



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

**KONTROLLÜ OVERYAN HİPERSTİMÜLASYON UYGULANDIĞINDA
İYİ CEVAP VEREN (GOOD RESPONDER) VE ZAYIF CEVAP VEREN
(POOR RESPONDER) İNFERTİL HASTALARDAKİ FSH RESEPTÖR
POLİMORFİZMLERİNİN, FERTİL KADINLARDAKİ FSH RESEPTÖR
POLİMORFİZMLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Barış SEVER

Antalya, 2011



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

**KONTROLLÜ OVERYAN HİPERSTİMÜLASYON UYGULANDIĞINDA
İYİ CEVAP VEREN (GOOD RESPONDER) VE ZAYIF CEVAP VEREN
(POOR RESPONDER) İNFERTİL HASTALARDAKİ FSH RESEPTÖR
POLİMORFİZMLERİNİN, FERTİL KADINLARDAKİ FSH RESEPTÖR
POLİMORFİZMLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Barış SEVER

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet ŞİMŞEK

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

Antalya, 2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sürecinde ve tez çalışmalarımda değerli yardım ve katkılarını esirgemeyen başta Sayın Doç. Dr. Mehmet ŞİMŞEK olmak üzere, tecrübelerinden faydalandığım çok değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömür TAŞKIN' a, Sayın Doç. Dr. Özgül ALPER'e, Sayın Prof. Dr. Mine ÜNER' e, Sayın Prof. Dr. Tayup ŞİMŞEK' e, Sayın Prof. Dr. İnanç MENDİLCİOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Münire ERMAN AKAR'a ve yakın zamanda aramızdan ayrılan çok değerli hocam Prof. Dr. Bilal TRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca ve uzmanlık eğitimim süresince bana en büyük desteği veren, bugünlere gelmemde emeği çok olan sevgili aileme ve sevgili eşim Pınar SEVER'e de ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iii
Şekiller Dizini	iv
Tablolar Dizini	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Gonadotropinler	2
2.1.1. Gonadotropinlerin yapı ve fonksiyonları	2
2.1.1.1. FSH'nin fonksiyonları	3
2.1.2. Hipofizer gonadotropin salınımı	7
2.1.3. Gonadotropinlerin etki mekanizması	9
2.1.4. Gonadotropinlerin düzenlenmesi	10
2.2. Gonadotropinlerin Teşhis ve Tedavi Uygulamaları	11
2.3. Gonadotropin Reseptörleri	12
2.3.1. Gonadotropin reseptör proteinleri	12
2.3.2. Gonadotropin reseptör genleri ve transkriptler	14
2.3.2.1. Genler	14
2.3.2.2. Transkriptler	15
2.3.3. LHR ve FSHR'nin doğal mutasyonları	15
2.4. Polimorfizm Nedir?	18
2.5. Poor Responder ve Good Responder Tanımlaması	18
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Hasta Seçimi	20
3.2. Periferel Kan Örneklerinin Alınımı	21
3.3. Periferel Kandan DNA Eldesi	21
3.3.1. Kullanılan solusyonlar	21
3.3.2. İşlemler	22
3.3.3. DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümü	23
3.3.4. PCR yöntemi	23
3.3.4.1. PCR reaksiyonu içeriği	24
3.3.4.2. PCR programı	24
3.3.5. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme sistemi	24
3.3.5.1. % 1'lik agaroz jelin hazırlanması	24
3.3.5.2. İşlemler	24
3.3.6. Amplikonların temizlenmesi	25
3.3.6.1. İşlemler	25
3.3.7. DNA Dizi Analizi	25
3.3.7.1. Dizileme Reaksiyonu	25
3.3.7.2. Dizileme PCR Programı	25

3.3.8. Dizi Analizi Yapılacak Amplikonların Temizlenmesi	25
3.3.9. DNA Dizi Analizi	26
3.4. İstatistik Analizi	26
3.5. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları	26
4. BULGULAR	32
4.1. Kontrol Grubu Hasta Sonuçları	32
4.1.1. Kontrol Grubu Hastaların Demografik Özellikleri	32
4.1.2. Kontrol Grubu Hastaların Moleküler Genetik Analizi	33
4.1.2.1. Ala307Thr polimorfizmi	33
4.1.2.2. Ser680Asn polimorfizmi	33
4.1.3. Kontrol Grubu Hastalarının Sonuçlarının İstatistiksel Analizi	34
4.1.3.1. Ala307Thr polimorfizm Sonuçları İçin İstatistiksel Analiz	34
4.1.3.2. Ser680Asn Polimorfizm Sonuçları İçin İstatistiksel Analiz	35
4.2. Good Responder Hasta Sonuçları	36
4.2.1. Good responder hastaların demografik özellikleri	36
4.2.2. Good Responder Grubu Hastaların Moleküler Genetik Analizi	38
4.2.2.1. Ala307Thr Polimorfizmi	38
4.2.2.2. Ser680Asn Polimorfizmi	38
4.2.3. Good responder Grubu Hastalarının Sonuçlarının İstatistiksel Analizi	39
4.2.3.1. Ala307Thr Bölge Sonuçları İçin İstatistiksel Analiz	39
4.2.3.2. Ser680Asn Bölge Sonuçları İçin İstatistiksel Analiz	41
4.3. Poor Responder Hasta Sonuçları	44
4.3.1. Poor responder hastaların demografik özellikleri	44
4.3.2. Poor Responder Grubu Hastaların Moleküler Genetik Analizi	46
4.3.2.1. Ala307Thr bölgesi	46
4.3.2.2. Ser680Asn bölgesi	46
4.3.3. Poor responder Grubu Hastalarının Sonuçlarının İstatistiksel Analizi	47
4.3.3.1. Ala307Thr Bölge Sonuçları İçin İstatistiksel Analiz	47
4.3.3.2. Ser680Asn Bölge Sonuçları İçin İstatistiksel Analiz	49
4.4. Gruplar Arası Karşılaştırma Sonuçları	51
4.4.1. Ala307Thr polimorfizminin gruplar arasındaki karşılaştırılması	51
4.4.1.1. Ala307Thr polimorfizminin gruplar arasındaki demografik özellikler açısından karşılaştırılması	53
4.4.2. Ser680Asn polimorfizminin gruplar arasındaki karşılaştırılması	55
4.4.2.1. Ser680Asn polimorfizminin gruplar arasındaki demografik özellikler açısından karşılaştırılması	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR	68
7. ÖZET	71
8. ABSTRACT	74
9. KAYNAKLAR	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
Ala	Alanin
Asn	Asparajin
β	Beta
CG	Koryonik gonadotropin
E2	Estradiol
FSH	Folikül stimulan hormon
FSHR	Folikül stimulan hormon reseptörü
GH	Büyüme hormonu
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
hCG	Human koryonik gonadotropin
ICSI	Intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	Invitro fertilizasyon
KOH	Kontrollü overyan hiperstimülasyon
LH	Lüteinizan hormon
LHR	Lüteinizan hormon reseptörü
Ser	Serin
SNP	Tek nüleotid değişimi
Thr	Treonin
TSH	Tiroid stimulan hormon

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. FSHR amplikonunun agaroz jel görüntüsü	27
3.2. FSHR amplikonunun ileri primerlerle okunan DNA dizisi	28
3.3. Kontrol grubu FSHR geninde p.Ala307Thr; gCT>ACT değişiminde 1029 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri	28
3.4. Kontrol grubu FSHR geninde p.Ser680Asn; AgT>AaT değişiminde 2039 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri	29
3.5. GR kodlu Good Responder grubunun FSHR geninde p.Ala307Thr; gCT>ACT değişiminde 1029 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri	29
3.6. GR kodlu Good Responder grubunun FSHR geninde p.Ser680Asn; AgT>AaT değişiminde 2039 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri	30
3.7. PR kodlu Poor Responder grubunun FSHR geninde p.Ala307Thr; gCT>ACT değişiminde 1029 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri	30
3.8. PR kodlu Poor Responder grubunun FSHR geninde p.Ser680Asn; AgT>AaT değişiminde 2039 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri	31

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Kontrol grubunda çalışmadan dışlanma kriterleri	20
3.2. Good responder grubunda çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri	21
3.3. Poor responder grubunda çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri	21
4.1. Kontrol grubu hastalarda yaşın demografik dağılımı	32
4.2. Kontrol grubu hastalarda gebelik sayısının demografik dağılımı	33
4.3. Kontrol grubunda Ala307Thr bölgesindeki polimorfizm genotipleri ve oranları	33
4.4. Kontrol grubunda Ser680Asn bölgesindeki polimorfizm genotipleri ve oranları	34
4.5. Ala307Thr Genotipleri ile yaş ve gebelik sayısı arasındaki ilişki	34
4.6. Genotipler ile yaş ve gebelik arasındaki ilişki	35
4.7. Genotipler ile yaş ve gebelik sayısı arasındaki ilişki	35
4.8. Genotipler ile yaş ve gebelik arasındaki ilişki	36
4.9. Good responder hastaların demografik özellikleri	37
4.10. Good responder grubunda Ala307Thr polimorfizm genotipleri ve oranları	38
4.11. Good responder grubunda Ser680Asn polimorfizm genotipler ve oranları	39
4.12. Good responder hastalarda genetik durum ve diğer parametreler arasındaki ilişki	40
4.13. Good responder hastalarda genotipler ve diğer parametreler arasındaki ilişki	43

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.14. Poor Responder grubundaki hastaların demografik özellikleri	44
4.15. Tedavi sonunda elde edilen follikül sayılarının oranı	45
4.16. Poor responder hastalarda Ala307Thr polimorfizminin genotip dağılımı	46
4.17. Poor responder hastalarda Ser680Asn polimorfizmin genotip dağılımı	46
4.18. Poor responder hastalarda genotipler ve diğer parametreler arasındaki ilişki	48
4.19. Poor responder hastalardaki genotipler ve diğer parametreler arasındaki ilişki	50
4.20. Ala307Thr polimorfizmi açısından üç grup arasındaki dağılım	52
4.21. Hastaların yaş dağılımları	54
4.22. Farklı genotipler için yaş dağılımları	54
4.23. Ala307Thr polimorfizmi poor ve good responder hastaların genotipe göre demografik özelliklerinin dağılımı	55
4.24. Ser68Asn polimorfizmi açısından üç grup arasındaki dağılım	56
4.25. Farklı genotipler için yaş dağılımları	57
4.26. Ser680Asn polimorfizmi poor ve good responder hastaların genotipe göre demografik özelliklerinin dağılımı	58

1. GİRİŞ VE AMAÇ

FSH, puberte döneminde seksüel olgunluğa erişme ve gonadal gelişim, fertilité döneminde ise gamet üretimi için gerekli bir hormondur. FSH, testislerde sertoli hücrelerinin plazmalemmasında, ovaryumlarda ise granuloza hücrelerinde lokalize FSH reseptörü yoluyla etkisini göstermektedir. Fertilitede FSH anahtar role sahiptir. Günümüze değin yapılan araştırmalarda, kromozom 2p21’de lokalize olan FSH reseptör geninde (OMIM 136435) pek çok inaktive edici mutasyonlar ve tek nükleotid değışimleri (SNP) saptanmıştır. İnfertilite nedeniyle kontrollü overyan hiperstimülasyon (KOH) uygulanan hastalarda, verilen tedaviye yanıt oranında FSH reseptöründeki mutasyonların etkili olabileceğı düşünölmektedir. National Centre for Biotechnology Information (NCBI) bilgi bankasında FSHR için tanımlanmış 731 mutasyon yer almaktadır. Bu mutasyonların her biri farklı şekillerde etki göstermektedir. Bunun yanı sıra FSH reseptöründe özellikle ekzojen olarak uygulanan FSH hormonuna overin yanıtını etkileyen tek nükleotid polimorfizmleri de (SNPs) belirlenmiştir. Saptanmış olan polimorfizmlerin çoğı FSH reseptörünü kodlayan genin intronik bölgelerinde yer almaktadır. FSH reseptöründe önemli iki polimorfik bölge bulunmaktadır. Bunlardan biri, 307. pozisyondaki aminoasit olup bu bölge özellikle ligand-reseptör etkilişiminde önemlidir. Diğeri ise, FSH sinyal iletiminde önemli rol oynayan 680. pozisyondaki aminoasittir. Bu polimorfizmlerden Ala307/Ser680 (AS) ve Thr307/Asn680 (TN) farklı etnik gruplarında en sık görölen polimorfizmlerdir. Bu polimorfizmler karşımıza 9 farklı kombinasyonda çıkmaktadır: TN/AN, TN/TS, AS/AN, AS/TS, AN/AN, TS/TS, TN/TN, TN/AS, AS/AS. Japon popölasyonunda, TN/TN %41, TN/AS %46.9, AS/AS %12.1 sıklıkla görölmektedir. IVF’ye başvuran Koreli olgularda ise TN/TN %41.8, AS/AS %12.5 ve TN/AS %45.6 sıklıkla bulunmuştur. Ayrıca, polikistik over sendromlu olgularda TN/AS %66.7 sıklıkla görölürken, normal overli kadınlarda ise %42.5 sıklıkla olduğı belirlenmiştir. Basal FSH düzeyi artmış subfertil olgularda normal kadınlara göre TN/AS, AS/AS, TN/TS, AS/AN, AS/TS, TS/TS varyantlarının daha sık olduğı görölmüştür. Araştırmamızda, tedaviye zayıf cevap veren (poor response) ve tedaviye iyi cevap veren (good response) hastalardaki FSH reseptör polimorfizmlerini (NG_008146.1)(307 ve 680 pozisyonları), fertil kadınlardaki FSH reseptör genotipleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Gonadal fonksiyonların düzenlenmesi gametogenezis ve steroidogenezis denilen işlemlerle oluşur. Tüm bu işlemler hipotalamustan salınan ve dekaeptid bir hormon olan gonadotropin-releasing hormone (GnRH)'na bağlı olarak gerçekleşir. Aynı zamanda hipofizden salınan luteinizing hormone (LH)'nın ve follicle-stimulating hormone (FSH)'nin de çok önemli fonksiyonları vardır. Human chorionic gonadotropin (hCG) ile birlikte bu hormonlar androjen, estrogen, progesteron sentezini gerçekleştirmektedir. Follikül ve sperm matürasyonunu, ovulasyonu ve erken gebeliğin devamını sağlarlar. Follikül maturasyonu, ovulasyon ve erken gebeliğin devamı tüm bu hormonlara bağlı olarak gerçekleşmektedir.

Yapısal olarak, bu üç gonadotropin (hCG, FSH, LH) ve tiroid-stimulan hormon (TSH) heterodimer olarak oluşurlar ve ortak bir α subünitine sahiptirler.

2.1. Gonadotropinler

2.1.1. Gonadotropinlerin yapı ve fonksiyonları

LH ve FSH yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteinlerdir. LH yaklaşık 28.000, FSH ise yaklaşık 37.000 dalton ağırlığındadır. Ortak bir α subünitine sahiptirler ve yaklaşık 14.000 dalton ağırlığındadır (92 aminoasitten oluşmuştur) (1). Alfa subünit aynı zamanda TSH'de ve hCG'de de benzer şekilde bulunur. Beta subünit tüm bu hormonlarda farklı yapıdadır ve farklı biyolojik aktiviteye yol açar. α ve β subünitleri disülfid bağları ile birbirlerine bağlanmışlardır.

FSH'nin β alt ünitesinde 118 aminoasit vardır. Her alt ünite (α ve β) iki adet olmak üzere 4 adet karbonhidrat yan zincire sahiptir. LH'nin β alt ünitesi 121 aminoasitten oluşur. LH tek bir glikozilasyon noktası bulunan 3 karbonhidrat yan zincirine sahiptir (FSH'deki sialik asidin yarısından daha azı). İçerdikleri sialik asit sayısı, hormonun yapısal kuvvetini artırır. LH içerisinde 2 tane sialik asit vardır ve yarılanma ömrü yaklaşık 30 dakika iken, FSH'de 5 tane sialik asit olması nedeniyle yarılanma ömrü 230 dakikadır.

İki hormon sinerjik olarak etki etseler de, LH asıl olarak teka hücrelerini uyarak steroidogenezisi sağlar. FSH ise asıl olarak granüloza hücrelerini uyarak folliküler gelişmeyi sağlar. Puberteye kadar FSH sekresyonu, LH sekresyonundan daha fazla miktardadır. Normal menstruel siklusların ortaya çıkması ile bu miktarlar tam ters

olarak belirtmeye başlar. Menopoz sonrası dönemde ise tekrar puberte öncesi döneme benzer oranlar ortaya çıkar. Reprodüktif dönem boyunca FSH salınımındaki engellemeler kandaki estrogen ve inhibin tarafından gerçekleştirilmektedir.

2.1.1.1. FSH'nin fonksiyonları

Ovulasyona ulaşacak olan follikül siklusun ilk birkaç gününde belirlenmektedir (2). Folliküllerin erken büyümesi birkaç menstrüel siklusu kapsayan zaman dilimi içinde meydana gelmektedir. Fakat ovulatuar follikül son luteal-folliküler faz geçişindeki hazırlanan folliküllerin içinden birisidir. Preovulatuar konuma gelebilmek için gerekli olan toplam süre 85 gündür. Bu konseptte uygun olmak üzere, büyümenin çoğu (son aşamalara kadar) gonadotropin uyarımından bağımsızdır. Sonuçta bir follikül atreziye gitmekten FSH ile kurtulur. FSH'ye cevap verecek folliküler (2-5 mm büyüklükte) hazır bulunmaktadır. FSH artışı, bir follikülün atreziye gitmesini engelleyerek ovulasyona uğrayacak olan follikülün seçimi yapılmış olur. Dolaşımdaki FSH düzeylerindeki artışın devam ettirilmesi kritik bir öneme sahiptir. Bu artış gerçekleşmez ise, follikül gelişimi durmakta, apoptozis gerçekleşmektedir.

Gelişen follikülde FSH'ye yanıt olarak, granüloza hücreleri ile oosit arasında küçük boşluklar meydana gelmektedir. Bu aralıklar granüloza hücreleri ve oosit arasındaki nütrisyonel metabolit değişiminin yapıldığı yollardır.

Granüloza hücreleri ile oosit arasındaki ve granüloza hücreleri üzerinden iletişim bu aralıklardaki küçük moleküllerin değişimi ile sağlanmaktadır. Bu aralıklar konneksin olarak bilinen protein düzenlemeleri ile oluşan kanallardan oluşmaktadır. Bu konneksin aralıklar granüloza hücrelerinin büyüme ve çoğalması için gerekli olup, nütrisyonu ve oosit büyümesinin düzenlenmesini sağlamaktadır. Ovarian folliküllerdeki konneksin ekspresyonu FSH ile artmakta ve LH ile azalmaktadır.

Folliküler büyümenin başlaması gonadotropin uyarımından bağımsızdır. Gonadotropin eksikliği oluşturulan mutant farelerde gözlenen başlangıç dönemimdeki büyümenin devam etmesi bu fikri desteklemektedir. Çoğu durumda bu büyüme sınırlandırılmakta ve atrezi ile sonuçlanmaktadır. İnsan ovarian follikül çalışmalarında FSH reseptörleri için gen ekspresyonu ancak primordial follikül büyümesi başlatıldıktan sonra tespit edilmektedir (3). Ayrıca FSH beta alt ünite geninde inaktive edici mutasyonu olan kadınlarda, antral follikül mevcut olmakla beraber, ileri büyüme ve ovulasyon görülmemektedir. Ekzojen FSH ile tedavi, FSH eksikliği olan kadınlarda

folliküler büyüme, ovulasyon ve gebelik ile sonuçlanmaktadır. Folliküler büyüme, ancak FSH normal düzeylerde ise devam etmektedir.

Luteal fazda, steroidogenezisteki azalma ve inhibin A sekresyonundaki azalma, bir sonraki menstruel siklusun başlangıcından birkaç gün öncesi FSH'nin artışına izin vermektedir. Bu önemli olayın zamanlaması FSH immünoassay çalışmalarından elde edilen bilgilerle saptanmıştır. Bu FSH bioaktivite artışının, mid-luteal fazdan geç-luteal faza kadar gerçekleştiği hassas FSH bioaktivite ölçümleri kullanılarak saptanmıştır (4).

Preantral follikülün granüloza hücreleri, steroidlerin her 3 sınıfını da sentez edebilme yeteneğindedir. Ancak androjen ve progestinlere oranla çok daha fazla östrojen yapılmaktadır. Aromataz enzim sistemi andojenleri östrojenlere dönüştürerek ovarian östrojen yapımını sınırlayan faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Aromatizasyonu indükleyen veya aktive eden FSH'nin kendisidir. FSH'nin kendi reseptörüne bağlanması ve adenilat siklaz iletimli uyarının ortaya çıkmasını birçok mRNA'nın sentezi takip eder. Hücre proliferasyonu, diferansiasyonu ve fonksiyonundan sorumlu proteinler kodlanır. Böylece, FSH hem granüloza hücrelerindeki steroidogenezi (östrojen yapımı) başlatmakta, hem de granüloza hücrelerinin büyümesini uyarmaktadır.

FSH, östrojen ile birlikte hareket ederek granüloza hücrelerinde sinerjistik mitotik etki gösterir ve proliferasyonu uyarır. FSH ve östrojen birlikte, FSH reseptörlerinin hızlı çoğalmasını uyarmaktadır. Bu durum, kısmen, granüloza hücrelerinin sayısının artışını da yansıtmaktadır. Östrojenin erkenden ortaya çıkması ile follikülün nispeten düşük FSH konsantrasyonlarına yanıt vermesine ve östrojenin follikül içindeki otokrin fonksiyonuna olanak sağlamaktadır. Büyüme ilerledikçe granüloza hücreleri farklı hücre popülasyonlarından oluşan bir çok subgruplara farklılaşmaktadır.

Düşük konsantrasyonlarda androjenler kendi aromatizasyonunu artırır ve östrojen yapımına katkı sağlar. Daha yüksek düzeylerde ise, aromatizasyonun sınırlı kapasitesi aşılmakta ve follikül androjenik, hatta en sonunda atretik hale gelmektedir. Folliküllerin gelişimi ancak FSH yüksek ve LH düşük olduğu sırada ortaya çıkmışlar ise devam edecektir. Luteal faz sonunda veya takip eden siklusun erken döneminde ortaya çıkan bu folliküller, granüloza hücrelerindeki aromatizasyonun hakim olduğu ortam tarafından korunacaktır. Bir follikülün başarısı androjenik mikro çevreyi östrojenik mikro çevreye dönüştürebilme yeteneğine bağlıdır (5,6).

Östrojen ve FSH'nin sinerjistik etkisi ile granülozanın intersellüler boşluklarında biriken follikül sıvısının yapımı çoğalır. Follikül aşamalı olarak antral safhaya geçtikçe

kavite oluşturma eğilimi belirlemektedir. Follikül sıvısının birikmesi ile, oosit ve onu çevreleyen granüloza hücrelerinin spesifik endokrin ortamlarında beslenmesi sağlanmaktadır. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri artık kümülüs ooforus'u oluşturmaktadır. Bu kümülüs ooforus'un farklılaşması oositten köken alan sinyallerle gerçekleşmektedir (7).

FSH varlığında östrojen follikül sıvısındaki ana madde halini almaktadır. Buna karşın, FSH yokluğunda, androjenler hakim olmaktadır (8). Normalde, midsiklusa kadar follikül sıvısında LH bulunmamaktadır. Plazma ve antral sıvıda LH'nin erken olarak yükselmesi durumunda granülozadaki mitotik aktivite azalmakta, dejeneratif değişikler başlamakta ve follikül içindeki androjen düzeyleri artmaktadır. Bu nedenle, granüloza hücrelerinin sürekli artışı ve folliküler büyümenin devamı için östrojen ve FSH'nin hakim durumda olması zorunludur. Granülozadaki yüksek proliferasyon oranları ile antral folliküler yüksek konsantrasyonda östrojen içerirler. En düşük androjen/östrojen oranları içeren folliküller, sağlıklı oosit barındırma ihtimalleri en yüksek olanlardır (9). Androjenik ortam östrojen uyarımlı granüloza proliferasyonunu engellemekte ve sürekli olduğu takdirde, oositteki dejeneratif değişiklikleri uyarmaktadır.

İki-hücre, İki Gonadotropin Sistemi: İki hücre sistemi overdeki folliküler steroidogeneizde geçen olayları açıklamak için ortaya atılan bir hipotezdir (10). İlk defa 1959'da Falck tarafından yapılan bu hipotez, spesifik steroid üretim yeri hakkındaki bilgiler ile hormon reseptörlerinin görölmesini ve önemini birleştirir (2).

FSH reseptörleri granüloza hücrelerinde bulunur ve FSH'nin kendisi tarafından indüklenir. LH reseptörleri teka hücreleri üzerinde bulunurlar, ancak siklusun başlangıç dönemlerinde granüloza hücreleri üzerinde bulunmazlar. Follikül büyüdükçe FSH, LH reseptörlerinin granüloza hücreleri üzerinde ortaya çıkmasını indükler. FSH granüloza hücrelerinde aromataz enzim aktivitesini indükler.

Primordiyal follikülün bir preantral folliküle değişimi hormonlardan bağımsızdır. Bu büyümedeki başlangıç basamağını yönlendiren uyarı bilinmemektedir. Fakat devam eden büyüme FSH uyarımına bağılıdır. Granüloza hücreleri FSH'ye yanıt verdikçe, proliferasyon ve büyüme FSH reseptörlerinde bir artışa yol açmaktadır. Bu etki, FSH'nin kendisine özgü bir etkidir. Fakat bu etki ayrıca otokrin ve parakrin peptidler tarafından önemli derecede

arttırılmaktadır. Teka hücreleri LH'ye yanıt olarak steroidojenik aktivite göstermeleri ile ayrı bir yere sahiptir ve bunu p450scc, p450c17 ve 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz genlerinin transkripsiyonu ile yaparlar. Bu durum spesifik olarak androjen üretimi ile sonuçlanır. Androjenlerin östrojenlere aromatisasyonu, granüloza tabakasında, p450aromataz geninin aktivasyonu ile FSH tarafından indüklenen özel bir aktivitedir. Teka tabakasında üretilen androjenler, granüloza tabakasına diffüz etmelidir. Granüloza tabakasında bunlar östrojenlere dönüştürülür ve periferel dolaşımdaki artan östradiol seviyesi, östrojenin geri teka tabakasına ve kan damarları içine salınımını yansıtır (2).

