



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İN VİTRO FERTİLİZASYON UYGULAMASINDA BAŞARISIZ
OLUNAN OLGULARDA *LHβ* GENİ EXON 3
MUTASYONLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elvan YILMAZ

**Samsun
Temmuz-2016**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İN VİTRO FERTİLİZASYON UYGULAMASINDA BAŞARISIZ
OLUNAN OLGULARDA *LHβ* GENİ EXON 3
MUTASYONLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elvan YILMAZ

Danışman

Öğr. Gör. Dr. Şengül TURAL

**Samsun
Temmuz-2016**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Elvan YILMAZ tarafından Öğr. Gör. Dr. Şengül TURAL danışmanlığında hazırlanan IVF Uygulamasında Başarısız Olunan Olgularda *LHβ* Geni Exon 3 Mutasyonlarının İncelenmesi başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 12 /07 /2016 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Davut GÜVEN (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Üye : Öğr. Gör. Dr. Şengül TURAL (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serbülen YİĞİT (Gaziosmanpaşa 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 eğitimimde bilgi ve deneyimleri ile beni yetiştiren, tezimi yapmamda bana yardımcı olan, karşılaştığım sorunların çözümünde ve eğitimim dışında bana her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Öğr. Gör. Dr. Şengül TURAL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca çalışma ortaklığı yaptığımız, karşılaştığım sorunların çözümünde bilgisini, deneyimlerini ve yardımlarını esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisi Tüp Bebek Merkezi sorumlusu sayın Doç. Dr. Davut GÜVEN'e ve çalışma arkadaşlarına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgileri ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Nurten KARA hocama, yüksek lisans eğitimime bilgileri ile katkı yapan ve her zaman destek olan OMÜ Tıbbi Biyoloji öğretim üyelerine çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca her zaman bilgi alışverişi yaptığım ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yük. Lis. Öğr. Işıl ÇAKIR ve Gülhan ORHAN ÇAYCI'ya teşekkür ederim.

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

Bu araştırma, PYO. TIP.1904.15.027 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

IVF UYGULAMASINDA BAŞARISIZ OLUNAN OLGULARDA *LHβ* GENİ EXON 3 MUTASYONLARININ İNCELENMESİ

Amaç: Çalışmamızda yardımcı üreme teknikleri ile tedavisi başarılı sonuçlanmayan olgularda *LH* (Lüteinleştirici Hormon) geni β alt ünitesinde meydana gelen genetik değişimlerin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum servisi Tüp Bebek Merkezinde infertilite tanısı konularak yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören ve başarılı sonuç elde edilemeyen 29 kadın hasta ve sağlıklı gebelik elde edilen 30 kadın kontrol olmak üzere toplam 59 kişiden kan alındı. Kan örneklerinden DNA izolasyonu ile DNA elde edildikten sonra PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılarak ilgili genlerde yeni nesil DNA dizileme yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlar SPSS ve Ki-kare analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: *LHβ* geni ekzon 3 bölgesinin yeni nesil DNA dizilemesi sonucunda, rs1056917 ve rs149579838 mutant bölgeleri hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Bununla birlikte hastaların klinik bulgularına göre genotip dağılımlarına bakıldığında, rs149579838 bölgesi GG genotipi ($p=0,04$, $\chi^2=6,381$) ve rs1056917 bölgesi AG genotipi ($p=0,03$, $\chi^2=6,75$) primer infertil olgularda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak saptandı.

Sonuç: Çalışmamızın sonucuna göre, yardımcı üreme tedavisi sürecinde *LHβ* geni rs149579838 mutant bölgesi bakımında GG genotipine sahip bireylerin ve *LHβ* geni rs1056917 bölgesi bakımında AG genotipine sahip bireylerin primer infertilite açısından risk grubunda olduğu saptandı. Sonuçların daha büyük ve farklı populasyonlarda doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gen mutasyonu; infertilite; *LH* geni; ovulasyon

Elvan YILMAZ, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Temmuz-2016

ABSTRACT

EVALUATION OF *LHβ* GENE EXON 3 MUTATIONS IN FAILED IVF PATIENTS

Aim: We aimed to evaluate the effect of *LHβ* gene variants on the cases of failed IVF during assisted reproductive techniques.

Material and Method: We evaluated 29 cases have failed IVF treatment in Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, IVF Center and 30 cases have healthy pregnancy. DNA isolated from all the cases and *LHβ* gene analysed by next generation DNA sequencing method. SPSS and Chi-Square analysis performed statistical analysis.

Results: As a result of the study, there is no statistical significant difference between patients and control groups for *LHβ* gene exon 3 rs1056917 and rs149579838 ($p>0.05$). When we investigate clinical findings according to the genotype, we found that, GG genotype of rs149579838 ($p=0.04$, $\chi^2=6.381$) and AG genotype of rs1056917 ($p=0.03$, $\chi^2=6.75$) was high in primary infertile cases.

Conclusion: Our results suggest that women have GG genotype for rs149579838 and AG genotype for rs1056917 are under risk for primary infertility. These results should be confirmed by other researches groups.

Keywords: Gene mutation; infertility; *LH* gene; ovulation

Elvan YILMAZ, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, July-2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|--------------|--|
| AFS | : Amerikan Fertility Society |
| ART | : Yardımcı Üreme Teknikleri |
| ATM | : Amplicon Tagment Mix |
| Bp | : Baz Çifti |
| cAMP | : Siklik Adenozin Mono Fosfat |
| COH | : Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon |
| Da | : Dalton |
| DNA | : Deoksiribo Nükleik Asit |
| E2 | : Östrojen Hormonu |
| EDTA | : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit |
| ET | : Embriyo Transferi |
| FSH | : Folikül Uyarıcı Hormon |
| GnRH | : Gonadotropin Salıverme Hormonu |
| GtH | : Gonadotropin Hormon |
| hCG | : İnsan Koryonik Gonadotropin |
| hLHR | : İnsan Lüteinize Hormon Reseptörü |
| IGV | : Integrative Genomics Viewer |
| IUI | : İn Utero İnseminasyon |
| IVF | : İn Vitro Fertilizasyon |
| Kbp | : Kilobaz Çifti |
| LH | : Lüteinize Hormon |
| LHCGR | : Lüteinize Hormon / Koryonik Gonadotropin Reseptörü |
| LHR | : Lüteinize Hormon Reseptörü |
| LNA1 | : Library Normalization Additives 1 |

| | |
|--------------|---|
| LNB1 | : Library Normalization Beads 1 |
| LNS1 | : Library Normalization Storage Buffer 1 |
| LNW1 | : Library Normalization Wash 1 |
| NPM | : Nextera PCR Master Mix |
| NT | : Neutralize Tagment Buffer |
| OHSS | : Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu |
| PAL | : Pooled Amplicon Library |
| PCR | : Polymerase Chain Reaction |
| PIP | : Fosfoditil İnositol Fosfat |
| RSB | : Resuspension Buffer |
| SGP | : Storage Plate |
| SNP's | : Tek Nükleotit Polimorfizmleri |
| TD | : Taqment DNA Buffer |
| TSH | : Tirotropik Hormon (Tiroid Uyarıcı Hormon) |
| USG | : Ultrasonografi |

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | vi |
| İÇİNDEKİLER | viii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. İnfertilite ve Neden Olan Faktörler | 3 |
| 2.2. Kadınlarda İnfertilite Nedenleri | 4 |
| 2.2.1. Ovulatuvar Bozukluklar | 4 |
| 2.2.2. Tubal/Peritoneal Faktörler | 6 |
| 2.2.3. Servikal ve İmmünolojik İnfertilite..... | 7 |
| 2.2.4. Diğer Nedenler..... | 7 |
| 2.3. Kadın İnfertilitesinde Genetik Köken..... | 8 |
| 2.3.1. İnfertilite Sebebi Olarak Tek Gen Defektleri | 8 |
| 2.3.2. Hipofiz Bezinden LH Salgılanması | 9 |
| 2.4. Lüteinize Hormon Reseptör (<i>LHR</i>) Geni..... | 9 |
| 2.4.1. <i>LHR</i> Yapısı ve Sinyal Özellikleri | 10 |
| 2.4.2. <i>hLHR</i> 'nin Aktif Mutasyonları: Belirlenmesi ve Klinik Kullanımı | 12 |
| 2.4.3. Aktif <i>hLHR</i> Mutasyonlarının Moleküler ve Hücresel Mekanizmaları..... | 14 |
| 2.4.4. <i>hLHR</i> 'nin İnaktif Mutasyonları : Belirlenmesi ve Klinik Kullanımı | 14 |
| 2.4.5. İnaktif <i>hLHR</i> Mutasyonlarının Moleküler ve Hücresel Mekanizmaları | 16 |
| 2.5. İnsanlarda Lüteinleştirici Hormon (<i>LH</i>) Geni | 17 |
| 2.5.1. Yaygın α Alfa Ünite..... | 18 |
| 2.5.2. <i>LH</i> β Alt Ünite | 19 |
| 2.5.3. <i>LHβ</i> Gen Mutasyonları | 19 |
| 3. MATERYAL VE METOT | 23 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 23 |
| 3.2. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler | 24 |
| 3.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması | 24 |
| 3.4. DNA İzolasyon Yöntemi | 25 |
| 3.4.1. Hazırlık | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.2. Liziz | 25 |
| 3.4.3. DNA Bağlanma..... | 25 |
| 3.4.4. Yıkama..... | 25 |
| 3.4.5. Elüsyon | 25 |
| 3.5. DNA Miktarının Tayini..... | 26 |
| 3.6. <i>LHβ</i> Geni Exon 3 Bölgesi PCR Amplifikasyonu | 26 |
| 3.7. Agaroz Jelin Hazırlanması | 26 |
| 3.8. Yeni Nesil DNA Dizi Analizi (Nextera XT DNA Kütüphanesi Hazırlama)..... | 26 |
| 3.8.1. Taqment Genomik DNA | 27 |
| 3.8.2. Kütüphaneyi Çoğaltma..... | 27 |
| 3.8.3. Kütüphane Yıkaması (Clean Up)..... | 28 |
| 3.8.4. Kütüphanelerin Kontrolü | 29 |
| 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 Grubunun Demografik Karakterlerinin İstatistiki Değerlendirilmesi..... | 34 |
| 4.2. Kontrol Grubunun İstatistiksel Değerlendirilmesi | 35 |
| 4.3. <i>LHβ</i> Geni Exon 3 Bölgesi Yeni Nesil Dizi Analizi Sonuçları..... | 35 |
| 5. TARTIŞMA..... | 40 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 43 |
| KAYNAKLAR | 44 |
| EKLER | 53 |
| ÖZGEÇMİŞ | 57 |

1. GİRİŞ

İnfertilite, çiftlerin korunma olmadan bir yıllık düzenli cinsel ilişkilerine rağmen gebe kalınmaması durumudur (Kişnişçi ve ark., 1996).

Sağlıklı bir çiftin normal olarak aylık her ovulatuvar siklusta gebe kalma şansı %25'tir. Bu gebelik şansı üç ay için %57, altı ay için %72, on iki ay için %85, yirmi dört ay için %93 olarak kabul edilmektedir. İnfertilitenin sebepleri ve görülme sıklığı toplumdan topluma farklılık göstermektedir (Speroff ve ark., 2007). Kadınlarda 20-25 yaşlarında fertilitate pik yapar, 35 yaşından sonra kaliteli oosit üretimi azalırken 40 yaşından sonra minimum olur. Erkeklerde ise 20-30 yaşlarında fertilitate pik yapar, 40 yaşından sonra çok az azalır ve ileriki yaşlarda devam eder (Forti ve Krausz, 1998; Hugues ve ark., 2002).

İnfertilitede rol oynayan faktörler; ovulatuvar bozukluk, tubal-peritoneal patolojiler, uterin patolojileri, erkek bireyden kaynaklanan sebepler ve geri kalanı ise nedeni açıklanamayan infertilitedir. Bu faktörlerin sıklığı yaşla birlikte değişir. Ovulasyon bozukluklarına genç kadınlarda daha sık rastlanırken, tubal- peritoneal patolojiler gençlerde ve yaşlılarda eşit sıklıkta görülür. Yaşlı çiftlerde ise erkek birey faktörü ve açıklanamayan infertilite daha sık görülmektedir (Miller ve ark., 1999).

İnfertilite oranlarının büyümesiyle çiftlerin infertilite sorununu çözmek ve daha fazla tedavi seçenekleri sunmak için yardımcı üreme teknikleri (ART= Assisted Reproductive Techniques) geliştirilmiştir. Hastanın yaşı, infertilite etyolojisi ve süresi gibi faktörler göz önüne alınarak çiftlere çözüm olabilecek, çiftler ve uygulamayı yapacak olan ekip için ekonomik olarak en avantajlı, daha etkili ve zararı daha az protokollerin geliştirilmesiyle infertilite tedavisi faydalı olacaktır. ART'nin ilerlemesine rağmen başlatılan ART döngüsü başına gebelik oranları hala % 30 civarındadır (Speroff ve ark., 2007). İn Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İn Utero İnseminasyon (IUI=aşılama) sık kullanılan yardımcı üreme tekniklerindedir. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) tedavisinin en zor problemlerinden birisi; kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (COH) yanıtının düşükle yüksek arasında değişmesiyle IVF başarısızlığına ya da ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) ile ilgili komplikasyonlara yol açmasıdır. Yumurtalık uyarılmasının olmaması, laboratuvar kültür koşullarının optimum dışında olması, embriyo transferi (ET) teknikleri gibi çoğu farklı faktör implantasyon

başarısızlığına sebep olabilir. Bu eksojen faktörlerden başka yaş, over rezervi ve hormonal durum ART'nin başarısını belirlemek için önemlidir (Verberg ve ark., 2009).

Yumurtalık uyarılmasına yanıtın normal, düşük ya da yüksek olmasının farklı tanımlamaları vardır. Bu tanımlamaların çoğu oosit sayısı ile ilişkilidir. Bu durum hastalarda aynı uyarılma protokolünün kullanılmasıyla ovaryan cevabın değerlendirilmesi gerektiğini göstermiştir (Verberg ve ark., 2009). Bir ovaryan uyarılmaya yanıt protokolünde, 15 oositten fazlası uyarılmaya yüksek yanıt olarak kabul edilirken 4 oositten daha azı uyarılmaya düşük yanıt olarak kabul edilir ve aradaki herhangi bir oosit sayısı normal uyarılma olarak isimlendirilir (Yong ve ark.,2003; Out ve ark., 2004).

Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH), gonadal fonksiyonları ve menstrual döngüyü düzenleyen glikoprotein hormon ailesinin 2 üyesidir. FSH ve LH; α alt birimleri her ikisinde ortak ve β alt birimi tek olan $\alpha:\beta$ heterodimerleridir (Themmen, 2005). LH yumurtalık foliküllerinin olgunlaşması ve ovulasyonda merkezi rol oynar ve bu nedenle önemlidir. FSH ve LH'nin etkisi onların reseptörleri tarafından uygulanır. Son zamanlarda bunların reseptörlerinde ve reseptör genlerindeki genetik çeşitlilik, ovaryan uyarılmaya yanıtta ve ART döngüsü sonuçlarında önemli bir belirteç olarak düşünülmüştür (Perez ve ark., 2000; Jun ve ark., 2006; Alviggi ve ark., 2009).

Tek nükleotit polimorfizmleri (SNPs), infertilite gibi kompleks düzensizlikler için aday genlerin genetik birliği olarak gösterilebilen ve insan genomunun nispeten yeni belirteçleridir. Çalışmaların çoğu FSH reseptörü üzerine odaklanmıştır ve FSH reseptör polimorfizminin ovaryan uyarılmaya yanıtla ilişkili olduğu görülmüştür (Loutradis ve ark., 2006; Achrekar ve ark., 2009; Sheikhha ve ark., 2011).

Çalışmamızdaki amacımız Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum servisinde infertilite tanısı konularak yardımcı üreme teknikleri ile tedavi uygulanan fakat başarılı sonuç alınamayan kadın hasta grubu ile sağlıklı gebelik geçiren kadın kontrol grubunda *LH β* genindeki varyantların etkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

İnfertilite, korunmasız bir yıllık düzenli cinsel ilişki sonrasındaki gebelik başarısızlığına denir. Hiç çocuk sahibi olmayanlara primer infertil, daha önce gebelik yaşamış fakat şu an gebelik başarısızlığı olanlara sekonder infertil denir. (Uehara ve ark., 2001). İnfertiliteli çiftlerin % 30-40'ında erkek bireyden kaynaklı faktörler, % 40-50'sinde ise kadın bireyden kaynaklı faktörler sorumludur. Çiftlerin % 10-15'inde ise günümüzdeki mevcut standart tanınan testler ile açıklanamayan infertilite mevcuttur (Shoham ve ark., 1991). İnfertilite hormonal sebeplere bağlı olabileceği gibi yaş, egzersiz, obezite ya da enfeksiyon hastalıkları ile de ilişkili olabilir (Uehara ve ark., 2001).

2.1. İnfertilite ve Neden Olan Faktörler

İnfertilitede rol oynayan faktörler; ovulatuvar bozukluk, tubal-peritoneal patolojiler, uterin patolojileri, erkek bireyden kaynaklanan sebepler ve nedeni açıklanamayan infertilite olarak Tablo 1' deki gibi ayrılmıştır. Bu faktörlerin sıklığı yaşla birlikte değişmektedir. Ovulasyon bozukluklarına genç kadınlarda daha sık rastlanırken tubal-peritoneal patolojilere gençlerde ve yaşlılarda eşit sıklıkta rastlanır. Yaşlı çiftlerde ise erkek birey faktörü ve açıklanamayan infertilite daha sık görülmektedir (Miller ve ark., 1999).

