerleştirildi ve tagmentation programı çalıştırıldı.
6. 5 µl NT (Neutralize Tagment Buffer) eklendi ve karıştırmak için pipetlendi.
7. 1 dk. boyunca 20°C'de 280 x g' de santrifüj edildi.
8. Oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edildi.

3.8.2.Kütüphaneyi Çoğaltma**Hazırlık:**

Termal cycler'a aşağıdaki program kaydedildi.

1. Kapak ön ısıtma opsiyonu seçildi.
2. 3 dk. boyunca 72°C
3. 30 sn. boyunca 95°C

4. 12 döngü ; 95°C’de 10 sn., 55°C’de 30 sn., 72°C’de 30 sn. yapıldı. 5 dk. boyunca 72°C’de bekletildi. 10°C’de bekletildi.

Prosedür:

1. 24 kütüphane için; index primerler TruSeq Index Plate Fixture’de aşağıdaki gibi düzenlendi.
 - TruSeq Index Plate Fixture’ün 1-6 sütunları index 1 (i7) adaptörleri ile düzenlendi.
 - TruSeq Index Plate Fixture’ün A-D satırları index 2 (i5) adaptörleri ile düzenlendi.
2. 96 kütüphane için: index primerler TruSeq Index Plate Fixture’de aşağıdaki gibi düzenlendi.
 - TruSeq Index Plate Fixture’ün 1-12 sütunları index 1 (i7) adaptörleri ile düzenlendi.
 - TruSeq Index Plate Fixture’ün A-H satırları index 2 (i5) adaptörleri ile düzenlendi.
3. Çok kanallı pipet kullanarak her sütunda aşağıya doğru 5 µl index 1 (i7) adaptor eklendi. Yeni bir turuncu kapak ile her i7 adaptör tüpün kapağı değiştirildi.
4. Çok kanallı pipet kullanarak her satır boyunca 5 µl index 2 (i5) adaptör eklendi.
5. Yeni bir beyaz kapak ile her i5 adaptör tüpün kapağı değiştirildi.
6. 5 µl. NPM (Nextera PCR Master Mix) eklendi. Karıştırmak için pipetlendi.
7. 1 dk. boyunca 20°C’de 280 x g’ de santrifüj edildi.
8. Termal cycler’a yerleştirildi ve PCR programı çalıştırıldı.
9. Güvenli saklama için plate sıkıca kapatılarak en fazla 2 gün boyunca 2°C ile 8°C arasında tutuldu ya da gece boyunca termal cycler’da bırakılabilir.

3.8.3. Kütüphane Yıkaması (Clean Up)

Hazırlık:

Aşağıdaki sarf malzemeler hazırlandı:

1. RSB (Resuspension Buffer): -25°C ile -15°C’ de muhafaza edilen solüsyon oda sıcaklığında çözüldü. İlk çözülmeye sonra 2°C ile 8°C’de muhafaza edildi.
2. AMPure XP Boncuklar: 2°C ile 8°C’de muhafaza edilen maddenin sıcaklığını oda sıcaklığına getirmek için 30 dk. bekletildi.
3. Saf etanolden %80’lik etanol hazırlandı

Prosedür:

4. 1 dk. boyunca 20°C'de 280 x g' de santrifüj edildi.
 5. 50 µl PCR ürünü PCR plate'inden yeni bir midi plate'ye transfer edildi.
 6. 30 µl AMPure XP boncuk eklendi.
 7. 2 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
 8. 5 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
 9. Manyetik bir stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
 10. Manyetik standdan alındı ve tüm süpernatant atıldı.
 11. 200 µl %80'lik etanol ile 2 kez yıkandı.
 12. 20 µl pipet kullanarak %80'lik tortu EtOH uzaklaştırıldı.
 13. 15 dk. boyunca manyetik stand üzerinde havada kurutuldu.
 14. Manyetik standdan alındı. 52,5 µl RSB eklendi.
 15. 2 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
 16. 2 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
 17. Manyetik stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
 18. 50 µl supernatant yeni bir TCY plate'e transfer edildi.
- Bekleme durumunda plate kapatılarak en fazla 7 gün süreyle 15°C - 25°C' de bekletildi.

3.8.4. Kütüphanelerin Kontrolü

Yüksek hassasiyetli bir DNA çipi kullanılarak Agilent Technology 2100 Bioanalizer seyreltilmemiş 1 µl kütüphane ile çalıştırıldı.

3.8.5. Kütüphanenin Normalizasyonu**Hazırlık:**

Aşağıdaki sarf malzemeler hazırlandı:

1. LNA1 (Library Normalization Additives 1): -25°C ile -15°C arasında muhafaza edilen solüsyon çeker ocak altında su banyosu kullanılarak sıcaklığı 20°C-25°C'ye getirildi.
2. LNB1 (Library Normalization Beads 1): 2°C-8°C'de muhafaza edilen madde su banyosu kullanılarak sıcaklığı 20°C- 25°C'ye getirildi.
3. LNW1 (Library Normalization Wash 1): 2°C-8°C'de muhafaza edilen solüsyonsu banyosu kullanılarak sıcaklığı 20°C- 25°C'ye getirildi.

4. LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1): Oda sıcaklığında muhafaza edilen solüsyon yine oda sıcaklığında kullanıldı.

Prosedür:

5. Yeni bir midi plate'e 20 µl süpernatant transfer edildi.
 6. 15 ml.'lik konik tüpe 4,4 ml. LNA1 eklendi.
 7. LNB1 iyice süspanse edildi ve karıştırmak için pipetlendi.
 8. 15 ml.'lik konik tüpe 800 µl LNB1 transfer edildi ve karıştırmak için alt üst edildi.
 9. Bir çukur içine boncuk karışımı döküldü ve 45 µl LNA1/LNB1 karışımı eklendi.
 10. 30 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
 11. Manyetik bir stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
 12. Manyetik standdan alındı ve tüm süpernatant atıldı.
 13. 2 kez 45 µl LNW1 ile yıkandı.
 14. 30 µl 0,1 N NaOH eklendi.
 15. 5 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
 16. 5 dk.'lık elüsyon sırasında yeni bir 96'lık PCR plate SGP (Storage Plate) etiketlendi.
 17. SGP plate'e 30 µl LNS1 eklendi ve bir kenara konuldu.
 18. 5 dk.'lık elüsyon sonrasında bütün örneklerin yeniden süspanse oldu ve pipetle karıştırıldı.
 19. 5 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
 20. Manyetik bir stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
 21. Midi plate'den SGP plate'ye süpernatant transfer edildi.
 22. 1 dk. 1000 x g'de santrifüj yapıldı.
- Bekleme durumunda plate kapatılarak en fazla 7 gün -25°C ile -15°C'de saklandı.

3.8.6. Kütüphane Havuzu

Hazırlık:

- 25°C ile -15°C'de muhafaza edilen SGP plate oda sıcaklığında çözüldü ve karıştırmak için pipetlendi.