Teka ve granüloza hücreleri otokrin ve parakrin faktörler olarak çalışan peptidler salgılar. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) teka hücrelerince salgılanır ve teka hücrelerinde LH uyarımına bağlı androjen üretimini güçlendirir. Aynı zamanda granüloza hücrelerinde FSH aracılı aromatisasyonu güçlendirir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, insan overindeki folliküllerde hem granüloza hem de teka hücrelerinde endojen insülin benzeri büyüme faktörünün IGF-2 olduğunu göstermektedir (11). İnsan over dokusunda IGF-1'in aktivitesini gösteren çalışmalar, IGF-1 ve IGF-2 aktivitelerinin yapı olarak insülin reseptörüne benzeyen tip 1 IGF reseptörü aracılığıyla olduğu gerçeği ile açıklanabilir. Granüloza hücrelerinin üzerindeki FSH reseptörlerinin düzenlenmesi nispeten karmaşıktır. FSH'nin kendi reseptör geninin aktivitesini siklik AMP aracılı mekanizma ile arttırmasına rağmen, bu işlev epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve bir gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) benzeri protein gibi inhibitör ajanlar tarafından etkilenmektedir. İnhibin ve aktivin, granüloza hücrelerinde FSH'ye yanıt olarak üretilirler. Aktivin, özellikle de FSH reseptörlerinin üretim yolu ile FSH'nin aktivitelerini güçlendirme gibi önemli bir otokrin rol üstlenir. İnhibin hormonu, teka hücrelerinde ve granüloza hücrelerinde östrojen aromatisasyonuna substrat sağlamak için LH uyarımına bağlı androjen sentezini arttırır. Aktivin ise androjen sentezini baskılar. Teka hücrelerinde inhibin ve aktivin tarafından gerçekleştirilen androjen üretimin önemli parakrin düzenlemesi, başlıca steroidojenik enzimlerin, özellikle de p450c17'nin, ekspresyonunda düzenleme yoluyla gerçekleştirilir.

Ovulasyon sonrası lüteinize olmuş granüloza tabakasının dominansı, yeterli sayıdaki LH reseptörünün preovulatar indüksiyonuna bağlıdır. Bu

nedenle de yeterli FSH aktivitesine bağılıdır. Ovulasyon öncesi granüloza tabakası, bir FSH aracılı aktivite olan aromatazasyon aktivitesi ve teka hücresi kaynaklı androjenlerin östrojenlere dönüşümü ile karakterizedir. Ovulasyon sonrası, bir LH aracılı aktivite olarak, granüloza tabakası direkt olarak kan akımına progesteron ve östrojen salgılar.

Granüloza ve teka hücrelerinin her ikisi de in vitro olarak gösterilebilen bir androjen aromataz sistemine sahiptir. Fakat, in vivo olarak folliküler fazda granüloza tabakasının aktivitesi teka tabakasının aktivitesinden birkaç yüz kez daha fazladır ve bu nedenle büyüyen follikülde östrojenin biyosentetik kaynağı granüloza hücresidir (12). Granüloza hücrelerinde p450c17'nin olmaması dolayısıyla granüloza tabakasındaki aromatazasyon hızı direk olarak teka hücreleri tarafından sağlanan androjen substratına bağılıdır. Dolayısıyla, ovulasyon öncesi follikül tarafından östrojen salgılanması, iki hücrenin (teka ve granüloza) LH ve FSH'nin birlikte uyarımının sonucunda oluşur.

İnhibin-B isimli madde dolaşıma granüloza hücrelerinden salgılanmakta, FSH'nin hipofizden salınımını baskılamakta, böylece tek bir follikül dominansı elde edilmektedir. FSH'nin reseptörlerinin azalması, dominant olmayan folliküllerin granüloza hücrelerinde ilk gelişen reaksiyondur. FSH'nin azalması, FSH bağımlı aromataz aktivitesinde azalmaya yol açmakta ve daha az ölçüde olgunlaşmış folliküllerdeki östrojen yapımı sınırlandırılmaktadır (2).

2.1.2. Hipofizer gonadotropin salınımı

Gonadotropinlerde ortak olan alfa alt ünitesinden sorumlu olan gen hem hipofizde hem de plasentada bulunur (2). Beta alt ünitesinde durum farklıdır. hCG'nin β alt ünitesinden sorumlu gen çoğunlukla plasentada ve az miktarda hipofizde bulunur. LH'nin β alt ünite geni ise tam tersi olarak çoğunlukla hipofizde ve az miktarda plasentada bulunur (13-14).

Hem FSH, hem de LH esas olarak hipofizin lateralinde yer alan ve pulsatil GnRH salgısına cevap veren küçük hücrelerden salgılanır (2). GnRH etkisi kalsiyum bağımlı olup, protein kinazı ve siklik AMP aktivitesini uyarmak için ikincil haberci olarak 1,4,5-trifosfat (IP3) ve 1,2-diaçilgliserolü (1,2-DG) kullanır (15). Bu etki için G protein reseptörlerinin olması ve hücre içi kalsiyumun siklik olarak salınması ve kalsiyum kanallarının açılması ile birlikte hücre dışı kalsiyumun da içeri girmesi

gerekir. Sonuç olarak kalmodulin, protein kinaz ve cAMP, GnRH etkisi için aracı görevi görürler. GnRH reseptörleri GnRH'nin kendisi, inhibin, aktivin ve seks steroidleri gibi birçok faktör tarafından düzenlenir (16). GnRH'nin yüksek dozda sürekli olarak verilmesi sonucunda gonadotropinlerde görülen düşme yalnızca reseptörlerdeki azalmaya değil, aynı zamanda desentizasyona da bağlıdır.

Gonadotropin sentezi ilk olarak granüler endoplazmik retikulumda gerçekleştikten sonra sentezlenen hormonlar golgi cisimciğinde sekretuar granüller halinde depolanır. Sekresyon için olgun sekretuar granüllerin hücre membranına migrasyon yapması ve GnRH uyarısıyla membran permeabilitesinde artma olup sekretuar granüllerin dışarı boşaltılması gerekir. Gonadotropin sentezindeki hız kısıtlayıcı basamak GnRH bağımlı β alt ünite miktarıdır.

GnRH'nin hipofizde reseptörüne bağlanması sonucunda birçok etki oluşur. GnRH'nin hipofizi uyarması sonrasında görülen en erken yanıt gonadotropin salgılanmasındaki artma, geç yanıt ise yeni bir sekresyona hazırlıktır. Geç yanıtla bağlı olarak yeni bir GnRH pulsu ile görülen sekresyon beklenenden daha fazla olur ve bu karmaşık bir biyokimyasal ve biyofiziksel olaylar zincirinin ardından meydana gelir. Bu kendi kendine işleyen sistem, siklus ortasında ortaya çıkan LH piki için önemlidir. Aynı zamanda bu sistem östrojen maruziyeti (çünkü östrojen progesteron reseptörlerini artırır) ve GnRH ile birlikte uyarılan fosforilasyon yoluyla aktive edilmiş progesteron reseptörleri gerektirir. Bu da steroid hormon reseptörleri ile peptit hormon reseptörleri arasındaki etkileşimin bir örneğini oluşturmaktadır.

Ön hipofizde gonadotrop, laktotrop, tiotrop, somatotrop ve kortikotroplar olmak üzere 5 sekretuar hücre grubu yer almaktadır. Ön hipofizdeki bu hücrelerin salgıları yalnızca hipotalamik serbestleştirici hormonlar ve geriye dönük etkileri altında olmayıp, parakrin ve otokrin etkileşimlerin de içinde bulunduğu karmaşık bir kontrol mekanizmasına işaret etmektedir. Her ne kadar GnRH sistemi ana mekanizma olsa da, diğer hipotalamik peptidler de GnRH sekresyonunu etkilemektedir. Peptidler GnRH ile hipofizde etkileşirler ve gonadotropları (örn.: oksitosin, CRP ve nöropeptid Y) direkt etkileyebilecekleri hipofize taşınabilirler veya hipofizden indirekt olarak FSH ve LH sekresyonunu uyarıp aktif maddelerin yapımını artırarak (örn. Galanin, interlökinler) etki gösterebilirler. Otokrin ve parakrin aktiviteler hipofiz tarafından yapılan peptidleri içerir.

2.1.3. Gonadotropinlerin etki mekanizması

Tropik hormonlar hipotalamustan kaynaklanan salgılatıcı hormonları ve hipofiz ile plasentadan salgılanan bir takım peptid ve glikoproteini içerir. Tropik hormonun özgülüğü hedef dokunun hücre membranında reseptör varlığına bağlıdır. Tropik hormonlar fizyolojik olayları stimüle etmek için hücre içine girmezler, hücre yüzeyinde bir reseptör ile birleşirler.

Hücre membranındaki reseptör aktif bir ajan olarak işlev görür. Bağlanma sonrası bir iyon kanalı gibi çalışır veya bir enzim gibi fonksiyon görür. Alternatif olarak reseptör protein hücre içi bir iletici olan aktif ajana bağlanır. Temel hücre içi iletici moleküller; siklik AMP, inositol 1,4,5-monofosfat (IP3), 1,2-diaçil-gliserol (1,2-DG), kalsiyum iyonu ve siklik guanozin 3',5'-monofosfattır (siklik GMP).

Bu membran ailesinin reseptörleri aynı zamanda lizozim, endoplazmik retikulum, golgi kompleksi membranlarında ve çekirdek içinde de bulunur. Bu hücre içi organel reseptörlerinin düzenlenmesi hücre yüzey membranından farklıdır.

Siklik AMP; FSH, LH, HCG, TSH ve ACTH için hücre içi ileticidir. Tropik hormonun yapısındaki veya reseptörün yapısındaki değişiklikler, hücresel bağlanmayı ve fizyolojik aktiviteyi bozabilir.

FSH, LH ve hCG iki tane G-protein-coupled reseptör (GPCRs) üzerinden etki eder. Gonadotropin reseptörleri tipik olarak geniş ekstrasellüler parça içerirler ve bu parçada yaygın lösin'den zengin tekrarlayan bölgeler mevcuttur. Bu ekstrasellüler parça, ilgili hormonu tanıma ve bu hormona yüksek afiniteli bağlanmayı sağlar. LH reseptörü (LHR) hem LH'yi hem de hCG'yi tanıırken, FSH reseptörü (FSHR) FSH'ye spesifiktir. LHR'nin eksprese olduğu hücreler teka, leydig, granüloza ve luteal hücrelerdir. FSHR ise granüloza ve sertoli hücrelerinde eksprese olmaktadır.

G proteinlerin yapısını ve aktivitesini değiştiren mutasyonlar bir hastalık ile sonuçlanabilir (17). G proteininde veya bir reseptörde fonksiyon kaybı mutasyonları, hormon eksikliği sendromlarıyla sonuçlanacaktır. Örnek olarak; TSH reseptörü ve hipotiroidizm, LH reseptörü ve erkek psödohermafroditizm, FSH reseptörü ve prematür over yetmezliği söylenebilir.

2.1.4. Gonadotropinlerin düzenlenmesi

Peptid hormon mekanizmasının modülasyonu, hedef doku yanıtının güçlendirilmesi veya azaltılması için önemli bir biyolojik süreçtir. Tropik hormon aktivitesinin düzenlenmesi 4 ana kısma bölünebilir.

- 1) Otokrin ve parakrin düzenleme
- 2) Tropik hormonların heterojenitesi
- 3) Reseptörlerin up/down regülasyonu
- 4) Adenilat siklaza düzenlenmesi

FSH ve LH gibi glikoproteinler yalnızca basit proteinler değildir. Farklı immünolojik ve biyolojik aktiviteye sahip heterojen formlar ailesi olarak görülmelidirler (18). Farklı formlar (izoformlar) farklı DNA promotor aktiviteleri, RNA ayrılmasında değişiklikler, nokta mutasyonları ve post-translasyonel karbonhidrat değişikliklerini içeren farklı yollardan ortaya çıkarlar (19). Varyasyonların önemi, yapıyı ve metabolik klirensi değiştirmesi ve böylece bağlanmayı ve aktiviteyi etkilemesinden dolayıdır. İzoformlar, farklı moleküler ağırlıklara, farklı dolaşım yarı ömürlerine ve farklı biyolojik aktivitelere sahiptir. Menstruel siklus boyunca FSH ve LH'nin en az 20-30 izoformu kan dolaşımında bulunur. Bir glikoprotein nihai aktivitesi bu durumda hedef dokuya ulaşan ve bağlanan formların karışımının etkilerine bağlıdır.

Tropik hormonların kimyasal yapısının doğruluğu, hormonun reseptörü ile birleşme yeteneğinin belirlenmesinde temel bir paya sahiptir. Glikoproteinler (FSH, LH, TSH, hCG) iki glikolize edilmiş polipeptid alt ünitelerinden oluşan dimerlerdir; α ve β alt üniteleri. Alfa ve beta alt üniteleri non-kovalent bağlarla birbirlerine sıkıca bağlanmıştır. Alt ünitelerin 3 boyutlu yapısı ve aktif konformasyonu internal disülfid bağları ile sağlanır (20). İnsan türündeki tüm glikopeptidler 92 aminoasidi içeren ortak bir α zincirini paylaşırlar. Beta zincirleri (veya β alt üniteleri) hem aminoasit hem de karbonhidrat içeriği açısından farklılık gösterirler ve bu da hormonlar ile onların reseptörleri arasında var olan özgüllüğü sağlar. Bu nedenle, bir glikopeptid hormonun biyolojik aktivitesinin özgüllüğü β alt ünite tarafından belirlenir.

FSH β alt ünitesi için olan gen kromozom 11p13'te yer alır ve hipofizdeki aktiviteden belirgin bir biçimde etkilenir (21). FSH ve LH'nin her ikisinin de GnRH ile uyarılmaya gereksinim duymalarına rağmen, FSH β geni, GnRH'ye yanıtın aktivine bağımlı olması ile özeldir (22). GnRH stimülasyonunun artması ile aktivinin rolü,

aktivin bağlayıcı protein olan follistatin tarafından engellenir. Aktivin ayrıca inhibin tarafından antagonize edilir.

2.2. Gonadotropinlerin Teşhis ve Tedavi Uygulamaları

Hipofizden elde edilen gonadotropinlerin serum konsantrasyonlarının immünoassay bazlı ölçümleri, hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen fonksiyonunu izlemek için geniş bir şekilde kullanılmıştır. hCG'nin üriner konsantrasyonları da gebelik tayin ve yönetimi için geniş şekilde kullanılmıştır; bu ölçümler aynı zamanda trofoblastik kanserleri izlemek için de kullanılmaktadır. Ek olarak, çalışmalar göstermiştir ki, hiperglikozile hCG down sendromu gebeliklerini ortaya çıkarmak için kullanılabilir (23-25). Burada diğer serum markerları α -fetoprotein ve estradiol ile beraber kullanılır. Fakat uzun zamandan beri bilinmektedir ki, glikoproteinlerin çok fazla çeşitleri vardır ve bu mikro-makro heterojenliğe yol açar (26). Mesela, hCG ele alındığında, analizler şunları tespit etmeye yetkin olmalıdır: Tam veya heterodimerik hormon, hCG β 43-48 bölgesinde bağ bulunan heterodimerik hormon, serbest α ve β subüniteleri, iki disülfid-bağlı parçadan oluşan ve 6-40 ile 55-92 bağlı bulunan hCG β çekirdek parçası (27). Birçok çalışma ve rapor, uygun standartların elde edilmesi ve kullanılması konusundaki zorlu çalışmalara işaret etmektedir (28-30). Evrensel standartların hazırlanması ve kabul edilmesi, antikor spesifikliğin tamamen tanımlanması ve açıklanması ile birlikte glikoprotein hormon immüno-assayların standart hale getirilmesini büyük ölçüde mümkün kılacaktır.

Vücut sıvıları içerisinde hormon konsantrasyonlarını bulmak için immüno reaktivite önde gelen teknik olmasına rağmen çoğu zaman biyoaktiviteyi de ölçmek gerekmektedir. Glikoprotein hormonlar için kullanılan eski in vivo analizler transfer edilmiş hücrelerde reseptör ve sinyal analizleriyle yer değiştirmiştir. Böyle ölçümler hormon reseptör bağlanması ve sinyal iletim etkinliği hakkında sayısal veri sağlarlar. Fakat sirküler yarı ömür ve böylece in vivo potansiyel hakkında bilgi vermezler. Bu yüzden, hayvan ve insan çalışmaları gerekmektedir.

Gonadotropinler infertilitenin tedavisinde kullanılır. FSH ve TSH'nin aktif olan uzun yarı ömürlü analoglarının üretiminde, hCG uzun süreler etkin olarak kullanılmıştır (31-35). FSH'nin yarı ömrünü uzatmak için kullanılan diğer bir başarılı yaklaşım α N-terminalinin N-glikozilasyonlu iki noktasının uzatılmasıdır. Meydana gelen FSH analogu glikoziledir (36). Bu analogun glikozile olduğu, sodyum dodesilsülfat

poliakrilamid jel elektroforezindeki (SDS-PAGE) hareketiyle anlaşılmaktadır. Bu FSH analogu, artmış sirküler yarı ömür ve invivo potansiyel gösterir.

Son zamanlarda özellikle hCG'nin terapötik olarak kanser tedavisinde kullanılabileceğini söyleyen raporlar çıkmıştır. Yeni bir faz-1 klinik çalışması meme kanserli menapoz sonrası hastalara hCG verilmesinin östrojen-progesteron reseptör seviyelerinde bir azalmaya yol açtığı göstermiştir (37).

Eski çalışmalar, hCG'nin ham ürünlerinin ve hCGβ'dan elde edilmiş peptidlerin kaposi sarkomu tümörlerinin gelişimini önlemekte faydalı olduğunu ortaya koymuştur (38,39). Başka bir çalışmada ise rekombinant hCG'nin farelerde ksenograft büyümesini önlemede sadece geçici olarak etkili olduğu gösterilmiştir (40). Bu alandaki çelişkilere rağmen bioaktif proteinlerin ve peptidlerin tanımlanması klinik uygulamalar için umut vermektedir.

LH'nin alzheimer hastalığının etiyolojisi ve ilerlemesinde oynayabileceği rol hakkında çalışmalar mevcuttur (41-43). LH'nin amiloid-β prekürsör proteinin oluşumunu ayarladığı ve bu şekilde amiloid-β peptid depolanmasını yaptığı gözlenmiştir.

Gonadotropinlerin gonadlar dışındaki organlarda gösterdikleri davranışları çelişkilidir. Fakat çok büyük klinik umutlar vaad ettiği için bu alan mutlaka araştırılmalıdır.

2.3. Gonadotropin Reseptörleri

2.3.1. Gonadotropin reseptör proteinleri

LH reseptörü (LHR) ve FSH reseptörü (FSHR) sırasıyla 675 ve 678 aminoasit uzunluğundadır. LHR ve FSHR'nin aminoasitleri, 'başlatıcı' metioninden itibaren numaralanmıştır (44-47). Sinyal peptidlerin en uygun kırılma noktalarını bildiren algoritmalar LHR için 24 aminoasit uzunluğunda sinyal peptidi ve FSHR için 17 aminoasit uzunluğunda sinyal peptidi şeklindedir. Bu yüzden, LHR ve FSHR'nun N-terminalleri sırasıyla leu25 ve cys18 olarak belirlenir.

TSH reseptörü ile beraber gruplandırıldığında gonadotropin reseptörleri, glikoprotein hormon reseptör ailesinin oluşturur. Bu reseptör ailesinde üç belirli bölge hemen tanınabilir: a) yaklaşık 300 aminoasit ihtiva eden ve hücre dışı olduğu tahmin edilen büyük bir N-terminal bölgesi, b) üç hücre dışı halka ve üç hücreler arası halka ile birbirine bağlı yedi transmembran parça ihtiva eden bir serpentin bölgesi, c) hücreler

arası yerleşik olduğu tahmin edilen bir C-terminal kuyruğu. Yedi transmembran parçanın bulunması, gonadotropin reseptörlerinin GPR'lerin (G protein aracılı reseptörler) süper ailesinin fertleri olduğu gerçeğine işaret eder (48-50).

Gonadotropin reseptörlerinin ekstra sellüler bölgelerinin (ECD) aminoasit dizilimi %46 oranında aynıdır. Bu bölge özel bir önem taşır çünkü hormonları ilgili reseptörlere yüksek derecede bağlanmaları ve tanınmalarından sorumludur (51). Üç alt bölgeye ayrılabilir: a) N-terminal sisteine bakımından zengin bölge, b) lösin ve diğer hidrofobik aminoasitler (LRR) bakımından zengin yapısal motifin birçok kopyasının meydana getirdiği bölge, c) aynı zamanda menteşe bölgesi olarak da bilinen bir C-terminal sistein bakımından zengin bölge.

FSHR'nin ekstra sellüler bölümünün (ECD) büyük bir kısmının kristal yapısı, bu önemli reseptörün üç boyutlu yapısı ve ligand bağlanmasında yer alması konusunda çok ihtiyaç duyulan bilgiler son dönemdeki çalışmalarla elde edilmiştir (52). FSH, FSHR ECD'sinin konkav yüzeyine sıkı bir şekilde bağlanır. Reseptör kendisini hormonun orta bölgesi etrafında sarar. Hormon ve reseptör arasındaki temas yüzey alanı büyüktür ve yüksek derecede elektrik yüklüdür.

Beklenildiği gibi reseptör bağlanmasında her iki hormon subünitesi de yer alır. Hormon için reseptör temasının önemli noktaları α ve β subünitelerinin C-terminal kısımları ve aynı zamanda α ve β halkalarıdır.

TSHR ECD ve TSHR otoantikor kompleksinin büyük bir kısmının kristal yapısı son zamanlarda ortaya konmuştur. TSHR ve FSHR arasındaki aminoasit sayıları farklı olmasına rağmen TSHR ECD'sinin bütün yapısı FSHR ECD'sininkine çok benzer (52). İlginçtir ki otoantikorları bağlayan TSHR yüzeyi, FSH'yi bağlayan FSHR yüzeyine son derece benzemektedir (52).

Kristal yapı, aynı zamanda FSH-FSHR kompleksinin bir dimer olduğunu göstermiştir. Bu bulgu birçok diğer metotla da doğrulanmıştır (52). Bir aminoasit, tyr110 glikoprotein hormon reseptörleri arasında tamamen korunmuştur. Bu, dimerdeki moleküller arası temasın çoğunu sağlar. Bu bulgu diğer glikoprotein hormon reseptör dimerleşmelerinin de muhtemel olduğunu gösterir. TSHR-TSHR antikor kompleksinin kristal yapısında herhangi bir dimer gösterilememiştir (52).

İki ECD kristal yapısında menteşe bölgesi yok olduğu için bunun ECD'nin bütün şekillenmesine veya reseptörlerine etkisi hakkında hiçbir şey bilinemez. FSHR'nin 1-268 aminoasitleri (kristal yapı için kullanılan parça) FSH'yi kuvvetli şekilde bağlar. Bu bulgu FSHR'nin menteşe bölgesinin bağlanmada yer almadığını

gösterir. Aynı şekilde, LHR'nin laboratuarda yapılmış ve doğal olarak bulunan birçok mutasyonu göstermektedir ki, LH veya hCG'nin kuvvetli bağlanması için LHR'nin menteşe bölgesi gerekli değildir. Bununla beraber, menteşe bölgesi kalıntılarının glikoprotein hormon reseptör ailesi içinde yüksek derecede korunması bu bölgenin reseptör fonksiyonunun diğer yönlerinde önemli bir rolü olduğunu düşündürür (örnek olarak aktivasyon) (53). Bu bölgede yüksek derecede korunmuş bir tyr'nin TSHR hücre yüzeyinde sülfatlanmış olduğu görülmektedir. Bu tyr'nin mutasyonu TSH bağlanması ve aktivasyonunu zayıflatır. LHR veya FSHR'de eşdeğer tyr'nin sülfatlanması gösterilememiştir. Fakat gonadotropin reseptörlerindeki bu aminoasidin mutasyonu da hormon bağlanması ve aktivasyonu zayıflatır (53).

LHR ve FSHR'nin transmembran (TM) bölgesinin aminoasit dizilimi %72 oranında aynıdır. Gonadotropin reseptörlerinin transmembran bölgesinin üç boyutlu yapısal şekli mevcut değildir. Fakat rodopsin kristal yapısı baz alınarak modeller hazırlanmıştır (54). Herkesin hemfikir olduğu bir nokta gonadotropin reseptörlerinin bu bölgede şekil değişikliğine uğradığıdır (55,56). Fakat bu değişikliklerin yapısı ve nasıl olduğu hakkında çok az bilgi vardır. İki yeni rapor göstermiştir ki LHR ve TSHR düşük molekül ağırlık bileşikler tarafından aktive edilebilir. Bunların ECD'den çok TM bölgesi ile etkileşim içine girdiği gözlenmektedir (57,58). Günümüzde LHR'nin düşük molekül ağırlıklı agonist jenerasyonu için kurşun bileşikler denetlenmektedir. Bunlar infertilite tedavisinde faydalı olabilir.

2.3.2. Gonadotropin reseptör genleri ve transkriptler

2.3.2.1 Genler

İnsan lutopin ve follitropin reseptörleri kromozom 2'nin kısa kolu üzerinde yaklaşık 200 kb açıkta yerleşmiş tek bir gen tarafından kodlanır. Kromozom 2'nin bu bölgesinde başka kodlayıcı gen bulunmaz.

LHR yaklaşık 70 kb uzunluktadır ve 11 exon içerir. FSHR yaklaşık 190 kb uzunluktadır ve 10 exon içerir. Reseptörlerin transmembran ve C-terminal bölgeleri, FSHR için exon 10 ve LHR için exon 11 tarafından kodlanır. Bu exonlar aynı zamanda her reseptörün ekstrasellüler parçanın menteşe bölgesinin C-terminal ucunda da kodlanır. LHR ve FSHR'nin 5' yan bölgeleri GC bakımından zengindir ve her iki genin de proksimal promotorları TATA kutularından yoksundur (59,60).

FSHR'nin kopyalama kontrolü hakkındaki çalışmalar çoklukla sıçan geni üzerinde yapılmıştır (60-66). Sıçan FSHR'sinin promotörü, kopyalama başlangıç noktasından yaklaşık 200 bp yukarısını ihtiva eder (60). Bu bölge, translasyon başlangıç noktasının yaklaşık 200 bp yukarı ucunda yerleşik bulunan iki kopyalama başlangıç noktası içerir (67).

2.3.2.2. Transkriptler

Çeşitli FSHR transkriptlerinin sayı ve özellikleri hakkındaki veriler çelişkilidir. Bu konudaki çalışmaların çoğu koyun ve fare modelleri üzerinde yapılmıştır (68,69). Değişik yapıştırmalardan oluşan ve muhtemelen belirli sinyal özellikleriyle fonksiyonel proteinlere çevrilmiş 4 değişik kopya bildirilmiştir (70). Bu kopyaların varlığı, bunların mümkün olan fizyolojik rolleri hakkında şaşırtıcı sorular akla getirirse de, şu önemle belirtilmelidir ki, çoğu durumda, böyle transkriptlerden meydana gelen proteinlerin varlığını gösteren veriler yetersizdir.