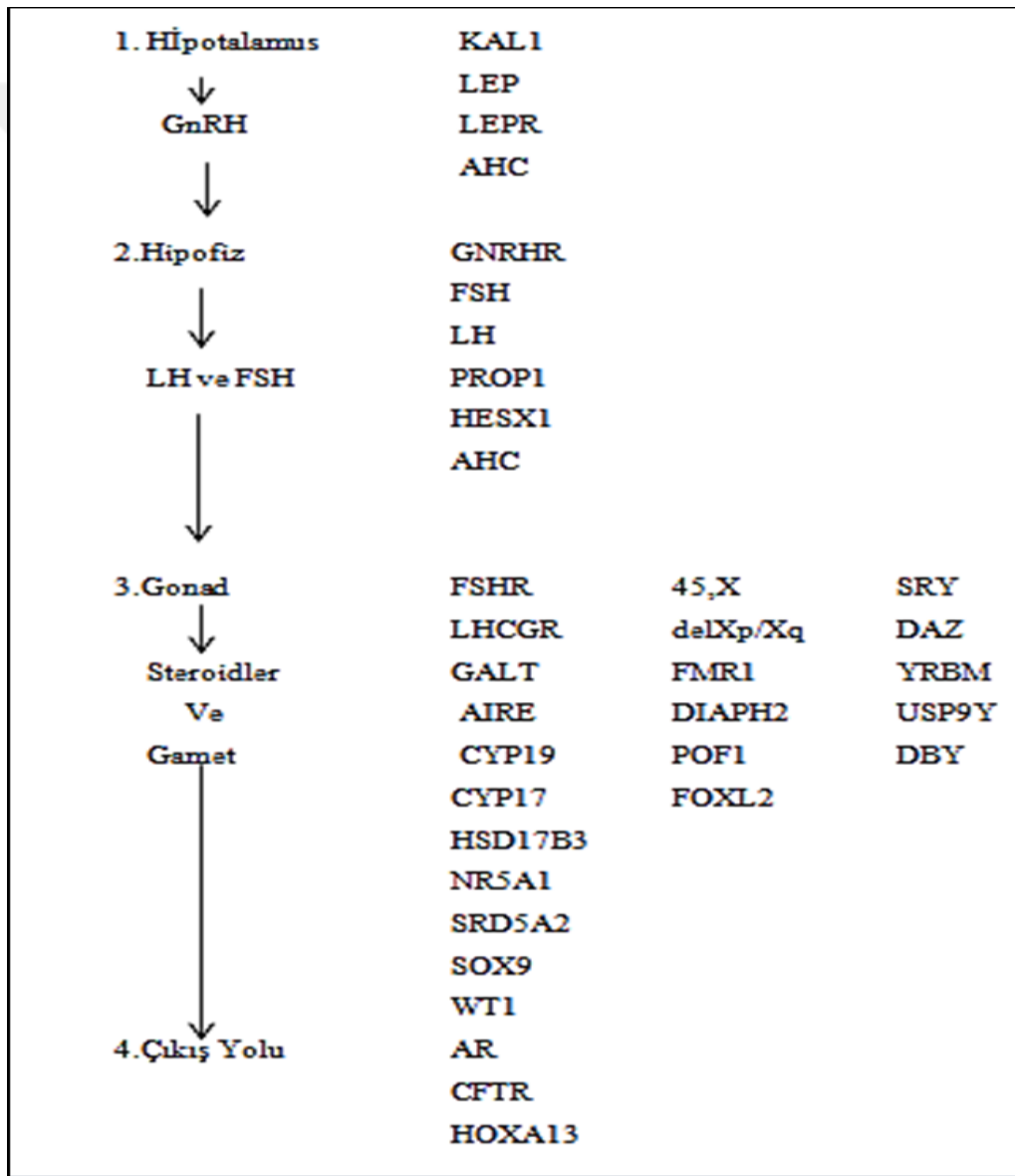
Tablo 1. İnfertilite nedenleri (Miller ve ark., 1999)

| | |
|----------|--|
| 1 | Kadın bireye ait nedenler (% 40-45) |
| | Ovulatuvar Bozukluk (% 30-40) |
| | Tubal/Peritoneal Faktör (% 20-40) |
| | Servikal ve İmmünolojik Faktörler (% 1-2) |
| | Diğer |
| 2 | Erkek bireye ait nedenler (% 30-40) |
| 3 | Açıklanamayan (% 10-15) |

2.2. Kadınlarda İnfertilite Nedenleri

2.2.1. Ovulatuvar Bozukluklar

Kadın etkili infertilitenin %30-40'mını ovulatuvar bozukluklar oluşturmaktadır. Ovulatuvar bozuklukların belirtileri arasında anovulasyon, amenore ve adet düzensizlikleri vardır. Şekil 1' de gösterildiği gibi ovulasyon sağlanması için hipotalamus, hipofiz ve over aksının düzenli çalışması gerekir. Bu aksın herhangi bir aşamasındaki bozukluk sonucu anovulasyon oluşabilir. Anovulasyonun tipine göre tedavi protokolleri değişmektedir.



Şekil 1. Hipotalamus, Hipofiz ve Over Aksı (Layman, 2002'dan uyarlanmıştır)

Ovulasyonun belirlenmesi için çeşitli yöntemler tercih edilebilir:

a) Hikaye: 21-35 günde bir düzenli adet görmek ve adet öncesi göğüslerde şişkinlik, hassasiyet, dismenore gibi premenstrüel ve menstrüel semptomların görülmesi olası bir ovulasyonun belirtileridir.

b) LH Monitorizasyonu: LH yükselmeye başladıktan 34-36 saat sonra, LH pikinden 10-12 saat sonra ovulasyon gerçekleşir. Böylece LH seviyesinin tespiti ile ovulasyon hakkında bilgi edinilebilir.

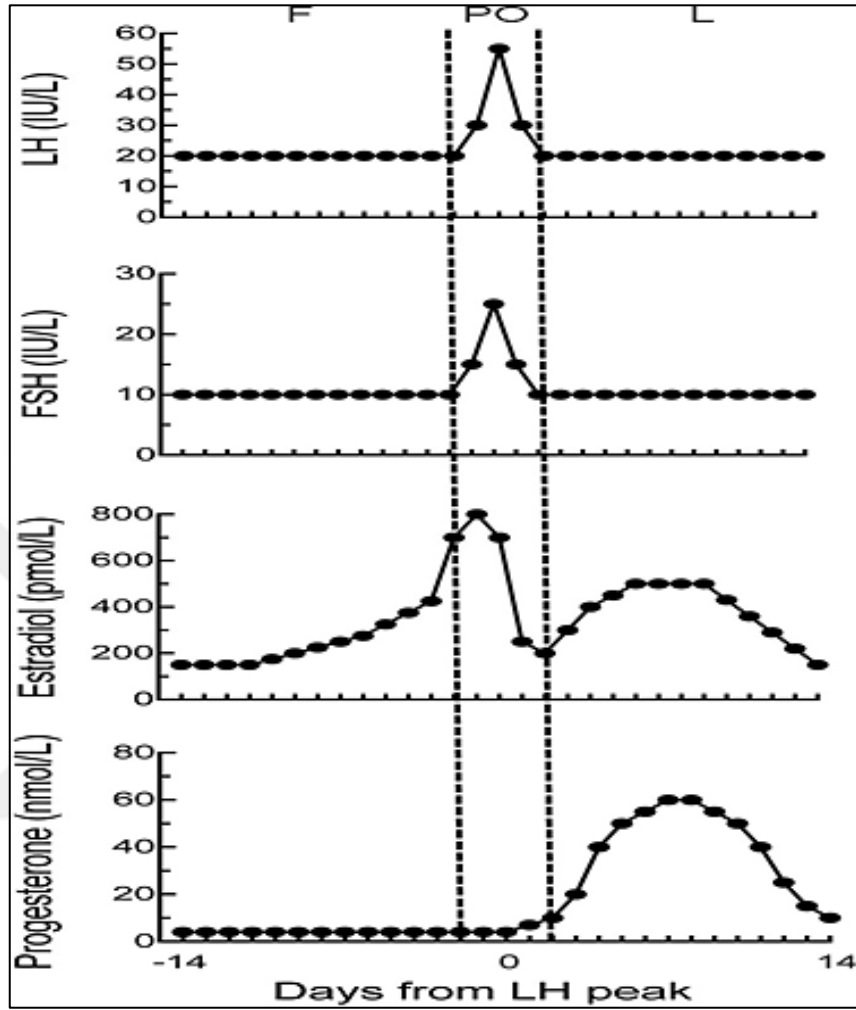
c) Bazal Vücut Isısı Ölçümü: Siklusun ilk gününden itibaren her sabah aynı saatte yataktan kalkmadan vücut ısısı ölçülür ve bazal vücut ısısı kartına not edilir. Preovulatuvar dönemde vücut ısısı normaldir ve 36,5 °C civarındadır. Ovulasyondan sonra progesteron hormon sentezinin artması ve progesteronun termojenik etkisiyle vücut ısısında 0,2-0,3 °C artış gözlenir. Luteal fazda en az 10 gün süren artış vardır.

d) Midluteal Serum Progesteron Ölçümü: Ovulasyondan sonra korpus luteum oluşmasıyla birlikte granuloza hücreleri lüteinize olur ve progesteron salgılanır. Bu nedenle serum progesteron düzeyinin yükselmesi dolaylı olarak ovulasyonu işaret eder. Midluteal dönemde sekresyon pik yaptığı için progesteron ölçümü bu evrede yapılmalıdır (Berek ve ark., 1998). Serum progesteronunun 3 ng/ml nin üstünde olması ovulasyonun göstergesidir. Luteal faz yetmezliği tanısında ovulasyondan sonraki 5-9. günler arasında 3 kez progesteron ölçümü yapılır. 3 ölçümün toplamı 30 ng/ml ya da tek ölçümde 10 ng/ml ise luteal faz yetmezliği yoktur (Jordan ve ark., 1994). Ovaryan siklus sırasındaki FSH, LH, östradiol ve progesteronun plazma seviyeleri Şekil 2' deki gibi gösterilmiştir. Foliküler faz regl ile başlar, 14. günden sonra ovulasyon ve LH piki oluşur. Genellikle foliküler fazın uzaması sebebi ile menstrual döngü uzar.

e) Endometrial Biyopsi: Geç luteal dönemde ve genellikle beklenen menstruasyondan 2-3 gün önce yapılır. Proliferatif endometriumun tespiti anovulasyonu gösterir. Siklus gününe göre 2 gün veya daha fazla gecikme, luteal faz yetmezliğini düşündürür (Berek ve ark., 1998).

f) Ultrasonografik Monitorizasyon: Seri ultrasonografik (USG) takip ile dominant folikül gelişimi ve ovulasyondan sonra folikülün gerilemesi izlenerek ovulasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenebilir. Menstruasyonun 3. günü transvaginal USG ile overler ve overlerde antral foliküller değerlendirilir. Siklusun 5-7.

günü seçilen dominant folikül ovulasyona kadar 1-4 mm/gün büyüme gösterir. Genellikle folikül çapı 21-23 mm olduğunda ovulasyon gerçekleşir.



Şekil 2. İnsan ovaryan siklusu sırasında LH, FSH, östradiol ve progesteronun plazma seviyeleri. Döngünün foliküler (F), periovulatuar (PO) ve luteal (L) fazları LH piki ile ilgili olarak etiketlenmiştir. Birkaç kaynağa dayanarak ortalama değerler düzeltilmiştir (Ross ve ark., 1970; Thorneycroft ve ark., 1971; Santoro ve ark., 1999; Bulun ve Adashi, 2003)

2.2.2. Tubal / Peritoneal Faktörler

Bu gruptaki düzensizlikler kadın etkili infertilitenin % 20- 40'ından sorumludur (Musich ve Behrman, 1983). Pelvik adhezyonlar, pelvik inflamatuvar hastalık, pelvik operasyonlar, ekstragenital orjinli enfeksiyonlar, genital tüberküloz, endometriozis, tubal polipler ve hidrosalpenks şeklinde tubo-peritoneal infertiliteye neden olabilecek patolojileri söyleyebiliriz.

2.2.3. Servikal ve İmmünolojik İnfertilite

Çiftlerde % 3-5 oranında görülen infertilite nedenidir. Servikal mukus yapısı hormonal etkiye bağlı olarak sperm geçişini etkiler. Östrojen mukus üretimini arttırırken progesteron baskılar (Jette ve Glass, 1972). Fertil kadınlarda oto antikor seviyesi % 1-4 olarak belirlenmişken infertil kadınlarda bu seviye % 15-45 olarak bulunmuştur (Forti ve Krausz, 1998).

2.2.4. Diğer Nedenler

a) Konjenital Uterin Anomaliler: Kadın birayde bu tür bir anomali varsa genellikle birinci ve ikinci trimestırda gebelik kaybı meydana gelir. Ayrıca blastokistin tutunduğu bölgede anomali oluşursa implantasyon da etkilenebilmektedir. Uterin anomaliler AFS'nin (Amerikan Fertility Society, 1988) sınıflandırmasına göre Klas I (Mülleryen Agenezis), Klas 2 (Unikornuat Uterus), Klas 3 (Uterus Didelphis), Klas 4 (Bikornuat Uterus), Klas 5 (Septat Uterus), Klas 6 (Arkuat Uterus), Klas 7 (DES İle İlişkili Anomaliler) olarak yedi gruba ayrılmıştır. En sık görülen ve infertiliteye sebep olan konjenital uterin malformasyon Klas 5 anomalilerdir (Septat Uterus). Böyle vakalarda gebelik kaybı oldukça fazladır. Uterin septumu olan ve tekrarlayan spontan abortusu olan kadınlarda cerrahi tedavi yapılmalıdır (Homer ve ark., 2000).

b) Edinsel Uterin Anomaliler: Edinsel uterin anomaliler olarak leiomyomlar, endometrial polipler ve intrauterin yapışıklıklardan söz edilir. Leiomyomların infertilite ile ilişkisi kesin bir şekilde ortaya konulamamıştır. Ancak uterin kontraktiliteye ve implantasyon alanında vasküler ve moleküler değişikliğe sebep olarak infertiliteye neden olabilir (Richards ve ark., 1998). Asemptomatik endometrial polip görülme sıklığının infertil kadınlarda % 10'lara kadar çıkabileceği bildirilmiştir (Shalev ve Meizner, 2000). İntrauterin yapışıklıkların (Ashermann Sendromu) en önemli nedeni kavitenin küretajı ve intrauterin enfeksiyonlardır. İntrauterin yapışıklıklar embriyo implantasyonunu engelleyebilir ve kavitedeki yapışıklığın derecesine bağlı olarak adet düzensizlikleri, amenore ve spontan düşükler görülebilir (Ismajovich ve ark., 1985).

2.3. Kadın İnfertilitesinde Genetik Köken

İnfertiliteye genetiğin katkısının belirlenmesi zordur. Yine de infertilite fenotipi spesifik genetik anomaliler ile ilişkilidir. İnfertilitenin çeşitli genetik sebepleri vardır ve kromozomal abnormalitelerini, tek gen düzensizliklerini, multifaktöriyel kalıtmımlı fenotipleri içerir. Bazı genetik faktörler özellikle erkekleri etkilerken bazı genetik faktörler ise kadın ve erkeğin her ikisini de etkiler. Örneğin kromozom translokasyonları hem kadın hem erkek infertilitesini etkileyen genetik bir etki iken Klinifelter Sendromu erkeklere spesifik bir infertilite fenotipidir (Kavita ve ark., 2003). Kompleks genetik mekanizmaların anlaşılması yavaş olurken tek gen defektleri ile ilgili bilgilerin yayılması yeni ve güçlü araştırmalardan dolayı daha hızlı olmaktadır. Araştırma metodları, aile boyu/ ikiz çalışmalarını ve bazı vakalarda etnik çalışmaları içerebilir. Genom-boyu araştırmaların artması ile hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen genlerle ilgili aday gen çalışmaları, hastalık vakaları ve kontroller arasındaki genetik çeşitlilik frekansını gösterebilir. Genom ile ilişkili çalışmalarda vaka ve kontrollerdeki yaklaşık 1 milyon tek nükleotit polimorfizminin (SNPs) frekansı karşılaştırılabilir.

2.3.1. İnfertilite Sebebi Olarak Tek Gen Defektleri

İnsan infertilitesine sebep olan genlerin tanımlanması konusunda eksiklikler vardır. İnfertil kadın ve erkeklerin çoğu normal ergenlik gelişmesi göstermesine rağmen bugüne kadar insanlarda karakterize edilmiş gen mutasyonlarının çoğu gonadal fonksiyonları etkilemekte, ergenlik başarısızlığına ve infertiliteye sebep olmaktadır. Gen mutasyonları hipotalamik, hipofiz, gonadal, çıkış yolu olmak üzere (Şekil 1) 4 farklı kategoride sınıflandırılmıştır.

Hipotalamik-hipofiz-gonadal-çıkış aksı boyunca eksprese edilen genlerin mutasyonları insanlarda ergenlik ve üreme bozukluklarına neden olur ve böylece infertilitede temel nedenlerden biridir. Tanımlanmış mutasyonlar sadece üreme bozukluklarının patofizyolojisini değil aynı zamanda normal üreme fonksiyonlarını anlamamızı sağlar. Hipotalamus (1.sınıf), gonadotropin salıverme hormonu (GnRH) içerir. GnRH, hipofizden (2. Sınıf) gonadotropin üretilmesi ve salgılanmasını kontrol eden ana düzenleyicidir. Gonadotropin hormonları FSH (Folikül Stimüle Edici Hormon) ve LH (Lüteinleştirici Hormon) dır. Bunlar sırasıyla cinsiyet steroidlerini ve gametlerin her ikisinin üretilmesi için gonadları (3. Sınıf) uyarır. Çıkış yolundan

(4. Sınıf) gametlerin çıkışı iletişimi kolaylaştırır ve sperm ile yumurtanın zigot oluşturmalarını sağlar. Bu sınıflandırma üreme prosesinin basitleştirilmiş halidir. Çünkü çok sayıda nöroendokrin faktör, gonadal peptidler ve büyüme faktörleri normal üreme sürecinde yer almaktadır (Layman, 2002).

