



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OVARYEN HİPERSTİMÜLASYON SENDROMU
GELİŞİMİNDE VEGFR GENİ EXON 7
MUTASYONLARININ ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Işıl ÇAKIR

**Samsun
Temmuz-2016**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OVARYEN HİPERSTİMÜLASYON SENDROMU
GELİŞİMİNDE VEGFR GENİ EXON 7
MUTASYONLARININ ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Işıl ÇAKIR

Danışman

Öğr. Gör. Dr. Şengül TURAL

**Samsun
Temmuz-2016**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Işıl ÇAKIR tarafından Öğr. Gör. Dr. Şengül TURAL danışmanlığında hazırlanan OHSS Gelişiminde *VEGFR* Geni Exon 7 Mutasyonlarının 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. Serbülen YİĞİT, Gaziosmanpaşa Üniversitesi

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

Üye : Doç. Dr. Davut GÜVEN, Ondokuz Mayıs 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 yönlendiren, bu tezin gerçekleştirilmesinde, başlangıcından sonuna kadar karşılaştığım problemlerin çözümünde ve her konuda güler yüzü ile bana yardım ve desteğini hiç esirgemeyen 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 çalışanlara yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve laboratuvar çalışmalarım 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. Elvan YILMAZ ve Gülhan ORHAN'a çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca ve özellikle yüksek lisans çalışmalarım sırasında gösterdikleri sonsuz sabır, fedakarlık ve desteklerinden dolayı öncelikle biricik aileme ve gösterdiği yardım ve desteği için arkadaşım Alperen YILDIRIM'a teşekkür ederim.

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

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.15.028 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

OHSS GELİŞİMİNDE *VEGFR* GENİ EXON 7 MUTASYONLARININ ETKİSİ

Amaç: Yardımcı üreme teknikleri ile tedavi sırasında fazla yumurta oluşan ve OHSS (Ovaryen Hiperstimulasyon Sendromu) gelişen olgularda *VEGF* (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) reseptörü geninde meydana gelen genetik değişimleri inceleyerek uygulanan ilacın etkisinin kişiden kişiye farklılık göstermesine ve aynı dozun farklı kalitede yumurta oluşturmaya etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezinde yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören ve istenilenden fazla sayıda yumurta elde edilen 27 hasta ve sağlıklı gebelik elde edilen 30 kadın kontrol, toplam 57 kişiden kan alındı. Kan örneklerinden kit yöntemi ile DNA elde edildikten sonra PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve sonrasında DNA dizileme yöntemleri uygulanarak *VEGFR* Geni ekzon 7 bölgesi incelendi. Elde edilen sonuçlar SPSS ve Ki-kare analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: *VEGFR* geni ekzon 7 rs2305948 bölgesi açısından hasta ve kontrol grubunda genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak fark saptanmazken klinik verileri değerlendirildiğinde, CT genotipine sahip olan bireylerle yüksek sayıda yumurta oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark saptandı ($p=0,006$, $\chi^2=7,560$).

Sonuç: Çalışmamızın sonucuna göre, yardımcı üreme tedavisi sürecinde *VEGFR* geni rs2305948 bölgesi bakımında CT genotipine sahip bireylerde çok daha yüksek sayıda yumurta oluştuğu ve OHSS gelişmesi açısından daha riskli grupta olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Gen polimorfizmi; OHSS; ovaryen cevap; *VEGFR*

Işıl ÇAKIR, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Temmuz - 2016

ABSTRACT

EFFECTS OF *VEGF* GENE EXON 7 MUTATIONS ON DEVELOPMENT OF OHSS

Aim: We aimed to evaluate the pharmacogenetic effect of *VEGFR* gene mutations on the cases of have high number of ovum and develop OHSS during assisted reproductive technics.

Material and Method: We evaluated 57 cases in this study. Twenty seven of them have high number of ovum during assisted reproductive technology in Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, IVF Center and 30 cases have healthy pregnancy. DNA isolated from all the cases. Polimerase Chain Reaction and following DNA sequencing methods performed for *VEGFR* gene exon 7 analysis. SPSS and Chi-square analysis performed for statistical analysis.

Results: As a result of the study, there was no statistically significance between patients and control groups. However, when we analyse for clinical findings we found that frequency of CT genotype for *VEGFR* gene exon 7 variant was higher in the group of women have the high number ovum ($p=0.006$, $\chi^2=7.560$).

Conclusion: During assisted reproductive technics, the patients have CT genotype of *VEGFR* gene exon 7 may have high number of ovum ad under risk for OHSS.

Keywords: Gene polimorphism; OHSS; ovarian response; VEGFR

Işıl ÇAKIR, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, June - 2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
A	: Adenin
A	: Alanin
AMH	: Antimüllerin Hormonu
AMHR	: Antimüllerin Hormonu Reseptör
ATM	: Amplicon Tagment Mix
Bç	: Baz Çifti
BMP15	: Kemik Morfolojik Protein 15
C	: Sitozin
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
COH	: Kontrollü Ovaryen Hiperstimilasyon
COS	: Kontrollü Ovaryen Stimulasyonu
dk	: Dakika
E2	: Estradiol
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ESR	: Östrojen Reseptörü
EtBr	: Etidyum Bromür
F	: Forward
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
Flt-1	: Fms Benzeri Tirozin Kinaz-1
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
FSHR	: Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü
G	: Guanin

GDF-9	: Büyüme Farklılaşma Faktörü 9
GnRH	: Gonadotropin Relasing Hormon
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
HIF	: Hipoksi ile İndüklenebilen Faktör
I	: İzolösin
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IUI	: İntrauterin İnseminasyon
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
kb	: Kilobaz
kDA	: KiloDalton
KDR	: Kinase İnsert Domain Receptör
LH	: Luteinleştirici Hormon
LHCGR	: Luteinleştirici Hormon/ Koriogonadotropin Reseptörü
LOD	: Laporoskopik Ovaryen Drilling
LPA	: Lipoprotein A
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTHFR	: Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
N	: Asparajin
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NPM	: Nextera PCR Master Mix
NRP	: Nörofilin

NT	: Neutralize Tagment Buffer
°C	: Santrigrat
OHSS	: Ovaryen Hiperstimülasyon Sendromu
P	: Prolin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Trombosit Türevli Büyüme Faktörü
PGR	: Progesteron Reseptörü
PKOS	: Polikistik Over Sendromu
R	: Arjinin
R	: Reverse
S	: Serin
SHBG	: Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizm
SOD2	: Süperoksit Dismutaz 2
T	: Timin
T	: Treonin
TBE	: Tris Borat EDTA
TGF -β	: Transforming Growth Factor -β
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Valin
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
W	: Triptofan

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ovaryen Hiperstimulasyon Sendromu (OHSS).....	2
2.1.1. Risk Faktörleri.....	3
2.1.2. OHSS'nin Önlenmesi	3
2.1.3. OHSS Sınıflandırma	4
2.2. Genetik Varyasyonlar.....	4
2.2.1. Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü (FSHR)	7
2.2.2. Luteinleştirici Hormon β Alt birimi	9
2.2.3. LH Reseptörü	9
2.2.4. Östrojen Reseptörleri	10
2.2.5. Anti Müllerin Hormon & Reseptör	10
2.2.6. Seks Hormon Bağlayıcı Globulin (SHBG).....	11
2.2.7. CYP19.....	11
2.2.8. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR).....	11
2.2.9. Kemik Morfolojik Protein 15 (BMP15)	12
2.2.10. Büyüme Farklılaşma Faktörü (GDF9).....	12
2.2.11. Süperoksit Dismutaz 2 (SOD2).....	13
2.2.12. p53	13
2.3. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	14
2.3.1. VEGF Ailesi ve Üyeleri.....	14
2.3.2. VEGF Reseptörleri (VEGFR)	16
2.3.3. <i>VEGF</i> Geninin Regülasyonu	19
2.4. Farmakogenetik	20
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler	23

3.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması.....	23
3.4. DNA İzolasyon Yöntemi.....	24
3.4.1. Hazırlık	24
3.4.2. Protokol.....	24
3.5. DNA Miktar Tayini.....	25
3.6. <i>VEGF</i> Geni Exon 7 Bölgesi PCR Amplifikasyonu	25
3.6.1. Primer Dizileri.....	25
3.7. Agaroz Jelin Hazırlanışı	25
3.8. Yeni Nesil DNA Dizi Analizi (Nextera XT DNA Kütüphanesi Hazırlama)	26
3.8.1. Taqment Genomik DNA.....	26
3.8.2. Kütüphaneyi Çoğaltma	26
3.8.3. Kütüphane Yıkaması	27
3.8.4. Kütüphanelerin Kontrolü	28
3.8.5. Kütüphanenin Normalizasyonu	29
3.8.6. Kütüphane Havuzu	30
3.9. Biyoinformatik Analiz.....	30
3.10. İstatistiksel Değerlendirme	31
4. BULGULAR	32
4.1. Hasta ve Kontrol Grubu Demografik Özellikleri	34
4.2. <i>VEGFR</i> Geni Yeni Nesil DNA Dizi Analizi Sonuçları	35
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	43
EKLER	54
ÖZGEÇMİŞ	58

1. GİRİŞ

Ovulasyonun gonadotropinlerle uyarılması infertilite tedavisinde başarılı olmakla birlikte, aşılama (IUI: İntrauterin inseminasyon) ve tüp bebek (IVF: İn 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 gerektirmekte iken bazı olgularda ise eksojen gonadotropin uygulaması komplikasyonlara yol açabilmekte ve hayatı tehdit edebilen iatrojenik bir komplikasyon olan OHSS (Ovaryen Hiperstimulasyon Sendromu: Yumurtalıkların aşırı uyarılması Sendromu)'na neden olabilmektedir.

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 üzerinde 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 (Lledo ve ark., 2014).

VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) anjiogenezde önemli role sahiptir. Anjiogenez, embriyonik gelişimde ve yara iyileşmesinde olduğu kadar ayrıca kadın üreme sisteminde ve kemiğin oluşumunda, şekillenmesinde ve büyümesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle, VEGF ile ilişkili olarak vasküler geçirgenliğin artması yumurtalıkların aşırı uyarılması sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Hanevik ve ark., 2012; O'Brien ve ark., 2014; Nouri ve ark., 2014).

Biz bu nedenle çalışmamızda, yardımcı üreme tekniklerinde kaliteli yumurta elde edilemeyen olgularda VEGFR (VEGF Reseptörü) genetik varyantlarının yumurta oluşumu-ovulasyona etkisini incelemeyi amaçladık. İlgili hormon ya da hücre içi haberci molekülün yeterince var olması durumunda bile reseptörün yapısında oluşmuş olan genetik bir defekt nedeniyle reseptörle etkileşime geçememesi, gereken cevabın oluşmamasına ya da gerekenden fazla cevap oluşumuna neden olabilmektedir. Dolayısıyla ilacın etkisi kişiden kişiye farklılık göstermekte, aynı doz ilaç farklı kalitede yumurta oluşturmaya neden olabilmektedir. Bu çalışmada da *VEGFR* genlerindeki değişimlerin ovulasyona etkisini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİ

İnfertilite, en az 12 ay herhangi bir korunma yöntemi uygulamaksızın başarısız gebelik durumudur (Zegers-Hochschild ve ark., 2009). Dünya çapında 80 milyondan fazla çift ve doğal yolla çocuk sahibi olmada zorluk çeken çiftlerin %10 u kısırdır ve yardımcı üreme tekniği kullanılarak tedavi edilebilir (Rosenbluth ve van Voorhis, 2011). İn vitro fertilizasyon (IVF) en çok kullanılan ve başarılı bir yardımcı üreme tekniğidir. IVF kompleks ve çok aşamalı bir süreçtir. Gonadotropinlerle kontrollü ovaryen stimülasyonu (COS) sonrası oositler toplanır. Döllenme ve embriyo bölünmesinden sonra embriyolar implantasyon için rahime aktarılır veya gelecek implantasyon girişimleri için dondurularak saklanabilir. IVF başarısı için bütün bu aşamalar kritiktir.

COS'nin amacı, güvenli bir şekilde transfer için en uygun kalitede ve sayıda embriyo seçmemizi sağlamaktır (Boudjenah ve ark., 2012). Yaklaşık olarak 8-10 oosit alınmış COS protokollerinde başarılı bir sonuç için optimal ön koşul olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda, başarı oranlarını maksimize etmek için yumurta sayısı yaklaşık 15 olarak yayımlanmıştır (Sunkara ve ark., 2011). Ancak yumurtalık cevabı yumurtalık uyarımı yapılan kadınlar arasında yaygın olarak değişmektedir. IVF uygulanan yaklaşık %9-24 oranında kadın ovaryen stimülasyondan beklenenden daha kötü cevap verir. Diğer taraftan yüksek cevaplar ovaryen hiperstimülasyon sendromuna (OHSS) yol açar (Oehninger, 2011).

2.1. Ovaryen Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS)

Ovulasyonun gonadotropinler ile uyarılması infertilite tedavisinde görülen en önemli gelişmelerden biridir. Gonadotropin uygulaması başarılı olmakla birlikte ciddi komplikasyonlara yol açabilmektedir. Ovaryen hiperstimülasyon sendromu, özellikle aşılama ve tüp bebek tedavilerinde, yumurta geliştirme ve çatlatma için uygulanan gonadotropin ilaçlarının kullanımı ile vücudun ilaca aşırı tepki vermesidir.

Ovaryen hiperstimülasyon sendromu eksojen gonadotropin uygulaması sonucu oluşabilen ve hayatı tehdit edebilen iatrojenik bir komplikasyondur. OHSS aşırı insan koryonik gonadotropin artışı ile beraber olan durumlarda da (çoğul gebelikler, molar gebelik) ve klomifen sitrat ile indüklenmiş sıkluslarda da gözlenebilir (Speroff ve Fritz, 2007).