2.3.3. LHR ve FSHR'nin doğal mutasyonları

İnsan üreme hastalıklarıyla ilgili LHR ve FSHR'nin birçok doğal mutasyonu rapor edilmiştir (51,71-74).

LHR'nin fonksiyon kaybı veya aktifliğin yok olması ile ilgili doğal mutasyonlar polipeptid zinciri boyunca meydana gelir. Bunların hepsi başlangıç noktası mutasyonlarıdır. 46 XY kişilerde en şiddetli fenotip leydig hücreleri tamamen yokluğu (leydig hücre hipoplazi) ve psödohermaafrodizmdir. 46 XY kişilerde görülen daha ılımlı fenotipler hipospadias ve mikropenisi ihtiva eder (72,73). Kadınlarda LHR'nin aktivasyonunu yok eden mutasyonlar ise hipoestrogenemiye yol açar (72,73).

LHR'nin fonksiyon kaybına neden olan mutasyon birçok şekilde görülebilir. Bunlar, tek aminoasit mutasyonları, kesilmiş reseptörler oluşturan anlamsız mutasyonlar, küçük araya girmeler ve aradan çıkmalar olabilir. Bu mutasyonlardan bazıları hormon bağlanmasını önler, fakat hepsi LHR prekürsörlerinin olgunlaşmasını veya taşınmasını zayıflatır. Bu şekilde, hücre yüzeyinde olgun LHR'nin ifadesi ya tamamen kaybolur veya en azından kısmen azalır (51). Bu yüzden, bu kişilerin fenotiplerinde LHR'nin hücre yüzeyi değerinde net bir kayıp görülür.

Exon 10'nun silinmesiyle ilgili fenotipten özellikle bahsedilmelidir. Bu mutasyon, başlangıçta, normal seks karakterlerinin gelişmesine rağmen infertil 46 XY

bir kişide bulunmuştur (75). Heterolog hücre çizgisi ile ifade edilirse, exon 10 tarafından kodlanan aminoasitleri bulunmayan bir LHR yapısı hücre yüzeyine uygun bir şekilde taşınır. Bu reseptör LH ve hCG'yi kuvvetle bağlar (76). İlginçtir ki; bu mutant reseptörü ifade eden hücreler hCG'ye normal bir cevap verirler, fakat bunların LH'ye olan hassasiyetleri yaklaşık 40 kat azalmıştır. Bu yüzden, LHR'nin exon 10'u tarafından kodlanan aminoasitler, hormon bağlanmasıyla yer almazlar, fakat LH ile reseptör aktivasyonunda yer alırlar (fakat hCG ile değil).

LHR'nin doğal fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar heterojen yerleşim gösterirler. Ancak bugüne kadar rapor edilmiş tüm fonksiyon arttırıcı mutasyonlar exon 11 üzerine yerleşmiştir (51,72-74). Bütün bunlar tek nokta mutasyonlarıdır ve çoğu transmembran heliks 6 ve hücreler arası halka 3'e kümelenir. Bu mutasyonlardan dördü bir tek aminoasit (asp 578) ile ilgilidir. Sinyal iletiminde bu mutasyonların kısıtlanmış yerleşimleri LHR'nin serpentin bölgesinin algılanan önemi ile uyum halindedir. Bunların kısıtlanmış yerleşimleri, mutasyonları araştırmak için kullanılan metodların bir sonucu da olabilir.

LHR'nin fonksiyon kazanımı mutasyonları heterozigot erkek çocuklarda bulunmuştur ve bu çocuklarda belirli fenotipik özellikler görülmektedir (72-74). Fakat dişi taşıyıcılarda fenotip yoktur. Bütün bu mutasyonlar germline'dır. Asp578His mutasyonu buna dahil değildir. Bu mutasyon, leydig hücre adenomalı ve aşırı gelişmiş ergenlik gösteren birçok erkek çocuğunda, leydig hücrelerinin somatik bir mutasyonu olarak bulunmuştur (77-79).

FSHR'nin doğal mutasyonları sayı olarak daha azdır fakat sınıflandırma benzer şekilde yapılır. İnaktive edici mutasyonları ( rnek olarak ala189val ve pro419thr) taşıyan homozigot dişilerde görülen en şiddetli fenotip hipergonadotropik hipogonadizmdir. Burada follikül olgunlaşması, ilk adımın ötesinde kısıtlanır ve FSH'ye cevap tamamen yok olmuştur (72-74).

Heterozigot kişilerde daha ılımlı fenotipler görülür. Bunlar, sekonder amenore, gonadotropin rezistansı ve follikül gelişmenin sadece antral safhaya kadar olması şeklindedir. Homozigot erkeklerde fenotip bu kadar açık değildir. Sperm kalitesi azalır, fakat üretkenlik devam eder. Bu FSHR mutantlarının fonksiyonel özellikleri, bu mutantları heterolog hücre çizgilerinde ifade ederek çalışılmıştır. LHR'de olduğu gibi, bu mutasyonların çoğu FSHR'nin plazma membranına geçişini zayıflatır. Bu şekilde tam bir FSH bağlanma yoksunluğu ve bu yüzden de cevapsızlık meydana gelir. En azından bir tanesi (TM heliks 2'de ala419'un thr'ye mutasyonu) sinyal iletimini

zayıflatır. Fakat FSH bağlanması veya FSHR'nin plasma membranına uygun taşınması konusunda ya hiç etkisi yoktur, ya da çok az vardır (80).

FSHR'nin dört aktive edici mutasyonu tarif edilmiştir. Bunlar exon10'un iki kalıntısının iki mutasyonudur. Asp567asn, thr449ile ve thr449ala mutasyonları, tekrar eden, spontan overyan hiperstimülasyon sendromu olan kadınlarda keşfedilmiştir (81-83). Bu mutantlar heterolog hücre tiplerinde ifade edildiğinde, zayıf fakat gözlenebilir seviyede bir yapıcı aktivite gösterirler. Bunlar aynı zamanda hCG ve TSH'ye artmış bir hassasiyet gösterirler. FSH'ye olan hassasiyet normal seviyelerde tutulur ancak ekzojen verilen FSH preparatları ile aşırı yanıtlar elde edilmektedir (71). Bağlanma spesifikiğindeki bu son değışiklik, bu mutasyonları taşıyan kadınlarda bulunan overyan hiperstimülasyonun sebebidir. hCG hassasiyetini arttıran TSHR ECD'nin doğal mutasyonu, gebelik sırasında hipertiroidizm gösteren iki kadın hastada bulunmuştur (84).

FSHR mutasyonları overyan disgenezise ve yüksek gonadotropin seviyelerine yol açar. Erkeklerde ise değışik spermatojenik sorunlara yol açar (85,86). Ayrıca farelerde yapılan deneylerde FSHR geninde oluşturulan defektler sonucunda küçük uterus, küçük overler ve sterilitte sağlanmıştır (antral follikül oluşumundan önce follikülogenez engellenmiş) (87). Tek olarak ser680asn'de oluşmuş polimorfizmin, kontrollü overyan hiperstimülasyonda kullanılan ilaç dozunu anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (88).

Güncel birçok çalışmada, estrogen reseptör- α genindeki polimorfizmlerin de yardımcı üreme tekniklerinde kullanılan FSH tedavilerine yanıtta değışiklikler oluşturduğu bilinmektedir (89).

FSHR SNPs'lerin sadece 5 tanesi egzoniktir. Hepsi exon 10'a yerleşiktir. Sadece 4 tanesi bir kod değışikliğı meydana getirir (ala307thr, arg524ser, ala665thr ve ser680asn). En sık rastlanan ve en iyi çalışılmış olanlar ala307thr ve ser680asn'dir. Bunlar dengesiz durumdadır ve en çok bilinen allelik varyantlar, thr307/asn680 ve ala307/ser680 beyaz topluluklar arasında hemen hemen eşit olarak dağılmıştır. Birçok çalışma göstermiştir ki, yardımcı üreme tekniğı uygulaması sırasında FSH enjekte edilen ve ser680 FSHR allel taşıyan kadınlar FSH'ye karşı daha az hassastır. Ek olarak, normal menstrüel sikluslu kadınlarda yapılan çalışmalar, ser680 allel'in daha yüksek FSH serum seviyelerine ve hipomenoreye sebep olduğunu göstermiştir. Ala307 ve ser680 polimorfizm taşıyıcılarının varlığı kadınların over kanserinin bazı spesifik alt tiplerine karşı kolay etkilenir olmasına sebep olur. İlginçtir ki, heterolog hücre tiplerinde

ifade edilen ser680 veya asn680 FSHR konusunda çalışmalar, bu reseptörlerin fonksiyonel özelliklerinde herhangi bir değişiklik göstermemiştir.

2.4. Polimorfizm Nedir ?

Southern blot testi, kısıtlayıcı enzim aktivitesi ile üretilen değişik uzunluklardaki DNA fragmanlarını yansıtan spesifik bantları gösterir. Spesifik bir nokta farklı bir şekil olarak (southern blot testinde, dizin farklılığına bağlı farklı uzunluktaki bir DNA fragmanı) bir mutasyon gösterir. DNA dizinindeki bu farklılıklara 'kısıtlayıcı fragman uzunluk polimorfizmi' denir (tek nükleotid polimorfizmleri) ya da genellikle benign bir varyasyon olarak polimorfizmler denir. Bunlar sık varyasyonlardır; insan genomu yaklaşık 10 milyon polimorfizme sahiptir ve 3 milyondan fazlası da tanımlanmıştır. Bir polimorfizm tıbbi olarak önemli bir gen için genetik bir marker görevi görebilir. Polimorfizm kalıtımı Mendelyan düzenlemelere göre yönetilir. Polimorfizm, kromozomların spesifik alanlarını işaret eden bir belirteç gibidir. Belli polimorfizmler saptanarak belli kromozomlar tanınabilir.

2.5. Poor Responder Ve Good Responder Tanımlaması

Genel olarak, 3.gün serum FSH seviye ölçümü overyan rezervi göstermede en iyi belirteç gibi sayılsa da, siklustan siklusa farklılık gösterebilir (90,91). Bazı yazarlar bazal inhibin seviyeleri üzerinde durdularsa da spesifik değişiklikler saptayamamışlardır (92). Yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki, 3.gün yüksek FSH seviyesine sahip olan kadınlardan alınan granüloza hücrelerinden daha az miktarda steroid salınmakta, kültürlerde daha az viabilite göstermekte, düşük mitotik indekse sahip olmakta ve daha az miktarlarda IGF-I ve IGF-II salgılamaktadırlar (93).

Poor responder tanımı için literatürde kabul edilmiş ortak bir görüş bulunmamaktadır (94). Loutradis ve ark. yaptığı çalışmada, bir hastayı poor responder kabul etmek için şu kriterleri kullanmıştır (94): a) yardımcı üreme tekniği tedavisi sonrasında elde edilen oosit sayısının 3 veya daha az olması b) tedavinin son aşamasında hCG verilirken serum estradiol seviyesinin 500 ile 660 pg/ml arasında olması. Castro ve ark. ise poor responder kriteri olarak sadece oosit sayısının 3 veya daha az olmasını kabul etmişlerdir (95). Surrey ve ark. 2000 yılında yaptıkları çalışmada, literatürdeki tüm poor responder hastalar hakkında bulunan yayınları taramışlar ve bir derleme hazırlamışlardır (96). Literatür taramasında, poor responder

hasta tanımlamasında çok değişken kriterlerin seçildiği görölmüştür, ancak aynı kriterleri kullanan 4'ten fazla çalışmaya rastlanılmamıştır (96). Bazı araştırmacılar kriter olarak ultrasound görüntüsündeki matür follikül sayısının 5'den az olmasını baz alırken (97-106), bazı araştırmacılar 3.gün FSH seviyelerinin yüksek olmasını (6,5mIU/mL'den 15 mIU/mL'ye kadar değişen aralıklarda) kriter olarak almışlardır (107-114). Tedavi sonunda elde edilen E2 seviyelerinin düşük olması kimi araştırmacılara göre hastaya poor responder denilebilmesi için yeterli görölmüştür (99,102,103,105,107,109,113). Başka iki araştırmacı da tedavi sonunda elde edilen matür oosit sayısının 4'den az olmasını kriter olarak benimsemişlerdir (108,114).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta Seçimi

Çalışmamız, Mayıs 2009 ve Kasım 2010 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran hastalarda yapıldı. Çalışmaya katılan her hastaya çalışma hakkında bilgi verildi ve onam formları okutularak imzalatıldı.

Çalışma hakkında etik kurul onayı alınması için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Kuruluna başvuruldu. 19.10.2010 tarihli ve 160 nolu karar ile çalışmanın yapılmasında etik sakınca yoktur kararı alındı.

Kontrol grubuna seçilen hastalarda çalışmaya katılma kriteri olarak daha önce herhangi bir kontrollü overyan hiperstimülasyon protokolü uygulanmadan gebe kalmış hastalardan seçildi. Çalışmaya katılan kontrol grubu hastalarının hepsinde korunmasız ilişkiye başlanmasından sonra en geç bir yıl içinde gebelik oluşmuştur. Katılan hastaların yaş aralığı olarak 23 ile 39 arası belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Kontrol grubunda çalışmadan dışlanma kriterleri.

Kontrol Grubunda Çalışmaya Alınmama Kriterleri
Bilinen infertilite öyküsü
Yaş aralığı <23 , >39
Cinsel aktiflik sonrası herhangi bir kontrasepsiyon yöntemi kullanılmamasına rağmen 1 yıldan fazla gebelik oluşmaması

Good responder olarak belirlenen kategoriye alınan hastalarda önceden bir kontrollü overyan hiperstimülasyon tedavisi almış olmak ve bu tedaviye yanıt olarak elde edilen oosit sayısının 3'ün üzerinde olma kriteri arandı. Yaş aralığı olarak yine 23 ile 39 yaş arası çalışmaya dahil edildi. Ayrıca verilen infertilite tedavisi sonucunda yeterli E2 seviyesi olmayan ($E2 \leq 660$ pg/mL) hastalar bu gruba dahil edilmedi.

Poor responder olarak belirlediğimiz gruba ise dahil olma kriterleri olarak kontrollü overyan hiperstimülasyon sonrasında elde edilen oosit sayısının 3 ve daha az olması ve tedavi sonunda ulaşılan E2 seviyesinin 660 pg/mL'den az olması şeklinde belirlendi. Yine diğer gruplara benzer olarak yaş aralığı 23 ile 39 arasında tutuldu.

Tablo 3.2. Good responder grubunda çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri.

Good Responder Grubunda Çalışmaya Alınma Kriterleri	Good Responder Grubunda Çalışmadan Dışlanma Kriterleri
Yaş aralığı ≥ 23 , ≤ 39	Yaş aralığı < 23 , > 39
KOH sonrası 3'den fazla oosit elde edilmesi	KOH sonrası 4'den az oosit elde edilmesi
KOH sonrası E2 düzeyinin 660pg/mL'den fazla olması	KOH sonrası E2 düzeyinin 660pg/mL'den az olması

Tablo 3.3. Poor responder grubunda çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri.

Poor Responder Grubunda Çalışmaya Alınma Kriterleri	Poor Responder Grubunda Çalışmadan Dışlanma Kriterleri
Yaş aralığı ≥ 23 , ≤ 39	Yaş aralığı < 23 , > 39
KOH sonrası 4'den az oosit elde edilmesi	KOH sonrası 3'den fazla oosit elde edilmesi
KOH sonrası E2 düzeyinin 660pg/mL'den az olması	KOH sonrası E2 düzeyinin 660pg/mL'den fazla olması

Çalışmamıza bu kriterlere uyan 100 tane kontrol grubu hastası, 42 tane good responder hasta ve 40 tane poor responder hasta dahil edilmiştir.

3.2. Periferik Kan Örneklerinin Alınımı

Çalışma kapsamına alınan olgulara onam formu doldurularak, 5 ml olacak şekilde periferik kan örnekleri K₃EDTA'lı steril tüplere [Venoject®] alındı. DNA izolasyon işlemine kadar +4°C'de saklandı.

3.3. Periferik Kandan DNA Eldesi

Olguların genomik DNA'ları, periferik kandan modifiye non-enzimatik metod ile izole edildi. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler ve işlem basamakları aşağıdaki gibi uygulandı.

3.3.1. Kullanılan solusyonlar

a) CLB 1X (Hücre Liziz Tamponu)

0.32 M Sükröz	(Merck)
10mM Tris HCl pH 7.6	(Sigma)
5mM MgCl ₂	(Merck)
%1 Triton-X	(Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan CLB 1X tamponu

otoklavda sterilize edildikten sonra +4°C’de saklandı.

b)TKM1 (Düşük Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu)

10mM Tris HCl pH 7.6 (Sigma)
10mM KCl (Reidel-de Haen)
10mM MgCl₂ (Merck)
2 mM EDTA pH 8.0 (Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan TKM1 tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

c)TKM2 (Yüksek Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu)

10mM Tris HCl pH 7.6 (Sigma)
10mM KCl (Reidel-de Haen)
10mM MgCl₂ (Merck)
0.4mM NaCl (Carlo Erba)
2 mM EDTA pH 8.0 (Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan TKM2 tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

d)%10 SDS Çözeltisi

1 gram SDS (Q-Bio gene) 10ml distile suda çözüldükten sonra filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

e)6 M NaCl

35.06 gram NaCl (Carlo Erba) 100 ml distile suda çözülerek otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

f)%70’lik Etanol

70 ml %99 luk etanol, 30 ml distile su ile karıştırıldı ve +4°C’de saklandı.

3.3.2. İşlemler

K₃EDTA’lı steril tüplere alınan kan alt üst edilerek homojenize edildi. Kan örneğinden 3 ml alınarak 15 ml’lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 3 katı hacim kadar CLB 1X eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Oda sıcaklığında devir sayısı (rpm) dakikada 2200 olacak şekilde 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti elle vurularak homojenize edildikten sonra üzerine 5 ml TKM1 solüsyonundan eklendi.

Vorteksle karıştırılarak homojenize edildikten sonra oda sıcaklığında 2200 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti elle vurularak homojenize edildikten sonra üzerine 1.5 ml TKM2 ve 100µl %10 SDS solüsyonlarından eklendi. Tüp alt üst edilerek karışması sağlandı. Çökelti tamamen homojenize olana kadar 65°C’de 30-60 dakika süreyle su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüpe 570 µl 6 M’lık NaCl eklendi. Beyaz köpüklü bir görünüm elde edene kadar vorteksle karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2900 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti içinde 4.5 ml %99 etanol bulunan 15 ml’lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Tüp alt üst edilerek DNA’nın kondanase olması sağlandı. Tüp 2900 rpm’de santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti üzerine 5 ml %70’lik etanol ilave edilerek DNA’nın yıkanması sağlandı. Oda sıcaklığında 2900 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek dökelti atıldı. Tüp içerisinde çökelti halinde bulunan DNA 10-15 dakika kurutuldu. Üzerine 300 µl Tris EDTA eklendi ve etüvde 65 °C’de 1 saat veya 4°C’de geceboyu bırakılarak DNA’nın çözülmesi sağlandı. Çözünen DNA 1.5 ml’lik ependorf tüplere alındı. Elde edilen DNA örneklerinin optik dansite ölçümleri spektrofotometre ile yapıldıktan sonra, sulandırılıp uzun süreli -20 °C’de, kısa süreli +4 °C’de saklandı.

3.3.3. DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümü

İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık derecelerini belirlemek için spektrofotometre ile ölçümler yapıldı. Optik dansite ölçümlerini belirlemek amacıyla örnekler 1/200 oranında sulandırıldı. 5µl DNA örneği 995 µl dH₂O ile sulandırılarak 1000 µl’ye tamamlandı. Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında örneklerin ölçümü yapılarak DNA miktarları, “DNA miktarı = 260 nm’deki Optik Dansite (O.D.) x Sulandırma Faktörü (S.F.) x 50” formülü ile hesaplandı. Hesaplanan değerlere göre DNA örnekleri 50ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

3.3.4. PCR yöntemi

PCR reaksiyonu, Bio-Rad (MyCycler) ve PCR System 9700 (Gene Amp ®) marka PCR cihazlarında gerçekleştirildi.

3.3.4.1. PCR reaksiyonu içeriği

PCR içeriği; H₂O, 10X tampon (Fermentas), MgCl₂ (25 mM) (Fermentas), dNTP (10 mM) Karışımı, İleri ve Geri primer (10 µM), Taq polimeraz (5 u/µl) (Fermentas) ve genomik DNA (50 ng/µl) konularak 20 µl olacak şekilde hazırlandı.

FSHR geni için kullanılan primerler;

İleri primer: 5' TCTCTGAGCTTCATCCAATTTG 3' [22 mer; Tm: 55°C]

Geri primer: 5' GAGGGACAAGTATGTAAGTG 3' [20 mer; Tm: 55°C]

Sekans için kullanılan internal primer;

İleri primer: 5' CTTTCGCAGAGATTTCTTCAT 3' [21 mer]

3.3.4.2. PCR programı

Başlangıç denatürasyonu, 94°C'de 10 dakika; denatürasyon 94°C'de 50 saniye, birleşme 55°C'de 50 saniye, uzama 72°C'de 52 saniye olacak şekilde 35 döngü, son uzama ise 72°C'de 8 dakika olarak ayarlandı.

3.3.5. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme sistemi

3.3.5.1. % 1'lik agaroz jelin hazırlanması

1 gram agaroz (Sigma) tartılarak 100 ml 1XTBE'de (Tris-Borat-EDTA) çözüldü. 50-55°C'ye gelene kadar soğutuldu. 0.5 µg/ml etidyum bromür ilave edildi. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirilerek sıvı agaroz jel elektroforez küvetine döküldü. Oda sıcaklığında 15-20 dakika polimerize olması için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden alındı ve agaroz jel, elektroforez tankına yerleştirildi.

3.3.5.2. İşlemler

%1'lik agaroz jel, içerisinde 1XTBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünü ve 50bp'lik marker yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektroforez tankına bağlı güç kaynağı ile 100 voltta 45 dakika yürütüldü. Süre sonunda örnekler UV ışık veren transilluminatör Syngene (Ingenius) yardımıyla incelendi.

3.3.6. Amplikonların temizlenmesi

Amplifikasyon ürünlerinin temizlenmesi, Roche marka PCR ürün pürifikasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.6.1. İşlemler

PCR ürünü steril distile su eklenerek 100 µl'ye tamamlandı. Üzerine 500 µl bağlanma tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. Karışım pürifikasyon filtresinin üzerine boşaltıldı. Oda sıcaklığında 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Tüpün dibine biriken dökelti atıldı. Pürifikasyon filtresinin üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. İkinci yıkama 200 µl yıkama solüsyonu ile yapıldı. Tekrar oda sıcaklığında 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve dökelti atıldı. Pürifikasyon filtresi temiz 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 50 µl elüsyon solüsyonu ilave edildi. Oda sıcaklığında 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA agaroz jelde kontrol edildi.

3.3.7. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi reaksiyonları PCR System 9700 (Gene Amp ®) marka Thermal Cycler kullanılarak aşağıdaki programa göre yapıldı.

3.3.7.1. Dizileme Reaksiyonu

5X Tampon, Big Dye v3.1, primer (10µM), kalıp DNA ve H₂O konularak final hacmi 10µl olacak şekilde hazırlandı.

3.3.7.2. Dizileme PCR programı

Denatürasyon, 96°C'de 10 saniye; birleşme, 50°C'de 5 saniye, uzama, 60°C'de 4 dakika ve 25 döngü olacak şekilde ayarlandı.

3.3.8. Dizi analizi yapılacak amplikonların temizlenmesi

Hazırlanan yeni 1.5 ml'lik ependorf tüplere 2 µl, 3.2 M sodyum asetat (Mallinckrodt) (pH 4.6) konuldu. Üzerine 30 µl %99 soğuk etanol ilave edildi. Bu karışımın üzerine amplifikasyon ürününün tamamı eklendi ve vorteksle karıştırıldı. 20 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda oda sıcaklığında 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Pipetle dökelti alınarak atıldı. Çökelti üzerine 250 µl %70 etanol ilave

edildi. Oda sıcaklığında 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Tekrar dökelti pipetle alınarak atıldı. Tüplerin 10-15 dakika karanlıkta kuruması beklendi. Tüpler kuruduktan sonra üzerine 25 µl formamid ilave edildi. Tüpler hafifçe vurularak karıştırıldı ve dizi analizi tüplerine aktarıldı. ABI 3130 dizileme cihazına konulmadan önce örnekler 94°C’de 5 dakika denatüre edilerek cihaza yüklendi.

3.3.9. DNA dizi analizi

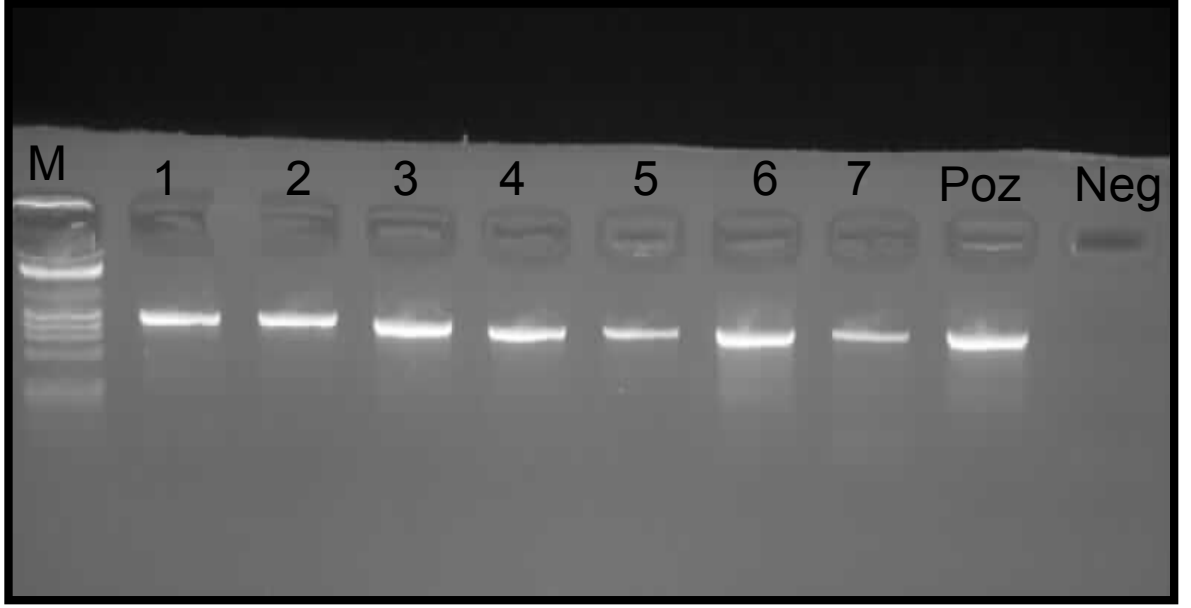
Denatüre edilen PCR ürünleri ABI 3130 dizileme cihazına yüklenerek sonuçlar ABI sequence analysis v3.1 yazılım programında değerlendirildi.