2.3.2. Hipofiz Bezinden LH Salgılanması

LH, yumurtalık foliküllerinin olgunlaşması ve ovulasyonda merkezi rol oynar ve bu nedenle önemlidir. LH yumurtalıkta bulunan teka hücrelerine etki ederek, androjen hormon üretimini sağlar. LH, GnRH'nın uyarısıyla ön hipofizdeki gonadotropik hücrelerden pulsatil (tonik) tarzda salgılır (Ellis ve ark., 1983; Karsch ve ark., 1992). LH ile GnRH salgısı arasındaki yakın ilişki nedeniyle GnRH aynı zamanda LH serbestleştirici hormon olarak da kabul edilir.

LH, LHR olarak isimlendirilen kendi hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. İnsan koryonik gonadotropinin (hCG) de LH ile aynı reseptöre bağlanması sebebiyle LHR ayrıca LHCGR olarak isimlendirilir. Bu reseptör tekaların bakımında, foliküllerin olgunlaşmasında ve ovulasyonda kritik bir öneme sahiptir. Reseptörün yapısında genetik bir defekt varsa ilgili hormonun yada hücre içi haberci molekülün yeterince var olması durumunda bile reseptör-hormon etkileşimi gerçekleşemeyeceğinden gereken cevabın oluşmaması ya da gerekenden fazla cevap oluşumu görülebilir. (Liedo ve ark., 2014).

Bazı literatürler *LH* ve *LHR* genindeki mutasyonların, LH ve LHR' nin yapısını ve fonksiyonunu aktif veya inaktif olarak değiştirebileceğini onaylamıştır. Bu değişiklikler; amenore, hipo-östrojenizm, anovulasyon ve polikistik over sendromuna sebep olabilir (Huhtaniemi ve Themmen, 2005; Huhtaniemi ve Alevizaki, 2006). *LHR* gen varyantlarının ART sonuçları üzerinde etkisi büyük ölçüde bilinmemektedir. Fonksiyonel SNP'lerin biri LH biyoaktivitesini etkileyen *LHR* geninde tanımlanmıştır. Şimdiye kadar, *LHR* geninde reseptör aktivitesinin artışıyla bağlantılı olan 18insLeuGln, Asn291Ser ve Ser312Asn'i içeren birkaç yaygın polimorfizm tanımlanmıştır (Piersma ve ark., 2007; Simoni ve ark., 2008).

2.4. Lüteinize Hormon Reseptör (LHR) Geni

Lüteinize hormon (LH) reseptörü (LHR) öncelikle kadınların yumurtalıklarında ve erkeklerin testislerinde heptahelikal reseptör olarak

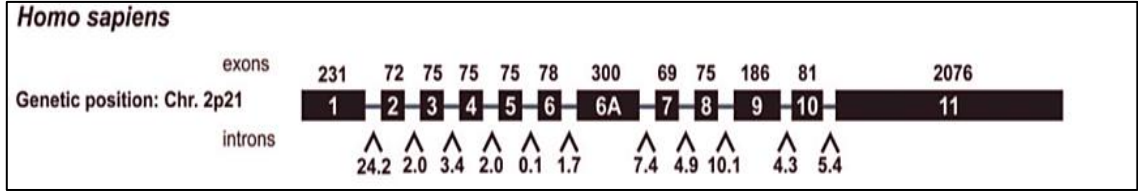
bulunmuştur. Bu reseptör ya hipofiz LH'ına ya da hemen hemen bu hormona eş plasental hCG hormonuna yüksek afiniteyle bağlanabilmektedir. Kadın ve erkeklerin her ikisinde de çocukluk yıllarında LH düzeyleri oldukça düşük kalır. Ergenliğe kadar hipotalamus-hipofiz-gonadal aksı olgunlaşır. Ergenlik sonrasında LH fonksiyonları normal üreme fonksiyonu için kritik öneme sahiptir. Postpubertal erkeklerde LH, testislerin Leydig hücrelerinden testosteron sentezini uyarır. Testosteron hormonu erkeklerde sekonder seks karakterlerinin gelişimi ve spermatogenez için gereklidir.

Gebe olmayan postpubertal kadınlarda LH çeşitli roller oynamaktadır. Ovaryan siklusun foliküler fazı sırasında LH androjen sentezi için teka hücrelerini uyarır daha sonra folikül uyarıcı hormon (FSH) etkisiyle granuloza hücrelerinde östradiol içinde aromatize edilir. Ovaryan siklusun ortasında LH dalgalanması, foliküler olgunlaşmayı ve yumurtlamayı tetikler. LH ovaryan siklusun luteal fazında ise korpus luteum oluşumunu ve progesteron sentezini uyarır. Gebe kadınlarda, plasental hCG yumurtalık luteal hücreler üzerinde LHR'ye bağlanır ve korpus luteuma sebep olur, aksi takdirde atreziye uğrar. Gebeliğin sürmesi için steroid sentezlenmesi ve muhafaza edilmesi gerekir. Gebelik sırasında fetus erkek ise plasental hCG testosteron üretmek için fetal testiküler Leydig hücrelerini uyararak dış genital organların farklılaşmasına aracılık eder ve testislerin gelişmesini uyarır (Roberts ve ark., 1999).

Açık bir şekilde görülmektedir ki LHR kadın ve erkeklerin her ikisinde de üreme fizyolojisinde kritik bir rol oynar. Normal üreme işleyişinde LHR sinyal iletim yolunun önemi insan *LHR* geninde, *hLHR*, doğal olarak meydana gelen mutasyonların son yıllarda keşfedilmesiyle daha da anlaşılmıştır.

2.4.1. LHR Yapısı ve Sinyal Özellikleri

hLHR geni Şekil 3' de gösterildiği gibi 11 ekzon ve 10 introndan oluşmuştur ve kromozom 2p21 üzerinde lokalize olmuştur (Rousseau-Merck ve ark., 1990; Segaloff ve Ascoli., 1993). Moleküler ağırlığı 85-95 KDa arasında değişen aminoasit kodlar (Troppmann ve ark., 2013).

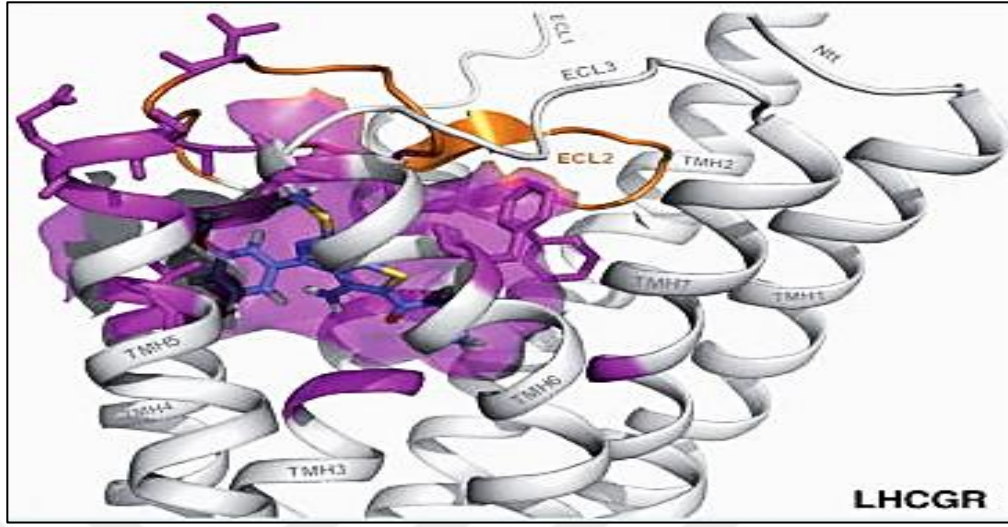


Şekil 3. *hLHR* geninin genomik organizasyonu (Gen ID: 3973). Eksonların büyüklüğü baz çifti (bp) olarak intronların büyüklüğü kilo baz çifti (kbp) olarak verilmiştir (Troppmann ve ark., 2013)

hLHR proteini yapısal olarak Şekil 4 'de gösterildiği gibi N (amino)-terminal dış domain ve C (karboksi)-terminal iç domainden oluşan bir reseptördür (Neumann ve ark., 2009). Dış domain ekson 1-10 ile 11. eksonun küçük bir kısmı tarafından kodlanır ve bu dış domain hormon bağlanmasına katılır. İç domain sinyal iletiminde önemli olan transmembran heliksi kısmını içerir ve özellikle ekson 11 tarafından kodlanır (Puett ve ark., 2005). *hLHR* geninin 1. eksonu sinyal peptidini ve N-terminalde sisteince zengin bölgeyi kodlar (Atger ve ark., 1995). Genin 11. eksonu, yedi transmembran heliksi de dahil birbiri ile bağlı 3 hücre dışı ilmek, birbiri ile bağlı 3 hücre içi ilmek ve sitoplazmik kuyruk olmak üzere reseptör proteinin tüm C-terminal kısmının yarısını kodlar. Reseptörün yarısındaki bu karboksil kısmı rodopsin gibi G-protein eşlikli reseptör süperailisinin diğer üyeleri ile homoloji gösterir. *hLHR* geninin ilk 10 eksonunun kodladığı ekstraselüler N-terminal domain muhtemelen protein-protein etkileşimleri ile ilgili olan lösin açısından zengin bir dizi tekrar motifi içerir. Transfekte olmuş hücreler birbirinden bağımsız ifade edildiğinde LHR'nin ekstraselüler domaininde bu tekrar motifleri gösterilmiştir ve tam uzunlukta reseptör gibi aynı yüksek afinite ile hCG'ye bağlanır. Reseptörün yarısındaki karboksil arasında düşük afiniteli etkileşimler olmasına rağmen reseptörün ekstraselüler N-terminal domain aracılığı ile hormona bağlanması yüksek afiniteli olmaktadır. Sonuç olarak LH'nin ya da hCG'nin LHR'ye bağlanmasına sebep olur ve heterotrimerik G proteinlerine uygun olarak aktif hale gelen ve onunla etkileşimde bulunabilecek aktif yapıda stabilize edilir.

LHR' nin kültürlenmiş hücrelerde fosfatidilinositol fosfat (PIP) üretimini uyardığı gösterilmiştir ancak bu sinyal yolunun fizyolojik önemi tartışmalıdır. Yalnızca reseptör ve hormonun her ikisi de son derece yüksek seviyelerde mevcut olduğunda PIP birikir. Buna karşılık, az ya da hiç olmayan LHR hormon birikimi tarafından Gs / adenilat siklaz / cAMP yolu birincil yolak olarak aktive edilir. G-protein eşlikli reseptör

genlerinde doğal olarak oluşan mutasyonlar, reseptör fonksiyonunun kazancı ya da kaybedilmesi şeklinde insanda hastalığa neden olabilir.



Şekil 4. LHR proteininin ekstraselüler domainleri (ECL1, ECL2 ve ECL3) ile transmembran heliks domainlerinin (TMH1, TMH2, TMH3, TMH4, TMH5, TMH6, TMH7) görüntüsü (Neumann ve ark., 2009)

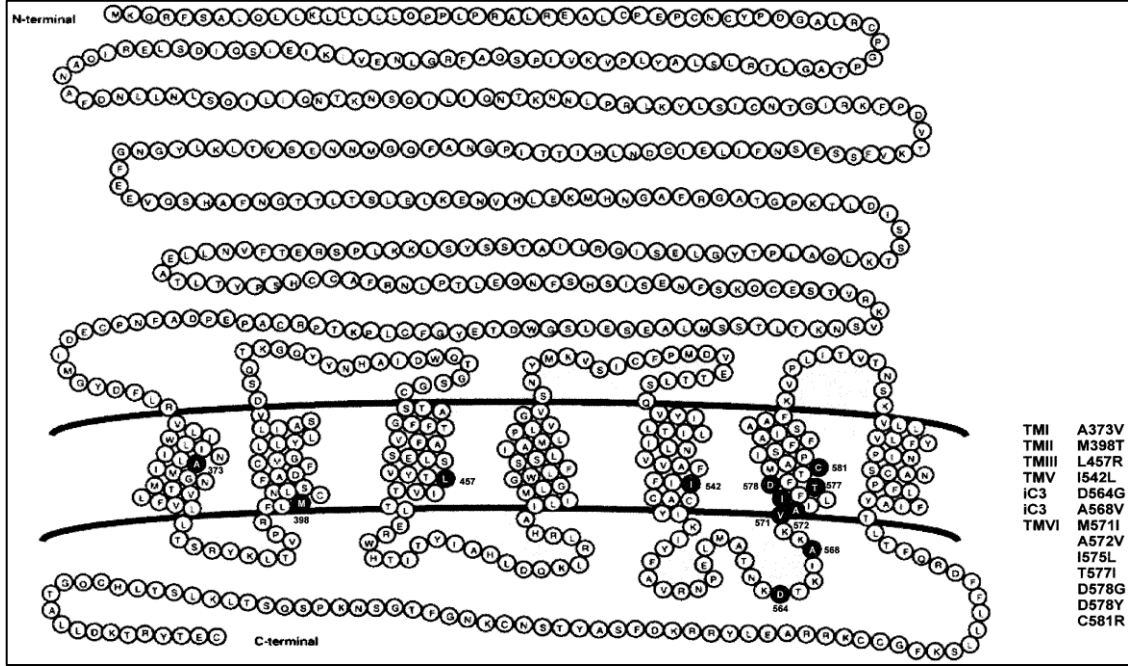
hLHR'nin genomik organizasyonu ve cDNA dizisinin aydınlatılması yapılmıştır. Spesifik üreme bozuklukları ile direkt bağlantılı olabileceğinden *hLHR* mutasyonlarının tespitinde genomik organizasyonun bilinmesi önemlidir.

2.4.2. hLHR'nin Aktif Mutasyonları: Belirlenmesi ve Klinik Kullanımı

Bugüne kadar hLHR'nin yarısındaki karboksilde bulunan ve fonksiyon kazancı ile sonuçlanan tüm yanlış eşleşme mutasyonları Şekil 5 'te gösterildiği gibi tanımlanmıştır. Bunların çoğu üçüncü hücre içi ilmekte ve altıncı transmembran sarmalda kümelenmiştir. *hLHR* geninin üçüncü hücre içi ilmek ve altıncı transmembran sarmal bölgesindeki bu fonksiyon kazancı mutasyonları yaygınlık göstermesine rağmen 11. eksonun sadece küçük bir kısmını kapsayan daha önceki çalışmaların çoğunda bu bölgeler dışında başka potansiyel mutasyonların da olabileceği açıklanmıştır.

Mutant hLHR'ler için cDNA ile transfekte edilen hücreler, agonist yokluğunda belirgin bir şekilde cAMP üretimini artırmıştır (Shenker ve ark., 1993). Yapısal olarak aktif hLHR'ler eksprese eden hücrelerde cAMP'nin bazal seviyesi, hormonunun doyma konsantrasyonuna yanıt olarak ulaşılan seviyeleri kadar büyük değildir. Yine de yapısal olarak aktif mutantlar çoğu durumda hormonal uyarılmaya daha fazla cevap verir.

Bugüne kadar hLHR'nin 13 aktif mutasyonu tanımlanmıştır. 3 durumda (Leu457Arg, Ile542Leu ve Cys581Arg) bazal cAMP üretimi yükselmiştir fakat mutant reseptörler hCG tarafından daha fazla uyarılma yanıtını engellemektedir. (Latronico ve ark., 1998; Laue ve ark., 1999a).



Şekil 5. hLHR geninin fonksiyon kazancı mutasyonları. Sporadik ya da erkek sınırlı ailesel erken ergenliğe sebep olan hLHR geninin yapısal olarak aktif mutasyonlarının pozisyonları, sistematik olarak temsili hLHR geninde gösterilmiştir (Latronico ve Segaloff, 1999)

46, XX dişi anne ya da erkek sınırlı erken ergenlikli çocukların kız kardeşleri heterozigot formlarında hLHR geninin yapısal olarak aktif mutasyonları taşımasına rağmen normal ovaryan fonksiyon gösterir. Rosenthal ve ark. (1996), ABD'de hLHR geninin yapısal olarak aktif en yaygın mutasyonun (Asp578Gly) olması nedeniyle ailesel erkek sınırlı erken ergenliğe sahip iki oğlu olan bir annenin hipofiz-gonadal aksını değerlendirmiştir. Annenin LH, FSH ve androjen salgılama dinamikleri bazal seviyede ve akut ya da kronik GnRH agonisti veya deksametason uygulanmasından sonra da bu hormon değerleri normal sınırlarda bulunmuştur. Böylece aktif hLHR mutasyonları olgun kadınlarda fonksiyonel ovaryan hiperandrojenizm nedeni olarak görünmemektedir. Çünkü yumurtalık teka hücreleri 17,20-liyaz seviyesinde steroid biyosentezinde testiküler leydig hücrelerinden daha az etkilidir ki androjen oluşumunda oran sınırlayıcı bir basamaktır (Ehrman ve ark., 1995).

2.4.3. Aktif hLHR Mutasyonlarının Moleküler ve Hücresel Mekanizmaları

Diğer G protein eşlikli reseptörler gibi, hLHR'nin aktif mutasyonları reseptör aktif halde iken stabilize olarak düşünülür. G-protein eşlikli reseptör aktivasyonu için geçerli paradigma ternary kompleksi modeline dayanır (Samama ve ark., 1993; Bond ve ark., 1995). Bu modelde kullanılmayan reseptörün inaktif (R) ve aktif (R*) konformasyonları arasında bir denge olduğu tahmin edilmektedir. Tercihen (R*)'e agonist bağlanması, aktif H-R* durumunda doğru dengenin kaymasıyla G-protein aktivasyonuna neden olur. Ayrıca R* durumunda doğru olan bir dengenin kaydırılmasıyla bunun yapılabileceği düşünülmektedir. Mutasyonlar G-protein eşlikli reseptörün liganttan bağımsız aktivasyonuna neden olur. Konstitütif olarak aktif bir R* mutantın, agonist dolu R* reseptörün durumuna yapısal olarak denk olup olmadığı araştırmalarda bir soru işaretidir. Bazı çalışmalarda konstitütif olarak aktif bir R* mutant durumunun, R ve agonist dolu R* reseptörün durumu arasındaki ara form olabileceği ayrıca birçok R* durum olabileceği ifade edilmiştir (Hjorth ve ark., 1998).