Prosedür:

1. 1 dk. boyunca 20°C’de 1000 x g’de santrifüj edildi.
2. SGP plate’den 5 µl PCR 8-strip tüpe transfer edildi.
3. Yeni bir ependorf PAL(Pooled Amplicon Library) tüp etiketlendi.
4. PCR 8-strip tüp içeriği PAL tüpe transfer edildi. Karıştırmak için pipetlendi.
5. Kütüphane havuzu, kullandığımız dizileme aletinin yükleme konsantrasyonuna seyreltildi.
6. PAL tüpdeki ve SGP plate’deki kullanılmayan kütüphane havuzu en fazla 7 gün boyunca -25°C ile -15°C’de muhafaza edildi.

3.9. Biyoinformatik Analiz

Yeni nesil dizileme işlemi İllumina Miseq ile yapıldı. Dizileme sonrası veriler İllumina basespace üzerinde incelendi. Basespace üzerinden Variant Studio V.1.0.0. uygulaması ile vcf dosyaları kullanılarak, dizilenen bölgelerdeki varyasyonlar ve ayrıntıları elde edildi. Buradan elde edilen varyasyon kordinatları alınarak yine Basespace üzerinden İntegrative Genomics Viewer (IGV) 2.1.2. uygulamasına aktarıldı. Bu aplikasyon aracılığıyla da bam ve vcf uzantılı dosyalar kullanılarak, diziler üzerinde örneklere ait varyasyon bölgeleri gözle incelendi.

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

SPSS istatistik programı kullanılarak klinik bulgular ile genotipler arasında korelasyon analizi yapıldı. Ayrıca, hasta ve kontrol grupları arasındaki allel ve genotip frekanslarını karşılaştırmak için Ki-kare, olasılık oranları (OR) ve P değeri hesaplandı. SPSS programı (Dean ve ark., versiyon 2.3.1) kullanılarak 57 genotip analizi yapıldı. Örneklem sayısı 25’in üzerinde olduğunda Pearson Ki-kare, 25’in altında olduğunda ise Yates Ki kare kullanıldı. Örneklem sayısı 5’in altında olduğunda Fisher exact veya Mid-P exact uygulandı.

Elde edilen sonuçlar; mutant bölgeler ile infertilite oluşumu arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığı amacıyla değerlendirildi.

4. BULGULAR

EYLÜL 2015-HAZİRAN 2016 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum servisi Tüp Bebek Merkezinde infertilite tanısı konularak yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören, istenilen sayı ve kalitede yumurta elde edilemeyen 27 kadın hasta ile, sağlıklı gebelik elde edilen 30 kadın kontrol olmak üzere toplam 57 kişiden kan alındı. Kontrol ve hasta grubu kişilere gönüllü olur formu imzalatıldı (Ek 1.). Her bir hastanın yaşı, infertilite tipi, infertilite nedenleri, evlilik süresi Tablo 2'deki gibi kaydedildi.

Tablo 2. Hasta grubunun yaşı, infertilite tipi, infertilite nedeni, evlilik süresi bilgileri

Sıra	Yaşı	İnfertilite Tipi	İnfertilite Nedeni	Evlilik Süresi
1	37	primer	düşük o. rezervi	8
2	41	primer	düşük o. rezervi	1
3	39	primer	açıklanamayan	10
4	41	primer	kadın kaynaklı	5
5	32	primer	kadın kaynaklı	3
6	35	primer	düşük o. rezervi	5
7	23	primer	kadın kaynaklı	4
8	36	primer	kadın kaynaklı	1,5
9	25	primer	açıklanamayan	2
10	30	primer	açıklanamayan	1
11	39	sekonder	düşük o. rezervi	5
12	45	primer	açıklanamayan	3
13	25	primer	açıklanamayan	2
14	45	primer	düşük o. rezervi	1
15	38	primer	açıklanamayan	1
16	33	sekonder	azalmış over	3
17	46	primer	açıklanamayan	6
18	42	sekonder	açıklanamayan	14

Tablo 2. (devamı)

Sıra	Yaşı	İnfertilite Tipi	İnfertilite Nedeni	Evlilik Süresi
19	34	Primer	açıklanamayan	8
20	34	Primer	açıklanamayan	1,5
21	34	Primer	female	3
22	35	Primer	düşük o. rezervi	3,5
23	34	Primer	azalmış over	4,5
24	35	Primer	açıklanamayan	1
25	36	Primer	açıklanamayan	6
26	39	Primer	açıklanamayan	20
27	41	Primer	açıklanamayan	5

Hasta grubuna ait FSH, LH, E2 hormon değerlerine ilişkin test sonuçları ile tedavi sırasında toplanan oosit sayılarına ilişkin bilgileri Tablo 3'teki gibi kaydedildi.

Tablo 3. Hasta grubunun FSH, LH, E2 hormonları ve oosit değerleri

Sıra	FSH (2,00-10,00 mIU/ml)	LH (2,00-15,00 mIU/m)	E2 (30-119 pg/ml)	Oosit
1	15	7	25	2
2	9,8	5,2	58	1
3	13,5	8,3	57	3
4	6,34	5,34	4,47	4
5	12	6	47	3
6	8,6	9,5	6,8	1
7	6	7	36	3
8	15	10	40	2
9	8,04	6,5	36	4

Tablo 3. (devami)

Sıra	FSH (2,00-10,00 mIU/ml)	LH (2,00-15,00 mIU/m)	E2 (30-119 pg/ml)	Oosit
10	9,7	8,03	36,3	3
11	8,01	2,9	41	1
12	8,7	7,8	49	4
13	7,04	4,1	43	4
14	37	32	30	1
15	10,5	5,1	89,4	3
16	12	4,5	22	2
17	11,8	7,03	28	1
18	9,76	6,68	56,63	4
19	6,2	5,03	122	4
20	10	8	42	4
21	13	7,5	32	2
22	10,3	7,9	58	1
23	10	3,6	46	3
24	9,06	5,07	53	3
25	4,7	4,2	29,2	3
26	10,4	6,6	88	1
27	13,7	7,4	34	1

Tablo 4. Hasta grubunun klinik verileri

	Hasta Grubu		
	Ortalama \pm SS	Ortanca(Min-Maks)	Aralık(Range)
Yaş	36,07 \pm 5,86	29,00 (24-45)	21
Evlilik Süresi	4,75 \pm 4,33	3,5 (1-20)	20
FSH	10,96 \pm 5,86	10,00 (4,7-37)	32,30
LH	7,34 \pm 5,23	6,68 (2,90-32)	29,10
E2	44,80 \pm 24,67	41 (4,47-122)	117,53
P	0,54 \pm 0,30	0,50 (0,30-1,73)	1,43
Oosit Sayısı	2,55 \pm 1,15	3 (1-4)	3
Tedavi Sayısı	1,48 \pm 1,01	1 (1-5)	4
Embriyo	1,40 \pm 1,11	1 (0-4)	4
Hemogram	13,10 \pm 1,10	12,90 (11,2-15,9)	4,7

4.1. Çalışma Grubu İle İlgili Demografik Karakterlerin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, *FSHR* gen polimorfizmlerinin infertilite ile olan ilişkisinin araştırılması amacıyla 27 infertil kadın hasta ile herhangi bir infertilite sorunu olmayan 30 sağlıklı kadın kontrol incelendi.