3.4. İstatistik Analizi

Veriler SPSS (version 18.0)(SPSS Inc., Chicago, USA) kullanılarak analiz edildi. Örneklemi tanımlamak için frekans dağılımı, ortalama, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. Ala307 ve Ser680 genleri için ayrı ayrı genotiplere ve gruplara göre hastaların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. Farklılık bulunduğu farklı grupların belirlenmesinde Bonferroni düzeltmesi yapılarak Mann-Whitney testi kullanıldı. Ayrıca A/A+G/A genotipi ile G/G genotipinin demografik özelliklerine ilişkin değerlerin karşılaştırılmasında ve poor ile good gruplarının demografik özelliklerine ilişkin değerlerin karşılaştırılmasında iki ortalama arası fark testi ya da Mann-Whitney U testi kullanıldı. Gruplara göre genotiplerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Analizlerde farklılıkların belirlenmesi için % 95 anlamlılık düzeyi (ya da $\alpha=0.05$ hata payı) kullanılmıştır.

3.5. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları

Çalışma kapsamına alınan olguların genomik örneklerinde, FSHR genininde moleküler genetik çalışmalar yapılmıştır. Good responder, bad responder ve kontrol grubundaki olguların FSHR gen bölgesi, PCR tekniği kullanılarak amplifiye edilmiştir. Elde edilen amplifikasyon ürünleri konsantrasyonu %1 olarak hazırlanan agaroz jelde yürütülmüştür. Amplikon büyüklüğü 1200bp olan FSHR amplikonunun agaroz jel görüntüsü Şekil 3.1’de sunulmuştur.



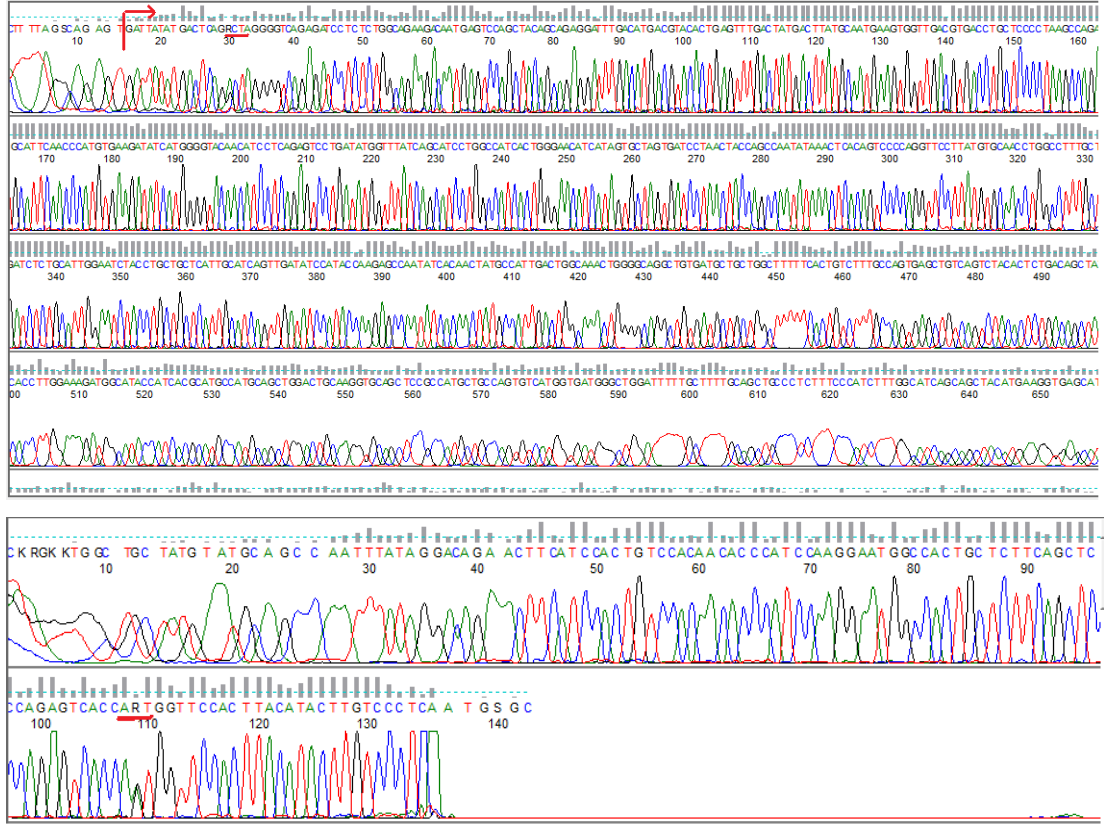
M= marker, olgu no: 1-7, Poz= pozitif kontrol, Neg=negatif kontrol

Şekil 3.1. FSHR amplikonunun agaroz jel görüntüsü.

Çalışma kapsamına alınan 100 kontrol, 42 “good”, 40 “poor” responder grubuna ait olguların FSHR gen amplikonları DNA dizi analizine alınmıştır. Her iki bölgenin referans DNA dizisi şekil 3-2’de sunulmuştur.

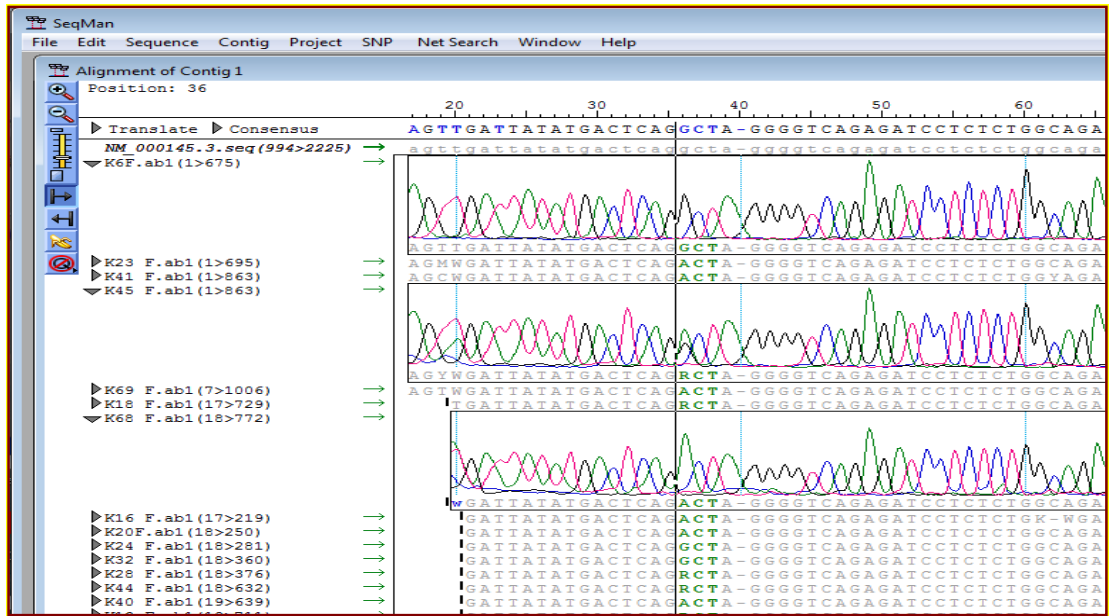
Çalışma kapsamında yer alan tüm olguların, FSHR amplikonlarının dizi analizi sonuçları, NCBI veri tabanında yer alan (www.ncbi.nlm.nih.gov) FSHR geninin [NM_000145.3] nükleotit dizisi referans alınarak değerlendirilmiştir.

Olgularımızda saptanan Ala307Thr ve Ser680Asn polimorfizmlerinin kontrol, poor responder ve good responder gruplarındaki genotiplerine ait dizileme örnekleri Şekil 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8’de verilmiştir.

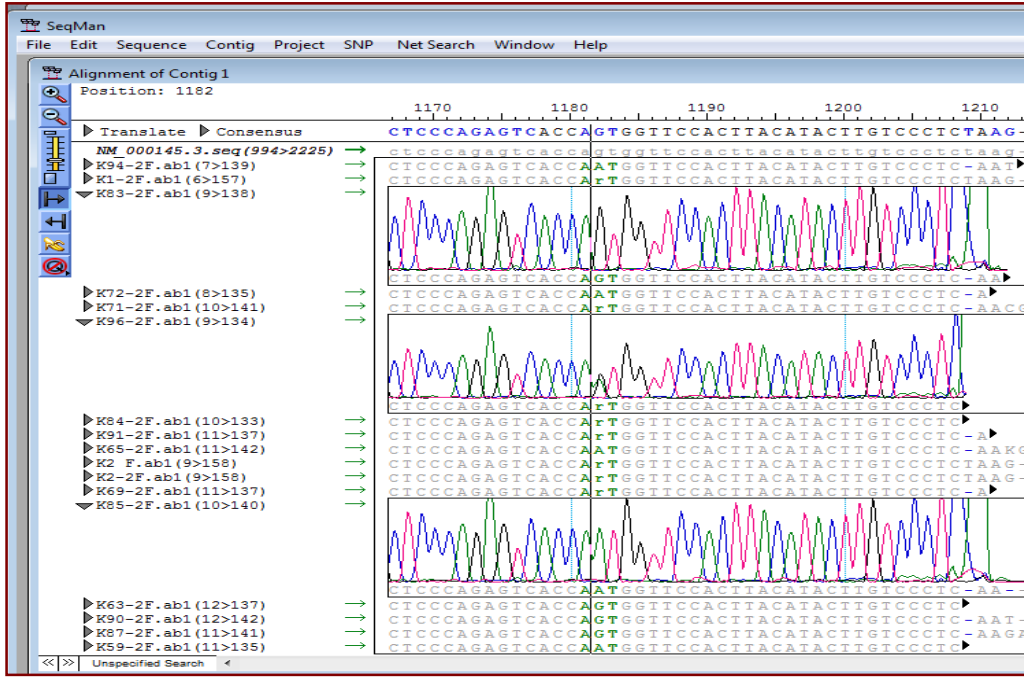


Elektroferogramda yer alan ok işareti, FSHR ampliconunun okuma başlangıcı, değerlendirilmeyen alınan p.Ala307Thr (G>A@1029) ve Ser680Asn (G>A@2039) polimorfizmlerini göstermektedir (altı kırmızı çizili) .

Şekil 3.2. FSHR ampliconunun ileri primerlerle okunan DNA dizisi.



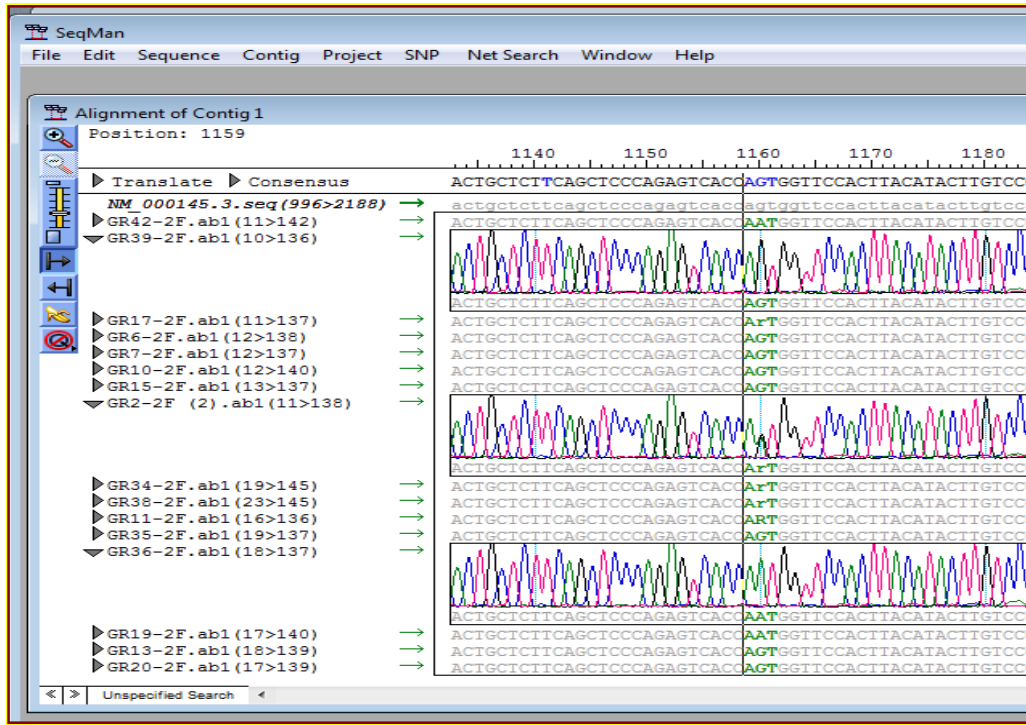
Şekil 3.3. Kontrol grubu FSHR geninde p.Ala307Thr; gCT>ACT değişiminde 1029 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri.



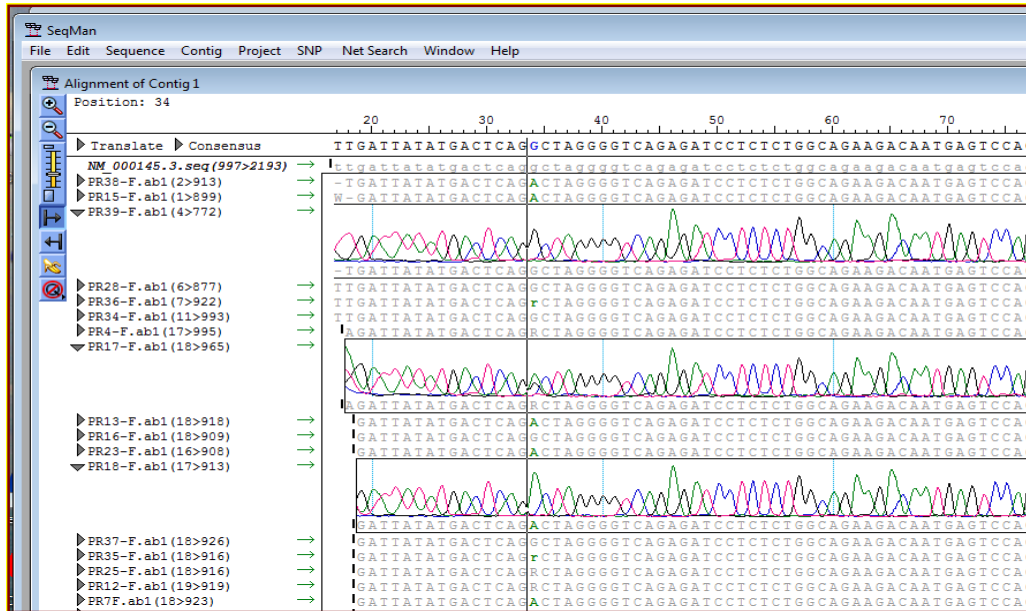
Şekil 3.4. Kontrol grubu FSHR geninde p.Ser680Asn; AgT>AaT değişiminde 2039 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri.



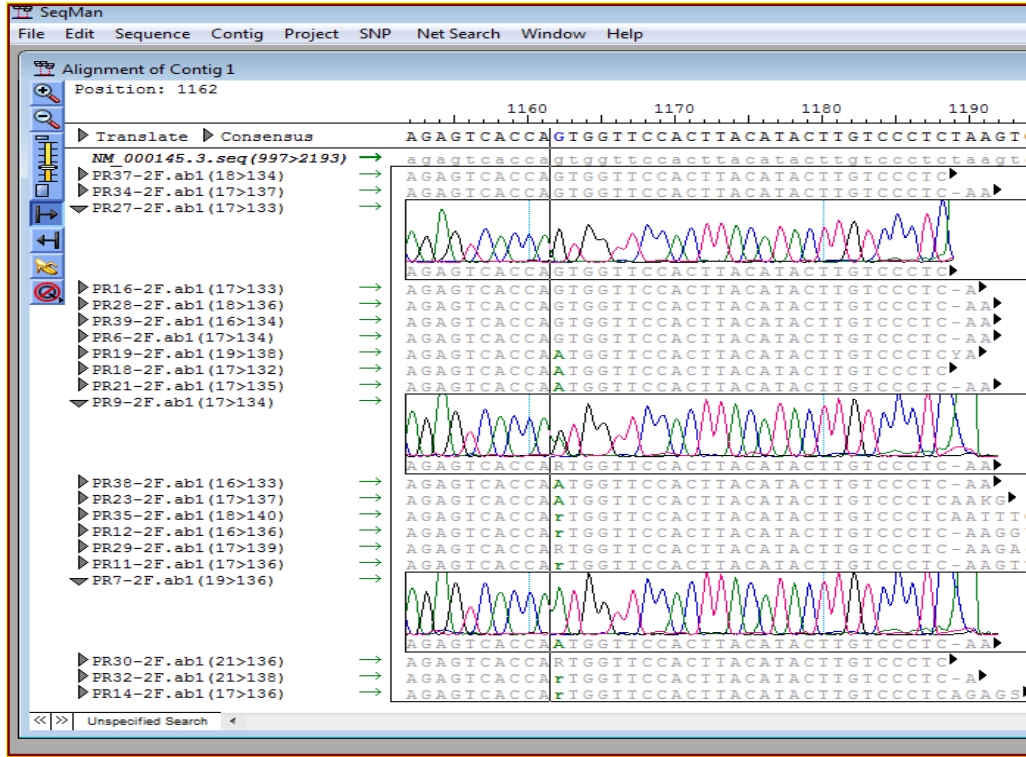
Şekil 3.5. GR kodlu Good Responder grubunun FSHR geninde p.Ala307Thr; gCT>ACT değişiminde 1029 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri.



Şekil 3.6. GR kodlu **Good Responder** grubunun FSHR geninde p.Ser680Asn; AgT>AaT değişiminde 2039 pozisyonunda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplemeleri.



Şekil 3.7. PR kodlu **Poor Responder** grubunun FSHR geninde p.Ala307Thr; gCT>ACT değişiminde 1029 pozisyonunda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplemeleri.



Şekil 3.8. PR kodlu **Poor Responder** grubunun FSHR geninde p.Ser680Asn; AgT>AaT değişiminde 2039 pozisyonda homozigot wild tip G/G genotipi; heterozigot G/A genotipi ve homozigot A/A genotiplmeleri.

4. BULGULAR

Hastaların genomik DNA örneklerinde yapılan moleküler genetik analizlerinde Ala307Thr ve Ser680Asn tek nükleotid polimorfizmleri araştırıldı. Polimorfizmler, bireylerin allelik yapılarına göre 3 olası genotipleme şeklinde değerlendirildi.

Hastaların seçiminde 3 farklı grup oluşturuldu. Kontrol grubu olarak 100 fertilitte sorunu olmayan hasta seçildi. Araştırma grubu olarak ta good responder ve poor responder olarak sırasıyla 42 ve 40 hastanın venöz kanı alınarak moleküler genetik çalışmalar yapıldı.

4.1. Kontrol Grubu Hasta Sonuçları

4.1.1. Kontrol grubu hastaların demografik özellikleri

Çalışmaya dahil edilen 100 kontrol grubu hastanın yaşları 23 ile 38 arasında değişmektedir (Tablo 4.1). Ortalama hasta yaşı $29,25 \pm 4,89$ 'dur. Tüm hastalarda ferilitite ile ilgili bir sorun bulunmamakta ve cinsel aktif olduktan sonra en geç 1 yıl içinde gebelik oluşmuştur.

Tablo 4.1. Kontrol grubu hastalarda yaştın demografik dağılımı.

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD
Yaş	100	23,00	38,00	29,2500	4,89975

N=hasta sayısı, SD=standart sapma

Hastaların gebelik sayısı 1 ile 6 arasında değişmekteydi (Tablo 4.2). Ortalama gebelik sayısı $2,11 \pm 1,1$ 'dir. 35 hastanın sadece bir canlı çocuğu varken, geri kalan 65 hastanın 35'inde yaşayan çocuğa ek olarak önceden geçirilmiş 1 veya daha fazla spontan düşük öyküsü de mevcuttu. Hastaların 2'sinde önceki gebeliklerinde geçirilmiş preeklampsi öyküsü mevcut iken, bir hastada önceki gebelikte geçirilmiş gestasyonel diyabet söz konusuydu. Bir hastada talasemi taşıyıcılığı ve başka bir hastada da orak hücreli anemi mevcuttu.

Tablo 4.2. Kontrol grubu hastalarda gebelik sayısının demografik dağılımı.

	N	Minimum	Maksimum	Mean	SD
Gebelik	100	1,00	6,00	2,1100	1,10914

N=hasta sayısı, mean=ortalama, SD=standart sapma

4.1.2. Kontrol grubu hastaların moleküler genetik analizi

Kontrol grubu hastaların genomik DNA örneklerinden Ala307Thr ve Ser680Asn bölgelerindeki polimorfizmler araştırıldı. Saptanan polimorfizmler her iki bölge için de ayrı ayrı olarak çalışıldı. İlgili varyasyon referans dizi için homozigot ise örnek olarak (A/A), heterozigot ise (G/A) ve homozigot polimorfik ise (G/G) şeklinde değerlendirildi.

4.1.2.1. Ala307Thr polimorfizmi

Kontrol grubundaki hastaların genetik analizlerinde Ala307Thr (GCT>ACT) bölgesi incelendiğinde, 28 tanesinde homozigot A/A şeklinde polimorfizm izlendi (Tablo 4.3). Heterozigot polimorfizme (G/A) sahip hasta sayısı 51 iken bu bölgede referans diziye sahip (homozigot G/G) hasta sayısı 2 olarak belirlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kontrol grubunda Ala307Thr bölgesindeki polimorfizm genotipleri ve oranları.

	A/A	G/A	G/G
N	28	51	21
%	28	51	21

N=hasta sayısı, %=yüzde, A/A=homozigot polimorfizm, G/A=heterozigot polimorfizm, G/G=normal

4.1.2.2. Ser680Asn polimorfizmi

Yapılan genetik analizler sonucunda kontrol grubundaki hastaların Ser680Asn (AGT>AAT) bölgeleri incelendiğinde, homozigot A/A genotipli 26 hastada saptanırken, heterozigot G/A genotipli hasta sayısı 53 olarak belirlendi (Tablo 4.4). Genotip yapısı homozigot G/G olan hasta sayısı ise 21 olarak belirlendi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kontrol grubunda Ser680Asn polimorfizmine ait genotipler ve oranları.

	A/A	G/A	G/G
N	26	53	21
%	26	53	21

N=hasta sayısı, %=yüzde, A/A=homozigot polimorfizm, G/A=heterozigot polimorfizm, G/G=normal

4.1.3. Kontrol grubu hastalarının sonuçlarının istatistiksel analizi

4.1.3.1. Ala307Thr polimorfizm sonuçları için istatistiksel analiz

Kontrol grubundaki 100 hastanın Ala307Thr bölgeleri incelendiğinde 28’inde A/A şeklinde polimorfizm saptandı. Bu hastaların yaşları 23 ile 37 arasında değişmektedir (Tablo 4.5). Ortalama yaş $28,32 \pm 4,76$ olarak saptandı. A/A şeklinde polimorfizme sahip olan 28 hastanın gebelik sayıları 1 ile 4 arasında değişmektedir (Tablo 4.5). Ortalama gebelik sayısı $2,03 \pm 0,96$ olarak saptandı.

Tablo 4.5. Ala307Thr Genotipleri ile yaş ve gebelik sayısı arasındaki ilişki.

ala307thr	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD
A/A YAŞ	28	23,00	37,00	28,3214	4,76914
A/A GEBELİK SAYISI	28	1,00	4,00	2,0357	0,96156
G/A YAŞ	51	23,00	38,00	30,3529	4,93082
G/A GEBELİK SAYISI	51	1,00	6,00	2,2549	1,16350
G/G YAŞ	21	23,00	38,00	27,8095	4,56748
G/G GEBELİK SAYISI	21	1,00	5,00	1,8571	1,15264

N=hasta sayısı, A/A=homozigot polimorfizm, G/A=heterozigot polimorfizm, G/G=normal, SD=standart sapma

G/A polimorfizmine sahip 51 hastanın yaş ortalaması $30,35 \pm 4,93$ olarak saptandı (Tablo 4.5). Yaş aralığı 23 ile 38 arasındadır. Bu hastaların geçirdikleri gebelik sayıları 1 ile 6 arasında değişmekteydi. Ortalama gebelik sayısı $2,25 \pm 1,16$ olarak saptandı.

Genetik analizlerinde herhangi bir polimorfizme rastlanılmayan 21 hasta belirlendi. Bu hastaların yaşları 23 ile 38 arasındaydı (Tablo 4.5). Ortalama yaş $27,80 \pm 4,5$ olarak saptandı. Bu gruptaki hastaların geçirdikleri gebelik sayısı 1 ile 5 arasında değişmekteydi (ort.= $1,85 \pm 1,15$).

Kontrol grubundaki hastaların genetik analizleri (Ala307Thr bölgesi için) ile yaşları her 3 grup için (G/G, G/A, A/A) istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve herhangi bir anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p=0,056$).

Ayrıca istatistiksel açıdan değerlendirmek için saptanan tüm polimorfizmlerin (A/A + G/A), referans allele sahip (G/G) olan diğer gruba oranı inceledik. Heterozigot polimorfizme ve homozigot polimorfizme sahip hasta verilerini birleştirdik (Tablo 4.6). Yapılan istatistiksel incelemede iki grup (A/A+G/A ve G/G) karşılaştırılmış ancak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p=0,137$).

Tablo 4.6. Genotipler ile yaş ve gebelik arasındaki ilişki.

ala307thr	N	Minimum	Maximum	Ortalama	SD	
AA+GA	YAŞ	79	23,00	38,00	29,6329	4,94113
	GEBELİK SAYISI	79	1,00	6,00	2,1772	1,09497
GG	YAŞ	21	23,00	38,00	27,8095	4,56748
	GEBELİK SAYISI	21	1,00	5,00	1,8571	1,15264

N=hasta sayısı, A/A=homozigot polimorfizm, G/A=heterozigot polimorfizm, G/G=normal, SD=standart sapma

4.1.3.2. Ser680Asn polimorfizm sonuçları için istatistiksel analiz

Kontrol grubundaki 100 hastadan Ser680Asn polimorfizmi A/A tipinde olanların sayısı 26'dır (Tablo4-7). Yaş aralığı 23 ile 37 arasında değişmektedir ve yaş ortalaması $28,96 \pm 4,79$ 'dur. A/A şeklinde polimorfizme sahip olan hastaların gebelik sayıları 1 ile 5 arasında değişmektedir ve gebelik sayısı ortalaması $2,23 \pm 1,1$ olarak belirlenmiştir.