Genel bir model üzerinden G protein eşlikli reseptörler ile yapılan diğer çalışmalar, Gether ve Kobilka (1998) tarafından değerlendirilmiştir. Buna göre reseptör aktivasyonu bir ya da daha fazla heliks taşınmasını artırmayı gerektirir. G-protein etkileşimi ve aktivasyonu için spesifik bölgelerde sitoplazmik aralık açılır. Özellikle, 3. ve 4. helikslerin birbirine göre hareketinin G-protein eşlikli reseptörler için aktifleşme anahtarı olabileceği önerilmiştir (Baranski ve ark., 1999; Sheikh ve ark., 1999).

hLHR geninin aktifleşmiş mutasyonları ile ilgili bazı çalışmalarda mutasyonların interhelikal etkileşimlerde değişiklikler gösterdiği ileri sürülmüştür (Kjelsberg ve ark., 1992; Kosugi ve ark., 1996; 1997). Diğer G protein eşlikli reseptör çalışmaları reseptörün aktifleşmiş bir halinde G protein-bağlama cebinden plazma zarına yakın bölgede yan yana sitoplazmik ilmek bölgeleri oluştuğunu göstermiştir. Son zamanlarda hLHR için yapılan çalışmalar, transmembran helikslerin kendi içindeki bölgelerin, özellikle heliks 6, doğrudan Gs aktivasyonuna katılabileceğini göstermiştir (Abell ve Segaloff 1997; Abell ve ark., 1998).

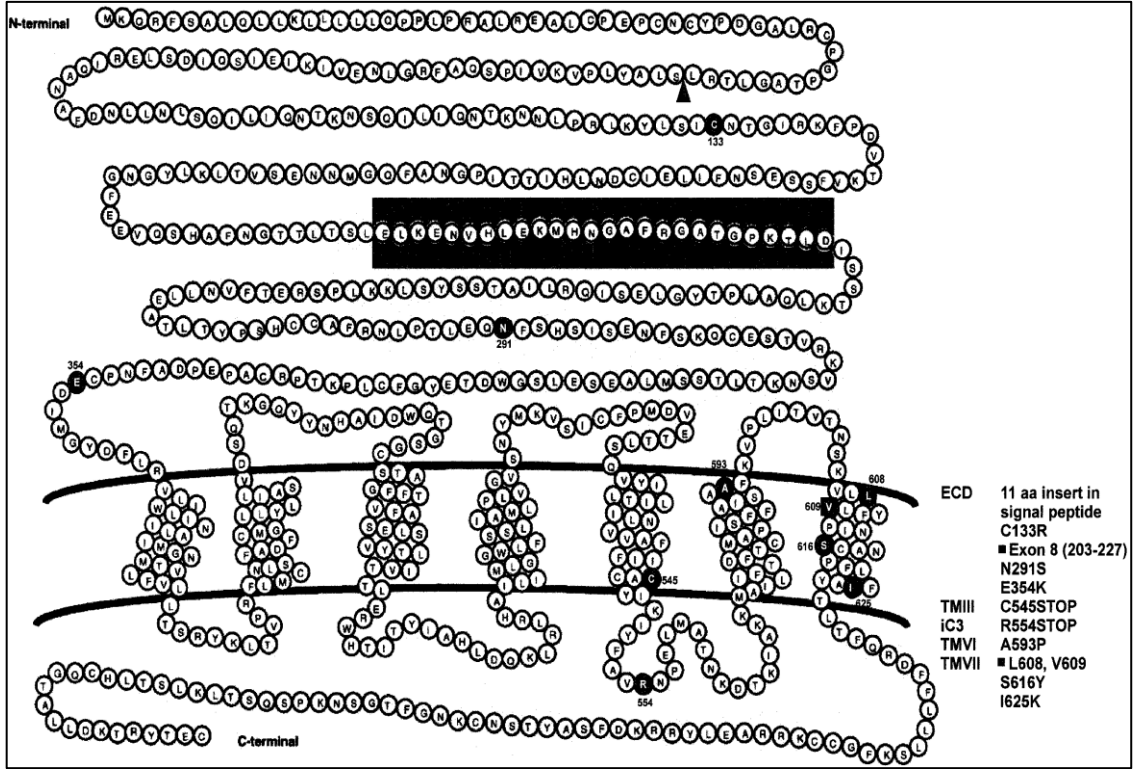
2.4.4. hLHR'nin İnaktif Mutasyonları: Belirlenmesi ve Klinik Kullanımı

Normal kadınlarda LH, menstrüel siklusun foliküler fazında granüloza hücreleri tarafından östradiol aromatisasyonu ile ilgili androjen öncülleri üretmek için teka hücrelerini uyarır. Daha sonra luteal fazda LH dalgalanmasının gerçekleşmesi ile

foliküler olgunlaşma ve yumurtlamayı teşvik için korpus luteum oluşumunu ve korpus luteumun işlevini sürdürmesi için progesteron salgılanmasını uyarır. Bu nedenle LH ile ilgili anormalliklerin adet döngüsünün ikinci aşamasında hatalı folikül, anovulasyon ve progesteron salgılanmasının yokluğu ile karakterize kısmi yumurtalık yetmezliği ile sonuçlanması beklenir. Bu tür anormalliklerin gecikmeli ergenlik, amenore ve infertilite veya eksik feminizasyona neden olabileceği tahmin edilmektedir.

İnaktif hLHR mutasyonlu kadınlarda normal ergenlik feminizasyonu, LH'nin kadının ergenlik gelişimi için gerekli olmadığını göstermektedir. Bunun yerine LH'nin ovulasyon öncesi normal seviyede östrojen salgılanmasını sağlayarak yumurtalıkları uyardırma çok önemli olduğu görülmektedir.

hLHR'nin genetik olarak inaktif mutasyonları bugüne kadar sadece dört kadında gösterilmiş olup Şekil 6' da gösterildiği gibi tespit edilmiştir. (Latronico ve ark., 1996; Toledo ve ark., 1996; Stavrou ve ark., 1998). Bu kadınlar, leyding hücre hipoplazili 46,XY bireylerin kız kardeşleri, homozigot veya birleşik-heterozigot inaktif hLHR gen mutasyonları taşıyır. LH'a ovaryan dirençli kadınlar ergenlikte normal dışı genital gelişimi, normal meme gelişimi ve kasık kıllanması sergiler ancak beklendiği gibi geçici kısırlık veya adet düzensizliğine sahip olarak infertildir. (Toledo ve ark., 1996; Arnhold ve ark., 1997). Bu kadınlarda FSH:LH oranının yükselmesiyle plazma LH düzeyleri yükselir ve progesteron konsantrasyonları postovulatuvar seviyeye ulaşmamasına rağmen östradiol konsantrasyonları normal geç foliküler faz aralığı içindedir (Arnhold ve ark., 1997; 1999). Bazı durumlarda rahim hipoplastiktir, yumurtalıklar genişlemiş ve birkaç kist içerir. Bu bulgular ovaryan biyopsi sonucunda granüloza ve teka hücrelerinin proliferatif aktivitesiyle ortaya çıkarılabilir (Arnhold ve ark., 1997).



Şekil 6. *hLHR* geninde fonksiyon kaybı mutasyonları. LH/hCG dirençli kadın ve erkeklerde *hLHR* mutasyonlarının pozisyonlarını gösteren sistematik *hLHR* geni. Kararmış bölgeler ekson 8'in delesyonu ile silinmiş ekstraselüler bölgeleri gösterir. Üçgen, 11 aminoasitlik bir insersiyon pozisyonunu gösterir. (Kremer ve ark., 1995; Laue ve ark., 1995b; 1996; Misrahi ve ark., 1997; Martens ve ark., 1998; Wu ve ark., 1998)

2.4.5. İnaktif *hLHR* Mutasyonlarının Moleküler ve Hücresel

Mekanizmaları

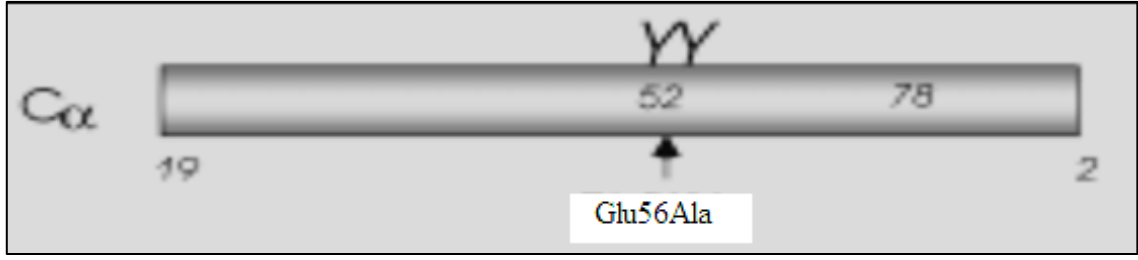
hLHR'nin bazal seviyelerinde artışa sebep olan fonksiyon kazancı mutasyonları *hLHR*'nin hücre içi sinyal özelliklerinin azalmasına sebep olabilir ya da olmayabilir. Bunun aksine *hLHR*'nin fonksiyon kaybı mutasyonlarını taşıyan gonadal hücrelerde LH/hCG yanıtının kaybı hücre içi olaylarda bazı farklı değişikliklere neden olabilir. Örneğin *hLHR*'lerin hücre yüzeyi, aktif Gs reseptörünün hormon bağlama yeteneğinin bozulması ya da hormon bağlama afinitesinin azalması sonucunda LH/hCG'ye yanıt vermeyebilir. Bu gonadal hücre yanıtının azalması hücre yüzeyindeki *hLHR*'lerin ekspresyon miktarının azalmasına bağlı olabilir. Bu durum eksprese olmuş reseptörün toplam miktarını değiştiren bir mutasyon varlığında ya mRNA ya da *hLHR* seviyelerinin azalması sebebiyle ortaya çıkabilir. Böyle bir mutasyon *hLHR*'nin doğru katlanmamasına ve endoplazmik retikulum içinde muhafaza edilmesine neden olabilir.

Bu olaylarla eş zamanlı olarak ya da eş zamanlı olmayarak doğru işlenmiş ve plazma membranına hedeflenmiş reseptörün yüzdesinde de bir azalma olabilir. (Rozell ve ark., 1995). Bu olaylar birbirinden bağımsız değildir. Bu nedenle hLHR'nin, fonksiyon kaybı mutasyon (Δ L608,V609) mekanizmalarının bir kombinasyonu ile hedef hücre yanıtını azalttığı görülmektedir. Mutant reseptör eksprese eden hücreler, eksprese olmuş hLHR'nin toplam miktarındaki azalmadan ve hLHR mutantının hücre içindeki kalıcılığının artmasından dolayı doğal tipte reseptör eksprese eden hücrelerin yalnızca %10'u oranındadır. Ayrıca hücre yüzeyindeki bu mutant reseptörler yüksek afiniteyle hCG'ye bağlanır fakat cAMP üretiminin artmasına etki edemez. Çünkü cAMP seviyesi hormon uyarılmasının yanı sıra hücre yüzey reseptörlerinin sayısına bağlıdır.

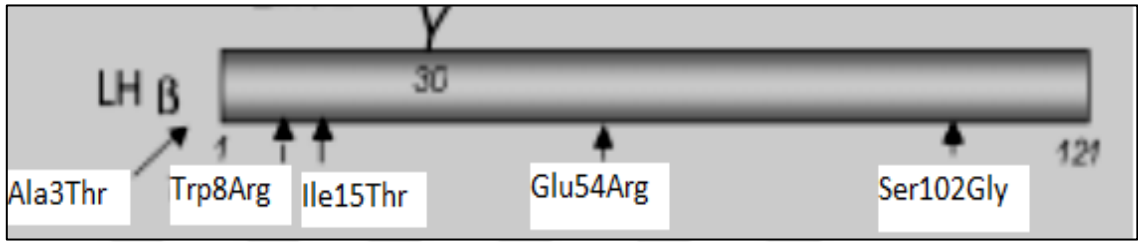
Mutant hLHR eksprese eden hücrelerin sinyal özellikleri, bu hücrelerdeki doğal tip hLHR ekspresyonunun ve mutant hLHR ekspresyonunun seviyelerinin karşılaştırılmasıyla belirlenebilir. Ancak hLHR geninde fonksiyon kaybı mutasyon tanımlanan çoğu rapora göre mutant reseptörün ekspresyonu doğal tip reseptörün ekspresyonundan daha azdır. Bu nedenle mutantların sinyal özellikleri bozulduğu için bu sonuç tek başına yeterli değildir (Latronico ve Segaloff, 1999).

2.5. İnsanlarda Lüteinleştirici Hormon (LH) Geni

FSH ve LH, insan koryonik gonadotropin (hCG) ve tirotropik hormonu (Tiroid Uyarıcı Hormon, TSH) da içeren glikoprotein hormon ailesine mensuptur (Tapanainen ve ark., 1998). Bu hormonlar heterodimerik hormonlardır, ortak bir α (alfa) ve her hormona fonksiyonel özgünlük kazandıran β (beta) alt ünitesine sahiptir. Hepsinde yaygın α alt birimi 89-92 aminoasitten meydana gelirken β alt biriminin uzunluğu ise 110 -145 aminoasit arasında değişir. Hormona spesifik β alt ünitesi non kovalent etkileşimlerle bağlantılıdır (Guyton ve ark., 2006). Karbonhidrat yan zincirler peptit zincirlere bağlanmıştır. Şekil 7' de ve Şekil 8' de gösterildiği gibi yaygın α alt üniteye 2 N (azot), LH β 'ya 1 N (azot) bağlanmıştır. İki alt birim arasındaki non kovalent etkileşim β alt birim çevresinde emniyet kemeri şeklinde uzanan bir segmenti tarafından dengelenmiştir ve altbirimler disülfid köprüsü ile bağlanmıştır.



Şekil 7. LH α alt ünitesinde Glu56Ala aminoasit değişimi (Alevizaki ve Huhtaniemi, 2002' den uyarlanmıştır)

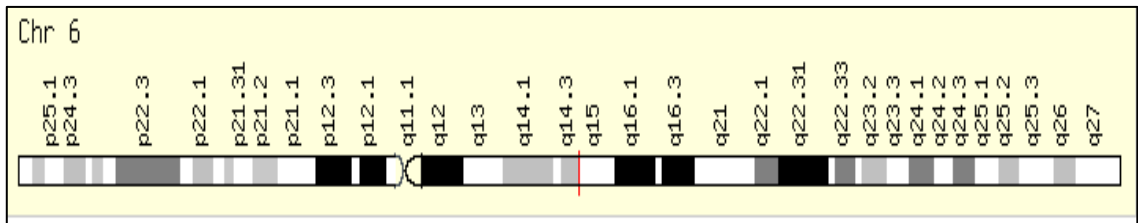


Şekil 8. LH β alt ünitesinde bilinen aminoasit değişimi mutasyonları (Alevizaki ve Huhtaniemi, 2002' den uyarlanmıştır)

Glikoprotein hormonları hedef hücre yüzeyindeki G-protein çifti reseptörleri aracılığı ile görev yaparlar ve reseptörleriyle etkileştikleri zaman etkisini gösterirler (Ghadami ve ark., 2008). LH hormonu ve reseptörüyle yumurtalık uyarımının etkisini inceleyen çalışmalar mevcuttur (Robab Davar ve ark., 2014).

2.5.1. Yaygın α Alt Ünite

Yaygın α alt ünite geni Şekil 9' da gösterildiği gibi 6. kromozom üzerinde q14.3' te lokalize olmuştur ve birinci ekzonun kodlayıcı olmadığı 5 ekzondan oluşur. 116 aminoasit kodlar ve olgun protein 92 aminoasit uzunluğundadır. Moleküler ağırlığı 13,075 Da' dur (GeneCard veritabanı, 2016).

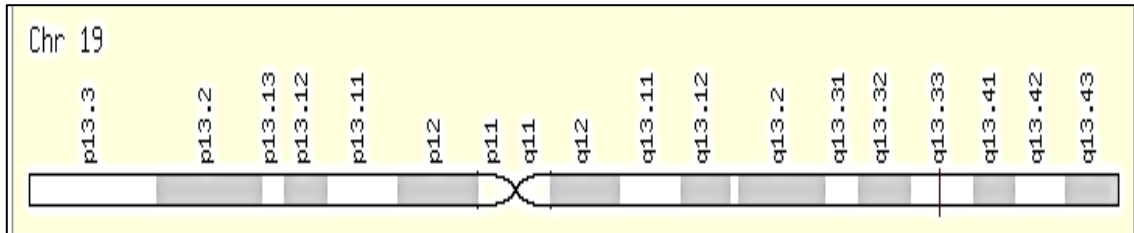


Şekil 9. Kromozom 6 üzerinde LH α geninin sitogenetik bant halinde gösterilmesi (GeneCard veritabanından alınmıştır. NC_000006.12)

Yaygın α alt ünite de çeşitli sessiz polimorfizmler tanımlanmıştır fakat hiçbir aminoasit dizisini etkilemez (Themmen ve Huhtaniemi, 2000). Bu güne kadar bu gende sadece bir amino asit değişikliği (Glu56Ala yer değiştirmesi) tanımlanmıştır (bkz. Şekil 7). Bu değişiklik bir insan karsinomasında ektojik olarak üretilen hCG' de tanımlanmıştır (Nishimura ve ark., 1986). Bu somatik bir mutasyondur ve $LH\beta$ ile kötü dimerizasyon sergilemiştir. α alt ünite de kanıtlanmış germline mutasyonların olmaması, bu tür mutasyonlar varsa FSH, TSH, hCG ve LH üretiminin kesintiye uğramasına yol açacak ve bu durumda bu tür mutasyonların ölümcül olması anlamı çıkacaktır (Kendall ve ark., 1995). Bu nedenle sonuç olarak α alt ünitesinin inaktif mutasyonlarının gelecekte tanımlanması mümkün değildir.