Hasta Grubu ve Demografik Özellikleri: Hasta grubunun yaşı 24 ve 45 arasında değişmekte olup ortalama yaş 36,07 olarak hesaplanmış ve medyanı 29'dur. Hasta grubunun evlilik süresi 2 ve 24 yıl arasında değişmekte olup ortalama evlilik süresi 2,40 olarak hesaplanmış medyanı 2 yıldır. Hasta grubunun FSH değeri 4,7 mIU/ml ve 37 mIU/ml arasında değişmekte olup ortalama FSH değeri 10,96 olarak hesaplanmış medyanı 10 mIU/ml'tir. Hasta grubunun LH değeri 2,90 IU/L ve 32 IU/L arasında değişmekte olup ortalama LH değeri 7,34 IU/L olarak hesaplanmış medyanı 6,68 IU/L'tir. Hasta grubunun E2 değeri 4,47 ng/ml ve 122 ng/ml arasında değişmekte olup ortalama E2 değeri 44,80 ng/ml olarak hesaplanmış medyanı 41 ng/ml'dir. Hasta grubunun oosit sayıları 1 ve 4 arasında değişmekte olup ortalama oosit sayısı 2,55 olarak hesaplanmış medyanı 3 oosittir. Hasta grubunun embriyo sayısı 0 ve 4 arasında değişmekte olup ortalama embriyo sayısı 1,40 olarak hesaplanmış medyanı 1 embriyodur. Hasta grubunun hemogram değeri 11,2 ve 15,9 arasında değişmekte olup ortalama hemogram miktarı 13,10 olarak hesaplanmış medyanı 12,90'dır. Hasta

grubunun herhangi bir Hıv ve HbsAg pozitifliği bulunmayıp AST ve ALT değerleri de normal seviyelerde bulunmuştur (Tablo 4’de Gösterilmiştir).

Çalışmamızda kullanılan kontrol grubu kişilerin yaş ortalaması ve ortanca değeri Tablo 5’te gösterilmiştir. Bu bilgilere göre kontrol grubu yaş ortalaması $30,70 \pm 5,396$ (21- 40) olup medyan 32 yaştır.

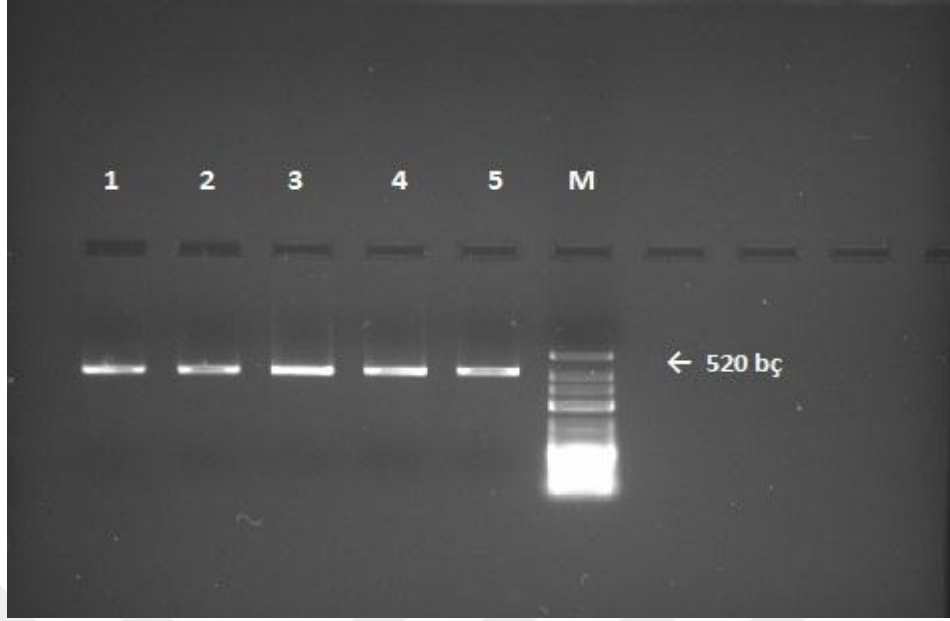
Tablo 5. Kontrol grubu yaş ortalaması

	Kontrol Grubu (N=30)		
	Ortalama \pm SS	Ortanca (Min-Maks)	Aralık(Range)
Yaş	$30,70 \pm 5,396$	32,00 (21-40)	19

4.2.FSHR Geni Yeni Nesil Dizi Analizi Sonuçları

4.2.1.FSHR Geni Polimorfizmi

FSHR geni rs747317735 varyantı çalışılan 27 hastanın 7’sinin (%58,3) CC homozigot, 7’sinin (%28,0) CT heterozigot, 13’ünün (%65,0) TT homozigot; 30 kontrolün ise 5’inin (%41,7) CC homozigot, 18’inin (%72,0) CT heterozigot, 7’sinin (%35,0) TT homozigot olduğu, 26’sının (%49,1) GG homozigot, 1’inin (%25,0) AG heterozigot olduğu tespit edildi (Tablo 6). PCR yöntemi ile çalışılan örneklerin bazılarının genotiplerini gösteren jel fotoğrafları (520 bç) şekilde verilmiştir (Şekil 7). Hasta ve kontrollerin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında rs747317735 bölge açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0,033$). Genotiplerden CC+CT’ye karşılık TT karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi ($p=0,024$). rs6166 bölgesi bakımından hasta ve kontrol grubu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 6).



Şekil 7. *FSHR* geni PCR sonuçları (M:Marker)

Tablo 6. *FSHR* gen polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıklarının hasta ve kontrollerde karşılaştırılması

SNP	Genotip / Allel	Hastalar (n=27) (%)	Kontroller (n=30) (%)	χ^2	P değeri	OR (%95 CI)	
<i>FSHR</i> rs747317735	CC	7(58,3)	5(41,7)	6,834	0,033		
	CT	7(28,0)	18 (72,0)				
	TT	13(65,0)	7(35,0)				
		CC+CT : TT	14 : 13	23: 7	3,842	0,024	0,327(0,1055-1,019)
		CC : TC+TT	7: 720	5: 25	0,733	0,39	1,75 (0,482-6,354)
		C	21	28	2,897	0,008	0,535 (0,260-1,102)
		T	33	32			
<i>FSHR</i> rs6166	GG	26(49,1)	27(50,9)	0,863	0,353		
	AG	1(25,0)	3(75,0)				
	AA	0	0				
		GG+AG : AA	27: 0	30 : 0	0,8634	0,35	2,889 (0,282-29,58)
		GG : AG+AA	26: 1	27: 3			
		G	53	57	0,70	2,789 (0,2814-27,65)	
		A	1	3			