G/A tipindeki kontrol grubu hasta sayısı 53'tür ve bu polimorfizmine sahip olan hastaların yaş ortalaması $29,79 \pm 5$ olarak saptanmıştır (yaş aralığı 23 ile 38 arasındadır). Gebelik sayıları incelendiğinde, 1 ile 6 arasında değiştiği görülmüştür ve ortalama gebelik sayısı $2,13 \pm 1,09$ olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.7. Genotipler ile yaş ve gebelik sayısı arasındaki ilişki.

ser680asn	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD	
A/A	YAŞ	26	23,00	37,00	28,9615	4,79567
	GEBELİK SAYISI	26	1,00	5,00	2,2308	1,10662
G/A	YAŞ	53	23,00	38,00	29,7925	5,00138
	GEBELİK SAYISI	53	1,00	6,00	2,1321	1,09259
G/G	YAŞ	21	23,00	38,00	28,2381	4,80526
	GEBELİK SAYISI	21	1,00	5,00	1,9048	1,17918

N=hasta sayısı, A/A=homozigot polimorfizm, G/A=heterozigot polimorfizm, G/G=normal, SD=standart sapma

Referans allele sahip (homozigot G/G) kontrol grubu hastaların sayısı 21 olarak saptandı. Yaş ortalamaları $28,23 \pm 4,8$ olarak belirlendi (yaş aralığı 23 ile 38 arasındadır). Gebelik sayıları incelendiğinde 1 ile 5 arasında değiştiği görüldü ve ortalama gebelik sayısı $1,9 \pm 1,17$ olarak hesaplandı.

Kontrol grubundaki hastaların genetik analizleri (Ser680Asn bölgesi için) ile yaşları her 3 grup için (G/G, G/A, A/A) istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve herhangi bir anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p=0,447$).

Oluşmuş tüm polimorfizmleri birleştirerek (A/A + G/A), polimorfizmi olmayan grupla (G/G) yaş açısından yapılan karşılaştırmada da herhangi bir anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p=0,288$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Genotipler ile yaş ve gebelik arasındaki ilişki.

ser680asn	N	Minimum	Maximum	Ortalama	SD	
AA+GA	YAŞ	79	23,00	38,00	29,5190	4,91951
	GEBELİK SAYISI	79	1,00	6,00	2,1646	1,09111
GG	YAŞ	21	23,00	38,00	28,2381	4,80526
	GEBELİK SAYISI	21	1,00	5,00	1,9048	1,17918

N=hasta sayısı, A/A=homozigot polimorfizm, G/A=heterozigot polimorfizm, G/G=normal, SD=standart sapma

4.2. Good Responder hasta sonuçları

4.2.1. Good responder hastaların demografik özellikleri

Çalışmamızda, hastaların good responder kategorisine dahil edilebilme kriteri olarak şu özellikler belirlendi: a) yaş aralığı 23 ile 39 arasında olacak, b) bilinen bir infertilite öyküsü sonucu belli bir yardımcı üreme tekniği almış olacak, c) tedavi sonucunda elde edilen follikül sayısı 3'den fazla olacak, d) tedavi sonucunda elde edilen E2 düzeyi 660 pg/mL'den fazla olacak. Bu kriterlere uygun 42 hasta belirlendi ve bu hastalardan 5 cc venöz kan alındı.

42 hastanın yaşları 23 ile 39 arasında değişmekteydi. Ortalama yaşları $30,00 \pm 4,22$ olarak saptandı (Tablo 4-9). Hastaların infertilite süreleri 2 yıldan 13 yıla kadar farklılık göstermektedir. Hastaların hepsi toplamda en az 2 kez bir infertilite tedavisi almış hastalardır. Hastaların ortalama infertilite süresi $5,83 \pm 3,01$ 'dir (Tablo 4-9). Hastaların 10 tanesinde infertilite nedeni erkek kaynaklı iken sadece bir tanesinde

tubal disfonksiyona bağılı infertilite söz konusuydu. Geri kalan 31 hastada açıklanamayan infertilite söz konusudur.

Tablo 4.9. Good responder hastaların demografik özellikleri.

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD
Yaş	42	23	39	30,00	4,225
İnfertilite süresi (yıl)	42	2,00	13,00	5,8333	3,01958
3.gün FSH (mIU/mL)	42	2,00	9,00	5,7381	1,53113
3.gün E2 (pg/mL)	42	18,00	93,00	44,5952	16,24967
3.gün antral follikül (adet)	42	0,00	12,00	7,6905	2,71839
Kullanılan gonadotropin dozu (ünite)	42	1075	4500	2156,55	862,799
Tedavi süresi (gün)	42	11,00	20,00	13,0476	1,78000
Tedavi sonu follikül sayısı (adet)	42	4,00	8,00	5,6429	1,26532
Tedavi sonu E2 (pg/mL)	42	1100	3950	2312,64	634,322
Opu sonrası oosit (adet)	42	2,00	7,00	4,5714	1,10747

N=hasta sayısı, opu=oosit pick up, SD=standart sapma

Good responder grubundaki hastaların 13 tanesinde en son aldıkları tedavinin şekli long protokol iken, geri kalan 29 hastada antagon protokolü uygulanmıştır. Tüm bu gruptaki hastaların tedaviye başlamadan önce adetlerinin 3. günündeki FSH ve E2 değerlerine bakılmıştır. FSH değerleri 2 mIU/mL ile 9 mIU/mL arasında değişmektedir. Ortalama 3. Gün FSH değeri $5,7381 \pm 1,53$ 'tür. 3. gün E2 değerleri ise 18 ile 93 arasında değişkenlik göstermekte olup, ortalaması $44,59 \pm 16,24$ 'tür.

Hastalara adetlerinin 3. gününde uygulanan transvaginal ultrasound ile antral follikül sayımı yapılmış ve 1 hastada her iki over de suprese şekilde izlenmiştir. 5 hastada overler polikistik görünümdeydi. 3. gün ortalama antral follikül sayısı $7,69 \pm 2,71$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.9).

Hastaların tedavi boyunca aldıkları total gonadotropin dozları hesaplanmış ve 1075 ünite ile 4500 ünite arasında değişen dozlarda ilaç aldıkları belirlenmiştir. Kullanılan ortalama gonadotropin dozu $2156,55 \pm 863,79$ olarak saptanmıştır (Tablo 4.9). Hastaların aldıkları tedaviye bağılı olarak follikül oluşturma süreleri incelendiğinde 11 gün ile 20 gün arasında değişen süreler saptanmıştır (ort.: $13,04 \pm 1,78$).

Tedavi sonu follikül sayıları incelenmiş ve 4 ile 8 arasında oldukları görülmüştür (folliküller transvaginal ultrasound ile değerlendirilmiştir ve 16-20 mm arasında çapa sahip olanlar dikkate alınmıştır). Tedavi sonu ortalama follikül sayısı $5,64 \pm 1,26$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.9).

Tedavi sonunda hCG verilmeden önce kanda bakılan E2 seviyelerinin 1100 pg/mL ile 3950 pg/mL arasında değişmekte olduğu görülmüştür. Ortalama tedavi sonu E2 seviyesi 2312,64±634,32 pg/mL olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.9).

Hastaların hepsinde tedavi sonunda verilen hCG'nin ardından opu (oosit pick up) işlemi uygulanmış ve 2 ile 7 arasında oosit toplandığı görülmüştür (ort.: 4,57±1,1). Tüm hastalara embriyo transfer işlemi uygulanmış olup işlemler sırasında herhangi bir komplikasyonla karşılaşılmamıştır. Yapılan 42 embriyo transfer işlemi sonrasında 14. günde venöz kandan β hCG seviyelerine bakılmış ve 7 hastanın gebe olduğu saptanmıştır.

4.2.2. Good Responder grubu hastaların moleküler genetik analizi

Good responder grubu hastaların genomik DNA örneklerinden Ala307Thr ve Ser680Asn bölgelerindeki polimorfizmler araştırıldı. Saptanan polimorfizmler her iki bölge için de ayrı ayrı olarak çalışıldı ve homozigot (A/A) – heterozigot (G/A) genotiplerleri olarak belirtildi. Çalışılan bölgede polimorfizm saptanmadı ise homozigot G/G genotipinde belirtildi.

4.2.2.1. Ala307Thr polimorfizmi

Good responder grubunu oluşturan 42 hastanın genomik DNA örneklerinde yapılan genetik analiz sonucunda 5 hastada homozigot A/A şeklinde polimorfizm izlenirken, 18 hastada G/A şeklinde heterozigot polimorfizm saptanmıştır (Tablo 4.10). 19 hastada homozigot referans dizi belirlenmiştir.

Tablo 4.10. Good responder grubunda Ala307Thr polimorfizm genotipleri ve oranları.

	A/A	G/A	A/A+G/A	G/G
N	5	18	23	19
%	11,9	42,9	54,8	45,2

N=hasta sayısı, %=yüzde, A/A=homozigot polimorfizm, G/A=heterozigot polimorfizm, G/G=normal

4.2.2.2. Ser680Asn polimorfizmi

Yapılan moleküler genetik analizler sonucunda good responder grubundaki hastaların Ser680Asn bölgesi incelendiğinde, A/A şeklinde polimorfizm 5 hastada saptanırken, G/A heterozigot polimorfizmine sahip hasta sayısı 18 olarak belirlendi (Tablo 4.11). Referans diziye sahip hasta sayısı ise 19 olarak belirlendi (Tablo 4.11).

Genetik analiz sonuçları good responder grubu için hem Ala307Thr hem de Ser680Asn bölgeleri açısından benzer şekilde bulundu (Tablo 4.10 ve 4.11).

Tablo 4.11. Good responder grubunda Ser680Asn polimorfizm genotiplerleri ve oranları.

	A/A	G/A	A/A+G/A	G/G
N	5	18	23	19
%	11,9	42,9	53,8	45,2

N=hasta sayısı, %=yüzde, A/A=homozigot polimorfizm, G/A=heterozigot polimorfizm, G/G=normal

4.2.3. Good responder grubu hastalarının sonuçlarının istatistiksel analizi

4.2.3.1. Ala307Thr bölge sonuçları için istatistiksel analiz

Elde edilen genetik analiz sonuçlarının, good responder grubundaki hastaları demografik özelliklerine göre analizi Tablo 4.12’de belirtilmiştir.

A/A polimorfizmine sahip 5 hastada yaş aralığı 25 ile 34 arasındadır (ort.: $31,2 \pm 3,7$) (tablo 4-12). G/A polimorfizmine sahip 18 hastada ise yaş aralığı 24 ile 36 arasındadır (ort.: $29,67 \pm 3,78$). Bu iki grubun toplamında, yani tüm polimorfizimli hastaların yaş aralığı 24 ile 36 arasında değişmekte olup, ortalaması $30 \pm 3,74$ olarak hesaplanmıştır. Herhangi bir polimorfizme uğramamış olan 19 hastanın yaş aralığı 23 ile 39 arasındadır (ort.: $30 \pm 4,85$). A/A, G/A ve G/G grupları arasında yaşlar açısından istatistiksel inceleme yapılmış ancak anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p=0,669$). Ayrıca A/A+G/A ve G/G arasında da istatistiksel analiz yapılmış ve yine benzer şekilde anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p=0,298$) (Tablo 4.12).

Good responder grubundaki hastaların polimorfizm sonuçları açısından 3. gün FSH düzeyleri değerlendirilmiş ve A/A genotipine sahip hastalarda FSH düzeyi 4 mIU/mL ile 8 mIU/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $5,8 \pm 1,48$) (Tablo 4.11). G/A ve G/G genotipine sahip hastalarda ise düzeyin değişkenlik sınırları sırasıyla 2 mIU/mL ile 8 mIU/mL arasında ve 3 mIU/mL ile 9 mIU/mL arasında olduğu görülmüştür. Ortalamaları sırasıyla $5,5 \pm 1,33$ mIU/ml ve $5,94 \pm 1,74$ mIU/mL’dir. Total polimorfizimli hasta (A/A+G/A) değerlendirilmesi yapıldığında ise düzey aralığının 2 mIU/mL ile 8mIU/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $5,56 \pm 1,34$). A/A, G/A ve G/G genotipine sahip hasta gruplarının 3. gün FSH düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,818$). A/A+G/A ve G/G grupları arasında da istatistiksel karşılaştırılma yapıldı ve anlamlı sonuç bulunmadı ($p=0,149$) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Good responder hastalarda genetik durum ve diğer parametreler arasındaki ilişki.

Ala307Thr	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD
Yaş	5	25	34	31,20	3,701
3.gün FSH (mIU/mL)	5	4,00	8,00	5,8000	1,48324
A/A Gonadotropin dozu	5	1075	2300	1425,00	496,236
Tedavi süresi (gün)	5	11,00	13,00	12,0000	1,00000
Tedavi sonu E2 (pg/mL)	5	2200	2600	2393,40	183,215
Yaş	18	24	36	29,67	3,789
3.gün FSH (mIU/mL)	18	2,00	8,00	5,5000	1,33945
G/A Gonadotropin dozu	18	1200	4500	2166,67	799,264
Tedavi süresi (gün)	18	11,00	16,00	12,6111	1,33456
Tedavi sonu E2 (pg/mL)	18	1250	3500	2326,83	624,843
Yaş	23	24	36	30,00	3,742
3.gün FSH (mIU/mL)	23	2,00	8,00	5,5652	1,34252
AA+GA Gonadotropin dozu	23	1075	4500	2005,43	797,651
Tedavi süresi (gün)	23	11,00	16,00	12,4783	1,27456
Tedavi sonu E2 (pg/mL)	23	1250	3500	2341,30	555,506
Yaş	19	23	39	30,00	4,853
3.gün FSH (mIU/mL)	19	3,00	9,00	5,9474	1,74718
G/G Gonadotropin dozu	19	1250	4000	2339,47	923,847
Tedavi süresi (gün)	19	11,00	20,00	13,7368	2,07745
Tedavi sonu E2 (pg/mL)	19	1100	3950	2277,95	732,813

N=hasta sayısı, SD=standart sapma

Tedavi boyunca kullanılan gonadotropin dozları karşılaştırıldığında, A/A genotipine sahip hastalarda kullanılan doz 1075 ünite ile 2300 ünite arasında değişmektedir (ort.: 1425±496,23) (Tablo 4.12). G/A genotipli hastalarda kullanılan doz 1200 ünite ile 4500 ünite arasında (ort.: 2166,67±799,26) değişmekte iken G/G genotipli hastalarda değişim aralığı 1250 ünite ile 4000 ünite arasındadır (ort.: 2339,47±923,84). Tüm polimorfizimli hastalar (A/A+G/A) dikkate alındığında kullanılan gonadotropin dozu 1075 ünite ile 4500 ünite arasında değişmektedir (ort.: 2005,43±797,65). A/A, G/A ve G/G genotipine sahip good responder hastaları kullanılan gonadotropin dozu açısından karşılaştırıldı ve anlamlı bir sonuç bulunamadı (p=0,057). Ayrıca homozigot olsun ve heterozigot olsun, tüm polimorfizimli hastalar (A/A+G/A) kullanılan gonadotropin dozu açısından normal bireylerle (G/G) karşılaştırıldığında yine anlamlı sonuç bulunmadı (p=0,276) (Tablo 4.12).

Tedavi süreleri açısından hastalar değerlendirildiğinde A/A şeklinde polimorfizme sahip hastalarda tedavi süresinin 11 ile 13 gün arasında sürdüğü görülmektedir (ort.: 12 ± 1) (Tablo 4.12). G/A genotipli hastalarda bu süre 11 ile 16 gün arasında değişmekte iken (ort.: $12,61\pm1,33$), G/G genotipli hastalarda bu süre 11 ile 20 gün arasında değişmektedir (ort.: $13,73\pm2,07$). A/A ve G/A genotipli hastalar toplamda dikkate alındığında süre aralığı 11 ile 16 gün arasındadır (ort.: $12,47\pm1,27$). A/A, G/A ve G/G genotipli hastalar tedavi süreleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılmışlardır ve anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,058$). Ancak total polimorfizimli hastalarla (A/A+G/A), normal genotipli hastalar ayrıca değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,024$) (Tablo 4.12).

Tedavi sonunda elde edilen, hCG vermeden önceki E2 düzeyleri açısından değerlendirme yapıldığında, A/A genotipli hastaların E2 düzeyleri 2200 pg/mL ile 2600 pg/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $2393,4\pm183,21$) (Tablo 4.12). G/A genotipli hastalarda E2 düzeyleri 1250 pg/mL ile 3500 pg/mL arasında değişirken (ort.: $2326,83\pm624,84$), G/G genotipli hastalarda bu değerler 1100 pg/mL ile 3950 pg/mL arasındadır (ort.: $2277,95\pm732,81$). A/A ve G/A genotipli hastalar toplamda incelendiğinde E2 düzeyleri 1250 pg/mL ile 3500 pg/mL arasında değişmektedir (ort.: $2341,3\pm555,5$). İstatistiksel olarak A/A, G/A ve G/G genotipli hastalar karşılaştırılmış ve anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,779$). Yine diğer parametrelerde yapıldığı gibi A/A+G/A grubu ile G/G grubu ayrıca değerlendirilmiş ve anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,284$) (Tablo 4.12).

4.2.3.2. Ser680Asn bölge sonuçları için istatistiksel analiz

Elde edilen genetik analiz sonuçlarının, good responder grubundaki hastaları demografik özelliklerine göre analizi Tablo 4.12’de belirtilmiştir. Good responder grubunda elde edilmiş olan genetik yapılar, hem Ala307Thr için hem de Ser680Asn için benzer özellik göstermiştir.

A/A polimorfizmine sahip 5 hastada yaş aralığı 25 ile 34 arasındadır (ort.: $31,2\pm3,7$) (Tablo 4.13). 18 hasta G/A polimorfizmine sahiptir ve yaş aralığı 24 ile 36 arasındadır (ort.: $29,67\pm3,78$). Tüm polimorfizimli hastaların yaş aralığı 24 ile 36 arasında değişmekte olup, ortalaması $30\pm3,74$ olarak hesaplanmıştır. Normal genotipe sahip olan 19 hastanın yaş aralığı 23 ile 39 arasındadır (ort.: $30\pm4,85$). A/A, G/A ve G/G grupları arasında yaşlar açısından istatistiksel inceleme yapılmış ancak anlamlı

sonuç bulunamamıştır ($p=0,669$). Ayrıca A/A+G/A ve G/G arasında da istatistiksel analiz yapılmış ve yine benzer şekilde anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p=0,298$) (Tablo 4.13).

Elde edilen genetik analizler 3. gün FSH düzeyleri açısından değerlendirilmiş ve A/A genotipine sahip hastalarda FSH düzeyi 4 mIU/mL ile 8 mIU/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $5,8\pm1,48$) (Tablo 4.13). G/A ve G/G genotipine sahip hastalarda ise düzeyin değişkenlik sınırları sırasıyla 2 mIU/mL ile 8 mIU/mL arasında ve 3 mIU/mL ile 9 mIU/mL arasında olduğu görülmüştür. Ortalamaları sırasıyla $5,5\pm1,33$ mIU/ml ve $5,94\pm1,74$ mIU/mL'dir. Total polimorfizmli hasta (A/A+G/A) değerlendirilmesi yapıldığında ise düzey aralığının 2 mIU/mL ile 8mIU/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $5,56\pm1,34$). A/A, G/A ve G/G genotipine sahip hasta gruplarının 3. gün FSH düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,818$). A/A+G/A ve G/G grupları arasında da istatistiksel karşılaştırılma yapıldı ve anlamlı sonuç bulunmadı ($p=0,149$) (Tablo 4.13).

Tedavide kullanılan gonadotropin dozları karşılaştırıldığında, A/A genotipine sahip hastalarda kullanılan doz 1075 ünite ile 2300 ünite arasında değiştiği görülmektedir (ort.: $1425\pm496,23$) (Tablo 4.13). G/A genotipli hastalarda kullanılan doz 1200 ünite ile 4500 ünite arasında (ort.: $2166,67\pm799,26$) değişmekte iken G/G genotipli hastalarda değişim aralığı 1250 ünite ile 4000 ünite arasındadır (ort.: $2339,47\pm923,84$). Tüm polimorfizmli hastalar (A/A+G/A) dikkate alındığında kullanılan gonadotropin dozu 1075 ünite ile 4500 ünite arasında değişmektedir (ort.: $2005,43\pm797,65$). A/A, G/A ve G/G genotipine sahip good responder hastaları kullanılan gonadotropin dozu açısından karşılaştırıldı ve anlamlı bir sonuç bulunamadı ($p=0,057$). Ayrıca homozigot olsun ve heterozigot olsun, tüm polimorfizmli hastalar (A/A+G/A) kullanılan gonadotropin dozu açısından normal bireylerle (G/G) karşılaştırıldığında yine anlamlı sonuç bulunmadı ($p=0,276$) (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Good responder hastalarda genotipler ve diğer parametreler arasındaki ilişki.

Ser680Asn	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD
A/A	Yaş	5	25	31,20	3,701
	3.gün FSH(mIU/mL)	5	4,00	5,8000	1,48324
	Gonadotropin dozu	5	1075	1425,00	496,236
	Tedavi süresi(gün)	5	11,00	12,0000	1,00000
	Tedavi sonu E2(pg/mL)	5	2200	2393,40	183,215
G/A	Yaş	18	24	29,67	3,789
	3.gün FSH(mIU/mL)	18	2,00	5,5000	1,33945
	Gonadotropin dozu	18	1200	2166,67	799,264
	Tedavi süresi(gün)	18	11,00	12,6111	1,33456
	Tedavi sonu E2(pg/mL)	18	1250	2326,83	624,843
AA+G/A	Yaş	23	24	30,00	3,742
	3.gün FSH(mIU/mL)	23	2,00	5,5652	1,34252
	Gonadotropin dozu	23	1075	2005,43	797,651
	Tedavi süresi(gün)	23	11,00	12,4783	1,27456
	Tedavi sonu E2(pg/mL)	23	1250	2341,30	555,506
G/G	Yaş	19	23	30,00	4,853
	3.gün FSH(mIU/mL)	19	3,00	5,9474	1,74718
	Gonadotropin dozu	19	1250	2339,47	923,847
	Tedavi süresi(gün)	19	11,00	13,7368	2,07745
	Tedavi sonu E2(pg/mL)	19	1100	2277,95	732,813

N=hasta sayısı, SD=standart sapma

Tedavi süreleri açısından hastalar değerlendirildiğinde A/A şeklinde polimorfizme sahip hastalarda tedavi süresinin 11 ile 13 gün arasında sürdüğü görülmektedir (ort.: 12 ± 1) (Tablo 4.12). G/A genotipli hastalarda bu süre 11 ile 16 gün arasında değişmekte iken (ort.: $12,61 \pm 1,33$), G/G genotipli hastalarda bu süre 11 ile 20 gün arasında değişmektedir (ort.: $13,73 \pm 2,07$). A/A ve G/A genotipli hastalar toplamda dikkate alındığında süre aralığı 11 ile 16 gün arasındadır (ort.: $12,47 \pm 1,27$). A/A, G/A ve G/G genotipli hastalar tedavi süreleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılmışlardır ve anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,058$). Ancak total polimorfizimli hastalarla (A/A+G/A), normal genotipli hastalar ayrıca değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,024$) (Tablo 4.13).

Tedavi sonunda elde edilen, β hCG vermeden önceki E2 düzeyleri açısından değerlendirme yapıldığında, A/A genotipli hastaların E2 düzeyleri 2200 pg/mL ile 2600 pg/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $2393,4 \pm 183,21$) (Tablo 4.13). G/A genotipli

hastalarda E2 düzeyleri 1250 pg/mL ile 3500 pg/mL arasında değişirken (ort.: 2326,83±624,84), G/G genotipli hastalarda bu değerler 1100 pg/mL ile 3950 pg/mL arasındadır (ort.: 2277,95±732,81). A/A ve G/A genotipli hastalar toplamda incelendiğinde E2 düzeyleri 1250 pg/mL ile 3500 pg/mL arasında değişmektedir (ort.: 2341,3±555,5). İstatistiksel olarak A/A,G/A ve G/G genotipli hastalar karşılaştırılmış ve anlamlı fark bulunmamıştır (p=0,779). Yine diğer parametrelerde yapıldığı gibi A/A+G/A grubu ile G/G grubu ayrıca değerlendirilmiş ve anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,284) (Tablo 4.13).

4.3. Poor Responder Hasta Sonuçları

4.3.1. Poor responder hastaların demografik özellikleri

Poor responder grubuna dahil edilecek hasta seçiminde kullandığımız kriterler şunlardır: a) hastanın yaşı 23 ile 39 arasında olacak, b) hastaya uygulanan kontrollü yardımcı üreme teknikleri sonucunda elde edilen follikül sayısı 3 veya daha az olacak, c) hastaya verilen yardımcı üreme tekniği sonucunda hCG verilmeden önceki E2 seviyeleri 660 pg/mL'den az olacak. Bu kriterlere uyan 40 hasta belirlendi ve 5 cc venöz kan alınarak genetik analizi yapıldı.

40 hastanın yaşları 23 ile 39 arasında değişmekteydi. Ortalama yaşları 32,60±4,26 olarak saptandı (Tablo 4.14). Çalışmaya katılan 40 hastanın infertilite süresi 1 yıldan 20 yıla kadar değişkenlik göstermekteydi. Ortalama infertilite süresi 7,32±4,52'dir. Hastaların hepsi toplamda en az 2 kez bir infertilite tedavisi almış hastalardır. Good responder hasta grubuna benzer olarak bu grupta da hastaların 10 tanesinde infertilite nedeni erkek kaynaklıydı. Ancak tubal faktöre bağlı infertilite nedeni hasta yoktu. Geri kalan 30 hastada açıklanamayan infertilite söz konusuydu.

Tablo 4.14. Poor Responder grubundaki hastaların demografik özellikleri.

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD
Yaş	40	23	39	32,60	4,266
İnfertilite süresi(yıl)	40	1	20	7,32	4,526
3.gün FSH(mIU/mL)	40	5,0	27,0	11,828	4,1238
3.gün E2(pg/mL)	40	4	82	35,88	15,686
Gonadotropin dozu(ünite)	40	2250	7500	4666,25	1333,031
Tedavi süresi(gün)	40	12	20	15,52	1,867
Tedavi sonu E2(pg/mL)	40	27	660	406,28	211,348
Tedavi sonu follikül sayısı	40	0	3	1,13	0,966

N=hasta sayısı, opu=oosit pick up, SD=standart sapm

Poor responder grubundaki hastaların hepsinde kullanılan tedavi, antagon protokolü şeklindedir. Diğer gruplardaki hastalarda yapıldığı gibi bu hasta grubundaki hastaların da adetlerinin 3. gününde venöz kandan FSH ve E2 düzeylerine bakıldı. FSH düzeyleri 5 mIU/mL ile 27 mIU/mL arasında değişmektedir (ort.: 11.82 ± 4.12). E2 seviyeleri ise 4 pg/mL ile 82 pg/mL arasında değişkenlik göstermektedir (ort.: 35.88 ± 15.68) (Tablo 4.14).