2.5.2. LH β Alt Ünite

Kodlanan LH β alt ünitesi 1984' te dizilenmiştir ve klonlanmıştır. $LH\beta$ geni Şekil 10' da gösterildiği gibi 19. kromozom üzerinde 19q13.3' de lokalize olmaktadır (Hollenberg ve ark., 1994). $LH\beta$ geni 3 ekzondan ve 1,4 kbp'den oluşur. 141 aminoasit kodlar ve olgun protein 121 amino asit uzunluğundadır. Moleküler ağırlığı 15,345 Da'dur (GeneCard veritabanı, 2016).



Şekil 10. Kromozom 19 üzerinde $LH\beta$ geninin sitogenik bant halinde gösterilmesi (GeneCard veritabanından alınmıştır. NC_000019.10)

2.5.3. $LH\beta$ Gen Mutasyonları

$LH\beta$ geninde bazıları oldukça yaygın olan ve hafif fenotipik etkili çeşitli polimorfizimler tanımlanmıştır. Fakat bu gende yalnızca 1 inaktif mutasyon tanımlanmıştır (Weiss ve ark., 1992). Bu inaktif mutasyon 17 yaşındaki gecikmiş ergenlikli bir erkekte tespit edilmiştir. Bu hasta erkek infertiliteli bir aile hikayesine sahipti ve sonrasında immünoassay ile yapılan ölçümlerde yüksek LH seviyeleri ile düşük serum testosteron seviyesi görülmüştür. LH invitro biyoassay ile ölçüldüğünde ise hiçbir LH biyoaktivitesi saptanmamıştır. Bununla birlikte testosteron üretimi LH/

hCG uyarılmasına yeterince yanıt vermiştir. Testis biyopsisi ile leyding hücrelerinin yokluğu ve spermatogenezin önlendiği saptanmıştır. Uzun süreli hCG tedavisi ile testiküler büyüme, virilizasyon ve spermatogenezin başlaması sağlanmıştır. Bulgular birlikte düşünüldüğünde LH'nin yapısında kalıtsal bir kusur olduğu ifade edilmiştir. Bu hipogonadal erkeğin *LHβ* gen dizilemesi Glu54Arg aminoasit değişimine neden olan yanlış anlamlı homozigot A-G mutasyonunu ortaya çıkarmıştır ve annesi de dahil olmak üzere birkaç heterozigot aile üyesi tespit edilmiştir.

İnaktif *LHβ* mutasyonlu kadınlar henüz tespit edilmemiştir. Bunların fenotipi büyük olasılıkla inaktif *LH* reseptör mutasyonlu kadınlara benzeyecektir yani anovulatuvar kısırlık görülecektir (Themmen ve Huhtaniemi, 2000). Erkeklerde ve kadın doğurganlığında LH'nin önemli rolü, genetik havuzdan hızlı bir şekilde elenen bu mutasyonun kendi kendini sınırlayan doğasını ve nadir oluşunu açıklar.

Anahtar genlerdeki mutasyonların tanımlanması açıklanamayan infertiliteli birçok vakayı açıklayabilir. Tablo 2' de gösterildiği gibi son zamanlarda LH'nin 3 varyantı keşfedilmiştir. İki *LHβ* alt ünite geninde bir yanlış eşleşme nokta mutasyonu sonucu Glu54-Arg54 ve Ser102-Gly102 aminoasit değişikliği meydana getirir (Weiss ve ark., 1992; Roy ve ark., 1996). Diğer mutasyon yaygındır ve olası fenotipik etkileri geniş çapta araştırılmıştır (Lamminen ve Huhtaniemi, 2001). Varyant *LH β* alleli iki yanlış eşleşme mutasyonu sonucu her biri bir aminoasit değişikliği meydana getiren Trp8-Arg8 (TGG>CGG) ve Ile15-Thr15 (ATC>ACC) şeklindeki mutasyondur. (Furui ve ark., 1994; Pettersson ve ark., 1994). Ayrıca varyant *LHβ* allel promotörünün ilk 600 nükleotitinde 8 nokta mutasyonu vardır ve varyant allel üzerinde promotör fonksiyon değişikliğini işaret etmektedir (Jiant ve ark., 1999). Varyant *LH'* in rekombinant bir şekli üzerindeki çalışmalar reseptör bölgesinde doğal tip *LH'* dan daha etkili olduğunu göstermiştir. Fakat dolaşımdaki yarılanma ömrü doğal tip *LH'* dan daha kısadır (Manna ve ark., 2002). Bunun tersine varyant *LHβ* promotörü doğal tip diziden daha aktiftir. Muhtemelen dolaşımdaki varyant hormonun daha hızlı kaldırılmasını telafi eder.

Tablo 2. *LHβ* gen polimorfizmleri ve mutasyonlar (Alevizaki ve Huhtaniemi, 2002'den uyarlanmıştır)

| Exon | Tip | Nükleotit değişimi | Aminoasit değişimi | Fenotip | Fonksiyonel etki | Referans |
|--------|------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------------|--|--------------------------|
| Exon 3 | Yanlış eşleşme | CAG ²²¹ >CGG | Gln54> Arg | İnfertilite, gecikmiş ergenlik | Reseptöre bağlanamama | Weiss ve ark., 1992 |
| Exon 2 | 2 Yanlış eşleşme | TGG ⁸² > CGG | Trp8> Arg | Biraz bastırılmış doğurganlık | İnvitro biyoaktivitede artış | Pettersson ve ark., 1994 |
| | | ATC ¹⁰⁴ > ACC | Ile15> Thr | PCOS' la karışır. | Kısalmış yarı ömür | Furui ve ark., 1994 |
| Exon 3 | Yanlış eşleşme | AGT ¹⁵⁰² >GGT | Ser102>Gly | İnfertilite | Belirlenmemiş | Liao ve ark., 1998 |
| Exon 3 | Yanlış eşleşme | GTG ²⁹⁵ >ATG | Ala-3>Thr | Çalışılmadı | Sinyal iletim aktivitesinde biraz azalma | Jiang ve ark., 2002 |

Literatürde yumurta oluşumu ile ilişkilendirilmiş çalışmalarda *LHβ* geni ekzon 3 G1502A mutasyonunun (Gly102Ser) aminoasit değişimine neden olduğu ve LH biyoaktivitesini değiştirerek, reseptöre bağlanma etkinliğini değiştirdiği bildirilmiştir (Robab Davar ve ark., 2014). Bu gen varyantının LH proteini üzerinde etkisi vardır ve LH biyoaktivitesini artırabilir. Aslında *LHβ* 1052A allel taşıyıcılarında LH seviyesinin düşük olduğu ve bu polimorfizmin kadın infertilitesine, bazı kadınlarda muhtemelen endometriozis ile ilişkili infertiliteye karışabileceği bulunmuştur (Liao ve ark., 1998). *LHβ* 1052A allelli hastalar kontrollü ovaryan uyarılma için daha fazla hormonal induksiyona ihtiyaç duyar ve bunun bir sonucu olarak OHSS'ye karşı duyarlı olabilir (Twigt ve ark., 2011).

LH β geninin eksonlarında ve intronlarında da 6 sessiz polimorfizm bildirilmiştir (Roy ve ark., 1996). Genelde LH' in varyant formları infertilite de dahil jinekolojik hastalıklarla ilişkili değildir. Bununla birlikte dikkat edilmesi gereken özel bir konu iki yanlış eşleşme nokta mutasyonunu içeren varyant *LH β* ' nın etnik gruplar arasında 0' dan %52'ye kadar değişen taşıyıcı frekans farklılığıdır (Huhtaniemi ve ark., 1999). Fin popülasyonunda varyant LH için homozigot olanlar infertilite ya da subfertilite bildirilmemesiyle sağlıklı görünürler. Ancak Japon popülasyonunda varyant LH, infertilite ve çeşitli adet düzensizlikleri ile ilgilidir (Suganuma ve ark., 1995; Takahashi ve ark., 1999). Güney Hindistan' da taşıyıcı frekansı 0 iken yerli Avusturalyalılar arasında %50'den daha fazladır (Lamminen ve Huhtainemi, 2001). Yunanistan' da ise frekans %15'tir.

Bu güne kadar varyant LH' in fenotipik ilgisi üzerine yapılan gözlemlerin çoğu LH' in biyolojik olarak en zayıf formunu temsil ettiğini göstermektedir. Bazı vakalarda LH seviyesinin umulmadık bir şekilde düşük olması bu LH polimorfizmlerinin açıklanabilmesi için klinisyenler tarafından önemlidir.

3. MATERYAL VE METOT

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 uygulanan fakat tedavisinde başarılı sonuç alınamayan 29 kadın hasta ve sağlıklı gebelik geçiren 30 kadın kontrol olmak üzere toplam 59 olgu çalışmaya dahil edildi. Tüm olguların yaşları, aile öyküleri, FSH, LH, östradiol hormon sonuçları, evlilik süresi, infertilite tipi, oosit sayısı gibi bilgilerinin sorgulandığı ayrıntılı bir anemnez alındı. Ayrıca 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 grubunu oluşturan 29 olgunun yaş ortalaması $33,86 \pm 5,443$ olarak kontrol grubunun yaş ortalaması ise $30,70 \pm 5,396$ olarak saptandı.

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

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edilen firmalar;

- Magnezyum Klorür ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
- EDTA (Merck)
- Master mix (One Taq)
- Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific)
- Primerler (Fermentas)
- dNTP Mix (Thermo Scientific)
- DNA İzolasyon Kiti (NükleoSpin Kandan DNA İzolasyon Kiti 74951.50)
- UltraPure™ Agaroz (Prona)
- DNA Ladder (Fermentas)
- 6xLoading Dye Solution (Sigma)
- Etidyum Bromid (EtBr) (Sigma)
- Saf etanol (Riedel-de Haen)

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)
- Distile 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 ısı bloğu (VWR Digital Hotblock)
- Thermal cycler (Applied Biosystems GeneAmp 9700 PCR System)
- Vorteks (Clifton Cyclone)
- Vorteks (Boeco)
- Vorteks (Nüve NM 110)

3.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

10X TBE: 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.

1X TBE: 100 ml 10x TBE solüsyonu üzerine 900 ml bidistile su eklendi. Oda ısısında saklandı.

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

Etidyum Bromid Solüsyonu (10 mg/ml): 1 g etidyum 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 ve 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) Elüsyon buffer BE 70°C'ye ısıtıldı.

3.4.2. Liziz

- 1) 1,5 ml ependorf tüpüne 200 µl tüm kan + 25 µl Proteinaz K + 200 µl Buffer B3 ilave edildi.
- 2) 10-20 sn. kuvvetli vorteks yapıldı (Siemed, Clifton, England).
- 3) Örnekler 70 °C'de 10-15 dk. ya da 30 dk. inkübe edildi (VWR dijital ısı bloğu, USA).

3.4.3. DNA Bağlanma

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

3.4.4. Yıkama

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

3.4.5. Elüsyon

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

3.5. DNA Miktarının Tayini

DNA miktar tayini Nanodrop cihazı ile gerçekleştirildi. Cihaz açıldıktan sonra 2 µl distile suyla körleme yapıldı. Daha sonra stok DNA örneklerinden 2 µl DNA örneği 260 nm’de ölçülerek saflık derecesi ve miktarı belirlendi.

3.6. *LHβ* Geni Ekzon 3 Bölgesi PCR Amplifikasyonu

PCR reaksiyonu 25µl’ lik toplam hacim içerisinde, 50-100 ng kalıp gDNA, her primerden 0,2-0,4 µM, 1-2 mM 1xPCR Buffer (Mg⁺² içeren) ve 0,625U Taq polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. PCR amplifikasyonunda denatürasyon ön ısısı 94°C’de 3dk. ve sonra 94°C’de 30 sn. denaturasyon, 60-62°C’de 30 sn. bağlanma ile 35 döngü, 71°C’de 35 sn. uzama ve son uzama 72°C’de 7 dk. şeklinde uygulandı. Daha sonra her PCR ürününden 5µl % 2’lik agaroz jelde analiz edildi ve her reaksiyon DNA dizi analizinde kullanıldı.

Primer dizileri:

F: 5’- AGTCTGAGACCTGTGGGGTCAGC TT -3’

R: 5’- GGAGGATCCGGGTGTCAGGG CTCCA -3’

Restriksiyon enzimi: RsaI

3.7. Agaroz Jelin Hazırlanışı

Çalışmamız için % 2’lik agaroz jel hazırlandı. Bunlar için 2 g agaroz tartıldı. Erlen mayere alınan agaroz üzerine 100 ml 1xTBE eklenip mikrodalgada iyice çözünene kadar kaynatıldı. Sonradan soğumaya bırakılan jelin sıcaklığı 80°C’ye ulaşınca üzerine çeker ocak açık haldeyken 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 çıkarılarak jelde oluşan kuyulara PCR ürünleri yüklendi.

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

Hazırlama)

Yeni nesil DNA dizileme yöntemi (İllumina Miseq) Ondokuz Mayıs Üniversitesi KİTAM (Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma Merkezi)’ da uygulandı.

3.8.1. Taqment Genomik DNA

- 1) Aşağıdaki tagmentasyon programı termal cyclers'a kaydedildi.
 - Kapak ön ısıtma opsiyonu seçildi.
 - 5 dk. boyunca 55°C'de durdu.
 - 10°C'de bekletildi.
- 2) PCR plate'ine TD (Taqment DNA Buffer)'den 10µl, gDNA'dan 5 µl eklendi.
- 3) Karıştırmak için pipetlendi.
- 4) 5 µl ATM (Amplicon Tagment Mix) eklendi ve karıştırmak için pipetlendi.
- 5) 1 dk. boyunca 20°C'de 280 g'de santrifüj edildi.
- 6) Termal cyclers'a yerleştirildi ve tagmentation programı çalıştırıldı.
- 7) 5 µl NT (Neutralize Tagment Buffer) eklendi ve karıştırmak için pipetlendi.
- 8) 1 dk. boyunca 20°C'de 280 g'de santrifüj edildi.
- 9) Oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edildi.

3.8.2. Kütüphaneyi Çoğaltma

- 1) Termal cyclers'a aşağıdaki program kaydedildi.
 - Kapak ön ısıtma opsiyonu seçildi.
 - 3 dk. boyunca 72°C
 - 30 sn. boyunca 95°C
- 2) 12 döngü ; 95°C'de 10 sn., 55°C'de 30 sn., 72°C'de 30 sn. yapıldı. 5 dk. boyunca 72°C'de bekletildi. 10°C'de bekletildi.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 5 µl NPM (Nextera PCR Master Mix) eklendi. Karıştırmak için pipetlendi.
- 8) 1 dk. boyunca 20°C'de 280 g'de santrifüj edildi.
- 9) Termal cycler'a yerleştirildi ve PCR programı çalıştırıldı.
- 10) 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)

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.
- Saf etanolden %80'lik etanol hazırlandı.

Prosedür:

- 1) 1 dk. boyunca 20°C'de 280 g'de santrifüj edildi.
- 2) 50 µl PCR ürünü PCR plate'inden yeni bir midi plate'e 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 standtan alındı. 52,5 µl RSB eklendi.

- 12) 2 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
- 13) 2 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 14) Manyetik stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
- 15) 50 µl supernatant yeni bir TCY plate'e transfer edildi.
- 16) 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 Bioanalyzer seyreltilmemiş 1 µl kütüphane ile çalıştırıldı.

3.8.5. Kütüphanenin Normalizasyonu

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 süspanse edildi 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.
- 6) 30 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
- 7) Manyetik bir stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.

- 8) Manyetik stanttan alındı ve tüm süpernatant atıldı.
- 9) 2 kez 45 µl LNWI ile yıkandı.
- 10) 30 µl 0,1 N NaOH eklendi.
- 11) 5 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
- 12) 5 dk.'lık elüsyon sırasında yeni bir 96'lık PCR plate SGP (Storage Plate) etiketlendi.
- 13) SGP plate'e 30 µl LNS1 eklendi ve bir kenara konuldu.
- 14) 5 dk.'lık elüsyon sonrasında bütün örnekler yeniden süspansiyon oldu ve pipetle karıştırıldı.
- 15) 5 dk. boyunca 1800 rpm'de sallandı.
- 16) Manyetik bir stand üzerine yerleştirildi ve sıvı berrak olana kadar (~2 dk.) beklendi.
- 17) Midi plate'den SGP plate'ye süpernatant transfer edildi.
- 18) 1 dk. 1000 g'de santrifüj yapıldı.
- 19) Bekleme durumunda plate kapatılarak en fazla 7 gün -25°C ile -15°C'de saklandı.

3.8.6. Kütüphane Havuzu

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

Prosedür:

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

3.9. Biyoinformatik Analiz

Yeni nesil dizileme işlemi Illumina Miseq ile yapıldı. Dizileme sonrası veriler Illumina basespace üzerinde incelendi. Basespace üzerinden Variant Studio V.1.0.0.

uygulaması ile vcf dosyaları kullanılarak, dizilenen bölgelerdeki varyasyonlar ve ayrıntıları elde edildi. Buradan elde edilen varyasyon kordinatları alınarak yine Basespace üzerinden İntegrative Genomics Viewer (IGV) 2.1.2. uygulamasına aktarıldı. Bu aplikasyon aracılığıyla da bam ve vcf uzantılı dosyalar kullanılarak, diziler üzerinde örneklere ait varyasyon bölgeleri gözle incelendi.

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

SPSS istatistik programı kullanılarak klinik bulgular ile genotipler arasında korelasyon analizi yapıldı. Ayrıca, hasta ve kontrol grupları arasındaki allel ve genotip frekanslarını karşılaştırmak için Ki kare, olasılık oranları (OR) ve P değeri hesaplandı. SPSS programı (Dean ve ark., versiyon 2.3.1) kullanılarak 59 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 fakat başarılı sonuç alınamayan 29 kadın hasta ile sağlıklı gebelik geçiren 30 kadın kontrol, toplam 59 kişiden kan alındı. Kontrol ve hasta grubu kişilere gönüllü olur formu imzalatıldı (Ek 2).