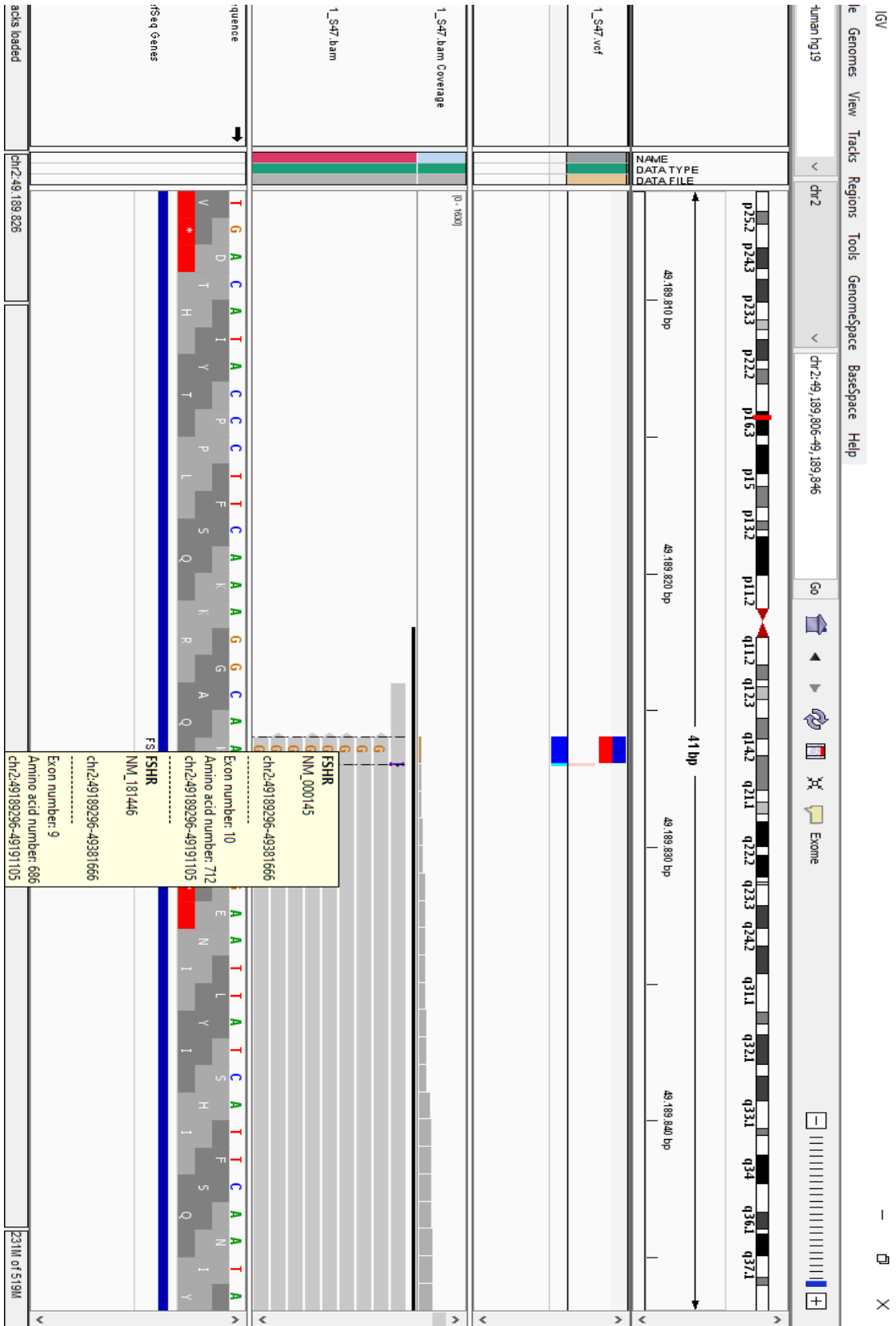
-İstatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlar kalın karakterlerle yazılmıştır.

Tablo7. Hastaların demografik özellikleri ve *FSHR* genotip dağılımları

	Toplam n(%)27	<i>FSHR</i> rs747317735			P değeri	χ^2	<i>FSHR</i> rs6166			P Değeri	χ^2
		CC	CT	TT			GG	AG	AA		
İnfertilite şekli											
primer	25(92,6)	5(71,4)	7(100,0)	13(100,0)	0,046	6,171	23(92,0)	2(8,0)	0	0,923	0,087
sekonder	2(7,4)	2(28,6)	0(,0)	0(,0)			1(100,0)	0(,0)	0		
Oosit sayısı											
1	7(25,9)	1(14,3)	1(14,3)	5(38,5)			5(20,0)	1(100,0)	0		
2	5(18,5)	0(,0)	3(42,9)	2(15,4)	0,192	8,689	5(20,0)	0(0,0)	0	0,325	3,467
3	8(29,6)	2(28,6)	2(28,6)	4(30,8)			8(32,0)	0(0,0)	0		
4	7(25,9)	4(57,1)	1(14,3)	2(15,4)			7(28,0)	0(0,0)	0		

İstatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlar kalın karakterlerle yazılmıştır.

FSHR geni DNA dizileme görüntüleri şekil 8 ve 9'da gösterilmiştir. Hastaların demografik özellikleri ve *FSHR* genotip dağılımlarına baktığımızda, TT genotipine sahip bireylerin primer infertilite grubunda daha yüksek frekansta olduğu saptanmıştır (Tablo 7).



Şekil 9. *FSHR* geni rs6166 dizileme görüntüsü

5.TARTIŞMA

FSH gamet olgunlaşmasında temel bir hormon olmakla birlikte hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite tedavisinde her iki cinsiyette de tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Liedo ve ark. 2014).

Yardımcı üreme tekniklerinde uygulanan ilaç dozu ve elde edilen yumurta sayısı ve kalitesi tedavide başarıyı etkileyen önemli unsurlardandır. Bu nedenle literatürde bu sorunu gidermek amacıyla birçok çalışma yapılmakta özellikle bireyler arasındaki genetik farklılıktan dolayı ilaca cevapta değişkenliğin belirlenmesine yönelik farmakogenetik çalışmalar gerçekleştirilmektedir.

Bu tez çalışmasında kadınlarda normal üreme fonksiyonu için gerekli olan FSH hormonunun reseptör geninin ekzon 10 bölgelerinde meydana gelen G919A (Ala307Thr), G2039A(Ser680Asn), G29A mutasyonlarının ve C566T (Ala189Val) inaktive edici mutasyonunun kadın fertilitesi tedavisi sırasında uygun doz uygulanımında yeterli sayıda ve kalitede yumurta oluşumunu etkileyip etkilemediği ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda benzer ve farklı sonuçlar sunulmuştur.

Bu çalışma sonucunda *FSHR* geni ekzon 10 bölgesi rs747317735 varyant bölgesi hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TT genotipi bakımından istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptandı ($p=0,033$, $\chi^2=6,834$). *FSHR* geni rs747317735 bölgesi (C>T) değişimi bakımından T allel frekansı hasta grubunda kontrol grubundan daha yüksek frekansta saptandı ($p=0,008$, $\chi^2=2,897$).

Çalışmamızın sonucuna göre, yardımcı üreme tedavisi sürecinde *FSHR* geni rs747317735 bölgesi bakımında T allelli ve TT genotipine sahip bireylerde yeterli sayıda ve kalitede x yumurta oluşturulamadığı saptanmıştır. Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında; Wunsch ve arkadaşlarının çalışmasında, *FSHR*'nün kodlayan kısmında yapılan mutasyonel araştırmada ekzon 10'da 307. ve 680. konumlarda 2 yaygın değişim olduğu görülmüştür. Araştırmalar ekzon 10'daki değişimlerin reseptör proteinini ve üreme tedavisi alan kadınlarda yumurtalığın FSH indüksiyonuna sensitivitesini etkilediğini göstermiştir (Wunsch ve ark., 2005). Wunsch ve ark çalışmasında -29 A/A homozigot hastalarda FSH miktarının diğer hastalara göre daha düşük olduğu görülmüştür (Wunsch ve ark., 2005).