2.1.1. Risk Faktörleri

Çeşitli faktörlerin birbirinden bağımsız olarak OHSS gelişme riskini arttırdığı gösterilmiştir. Bunlar:

- Yaş < 30
- Yüksek serum östrojen seviyesi (>2000 pg/ml) (Navot ve ark., 1988)
- Daha önce OHSS olma durumu
- IVF sonrası luteal fazı desteklemek için progesterona karşıt olarak hCG (insan koryonik gonadotropin) verilmesi (Navot ve ark., 1992)
- Polikistik overler (ultrason muayenesinde 24'den fazla antral folikül) (Brinsden ve ark., 1995)
- Over stimülasyonu sırasında ultrasonda çok sayıda küçük folikül (8 – 12 mm) varlığı (Enskog ve ark., 1999)
- Fazla sayıda oosit toplanması (>20) (Asch ve ark., 1991)
- Yüksek anti-müllerian hormon (>3.36 ng/mL) (Lee ve ark., 2008)

2.1.2. OHSS'nin Önlenmesi

Yapılan çalışmalar sonucuna göre OHSS'nin önlenmesinde 'ON KURAL'dan bahsedilmektedir (Rizk, 1993):

1. hCG vermeme (en genel metod)
2. hCG'yi geciktirme
3. Ovulasyonu tetiklemek için GnRH-A kullanımı
4. Foliküler aspirasyon
5. Luteal faz desteği için progesteron
6. Embriyo dondurma ve daha sonraki sikluslarda dondurulup çözülmüş embriyoların tekrar yerleştirilmesi
7. PCOS'ta (Polikistik over sendromu) step-up protokolü ve LOD (laporoskopik ovaryen delme)
8. Oositlerin atılımı sırasında albumin verilmesi
9. IVF programında hCG verilmesinden 35 saat sonra overyan foliküllerin en iyilerinin alınması
10. Glukokortikoid verilmesi

2.1.3. OHSS Sınıflandırması

Literatürde birçok OHSS sınıflandırması bulunmaktadır. OHSS'nin her seviyesi farklı klinik belirti gösterir (Tablo 1).

Tablo 1. OHSS sınıflandırması (Mathur ve ark., 2007)

SEVİYE	BELİRTİLER
Hafif OHSS	Abdominal şişkinlik Hafif abdominal ağrı Over genişliği genellikle 8 cm'den az
Orta OHSS	Orta abdominal ağrı Mide bulantısı, kusma Ultrasonda asit belirtisi Over genişliği genellikle 8 – 12 cm
Şiddetli OHSS	Klinik bulgularda asit varlığı (bazen hidrotoraks) Oliguri Hemokonsantrasyon (Hematokrit>%45) Hipoproteinemi Over genişliği 12 cm'den fazla
Kritik OHSS	Geniş asit veya geniş hidrotoraks Hematokrit > %55 WBC > 25000/mL Oliguri / Anuria Tromboembolizm Akut respiratuar distres sendromu(ARDS)

2.2. Genetik Varyasyonlar

Kontrollü ovaryen hiperstimilasyon (COH) ile ilgili farklı gen bölgelerinde çalışılan birçok genetik varyasyon bulunmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Kontrollü ovaryen hiperstimilasyon ile ilgili çalışılan genetik varyasyonlar

Gen	Kromozom Bölgesi	Genetik Varyasyon		Temel Bulgu	Referans
		rs numarası	Protein yada Kodlayan Dizi Varyasyonu		
<i>FSHR</i>	2p21	rs6166	N680S	S680 alleli olan hastalarda stimülasyon fazı süresince daha fazla FSH gereklidir.	Desai ve ark., 2013
		rs1394205	-29 G/A	-29 pozisyonunda AA genotipi olan kadınlar daha fazla FSH'a ihtiyaç duyarlar. Düşük E2 düzeylerine sahip olup daha az folikül üretir ve alınan oositin düşük sayıda olduğu görülür.	Desai ve ark., 2011
<i>LHB</i>	11p13	rs1800447	W8R	W8R (rs1800447) ve I15T (rs3439826) varyantlarını taşıyan kadınlar daha az oosit alındığı zaman, daha yüksek FSH tüketimine ihtiyaç duyarlar.	Haavisto ve ark., 1995
		rs3439826	I15T		Alviggi ve ark., 2009
<i>LHCGR</i>	2p21	rs4073366	+28G>C	C varyant taşıyıcı durumu, OHSS gelişiminin üç kat artış riski ile ilişkilidir.	Bentov ve ark., 2012 Haasl ve ark., 2008 O'Brien ve ark., 2013
<i>ESR1</i>	6q25	rs2234693	-397T>C	CC genotipi taşıyan hastalarda olgun oositler, döllenme oranı, kaliteli embriyolar ve foliküller daha yüksek sayıdadır.	Altmäe ve ark., 2007
		rs9340799	-351A>G	GG genotipi taşıyan hastalarda fertilizasyon oranı yüksek ve olgun oositler yüksek sayıdadır.	Ayvaz ve ark., 2009
		rs3138774	(TA) _n	Daha uzun TA tekrarları daha iyi COH sonucu ile ilişkilidir.	

Tablo 2 (devam). Kontrollü ovaryen hiperstimulasyon ile ilgili çalışılan genetik varyasyonlar

Gen	Kromozom Bölgesi	Genetik Varyasyon		Temel Bulgu	Referans
		rs numarası	Protein yada Kodlayan Dizi Varyasyonu		
<i>AMH</i>	19p13	rs10407022	I49S	AMH Ser ve AMHR2 -482G allel taşıyan kadınlarda FSH'nin foliküler duyarlılığı artmıştır.	Hanevik ve ark., 2010
<i>AMHR2</i>	12q13	rs2002555	-482A>G		Yoshida ve ark., 2014
<i>SHBG</i>	17q13	rs6761	(TAAAA)n	Uzun SHBG (TAAAA)n taşıyan kadınlarda folikül ve oosit sayısında bir artış gözlenmiştir.	Hatzi ve ark., 2011 Lazaros ve ark., 2012
<i>CYP19A1</i>	15q21	rs60271534	(TTTA)n	Kısa CYP19A1 alel taşıyıcıları COH süresince gonadotropin yönetimine daha fazla ihtiyaç duyarlar.	Lazaros ve ark., 2013
<i>MTHFR</i>	1p36	rs1801133	677C>T	Heterozigotların homozigotlara kıyasla daha uygun sonuçlara sahip oldukları görünür.	Laanpere ve ark., 2011 Machac ve ark., 2006 Thaler ve ark., 2006
<i>BMP15</i>	Xp11	rs58995369 rs3810682 rs3897937 rs6165	- 673C>T -9C/G IVSI+905 N103S	Haplotip TGGA, OHSS olan hastalarda daha yüksektir	Morón ve ark., 2006 Hanevik ve ark., 2011 Wang ve ark., 2010
<i>GDF-9</i>	5q31	rs10491279	546G>A	A alleli zayıf COH ve IVF sonuçlarıyla ilişkilidir.	Wang ve ark., 2010

Tablo 2 (devam). Kontrollü ovaryen hiperstimulasyon ile ilgili çalışılan genetik varyasyonlar

Gen	Kromozom Bölgesi	Genetik Varyasyon		Temel Bulgu	Referans
		rs numarası	Protein yada Kodlayan Dizi Varyasyonu		
<i>SOD2</i>	6q25	rs4880	A16V	AA genotipi, COH sonrası toplam oosit sayısı ile daha fazla ilişkilidir.	Ruiz-Sanz ve ark., 2011
<i>p53</i>	17p13	rs1042522	P72R	A72 için homozigot olan kadınların PP homozigot ve heterozigot olan kadınlardan daha fazla sayıda oositi vardır.	Boudjenah ve ark., 2012

2.2.1. Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü (FSHR)

İnsan üremesinde FSH anahtar bir hormondur. FSH ve FSH reseptörü (FSHR), yumurtalıkta steroidogenez düzenlenmesi ve foliküler gelişmede büyük rol oynar (Dupakuntla ve Mahale, 2010).

FSHR geni kromozom 2p21 üzerinde lokalizedir ve 54 kb'lık bölge kapsar (Gromoll ve ark., 1994). On ekzondan oluşur (Simoni ve ark., 1997). Yaklaşık 1000 SNP *FSHR* geninde bulunur fakat yalnız sekizi ekzondadır. Bunların 6'sı nonsemptomatik ve diğer iki 307 (rs6165) ve 680 (rs6166) kodonlar ekson 10'da lokalizedir ve ovaryen yanıt ile ilgilidir. Kodon 307 hücre dışı bölgede ve kodon 680 hücre içi bölgede bulunur. Her iki SNP, proteinin özelliklerini değiştirir ve FSH yanıtını modifiye ederek gen fonksiyonunu etkileyebilmektedir (Simoni ve ark., 2008). Treonin (T) 307. pozisyondaki alaninin (A) yerine geçebilir ve serin (S) 680. pozisyondaki asparjinin (N) yerine geçebilir. Bu polimorfizm T307-N680 ve A307-S680 en sık allelik kombinasyonları ile sonuçlanan linkaj dengesizliği içindedir. Çalışmaların çoğu neredeyse sadece kodon 680 polimorfizmleri üzerine odaklanmıştır. Bu polimorfizmler FSH uyarısına reseptör yanıtı değerlendirmek için çalışılmaktadır. Benzer pikli estradiol seviyelerini elde etmek için COS için gerekli FSH'nın miktarı, gonadotropinlerin kötü yanıtı ve S680 aleli için FSH'nın düşük duyarlılık gösteren, pozisyon 680'de N/N genotipli kadınlarda daha düşüktür (Perez Mayorga ve ark., 2000). S680 aleli olan hastalar, foliküler fazda daha fazla FSH'a ihtiyaç duyar (De Castro ve ark., 2004; Jun ve

ark., 2006; Sudo ve ark., 2006; Sheikhha ve ark., 2011). S/S grubundan alınan oosit başına estradiol seviyesi hCG uygulandığı zamanda N/S ve N/N gruplarının düzeyleri ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşüktür.

Uyarım ve embriyo implantasyonu potansiyel oosit yardımını değerlendirmek için en iyi modeldir. Donörler, normal yumurtalık fonksiyonu benzer olan genç yaştaki kadınlardır. İlginçtir ki verimli yumurta donörleri üzerinde yapılan bir çalışma, S/S grubunda gonadotropin dozu daha yüksek ve COS'da oositlerin diğer genotip gruplarından daha düşük olduğunu gösteren önceki çalışmalarla aynı sonucu vermiştir (Lledo ve ark., 2013).

Yao ve arkadaşlarının meta analizlerinde belirtildiği gibi, S/S grubunda daha yüksek gonadotropin tüketimi, S/S genotipli hastaların bazal FSH düzeylerinin artması ve daha yüksek FSH dozu istemesi gerçeğiyle açıklanabilir (Yao ve ark., 2011). Bazı araştırmalar, farklı toplumlarda bu bulguyu onaylamışlardır (Sudo ve ark., 2002; de Castro ve ark., 2003; Jun ve ark., 2006; Loutradis ve ark., 2006; Livshyts ve ark., 2009). Bu bulgular S/S varyantı olan kadınların diğer varyantları taşıyan kadınlara göre FSH etkisine daha dirençli olduklarını ifade etmektedir (Sudo ve ark., 2006; Sheikhha ve ark., 2011). Ancak Yao, genotip ve oosit sayısı arasında ilişki bulamamıştır. IVF tedavisinde bir eğilim söz konusudur: kötü yanıt verenlerin FSH dozu yeterli sayıda yumurtaya ulaşmak için artırılır ve iyi yanıt verenlerin dozu hiperstimülasyonu önlemek için indirilir.

Bugüne kadar yapılan gen değişkenleri ve COS sonucunu inceleyen tek klinik çalışma, S/S taşıyıcılarının daha düşük FSH duyarlılığı, COS protokolleri süresince daha yüksek FSH dozlarının üstesinden gelebildiğini gösteren N680S polimorfizm etkisinin önceki bulgularını doğrulamıştır (Behre ve ark., 2005). *FSHR* polimorfizmi OHSS ile ilişkilendirilmiştir. OHSS hastaları arasında N/N aleli, semptomların şiddetinin bir risk faktörü belirleyicisidir (Daelemans ve ark., 2004). Bununla birlikte araştırmalar bu bulguları çoğaltmamıştır (d'Alva ve ark., 2005; Kerkelä ve ark., 2007). Kısmen aynı olmayan sonuçlar kadınların yaşına göre açıklanabilir. Bu daha genç kadınlar için önerilmiştir. S taşıyıcıları her doğal devre süresince çok sayıda folikül çalıştıran, folikül yakıcı bir fenotipe sahiptir. Bu yüzden daha yüksek OHSS riski altındadır. Bu sırada aynı bireylerde yumurtalık stok tükenmesi, sonraki yaşamında yaşa bağlı zayıf fenotipik cevap meydana getirebilir (de Castro ve ark., 2005). İleri

araştırmalar, OHSS'de *FSHR* polimorfizminin rolünü açıklığa kavuşturmak için gereklidir.

FSHR ifadesinin seviyesi *FSH*'ın etkisi üzerinde etkiye sahiptir. *FSHR* geninin -29(rs1394205) bölgesindeki G/A polimorfizmi gonadotropin over cevabını modüle edebilir. Daha yüksek dozda *FSH* gereksinimi olan -29 pozisyonunda AA genotipine sahip kadınlarda, düşük estradiol düzeylerine sahip, daha az folikül üretilmekte ve alınan oositlerin düşük sayıda olduğu gösterilmiştir (Desai ve ark., 2013). Bu etki granuloza hücreleri üzerinde *FSHR*'nın ifadesinin azaltılmasına neden olabilir (Desai ve ark., 2011). Ancak, bu bulguyu doğrulamak için daha büyük çalışmalar gerekmektedir. *FSHR* genotipi, COS döngü sonucunu belirleyen önemli bir faktördür. *FSHR* N680S genotiplemesi, bazı ek markerlerle birlikte infertilite tedavisi başlamadan önce zayıf yanıt tanımlaması sağlayabilir (Simoni ve ark., 2008).