Herbir hastanın yaşı, infertilite tipi, infertilite nedenleri, evlilik süresi Tablo 3' deki gibi kaydedildi. Bu bilgilere göre hasta grubundaki 3 hastada sekonder infertilite gözlenirken 15 hastada primer infertilite tipi gözlendi ve 12 hastanın da infertilite tipi ile ilgili bilgiye ulaşamadı. Ayrıca 4 hastanın infertilite nedeni azalmış over, 1 hastanın düşük over rezervi ve geri kalan 24 hastanın ise infertilite nedeni açıklanamayan infertilite olarak gözlenirken 2 hastanın infertilite nedeni ile ilgili bilgisine ulaşamadı.

Tablo 3. Hasta grubunun yaşı, infertilite tipi, infertilite nedeni, evlilik süresi bilgileri

| Sıra | Yaşı | İnfertilite Tipi | İnfertilite Nedeni | Evlilik Süresi |
|------|------|------------------|--------------------|----------------|
| 1 | 28 | | açıklanamayan | 8 |
| 2 | 34 | primer | azalmış over | 5,5 |
| 3 | 35 | primer | açıklanamayan | 3 |
| 4 | 36 | | açıklanamayan | 8 |
| 5 | 42 | sekonder | azalmış over | 24 |
| 6 | 33 | primer | açıklanamayan | 11 |
| 7 | 22 | primer | açıklanamayan | 4 |
| 8 | 36 | | açıklanamayan | 11 |
| 9 | 34 | primer | açıklanamayan | 5 |
| 10 | 29 | | açıklanamayan | 4 |
| 11 | 38 | primer | açıklanamayan | 2 |
| 12 | 25 | | açıklanamayan | 5 |
| 13 | 35 | primer | açıklanamayan | 15 |
| 14 | 43 | sekonder | açıklanamayan | 16 |
| 15 | 35 | primer | açıklanamayan | 4,5 |
| 16 | 31 | primer | düşük over rezervi | 7 |
| 17 | 37 | | açıklanamayan | 7 |
| 18 | 43 | primer | | 2 |
| 19 | 33 | primer | azalmış over | 9 |
| 20 | 33 | | açıklanamayan | 6 |

Tablo 3 (devam). Hasta grubunun yaşı, infertilite tipi, infertilite nedeni, evlilik süresi bilgileri

| Sıra | Yaşı | İnfertilite Tipi | İnfertilite Nedeni | Evlilik Süresi |
|------|------|------------------|--------------------|----------------|
| 21 | 29 | | açıklanamayan | 9 |
| 22 | 38 | | açıklanamayan | 17 |
| 23 | 30 | primer | | 6 |
| 24 | 30 | primer | açıklanamayan | 4 |
| 25 | 47 | | açıklanamayan | 7 |
| 26 | 40 | sekonder | azalmış over | 16 |
| 27 | 36 | primer | açıklanamayan | 13 |
| 28 | 27 | | açıklanamayan | 2 |
| 29 | 30 | | açıklanamayan | 15 |

Hasta grubuna ait FSH, LH, E2 hormon değerlerine ilişkin test sonuçları ile tedavi sırasında toplanan oosit sayılarına ilişkin bilgileri Tablo 4'teki gibi kaydedildi.

Tablo 4. Hasta grubunun FSH, LH, E2 hormonları ve oosit değerleri

| Sıra | FSH | LH | E2 | Oosit |
|------|-------|------|-------|-------|
| 1 | 4,58 | 6,68 | 36,98 | 19 |
| 2 | 10 | 3,6 | 46 | 3 |
| 3 | 10 | 8 | 42 | 4 |
| 4 | 9,06 | 5,07 | 53,32 | 3 |
| 5 | 12 | 8 | 27 | 5 |
| 6 | 5 | 12 | 50 | 23 |
| 7 | 8 | 6 | 37 | 7 |
| 8 | 3,6 | 3,5 | 15 | 9 |
| 9 | 12,4 | 6,8 | 21 | 6 |
| 10 | 5,9 | 3,76 | 53 | 13 |
| 11 | 8,4 | 7,5 | 60 | 6 |
| 12 | 8,7 | 11 | 40 | 31 |
| 13 | 8 | 13 | 32 | 10 |
| 14 | 9,76 | 6,68 | 56,63 | 4 |
| 15 | 8 | 5 | 65 | 7 |
| 16 | 11,05 | 7,02 | 36 | 4 |
| 17 | 4,7 | 4,2 | 29,2 | 3 |
| 18 | 5,8 | 6,38 | 29 | 13 |
| 19 | 12 | 4,5 | 22 | 1 |
| 20 | 6,1 | 4,5 | 30 | 11 |

Tablo 4 (devam). Hasta grubunun FSH, LH, E2 hormonları ve oosit değerleri

| Sıra | FSH | LH | E2 | Oosit |
|------|------|-------|------|-------|
| 21 | 6,2 | 6,2 | 42 | 11 |
| 22 | 5,1 | 4,01 | 26,6 | 14 |
| 23 | 6,9 | 10 | 51 | 19 |
| 24 | 6,8 | 10 | 42 | 18 |
| 25 | 11,8 | 7,03 | 28 | 1 |
| 26 | 5,15 | 19,56 | 99 | 17 |
| 27 | 8,26 | 9,4 | 33,5 | 11 |
| 28 | 7,1 | 6,2 | 45 | 14 |
| 29 | 8,5 | 6,8 | 41,6 | 20 |

Hasta grubunun yaş, evlilik süresi, FSH, LH, E2, oosit sayıları, embriyo sayıları ve dondurulmuş embriyo sayılarının ortalama, ortanca değerleri Tablo 5’ te gösterilmiştir.

Tablo 5. Hasta grubunun ortalama, ortanca değerleri

| | Hasta Grubu | |
|---------------------|------------------|-----------------------|
| | Ortalama ± SS | Ortanca(Min-Maks) |
| Yaş | 33,86 ± 5,443 | 34,00 (22- 47) |
| Evlilik Süresi | 8,1379 ± 5,26426 | 7,0000 (2 – 24) |
| FSH | 7,7597± 2,49887 | 8,0000 (3,60 - 12,40) |
| LH | 7,2314 ± 3,49679 | 6,6800 (3,50 -19,56) |
| E2 | 39,9724±16,50274 | 37,0000 (15- 99) |
| Oosit | 10,82 ± 7,394 | 10,50 (1 -31) |
| Embriyo | 5,86 ± 4,751 | 4,00 (1- 19) |
| Dondurulmuş embriyo | 3,13 ±1,642 | 3,00 (1-6) |

4.1. Hasta Grubunun Demografik Karakterlerinin İstatistiki Değerlendirilmesi

Hasta grubunun yaşı 22 ve 47 arasında değişmekte olup ortalama yaş 33,86± 5,443 olarak hesaplandı.

Hasta grubunun evlilik süresi 2 yıl ve 24 yıl arasında değişmekte olup ortalama evlilik süresi $8,1379 \pm 5,26426$ olarak hesaplandı.

Hasta grubunun FSH değeri 3 mIU/ml ve 12 mIU/ml arasında değişmekte olup ortalama FSH değeri $7,7597 \pm 2,49887$ olarak hesaplandı.

Hasta grubunun LH değeri 3,5 IU/L ve 19,5 IU/L arasında değişmekte olup ortalama LH değeri $7,2314 \pm 3,49679$ IU/L olarak hesaplandı.

Hasta grubunun E2 değeri 15 ng/ml ve 99 ng/ml arasında değişmekte olup ortalama E2 değeri $39,9724 \pm 16,50274$ ng/ml olarak hesaplandı.

Hasta grubunun oosit sayıları 1 ve 31 arasında değişmekte olup ortalama oosit sayısı $10,82 \pm 7,394$ olarak hesaplandı.

Hasta grubunun embriyo sayısı 1 ve 19 arasında değişmekte olup ortalama embriyo sayısı $5,86 \pm 4,751$ olarak hesaplandı.

Hasta grubunun dondurulmuş embriyo sayısı 1 ve 6 arasında değişmekte olup ortalama dondurulmuş embriyo sayısı $3,13 \pm 1,642$ olarak hesaplandı.

4.2. Kontrol Grubunun İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmamızda kullanılan kontrol grubu kişilerin yaş ortalaması, ortanca ve aralık değerleri Tablo 6' daki gibi hesaplandı. Bu bilgilere göre kontrol grubunun yaşı 21 ve 40 arasında değişmekte olup ortalaması $30,70 \pm 5,396$ (21- 40) olarak hesaplandı ve ortanca değeri 32 yaştır.

Tablo 6. Kontrol grubu 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 |

4.3. *LHβ* Geni Exon 3 Bölgesi Yeni Nesil Dizi Analizi Sonuçları

LHβ geni rs1056917 mutant bölgesinin Tablo 7'de gösterildiği gibi çalışılan 29 hastanın 6'sında (%60,0) AA homozigot, 16'sında (%51,6) GA heterozigot, 7'sinde (%38,9) GG homozigot olduğu; 30 kontrolün 4'ünde (%40) AA homozigot, 15'inde (%48,4) GA heterozigot, 11'inde (%61,1) GG homozigot olduğu tespit edildi.

LHβ geni rs149579838 mutant bölgesinin Tablo 7’ de gösterildiği gibi çalışılan 29 hastanın 21’inde (%47,7) GG homozigot, 2’sinde (%100) CG heterozigot, 6’sında (%46,2) CC homozigot olduğu; 30 kontrolün 23’ünde (%52,3) GG homozigot, 7’sinde (%53,8) CC homozigot olduğu tespit edildi.

LHβ geni ekzon 3 bölgesi yeni nesil DNA dizilemesi sonucunda, rs1056917 ve rs149579838 mutant bölgeleri hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptanmadı ($p>0,05$).

Hastaların klinik bulgularına göre Tablo 8’ de gösterilen genotip dağılımlarına bakıldığında, rs149579838 mutant bölgesi GG genotipi ($p=0,04$, $\chi^2=6,381$) ve rs1056917 mutant bölgesi AG genotipi ($p= 0,03$, $\chi^2=6,75$) primer infertil olgularda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak saptandı.

Tablo 7. *LHβ* gen polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıklarının hasta ve kontrollerde karşılaştırılması

| SNP | Genotip / Allel | Hastalar (n=29) (%) | Kontroller (n=30) (%) | χ^2 | P değeri | OR (%95 CI) | |
|---------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|----------|----------|-------------|---------------------|
| <i>LHβ</i> rs1056917 | AA | 6(60,0) | 4(40,0) | 1,305 | 0,52 | | |
| | GA | 16(51,6) | 15 (48,4) | | | | |
| | GG | 7(38,9) | 11(61,1) | | | | |
| | | GG+GA:AA | 6 : 23 | 4: 26 | 0,566 | 0,45 | 1,696(0,4249-6,766) |
| | | GG:AG+AA | 22: 7 | 19: 11 | 1,092 | 0,29 | 1,82 (0,588-5,627) |
| | | G | 30 | 37 | 0,016 | 0,89 | 1,046 (0,521-2,1) |
| | | A | 28 | 33 | | | |
| <i>LHβ</i> rs149579838 | GG | 21(47,7) | 23(52,3) | 2,152 | 0,34 | | |
| | CG | 2(100,0) | 0(0,0) | | | | |
| | CC | 6 (46,2) | 7 (53,8) | | | | |
| | | GG+CG : CC | 23:60 | 23 :7 | 0,050 | 0,80 | 1,167 (0,339-4,008) |
| | | GG : CG+CC | 21: 8 | 23: 7 | | | |
| | | G | 44 | 46 | | | |
| | | C | 14 | 14 | 0,010 | 0,91 | 0,956 (0,409-2,234) |

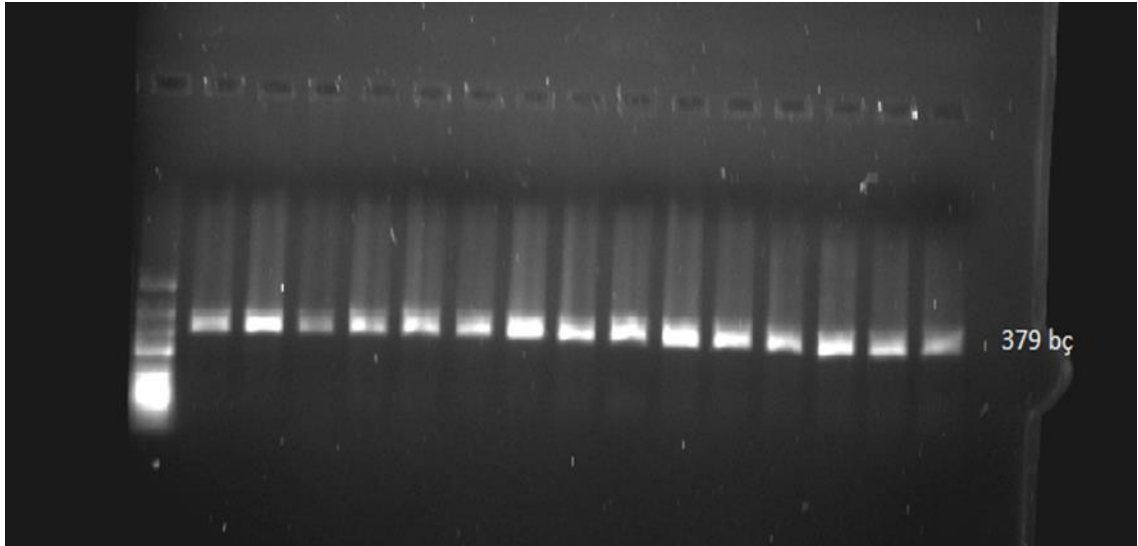
-İstatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlar kalın karakterlerle yazılmıştır.

Tablo 8. Hastaların *LHβ* varyantlarının embriyo sayısı, oosit sayısı, infertilite tipine göre p ve χ^2 değerlerinin dağılımı

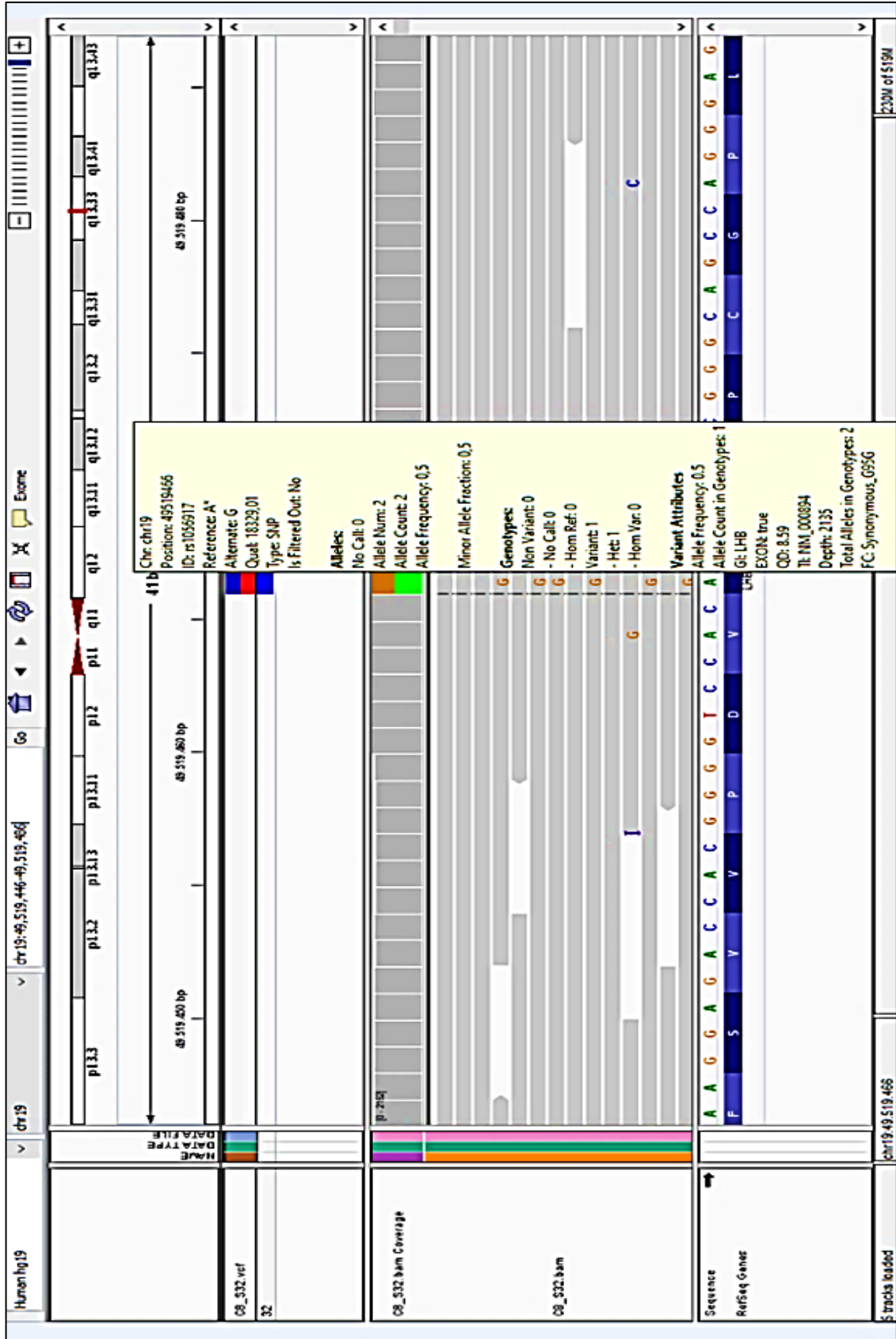
| | | <i>LHβ</i> rs1056917 | | | P değeri | χ^2 | <i>LHβ</i> rs149579838 | | | P Değeri | χ^2 |
|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------|-------------|----------|---------------------------|-----------|-----------|-------------|----------|
| Embriyo sayısı | AA | AG | GG | | | | CC | GC | GG | | |
| 10< | 4(66,7) | 13(81,3) | 7(100,0) | | | | 5(83,3) | 2(100) | 17(81) | | |
| 10> | 2(33,3) | 3(18,8) | 0(0) | 0,27 | 2,57 | | 1(16,7) | 0(0) | 4(19,0) | 0,79 | 0,46 |
| Oosit sayısı | | | | | | | | | | | |
| 10< | 2(33,3) | 7(43,8) | 5(71,4) | 0,3 | 2,17 | | 2(33,3) | 2(100) | 10(47,6) | 0,26 | 2,68 |
| 10> | 4(66,7) | 9(56,3) | 2(28,6) | | | | 4(66,7) | 0(0) | 11(52,4) | | |
| İnfertilite Tipi | | | | | | | | | | | |
| Primer | 6(100) | 16(100) | 5(71,4) | | | | 6(100) | 1(50,0) | 20(95,2) | 0,04 | 6,38 |
| Sekonder | 0(0) | 0(0) | 2(28,6) | 0,03 | 6,75 | | 0(0) | 1(50,0) | 1(4,8) | | |

İstatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlar kalın karakterlerle yazılmıştır.