307. ve 680. aminoasitleri eksprese eden kodonlarda bağlantı eşitsizliği (*linkage disequilibrium*) görülür, çünkü rekombinasyon sırasında birbirlerine bağlanır ve rastgele dağılım yapmazlar. Bu durum bu konumlarda farklı allelik varyantlar oluşmasına neden olur. Bu varyantlardan farklı etnik gruplarda en sık görülenler Ala307/Ser680 ve Thr307/Asn680'dir (Lussiana ve ark., 2008). Ala307-Ser680 dünya genelinde % 40 oranında bulunmaktadır (Wunsch ve ark., 2007).

Yapılan diğer bir çalışmada -29. pozisyondaki TNP'in FSH reseptör geninin transkripsiyonel etkinliğiyle ilişkili olduğu ve AA genotipinin tedaviye zayıf cevap verme ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Achrekar ve ark., 2009).

2010 yılında yapılan bir başka çalışmada -29 AA genotipinin kontrol gruplarıyla kıyaslandığında primer ve sekonder amenoreli kişilerdeki prevalansı daha yüksek çıkmıştır, ayrıca primer amenoreli hastaların serum FSH miktarlarının -29. pozisyonda AA genotipindeki kişilerde daha yüksek çıkmıştır (Achrekar ve ark., 2010).

Farklı popülasyonlardaki araştırmalar 680. pozisyondaki Ser/Ser varyantı olan kişilerin bazal FSH düzeylerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (Sudo ve ark., 2002; Falconer ve ark., 2005; Grebb ve ark., 2005; Simoni ve ark., 2008).

FSHR'nün, -29A-A919A-A2039A, -29G- A919A-A2039A, -29A-G919GG2039G ve -29G- G919G-G2039G olmak üzere 4 yaygın kombinasyonu vardır (Gromoll ve Simoni, 2005).

FSHR gen dizisindeki mutasyonlar FSHR protein yapısındaki aminoasitlerde etkin fonksiyonel değişimlere neden olur. *FSHR* gen mutasyonları hücre yüzeyinde reseptör ifadesi, FSH bağlanma yeteneği ve FSH sinyal iletiminde etkin olabilir (Lussiana ve ark., 2008).

Aittomaki ve arkadaşları 1995 yılında *FSHR* geninin 7. ekzonunda, dirençli yumurtalık sendromundan (*Resistant ovarian syndrome*) dolayı yumurtalık yetmezliğine sebep olan bir mutasyon bulmuştur. Etkilenmiş kadınlar kısırdır ve günümüzde kısırlıkta hormon tedavisinden başka bir tedavisi mevcut değildir (Ghadami ve ark., 2008).

FSHR'nin inaktifleştirici mutasyonu, proteinin ekstraselüler ligand bağlanma kısmında tanımlanmıştır. Ekzon 7'de bir C566T transisyonu 189. rezidüde Ala'nin yerine Val'in gelmesine sebep olur (Tapanainen, 1998).

Ala189Val mutasyonu olan kadınların fenotipi, FSHR'nün kısmen inaktif formlarını ifade eden kadınlardan daha önemlidir (Ranniko ve ark., 2002).

FSHR genindeki Ala189Val mutasyonu homozigot olduğu durumlarda kadınlarda folliküler olgunlaşmanın durmasıyla hipergonadotropik ovaryan yetmezliğine ve erkeklerde spermatogenezin bloke olmasına sebep olur. Val 189 bakımından homozigot kadınlarda folliküler olgunlaşma engellenir ve granüloza hücreleri apoptoza uğrar. Bununla beraber granüloza hücrelerinin aromataz içeriği önemsenmeyebilir ve intrafolliküler çevrede de östrojen miktarı azdır. Bu follikülün erken kaybolmasının sebebidir. Bu durumda yumurtalık steroid üretiminde ekzojen olarak FSH verilmesinin bir önemi mevcut değildir ve hCG serum östrojen miktarını yükseltmez. Mutasyon heterozigot ise iyi korunmuş yumurtalık hacmi ile birlikte sekonder amenoreye sebeptir, bu da FSHR etkinliğinin oldukça azaldığını fakat follikül havuzunun iyi korunduğunu göstermiştir (Lussiana ve ark, 2008).

Mutasyon maymun, koyun ve rat FSHR'leri ile kıyaslandığında epeyce korunmuş bir bölgede bulunur. Bu da bölgenin işlevsel önemini vurgulamaktadır. Bu kısım FSHR, LHR ve TSHR'de aynı olan beş aminoasitlik bir diziyeye dahildir ve konsensus N-bağlı glikolizasyon bölgesi bulunur. Bölgenin üç glikoprotein hormon reseptöründe de yüksek oranda korunmuş olması ligand özgün tanıma ve bağlanma bölgesi olmadığını işaret eder. Bu bölge daha çok reseptörün plazma membranına transdüksiyonunda işlevseldir (Tapanainen, 1998).

Ala 189, glikoprotein hormon reseptörlerinde iyi korunmuş 5 aminoasitlik bölgenin (Ala189PheAsnGlyThr) ilk aminoasitidir. 189. pozisyonda Val olması glikolizasyonun işlevini azaltır ve sonuçta hasarlı reseptör gidiş gelişine (*trafficking*) ve protein tranformasyonuna sebep olur (Themmen ve Huhtainemi, 2000).

Mutant gen ile transfekte edilmiş MSC-1 hücrelerinin yükselen FSH ile inkübasyonundan sonra cAMP üretiminin wt FSHR ile transfekte edilen hücrelerden daha az olduğu görülmüştür. Aynı zamanda FSH'ın uyardığı IP3 miktarı da mutant FSHR'ü bulunan hücrelerdeki miktarının az olduğu gözlemlenmiştir. Mutant reseptörün FSH bağlanma etkinliği normaldir çünkü Ala 189 Val mutasyonu FSH-FSHR etkileşimini etkileyen bir bölgede bulunmamaktadır ve hormon reseptör kompleks oluşumuna etki etmez. Ala189Val mutasyonu FSHR'nin yapısal değişimi nedeniyle FSH bağlanmasından sonra sinyal iletimini etkiler. Mutasyon FSHR'nin hücre

membran hedeflenmesini ve reseptörün ikincil mesajcı etkinliğini değiştirir (Lussiana ve ark, 2008).

Mutant Ala 189 Val varyant kurucu etkisinden dolayı kuzey doğu Avrupa'da az değildir (Lussiana ve ark, 2008).

Ala189Val inaktive edici mutasyonuna Brezilya ve Japon popülasyonlarında yapılan araştırmalarda rastlanmamıştır. Yunan popülasyonunda 33 prematür over yetmezlik tanısı (POF) konmuş kadın, ovulasyon indüksiyonunu zayıf cevaplayan 8 kadın ve 20 kontrolle yapılan araştırmada hastaların ve kontrollerin hiç birinde homozigot veya heterozigot mutasyon görülmemiştir (Loutradis ve ark, 2006).