2.2.2. Luteinleştirici Hormon β Alt birimi

FSH ve luteinleştirici hormon (LH) reseptörü, bağlanma domaini içerir ve β alt birimi hormon özğü iken ortak α alt ünite paylaşırlar. LH, öncü folikülün foliküler gelişimi, luteinizasyon ve ovulasyonun teşvik edilmesinde *FSH* ile birlikte hareket eder (Hillier ve ark., 1994). LH β alt birimi *LHB* geni tarafından kodlanır, kromozom 11p13 üzerinde lokalizedir ve üç ekzona sahiptir. Gendeki polimorfizm tespit edilmiştir ve üç kodlayan dizi LH aktivitesinin azalmasında etkili bulunmuştur (Haavisto ve ark., 1995). W8R (rs1800447) ve I15T (rs3439826) varyantları taşıyan kadınlardan daha az oosit alınırken daha yüksek *FSH* dozu gerektirir (Alviggı ve ark., 2009). Bu varyantı taşıyan kadınlar COS sırasında harici LH takviyesinden yararlanabilecektir.

2.2.3. LH Reseptörü

LH reseptörü, hücre yüzeyinde yer alır ve ligand ile bağlanması, ovulasyon ve foliküllerin olgunlaşması için olanak tanır. LHR, 11 eksondan oluşup kromozom 2p21 yer alan *LHCGR* geni tarafından kodlanır. *LHCGR* en az 300 polimorfizm barındırır, cinsel gelişim ve fertilité üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Bentov ve ark., 2012). Yeni bir polimorfizmin *LHCGR* mRNA işlenmesinde potansiyel olarak etkileyebileceği (rs4073366 +28G>C) tespit edilmiştir (Haasl ve ark., 2008). C varyant taşıyıcı durumu OHSS gelişmesinde üç kat risk artışı ile ilişkilendirilmiştir (O'Brien ve ark., 2013). Bu bulgu, diğer COS populasyonları için ileri incelemeler gerektirir.

2.2.4. Östrojen Reseptörleri

COS'da, endojenik olarak üretilen östrojenler folikülogenez uyarılmasında FSH'nin etkisini uzatır. Ek olarak folikülogenezde östrojenler endometriyal hazırlanmada önemli rol oynar. Östrojen sinyali östrojen reseptör aracılıdır. Östrojen reseptörleri *ESR1*(6q25) ve *ESR2*(14q22) tarafından kodlanmıştır

IVF'de uygun ilk farmakogenetik yaklaşım, *ESR1* gen polimorfizmlerine odaklanmıştır (Georgiou ve ark., 1997). *ESR1* içinde en yaygın çalışılan polimorfizmler intron 1'in -351 (rs9340799) pozisyonundaki A>G, -397 (rs2234693) pozisyonundaki T>C ve promotor bölgesindeki (TA)_n tekrar polimorfizmleridir (rs3138774).

İntron 1'de SNP rs2234693 bölgesinde, CC genotipi taşıyan hastalarda foliküller, olgun oositler ve kaliteli embriyolar yüksek sayıda vardır (Altmäe ve ark., 2007; Ayvaz ve ark., 2009). İntron 1 de SNP rs9340799 bölgesinde GG genotipi taşıyan hastalarda fertilizasyon oranı ve olgun oosit yüksek sayıdadır. Uzun TA tekrarları daha iyi COS ile ilişkilidir.

ESR2 üzerinde +1730 (rs49866938) pozisyonundaki G>A polimorfizm çalışması herhangi bir etki göstermemiştir (Altmäe ve ark., 2007). Ancak önceki çalışmalarda (De Castro ve ark., 2004; Boudjenah ve ark., 2012; Anagnostou ve ark., 2012) *ESR2* ve farklı genleri içeren bir multigenik model, kontrollü over stimülasyonu sonucu ile ilgili olan hipotezi destekler.

2.2.5. Anti Müllerin Hormon & Reseptör

Anti müllerin hormonu (AMH) serum konsantrasyonu over rezervi ve uyarıya ovaryen cevabın bir göstergesi olarak gittikçe artan düzeyde kullanılmaktadır (Nelson ve ark., 2009). AMH, AMHR2 yoluyla etkisini ortaya koyar. *AMH*, *AMHR2* kodlayan genleri sırasıyla kromozom 19p13 ve 12p13 üzerinde yer almaktadır.

Normogonadotropik kadınlar üzerinde yapılan çalışmada *AMH* geninde I49S (rs10407022) SNP ve *AMHR2* geninde -482A>G (rs2002555) polimorfizmi menstural döngüsü sırasında estradiol konsantrasyonlarındaki artış ile ilişkili bulunmuştur. Bu, FSH'nin artmış foliküler duyarlılığının bir ölçüsünü temsil edebilir. Yumurtalık uyarılmasında herhangi bir SNP ile yüksek yada düşük cevap arasındaki ilişkide bazı uyumsuzluklar vardır (Hanevik ve ark., 2010; Yoshida ve ark., 2014). Daha geniş araştırmalar bu sonuçlara açıklık getirmek için gereklidir.

2.2.6. Seks Hormon Bağlayıcı Globulin (SHBG)

SHBG hedef dokulara seks steroid hormonlarının başlıca plazma taşıma glikoproteinini oluşturmaktadır. Gen kodlayan *SHBG* kromozom 17p13 üzerinde lokalizedir. Gen promotörünün 5-sınırında kendi transkripsiyonel aktivitesini etkilediği gösterilmiş. Bir pentanükleotid (TAAAA)n tekrar polimorfizmi (rs6761) tanımlanmıştır (Hogeveen ve ark., 2001). Önceki çalışmalar SHBG ve ovaryen yanıtına TAAAA tekrarlarının uzunluğu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (Hatzi ve ark., 2011; Lazaros ve ark., 2012). Kesim aleli olarak sekiz tekrarlar kullanılarak, kısa SHBG (TAAAA)n alel homozigotu ile karşılaştırıldığında uzun SHBG (TAAAA)n alel homotigotlarını taşıyan kadınlarda, folikül ve oosit sayısında artış gözlenmiştir. Büyük populasyon çalışmaları bu bulguyu doğrulamaktadır.

2.2.7. CYP19

İntrafoliküler steroidler ve onların metabolizmaları foliküler büyüme için önemlidir. İntrafoliküler östrojen üretimi, substrat olarak aromataz katalitik etkisi altında teka hücrelerinde sentezlenen androjenler kullanılarak foliküler granüloza hücrelerinde gerçekleşmektedir. *CYP19A1* olan aromataz, kromozom 15q21 bölgesinde bulunur. İntron 4'deki bir tetranükleotit(TTTA) tekrarları polimorfizmi (rs60271534) steroid hormon düzenlemesi ile ilgilidir (Xita ve ark., 2010). Daha kısa TTTA tekrarları taşıyan kadınlar daha düşük östrojen konsantrasyonları ve azaltılmış aromataz aktivitesi gösterirler. Kısa *CYP19A1* alel taşıyıcıları uzun *CYP19A1* alel taşıyıcılarında gözlenenlerde olduğu kadar yüksek folikül sayıları elde etmek için COS esnasında daha yüksek gonadotropin verilmesini gerektirir (Lazaros ve ark., 2012; Lazaros ve ark., 2013). Daha geniş çalışmalar COS sonucu üzerinde aromataz gen varyantları etkisini netleştirmek için gereklidir.

2.2.8. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR)

MTHFR(1p36.3) metionin homosistein remetilasyonu kullanılan folatın birincil dolaşım formuna, 5-metiltetrahidrofolatı 5,10-metilentetrahidrofolata dönüşümünü katalizleyerek folat ve homosistein metabolizmasında merkezi bir rol oynar. Folat olgunlaşmamış folikülleri etkileyen erken folikül gelişimi sırasında meydana gelir ve hızlı hücre büyümesi dönemlerinde önemlidir (Twigt ve ark., 2011).

677C>T *MTHFR* polimorfizmi (rs1801133) aktivitesi azaltılmış olan kararsız bir enzime yol açar. Heterozigot bireyler, homozigotlar ile karşılaştırıldığında daha olumlu sonuca sahip görünmektedir. Ancak, *MTHFR* üzerindeki C677T polimorfizmi ile COS sonuçları arasındaki ilişkide bazı uyumsuzluklar vardır (Machac ve ark., 2006; Thaler ve ark., 2006; Laanpere ve ark., 2011). Hamile kalmaya çalışan kadınların büyük çoğunluğu, çelişkili sonuçlar için bir çözüm olan folat takviyesi almayı denemektedir. Follikülogenezde folatın katılımı göz önüne alındığında, *MTHFR* polimorfizimleri COS tepkisinde daha fazla incelenmelidir.

2.2.9. Kemik Morfolojik Protein 15 (BMP15)

BMP15, gelişimin yönünü kontrol eden proteinlerin TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. BMP15 kodlayan gen Xp11.2 üzerinde yer almaktadır. Hayvan modellerine göre, azaltılmış BMP15 düzeyleri, granüloza hücrelerinde daha yüksek FSHR düzeyi, yüksek östrojen düzeyi, artırılmış folikül üretimi ve OHSS ile ilişkili olası bir yan etkinin görülmesi ile sonuçlanabilir (Guéripel ve ark., 2006).

BMP15 genindeki bir SNP daha az biyoaktif protein oluşturur ya da teorik olarak FSH folikülerinin duyarlılığı artırarak salgılanmasını inhibe etmektedir. Aktive edici bir SNP ters etki yapabilir. FSH ve OHSS'de over yanıtı tahmin edebilen dört SNP (-673C>T, rs58995369; -9C/G, rs3810682; IVSI +905, rs3897937; N103S, rs6165) *BMP15* geninde tespit edilmiştir (Morón ve ark., 2006). Ek olarak, başka bir çalışmada, -9G alleli ve gonadotropin uyarımında yüksek yanıt arasında bir ilişki rapor edilmiştir (Hanevik ve ark., 2011). Bu sonuçlar, insanlarda östrojen ve folikül üretimini etkinleştirmek için yeni bir yolun varlığını desteklemektedir. Bu sonuç bağımsız araştırma grupları tarafından onaylanmıştır.

2.2.10. Büyüme Farklaşma Faktörü (GDF9)

GDF9 TGF- β süperaillesine aittir ve tercihen insan oositlerinde ifade edilir. GDF9 foliküler apoptozu inhibe eder, granüloza hücre çoğalması ve kümülüs hücre genişlemesini uyarır ve oosit ve embriyo gelişimini artırır. *GDF9* geni kromozom 5q31.1 bölgesinde bulunmaktadır. *GDF9* geni 546G>A polimorfizminde (rs10491279) A aleli, azalmış ovaryen rezervi olan kadınlarda zayıf COS ve IVF sonuçları ile ilişkilidir (Wang ve ark., 2010). TGF- β üst familyasının genlerindeki polimorfizmler, follikülogenezdeki TGF- β üst familyası üyelerinin önemli rolleri sayesinde, adaylara

COS sonuçlarında umut vermektedir. FSH'ın farklı yanıtında *GDF9* polimorfizminin ilişkisi daha da araştırılmalıdır.

2.2.11. Süperoksit Dismutaz 2 (SOD2)

SOD2 serbest süperoksit radikallerinin detoksifikasyonunu katalizleyen, redoks hasarına karşı korunmada rol oynayan bir mitokondriyal enzimdir. COS oksidan-antioksidan bir dengesizlik oluşturur (Aurrekoetxea ve ark., 2010). *SOD2*'nin COS'un farklı tepkilerinde rolü vardır. *SOD2* geni 6q25'de lokalizedir. A16V (rs4880) polimorfizmi tespit edilmiştir. Pozisyon 16'daki bir valin etkinliğini azaltarak protein yapısında yapısal bir değişiklik üretir. İlginç olarak rs4880 polimorfizminde AA genotipi COS uygulamasında yüksek sayıda oosit elde edilmesi ile ilişkilidir. (Ruiz-Sanz ve ark., 2011). Ancak bu bulguyu doğrulamak için büyük populasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.12. p53

p53 tümör supresör proteini somatik hücrelerin genomik stabilitesini korumada kritik rol oynar. p53 tümör supresör geni kromozom 17p13 üzerinde lokalizedir ve 11 exondan oluşur. *p53* genindeki codon 72'nin ikinci pozisyonda bulunan bir SNP, G allelden elde edilen atasal bir C allelden oluşur. Kodon 72'de C allelin varlığı prolin ile sonuçlanırken, G allelin varlığı arjinin ile sonuçlanır. p53'ün kodon 72 polimorfik formunda önemli farklılıklar p53'ün (rs1042522) biyolojik aktivitesini etkileyebilir.

p53 proteininin R72 varyantı P72 formundan daha belirgin şekilde etkindir. Önceki çalışmalar, P72 polimorfizminin tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve gebelik kaybı için bir risk faktörü olduğunu gösterir (Lledo ve ark., 2014).

Oogenez üzerinde p53'ün fonksiyonel etkileri henüz araştırılmamış olsada düşük p53 aktivitesinin folikülogenez sırasında büyük DNA hasarı ile ilişkili olması, bir hipotez olabilir. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, A72 için homozigot olan kadınların oositlerinin PP homozigot veya heterozigot olan kadınlara göre fazla sayıda olduğunu göstermiştir (Boudjenah ve ark., 2012).

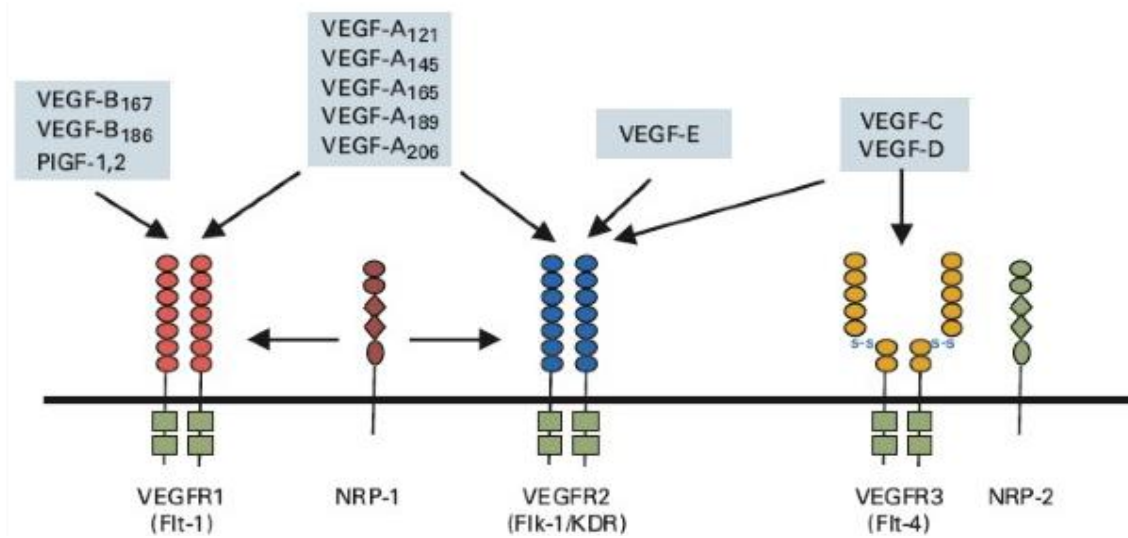
2.3. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

2.3.1. VEGF Ailesi ve Üyeleri

OHSS'nin oluşmasındaki nedenler arasında ilk aday, vasküler endotel geçirgenlik faktörü (VPF) olarak da adlandırılabilen VEGF'dir ve hCG bağımlı ovaryen anjiogeneziste en önemli mediatördür (Senger ve ark., 1983; McClure ve ark., 1994). Ayrıca hCG eklendikten sonra granüloza hücrelerindeki VEGF mRNA seviyesinin arttığı bilinmektedir (Yancopoulos ve ark., 2000; Bikfalvi, 2004).