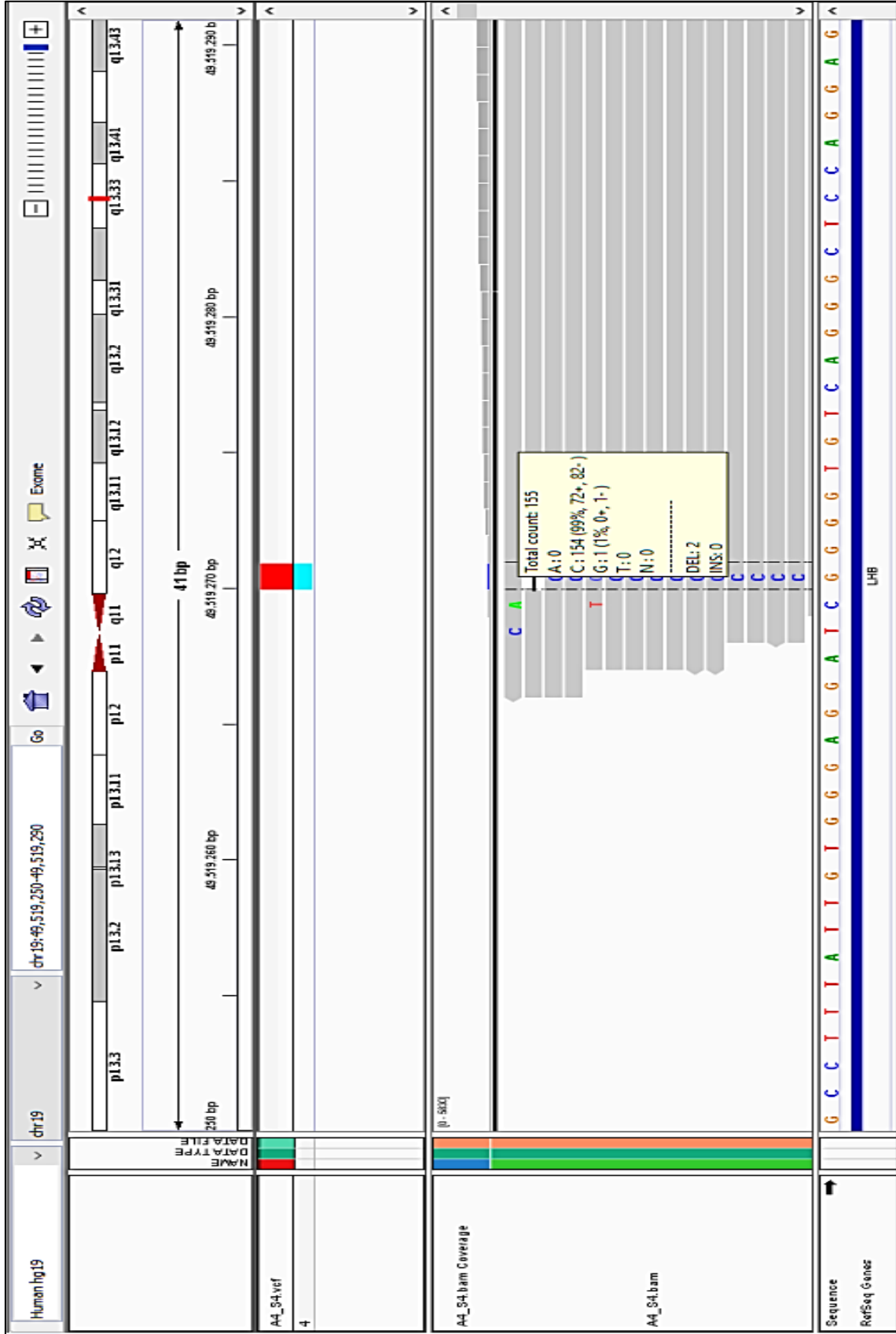
PCR yöntemi ile çalışılan örneklerden bazılarının *LHβ* geni jel görüntüsü Şekil 11' deki şekilde verilmiştir. Ayrıca Şekil 12' de yeni nesil dizileme yöntemi ile *LHβ* geni rs1056917 mutant bölgesinin ve Şekil 13' te *LHβ* geni rs149579838 mutant bölgesinin görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 11. Hasta grubundan sırasıyla 26, 10, 1, 6, 12, 19, 25, 14, 3, 2, 4, 17, 28, 29, 4 numaralı hastaların *LHβ* geni agaroz jel görüntüsü (en solda markır)



Şekil 12. Yeni nesil dizileme yöntemi ile *LHB* geni rs1056917 mutant bölgesinin görüntüsü



Şekil 13. Yeni nesil dizileme yöntemi ile *LHB* geni rs149579838 mutant bölgesinin görüntüsü

5.TARTIŞMA

Son yıllarda yardımcı üreme teknikleri infertil çiftlerin gebe kalabilme oranlarını arttırmıştır (Robab Davar ve ark., 2014). Hipofiz glikoprotein hormonlarından gonadotropinler (GtH) üremenin düzenlenmesinde önemli rol almaktadır.

LH ve FSH hormonları yumurtalıkta östrojen üretimini kontrol eden hipofiz hormonlarıdır. Njiyu ve arkadaşları, FSH'ın yumurtalık gelişiminde ve yumurtlama döneminde önemli role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle de yumurtlama döneminde hipofiz, yumurtalık ve plazma LH seviyelerinin yüksek olmasından dolayı LH sentezi, sekresyonu ve *LH* reseptör ifadesinin de yumurta olgunlaşması ve yumurtlama dönemlerinde yüksek olduğunu vurgulamışlardır (Njiyu ve ark., 2016).

Bu alanda yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olmakla birlikte daha önce yapılan çalışmalarda da *LH* ve *LH* reseptörü genleri kadınlarda primer amenore ve anovulasyonla ilişkili bulunmuştur (Themmen ve Huhtaniemi, 2000).

LHβ ve *LHR* genlerinde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. *LHR* polimorfizmlerinin ikisinin fonksiyonel öneme sahip olabileceği ve hormon bağlanmasına katılabileceği gösterilmiştir. Bunlar *LHR* geninin Ekzon 10'unda kodon 291'de Asparjin>Serin değişimine ve kodon 312'de Serin>Asparjin değişimine neden olur (Richter-Unruh, 2002).

LHβ gen mutasyonları LH'ın yapısını ve fonksiyonunu değiştirmekte, böylelikle onun biyoaktivitesini aktive ya da inaktive etmektedir. Bu değişim kadınlarda anovulasyon, amenore ve polikistikover gibi jinekolojik problemlere neden olmaktadır. *LHβ* gen mutasyonlarına sahip olan kadınlarda sıklıkla amenore ve infertilite görülmektedir (Themmen, 2005).

Literatürdeki çeşitli çalışmalar *LHβ* G1502A gen polimorfizminin infertilite ve infertiliteyle ilişkili endometriozisle ilişkili olduğunu göstermiştir (Liao ve ark., 1998; Christofolini ve ark., 2011; Hashad ve ark., 2012). Piersma ve arkadaşları, *LHR* geni 291Ser varyasyonunu incelemiş ve varyasyon varlığında *LHβ* duyarlılığında artış gözlemlemişlerdir (Piersma ve ark., 2007). Maman ve arkadaşları, insan granuloza hücrelerinde *LHR* ekspresyon paternlerini incelemişler ve oosit fonksiyonuyla korelasyon gözlemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda düşük ve yüksek *LHR*

ekspresyonunun düşük fertilizasyon kapasitesi ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (Maman ve ark., 2012). Diğer bir çalışmada, *LHCGR* geni ekzon 1 mutasyonları bazı IVF tedavisi gören kadınlarda zayıf yumurta oluşumu ile ilişkili görülmüştür (Bentov ve ark., 2012). Papamentzelopoulou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören kadınların kumulus hücrelerini incelemişler ve *LHR* geni splay varyant ekspresyonu ile ovaryan cevap arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucuna göre, *LHR* gen ekspresyonunu profilinin yardımcı üreme teknikleri ile tedavi sırasında ovaryan cevap ölçümünde bir biyomarkır olarak kullanılabilirliğini öne sürmüşlerdir (Papamentzelopoulou ve ark., 2012).

Mafra ve arkadaşları, *LHβ* G1502A gen polimorfizmini infertil kadınlarda incelemişler ve infertilite ile polimorfik bölge arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamışlardır (Mafra ve ark., 2010). Singapurda yaşayan Çinli kadınlarda yapılan bir çalışmada, *LHβ* geni G1502A varyantı menstrual hastalığa neden olanlarda daha yüksek oranda saptanmıştır (Ramanujam ve ark., 1999). Liu ve arkadaşlarının çalışmasında polikistikover hastalarında, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *LHβ* 1052A alleli taşıyıcılarında düşük LH seviyesi ve açlık kan şekeri saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucu, *LHβ* G1052A gen mutasyonunun polikistikover patogenezinde rol aldığı yönündedir (Liu ve ark., 2012).

Robab Davar ve arkadaşları, 2014 yılında 220 İranlı kadında *LH* genini inceleyen çalışma yapmışlardır. GG, GA ve AA genotipleri PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi ile analiz edilmiş ve *LH* geni ile ovaryan değişim ve infertilite arasında bir ilişki saptanmamıştır (Robab Davar ve ark., 2014).

2015 yılında yardımcı üreme teknikleriyle tedavi gören 236 Çinli kadında yapılan bir çalışmada, *LHβ* geni rs13405728 polimorfik bölgesi incelenmiş ve folikül sayısı ve antimullarian hormon değeri bakımından herhangi bir ilişki saptanmamıştır (Yi ve ark., 2015).

LHβ geni ekzon 3 G1502A mutasyonunun (Gly102Ser) aminoasit değişimine neden olarak LH biyoaktivitesini değiştirdiği bilinmektedir. Bu durumun infertilite tedavisinde ilaç uygulamalarında hormonun reseptöre bağlanma etkinliğini değiştirerek tedaviye yeterli cevap alınamamasına neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonucunda *LHβ* geni ekzon 3 bölgesi yeni nesil DNA dizilemesi sonucunda, rs1056917 ve rs149579838 mutant bölgeleri hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptanmadı ($p>0,05$). Bunun yanında hastaların klinik bulgularına göre genotip dağılımlarına bakıldığında, *LHβ* geni rs149579838 mutant bölgesi GG genotipi ($p=0,04$, $\chi^2=6,381$) ve rs1056917 mutant bölgesi AG genotipi ($p= 0,03$, $\chi^2=6,75$) primer infertil olgularda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak saptandı. Bu sonuca göre yardımcı üreme teknikleri ile tedavi sürecinde *LHβ* geni rs149579838 mutant bölgesi bakımından GG genotipine sahip bireylerin ve rs1056917 mutant bölgesi bakımından AG genotipine sahip bireylerin primer infertilite görülme oranı açısından risk grubunda olduğu görüldü ve bu nedenle sonuçların daha büyük populasyonlarda doğrulanması 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 fakat tedavisi başarılı olarak sonuçlanamayan 29 kadın hasta ile sağlıklı gebelik elde edilen 30 kadın kontrol dahil edilerek toplam 59 olgu çalışıldı. *LHβ* geni ekzon 3 bölgesi yeni nesil DNA dizileme yöntemi ile çalışıldı.

LHβ geni ekzon 3 G1502A mutasyonunun (Gly102Ser) aminoasit değişimine neden olarak LH biyoaktivitesini değiştirdiği bilinmektedir. Bu durumun infertilite tedavisinin ilaç uygulamalarında hormonun reseptöre bağlanma etkinliğini değiştirerek tedaviye yeterli cevap alınamamasına neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamız sonucunda *LHβ* geni ekzon 3 bölgesi DNA dizilemesi sonucunda, rs1056917 ve rs149579838 mutant bölgeleri hasta ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptanmadı ($p>0,05$). Bunun yanında hastaların klinik bulgularına göre genotip dağılımlarına bakıldığında, *LHβ* geni rs149579838 mutant bölgesi GG genotipi ($p=0,04$, $\chi^2=6,381$) ve rs1056917 mutant bölgesi AG genotipi ($p= 0,03$, $\chi^2=6,75$) primer infertil olgularda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak saptandı. Bu sonuca göre yardımcı üreme teknikleri ile tedavi sürecinde *LHβ* geni rs149579838 mutant bölgesi bakımından GG genotipine sahip bireylerin ve rs1056917 mutant bölgesi bakımından AG genotipine sahip bireylerin primer infertilite görülme oranı açısından risk grubunda olduğu görüldü ve bu nedenle sonuçların daha büyük populasyonlarda doğrulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abell AN, McCormick D, Segaloff DL. Certain activating mutations within helix 6 of the human luteinizing hormone receptor may be explained by alterations that allow allow transmembrane regions to activate Gs. *Mol Endocrinol* 1998; 12:1857–1869.
- Abell AN, Segaloff DL. Evidence for the direct involvement of transmembrane region six of the lutropin/choriogonadotropin receptor in activating Gs. *J Biol Chem* 1997; 272:14586–14591.
- Achrekar SK, Modi DN, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale SD. Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:509-515.
- Alevizaki M, Huhtaniemi I. Structure-function relationships of glycoprotein hormones; lessons from mutations and polymorphisms of the thyrotrophin and gonadotrophin subunit genes. *Hormones* 2002; 1(4):224-232.
- Alvigi C, Clarizia R, Pettersson K, Mollo A, Humaidan P, Strina I, et al. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:9-14.
- Arnhold IJP, Latronico AC, Batista MC, Mendonca BB. Menstrual disorders and infertility caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone receptor gene. *Fertil Steril* 1996; 71:1–5.
- Arnhold IJP, Latronico AC, Batista MC, Carvalho FM, Chrousos GP, Mendonca BB. Ovarian resistance to luteinizing hormone: a novel cause of amenorrhea and infertility. *Fertil Steril* 1997; 67:394–397.
- Atger M, Misrahi M, Sar S, Le Flem L, Dessen P, Milgrom E. Structure of the human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 111:113–123.
- Baranski TJ, Herzmark P, Lichtarge O, Gerber BO, Trueheart J, Meng EC, Iiri T, et al. C5a receptor activation: genetic identification of critical residues in four transmembrane helices. *J Biol Chem* 1999; 274:15757–15765.
- 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.
- Berek JS. İnfertilite. Adashi, E.Y., Hillard, P.A., Novak Jinekoloji, 12.Baskı, İstanbul, Nobel Kitabevi. 1998; 918-925.

- Bond RA, Leff P, Johnson TD, Milano CA, Rockman HA, McMinn TR, Apparsundaram S, et al. Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the β_2 -adrenoreceptor. *Nature* 1995; 374:272–276.
- Bulun SE, Adashi EY. The physiology and pathophysiology of the female reproductive tract. In: Williams Textbook of Endocrinology Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. 10th Ed., Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. 2003; 587–664.
- Christofolini DM, Vilarino FL, Mafra FA, André GM, Bianco B, Barbosa CP. Combination of polymorphisms in luteinizing hormone β , estrogen receptor β and progesterone receptor and susceptibility to infertility and endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 158:260-264.
- Ehrman DA, Barnes RB, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev* 1995; 16:322–353.
- Ellis GB, Desjardins C, Fraser HM. Control of pulsatile LH release in male rats. *Neuroendocrinology* 1983; 37(3):177–183.
- Forti G, Krausz C. Evaluation and treatment of the infertile couple. *Journal of Clinical Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 83(129):4177-4188.
- Furui K, Suganuma N, Tsukahara S, Asada Y, Kikkawa F, Tanaka M, Ozawa T, Tomoda Y. Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) beta-subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:107-113.
- Gether U, Kobilka BK. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 1998 ; 273:17979–17982.
- Ghadami M, El-Demerdash E, Zhang D, Binhazim AA, Archibong AE, Al-Hendy A. Expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene after bone marrow transplantation (BMT) in a FSHR knock out mouse model. *Fertil and Steril* 2008; 90:109.
- Guyton AC, Çavuşoğlu, H, Yeğen BÇ. Editör, *Tıbbi Fizyoloji, İstanbul, Yüce Yayın Evi ve Nobel Tıp Kitapevi*. 2006.
- Hashad D, Mohamed N, Hashad MM. Luteinising hormone β -subunit gene Gly102Ser variant and oxidative stress biomarkers in Egyptian infertile males. *Andrologia* 2012; 44(Suppl.):484-489.
- Hjorth SA, Orskov C, Schwartz TW. Constitutive activity of glucagon receptor mutants. *Mol Endocrinol* 1998; 12:78–86.