Finlandiya, İsviçre, Danimarka ve Singapur'un Çin popülasyonlarındaki araştırmada Finlandiya'da C566T mutasyonunun prevalansı %0,96 iken, İsviçre'de yalnızca 1 tane mutasyon taşıyıcısı bulunmuş, diğerk iki popülasyonda ise mutasyon görülmemiştir (Jiang ve ark, 1998).

189. pozisyonda Val görülmesi glikozilasyonun etkinliğini azaltır ve sonuçta hasarlı reseptör trafiğine (reseptörün plazma membranına taşınamaması) ve yanlış protein konformasyonuna sebep olur (Themmen ve Huhtainemi, 2000).

Bu mutasyonun homozigot olduğu kadınlarda foliküler olgunlaşmanın durmasıyla hipergonadotropik ovaryan yetmezlik oluşurken, erkeklerde spermatogenezin engellendiği görülmüştür (Lussiana ve ark., 2008).

Araştırmalar spermatogenetik bozukluklarda, *FSHR* geninin üç bölgeyi kapsayan tek nükleotid değişimlerinin (-29. pozisyon ile ekzon 10'daki 307 ve 680.pozisyondaki polimorfizmler) birçok genetik faktörden biri olabileceğini kanıtlamıştır fakat bu üç tek nükleotid polimorfizminin yumurtalık işlevi üzerine sinerjistik etkisi araştırılmamıştır.

2014 yılında Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada, infertilite tanısı konan ve yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören 96 kadın olgu çalışılmış ve kumulus hücre örnekleriyle gerçekleştirilen çalışmada *FSHR* geni incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda hastaların % 8'inde ekzon ve intronlarda delesyon ve splay değişimleri saptanmıştır (Cengiz Karakaya, 2014). Bu çalışmanın sonucunda *FSHR* geninde alternatif splay değişimlerinin bireyler arasında farklılıklara yol açabileceği tanı ve tedavide farklı yol izlenmesi gerekebileceği önerilmektedir (Cengiz Karakaya, 2014).

2014 yılında yapılan başka bir çalışmada, IVF ya da ISCI tedavisi gören ve yeterli yumurta sayısı oluşmayan 121 Tayvanlı kadında *FSHR* geni kodon 307 ve 680 gen polimorfizmleri incelenmiş ve *FSHR* geni ile kronik anovulasyon arasında bir ilişki tespit edilememiştir (Singhasena, 2014).

Palaban ve arkadaşlarının Asyalı kadınlarla yaptığı çalışmada, *FSHR* geni Ser680Asn (N680S) polimorfizmini incelemişler ve SS genotipinin yeterli yumurta elde edilemeyen kadınlarda frekansının yüksek olduğunu saptamışlardır (OR 1,61, p = 0,08). (Palaban, 2014).

Yine 2014 yılında Simoni ve arkadaşları infertilite tedavisinde FSH'nin potansiyel farmakogenetik etkisini incelemek amaçlı yaptıkları çalışmada, rs6166 (c.2039AOG, p.N680S), rs6165 (c.919AOG, p.T307A), rs1394205 (c.K29GOA) polimorfik bölgeleri incelemişler ve *FSHR* geni varyantlarının her iki cinsiyette de serum FSH düzeylerini ve gonadal cevabı etkilediğini bildirmişlerdir (Simoni, 2014).

Bu çalışmada da benzer şekilde, *FSHR* geni ekzon 10 bölgesi rs747317735 varyant bölgesi hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TT genotipi bakımından istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptandı (p=0,033, $\chi^2=6,834$). *FSHR* geni rs747317735 bölgesi (T>C) değişimi bakımından T allel frekansı hasta grubunda kontrol grubundan daha yüksek frekansta saptandı (p=0,008, $\chi^2=2,897$). Çalışmamızın sonucuna göre, yardımcı üreme tedavisi sürecinde *FSHR* geni ekzon 10 rs747317735 bölgesi bakımından T allelli ve TT genotipine sahip bireylerde yeterli sayıda ve kalitede yumurta oluşmadığı saptanmıştır.

FSHR geni ekzon 10 bölgesinde 680. pozisyonda serin→asparjin aminoasit değişimi meydana geldiği bilinmektedir. Bu değişim neticesinde reseptörde meydana gelen konformasyonel değişiklik nedeni ile hormon–reseptör bağlanma etkinliği değişmektedir. Dolayısıyla tedavi sırasında uygulanan ilacın etkinliğini tam olarak gösteremediğini ve bu durumdan dolayı yeterli yumurta oluşmadığını düşünmekteyiz. Bu sebeple benzer çalışmaların artmasıyla birlikte, gelecekte yardımcı üreme tedavisi uygulanan olgularda yumurta oluşumunu etkileyen genler bakımından bireylerin genotip durumlarına göre ilaç dozu uygulanmasının daha etkin sonuçlar vereceği düşüncesindeyiz.

Sonuçlarımızın kesinlik kazanması için hasta sayısının artırılması ve farklı populasyonlarda çalışılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmaya Eylül 2015 - Haziran 2016 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum servisi Tüp Bebek Merkezinde infertilite tanısı konularak yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören, istenilen sayı ve kalitede yumurta elde edilemeyen 27 hasta ile sağlıklı gebelik elde edilen kadın 30 kontrol dahil edilerek toplam 57 olgu dahil edildi. *FSH* geni ekzon 10 bölgesi yeni nesil DNA dizileme yöntemi ile çalışıldı.

Bu çalışmada, *FSHR* geni ekzon 10 bölgesi rs747317735 mutant bölgesi hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TT genotipi bakımından istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptandı ($p=0,033$, $\chi^2=6,834$). *FSHR* geni rs747317735 bölgesi (T>C) değişimi bakımından T allel frekansı hasta grubunda kontrol grubundan daha yüksek frekansta saptandı ($p=0,008$, $\chi^2=2,897$). Çalışmamızın sonucuna göre, yardımcı üreme tedavisi sürecinde *FSHR* geni ekzon 10 rs747317735 bölgesi bakımından T allelli ve TT genotipine sahip bireylerde yeterli sayıda ve kalitede yumurta oluşmadığı saptanmıştır.

FSHR geni ekzon 10 bölgesinde 680. pozisyonda serin→asparjin aminoasit değişimi meydana geldiği bilinmektedir. Bu değişim neticesinde reseptörde meydana gelen konformasyonel değişiklik nedeni ile hormon–reseptör bağlanma etkinliği değişmektedir. Dolayısıyla tedavi sırasında uygulanan ilacın etkinliğini tam olarak gösteremediğini ve bu durumdan dolayı yeterli yumurta oluşmadığını düşünmekteyiz. Bu sebeple benzer çalışmaların artmasıyla birlikte, gelecekte yardımcı üreme tedavisi uygulanan olgularda yumurta oluşumunu etkileyen genler bakımından bireylerin genotip durumlarına göre ilaç dozu uygulanmasının daha etkin sonuçlar vereceği düşüncesindeyiz.