Özellikle endotel hücrelerine özgül olan VEGF, multifonksiyonel bir büyüme faktör ailesidir. VEGF ailesi ilk olarak 1980'lerde bulunmuştur. İlk yapılan çalışmalarda tek bir üyeden oluştuğu düşünülmekteydi. Ancak daha sonra yapılan çalışmalar VEGF'nin birçok üyesi olan bir aile olduğunu ortaya çıkarmıştır.

VEGF ailesinin VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF (Plasental büyüme faktörü) ve yılan zehiri VEGF'ü (svVEGF, VEGF-F) adı verilen yedi üyeden oluştuğu görülmüştür (Şekil 1). Tüm üyeler; vücutta oluşan birçok fizyolojik (vaskülogenez, anjiogenez vb.) ve patolojik olayda (kanser, neovasküler hastalıklar veya kronik inflamatuvar hastalıklar vb.) rol oynamalarından dolayı son yıllarda oldukça popüler olmuşlardır (Yancopoulos ve ark., 2000).



Şekil 1. VEGF ligandları ve ilgili reseptörleri (Byrne ve ark., 2005)

VEGF-A

İnsan *VEGF* geni yani *VEGF-A*, kromozom 6p21.3 üzerinde yer alır. (Zhao ve ark, 2008). *VEGF-A* geni, 7 intronla birbirinden ayrılmış 8 ekzona sahip 45 kD büyüklüğünde bir gendir (Senger ve ark., 1986).

VEGF gen ailesi içinde en fazla çalışma yapılan *VEGF-A* izoformu, hipoksi ile aktive olabilen tek üyedir. *VEGF-A*'nın tespit edilen 9 farklı izoformu tanımlanmıştır: $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{148}$, $VEGF_{162}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{165b}$, $VEGF_{183}$, $VEGF_{189}$, $VEGF_{206}$ (Klaiser, 2006).

İzoformların heparine bağlanma özellikleri farklılık gösterir. En küçük izoform olan $VEGF_{121}$ hariç hepsi heparine bağlanabilmektedir. $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$ ve $VEGF_{165}$ izoformları salgılandığında kolayca difüze olur ve erimiş formları sıvılarda kolayca saptanabilmektedir (Zachary, 1998).

Bu izoformlar içinde en çok bulunan ve heparine bağlanan $VEGF_{165}$, hem hücre içi etkinliği hem de hücre dışı makrikse bağlanma özelliği olan izoformdur (Klaiser, 2006). Büyük izoformlar olan $VEGF_{189}$ ve $VEGF_{206}$ ise depo izoform olarak adlandırılırlar. Salgılandığı halde hücre aracılı olarak kalır ve varlıkları testlerle kolayca saptanamaz.

$VEGF_{206}$, yaklaşık 34-46 kDa ağırlığında ve *VEGF*'ün orijinal karakteristik bir formudur. Ayrıca homodimerik bir glikoproteindir (Thomas, 1996; Zachary, 1998). $VEGF_{189}$ heparin ve heparan sülfat proteoglikanına bağlanmayı tetikler ve artırır (Thomas, 1996).

VEGF-B

Başlangıçta *VEGF-A* ile %23'lük kısmı homolog olan bir sinyal peptidinin bölünmesiyle 186 amino asitlik bir protein olarak oluşur. Daha sonra ekson 6 bölgesinde oluşan alternatif splayzing ile tamamen farklı 167 amino asitli proteine dönüşür (Ortega ve ark., 1998). *VEGF-B*, *VEGFR-1*'e (vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1) bağlanarak monositlerin aktivasyonunda ve farklılaşmasında rol oynar (Clauss, 2000).

VEGF-C

VEGF-C, %16'sı *VEGF-A* ile benzer 388 amino asitten oluşmuştur (Ortega ve ark., 1998). *VEGFR-2* ve *VEGFR-3*'e bağlanır, vasküler ve lenfatik endotelial

hücrelerde mitojenik etki yapar. Lenfatik damarların oluşumunda rol oynamaktadır (Clauss, 2000; Ferrara ve ark., 2003).

VEGF-D

VEGF-D, %31 oranında VEGF-A ile aynı amino asitleri içeren, 334 amino asitten oluşan bir proteindir (Achen ve Stacker, 1998). C-terminal uçlarında sistinece zengin domainler içerir. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanır ve VEGF-C ile benzer işlevler yapar (Ortega ve ark., 1998; Clauss, 2000).

VEGF-E

VEGF-E, %25 oranında VEGF-A ile amino asit dizilimi aynı olan bir polipeptittir. VEGFR-1'e bağlanmayı başaramaz ama VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösteren güçlü bir mitojen ve permeabilite artırıcı faktördür (Clauss, 2000).

VEGF-F

VEGF ailesinin 7. üyesi olan ve yakın zamanda yılan zehrinden tespit edilen VEGF-F, VEGF-A₁₆₅'in aktivitesini in vivo ve in vitro ortamda bloke etmektedir (Roy ve ark., 2006).

PIGF (Plasenta Büyüme Faktörü)

VEGF ailesi içinde tanımlanan ilk üyedir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi ile önce 131 amino asite sahip olur. Sonra yeni amino asitlerin eklenmesiyle %37 oranında VEGF-A ile benzeşen, 152 amino asitli son şekli oluşur (Ortega ve ark., 1998). VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir (Clauss, 2000)

İlk defa plasentada tespit edilmiş, sonra akciğer ve kalpte de bulunduğu gösterilmiştir. PIGF ekspresyonu akciğer kanseri, kolorektal kanser, yara iyileşmesi gibi bazı patolojik durumlarda artarken, preeklampside (gebelik zehirlenmesi) düşmektedir (Roy ve ark., 2006).

2.3.2. VEGF Reseptörleri (VEGFR)

VEGF reseptörleri vasküler endotel hücrelerinde ve monosit gibi kemik iliği kökenli hücrelerde tespit edilmiştir (Shen ve ark., 1993).

VEGF ailesinin endotel hücresinde etki gösterebilmesi için öncelikle ona bağlanabilmesi gerekir ve bağlanabilmek için de özgül reseptörleri sentezlemesi gerekmektedir (Geva ve Jaffe, 2000) (Tablo3).

Tablo 3. VEGF izoformları ve reseptör etkileşimleri (Tammela ve ark.,2005; Holmes ve Zachary, 2005)

VEGF	RESEPTÖR	AÇIKLAMALAR
A	VEGFR-1 VEGFR-2 NRP-1 NRP-2	Endotel hücrelerinin proliferasyonu ve artan göçü
B	VEGFR-1 NRP-1	Endotel hücrelerinin proliferasyonu ve artan göçü
C ve D	VEGFR-2 VEGFR-3	Artan VEGFA ekspresyonu ve VEGFA'ya endotel hücrelerinin tepkisi
PIGF	VEGFR-1	Endotel hücrelerinin proliferasyonu ve artan göçü

VEGF reseptörleri beş tanedir: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1 ve NRP-2 (Tablo 4).

Tablo 4. VEGF reseptörleri (Bali ve Bali, 2013)

RESEPTÖR	ADI
VEGFR1	VEGF- Reseptör 1 veya Flt 1
VEGFR2	VEGF- Reseptör 2 veya Flk 1
VEGFR3	Flt 4
NRP1	Nörofilin 1
NRP2	Nörofilin 2

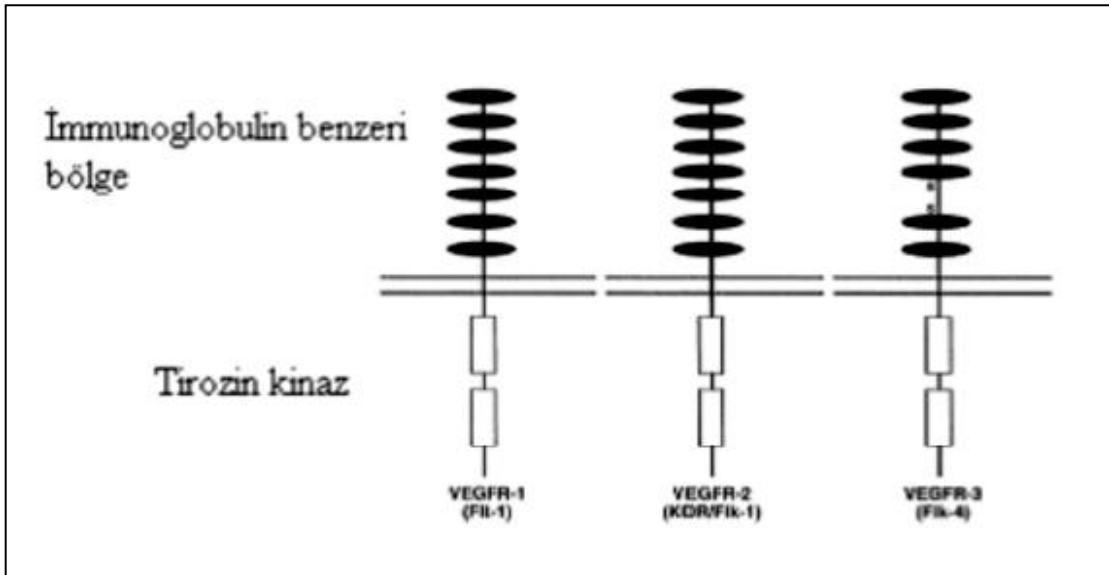
Bu reseptörlerden VEGFR-1 ve VEGFR-2 anjiyogenez ve vaskülogenezden sorumlu iken VEGFR-3 de lenfanjiyogenezden sorumludur (Park ve ark., 1994).

VEGF Reseptör 1 (VEGFR-1)

İlk bulunan, ayrıca yüksek affiniteli reseptörler: VEGFR-1, Flt-1 (Fms like tyrosine kinase-1) ve VEGFR-2, kinaz insert domaini içeren reseptör (Flk 1, KDR)'dür (Geva ve Jaffe, 2000).

Flt-1 ve KDR reseptörleri VEGF'ye yüksek affinite ile bağlanmaktadır. VEGF, KDR reseptörlerine bağlandığında hücrelerde kemotaksis ve mitojenik aktivite uyarılırken, Flt-1 reseptörlerine bağlandığında buna ters etki görülmektedir. KDR intakt hücrelerde tirozin fosforilasyonunu oldukça güçlü sağlarken, Flt-1'de bu etki daha hafiftir (Kieser ve ark., 1994).

Reseptörler yaklaşık 1300 amino asitten oluşur ve amino asitlerin %44'ü ortaktır. Ayrıca iki bölüm içerirler. Birinci bölüm, intrasellüler tirozin kinaz domainin etkinlik alanlarını içeren hücre içi bölümdür. İkinci bölüm ise, tek kısa membran köprüleri dizisi ve ligand bağlama bölgeleri içeren, 7 adet ekstrasellüler immüoglobülin benzeri domainden oluşan hücre dışı bölümdür (Popovici ve ark., 1999) (Şekil 2). Bu reseptörler ilk olarak embriyogenez sırasında sentezlenirler (Gave ve Jaffe, 2000). İyileşmekte olan cilt yaralarındaki neovaskularizasyonda da eksprese edilmektedir (Shibuya ve ark., 1990).



Şekil 2. VEGF reseptörleri (Geva ve Jaffe, 2000)

VEGF Reseptör 2 (VEGFR-2)

VEGFR-2 (Flk-1/KDR), 200–230 kDa'luk yüksek affiniteli bir VEGF reseptörüdür (Hiratsuka ve ark., 1998). Daha önceden keşfedilmiş olan fare fetal karaciğer kinazı-I (Flk-1) ile %85 oranında ortak bir sekans kimliğine sahiptir. İnsanlarda, tirozin kinaz reseptörleri için yapılan endotelial cDNA taramaları sırasında tanımlanan bu reseptör, VEGF-C ve VEGF-D için de reseptör görevi yapabilmektedir. Endotel hücrelerinde mitogeneze, kemotaksise ve morfolojik değişikliklere yol açar (Terman ve ark., 1992).

VEGF Reseptör 3 (VEGFR-3)

VEGFR-3 (Flt-4) reseptör tirozin kinazların Flt alt ailesinin bir üyesidir. Bu reseptör, embriyonik kalp damar sisteminde ve lenfatik damarların gelişiminde önemlidir ve erişkin dokularının lenfatik endotelinde gözlenmiştir. VEGFR-3, VEGF-C ve VEGF-D'yi bağlarken VEGF-A'yı bağlamaz. Ayrıca reseptörün lenfanjiyogenezi kontrol ettiği düşünülmektedir.