Hastaların adetlerinin 3. gününde yapılan transvaginal ultrasound ile antral follikül sayımı yapılmış ve 13 hastada bilateral overler suprese izlenmiştir.

Tedavi boyunca uygulanan gonadotropin dozları hesaplanmış ve 2250 ünite ile 7500 ünite arasında değişen miktarlarda bulunmuştur (ort.: 4666.25 ± 1333.03) (Tablo 4.14). Uygulanan tedavi süresi 12 gün ile 20 gün arasında değişmektedir (ort.: 15.52 ± 1.86).

Tedavi sonunda oluşan follikül sayısı, transvaginal ultrasound ile değerlendirildi. 14 hastada verilen tedavi boyunca verilen yüksek gonadotropine rağmen herhangi bir follikül gelişimi sağlanamamıştır. Bu hastalarda tedavi iptal edilmiştir ve opu işlemi yapılmamıştır. Tüm poor responder hastalar dikkate alındığında elde edilen ortalama follikül sayısı 1.13 ± 0.966 'dır.

Tedavi sonu elde edilen E2 düzeyleri incelendiğinde, E2 düzeylerinin 27 pg/mL ile 660 pg/mL arasında olduğu görülmüştür (ort.: 406.28 ± 211.34) (Tablo 4.14).

Tedavi sonucunda 14 hastadan follikül elde edilememiştir (yapılan transvaginal ultrasoundda olgun follikül izlenmemiştir) (Tablo 4.15). Bu hastaların tedavileri iptal edilmiş ve opu işlemi yapılmamıştır. Geri kalan 26 hastanın opu ilemi yapılmış ancak 4 tanesinde kaliteli oosit elde edilememiştir. Bu 4 hastaya embriyo transfer işlemi yapılmamıştır. Totalde 22 hastaya embriyo transfer işlemi uygulanmış ve 14 gün sonra venöz kandan bakılan β hCG seviyelerinin sadece 3 hastada yüksek olduğu saptanmıştır. Bu üç gebelikten 2'sinde takipte sorun olmazken, bir tanesinde 8 haftalık iken missed abortus olmuştur.

Tablo 4.15. Tedavi sonunda elde edilen follikül sayılarının oranı.

Follikül sayısı	Hasta sayısı	%
0	14	35
1	9	22,5
2	15	37,5
3	2	5

%=yüzde

4.3.2. Poor Responder grubu hastaların moleküler genetik analizi

Poor responder grubu hastaların genomik DNA örneklerinde Ala307Thr ve Ser680Asn polimorfizmleri araştırıldı. Saptanan polimorfizmler her iki bölge için de ayrı ayrı olarak çalışıldı ve homozigot (A/A) – heterozigot (G/A) polimorfizmler olarak belirtildi. Çalışılan bölgede polimorfizm saptanmadı ise G/G şeklinde belirtildi.

4.3.2.1. Ala307Thr bölgesi

40 tane poor responder olan hastada yapılan genetik analizler sonucunda, A/A genotipli hasta sayısının 12 olduğu görüldü (%30) (Tablo 4.16). Heterozigot polimorfizme sahip hasta sayısı 20 (%50) iken normal genotipli poor responder hasta sayısı 8 (%20) olarak belirlendi. Tüm polimorfizimli hasta sayısı (A/A+G/A) ise 32 olarak belirlendi (%80).

Tablo 4.16. Poor responder hastalarda Ala307Thr polimorfizminin genotip dağılımı.

	A/A	G/A	A/A+G/A	G/G
Hasta sayısı	12	20	32	8
Yüzde (%)	30	50	80	20

4.3.2.2. Ser680Asn bölgesi

Poor responder grubundaki hastalarda yapılan genetik analizler sonucunda Ser680Asn bölgesinde polimorfizmi olan hasta sayısı dağılımı Tablo 4.17’de verilmiştir.

Tablo 4.17. Poor responder hastalarda Ser680Asn polimorfizmin genotip dağılımı.

	A/A	G/A	A/A+G/A	G/G
Hasta sayısı	11	21	33	8
Yüzde (%)	27,5	52,5	80	20

A/A genotipine sahip olan hastaların oranı %27,5’tir (sayı=11). G/A şeklinde polimorfizmi olan hasta sayısı 21 (%52,5) iken Ser680Asn bölgesinde herhangi bir polimorfizme sahip olmayan hasta sayısı 8’dir (%20). Tüm polimorfizimli hastaların sayısı ve bunların poor responder içindeki yüzdesi sırasıyla 33 ve 80’dir.

4.3.3. Poor responder grubu hastalarının sonuçlarının istatistiksel analizi

4.3.3.1. Ala307Thr bölge sonuçları için istatistiksel analiz

Poor responder grubundaki hastalardan alınan kan örneklerinden genetik analiz yapıldı. Bu genetik analiz sonuçları Tablo 4.18’de gösterilmiştir.

Poor responder olarak belirlenen hasta grubunda A/A polimorfizmine sahip 12 hastanın yaş aralığı 27 ile 38 arasında değişmektedir (ort.: $31,33 \pm 3,7$) (Tablo 4.18). G/A polimorfizmine sahip hasta sayısı 20 ‘dir ve yaş aralığı 25 ile 39 arasında değişmektedir (ort.: $33,9 \pm 4,1$). Polimorfizm saptanmayan hasta (G/G) sayısı 8’dir ve yaş aralığı 23 ile 39 arasında değişmektedir (ort.: $31,25 \pm 4,95$). Tüm polimorfizimli hastaların oranı hesaplandığında, hasta sayısı 32 olarak belirlenmiştir ve yaş aralığı 25 ile 39 arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $15,47 \pm 1,68$). A/A, G/A ve G/G grupları arasında yaşlar açısından istatistiksel inceleme yapılmış ancak anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p=0,131$). Tüm polimorfizimli hastalar (A/A+G/A) ile polimorfizmi olmayan hastalar arasında yaşlar açısından istatistiksel inceleme yapıldığında anlamlı fark saptanamamıştır ($p=0,387$) (Tablo 4.18).

Hastaların tedavi başlangıcında 3. gün FSH değerlerine bakıldı. A/A genotipine sahip bireylerde FSH düzeyleri 5 mIU/mL ile 21 mIU/ml arasında saptanmıştır (ort.: $11,41 \pm 4,52$ mIU/mL) (Tablo 4.18). G/A genotipli hastalarda düzey 8 mIU/mL ile arasında değişmekte iken (ort.: $11,4 \pm 3,14$ mIU/mL), G/G genotipine sahip hastalarda bu aralık 9,1 mIU/mL ile 27 mIU/mL arasında (ort.: $13,51 \pm 5,69$ mIU/mL) bulunmuştur. Polimorfizme uğrayan tüm hastalar (A/A+G/A) dikkate alındığında aralık 5 mIU/mL ile 21mIU/mL arasındadır (ort.: $11,4 \pm 3,62$ mIU/mL). A/A, G/A ve G/G bireylerin 3. gün FSH düzeyleri istatistiksel açıdan karşılaştırıldı ve anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,427$). A/A+G/A ve G/G arasındaki istatistiksel açıdan yapılan karşılaştırmada da anlamlı fark saptanmadı ($p=0,192$) (Tablo 4.18). Tedavide kullanılan toplam gonadotropin dozları değerlendirildiğinde, A/A genotipli hastaların doz aralığının 3750 ünite ile 7350 ünite arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $5145,83 \pm 1054,09$ ünite) (Tablo 4.18). G/A polimorfizmine sahip bireylerde aralık 3000 ünite ile 7500 ünite arasında (ort.: $4677,5 \pm 1414,35$) değişirken, G/G genotipli bireylerde bu oran 2250 ünite 5700 ünite arasında (ort.: $3918,75 \pm 1300,53$) değişmektedir. Total polimorfizimli bireylerdeki (A/A+G/A) aralık 3000 ünite ile 7500 ünite arasında değişmektedir (ort.: $4853,12 \pm 1293,59$ ünite). Tedavide kullanılan gonadotropin dozu açısından A/A, G/A, G/G genotipli bireyler kendi arasında ve A/A+G/A bireylerle G/G genotipli bireyler

kendi arasında istatistiksel açıdan karşılaştırılmışlardır ancak anlamlı istatistiksel sonuç bulunmamıştır ($p=0,132$, $p=0,124$) (Tablo 4.18).

Tablo 4.18. Poor responder hastalarda genotipler ve diğer parametreler arasındaki ilişki.

Ala307Thr1	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD
Yaş	12	27	38	31,33	3,701
3.gün FSH	12	5,0	21,0	11,417	4,5218
A/A Tedavi gonadotropin	12	3750	7350	5145,83	1054,096
Tedavi süresi	12	14	18	15,83	1,115
Tedavi sonu E2	12	110	660	420,33	187,613
Yaş	20	25	39	33,90	4,103
3.gün FSH	20	8,0	21,0	11,400	3,1018
G/A Tedavi gonadotropin	20	3000	7500	4677,50	1414,351
Tedavi süresi	20	12	19	15,25	1,943
Tedavi sonu E2	20	27	660	376,60	220,730
Yaş	32	25	39	32,94	4,095
3.gün FSH	32	5,0	21,0	11,406	3,6266
AA+AG Tedavi gonadotropin	32	3000	7500	4853,12	1293,591
Tedavi süresi	32	12	19	15,47	1,685
Tedavi sonu E2	32	27	660	393,00	206,916
Yaş	8	23	39	31,25	4,950
3.gün FSH	8	9,1	27,0	13,513	5,6960
G/G Tedavi gonadotropin	8	2250	5700	3918,75	1300,532
Tedavi süresi	8	13	20	15,75	2,605
Tedavi sonu E2	8	120	660	459,38	235,014

N=hasta sayısı, SD=standart sapma

Elde edilen genetik analizler tedavi süreleri açısından değerlendirilmiş ve A/A genotipine sahip hastalarda tedavi süresinin 14 ile 18 gün arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $15,83 \pm 1,11$ gün) (Tablo 4.18). G/A ve G/G genotipine sahip hastalarda ise sürenin değişkenlik sınırları sırasıyla 12 ile 19 gün arasında ve 13 ile 20 gün arasında olduğu görülmüştür. Ortalamaları sırasıyla $15,25 \pm 1,94$ gün ve $15,75 \pm 2,6$ gündür. Total polimorfizimli hasta (A/A+G/A) değerlendirilmesi yapıldığında ise süre aralığının 12 ile 19 gün arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $15,47 \pm 1,68$ gün). A/A, G/A ve G/G genotipine sahip hasta gruplarının tedavi süreleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,582$). A/A+G/A ve G/G grupları arasında da istatistiksel karşılaştırılma yapıldı ve anlamlı sonuç bulunmadı ($p=0,81$) (Tablo 4.18).

Tedavi sonunda elde edilen, β hCG vermeden önceki E2 düzeyleri açısından değerlendirme yapıldığında, A/A genotipli hastaların E2 düzeyleri 110 pg/mL ile 660 pg/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $420,33 \pm 187,63$ pg/mL) (Tablo 4.18). G/A genotipli hastalarda E2 düzeyleri 27 pg/mL ile 660 pg/mL arasında değişirken (ort.: $376,6 \pm 220,73$ pg/mL), G/G genotipli hastalarda bu değerler 120 pg/mL ile 660 pg/mL arasındadır (ort.: $459,38 \pm 235,01$ pg/mL). A/A ve G/A genotipli hastalar toplamda incelendiğinde E2 düzeyleri 27 pg/mL ile 660 pg/mL arasında değişmektedir (ort.: $393 \pm 206,81$ pg/mL). İstatistiksel olarak A/A, G/A ve G/G genotipli hastalar karşılaştırılmış ve anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,771$). Yine diğer parametrelerde yapıldığı gibi A/A+G/A grubu ile G/G grubu ayrıca değerlendirilmiş ve anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,488$) (Tablo 4.18).

4.3.3.2. Ser680Asn bölge sonuçları için istatistiksel analiz

Ser680Asn bölgesindeki polimorfizmin poor responder hastalarındaki genetik analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 4.19’da verilmiştir.

A/A polimorfizmine sahip 11 hastada yaş aralığı 27 ile 38 arasındadır (ort.: $31,27 \pm 3,87$) (Tablo 4.19). 21 hasta G/A polimorfizmine sahiptir ve yaş aralığı 25 ile 39 arasındadır (ort.: $33,81 \pm 4,02$). Tüm polimorfizimli hastaların yaş aralığı 25 ile 39 arasında değişmekte olup, ortalaması $32,94 \pm 4,09$ olarak hesaplanmıştır. Normal genotipe sahip olan 8 hastanın yaş aralığı 23 ile 39 arasındadır (ort.: $31,25 \pm 4,95$). A/A, G/A ve G/G grupları arasında yaşlar açısından istatistiksel inceleme yapılmış ancak anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p=0,145$). Ayrıca A/A+G/A ve G/G arasında da istatistiksel analiz yapılmış ve yine benzer şekilde anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p=0,387$) (Tablo 4.19). Elde edilen genetik analizler 3. gün FSH düzeyleri açısından değerlendirilmiş ve A/A genotipine sahip hastalarda FSH düzeyi 6 mIU/mL ile 21 mIU/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $12 \pm 4,24$ mIU/mL) (Tablo 4.19). G/A ve G/G genotipine sahip hastalarda ise düzeyin değişkenlik sınırları sırasıyla 5 mIU/mL ile 21 mIU/mL arasında ve 9,1 mIU/mL ile 27 mIU/mL arasında olduğu görülmüştür. Ortalamaları sırasıyla $11,09 \pm 3,33$ mIU/ml ve $13,51 \pm 5,69$ mIU/mL’dir. Total polimorfizimli hasta (A/A+G/A) değerlendirilmesi yapıldığında ise düzey aralığının 5 mIU/mL ile 21 mIU/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $11,4 \pm 3,62$ mIU/mL). A/A, G/A ve G/G genotipine sahip hasta gruplarının 3. gün FSH düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,367$). A/A+G/A ve G/G grupları

arasında da istatistiksel karşılaştırılma yapıldı ve anlamlı sonuç bulunmadı ($p=0,192$) (Tablo 4.19).

Tablo 4.19. Poor responder hastalardaki genotipler ve diğer parametreler arasındaki ilişki.

Ser680Asn1	N	Minimum	Maksimum	Mean	SD
Yaş	11	27	38	31,27	3,875
3.gün FSH	11	6,0	21,0	12,000	4,2426
A/A Tedavi gonadotropin	11	3750	6500	4945,42	832,001
Tedavi süresi	11	14	17	15,64	0,924
Tedavi sonu E2	11	110	660	418,64	196,673
Yaş	21	25	39	33,81	4,020
3.gün FSH	21	5,0	21,0	11,095	3,3302
G/A Tedavi gonadotropin	21	3000	7500	4804,76	1496,822
Tedavi süresi	21	12	19	15,38	1,987
Tedavi sonu E2	21	27	660	379,57	215,571
Yaş	32	25	39	32,94	4,095
3.gün FSH	32	5,0	21,0	11,406	3,6266
AA+AG Tedavi gonadotropin	32	3000	7500	4853,12	1293,591
Tedavi süresi	32	12	19	15,47	1,685
Tedavi sonu E2	32	27	660	393,00	206,916
Yaş	8	23	39	31,25	4,950
3.gün FSH	8	9,1	27,0	13,513	5,6960
G/G Tedavi gonadotropin	8	2250	5700	3918,75	1300,532
Tedavi süresi	8	13	20	15,75	2,605
Tedavi sonu E2	8	120	660	459,38	235,014

N=hasta sayısı, SD=standart sapma

Tedavide kullanılan gonadotropin dozları karşılaştırıldığında, A/A genotipine sahip hastalarda kullanılan doz 3750 ünite ile 6500 ünite arasında değiştiği görülmektedir (ort.: $4945,45 \pm 832$ ünite) (Tablo 4.19). G/A genotipli hastalarda kullanılan doz 3000 ünite ile 7500 ünite arasında (ort.: $4804,76 \pm 1496,82$ ünite) değişmekte iken G/G genotipli hastalarda değişim aralığı 2250 ünite ile 5700 ünite arasındadır (ort.: $3918,75 \pm 1300,532$). Tüm polimorfizimli hastalar (A/A+G/A) dikkate alındığında kullanılan gonadotropin dozu 3000 ünite ile 7500 ünite arasında değişmektedir (ort.: $4853,12 \pm 1293,591$). A/A, G/A ve G/G genotipine sahip poor responder hastaları kullanılan gonadotropin dozu açısından karşılaştırıldı ve anlamlı bir sonuç bulunamadı ($p=0,226$). Ayrıca homozigot olsun ve heterozigot olsun, tüm

polimorfizimli hastalar (A/A+G/A) kullanılan gonadotropin dozu açısından normal bireylerle (G/G) karşılaştırıldığında yine anlamlı sonuç bulunmadı ($p=0,124$) (Tablo 4.19).

Tedavi süreleri açısından hastalar değerlendirildiğinde A/A şeklinde polimorfizme sahip hastalarda tedavi süresinin 14 ile 17 gün arasında sürdüğü görülmektedir (ort.: $15,64 \pm 0,924$) (Tablo 4.19). G/A genotipli hastalarda bu süre 12 ile 19 gün arasında değişmekte iken (ort.: $15,38 \pm 1,987$), G/G genotipli hastalarda bu süre 13 ile 20 gün arasında değişmektedir (ort.: $15,75 \pm 2,605$). A/A ve G/A genotipli hastalar toplamda dikkate alındığında süre aralığı 12 ile 19 gün arasındadır (ort.: $15,47 \pm 1,685$). A/A, G/A ve G/G genotipli hastalar tedavi süreleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılmışlardır ve anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,841$). Ayrıca total polimorfizimli hastalarla (A/A+G/A), normal genotipli hastalar ayrıca değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,810$) (Tablo 4.19).

Tedavi sonunda elde edilen, β hCG vermeden önceki E2 düzeyleri açısından değerlendirme yapıldığında, A/A genotipli hastaların E2 düzeyleri 110 pg/mL ile 660 pg/mL arasında değiştiği görülmüştür (ort.: $418,64 \pm 196,673$) (Tablo 4.19). G/A genotipli hastalarda E2 düzeyleri 3000 pg/mL ile 7500 pg/mL arasında değişirken (ort.: $4804,76 \pm 1496,822$), G/G genotipli hastalarda bu değerler 2250 pg/mL ile 5700 pg/mL arasındadır (ort.: $3918,75 \pm 1300,532$). A/A ve G/A genotipli hastalar toplamda incelendiğinde E2 düzeyleri 3000 pg/mL ile 7500 pg/mL arasında değişmektedir (ort.: $4853,12 \pm 1293,591$). İstatistiksel olarak A/A, G/A ve G/G genotipli hastalar karşılaştırılmış ve anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,776$). Yine diğer parametrelerde yapıldığı gibi A/A+G/A grubu ile G/G grubu ayrıca değerlendirilmiş ve anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,488$) (Tablo 4.19).

4.4. Gruplar Arası Karşılaştırma Sonuçları

4.4.1. Ala307Thr polimorfizminin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Her üç gruptaki hasta sayıları ve oranları tablo 4-20’de gösterilmiştir. A/A polimorfizmine sahip toplam 45 hastanın 12’si poor responder grubundan, 5 tanesi good responder grubundan, 28 tanesi de kontrol grubundan bulunmuştur. Tüm poor responder grubu hastalarının %30’u A/A genotipine sahipken, bu oran good responder grubu hastalarında %11,9, kontrol grubu hastalarında ise %28 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.20. Ala307Thr polimorfizmi açısından üç grup arasındaki dağılım.

			Grup			toplam
			PR	GR	KG	
Ala307Thr	A/A	Hasta sayısı	12	5	28	45
		Ala307Thr polimorfizmi olanlar içinde (%)	26,7	11,1	62,2	100,0
		Tüm gruplar içinde (%)	30,0	11,9	28,0	24,7
	G/A	Hasta sayısı	20	18	51	89
		Ala307Thr polimorfizmi olanlar içinde (%)	22,5	20,2	57,3	100,0
		Tüm gruplar içinde (%)	50,0	42,9	51,0	48,9
	G/G	Hasta sayısı	8	19	21	48
		Ala307Thr polimorfizmi olanlar içinde (%)	16,7	39,6	43,8	100,0
		Tüm gruplar içinde (%)	20,0	45,2	21,0	26,4
AA+G/A		Hasta sayısı	32	23	79	134
		Ala307Thr polimorfizmi olanlar içinde (%)	23,9	17,2	59,0	100
		Tüm gruplar içinde (%)	80	54,8	79	73,6
Toplam		Hasta sayısı	40	42	100	
		Ala307Thr polimorfizmi olanlar içinde (%)	22,0	23,1	54,9	
		Tüm gruplar içinde (%)	100,0	100,0	100,0	

PR=poor responder, GR=good responder, KG=kontrol grubu

G/A genotipine sahip 89 hastanın 20 tanesi poor responder grubundan, 18 tanesi good responder grubundan, 51 tanesi de kontrol grubundan elde edilmiştir. Poor responder olan 40 hastanın %50'si G/A genotipine sahipken, 42 good responder hastada bu oran %42,9 olarak saptanmıştır. 100 tane kontrol grubu hasta da bu oran %51,0 olarak bulunmuştur.

Herhangi bir polimorfizme uğramayan hasta sayısı poor responder, good responder ve kontrol grubu hastaları için sırasıyla 8, 19 ve 21 olarak saptanmıştır. Poor responder grubu hastaları içinde polimorfizme sahip olmayan hasta oranı %20 iken bu oran good responder ve kontrol grubu için sırasıyla %45,2 ve %21,90 olarak saptanmıştır.

Toplamda tüm poor responder hastalarının %80'inde polimorfizme rastlanırken, good responder hastaların %54,8'inde polimorfizme rastlanılmıştır. Kontrol grubu hastalarının %79'unda polimorfizme rastlanılmıştır.

Polimorfizminin var olup olmaması ve oluşan polimorfizm tipleri (heterozigot-homozigot) kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Poor responder ve good responder grubundaki Ala307Thr bölgesindeki A/A, G/A ve G/G genotipli hastalar karşılaştırılmıştır ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0,024). Poor

responder ve good responder gruplarındaki polimorfizme sahip tüm hastalar (A/A+G/A) karşılaştırıldığında yine anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,015$).

Poor responder grubu ile kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı bir farka rastlanılmamıştır (A/A,G/A ve G/G grubları arasında) ($p=0,971$). Yine toplam polimorfizimli hasta açısından poor responder ve kontrol grubu açısından istatistiksel analiz yapıldığında anlamlı bir farka rastlanılmamıştır ($p=0,895$).

Good responder ile kontrol grubu da ayrıca değerlendirilmiştir. A/A, G/A ve G/G genotipleri arasında yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p=0,007$). A/A ve G/A genotipne sahip tüm polimorfizli hastalar açısından yapılan analizde de yine istatistiksel açıdan farklılık saptanmıştır ($p=0,003$).

4.4.1.1. Ala307Thr polimorfizminin gruplar arasındaki demografik özellikler açısından karşılaştırılması

Gruplarda (poor responder, good responder ve kontrol grubu) bulunan hastalar sahip oldukları polimorfizmlere göre demografik yapıları bakımından karşılaştırıldılar.

Poor responder, good responder ve kontrol grubu hastalarının yaş oranları Tablo 4.21’de verilmiştir. Poor responder, good responder ve kontrol grubu hastalarının yaş ortalamaları sırasıyla 32,6, 30,00 ve 29,25’tir.

Ala307Thr bölgesinde A/A genotipine sahip hastaların yaşları arasında istatistiksel inceleme yapılmış ve anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,121$) (Tablo 4.22). Üç grup arasında G/A genotipli hastalar arasında yapılan istatistiksel incelemede anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,008$). G/A genotipi açısından poor responder ve good responder grupları arasında da istatistiksel inceleme yapılmış, yine anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,003$). Poor responder ve kontrol grubu arasındaki incelemede de anlamlı fark bulunurken ($p=0,007$), good responder ve kontrol grubu arasında G/A genotipinde yaşlar açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,671$) (Tablo 4.22). Ala307Thr bölgesindeki tüm polimorfizimli (A/A+G/A) hastalar yaşları açısından incelendiğinde, üç grup arasından anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,004$). Poor responder ve good responder grubu ile poor responder ve kontrol grubu hastaları kendi aralarında incelendiğinde yine benzer şekilde anlamlı farklılıklar saptanmıştır (sırasıyla $p=0,017$, $p=0,001$). Ancak good responder ve kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır ($p=0,596$).

Tablo 4.21. Hastaların yaş dağılımları.

Grup	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD
PR Yaş	40	23	39	32,60	4,266
GR Yaş	42	23	39	30,00	4,225
KG Yaş	100	23	38	29,25	4,900

N=hasta sayısı, SD=standart sapma, PR=poor responder, GR=good responder, KG=kontrol grubu

Tablo 4.22. Farklı genotipler için yaş dağılımları.

Ala307Thr		Yaş ortalamaları
Kontrol grubu	A/A	28,32±0,90
	G/A	30,35±0,69
	G/G	27,81±0,99
Good resonder	A/A	31,20±1,65
	G/A	29,67±0,89
	G/G	30,00±1,11
Poor responder	A/A	31,33±1,06
	G/A	33,90±0,91
	G/G	31,25±1,75

Ala307Thr polimorfizmi açısından incelenen poor responder ve good responder gruplarının yaş dışındaki demografik özellikleri Tablo 4.23’de gösterilmiştir. Her iki gruptaki hastalar (poor responder ve good responder) infertilite süreleri açısından karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık istatistiksel açıdan saptanmamıştır (Tablo 4.23). Her iki grup 3. Gün FSH düzeyleri açısından karşılaştırıldığında hem polimorfizimli hastalarda hem de normal genotipli hastalarda istatistiksel açıdan farklılık saptanmıştır. Benzer şekilde tedavide kullanılan gonadotropin dozları açısından karşılaştırıldığında tüm genotiplerde istatistiksel farklılık saptanmıştır. Ancak uygulanan tedavi süreleri açısından incelendiğinde polimorfizme uğramış hastalarda süre açısından farklılık saptanırken, normal genotipli hastalarda süreler benzer bulunmuştur. Tedavi sonunda oluşan follikül sayıları ve tedavi sonunda elde edilen E2 düzeyleri hem polimorfizimli hastalarda hem de normal genotipli hastalarda istatistiksel açıdan anlamlı şekilde farklı bulunmuştur (Tablo 4.23).