Sonuçlarımızın kesinlik kazanması için hasta sayısının artırılması ve farklı populasyonlarda çalışılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Achrekar SK, Modi DN, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale SD. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (Thr307Ala) is associated with variable ovarian response and ovarian hyperstimulation syndrome in Indian women. *Fertil Steril*. 2009;91:432-9.
- Achrekar SK, Modi DN, Meherji PK, Patel ZM, Mahale SD. Follicle stimulating hormone receptor gene variants in women with primary and secondary amenorrhea. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27: 317-26.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell* 4th Ed. 2002; p: 858.
- Bletsa R, Antsaklis A, Michalas S. Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are not evident in Greek women with premature ovarian failure and poor responders. *Gynecol Obstet Invest*. 2006;61: 56-60.
- Buffet N C and Bouchard P. The Neuroendocrine Regulation Of The Human Ovarian. *Cycle Chronobiol Int*. 2001; 18: 893-919.
- Bükülmez O, Arıcı A. Üreme Hormonlarının Biyosentezi, İntrasellüler Etki Mekanizma ve Metabolizmaları Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Editörler: Prof. Dr. Hüsnü A. Kışınışçi, Prof. Dr. Eflatun Gökşin, Prof. Dr. Lütfü Sabri Önderoğlu, Prof. Dr. Nobel Kitabevi. 1996; s.:1109.
- Caltabiano G, Campillo M, De Leener A, Smits G, Vassart G, Costagloa S, Pardo L. The specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65: 2484-92.
- Conn PM, Ulloa-Aguirre A, Ito J, Janovick JA. G protein coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacol Rev*. 2007;59: 225-50.
- Falconer H, Andersson E, Aanesen A, Fried G. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in a population of infertile women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005;84: 806-811.
- Ghadami M, Salama SA, Khatoon N, Chilvers R, Nagamani M, Chedrese PJ, Al-Hendy A. Toward gene therapy of primary ovarian failure: adenovirus expressing human FSH receptor corrects the Finnish C566T mutation. *Mol Hum Reprod*. 2008;14:9-15.
- Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J, Sonntag B, Nieschlag E, Kiesel L, Simon M. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90: 4866-72.

- Gromoll J, Simonı M. Genetic complexity of FSH receptor function. Trends Endocrinol Metab. 2005;16: 368-73.
- Heckert LL, Griswold MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. Recent Prog Horm Res. 2002;57: 129-48.
- <http://www.gata.edu.tr2016.cerrahitipbilimleri/kadinhastaliklaridogumad/SSS/INF4.html>, 2016.
- Ilgaz N. S. Türk Toplumundaki Kadınlarda Fshr Polimorfizmleri Ve C566t Mutasyonunun Fertilité Üzerine Etkisinin Analizi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Yüksek Lisans Tezi, 2010; 2-5.
- Jı TH, Grossmann M, Jı I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor ligand interactions. J Biol Chem. 1998;273: 17299-302.
- Jiang M, Aittomäki K, Nilsson C, Pakarinen P, Iitiä A, Torresani T, Simonsen H, Goh V, Pettersson K, De La Chapelle A. Huhtaniemi I The frequency of an inactivating point mutation (566C-->T) of the human follicle-stimulating hormone receptor gene in four populations using allele-specific hybridization and time resolved fluorometry. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83: 4338-43.
- Junqueira L C, Carneiro J. Temel Histoloji. AYTEKİN Y ve SOLAKOĞLU S. editör, Nobel Tıp Kitabevi. 2006;s:450.
- Kutlukhan, O. Menstrual Döngü (Siklus) ve Nöroendokrin Kontrolü Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Editörler: Prof. Dr. Hüsnü A. Kışnişçi, Prof. Dr. Eflatun Gökşin, Prof. Dr. Lütfü Sabri Önderoğlu, Prof. Dr. Tekin Durukan, Prof. Dr. Kemal Üstay, Prof. Dr. Ali Ayhan, Timur Gürkan Güneş Tıp Kitabevi. 1996; 1112-1119.
- Karakaya C, Guzeloglu-Kayisli Ö, [...] and Lalioti M. D. Follicle-stimulating hormone receptor (*FSHR*) alternative skipping of exon 2 or 3 affects ovarian response to FSH. 2014;(7):630-643.
- Liedo B, Ortiz JA, Llacer J, Bernabeu R. Pharmacogenetics of ovarian response Pharmacogenomics. 2014;15(6), 885–893.
- Livshytis G, Podlesnaja S, Kravchenko S, Sudoma I, Livshits L. A distribution of two SNPs in exon 10 of the FSHR gene among the women with a diminished ovarian reserve in Ukraine. Assist Reprod Genet. 2009; 26:29–34.
- Loutradis D, Patsoula E, Stefanidis K, Drakakis P, Antonakis G, Lussiana C, Guanı B, Marı C, Restagno G, Massobrio M, Revelli A. Mutations and Polymorphisms of the FSH Receptor (*FSHR*) Gene Clinical Implications in Female Fecundity and Molecular Biology of *FSHR* Protein and Gene. Obstet Gynecol Surv. 2008;63: 785-95.

- Palaban N, Trevisan CT, Peluso C, Jarjanazi H, Christofolini DM, Barbosa CV, Bianco B. Evaluating influence of the genotypes in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn (rs6166) polymorphism on poor and hyper-responders to ovarian stimulation: a meta-analysis. *Journal of Ovarian Research*. 2014;7:122.
- Rannikko A, Pakarinen P, Manna PR, Beau I, Misrahi M, Aittomäki K, Huhtaniemi I. Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Mol Hum Reprod*. 2002; 8:311-7.
- Rosenbluth EM, Van Voorhis BJ. Evolving role of assisted reproductive technologies. *Clin. Obstet. Gynecol*. 2011; 54(4), 734–745.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology, *Endocr Rev*. 1997;18: 739-73.
- Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update*. 2002;8: 413-21.
- Simoni M, Tempfer CB, Destenaves B, Fauser BC. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Hum Reprod Update*. 2008;14: 459–484.
- Simoni M, Casarini L. Genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view. 2014;170:3.
- Singhasena W, Pantasri T, Piromlertamorn W, Samchimchom S, and Vutyavanich T. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism in chronic anovulatory women, with or without polycystic ovary syndrome: a cross-sectional study. 2014;12:86.
- Sivaslıoğlu A A. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi Tusem Tıbbi Yayıncılık. 2004; s.: 51.
- Speroff L, Fritz MA. ‘Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility’ 7th Ed. 2005;s.: 185-215.
- Strauss III JF, Barbieri RL. ‘YEN ve JAFFE, Üreme Endokrinolojisi , Fizyoloji, Patofizyoloji ve Klinik Muayene’. Serdar G. Editör, 5. Baskı, Güneş Tıp Kitabevi. 2006; Bölüm 7 -1456.
- Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod*. 2002;8: 893-9.