- Hollenberg AN, Postoll RG, Albancse C, Boers ME, Jameson JL. Multiple promoter elements in the human chorionic gonadotropin beta subunit genes distinguish their expression from the luteinizing hormone beta gene. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 106:111–119.
- Homer HA, Li TC, Cooke ID. The septate uterus: review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril* 2000; 73:1-14.
- Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57(4):792-6.
- Hugues JN. Ovarian stimulation for assisted reproductive Technologies. In: Vayana E, Rowe PS, Griffin PD, editors. *Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting*. Geneva: WHO. 2002; 102-105.
- Huhtaniemi I, Alevizaki M. Gonadotrophin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20:561-576.
- Huhtaniemi I, Jiang M, Nilsson C, Pettersson K. Mutations and polymorphisms in gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 151:89–94.
- Huhtaniemi IT, Themmen AP. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine* 2005; 26:207-217.
- Ismajovich B, Lidor A, Confino E, David MP. Treatment of minimal and moderate intrauterine adhesions (Asherman's syndrome). *J Reprod Med* 1985; 30(10):769-72.
- Jette NT, Glass RH. Prognostic value of the postcoital test. *Fertil Steril* 1972; 23:29-32.
- Jiang M, Pakarinen P, Zhang FP, El-Hefnawy T, Koskimies P, Pettersson K, Huhtaniemi I. A common polymorphic allele of the human luteinizing hormone betasubunit gene: additional mutations and differential function of the promoter sequence. *Hum Mol Genet* 1999; 8:2037- 2046.
- Jordan J, Craig K, Clifton DK, Soules MR. Luteal phase defect: The sensitivity and spesivity of diagnostic methods in common clinical use. *Fertil Steril*. 1994; 62:54.
- Jun JK, Yoon JS, Ku S, Choi YM, Hwang KR, Park SY, et al. Follicle stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet* 2006; 51:665-670.
- Karsch FJ, Moenter SM, Caraty A. The neuroendocrin signal for ovulation. *Anim Reprod Sci* 1992; 28:329–341.
- Kişnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Öneroğlu LS. Erkeğe bağlı infertilite. *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Editör, Androloji, Ankara, Güneş, 1996; 1119-1129,1287.

- Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MC, Lefkowitz RJ. Constitutive activation of the $\alpha 1B$ -adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. *J Biol Chem* 1992; 267:1430–1433.
- Kosugi S, Lin Z, Pearlstein R, Mori T, Shenker A. Evidence that interhelical hydrogen bonding between Asp 578 and Asn 619 helps maintain the inactive conformation of the human lutropin receptor (LHR). *Endocrine Society Minneapolis* 1997.
- Kosugi S, Mori T, Shenker A. The role of Asp578 in maintaining the inactive conformation of the human lutropin/ choriogonadotropin receptor. *J Biol Chem*. 1996; 271:31813–31817.
- Kremer H, Kraaij R, Toledo SPA, Post M, Fridman JB, Hayashida CY, van Reen M, et al. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat Genet* 1995; 9:160–164.
- Lamminen T, Huhtaniemi I. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *Eur J Pharmacol* 2001; 414:1-7.
- Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJP, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, Castro M, et al. Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by homozygous inactivating mutations of the luteinizing hormone receptor gene. *N Engl J Med* 1996; 334:507–512.
- Latronico AC, Abell AN, Arnhold IJP, Liu X, Lins TSS, Brito VN, Billerbeck AE, et al. A unique constitutively activating mutation in the third transmembrane helix of the luteinizing hormone receptor causes sporadic male gonadotropin independent precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2435–2440.
- Latronico AC, Segaloff DL. Naturally Occurring Mutations of the Luteinizing-Hormone Receptor:Lessons Learned about Reproductive Physiology and G Protein–Coupled Receptors.*Am. J. Hum. Genet* 1999; 65:949–958.
- Laue L, Chan W-C, Hsueh A, Kudo M, Hsu SY, Wu S, Blomberg L, et al. Genetic heterogeneity of constitutively activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in familial male-limited precocious puberty. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995a; 92:1906–1910.
- Laue L, Wu SM, Kudo M, Bourony CJ, Cutler GB, Hsueh AJW, Chan WY. Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. *Mol Endocrinol* 1996; 10:987–997.
- Laue L, Wu SM, Kudo M, Hsueh AJW, Cutler GB Jr, Griffin JE, Wilson JD, et al. A nonsense mutation of the human luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. *Hum Mol Genet* 1995b; 4:1429–1433.
- Layman LC. Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet* 2002; 39:153–161.

- Liao WX, Roy AC, Chan C, Arulkumaran S, Ratnam SS, A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility. *Fertil Steril* 1998; 69:102-106.
- Liu N, Ma Y, Wang S, Zhang X, Zhang Q, Zhang X, et al. Association of the genetic variants of luteinizing hormone, luteinizing hormone receptor and polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10:36.
- Liedo B, Ortiz JA, Llacer J, Bernabeu R. Pharmacogenetics of ovarian response. *Pharmacogenomics* 2014; 15(6):885-893.
- Loutradis D, Patsoula E, Minas V, Koussidis GA, Antsaklis A, Michalas S, et al. FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSIET programs. *J Assist Reprod Genet* 2006; 23:177-184.
- Mafra FA, Bianco B, Christofolini DM, Souza AM, Zulli K, Barbosa CP. Luteinizing hormone beta-subunit gene (LHbeta) polymorphism in infertility and endometriosis-associated infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 151:66-69.
- Maman E, Yung Y, Kedem A, Yerushalmi GM, Konopnicki S, Cohen B, et al. High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertil Steril* 2012; 97:592-598.
- Manna PR, Joshi L, Reinhold VN, Aubert ML, Sukanuma N, Pettersson K, Huhtaniemi I. Synthesis, purification, and structural and functional characterization of recombinant form of a common genetic variant of human luteinizing hormone. *Hum Mol Genet* 2002; 11:301-315.
- Martens JWM, Verhoef-PostM, Abelin N, EzabellaM, Toledo SPA, Brunner HG, Themmen APN. A homozygous mutation of the luteinizing hormone receptor causes partial Leydig cell hypoplasia: correlation between receptor activity and phenotype. *Mol Endocrinol* 1998; 12:775-784.
- Miller JH, Weinberg RK, Canino NL, Klein NA, Solues MR. The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:952.
- Misrahi M, Meduri G, Pissard S, Bouvattier C, Beau I, Loosfelt H, Jolivet A, et al. Comparison of immunocytochemical and molecular features with the phenotype in a case of incomplete male pseudohermaphroditism associated with a mutation of the luteinizing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2159-2165.
- Musich J, Behrman S. Surgical management of tubal obstruction at the uterotubal junction. *Fertil Steril* 1983; 40:423-440.

- Neumann S, Raaka BM, Gershengorn MC. Human TSH receptor ligands as pharmacological probes with potential clinical application. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2009; 4(6): 669.
- Nishimura R, Shin J, Ji I, Middaugh CR, Kruggel W, Lewis RV, Ji TH. A single amino acid substitution in an ectopic α subunit of a human carcinoma choriongonadotropin. *J Biol Chem* 1986; 261:10475-10477.
- Nyuji M, Kazeto Y, Izumida D, Tani K, Suzuki H, Hamada K, Mekuchi M, Gen K, Soyano K, Okuzawa K. Greater amberjack Fsh, Lh, and their receptors: Plasma and mRNA profiles during ovarian development. *Gen Comp Endocrinol* 2016; 225:224–234.
- Out HJ, Rutherford A, Fleming R, Tay CC, Trew G, Ledger W, et al. A randomized, double-blind, multicentre clinical trial comparing starting doses of 150 and 200 IU of recombinant FSH in women treated with the GnRH antagonist ganirelix for assisted reproduction. *Hum Reprod* 2004; 19:90-95.
- Papamentzelopoulou M, Mavrogianni D, Partsinevelos GA, Marinopoulos S, Dinopoulou V, Theofanakis C, et al. LH receptor gene expression in cumulus cells in women entering an ART program. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:409-416.
- Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to folliclestimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3365-3369.
- Pettersson K, Makela MM, Dahlén P, Lamminen T, Huoponen K, Huhtaniemi I. Genetic polymorphism found in the LH α gene of an immunologically anomalous variant of human luteinizing hormone. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 65.
- Piersma D, Verhoef-Post M, Look MP, Uitterlinden AG, Pols HAP, Berns EMJJ, et al. Polymorphic variations in exon 10 of the luteinizing hormone receptor: Functional consequences and associations with breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 276:63-70.
- Puett D, Li Y, Angelova K, et al. Structure-function relationships of the luteinizing hormone receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1061:41-54.
- Ramanujam LN, Liao WX, Roy AC, Loganath A, Goh HH, Ng SC. Association of molecular variants of luteinizing hormone with menstrual disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999; 51:243-246.
- Richards PA, Richards PD, Tiltman AJ. The ultrastructure of fibromyomatous myometrium and its relationship to infertility. *Hum Reprod Update* 1998; 4:520-525.


- Richter-Unruh A, Martens JWM, Verhoef-Post M, Wessels K, Kors WA, Sinnecker GHG, et al. Leydig cell hypoplasia: cases with new mutations, new polymorphism and cases without mutations in the luteinizing hormone receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 56:103-112.
- Robab Davar MD, Nasim Tabibnejad MD, Seyed Mehdi Kalantar Ph.D, Mohammad Hasan Sheikhha M.D.Ph.D. The luteinizing hormone beta-subunit exon 3 (Gly102Ser) gene mutation and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation. *Iran J Reprod Med* 2014; 12(10):667-672.
- Roberts LM, Shen J, Ingraham HA. New solutions to an ancient riddle: defining the differences between Adam and Eve. *Am J Hum Genet* 1999; 65:933–942.
- Rosenthal IM, Refetoff S, Rich B, Barnes RB, Sunthornthepvarakul T, Parma J, Rosenfield RL. Response to challenge with gonadotropin-releasing hormone agonist in a mother and her two sons with a constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor—a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3802–3806.
- Ross GT, Cargille CM, Lipsett MB, Rayford PL, Marshall JR, Strott CA, Rodbard D. Pituitary and gonadal hormones in women during spontaneous and induced ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 1970; 26: 1–62.
- Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54:77–79.
- Roy Ac, Liao WX, Chen Y, Arulkumaran S, Ratnam SS. Identification of seven novel mutations in LHb-subunit genes by SSCP. *Mol Cell Biochem* 1996; 165:151–153.
- Rozell TG, Wang H, Liu X, Segaloff DL. Intracellular retention of mutant gonadotropin receptors results in loss of hormone binding activity of the follitropin receptor but not the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Mol Endocrinol* 1995; 9:1727–1736.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the b2-adrenergic receptor: extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 1993; 268:4625–4636.
- Santoro N, Adel T, Skurnick JH. Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women. *Fertil Steril* 1999; 71:658–662.
- Segaloff DL, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin (LH/CG) receptor-4 years later. *Endocr Rev* 1993; 14:324–347.
- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin KD. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003;126:13–25.

- Shalev J, Meizner I. Predictive value of transvaginal sonography performed routine diagnostic hysteroscopy for evaluation of infertility. *Fertil Steril* 2000; 73:412-417.
- Sheikh SP, Vilardarga J-P, Baranski TJ, Lichtarge O, Iiri T, Meng EC, Nissenson RA, et al. Similar structures and shared switch mechanisms of the b2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor: Zn(II) bridges between helices III and VI block activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 17033–17041.
- Sheikhha MH, Eftekhar M, Alantar 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.
- Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ Jr, Minegishi T, Cutler GB Jr. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 1993; 365:652–654.
- Shoham Z, Di Carlo C, Patel A, Conway GS, Jacobs HS. Is it possible to run a successful ovulation induction program based solely on ultrasound monitoring? The importance of endometrial of endometrial measurements. *Fertil Steril* 1991; 56:836-841.
- Simoni M, Tuttelmann F, Michel C, Bockenfeld Y, Nieschlag E, Gromoll J. Polymorphisms of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene: association with aldescended testes and male infertility. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18:193-200.
- Speroff L, Glass NH, Kase RG. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility*. 7nd Ed. 2007; 84, 171, 213, 236, 1013, 1026, 1142, 1143, 1075, 1097, 1133.
- Stavrou SS, Zhu Y-S, Cai LQ, Katz MD, Herrera C, DeFillo-Ricart M, Imperato-McGinley J. A novel mutation of the human luteinizing hormone receptor in 46XY and 46XX sisters. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2091–2098.
- Suganuma N, Furui K, FuruhashiM, Asada Y, Kikkawa F, Tomoda Y. Screening of the mutations in luteinizing hormone b-subunit in patients with menstrual disorders. *Fertil Steril* 1995; 63:989–995.
- Takahashi K, Ozaki T, Okada M, Kurioka H, Kanasaki H, MiyazakiK. Increased prevalence of Luteinizing hormone b-subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1999; 71:96–101.
- Tapanainen JS, Vaskivuo T, Aittomäki K, Huhtaniemi IT. Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145:129-135.
- Themmen AP. An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. *Reproduction* 2005; 130:263-274.

- Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 2000; 21:551-583.
- Thornycroft IH, Mishell DR, Jr, Stone SC, Kharma KM, Nakamura RM. The relation of serum 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 β levels during the human menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 111: 947-951.
- Toledo SPA, Brunner HG, Kraaij R, PostM, Dahia PLM, Hayashida CY, Kremer H, et al. An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3850-3854.
- Troppmann B, Kleinau G, Krause G, Gromoll J. Structural and functional plasticity of the luteinizing hormone/ choriogonadotrophin receptor. *Hum Reprod Update* 2013; 19:583-602.
- Twigt JM, Hammiche F, Sinclair KD, Beckers NG, Visser JA, Lindemans J, et al. Preconception folic Acid use modulates estradiol and follicular responses to ovarian stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:E322-E329.
- Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K and Okamura K. Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility* 2001; 76:908-914.
- Van Voorhis BJ. Outcomes from assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol* 2006; 107:183-200.
- Verberg MF, Eijkemans MJ, Macklon NS, Heijnen EM, Baart EB, Hohmann FP, et al. The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild.2009.
- Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 1992; 326:179-183.
- Wu SM, Hallermeier KM, Laue L, Brain C, Berry C, Grant DB, Griffin J, et al. Inactivating of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by an insertional mutation in Leydig cell hypoplasia. *Mol Endocrinol* 1998; 12:1651-1660.
- Yin Q, Li Y, Huang J, Yang D. Association of rs13405728 polymorphism of LHR gene with slow ovarian response. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2015; 32(6):840-3.
- Yong PY, Brett S, Baird DT, Thong KJ. A prospective randomized clinical trial comparing 150 IU and 225 IU of recombinant follicle-stimulating hormone (Gonal-F*) in a fixed-dose regimen for controlled ovarian stimulation in in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 2003; 79:308-315.

EKLER

Ek 1: Etik kurul onay belgesi




T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/1641 10.04.2015

Sayın Öğr.Gör.Dr.Şengül TURAL

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

Bilgilerinize arz/rica ederim.



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

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

Ek 2: Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

| |
|--|
| <p>İLAÇ DIŞI GİRİŐİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU</p> |
| <p>HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ *</p> |
| <p><u>ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):</u></p> <p>Yardımcı Üreme Tekniklerinde <i>FSH, VEGF LH</i> ve <i>ESR</i> Gen Mutasyonlarının Etkisi.</p> |
| <p>Gönüllünün BaŐ Harfleri << >></p> |
| <p>Bir araştırma çalıŐmasına 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.</p> |
| <p><u>BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?</u></p> <p>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 çalıŐmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.</p> |
| <p><u>ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR? Açıklayınız</u></p> <p>Yardımcı Üreme Tekniklerinde ile tedavisi sırasında bazı hastalar kullandıkları ilaçlara karşı farklı tepki verebilmektedirler. Bazı hastalarda istenilen yumurta sayısına ya da istenilen kalitede yumurtaya ulaŐılamazken bazılarında istenilenden çok sayıda yumurta gelişimi sağlanabilmektedir, ki bu sayı gerekenden çok daha fazla olduğunda yumurtalıkların boyutu artar, aŐırı uyarılmış olan bu yumurtalıklardan salgılanan yüksek hormon seviyesi nedeniyle iki hafta içerisinde bazı yan etkiler görülebilmektedir (Yumurtalıkların aŐırı uyarılması sendromu: OHSS). Bu yan etkiler vücut boŐluĐunda 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 <i>LH</i> (LüteinleŐtiriciHormon) Reseptör ve <i>ESR</i>(Estrogen Reseptör) GenlerindeMaydana Gelen Genetik Değişimlerin etkisi ile ilacın etkisinin kişiden kiŐiye farklılık göstermesi ve aynı dozun farklı kalitede yumurta oluŐturmasındaki etkisini (farmakogenetik) incelemeyi amaçladık. Çalışmanın sonucunda <i>LH</i>ve <i>ESR</i> 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 baŐarı oranını yükseltecek, hastaların zaman kaybını ve olumsuz sonuçlardan psikoljik olarak etkilenmesini önleyecek ve aŐırı yumurta oluşumu sendromu gibi komplikasyonların önüne geçilmiş olacaktır.</p> |
| <p><u>ÇALIŞMA İŐLEMLERİ:</u></p> <p>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.</p> |
| <p>İlaç Dışı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar için Başvuru Formu 10 Mayıs 2010 Versiyon No:01</p> |
| <p>11/5</p> |

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 maktubuzları 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") toplamlarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışma destekleyicisi firma ile paylaşılan çalışma verileri size özel bir numara olan bir kod ("Kod") numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin çalışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma doktorunuzun denetimindedir. Çalışma destekleyicisi firma düzenleyici otorite veya diğer denetim kurumları tarafından atanmış kişiler doktorunuz tarafından tutulan çalışma verilerinizi inceleyebilirler.

Doktorunuz çalışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Çalışma destekleyicisi firma; çalışmanın yürütülmesi, teşhis ve tıbbi yardım gereçlerinin geliştirilmesi için çalışma verilerinizi kullanabilir. Doktorunuzun çalıştığı kurum ve çalışma destekleyicisi firmanın her ikisi de yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar.

Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Ek 2 (devam): Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU

Doktorunuz ya da çalışma destekleyicisi firmadan, toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahipsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahipsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen gerekirse sizin çalışma destekleyicisi firma ile temasa geçmenize yardımcı olabilecek doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Çalışma destekleyici firma onayınızdan vazgeçmeden önceki çalışma verilerinizi kullanmaya devam edebilir.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Ad, Soyadı ve telefon numaraları

Öğr.Gör.Dr.Şengül Tural 05334925282

CALISMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR: Varsa açıklayınız

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

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

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

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

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

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

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

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

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elvan YILMAZ

Doğum Yeri : Ordu

Doğum Tarihi : 08.06.1992

Medeni Hali : Bekar

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Eğitim Durumu : Erzurum Atatürk Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik /
2014

E-posta : ylmazelvan@hotmail.com