VEGF Benzeri Reseptörler: Nörofilinler

125I-işaretli VEGF kullanılarak yapılan çapraz-bağlantı denemeleri, VEGFR'lere karşılık gelmeyen VEGF reseptörlerin olduğunu göstermektedir. Bu reseptörler, *VEGF*'nin 7. eksonu tarafından kodlanan domainini tanırlar. Dolayısıyla $VEGF_{121}$ 'e değil de $VEGF_{165}$ 'e bağlanırlar. Bu tür reseptörlerden biri NRP-1 (nörofilin-1)'dir. NRP-1, 120–130 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. NRP-1'in tümör kökenli hücreler ve endotel hücreleri de dahil çok geniş bir doku dağılımı vardır. Fare embriyolarında yapılan çalışmalarda aşırı NRP-1 ekspresyonu embriyoda 17,5. günde aşırı derecede fazla kan damarları oluşturarak ölüme yol açmaktadır. Bu kan damarları dilate ve hemorajiye yatkındır ve NRP-1 defektif fareler embriyoda 10,5–12,5. günler arasında kardiyovasküler anomaliler nedeniyle ölmektedir (Soker ve ark., 1998; Hiratsuka ve ark., 1998; Sondel ve ark., 1999).

2.3.3. VEGF Geninin Regülasyonu

VEGF geninin regülasyonunda çeşitli mekanizmalar önerilmiştir:

- a. Hipoksida in vivo ve in vitro olarak HIF (Hipoksi ile indüklenebilen faktör) ile *VEGF* mRNA' sının yüksek ekspresyonudur (Elchalal ve Schenker, 1997). Bir mekanizma *VEGF* ve eritropoetin homolog genlerine dayandırılmaktadır.

Diğer bir mekanizma adenosin A2 reseptörlerinin aktivasyonunu sağlayan, cAMP artışı ile sonuçlanan adenosin artışıdır. Artan cAMP, protein kinaz-A bağımlı yoldan *VEGF* mRNA üretimini arttırmaktadır.

- b. Sitokin ve büyüme faktörlerinin, *VEGF* mRNA üretimi ve protein sekresyonunu arttırmasıdır. IGF-1, *VEGF* mRNA'sını ve protein üretimini *VEGF* geninin transkripsiyon oranını hemde mRNA stabilitesini arttırarak uyarabilmektedir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), TGF- α ve TGF- β , PDGF, bFGF, IL-1 β ve IL-6, *VEGF*'yi yükseltmektedir.
- c. Epitelyal ovaryen kanserli hastaların asit sıvıları ve plazmasında LPA seviyeleri yüksek bulunmuştur. LPA, *VEGF* mRNA ekspresyonunu ve *VEGF* protein seviyelerini muhtemelen Edg-4 ve diğer LPA reseptörlerini aktive ederek arttırmaktadır (Kieser ve ark., 1994).
- d. Hücre farklılaşması *VEGF* gen üretiminin düzenlenmesinde etkili rol oynamaktadır. Fibroblast hücrelerinde tümör baskılayıcı geninin, mutasyon formu *VEGF* mRNA ekspresyonunu uyarabilmektedir (Watson ve ark., 1990). RAS'ın onkojenik mutasyonu veya amplifikasyonu *VEGF*'ün yükselmesine neden olmaktadır. Ayrıca bu RAS inhibitörü olan farnesyl transferaz tedavisi ile bloke olabilmektedir. Son çalışmalarda, VHL tümör baskılayıcı geni *VEGF* gen ekspresyonunu regüle ettiği bulunmuştur. Bir adenilat siklaz aktivatörü olan LH'in ovaryen granuloza hücrelerinde *VEGF* mRNA üretimini arttırmaktadır (Kieser ve ark., 1994).

2.4. Farmakogenetik

Bireyler, genleri ve çevrelerinin etkileşim sonucunun ürünüdür. Farmakogenetik her bireyin ayrı genetik yapısı olması sebebiyle kişilerin ilaçlara verdiği cevapların oluşmasında temel rol oynayan genetik faktörleri inceleyen bir bilim dalıdır (Vogel, 1959).

Kişinin ilaç kullanımı sonucunda verdiği yanıt birden fazla gen ve gen ürününün rol aldığına tespitinin yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkması ile araştırmaların gen düzeyinden genom düzeyine kaymasına sebep olmuştur. Bunun sonucu olarak da farmakogenetik terimi yerine farmakogenomik terimi de kullanılabileceği belirtilmiştir (Baskın, 2007).

Farmakogenetikteki amaç; ilaç etkileşimini tahmin edip buna göre tedavi ayarlamak, tanı testlerini geliştirmek, genetik varyantlar ve ilaç cevabı arasındaki ilişkiyi kurmaktır (Loutradis ve ark., 2008). İlaçlara yanıt olarak bireysel değişkenliğin mevcut olduğu doğrulanmıştır (Mutsatsa ve Currid, 2012).

Ovaryen yanıtına farmakogenetik uygulaması, uyarım başarısını tahmin edebilir. Aynı zamanda kişiye özel tedavi amacıyla doz tasarımı ve ayarlamaya katkıda bulunur (Fauser ve ark., 2008). IVF de ovaryen uyarım sonucuna genlerdeki polimorfizmlerin etkisi çeşitli gruplar tarafından analiz edilmiştir (Altmäe ve ark., 2011).



3. MATERYAL VE METOT

Eylül 2015-Haziran 2016 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum servisinde infertilite tanısı konularak tedavi uygulanmakta olan olgular çalışmaya dahil edildi. Yardımcı üreme teknikleri uygulanan olguların tedavisi sırasında yumurta takiplerinde fazla sayıda yumurta elde edilen 27 olgu çalışma grubumuzu oluştururken, sağlıklı gebelik geçiren 30 kadın olgu çalışmaya dahil edildi. Tüm olguların, yaşları, aile öyküleri, FSH, LH, Estradiol hormon sonuçları, evlilik yılı, infertilite tipi, oosit sayısı gibi bilgileri sorgulayan ayrıntılı bir anemnez alındı. Tüm olgular çalışma hakkında bilgilendirilerek çalışmaya katılmaları konusunda aydınlatılmış onayları alındı. Bu çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onay alındı (Ek 1).

Çalışma ve kontrol grubu bireylerinden EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden DNA'lar saflaştırıldı. DNA eldesi kit yöntemi ile yapıldı (NukleoSpin 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 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (Merck)
- EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (Merck)
- Saf etanol (Riedel-de Haen)
- Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific)
- Primerler (Fermentase)
- dNTP Mix (Thermo Scientific)
- DNA İzolasyon Kiti (blood) (NukleoSpin)
- 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)

3.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

10XTBE: 108 g Tris, 55 g Borik asit, 40 ml EDTA 0,5 M pH: 8 karıştırılıp toplam hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

1XTBE: 100 ml 10XTBE solüsyonu üzerine 900 ml bidistile su eklendi. Oda ısısında saklandı.

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

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

3.4. DNA İzolasyon Yöntemi

3.4.1. Hazırlık

1. Wash Buffer B5 üzerine 28 ml saf alkol ilave edildi.
2. Proteinaz K (liyofilize) 1,35 ml 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.
3. Örnekler 70°C'de 10-15 dk. ya da 30 dk. inkübe edildi.

DNA Bağlanma:

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

Yıkama:

3. Toplama tüpleri atıldı, yeni toplama tüpleri (2 ml) yerleştirildi.
4. 500 µl Buffer BW ilave edildi ve 11000xg'de 1 dk. santrifüj edildi ve toplama tüpleri atıldı.
5. Yeni toplama tüpleri alındı ve örnekler üzerine 600 µl Buffer B5 ilave edildi ve 11000xg de 1 dk. santrifüj edildi.
6. Alkolü uzaklaştırmak için santrifüj işlemi bir kez daha yapıldı.

Ayrılma:

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

3.5. DNA Miktarının Tayini

DNA miktar tayini UV spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirildi. Cihaz açıldıktan sonra 2 µl distile suyla körlleme yapıldı. Daha sonra 2 µl DNA örneği ile 260 ve 280 nm dalga boylarında (OD_{260/280}) ölçüm yapıldı.

3.6. VEGFR Geni Ekzon 7 Bölgesi PCR Amplifikasyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) reaksiyonu 25 µl'lik total volum içerisinde, 50-100 ng kalıp gDNA, her primerden 0,2-0,4 µM, 1-2 mM 1xPCR Buffer (Mg²⁺ içeren) ve 0,625 U Taq polimeraz içermekteydi.

Tablo 5. VEGFR 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 5'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. Daha sonra her PCR ürününden 5 µl alınarak %2'lik agaroz jelle yükleme yapıldı. Jel görüntüsü analiz edildi ve her reaksiyon DNA dizi analizinde kullanıldı.

3.6.1. Primer Dizileri

- **Forward (F):** 5'-TTTCCAAGACCATAGCTTACCAT-3'
- **Reverse (R):** 5'-CAGCATCAGCATAAGAACTTGTA-3'

3.7. Agaroz Jelin Hazırlanışı

Çalışmamız için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bunlar için 2 g agaroz tartıldı. Erlenmayere 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) 100 µl EtBr (0,5 mg/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.

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

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

3.8.1. Taqment Genomik DNA

Hazırlık

Aşağıdaki taqmentation 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 10 µl, gDNA'dan 5 µl eklendi. Karıştırmak için pipetlendi.
2. 5 µl ATM (Amplicon Tagment Mix) eklendi ve karıştırmak için pipetlendi.
3. 1 dk. boyunca 20°C'de 280xg'de santrifüj edildi.
4. Termal cycler'a yerleştirildi ve taqmentation programı çalıştırıldı.
5. 5 µl NT (Neutralize Tagment Buffer) eklendi ve karıştırmak için pipetlendi.
6. 1 dk. boyunca 20°C'de 280xg'de santrifüj edildi.
7. 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. 5 dk. boyunca 72°C'de bekletildi.
 6. 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) adaptör 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. Yeni bir beyaz kapak ile her i5 adaptör tüpün kapağı değiştirildi.
5. 5 µl NPM (Nextera PCR Master Mix) eklendi. Karıştırmak için pipetlendi.
6. 1 dk. boyunca 20°C'de 280xg'de santrifüj edildi.
7. Termal cycler'a yerleştirildi ve PCR programı çalıştırıldı.

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

1. Aşağıdaki sarf malzemeler hazırlandı:

- 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.
 - AMPure XP Boncuklar: 2°C ile 8°C 'de muhafaza edilen maddenin sıcaklığını oda sıcaklığına getirmek için 30 dk. bekletildi.
2. Saf etanolden %80'lik etanol hazırlandı.

Prosedür

1. 1 dk. boyunca 20°C 'de $280\times g$ 'de santrifüj edildi.
2. 50 μl PCR ürünü PCR plate'inden yeni bir midi plate'ye transfer edildi.
3. 30 μl AMPure XP boncuk eklendi.
4. 2 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
5. 5 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Manyetik bir stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
7. Manyetik standdan alındı ve tüm süpernatant atıldı.
8. 200 μl %80'lik etanol ile 2 kez yıkandı.
9. 20 μl pipet kullanarak %80'lik tortu EtOH uzaklaştırıldı.
10. 15 dk. boyunca manyetik stand üzerinde havada kurutuldu.
11. Manyetik standdan alındı.
12. 52,5 μl RSB eklendi.
13. 2 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
14. 2 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
15. Manyetik stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
16. 50 μl süpernatant 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 seyretilmemiş 1 μl kütüphane ile çalıştırıldı.

3.8.5. Kütüphanenin Normalizasyonu

Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemeler hazırlandı:
 - 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.
 - LNB1 (Library Normalization Beads 1): 2°C-8°C'de muhafaza edilen madde su banyosu kullanılarak sıcaklığı 20°C-25°C'ye getirildi.
 - LNW1 (Library Normalization Wash 1): 2°C-8°C'de muhafaza edilen solüsyon su banyosu kullanılarak sıcaklığı 20°C-25°C'ye getirildi.
 - LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1): Oda sıcaklığında muhafaza edilen solüsyon yine oda sıcaklığında kullanıldı.

Prosedür

1. Yeni bir midi plate'e 20 µl süpernatant transfer edildi.
2. 15 ml'lik konik tüpe 4,4 ml LNA1 eklendi.
3. LNB1 iyice süspansedildi ve karıştırmak için pipetlendi.
4. 15 ml'lik konik tüpe 800 µl LNB1 transfer edildi ve karıştırmak için alt üst edildi.
5. Bir çukur içine boncuk karışımı döküldü ve 45 µl LNA1/LNB1 karışımı eklendi. 30 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
6. Manyetik bir stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
7. Manyetik standdan alındı ve tüm süpernatant atıldı.
8. 2 kez 45 µl LNW1 ile yıkandı.
9. 30 µl 0,1 N NaOH eklendi.
10. 5 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
11. 5 dk.'lık elüsyon sırasında yeni bir 96'lık PCR plate SGP (Storage Plate) etiketlendi.
12. SGP plate'ye 30 µl LNS1 eklendi ve bir kenara konuldu.
13. 5 dk.'lık elüsyon sonrasında bütün örnekler yeniden süspansedildi ve pipetle karıştırıldı.

14. 5 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
15. Manyetik bir stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
16. Midi plate'den SGP plate'ye süpernatant transfer edildi.
17. 1 dk. 1000xg'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 1000xg'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.1.1.0.0. uygulaması ile vcf dosyaları kullanılarak, dizilenen bölgelerdeki varyasyonlar ve ayrıntıları elde edildi. Buradan elde edilen varyasyon koordinatları alınarak yine Basespace üzerinden Integrative 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 Kikare, 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; polimorfik bölgeler ile infertilite oluşumu arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığı amacıyla değerlendirildi.



4. BULGULAR

Eylül 2015-Haziran 2016 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum servisinde infertilite tanısı konularak yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören, fazla sayıda yumurta elde edilen 27 hasta ile sağlıklı gebe kalan 30 kontrol, toplam 57 kişiden kan alındı. Kontrol ve hasta grubundaki kişilere gönüllü olur formu imzalatıldı (Ek 2).

Her bir hastanın yaşı, infertilite tipi, infertilite nedenleri, evlilik süresi Tablo 6'daki gibi kaydedildi. Bu bilgilere göre hasta grubunda 1 hastada sekonder, 13 hastada primer infertilite tipi gözlenirken 13 hastaya ait infertilite tipi bilgilerine ulaşılamadı. Ayrıca her bir hastanın infertilite nedenlerine bakıldığında düşük over rezervi olan 1 hasta, infertilite nedeni açıklanamayan 22 hasta ve 4 hastaya ait bilgilere ise ulaşılamadı.