- Tapanainen JS, Vaskivuo T, Aittomäki K, Huhtaniemi IT. Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction Molecular and Cellular Endocrinology. 1998;145: 129–135.
- Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. Endocr Rev. 2000;21: 551-83.
- Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick JA, Conn PM. Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. Arch Med Res. 1999;30: 420-35.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle stimulating hormone and its receptor. Hum Reprod Update. 1998;4: 260-83.
- Wright KP, Johnson JV. İnfertilite. [Infertility]. Gibbs RS, Karlan BY, Haney AF, Nygaard I. Editör, Danforth's obstetrik ve jinekoloji. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri. 2010; 705-715.
- Wunsch A, Sonntag B, Simonı M. Polymorphism of the FSH receptor and ovarian response to FSH. Ann Endocrinol (Paris). 2007;68: 160-6.
- Wunsch A, Yunı A, Banaz-Yaşar F, Sonntag B, Nieschlag E, Simonı M, Gromoll J. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human folliclestimulating hormone receptor. Fertil Steril. 2005;84: 446- 53.
- Yi CS, Song YS, Ryu KS, Sohn J, Ji I, Ji TH. Common and differential mechanisms of gonadotropin receptors. Cell Mol Life Sci. 2002;59: 932-40.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology. Hum. Reprod. 2009;24(11), 2683–2687.

EKLER

Ek 1: Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu Örneği

İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ *

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

Yardımcı Üreme Tekniklerinde *FSH*, *VEGF LH* ve *ESR* Gen Mutasyonlarının Etkisi.

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmamız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağını çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamamız önemlidir Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığımız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılmamızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR? Açıklayınız

Yardımcı Üreme Tekniklerinde ile tedavisi sırasında bazı hastalar kullandıkları ilaçlara karşı farklı tepki verebilmektedirler. Bazı hastalarda istenilen yumurta sayısına ya da istenilen kalitede yumurtaya ulaşamazken bazılarında istenilenden çok sayıda yumurta gelişimi sağlanabilmektedir, ki bu sayı gerekenden çok daha fazla olduğunda yumurtalıkların boyutu artar, aşırı uyarılmış olan bu yumurtalıklardan salgılanan yüksek hormon seviyesi nedeniyle iki hafta içerisinde bazı yan etkiler görülebilmektedir (Yumurtalıkların aşırı uyarılması sendromu: OHSS). Bu yan etkiler vücut boşluğunda sıvı birikimi ve bu sıvının iç organlara baskı yapması ile nefes almada zorlanma, midenin yukarıya doğru basıncı yapması hatta hayati önem arzeden sonuçlara yol açabilmektedir. Tüp Bebek Yardımcı Üreme Teknikleri ile tedavide *LH* (Lüteinleştirici Hormon) Reseptör ve *ESR*(Estrogen Reseptör) Genlerinde Maydana Gelen Genetik Değişimlerin etkisi ile ilacın etkisinin kişiden kişiye farklılık göstermesi ve aynı dozun farklı kalitede yumurta oluşturmadaki etkisini (farmakogenetik) incelemeyi amaçladık. Çalışmanın sonucunda *LH* ve *ESR* genlerindeki varyantlar bakımından kaliteli ve normal sayıda yumurta elde edilen bireylerle kalitesiz ve istenilenden çok az ve çok daha yüksek sayıda yumurta elde edilen bireyler karşılaştırıldığında genetik farklılık saptanırsa, tedavi öncesinde bu genlerin analizinden sonra uygulanacak dozun belirlenmesi IVF tedavisinin başarı oranını yükseltecek, hastaların zaman kaybını ve olumsuz sonuçlardan psikolojik olarak etkilenmesini önleyecek ve aşırı yumurta oluşumu sendromu gibi komplikasyonların önüne geçilmiş olacaktır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezinde Yardımcı Üreme Teknikleri ile tedavi gören ve istenilen sayı ve kalitede yumurta elde edilemeyen 50 hasta ve sağlıklı 50 kontrol, toplam 100 kişiden kan alınacaktır. Kan örneklerinden DNA izolasyonu ile DNA elde edildikten sonra ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılarak DNA Dizileme yöntemi uygulanacaktır.

Ek 1: (devam)

İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Kan örnekleri için açlık tokluk fark etmemektedir. Çalışma doktorunuzu ziyarete belirlenen günlerde gelmelisiniz ve bir sonraki ziyaretiniz de, ziyaretten ayrılmadan önce planlanmalıdır. Yine çalışmadan önce veya çalışma sırasında aldığımız başka herhangi bir tıbbi tedaviyi de çalışma doktoruna söylemeniz önemlidir.

CALISMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Araştırmada sizden 5ml kan örneği alınacaktır ve DNA Analizi için kullanılacaktır. Herhangibir yan etkisi ve riski yoktur.

GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ

CALISMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR? (Varsa açıklayınız)

==

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilirim bilincindeyim. Çalışmadan her hangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

CALISMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma doktoru ziyaretleri ve çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyici tarafından karşılanacak ve size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödettirmeyecektir. Ayrıca çalışmaya bağlı makul miktardaki yol gideriniz makbuzları gösterildiği takdirde karşılanacaktır.

Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi ("Çalışma Verileri") toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışma destekleyicisi firma ile paylaşılan çalışma verileri size özel bir numara olan bir kod ("Kod") numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin çalışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma doktorunuzun denetimindedir. Çalışma destekleyicisi firma düzenleyici otorite veya diğer denetim kurumları tarafından atanmış kişiler doktorunuz tarafından tutulan çalışma verilerinizi inceleyebilirler. Doktorunuz çalışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Çalışma destekleyicisi firma; çalışmanın yürütülmesi, teşhis ve tıbbi yardım gereçlerinin geliştirilmesi için çalışma verilerinizi kullanabilir. Doktorunuzun çalıştığı kurum ve çalışma destekleyicisi firmanın her ikisi de yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar. Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayımlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

İlaç Dışı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar için Başvuru Formu
10 Mayıs 2010 Versiyon No:01

12/5

Ek 1: (devam)

İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU

Doktorunuz ya da çalışma destekleyicisi firmadan, toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahipsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahipsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen gerekirse sizin çalışma destekleyicisi firma ile temasa geçmenize yardımcı olabilecek doktorunuzla görüşünüz. Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Çalışma destekleyici firma onayınızdan vazgeçmeden önceki çalışma verilerinizi kullanmaya devam edebilir. Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermektedirim.

ARASTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Ad, Soyadı ve telefon numaraları
Öğr.Gör.Dr.Şengül Tural 05334925282

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR: Varsa açıklayınız

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

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 ayrılabilirim ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

* **Açıklamalar hastanın anlayabileceği açıklıkta ve teknik terimlerden uzak bir şekilde belirtilmelidir.**

Ek 2: Etik Kurul



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/1041

10.04.2015

Sayın Öğr.Gör.Dr.Şengül TURAL

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Yardımcı Üreme Tekniklerinde Başarısız Olunan Olgularda LH ve ESR Gen Mutasyonlarının Etkisi** başlıklı OMÜ KAEEK 2015/185 Karar nolu Genetik çalışma nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre 26.03.2015 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra *başlanmasına* oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof. Dr. A.Tevfik SÜNER
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülhan ORHAN ÇAYCI

Doğum Yeri : Mecitözü/ÇORUM

Doğum Tarihi : 29.05.1988

Medeni Hali : Evli

Bildiği Yabancı Diller :İngilizce

Eğitim Durumu (Yıl ve Kurum) :

1994-2002 Ayvalıdere İlköğretim Okulu

2002-2006 İbrahim Turhan Anadolu Lisesi

2007-2011 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü

2014- Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :Merzifon Karamustafa Paşa Devlet Hastanesi/2014-...

E-posta :gulhan.orhan34@hotmail.com