Tablo 4.23. Ala307Thr polimorfizimli poor ve good responder hastaların genotipe göre demografik özelliklerinin dağılımı.

Ala307Thr	İnfertilite süresi (yıl)	3.gün FSH (mIU/mL)	Tedavi gonadotropin dozu (ünite)	Tedavi süresi (gün)	Tedavi sonu follikül sayısı	Tedavi sonu E2 (pg/mL)
PR A/A	7,33±3,33	11,41±4,52*	5145,83±1054,09*	15,83±1,11**	1,17±0,93**	420,33±187,61*
G/A	7,65±5,65	11,40±3,10**	4677,50±1414,35**	15,25±1,94**	1,05±1,05**	376,60±220,73**
A/A+G/A	7,53±4,85	11,40±3,62**	4853,12±1293,59**	15,47±1,68**	1,09±0,99**	393,00±206,91**
G/G	6,50±2,97	13,51±5,69**	3918,75±1300,53*	15,75±2,60	1,25±0,88**	459,38±235,01**
GR A/A	6,20±3,63	5,8±1,48*	1425,00±496,23*	12,00±1,00**	5,60±1,14**	2393,40±183,21*
G/A	6,33±3,10	5,5±1,33**	2166,67±799,26**	12,61±1,33**	5,72±1,36**	2326,83±624,84**
A/A+G/A	6,30±3,14	5,56±1,34**	2005,43±797,65**	12,48±1,27**	5,70±1,29**	2341,30±555,50**
G/G	5,26±2,84	5,94±1,74**	2339,47±923,84*	13,74±2,07	5,58±1,26**	2277,95±732,81**

PR=poor responder, GR=good responder, *=p<0,05, **=p<0,001

4.4.2. Ser680Asn polimorfizminin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Her üç gruptaki hasta sayıları ve oranları tablo 4-23’de gösterilmiştir. A/A polimorfizmine sahip toplam 42 hastanın 11’si poor responder grubundan, 5 tanesi good responder grubundan, 26 tanesi de kontrol grubundan bulunmuştur. Tüm poor responder grubu hastalarının %27,5’u A/A genotipine sahipken, bu oran good responder grubu hastalarında %11,9, kontrol grubu hastalarında ise %26 olarak bulunmuştur.

G/A genotipine sahip 92 hastanın 21 tanesi poor responder grubundan, 18 tanesi good responder grubundan, 53 tanesi de kontrol grubundan elde edilmiştir. Poor responder olan 40 hastanın %52,5’si G/A genotipine sahipken, 42 good responder hastada bu oran %42,9 olarak saptanmıştır. 100 tane kontrol grubu hasta da bu oran %53,0 olarak bulunmuştur.

Herhangi bir polimorfizme uğramayan hasta sayısı poor responder, good responder ve kontrol grubu hastaları için sırasıyla 8, 19 ve 21 olarak saptanmıştır (Ala307Thr grubuna benzer sayılar elde edilmiştir). Poor responder grubu hastaları içinde polimorfizme sahip olmayan hasta oranı %20 iken bu oran good responder ve kontrol grubu için sırasıyla %45,2 ve %21,9 olarak saptanmıştır.

Toplamda tüm poor responder hastalarının %80’inde polimorfizme rastlanırken, good responder hastaların %54,8’inde polimorfizme rastlanılmıştır. Kontrol grubu hastalarının %79’unda polimorfizme rastlanılmıştır (Ala307Thr grubuna benzer sayılar elde edilmiştir).

Polimorfizminin var olup olmaması ve oluşan polimorfizm tipleri (heterozigot-homozigot) kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Poor responder ve good responder grubundaki Ser680Asn bölgesindeki A/A, G/A ve G/G genotipli hastalar

karşılaştırılmıştır ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,031$). Poor responder ve good responder gruplarındaki polimorfizme sahip tüm hastalar (A/A+G/A) karşılaştırıldığında yine anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,015$).

Tablo 4.24. Ser68Asn polimorfizmi açısından üç grup arasındaki dağılım.

			Grup			toplam
			PR	GR	KG	
Ser680Asn	A/A	Hasta sayısı	11	5	26	42
		Ser680Asn polimorfizmi olanlar içinde (%)	26,2%	11,9%	61,9%	100,0%
		Tüm gruplar içinde (%)	27,5%	11,9%	26,0%	23,1%
	G/A	Hasta sayısı	21	18	53	92
		Ser680Asn polimorfizmi olanlar içinde (%)	22,8%	19,6%	57,6%	100,0%
		Tüm gruplar içinde (%)	52,5%	42,9%	53,0%	50,5%
	G/G	Hasta sayısı	8	19	21	48
		Ser680Asn polimorfizmi olanlar içinde (%)	16,7%	39,6%	43,8%	100,0%
		Tüm gruplar içinde (%)	20,0%	45,2%	21,0%	26,4%
AA+AG	Hasta sayısı	32	23	79	134	
	Ser680Asn polimorfizmi olanlar içinde (%)	23,9	17,2	59,0	100	
	Tüm gruplar içinde (%)	80	54,8	79	73,6	
Toplam	Hasta sayısı	40	42	100		
	Ser680Asn polimorfizmi olanlar içinde (%)	22,0%	23,1%	54,9%		
	Tüm gruplar içinde (%)	100,0%	100,0%	100,0%		

PR=poor responder, GR=good responder, KG=kontrol grubu

Poor responder grubu ile kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı bir farka rastlanılmamıştır (A/A,G/A ve G/G grupları arasında) ($p=0,980$). Yine toplam polimorfizimli hasta açısından poor responder ve kontrol grubu açısından istatistiksel analiz yapıldığında anlamlı bir farka rastlanılmamıştır ($p=0,895$).

Good responder ile kontrol grubu da ayrıca değerlendirilmiştir. A/A, G/A ve G/G genotipleri arasında yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p=0,009$). A/A ve G/A genotipine sahip tüm polimorfizli hastalar açısından yapılan analizde de yine istatistiksel açıdan farklılık saptanmıştır ($p=0,003$).

4.4.2.1. Ser680Asn polimorfizminin gruplar arasındaki demografik özellikler açısından karşılaştırılması

Gruplarda (poor responder, good responder ve kontrol grubu) bulunan hastalar sahip oldukları polimorfizmlere göre demografik yapıları bakımından karşılaştırıldılar.

Ser680Asn bölgesinde A/A genotipine sahip hastaların yaşları arasında istatistiksel inceleme yapılmış ve anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,259$) (Tablo 4.25). Üç grup arasında G/A genotipli hastalar arasında yapılan istatistiksel incelemede anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,004$). G/A genotipi açısından poor responder ve good responder grupları arasında da istatistiksel inceleme yapılmış, yine anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,003$). Poor responder ve kontrol grubu arasındaki incelemede de anlamlı fark bulunurken ($p=0,002$), good responder ve kontrol grubu arasında G/A genotipinde yaşlar açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,926$) (Tablo 4.25). Ser680Asn bölgesindeki tüm polimorfizimli (A/A+G/A) hastalar yaşları açısından incelendiğinde, üç grup arasından anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,003$). Poor responder ve good responder grubu ile poor responder ve kontrol grubu hastaları kendi aralarında incelendiğinde yine benzer şekilde anlamlı farklılıklar saptanmıştır (sırasıyla $p=0,017$, $p=0,001$). Ancak good responder ve kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır ($p=0,510$).

Tablo 4.25. Farklı genotipler için yaş dağılımları.

Ser680Asn		Yaş ortalamaları
Kontrol grubu	A/A	28,96±4,796
	G/A	29,79±5,001
	G/G	28,24±4,805
Good resonder	A/A	31,20±3,701
	G/A	29,67±3,789
	G/G	30,00±4,853
Poor responder	A/A	31,27±3,875
	G/A	33,81±4,020
	G/G	31,25±4,950

Ser680Asn polimorfizmi açısından incelenen poor responder ve good responder gruplarının yaş dışındaki demografik özellikleri Tablo 4.26’da gösterilmiştir. Her iki gruptaki hastalar (poor responder ve good responder) infertilite süreleri açısından karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık istatistiksel açıdan saptanmamıştır (Tablo 4.26). Her iki grup 3. Gün FSH düzeyleri açısından karşılaştırıldığında hem polimorfizimli hastalarda hem de normal genotipli hastalarda istatistiksel açıdan farklılık saptanmıştır. Benzer şekilde tedavide kullanılan gonadotropin dozları açısından karşılaştırıldığında tüm genotiplerde istatistiksel farklılık saptanmıştır. Ancak uygulanan tedavi süreleri açısından incelendiğinde polimorfizme uğramış hastalarda süre açısından farklılık saptanırken, normal genotipli hastalarda süreler benzer bulunmuştur ($p=0,062$). Tedavi sonunda oluşan follikül sayıları ve tedavi sonunda elde edilen E2 düzeyleri hem polimorfizimli hastalarda hem de normal genotipli hastalarda istatistiksel açıdan anlamlı şekilde farklı bulunmuştur (Tablo 4.26) (bu sonuçlar Ala307Thr polimorfizimli hastalar içinde benzer şekildedir).

Tablo 4.26. Ser680Asn polimorfizimli poor ve good responder hastaların genotipe göre demografik özelliklerinin dağılımı.

Ala307Thr	İnfertilite süresi (yıl)	3.gün FSH (mIU/mL)	Tedavi gonadotropin dozu (ünite)	Tedavi süresi (gün)	Tedavi sonu follikül sayısı	Tedavi sonu E2 (pg/mL)
PR A/A	7,45±3,47	12,00±4,24*	4945,45±832,00*	15,64±0,92*	1,27±0,90**	418,64±196,67*
G/A	7,57±5,51	11,095±3,33**	4804,76±1496,82**	15,38±1,98**	1,00±1,04**	379,57±215,57**
A/A+G/A	7,53±4,85	11,40±3,62**	4853,12±1293,59**	15,47±1,68**	1,090±0,99**	393,00±206,91**
G/G	6,50±2,97	13,51±5,69**	3918,75±1300,53*	15,75±2,60	1,25±0,88**	459,38±235,01**
GR A/A	6,20±3,63	5,800±1,48*	1425,00±496,23*	12,00±1,00*	5,60±1,14**	2393,40±183,21*
G/A	6,33±3,10	5,500±1,33**	2166,67±799,26**	12,61±1,33**	5,72±1,36**	2326,83±624,84**
A/A+G/A	6,30±3,14	5,56±1,34**	2005,43±797,65**	12,48±1,27**	5,70±1,29**	2341,30±555,50**
G/G	5,26±2,84	5,94±1,74**	2339,47±923,84*	13,74±2,07	5,58±1,26**	2277,95±732,81**

PR=poor responder, GR=good responder, *= $p<0,05$, **= $p<0,001$

5. TARTIŞMA

FSHR'yi (follikül stimulan hormon reseptörü) kodlayan genler kromozom 2'de bulunmaktadır (115). Burada oluşan yapısal değişiklikler, FSH reseptör geninin dizilimindeki aminoasit sıralamasında değişiklik oluşturacak ve dolayısıyla genin işlevinde de değişiklik oluşturacaktır. Bu oluşan değişikliklerden bazıları reseptörün fonksiyonlarının artmasına neden olurken bazıları ise azalmasına neden olabilmektedir.

Aktive edici mutasyonlar, FSH'nin az seviyelerinde, hatta yokluğunda bile FSHR aktivasyonuna yol açabilirler. Bu aktive edici mutasyonlar bazen, FSHR'nin başka tropik hormonlara da cevap vermesine yol açabilir (TSH gibi). İnaktive edici mutasyonlar reseptör ligand etkileşimini bozarak etki gösterebildiği gibi, FSH'ye bağlı oluşan sinyal iletimini de bozarak etki gösterebilir. Bu oluşan etki derecesi değişkendir. Total blok ta oluşabilir, minimal etki azalması da oluşabilir.

FSHR inaktive edici mutasyonları primer veya sekonder amenore, infertilite ve prematür overyan sendroma (POF) yol açabilmektedir. Tam tersi olarak ta aktive edici mutasyonlar, eksojen FSH hormonu verilsin veya verilmesin overyan hiperstimülasyon sendromuna (OHSS) yol açabilmektedirler.

Nokta mutasyonlarının yanında, FSHR gen polimorfizmleri (özellikle codon 307 ve 680) olduğu zaman eksojen verilen FHS hormonuna yanıtta değişiklikler gözlenebilmektedir (115). Bu durum da yardımcı üreme teknikleri uygulanırken tedavi yanıtının değişiklikler göstermesine neden olabilmektedir.

FSHR geni kodlanırken, iki bölgesinde (307 ve 680) bağlantı dengesizliği nedeniyle değişik paternlerde bağlanma olabilir. Bu, bir nüfusun içinde özel sıklıklarla bulunabilen bu konumlarda ayrı allelik değişkenlerini oluşturur. Bu değişkenler nadir görülselerde, en sık olarak Ala307/Ser680 (AS) ve Thr307 /Asn680 (TN) bölgelerinde gözlenir(116). TN allelik değişkeni, en yüksek görülme sıklığına sahiptir (117-119). Ala307/Asn680 ve Thr307/Ser680 ise çok daha az sıklıkla görülen iki alleldir, bazı etnik gruplarda nadiren rastlanırlar. Bu allelik değişkenler homozigot (her iki kromozomda) veya heterozigot (bir kolda varyant değişim, diğer kolda homolog kromozom) şekilde olabilirler. Sonuç olarak 9 farklı şekilde gözlenebilirler: TN/TN, TN/AS, AS/AS, TN/AN, TN/TS, AS/AN, AS/TS, AN/AN, TS/TS). Farklı ırklarda farklı görülme sıklıkları izlenebilir. Örnek olarak Japon nüfusunu vermek gerekirse TN/TN, TN/AS ve AS/AS sıklıklarının görülme oranları sırasıyla %41, %46,9 ve %12,1'dir (119). KOH

uygulanan Kore nüfusunun yaklaşık %41'i homozigot Asn680 (TN/TN), %12,5'i homozigot Ser680 (AS/AS) ve %45,6'sı da heterozigot Asn/Ser680 olarak bulunmuştur (120). Homozigot Ser680 olan grupta bazal FSH seviyelerinin yüksek olduğu birkaç çalışmada belirtilmiştir (117-119). Ayrıca bu çalışmalarda Ser680 homozigot polimorfizminin düşük tedavi sonu E2 seviyeleri ve düşük inhibin A seviyeleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu hastalarda ovulasyon indüksiyonu için daha yüksek miktarlarda rFSH kullanmak gerektiği bildirilmiştir (118,119). Eğer homozigot Asn680 genotipi varsa genel olarak bu hastalarda tedaviye iyi yanıt olduğu düşünülmektedir (108). Bu hastalar düşük 3.gün FSH seviyeleri, yüksek tedavi sonu E2 miktarı ve daha az gonadotropin kullanımı ile ilişkilidir (115).

Verilen yardımcı üreme tekniklerine cevap alınamaması durumu genel olarak poor response olarak tariflenmektedir. Ancak birçok çalışma olmasına rağmen bugüne kadar poor responder hastaların belirlenmesi adına ortak bir konsensus sağlanamamış ve hangi kriterlere bakılarak hastanın poor responder olarak belirlenebileceği kararlaştırılmamıştır. Surrey ve ark. 2000 yılında yaptıkları çalışmada, literatürdeki tüm poor responder hastalar hakkında bulunan yayınları taramışlar ve bir derleme hazırlamışlardır (110). Literatür taramasında, poor responder hasta tanımlamasında çok değişken kriterlerin seçildiği görülmüştür, ancak aynı kriterleri kullanan 4'ten fazla çalışmaya rastlanılmamıştır (110). Bazı araştırmacılar kriter olarak ultrasound görüntüsündeki matür follikül sayısının 5'den az olmasını baz alırken (111-120), bazı araştırmacılar 3.gün FSH seviyelerinin yüksek olmasını (6,5 mIU/mL'den 15 mIU/mL'ye kadar değişen aralıklarda) kriter olarak almışlardır (121-127). Tedavi sonunda elde edilen E2 seviyelerinin düşük olması kimi araştırmacılara göre hastaya poor responder denilebilmesi için yeterli görülmüştür (113,117,123,127). Başka iki araştırmacı da tedavi sonunda elde edilen matür oosit sayısının 4'den az olmasını kriter olarak benimsemişlerdir (122,128). Loutradis ve ark. 2006 yılında yaptıkları geniş prospektif çalışmada, poor responder kriteri olarak, tedavi sonundaki follikül sayısının 3 ve daha az olması ve elde edilen E2 düzeyinin 660 pg/mL'den az olmasını belirlemişlerdir (108). E2 seviyesinin 660 pg/mL olarak kabul edilmesinin nedeni ise hasta popülasyonlarında en düşük E2 seviyesine sahip olan %10'luk hasta grubunun E2 seviyesinin 660 pg/mL'den az olmasıdır (108). Benzer şekilde biz de çalışmamızda poor responder hasta seçimi yaparken, tedavi sonunda elde follikül sayısının 3 ve daha az olmasını ve E2 seviyesinin 660 pg/mL'den az olmasını belirledik (tablo 3-3). Yine aynı çalışmada, Loutradis ve ark. poor responder grubundan farklı olarak overyan

disfonksiyonlu bir grup daha oluşturmuşlar ve bu grubun belirlenme kriteri olarak da 3.gün FSH seviyesinin 10 mIU/mL'den fazla olmasını baz almışlardır. Biz çalışmamızda poor responder hasta kriteri olarak sadece tedavi sonu follikül sayısı ve tedavi sonu E2 düzeylerini dikkate aldık.

Surrey ve ark. yaptığı poor responder hasta ve tedavi protokolleri derlemesinde, hangi tedaviye daha iyi yanıt verildiği de araştırılmıştır (110). Değişik çalışmalarda farklı tedavi protokolleri uygulandığı görülmüştür. Ortak bir tedavi şekli belirlenememiş ve verilen tedaviler arasında istatistiksel olarak üstün bir tanesinin belirlenemediği görülmüştür. Bizim çalışmamızda poor responder olarak belirlediğimiz tüm hastalarda rFSH ve hMG kombine olarak verilmiştir.

Loutradis ve ark. 2006 yılında yaptıkları çalışmada FSH reseptöründeki Ser680Asn polimorfizmlerini araştırmışlardır (108). Daha önce de bahsedildiği gibi 3 ve daha az tedavi sonu follikül sayısı olan ve E2 düzeyi 660 pg/mL'nin altında olan 35 hastayı poor responder olarak belirlemişlerdir (108). 46 tane de good responder olan hastayı çalışmaya katmışlardır. 3. grup olarak overyan disfonksiyon grubu oluşturmuşlar ve 44 tane 3. gün FSH değeri 10 mIU/mL ve üzerinde olan hastayı çalışmaya katmışlardır. Hasta sayıları olarak bizim çalışmamızda da benzer rakamlar söz konusuydu ancak biz çalışmamızda 100 tane kontrol grubu hastayı da çalışmaya ekledik. Good responder grup hastalarda long protokol uygulanırken, poor responder ve overyan disfonksiyonlu hastalarda short protkol uygulanmış. Biz çalışmamızda 13 good responder hastaya long protokol uygularken, geri kalan 29 good responder hastaya ve tüm poor responder olan hastalara rFSH ve hMG kombine şekilde verdik. Loutradis ve ark. hastaları sadece Ser680Asn polimorfizmi açısından değerlendirmişler ve Ser/Ser (G/G), Ser/Asn (G/A), Asn/Asn (A/A) şeklinde genotipleri sınıflandırmışlardır. Ser680Asn açısından biz de benzer şekilde sınıflandırma yaptık ancak, ek olarak FSH reseptöründeki diğer bir polimorfizmi de (Ala307Thr) araştırmamıza dahil ettik. Araştırma sonucunda tüm genotip gruplarında 3. gün FSH düzeyi ile verilen gonadotropin dozları arasında anlamlı paralellik gözlemlenmiştir. 3. gün FSH düzeyi arttıkça verilen gonadotropin dozunda artış olduğu izlenmiştir (108). Tablo 4.26'da belirtildiği şekilde bizim çalışmamızda da Ser680Asn polimorfizmi açısından 3.gün FSH ve gonadotropin arasındaki ilişki anlamlı olarak bulunmuştur. Ayrıca Ala307Thr polimorfizmi incelendiğinde yine tüm normal ve polimorfizimli hasta gruplarında 3.gün FSH miktarı ve tedavi gonadotropin dozları arasında anlamlı paralellik izlenmiştir (Tablo 4.23). 3.gün FSH düzeyi arttıkça hastanın tedaviye cevap vermesi zorlaşmakta

ve daha yüksek dozlarda gonadotropin alması gerekmektedir. Çalışmada, poor responder grubundaki hastalarda her üç genotip arasında 3.gün FSH miktarları ve E2 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmazken, good responder grubunda Ser/Asn (G/A) genotipine sahip hastalarda istatistiksel açıdan anlamlı bir yükseklik saptanmıştır. Bizim çalışmamızda poor responder ve good responder hastalarda, gruplar kendi içlerinde genotipler açısından değerlendirildiğinde 3. gün FSH ve E2 düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır (poor responder grubu: 3.gün FSH için $p=0,367$, E2 için $p=0,776$; good responder grubu: 3.gün FSH için $p=0,818$, E2 için $p=0,779$). Loutradis ve ark., poor responder grupta her üç genotipin benzer oranlarda dağıldığını görmüşlerdir. Ancak good responder grubunda Ser/Asn polimorfizminin daha sık görüldüğü saptanmıştır ($p=0,005$) (108). Bizim çalışmamızda good responder grubunda Ala307Thr polimorfizminde homozigot polimorfizm oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az görülmektedir ($p=0,013$). Aynı şekilde good responder grubunda Ser680Asn polimorfizminde de homozigot genotipin (A/A) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az olduğu saptadık ($p=0,013$). Poor responder grubundaki hasta sayılarını da istatistiksel açıdan karşılaştırdık. Poor responder grubumuza Ser680Asn polimorfizmi açısından bakıldığında heterozigot polimorfizmin anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu saptadık ($p=0,031$). Kontrol grubumuzda ise heterozigot polimorfizmin hem Ser680Asn hem de Ala307Thr polimorfizimli grupta yüksek oranlarda saptandığını bulduk (Ser680Asn G/A polimorfizmi anlamlı şekilde ($p=0,001$) daha yüksek, Ala307Thr G/A polimorfizmi anlamlı şekilde ($p=0,001$) daha yüksek).

Loutradis ve ark. yaptıkları çalışmada good responder grubunda G/A genotipinde daha yüksek oranda tedavi sonu E2 düzeyleri saptamışlardır. Bizim çalışmamızda hem Ser680Asn hem de Ala307Thr için good responder olan tüm hastalarda genotipler arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,779$) (Tablo 4.12). Tedavi süreleri bu çalışmada karşılaştırılmış ve herhangi farklılık bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda ise tüm polimorfizimli hastalar dikkate alındığında (A/A+G/A), polimorfizmi olmayan hastalara göre anlamlı şekilde tedavi sürelerinde uzama saptadık (hem Ala307Thr hem de Ser680Asn için $p=0,024$).

Castro ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada Ser680Asn polimorfizminin etkilerini araştırmışlardır (109). Poor responder hastaların seçilme kriteri olarak sadece tedavi sonu follikül sayısının 4'den az olması belirlenmiştir ve bu şekilde 19 hasta seçilmiştir. Good responder olarakta 83 hasta belirlenmiştir. Yaptıkları genetik analizler sonucunda, Ser/Ser (G/G) genotipinin poor responder hastalarda daha sık olduğu gözlemlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada, poor responder grubunda G/G genotipli hasta sayısı (hem Ser/Ser için hem de Ala/Ala için), good responder olan hasta grubuna göre anlamlı şekilde az sayıda çıkmıştır ($p=0,024$). Aynı zamanda biz çalışmamızda tüm polimorfizimli hastaları (A/A+G/A), normal genotipli hastalarla da karşılaştırdık ve good responder hastalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olan G/G genotipli (Ser/Ser ve Ala/Ala) hasta sayısı elde ettik (Tablo 4.19 ve 4.23). Ayrıca Castro ve ark. istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da Ser/Ser genotipili hastaların daha fazla gonatotropin ile indükte olabildiklerini söylemişlerdir. Biz kendi çalışmamızda hem poor responder grubunda hem de good responder grubunda kullanılan gonadotropin açısından genotipler arasında anlamlı fark saptayamadık (poor responder grubu için $p=0,226$, good responder grubu için $p=0,057$). Loutradis'in çalışmasına benzer olarak, Castro ve ark. da poor responder grubunda Ser/Ser genotipini istatistiksel olarak daha fazla bulmuşlardır ($p=0,04$) (109). Bu çalışmada da Ser/Ser polimorfizmine sahip hastalarda indüksiyon için daha fazla gonadotropin miktarına ihtiyaç duyulmuştur. Daha önce de belirtildiği gibi bizim çalışmamızda good responder ve poor responder arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptansa da, grupların kendi içindeki polimorfizmler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.12) ($p=0,057$). Castro ve ark. yaş ile genotip arasında ilişki kurmaya çalışmışlar ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır. Biz de kontrol grubu da dahil olmak üzere, her 3 grubun kendi içlerinde polimorfizm-yaş arasında ilişki aradık ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (kontrol grubu için $p=0,447$, good responder grubu için $p=0,669$, poor responder grubu için $p=0,131$) (Tablo 4.6, 4.12, 4.18). Sonuç olarak Castro ve ark., polimorfizmin yaş ve overyan rezerv ile ilişkili olabileceğini söylemişler ama istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar yakalayamamışlardır (109).