Tablo 6. Hasta grubunun yaşı, infertilite tipi, infertilite nedeni, evlilik süresi bilgileri

Sıra	Yaşı	İnfertilite Tipi	İnfertilite Nedeni	Evlilik Süresi
1	28		Açıklanamayan	8
2	29	Primer	Açıklanamayan	5
3	33		Açıklanamayan	7
4	32	Primer		4,5
5	30	Primer	Açıklanamayan	4
6	29		Açıklanamayan	4
7	25		Açıklanamayan	5
8	25	Primer	Açıklanamayan	5
9	25	Primer	Açıklanamayan	4
10	37	Primer	Açıklanamayan	12
11	32	Primer	Açıklanamayan	6
12	43	Primer		2
13	26		Açıklanamayan	6
14	38		Açıklanamayan	17
15	30	Primer		6
16	30	Primer	Açıklanamayan	4
17	28	Primer	Açıklanamayan	3
18	40	Sekonder	Düşük over rezervi	16
19	27		Açıklanamayan	2
20	30		Açıklanamayan	8
21	25		Açıklanamayan	2

Tablo 6 (devam). Hasta grubunun yaşı, infertilite tipi, infertilite nedeni, evlilik süresi bilgileri

Sıra	Yaşı	İnfertilite Tipi	İnfertilite Nedeni	Evlilik Süresi
22	30		Açıklanamayan	15
23	25		Açıklanamayan	6
24	24		Açıklanamayan	4
25	26		Açıklanamayan	8
26	28	Primer		6
27	25	Primer	Açıklanamayan	6

Hasta grubuna ait FSH, LH, E2 hormon değerlerine ilişkin test sonuçları ile tedavi sırasında toplanan oosit sayılarına ilişkin bilgiler Tablo 7'deki gibi kaydedildi.

Tablo 7. Hasta grubunun FSH, LH, E2 hormonları ve oosit değerleri

Sıra	FSH	LH	E2	Oosit
1	4,58	6,68	36,98	19
2	4	10	36	15
3	7,2	2,7	36	15
4	6,4	8,8	64	13
5	4,7	5,07	44	17
6	5,9	3,76	53	13
7	8,7	11	40	31
8	6,2	7,2	3,7	13
9	7	6	7,9	25
10	4,1	2,05	35,4	23
11	6	9	34	13
12	5,8	6,38	29	13
13	9,2	7,6	29	13
14	5,1	4,01	26,6	14
15	6,9	10	51	19
16	6,8	10	42	18
17	4,08	2,1	12	13
18	5,15	19,56	99	17
19	7,1	6,2	45	14
20	6,5	4,8	49	25
21	6,5	4,2	35	16
22	8,5	6,8	41,6	20
23	6,1	4,1	38	17

Tablo 7 (devam). Hasta grubunun FSH, LH, E2 hormonları ve oosit değerleri

Sıra	FSH	LH	E2	Oosit
24	4,5	0,7	39	22
25	4,8	5,2	34	25
26	4,5	3,4	25	32
27	6,39	6,5	54	21

4.1. Hasta ve Kontrol Grubu Demografik Özellikleri

Çalışmamızda herhangi bir infertilite sorunu olmayan 30 sağlıklı kadın kontrol grubu incelenmiştir. İncelenen kontrol grubu kişilerinin yaş ortalaması, ortanca ve aralık değerleri Tablo 8’deki gibi hesaplanmıştır. Bu bilgilere göre kontrol grubu yaşı 21 ve 42 arasında değişmekte olup, ortalaması $30,70 \pm 5,396$ olarak hesaplanmıştır ve ortanca değeri 32 yaşdır.

Tablo 8. Kontrol grubunun ortalama, ortanca, aralık değerleri

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

Çalışmada, infertilite tanısı koyularak yardımcı üreme teknikleri ile tedavi olan fazla sayıda yumurta elde edilen 27 hastanın *VEGFR* geni polimorfizmleri incelenmiştir.

Hasta grubuna ait yaş, evlilik süresi, hemogram, FSH, LH, E2, oosit sayıları ve embriyo sayılarına ilişkin özelliklerin ortalama, ortanca ve aralık değerleri Tablo 9’da gösterilmiştir.

Hasta grubunun yaşı 24 ve 43 arasında değişmekte olup ortalama yaş $29,59 \pm 4,948$ olarak hesaplanmıştır ve ortancası 29,00’dır. Evlilik süreleri 2 yıl ve 17 yıl arasında değişmekte olup ortalama evlilik süresi 6,48 olarak hesaplanmıştır ve ortancası 6,00 yıldır. Hemogram değerleri 9,30 ve 15,10 arasında değişmekte olup ortalama hemogram değeri 12,9625 olarak hesaplanmıştır ve ortancası 12,95’dir.

Tablo 9. Hasta grubunun klinik verileri

Hasta Grubu (N=27)			
	Ortalama \pm SS	Ortanca(Min-Maks)	Aralık(Range)
Yaş	29,59 \pm 4,948	29,00 (24-43)	19
Evlilik Süresi	6,48 \pm 4,061	6,00 (2-17)	15
Hemogram	12,9625 \pm 1,36535	12,9500 (9,30-15,10)	5,80
FSH (mIU/ml)	6,0259 \pm 1,41760	6,10000 (4,00-9,20)	5,20
LH (IU/L)	6,4374 \pm 3,76936	6,2000 (0,70-19,56)	18,86
E2 (ng/ml)	38,5252 \pm 18,14024	36,9800 (3,70-99,00)	95,30
Oosit	18,37 \pm 5,534	17,00 (13-32)	19
Embriyo	9,92 \pm 4,481	10,00 (2-19)	17

Hasta grubunun FSH değerleri 4 mIU/ml ve 9,20 mIU/ml arasında değişmekte olup ortalama FSH değeri 6,0259 ve ortancası 6,100 mIU/ml'dir. LH değeri 0,7 IU/L ve 19,56 IU/L arasında değişmekte olup ortalama LH değeri 6,4374 IU/L olarak hesaplanmış ve ortancası 6,200 IU/L'dir. E2 değerleri 3,7 ng/ml ve 99 ng/ml arasında değişmekte olup ortalama E2 değeri 38,5252 ng/ml olarak hesaplanmış ve ortancası 36,98 ng/ml'dir.

Hasta grubunun oosit sayıları 13 ve 32 arasında değişmekte olup ortalama oosit sayısı 18,57 olarak hesaplanmış ve ortancası 17 oosittir. Embriyo sayıları ise 2 ve 19 arasında değişmekte olup ortalama embriyo sayısı 9,92 olarak hesaplanmış ve ortancası 10 embriyodur.

Hastaların oosit sayısı, embriyo sayısı, yaşı gibi demografik karakterleri Tablo 11'de gösterilmiştir. Hastaların yaşlarına bakıldığında %59,3'ü 20-30 yaş arasında, %40,7'si 30-40 arasındaydı. Oosit sayısı 20'nin altında olanlar %77,8 iken, 20'nin üstünde olanlar %22,8 oranındaydı. Embriyo Sayısı 15'in altında olanlar %44,4 iken %55,6'sının embriyo sayısı 15'in üstündeydi.

4.2. VEGFR Geni Yeni Nesil DNA Dizi Analizi Sonuçları

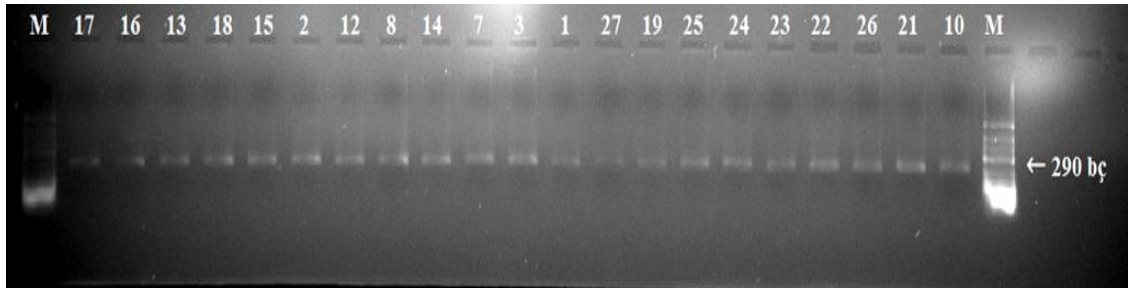
VEGFR geni rs2305948 mutant bölgesi çalışılan 27 hastanın 25'sinin (%50,0) CC homozigot, 2'sinin (%28,6) CT heterozigot; 30 kontrolün ise 25'inin (%50,0) CC homozigot, 5'inin (%71,4) CT heterozigot olduğu tespit edildi (Tablo 10).

Hasta ve kontrollerin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında rs2305948 bölge açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Genotiplerden CC+CT'ye karşılık TT veya CC'ye karşılık TT+CT karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak bir ilişki tespit edilmedi ($p>0,05$) (Tablo 10).

Tablo 10. *VEGFR* gen polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıklarının hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılması

SNP	Genotip / Allel	Hastalar (n=27) (%)	Kontroller (n=30) (%)	χ^2	P değeri	OR (%95 CI)	
<i>VEGFR</i> rs2305948	CC	25 (50,0)	25 (50,0)	1,131	0,288		
	CT	2 (28,6)	5 (71,4)				
	TT	0	0				
		CC+CT : TT	27: 0	30: 0			
		CC : CT+TT	25: 2	25: 5	1,131	0,28	2,5 (0,4428-14,11)
		C	52	55	0,057	0,305	2,364 (0,4392-12,72)
		T	2	5			

PCR yöntemi ile çalışılan örneklerin bazılarının genotiplerini gösteren jel fotoğrafları şekilde verilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. *VEGFR* geni için PCR yöntemi ile çalışılan 17, 16, 13, 18, 15, 2, 12, 8, 14, 7, 3, 1, 27, 19, 25, 24, 23, 22, 26, 21, 10, numaralı örneklerin ve markerin jel görüntüsü

Hasta grubunun demografik özellikleri karşılaştırıldığında, oosit sayısı, embriyo sayısı, yaşı ile *VEGFR* genotip dağılımı değerlendirildi ve oosit sayısı 20'nin üzerinde olan bireylerde CT genotip frekansı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,006$) (Tablo 11).

Yeni nesil dizileme yöntemi ile elde ettiğimiz görüntüde ise *VEGFR* geninin rs2305948 bölgesinde CT değişiminin olduğu tespit edildi (Şekil 4).

Tablo 11. Hastaların *VEGFR* rs2305948 bölgesi, oosit sayısı, embriyo sayısı ve yaşının demografik özellikleri dağılımları

	Toplam n(%)27	<i>VEGFR</i> rs2305948			P Değeri	χ^2
		CC	CT	TT		
Oosit Sayısı						
≤20	21 (77,8)	21 (84)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,006	7,560
>20	6 (22,2)	4 (16,0)	2 (100)	0 (0,0)		
Embriyo Sayısı						
≤15	12 (44,4)	12 (48,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,189	1,728
>15	15 (55,6)	13 (52,0)	2 (100)	0 (0,0)		
Yaş						
20-30	16 (59,3)	14 (56,0)	11 (0,0)	0 (0,0)	0,223	1,485
30-40	11 (40,7)	11 (44,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		

-İstatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlar kalın karakterlerle yazılmıştır.

5. TARTIŞMA

İnsanlarda VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 (KDR)'ye bağlanması yoluyla biyolojik etkisini gösterir. Vasküler endotelyal hücreler de VEGF'nin vasküler geçirgenliğinde ikincil olarak sorumludur (Ferrara, 2004). VEGF'ün periferik kan konsantrasyonu ile OHSS riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda pozitif sonuçların olmasıyla birlikte farklı ve çelişkili sonuçlar da elde edilmiştir (Enskog ve ark., 2001; Pau ve ark., 2006).

VEGFR2 geni promotor bölgesinde *VEGFR2*'nin transkripsiyon aktivitesini etkileyen bir polimorfizm tespit edilmiştir (Kariyazono ve ark., 2004; Wang ve ark., 2007). Bununla birlikte *VEGFR2* geninin kodlama bölgesini etkileyen ve VEGF'ün *VEGFR2*'ye bağlanma etkinliğini etkileyen polimorfizmler de mevcuttur (Wang ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalarda OHSS riski gelişiminde etkili olabilecek birçok genetik polimorfizm incelenmiştir. Bunlar arasında; *FSHR*, *LHB*, *ESR*, *AMHR*, *SHBG*, *CYP19*, *MTHFR*, *BMP15*, *GDF9*, *SOD2* ve *p53* yer almaktadır (Lledo ve ark., 2014). Bu çalışmada OHSS olgularında *VEGFR* geni exon 7 bölgesi incelenmiş olup, *VEGFR* geni ekzon 7 rs2305948 mutant bölge açısından CT genotipine sahip olan bireylerle yüksek sayıda yumurta oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişki saptanmıştır ($p=0,006$, $\chi^2=7,560$).

Literatürdeki çalışmalara baktığımızda; Hanevik ve arkadaşlarının çalışmasında 53 OHSS olgusu ve 100 kontrol olgusu incelenmiş ve *VEGF* geninde 6 SNP bölgesi analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, *VEGF* +405CC genotipi ile OHSS istatistiksel olarak ilişkili bulunmuştur (OR 3,4, 95% CI 1,01–11,7) (Hanevik ve ark., 2012). Diğer 5 SNP bölgesi ile OHSS gelişimi arasında bir ilişki saptanmamıştır. Literatürde *VEGF* +405C genotipi aynı zamanda yumurtalık kanseri oluşumu ile de ilişkili bulunmuştur (Steffensen ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada *VEGF* +405C genotipi endometriosis gelişiminde risk faktörü olarak belirlenmiştir (Bhanoori ve ark., 2005). Pre-eklemsi hastalarında da düşük VEGF seviyesi ile *VEGF* +405C genotipi ilişkili görülmüştür (Bányász ve ark., 2006). Bu sonuçlar VEGF'ün düzenleyici rolünü göstermektedir.

Nouri ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmada, VEGF/VEGFR'nün OHSS gelişimine olan etkisini inceledikleri çalışmada 116 OHSS hastası ve 124 kadın

kontrol kullanmışlar ve rs2071559 (*VEGFR2-604*); rs2305948 (*VEGFR2-1192*); rs1870377 (*VEGFR2-1719*); rs2010963 (*VEGF-405*); ve rs111458691 (*VEGFR1-519*) gen bölgelerini incelemişlerdir. *VEGFR1-519* polimorfizmini T allelinin frekansının OHSS hastalarında yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (p = 0,02, OR: 3,62, CI: 1,16 – 11,27). *VEGFR1-519* ve *VEGF-405* polimorfik bölgelerinin de hasta ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğunu tespit etmişlerdir (p = 0,02, OR: 3,79 CI: 1,98 – 11,97 ve p = 0,000005, OR: 0,29, CI: 0,17–0,50). Böylelikle *VEGFR2* ve *VEGF* geninin ve özellikle VEGF ve reseptör etkileşiminin OHSS gelişiminde rol aldığını bildirmişlerdir. Nouri ve arkadaşlarının çalışması, VEGF ve reseptörünün OHSS gelişiminde vasküler geçirgenlikte rol aldığı ve OHSS patofizyolojisi ve etiyolojisinde rol aldığı yönündedir (Nouri ve ark., 2014).

Hanek ve arkadaşları, IVF uygulaması sırasında OHSS gelişen 53 Norveçli kadınla yaptıkları çalışmada *VEGF +405* gen polimorfizmini incelemişler ve *VEGF +405 CC* genotipinin OHSS gelişiminde etkili olduğunu tespit etmişlerdir (Hanek ve ark., 2012). Diğer bir çalışmada Watson ve arkadaşları *VEGF -405* polimorfik bölgesinin direkt olarak *VEGF* gen ekspresyonunu etkilediğini vurgulamışlardır. Bu bölgede myeloid çinko parmak bağlanma bölgesi bulunduğunu ve transkripsiyon faktörlerinin bu bölgeyi tanıyarak bağlanmalarından dolayı ekspresyonu etkilediğini vurgulamışlardır (Humaidan ve ark., 2010). *VEGF*'ün yanı sıra *VEGFR* geni de daha önce yapılan çalışmalarda bazı kanserler, inme, sistemik lupus eritematozus ve tekrarlayan düşüklerle ilişkili bulunmuştur (McClure ve ark., 1994; Zimmermann ve ark., 2001; Zimmermann ve ark., 2003; Pauli ve ark., 2005; Kaczmarek ve ark., 2007).

Kolon ve rektal kanserlerinde VEGF reseptörünün VEGF'den daha fazla risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak da VEGF reseptörünün inflamatuvar sinyallerle etkileşime geçmesi olabileceği düşünülmektedir (McClure ve ark., 1994). *VEGFR1-519* polimorfik bölgesinin analizi T allelinin VEGF ve reseptörünün etkileşiminde p53 cevap elementini etkilediğini ve transkripsiyonel yolda strese neden olduğunu vurgulamışlardır (Wulff ve ark., 2001).

2014 yılında *VEGFR2* geni ve OHSS hastaları ile yapılan bir diğer çalışmada, 174 kadın hasta ve 155 kontrol çalışılmış ve rs2305945 G/T polimorfik bölgesinin (p=0,027) ve rs2305948, rs1870378, rs2305945 (C-T-G) haplotipinin OHSS gelişiminde etkili olduğunu öne sürmüşlerdir (O'Brien ve ark., 2014).

VEGFR geni exon 7'de yer alan ve kodon 297'de amino asit değişimine (valin>izolösin) neden olan diğer bir polimorfik bölgesi rs2305948 (G>A)'dir. Bu amino asit değişiminin yer aldığı bölge reseptörün ekstraselüler bölgesinin ligand bağlanma domainindedir. İn vitro çalışmalar bu polimorfik bölgenin *VEGFR* ve *KDR* bağlanmasını etkilemekte olduğunu göstermektedir. Klinik olarak da rs2305948 polimorfik bölgesinin koroner arter hastalığı ile yüksek riskli ilişkili, intraserebral kanama ve inme ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Wang ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2009). rs2305948 T ve rs10020464-rs7692791 haplotipi neovasküler yaşla ilişkili maküler dejenerasyon ile ilişkili bulunmuştur (Fang ve ark., 2009).

Bizim çalışmamızın sonuçları da literatür ile uyumlu olup, sonuçlarımıza göre, yardımcı üreme tedavisi sürecinde *VEGFR* geni rs2305948 bölgesi bakımında CT genotipine sahip bireylerde çok daha yüksek sayıda yumurta oluştuğu ve bu bireylerin OHSS gelişmesi açısından riskli grupta olduğu saptanmıştır. *VEGFR* geninde valin>izolösin değişiminin yer aldığı bölge, reseptörün ekstraselüler bölgesinin ligand bağlanma domaininde olduğu bilinmektedir. Bu durum hormon-reseptör bağlanma etkinliğini değiştirebileceği için, tedavi sürecinde uygulanan ilacın etkisinin de değişebileceği, dolayısıyla yumurta oluşumunu da etkilediği kanaatindeyiz. Sonuçlarımızın kesinlik kazanması için hasta sayısının arttırılması 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, tedavi sırasında fazla sayıda yumurta elde edilen ve OHSS gelişen 27 hasta ile sağlıklı gebelik elde edilen 30 kadın kontrol dahil edilerek toplam 57 olgu çalışıldı. *VEGFR* geni ekzon 7 bölgesi yeni nesil DNA dizileme yöntemi ile çalışıldı.

VEGFR geni ekzon 7 rs2305948 bölge açısından CT genotipine sahip olan bireylerle yüksek sayıda yumurta oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişki saptanmıştır ($p=0,006$, $\chi^2=7,560$).

Çalışmamızın sonucuna göre, yardımcı üreme tedavisi sürecinde *VEGFR* geni rs2305948 bölgesi bakımında CT genotipine sahip bireylerde çok daha yüksek sayıda yumurta oluştuğu ve OHSS gelişmesi açısından daha riskli grupta olduğu saptanmıştır. *VEGFR* geninde valin>izolösin değişiminin yer aldığı bölge, reseptörün ekstraselüler bölgesinin ligand bağlanma domaininde olduğu bilinmektedir. Bu durum hormon-reseptör bağlanma etkinliğini değiştirebileceği için, tedavi sürecinde uygulanan ilacın etkisinin de değişebileceği, dolayısıyla yumurta oluşumunu da etkilediği kanaatindeyiz. Bu sebeple benzer çalışmaların arttırılmasıyla birlikte gelecekte yardımcı üreme teknikleri uygulanan olgularda yumurta oluşumunu etkileyen genler açısından bireylerin genotip durumlarına göre ilaç dozu uygulamasının daha etkin sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz. Sonuçlarımızın kesinlik kazanması için hasta sayısının arttırılması ve farklı populasyonlarda da çalışılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Achen MG, Stacker SA. The VEGF family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int Exp Path.* 1998; 79: 255-265.
- Altmäe S, Haller K, Peters M, Hovatta O, Stavreus-Evers A, Karro H, Metspalu A, Salumets A. Allelic estrogen receptor 1 (ESR1) gene variants predict the outcome of ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Mol Hum Reprod.* 2007; 13(8): 521–526.
- Altmäe S, Hovatta O, Stavreus-Evers A, Salumets A. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: where do we stand today?. *Hum Reprod Update.* 2011; 17(6): 813–828.
- Alviggi C, Clarizia R, Pettersson K, Mollo A, Humaidan P, Strina I, Coppola M, Ranieri A, D'Uva M, De Placido G. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online.* 2009; 18(1): 9–14.
- Anagnostou E, Mavrogianni D, Theofanakis CH, Drakakis P, Bletsas R, Demireol A, Gurgan T, Antsaklis A, Loutradis D. ESR1, ESR2 and FSH receptor gene polymorphisms in combination: a useful genetic tool for the prediction of poor responders. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13(3): 426–434.
- Asch R, Li H-P, Balmaceda JP, Weckstein LN, Stone SC. Severe ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproductive technology: definition of high risk groups. *Hum Reprod.* 1991; 6: 1395–1399.
- Aurrekoetxea I, Ruiz-Sanz JI, del Agua AR, Navarro R, Hernández ML, Matorras R, Prieto B, Ruiz-Larrea MB. Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010; 94(4): 1279–1286.
- Ayvaz OU, Ekmekçi A, Baltacı V, Onen HI, Unsal E. Evaluation of in vitro fertilization parameters and estrogen receptor alpha gene polymorphisms for women with unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26(9–10): 503–510.
- Bali J, Bali RT. Pathological ocular angiogenesis in diabetes: A perspective of emerging paradigms and current evidence. *J Clin Ophthalmol Res.* 2013; 1: 3-10.
- Bányász I, Szabó S, Bokodi G, Vannay A, Vásárhelyi B, Szabó A, Tulassay T, Rigó JJ r. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2006; 12: 233–236.
- Baskın Y. Tıpta teknolojik gelişimin neden olduğu kavram değişimleri: Kişiselleştirilmiş tıp. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2007; 64 (2): 54-9.
- Behre HM, Greb RR, Mempel A, Sonntag B, Kiesel L, Kaltwasser P, Seliger E, Röpke F, Gromoll J, Nieschlag E, Simoni M. Significance of a common single nucleotide

- polymorphism in exon 10 of the folliclestimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15: 451–456.
- Bentov Y, Kenigsberg S, Casper RF. A novel luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mutation associated with amenorrhea, low oocyte yield, and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2012; 97: 1165–1168.
- Bhanoori M, Arvind Babu K, Pavankumar Reddy NG, Lakshmi Rao K, Zondervan K, Deenadayal M, Kennedy S, Shivaji S. The vascular endothelial growth factor (VEGF) +405G>C 5'-untranslated region polymorphism and increased risk of endometriosis in South Indian women: a case control study. *Hum Reprod*. 2005; 20: 1844–1849.
- Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem Pharmacology*. 2004; 68: 1017-1021.
- Boudjenah R, Molina-Gomes D, Torre A, Bergere M, Bailly M, Boitrelle F, Taieb S, Wainer R, Benahmed M, de Mazancourt P, Selva J, Vialard F. Genetic polymorphisms influence the ovarian response to rFSH stimulation in patients undergoing in vitro fertilization programs with ICSI. *PLoS ONE*. 2012; 7(6): e38700.
- Brinsden PR, Wada I, Tan SL, Balen A, Jacobs HS. Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995; 102: 767–772.
- Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005; 9(4): 777-794.
- Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost*. 2000; 26: 561-569.
- d'Alva CB, Serafini P, Motta E, Kohek MB, Latronico AC, Mendonca BB. Absence of follicle-stimulating hormone receptor activating mutations in women with iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2005; 83(6): 1695–1699.
- Daelemans C, Smits G, de Maertelaer V, Costagliola S, Englert Y, Vassart G, Delbaere A. Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(12): 6310–6315.
- De Castro F, Moron FJ, Montoro L, Galán JJ, Hernández DP, Padilla ES, Ramírez-Lorca R, Real LM, Ruiz A. Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics*. 2004; 14: 285–293.

- de Castro F, Morón FJ, Montoro L, Real LM, Ruiz A. Pharmacogenetics of controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenomics*. 2005; 6(6): 629–637.
- de Castro F, Ruiz R, Montoro L, Pérez-Hernández D, Sánchez-Casas Padilla E, Real LM, Ruiz A. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle stimulating hormone. *Fertil Steril*. 2003; 80: 571–576.
- Desai SS, Achrekar SK, Paranjape SR, Desai SK, Mangoli VS, Mahale SD. Association of allelic combinations of FSHR gene polymorphisms with ovarian response. *Reprod Biomed Online*. 2013; 27(4): 400–406.
- Desai SS, Achrekar SK, Pathak BR, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale SD. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (G-29A) is associated with altered level of receptor expression in granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(9): 2805–2812.
- Dupakuntla M, Mahale SD. Accessibility of the extracellular loops of follicle stimulating hormone receptor and their role in hormonereceptor interaction. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 315: 131–137.
- Elchalal U, Schenker JG. The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome—views and ideas. *Hum Reprod*. 1997; 12: 1129–37.
- Enskog A, Henriksson M, Unander M, Nilsson L, Brannstrom M. Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1999; 71: 808–14.
- Enskog A, Nilsson L, Brännström M. Plasma levels of free vascular endothelial growth factor(165) (VEGF(165)) are not elevated during gonadotropin stimulation in in vitro fertilization (IVF) patients developing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): results of a prospective cohort study with matched controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001; 96: 196–201.
- Fang AM, Lee AY, Kulkarni M, Osborn MP, Brantley MA Jr: Polymorphisms in the VEGFA and VEGFR-2 genes and neovascular age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2009; 15: 2710–2719.
- Fauser BC, Diedrich K, Devroey P. Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update*. 2008; 14: 1–14.
- Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9: 669–676.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004; 25: 581–611.

- Georgiou I, Konstantelli M, Syrrou M, Messinis IE, Lolis DE. Oestrogen receptor gene polymorphisms and ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997; 12(7): 1430–1433.
- Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril.* 2000; 74: 429-438.
- Gromoll J, Ried T, Holtgreve-Grez H, Nieschlag E, Gudermann T. Localization of the human FSH receptor to chromosome 2 p21 using a genomic probe comprising exon 10. *J Mol Endocrinol.* 1994; 12: 265–271.
- Guéripel X, Brun V, Gougeon A. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biol Reprod.* 2006; 75(6): 836–843.
- Haasl RJ, Ahmadi MR, Meethal SV, Gleason CE, Johnson SC, Asthana S, Bowen RL, Atwood CS. A luteinizing hormone receptor intronic variant is significantly associated with decreased risk of Alzheimer's disease in males carrying an apolipoprotein E epsilon4 allele. *BMC Med Genet.* 2008; 25: 9–37.
- Haavisto AM, Pettersson K, Bergendahl M, Virkamäki A, Huhtaniemi I. Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(4): 1257–1263.
- Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online.* 2011; 23(1): 97–104.
- Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. Single nucleotide polymorphisms in the anti-Müllerian hormone signalling pathway do not determine high or low response to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online.* 2010; 21(5): 616–623.
- Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. Increased risk of ovarian hyperstimulation syndrome following controlled ovarian hyperstimulation in patients with vascular endothelial growth factor +405 cc genotype. *Gynecol Endocrinol.* 2012; 28: 845–849.
- Hatzi E, Bouba I, Galidi A, Xita N, Sakaloglou P, Kolios G, Bairaktari E, Kaponis A, Zikopoulos K, Tsatsoulis A, Georgiou I. Association of serum and follicular fluid SHBG levels and SHBG (TAAAA)n polymorphism with follicle size in women undergoing ovarian stimulation. *Gynecol Endocrinol.* 2011; 27(1): 27–32.
- Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol.* 1994; 100(1–2): 51–54.

- Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt -1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1998; 95: 9349-9354
- Hogeveen KN, Talikka M, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)n repeat element within an Alu sequence. *J Biol Chem*. 2001; 276(39): 36383–36390.
- Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth actor family: Angiogenic factors in growth and disease. *Genome Biol*. 2005; 6: 209.
- Humaidan P, Quartarolo J, Papanikolaou EG. Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician. *Fertil Steril*. 2010; 94: 389–400.
- Jun JK, Yoon JS, Ku SY, Choi YM, Hwang KR, Park SY, Lee GH, Lee WD, Kim SH, Kim JG, Moon SY. Follicle stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet*. 2006; 51: 665–670.
- Kaczmarek MM, Kowalczyk AE, Waclawik A, Schams D, Ziecik AJ. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Mol Reprod Dev*. 2007; 74: 730–739.
- Kariyazono H, Ohno T, Khajooe V, Ihara K, Kusuhara K, Kinukawa N, Mizuno Y, Hara T. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor gene polymorphisms with coronary artery lesions of Kawasaki disease. *Pediatr Res*. 2004; 56: 953–959.
- Kerkelä E, Skottman H, Friden B, Bjuresten K, Kere J, Hovatta O. Exclusion of coding region mutations in luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor genes as the cause of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2007; 87(3): 603–606.
- Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*. 1994; 9: 963–969.
- Klaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease. *Am J Ophthalmol*. 2006; 142: 660-668.
- Laanpere M, Altmäe S, Kaart T, Stavreus- Evers A, Nilsson TK, Salumets A. Folate-metabolizing gene variants and pregnancy outcome of IVF. *Reprod Biomed Online*. 2011; 22(6): 603–614.
- Lazaros L, Xita N, Hatzi E, Takenaka A, Kaponis A, Makrydimas G, Sofikitis N, Stefanos T, Zikopoulos K, Georgiou I. CYP19 gene variants affect the assisted

- reproduction outcome of women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2013; 29(5): 478–482.
- Lazaros LA, Hatzi EG, Pamporaki CE, Sakaloglou PI, Xita NV, Markoula SI, Stefanos TI, Zikopoulos KA, Georgiou IA. The ovarian response to Standard gonadotrophin stimulation depends on FSHR, SHBG and CYP19 gene synergism. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29(11): 1185–1191.
- Lee TH, Liu CH, Huang CC, Wu YL, Shih YT, Ho HN, Yang YS, Lee MS. Serum anti-Müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod.* 2008; 23: 160–167.
- Livshyts 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. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26(1): 29–34.
- Lledo B, Guerrero J, Turienzo A, Ortiz JA, Morales R, Ten J, Llacer J, Bernabeu R. Effect of follicle-stimulating hormone receptor N680S polymorphism on the efficacy of follicle-stimulating hormone stimulation on donor ovarian response. *Pharmacogenet Genomics.* 2013; 23(5): 262–268.
- Lledo B, Ortiz JA, Llacer J, Bernabeu R. Pharmacogenetics of ovarian response. *Pharmacogenomics.* 2014; 15(6): 885–893.
- Lledo B, Turienzo A, Ortiz JA, Morales R, Ten J, Llacer J, Bernabeu R. Negative effect of P72 polymorphism on p53 gene in IVF outcome in patients with repeated implantation failure and pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet.* 2014; 31(2): 169–172.
- Loutradis D, Patsoula E, Minas V, Koussidis GA, Antsaklis A, Michalas S, Makrigiannakis A. FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. *J Assist Reprod Genet.* 2006; 23(4): 177–184.
- Loutradis D, Vlismas A, Drakakis P, Antsaklis A. Pharmacogenetics in ovarian stimulation – current concepts. *Ann NY Acad Sci.* 2008; 1127: 10–19.
- Machac S, Lubusky M, Prochazka M, Streda R. Prevalence of inherited thrombophilia in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006; 150(2): 289–292.
- Mathur R, Kailasam C, Jenkins J. Review of the evidence base of strategies to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Fertil.* 2007; 10: 75–85.
- McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RV Jr, Connolly DT, Robertson DM. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet.* 1994; 344: 235–236.

- Morón FJ, de Castro F, Royo JL, Montoro L, Mira E, Sáez ME, Real LM, González A, Mañes S, Ruiz A. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) alleles predict over-response to recombinant follicle stimulation hormone and iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Pharmacogenet Genomics*. 2006; 16(7): 485–495.
- Mutsatsa S, Currid TJ. Pharmacogenetics: a reality or misplaced optimism? *J Psychiatr Ment Health Nurs*. 2012; 20(4): 314–320.
- Navot D, Bergh PA, Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril*. 1992; 58: 249–261.
- Navot D, Relou A, Birkenfield A, Rabinowitz R, Brzezinski A, Margalioth EJ. Risk factors and prognostic variables in the ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1988; 159: 210–215.
- Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M, Mitchell P, Ambrose P, Fleming R. Anti- Mullerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod*. 2009; 24: 867–875.
- Nouri K, Haslinger P, Szabo L, Sator M, Schreiber M, Schneeberger C, Pietrowski D. Polymorphisms of VEGF and VEGF receptors are associated with the occurrence of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS)—a retrospective case–control study. *Journal of Ovarian Research*. 2014; 7: 54.
- O'Brien TJ, Kalmin MM, Harralson AF, Clark AM, Gindoff I, Simmens SJ, Frankfurter D, Gindoff P. Association between the luteinizing hormone/ chorionic gonadotropin receptor (LHCGR) rs4073366 polymorphism and ovarian hyperstimulation syndrome during controlled ovarian hyperstimulation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013; 11(1): 71.
- O'Brien TJ, Harralson AF, Tran T, Gindoff I, Orkunoglu-Suer FE, Frankfurter D, Gindoff P. Kinase insert domain receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR) genetic variation is associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014; 12: 36.
- Oehninger S. Ovulation induction in IVF. *Minerva Ginecol*. 2011; 63: 137–156.
- Ortega N, L'f aqih F-E, Plouet J. Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell*. 1998; 90: 381–390.
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. 1994; 269(41): 25646–25654.

- Pau E, Alonso-Muriel I, Gómez R, Novella E, Ruiz A, García- Velasco JA, Simón C, Pellicer A. Plasma levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 may determine the onset of early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 2006; 21: 1453–1460.
- Pauli SA, Tang H, Wang J, Bohlen P, Posser R, Hartman T, Sauer MV, Kitajewski J, Zimmermann RC. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. *Endocrinology.* 2005; 146: 1301–1311.
- Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 3365–3369.
- Popovici RM, Irwin JC, Giaccia AJ, Giudice LC. Hypoxia and cAMP stimulate vascular endothelial growth factor (VEGF) in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation and endometrial regeneration. *J Clin Endocrinol metab.* 1999; 84(6): 2245-2248.
- Rizk B. Prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: the Cominandments. Presented at the 1993 European Society of Human Reproduction and Embryology Symposium, Tel Aviv, Israel, 1993; 1-2.
- Rosenbluth EM, van Voorhis BJ. Evolving role of assisted reproductive technologies. *Clin Obstet Gynecol.* 2011; 54(4): 734–745.
- Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* 2006; 580: 2879-2887.
- Ruiz-Sanz JI, Aurrekoetxea I, Matorras R, Ruiz-Larrea MB. Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2011; 95(5): 1601–1605.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; 219: 983-985.
- Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 1986; 46(11): 5629- 5632.
- Sheikhha MH, Eftekhari M, Kalantar SM. Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation. *J Hum Reprod Sci.* 2011; 4: 86–90.
- Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, Borden L, Connolly D, Stern D, Kao J. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial


- growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood*. 1993; 81(10): 2767-2773.
- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane M, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression by of a novel human receptor type tyrosine kinase gene closely related to the *fms* family. *Oncogene*. 1990; 5: 519-524.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev*. 1997; 18: 739–773.
- 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.
- Soker S, Takashima S, Miao H, Neufeld G, Klagsbrun M. Neurophilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells and an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998; 92: 735-745.
- Sondel M, Lounberg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci*. 1999; 19: 5731-5740
- Speroff L, Fritz MA. Infertilite. Erk A, Günalp S. Editörler, Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite, 7. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi. 2007; 386, 489, 1027, 1028, 1198, 1217.
- Steffensen KD, Waldstrøm M, Brandslund I, Jakobsen A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2010; 117: 109–116.
- 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*. 2006; 8: 893–899.
- 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(10): 893–899.
- Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod*. 2011; 26: 1768–1774.
- Tammela T, Enblom B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*. 2005; 65: 550-563.

- Terman BI, Dougher VM, Maglione D, Lassam N.J, Gasporadowicz D, and Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase a reseptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 187: 1579-1586.
- Thaler CJ, Budiman H, Ruebsamen H, Nagel D, Lohse P. Effects of the common 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene on ovarian responsiveness to recombinant follicle-stimulating hormone. *Am J Reprod Immunol.* 2006; 55(4): 251–258.
- Thomas KA. VEGF, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chemistry.* 1996; 271: 603-606.
- Twigt JM, Hammiche F, Sinclair KD, Beckers NG, Visser JA, Lindemans J, de Jong FH, Laven JS, Steegers-Theunissen RP. Preconception folic acid use modulates estradiol and follicular responses to ovarian stimulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(2): 322–329.
- Vogel F. Moderne probleme der humangenetik. *Ergeh Inn Med Kinderheild.* 1959; 12: 52-125.
- Wang TT, Wu YT, Dong MY, Sheng JZ, Leung PC, Huang HF. G546A polymorphism of growth differentiation factor-9 contributes to the poor outcome of ovarian stimulation in women with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2010; 94(6): 2490–2492.
- Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, Qin Q, Zhao B, Yang Y, Hui R. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 760–767.
- Watson JM, Sensintaffar FL, Berek JS, Martinez-Maza O. Constitutive production of IL-6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures. *Cancer Res.* 1990; 50: 6959-6965.
- Wulff C, Wilson H, Rudge JS, Wiegand SJ, Lunn SF, Fraser HM. Luteal angiogenesis: prevention and intervention by treatment with vascular endothelial growth factor trap (A40). *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 3377–3386.
- Xita N, Lazaros L, Georgiou I, Tsatsoulis A. CYP19 gene: a genetic modifier of polycystic ovary syndrome phenotype. *Fertil Steril.* 2010; 94(1): 250–254.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000; 407: 242-8.
- Yao Y, Ma CH, Tang HL, Hu YF. Influence of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn polymorphism on ovarian function and in vitro fertilization outcome: a meta-analysis. *Mol Genet Metab.* 2011; 103: 388–393.

- Yoshida Y, Yamashita Y, Saito N, Ono Y, Yamamoto H, Nakamura Y, Hayashi A, Terai Y, Ohmichi M. Analyzing the possible involvement of anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone receptor II single nucleotide polymorphism in infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2014; 31(2): 163–168.
- Zachary I. Molecules in focus VEGF. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30: 1169-1174.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. 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.
- Zhang W, Sun K, Zhen Y, Wang D, Wang Y, Chen J, Xu J, Hu FB, Hui R. VEGF receptor-2 variants are associated with susceptibility to stroke and recurrence. *Stroke.* 2009; 40: 2720–2726.
- Zhao ZZ, Nyholt DR, Thomas S, Treloar SA, Montgomery GW. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of familial endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2008; 14: 531–538.
- Zimmermann RC, Hartman T, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. *Microvasc Res.* 2001; 62: 15–25.
- Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest.* 2003; 112: 659–669.

EKLER

Ek 1: Etik kurul onay belgesi




T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/ *106* 15.04.2015

Sayın Öğr.Gör.Dr.Şengül TURAL

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Yardımcı Üreme Tekniklerinde FSHR ve VEGFR Gen Mutasyonlarının Ovaryen Cevaba Etkisi** başlıklı OMÜ KAЕК 2015/157 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.



Doç.Dr.Emine ŞENTUNÇ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başkan Yrd.

Ondokuz mayıs Üniversitesi Tıp Fak. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Tel:(0362)3121919/2782 -4576007 Omutaek@gmail.com
Hastane içi 1.Kat (Özel servis karşısı) Atakum/SAMSUN

Ek 2: Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

İLAÇ DIŞI GİRİŐİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ *

ARASTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

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

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağının çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız 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 aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla 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 ulaşılamazken 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 basınç yapması hatta hayati önem arzeden sonuçlara yol açabilmektedir. Tüp Bebek Yardımcı Üreme Teknikleri ie tedavide *LH* (LütleinleştiriciHormon) Reseptör ve *ESR*(Estrogen Reseptör) GenlerindeMaydana Gelen Genetik Değişimlerin etkisi ile ilacın etkisinin kişiden kişiye farklılık göstermesi ve aynı dozun farklı kalitede yumurta oluŐturmasındaki 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 İŐLEMLERİ:

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 2 (devam): Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

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.

ÇALIŞMAYA 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

ÇALIŞMAYA 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 herhangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIŞMAYA 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 ödetilmeyecektir. 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 anahtarları 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 yayınlanabilir, 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 2 (devam): Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

İLAÇ DIŞI GİRİŐİMSSEL 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 görüŐtünüz.

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 ULAŐILABİLECEK KİŞİLER:

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

CALISIMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR: Varsa açıklayınız

YENİ BİLGİLER CALISIMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmıŐ 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 araŐtırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araŐtırmacı 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 İŐlemine 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.**

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Işıl ÇAKIR

Doğum Yeri : Samsun

Doğum Tarihi : 10.09.1992

Medeni Hali : Bekar

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce, Almanca

Eğitim Durumu:

1998-2006 Alparslan İlköğretim Okulu- Mustafa Kemal İlköğretim Okulu

2006-2010 Çarşamba Anadolu Lisesi

2010-2014 Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

2014- Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

E-posta : isilcakil0@gmail.com