Koning ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmada 38 poor responder hasta ile 50 good responder hastayı Ser680Asn polimorfizmi açısından karşılaştırmışlardır (121). Poor responder hasta seçiminde kriter olarak sadece bazal FSH değerinin 10 mIU/mL'nin üzerinde olmasını kriter olarak seçmişlerdir. Polimorfizme uğrayan hasta sayısının poor responder grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulmuşlardır ($p<0,05$). Biz de her iki grup arasında yaptığımız karşılaştırmada hem Ala307Thr hem de Ser680Asn polimorfizmi açısından anlamlı fark yakaladık (polimorfizme uğrayan hasta sayısı poor responder grubunda daha yüksektir) (Ala307Thr için $p=0,015$, Ser680Asn için $p=0,031$) (Tablo 4.20, 4.24). Yine her iki grup tedavi süreleri açısından karşılaştırılmış ve bizim çalışmamıza benzer olarak poor responder grubunda anlamlı olarak daha uzun süreler bulunmuştur. Biz ayrıca her grup içinde polimorfizmi olanlar ve olmayanlar arasında da süreler açısından karşılaştırma yaptık. Poor responder grubunun tedavi süreleri good responder grubuna göre daha uzun olsa da, hem poor responder grubunda hem de good responder grubunda kendi içlerinde polimorfizmi olanlar ve olmayanlar karşılaştırıldığında sürelerde farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.22, 4.25). Koning ve ark. polimorfizm ve gebelik oranları açısından fark aramışlar ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır ($p=0,8$). Benzer şekilde Van Montfrans ve ark. (122) 2000 yılında ve Van Rooji ve ark. (123) 2004 yılında yaptıkları çalışmalarda gebelik ve FSH polimorfizmi açısından anlamlı farklılıklar yakalayamamışlardır. Sonuç olarak Koning ve ark. bizim çalışmamıza benzer şekilde, poor responder hasta grubunda polimorfizimli hasta sayısının daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Sudo ve ark. 2002 yılında Japonya'da yaptıkları çalışmada, hem Ala307Thr hem de Ser680Asn polimorfizmlerinin sıklığını araştırmışlardır (119). Toplamda 522 hastada genetik analiz yapmışlardır. Spontan ovulasyonu olan 258 hasta (ultrasound veya diğer yöntemlerle ovulasyon olduğu anlaşılmış) seçilmiştir. Geri kalan hastaların çeşitli ovulasyon ile ilgili çeşitli şikayetleri bulunmaktaydı (primer amenore, sekonder amenore, hiperprolaktinemi, polikistik over sendromu, prematür overyan yetmezlik gibi). Normal ovulasyonu olan grup ile ovulatuar sorunu olan hastalar tüm polimorfizler açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmamıştır (119). Sadece polikistik overi olan grupta heterozigot polimorfizm oranı daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Hastalara uygulanan yardımcı üreme tedavileri sonunda elde edilen E2 düzeyleri karşılaştırılmış ve polimorfizimli hastalarda daha düşük bulunmuştur

($p<0,05$). Bizim çalışmamızda poor ve good responder grupları arası yaptığımız karşılaştırmada E2 düzeyleri good responder grubunda daha yüksek bulunmuştur, ancak polimorfizmler açısından yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark yakalanmamıştır ($p>0,05$). Sudo ve ark. aynı zamanda önceden yapılan birkaç çalışmanın sonuçları ile kendi sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Hasbergen ve ark. (2001) avrupa toplumundaki polimorfizm dağılım oranlarını G/G, G/A ve A/A genotipleri açısından sırasıyla %22,3 , %55,5 ve %22,3 şeklinde bulurken (124), Mayorga ve ark. (2000) bu oranları %29 , %45 ve %26 şeklinde belirlemişlerdir (125). Sudo ve ark. ise Japon popülasyonu için buldukları değerler sırasıyla %43,5 , %43,5 ve %12,1'dir. Bizim çalışmamızda Ser680Asn polimorfizmi için bu değerler sırasıyla %20 , %52,5 ve %27,5 şeklindedir (Tablo 4.16). Ala307Thr polimorfizmi için ise değerler sırasıyla %20, %50 ve %30 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.15). Sudo ve ark.'nın çalışmasında 3.gün FSH düzeyleri homozigot polimorfizmi olanlarda, heterozigot polimorfizmi olanlara göre daha yüksek bulmuşlardır. Diğer parametreler arsında anlamlı farklılık bulamamışlardır. Biz, good responder ve poor responder olan grupları 3. gün FSH düzeyleri açısından karşılaştırdığımızda, poor responder grubunda anlamlı bir yükseklik saptadık ($p<0,05$) (Tablo 4.23 ve Tablo 4.25). Ancak gruplar kendi içlerinde polimorfizmler açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.11, 4.12, 4.17 ve 4.18). Çalışmalar arasında farklılar görülmesinin çeşitli nedenlere bağlı olabileceği Sudo ve ark. tarafından belirtilmiştir (119). İn vivo olarak hücrel yüzeylerde FSH reseptörünün farklı oranlarda ekspresyona uğramasının veya FSH sekresyonunu regüle eden inhibin düzeylerinin farklı düzeylerde olmasının nedenler arasında söylenebileceği belirtilmiştir (119). Tedavi sonunda elde edilen E2 düzeylerini karşılaştırdıklarında ise ovulasyon sorunu olanlar ile olmayanlar arasında anlamlı fark bulmuşlardır. Benzer şekilde biz de good responder ve poor responder hastalar arasında tedavi sonu elde edilen E2 düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptadık ($p<0,001$) (Tablo 4.23, 4.25). Ancak Sudo ve ark. A/A polimorfizmine sahip grupta daha az E2 düzeyleri saptamışlardır ($p<0,05$). Bizim çalışmamızda ise hem poor responder grubu için hem de good responder grubu için polimorfizmler kendi grupları içinde kıyaslandığında anlamlı farklılık izlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.17, 4.18).

Modi ve ark.'nın 2009 yılında Hindistan'da yaptıkları çalışmada 50 tane normogonadotropik infertil hasta belirlemişlerdir (126). Aynı zamanda 100 tane fertilité sorunu olmayan hastayı da çalışmaya dahil etmişlerdir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde hem Ala307Thr hem de Ser680Asn polimorfizmlerini araştırmışlardır. Hem poor

responder grubunda hem de good responder grubunda heterizgot polimorfizm oranlarını %50'den fazla olarak saptamışlardır. Benzer şekilde biz de heterozigot polimorfizmi yüksek değerlerde saptadık (poor responder: Ala307Thr G/A→%50, Ser680Asn G/A→%52,5, good responder: Ala307Thr G/A→%42,9, Ser680Asn G/A→%42,9). Çalışmalarında Ser680Asn polimorfizmi açısından tüm parameterler (bazal FSH, tedavide kullanılan gonadotropin dozu, tedavi sonu E2 düzeyleri) karşılaştırılmış ancak polimorfizler arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde poor responder ve good responder grupları kendi içlerinde polimorfizleri açısından karşılaştırıldığında biz de istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulamadık ($p>0,05$). Ala307Thr polimorfizmi dikkate alındığında ise homozigot polimorfizmi olan hastaların tedavide daha az gonadotropine ihtiyaç duydukları, daha fazla E2 ürettikleri belirlenmiştir. Heterozigot polimorfizmi olanlar ile polimorfizmi olmayan gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptayamamışlardır ($p>0,05$) (126). Bizim çalışmamızda, hem homozigot polimorfizlerde hem de diğer gruplarda anlamlı farklılık saptanmamıştır (homozigot polimorfizmi olan hastalarda kullanılan gonadotropin dozları ve tedavi sonunda elde edilen E2 düzeyleri, diğer genotiplerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı değildir).

Simoni ve ark. 2002 yılında yaptıkları çalışmada ovulasyonu olan 161 infertil hastada Ser680Asn polimorfizmini araştırmışlardır (127). Normal genotipli ve polimorfizimli hastalar arasında fark aranmıştır ancak sadece kullanılan gonadotropin dozu ve 3.gün FSH düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulunmuştur. Homozigot polimorfizm olan hastalarda değerler yüksek bulunmuştur. Elde edilen follikül sayılarında ve E2 düzeylerinde herhangi bir fark bulunmamıştır (127).

Laven ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada normogonadotropik anovulatuvar kadınlarla, normo-ovulatuvar kadınlardaki FSH reseptör polimorfizmlerini araştırmışlardır (128). 30 hasta normo-ovulatuvar olarak seçilmiş ve kontrol grubu olarak belirlenmiştir. 148 hasta ise normogonadotropik anovulatuvar kadınlardan seçilmiştir. Çalışmalarında Ala307Thr polimorfizmi açısından heterozigot kadınların anovulatuvar gupta daha sık olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda poor responder grubunda homozigot polimorfizmin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğunu saptadık ($p<0,05$). Ser680Asn polimorfizmi açısından ise homozigot polimorfizmin anovulatuvar kadınlarda daha sık olduğunu saptamışlardır. Kontrol grubunda Ala307Thr homozigot polimorfizmin daha sık olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bizim çalışmamızda ise kontrol grubunda heterozigot polimorfizmin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da

diğer genotiplere oranla daha sık görüldüğünü belirledik (Tablo 4.3 ve 4.4). Good responder grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde homozigot polimorfizmin daha az görüldüğünü saptadık (Tablo 4.9). Ser680Asn homozigot polimorfizminde bazal FSH değerlerinin ve tedavide kullanılan gonadotropin dozlarının diğer genotiplere oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak tedaviye verilen cevapta (E2 düzeyleri ve tedavi sonu oluşan follikül sayısı) genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmamıştır. Uyumsuz sonuçların kullandıkları ovulasyon indüksiyonundaki değişik protokollere bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir. Bizim çalışmamızda poor responder grubundaki hastaların hepsine antagon protokolü uygulanırken, good responder grubundaki hastaların 29'una antagon, 13'üne de long protokolü uygulanmıştır.

6. SONUÇLAR

Çalışmamıza 100 tane kontrol grubu hasta, 42 tane good responder grubu hasta ve 40 tane poor responder grubu hasta dahil ettik. Hastaların venöz kan örneklerinden genetik analizler yaparak Ala307Thr ve Ser680Asn polimorfizmlerini araştırdık. Polimorfizmleri heterozigot ve homozigot olarak iki farklı şekilde belirledik. Heterozigot olanlar G/A şeklinde, homozigot olanlar A/A şeklinde belirtildi. Herhangi bir polimorfizme uğramayan hastalar ise G/G şeklinde belirtildi. Her grup (kontrol grubu, poor responder grubu ve good responder grubu) polimorfizmler açısından öncelikle kendi içinde karşılaştırıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar hem polimorfizm tipleri için yapıldı, hem de oluşan demografik özellikler açısından yapıldı.

Kontrol grubunda görülen hem Ala307Thr polimorfizmi hem de Ser680Asn polimorfizmi kendi içlerinde değerlendirildiğinde heterozigot polimorfizmin daha sık görüldüğü belirlendi. Kontrol grubunda Ala307Thr polimorfizmi için G/A genotip sıklığı %51 iken, Ser680Asn polimorfizmi için bu oran %53 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3, Tablo 4.4). Kontrol grubumuzda heterozigot polimorfizmin hem Ser680Asn hem de Ala307Thr polimorfizimli grupta yüksek oranlarda saptandığını bulduk [Ser680Asn G/A polimorfizmi anlamlı şekilde ($p=0,001$) daha yüksek, Ala307Thr G/A polimorfizmi anlamlı şekilde ($p=0,001$) daha yüksek].

Çalışmamızda good responder grubunda Ala307Thr polimorfizminde homozigot polimorfizm oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az görüldüğünü saptadık ($p=0,013$). Aynı şekilde good responder grubunda Ser680Asn polimorfizminde de homozigot genotipin (A/A) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az olduğu saptadık ($p=0,013$). Poor responder grubundaki hasta sayılarını da istatistiksel açıdan karşılaştırdık. Poor responder grubumuza Ser680Asn polimorfizmi açısından bakıldığında heterozigot polimorfizmin anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu saptadık ($p=0,031$).

Kontrol grubu, good responder ve poor responder grupları arasında polimorfizmler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu farklılığın good responder-poor responder arasındaki ve good responder-kontrol grubu arasındaki farklılık yüzünden ortaya çıktığını düşündük. Çünkü yapılan istatistiksel incelemede, poor responder ile kontrol grubu arasında polimorfizmler açısından farklılık saptanmamıştır. Good responder grubunda hem Ser680Asn hem de Ala307Thr

polimorfizmleri açısından homozigot polimorfizmin belirgin az görüldüğünü saptadık ($p<0,05$). Poor responder grubunda görülen homozigot polimorfizm oranının yüksek oluşu ile stimülasyona verilen overyan cevabın az görülmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptadık.

Kontrol grubu, good responder ve poor responder gruplarında polimorfizmler ile yaş arasında ilişki aradık. Her polimorfizm tipi ile gruplar arasında karşılaştırılma yapıldığında anlamlı bir fark saptanmadı. Sadece G/A polimorfizmine sahip hastaların yaşlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha ileri olduğunu gördük ($p=0,003$). Yaşın ilerlemesiye G/A tipinde polimorfizm oluşum sıklığı artmaktadır.

Good responder ve poor responder grubu hastalarında kendi içlerinde ve gruplar arasında polimorfizm-demografik özellikler karşılaştırılması yapıldı. Good responder grubunda Ala307Thr polimorfizmi ile demografik özellikler karşılaştırıldığında, sadece tedavi süresinin polimorfizm (A/A+G/A) olan hastalarda daha uzun olduğuna dair istatistiksel anlamlı sonuç bulduk ($p=0,024$). Diğer özellikler açısından (yaş, 3.gün FSH, tedavide kullanılan gonadotropin dozu, tedavi süresi, tedavi sonu E2) good responder grubunda polimorfizmler arasında farklılık saptanmadı. Ser680Asn polimorfizmi için de sonuçların benzer olduğu saptadık. Polimorfizme sahip hastaların tedaviye yanıt verme süreleri artmaktadır.

Poor responder grubunda hem Ser680Asn hem de ala307Thr polimorfizmleri demografik özellikler karşılaştırıldığında, hiçbir parametre ile polimorfizm arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Good responder grubunda görülen polimorfizmi olan hastalarda tedavi süresinin uzun olması, poor responder grubu için istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde daha uzun bulunmamıştır.

Poor responder ile good responder grupları birbirleri arasında da kıyaslandığında görülmüştür ki poor responder grubunda A/A polimorfizmi daha sık görülmektedir ($p<0,05$). Bu sonuç hem Ser680Asn için hem de Ala307Thr için geçerlidir.

Poor responder ve good responder grupları arasında infertilite süresi haricinde diğer tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. İnfertilite süreleri her iki grup için de benzer sürelerdedir. Poor responder grubunda 3.gün FSH miktarı daha fazla, tedavi gonadotropin dozu daha fazla, tedavi süresi daha uzun, tedavi sonu follikül sayısı daha az ve tedavi sonu E2 miktarı daha az bulunmuştur. Tüm bu değerler iki grup arasında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunsa da polimorfizm tipleri ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Örnek olarak tedavi

sonunda elde edilen E2 düzeyleri ele alınırsa, poor responder ve good responder arasında belirgin farklılık olsa da, poor responder grubunda polimorfizmler arasında istatistiksel açıdan fark yoktur. Her grup içinde A/A, G/A ve G/G genotiplerinde elde edilen E2 miktarları benzerdir. Bu durum diğer parametreler içinde geçerlidir.

Sonuç olarak, poor responder grubunda hem Ser680Asn hem de Ala307Thr polimorfizmi açısından homozigot genotip sıklığı istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuş olsa da kontrol grubundaki homozigot genotip sıklığının da yüksek olması, homozigot polimorfizmin FSH reseptör cevap yetersizliği oluşturduğuna dair genelleme yapmamızı engellemektedir. Bu konuda daha kesin sonuçlara ulaşılabilmesi için daha fazla hasta sayısı içeren randomize kontrollü prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

FSHR'yi (follikül stimulan hormon reseptörü) kodlayan genler kromozom 2'de bulunmaktadır. Burada oluşan noktasal değişiklikler, FSH reseptör geninin dizilimindeki aminoasit sıralamasında değişiklik oluşturacak ve dolayısıyla genin işlevinde de değişiklik oluşturacaktır. Bu oluşan değişikliklerden bazıları reseptörün fonksiyonlarının artmasına neden olurken bazıları ise azalmasına neden olabilmektedir.

Aktive edici mutasyonlar, FSH'nin az seviyelerinde, hatta yokluğunda bile FSHR aktivasyonuna yol açabilirler. Bu aktive edici mutasyonlar bazen, FSHR'nin başka tropik hormonlara da cevap vermesine yol açabilir (TSH gibi). İnaktive edici mutasyonlar reseptör ligand etkileşimini bozarak etki gösterebildiği gibi, FSH'ye bağlı oluşan sinyal iletimini de bozarak etki gösterebilir. Bu oluşan etki derecesi değişkendir. Total blok ta oluşabilir, minimal etki azalması da oluşabilir.

FSHR inaktive edici mutasyonları primer veya sekonder amenore, infertilite ve prematür overyan sendroma (POF) yol açabilmektedir. Tam tersi olarak ta aktive edici mutasyonlar, eksojen FSH hormonu verilsin veya verilmesin overyan hiperstimülasyon sendromuna (OHSS) yol açabilmektedirler.

Nokta mutasyonlarının yanında, FSHR gen polimorfizmleri (özellikle codon 307 ve 680) olduğu zaman eksojen verilen FSH hormonuna yanıtta değişiklikler gözlenebilmektedir. Bu durum da yardımcı üreme teknikleri uygulanırken tedavi yanıtının değişiklikler göstermesine neden olabilmektedir.

Biz çalışmamızda FSH reseptöründe oluşabilen polimorfizm tiplerinin fertiliteye ve yardımcı üreme tekniklerindeki cevaba olan etkisini inceledik. Çalışmamız, Mayıs 2009 ve Kasım 2010 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran hastalarda yapıldı.

Kontrol grubuna, daha önce herhangi bir KOH protokolü uygulanmadan gebe kalmış hastalar seçildi. Çalışmaya katılan kontrol grubu hastalarının hepsinde korunmasız ilişkiye başlanmasından en fazla bir yıl sonra gebelik oluşmuştur. Good responder olarak belirlenen kategoriye alınan hastalarda bir infertilite tedavisi almış olmak ve bu tedaviye yanıt olarak elde edilen oosit sayısının 3'ün üzerinde olma kriteri arandı. Ayrıca verilen infertilite tedavisi sonucunda yeterli E2 seviyesi olmayan ($E2 \leq 660$ pg/mL) hastalar bu gruba dahil edilmedi. Poor responder olarak belirlediğimiz gruba ise dahil olma kriterleri olarak KOH sonrasında elde edilen oosit sayısının 3 ve

daha az olması ve tedavi sonunda ulaşılan E2 seviyesinin 660 pg/mL'den az olması şeklinde belirlendi. Tüm gruplarda yaş aralığı 23 ile 39 arasında tutuldu.

Olguların genomik DNA'ları, periferel kandan modifiye non-enzimatik metod ile izole edildi. PCR reaksiyonu, Bio-Rad (MyCycler) ve PCR System 9700 (Gene Amp®) marka PCR cihazlarında gerçekleştirildi. Denatüre edilen PCR ürünleri ABI 3130 dizileme cihazına yüklenerek sonuçlar ABI sequence analysis v3.1 yazılım programında değerlendirildi.

Veriler SPSS (version 18.0)(SPSS Inc., Chicago, USA) kullanılarak analiz edildi. Örneklemi tanımlamak için frekans dağılımı, ortalama, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. Farklılık bulunduğunda farklı grupların belirlenmesinde Bonferroni düzeltmesi yapılarak Mann-Whitney testi kullanıldı. Demografik özelliklerine ilişkin değerlerin karşılaştırılmasında iki ortalama arası fark testi ya da Mann-Whitney U testi kullanıldı. Gruplara göre genotiplerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Analizlerde farklılıkların belirlenmesi için % 95 anlamlılık düzeyi (ya da $\alpha=0.05$ hata payı) kullanıldı.

Kontrol grubunda görülen hem Ala307Thr polimorfizmi hem de Ser680Asn polimorfizmi kendi içlerinde değerlendirildiğinde heterozigot polimorfizmin daha sık görüldüğü belirlendi. Kontrol grubunda Ala307Thr polimorfizmi için G/A genotip sıklığı %51 iken, Ser680Asn polimorfizmi için bu oran %53 olarak belirlenmiştir [Ser680Asn G/A polimorfizmi anlamlı şekilde ($p=0,001$) daha yüksek, Ala307Thr G/A polimorfizmi anlamlı şekilde ($p=0,001$) daha yüksek].

Çalışmamızda good responder grubunda Ala307Thr polimorfizminde homozigot polimorfizm oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az görüldüğünü saptadık ($p=0,013$). Aynı şekilde good responder grubunda Ser680Asn polimorfizminde de homozigot genotipin (A/A) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az olduğu saptadık ($p=0,013$). Poor responder grubundaki hasta sayılarını da istatistiksel açıdan karşılaştırdık. Poor responder grubumuza Ser680Asn polimorfizmi açısından bakıldığında heterozigot polimorfizmin anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu saptadık ($p=0,031$).

Kontrol grubu, good responder ve poor responder grupları arasında polimorfizmler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Good responder grubunda hem Ser680Asn hem de Ala307Thr polimorfizmleri açısından homozigot polimorfizmin belirgin az görüldüğünü saptadık ($p<0,05$). Poor responder grubunda görülen homozigot polimorfizm oranının yüksek oluşu ile

stimülasyona verilen overyan cevabın az görülmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptadık.

Sadece G/A polimorfizmine sahip hastaların yaşlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha ileri olduğunu gördük ($p=0,003$). Yaşın ilerlemesiye G/A tipinde polimorfizm oluşum sıklığı artmaktadır.

Good responder grubunda Ala307Thr genotipinde tedavi süresinin polimorfizm (A/A+G/A) olan hastalarda daha uzun olduğuna dair istatistiksel anlamlı sonuç bulduk ($p=0,024$). Good responder grubunda görülen polimorfizmi olan hastalarda tedavi süresinin uzun olması, poor responder grubu için istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde daha uzun bulunmamıştır.

Poor responder ile good responder grupları birbirleri arasında da kıyaslandığında görülmüştür ki poor responder grubunda A/A polimorfizmi daha sık görülmektedir ($p<0,05$).

Sonuç olarak, poor responder grubunda hem Ser680Asn hem de Ala307Thr polimorfizmi açısından homozigot genotip sıklığı istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuş olsa da kontrol grubundaki homozigot genotip sıklığının da yüksek olması, homozigot polimorfizmin FSH reseptör cevap yetersizliği oluşturduğuna dair genelleme yapmamızı engellemektedir.

Anahtar Kelimeler: FSH reseptör polimorfizmi, poor responder, good responder, KOH

8. ABSTRACT

COMPARISON OF FSH RESEPTOR POLYMORPHISMIS BETWEEN INFERTILE WOMEN (POOR RESPONDERS AND GOOD RESPONDERS AFTER CONTROLLED OVARIAN HYPERSTIMULATION) AND FERTILE WOMEN

Genes coding FSHR, are on chromosome 2. Any changes occuring at these points will cause changes in amino acid arrangement in FSH receptor genes and this, as a result, will change the function of the gene. While some of these changes will result in an increase in receptor functions, some others result in a decrease in the same functions.

Activating mutations may result in FSHR activation at low levels of FSH, or even in the absence of it. Sometimes these activating mutations may result in FSHR responding to other thropic hormones (e.g. TSH). Inactivating mutations may show effect by spoiling receptor ligand interaction; at the same time, these may also be effective by spoiling the signal transmission formed by FSH. The level of this resulting effect is changeable. A total bloc or a minimum effect may form.

FSHR inactivating mutations may cause primer or seconder amenorrhea, infertility and premature overian syndrome (POF). On the contrary, activating mutations may cause overian hyperstimulation syndrome (OHSS), whether exogen FSH hormone is given or not.

Besides point mutations, when FSHR gene polymorphisms are formed (especially codon 307 and 680), changes in response to exogen FSH hormone are observed. These results in changes in treatment response when artificial reproduction techniques are applied.

In our study, we investigated the effect of the response in artificial reproduction techniques and fertility of polymorphism types formed in FSH receptor. The study involved patients at the department of Gynecology and Obstetrics in Akdeniz University between May 2009 – November 2010.

Control group involved patients who became pregnant without any controlled ovarian stimulation treatment (COS) before. In all of the control group patients pregnancy occured at most one year later after intercourse. In patients taken into the category as good responder a criterium of having taken an infertility treatment and an

oocyte count above 3 obtained as a response to this treatment was sought. Besides, patients without sufficient E2 level ($E2 \leq 660$ pg/ml) as a result of infertility treatment were not included in this group. Criterium for being included in the group defined as poor responder was determined as oocyte count 3 or less at the end of controlled ovarian stimulation treatment and E2 levels less than 660 pg/ml after treatment. In all groups age interval was 23-39.

Genomic DNA's of the patients was isolated from venous blood by modified non-enzymatic method. PCR reaction was carried out using Bio-Rad (MyCycler) and PCR Systems 9700 (Gene Amp) PCR instruments. Denaturated PCR products were loaded to ABI 3130 serial instrument and the results were evaluated using ABI sequence analysis V3.1 software package.

Data were analyzed using SPSS (version 18.0) (spss Inc., Chicago, USA). To evaluate the model definitional statistics such as frequency distribution, mean, standard variation were used. When disfferences were found, Bon ferronni correction was applied and Mann-Whithney test was used to determine different groups. Related to demographic features, in comparing the values, difference test between two means or Mann-Whitney U test was used. In comparing genotypes according to groups Ki-square test was used. To determine the differences in analysis 95% significance level (or $\alpha=0.05$ error level) was used.

When Ala307Thr polymorphism and also the Ser680Asn polymorphism seen in control groups were evaluated in itself, it was determined that heterozygot polymorphism was more frequent. Frequency of occurence for G/A genotype in Ala307Thr polymorphism in the control group was 51%, whereas this value was 53% for Ser680Asn polymorphism [Ser680Asn G/A polymorphism significantly ($p=0.001$) higher, Ala307Thr G/A polymorphism significantly ($p=0.001$) higher].

In our study, we determined that in good responder group, homozygot polymorphism ratio in Ala307Thr polymorphism was statistically less frequently seen in a significant way ($p=0.013$). It was also determined that in good responder group homozygot genotype (A/A) in Ser680Asn polymorphism was statistically less frequently seen in a significant way ($p=0.013$). Patient numbers in poor responder group was also statistically compared. In poor responder group heterozygot polymorphism in Ser680Asn polymorphism was significantly higher ($p=0.031$).

When polymorphisms between control groups, good responder and poor responder groups were compared statistically significant differences were found. In

good responder group in both Ser680Asn and Ala307Thr polymorphisms, homozygote polymorphism were seen less frequently ($p<0.05$). Statistically significant difference were found between high homozygote polymorphism ratio seen in poor responder group and the low occurrence of ovarian response given to stimulation.

Ages of patients having only G/A polymorphism was seen to be statistically significant higher ($p=0.003$). At the older ages occurrence of G/A type polymorphism increases.

In good responder group in Ala307Thr genotype duration of treatment was statistically significant found to be longer in patients with (A/A+G/A) polymorphism ($p=0.024$). Longer treatment duration seen in patients with polymorphism in good responder group, statistically was not found to be longer in poor responder group in a significant way.

When poor responder and good responder groups were compared, it was seen that A/A polymorphism was higher in poor responder group ($p<0.05$).

As a result, in poor responder group related to both Ser680Asn and Ala307Thr polymorphism, occurrence of homozygote genotype was statistically significant high. However, the high value of occurrence of homozygote genotype in control group prevents making a generalization about formation of FSH receptor response in sufficiency of homozygote polymorphism.

Key words: FSH receptor polymorphism, poor responder, good responder, COS

9. KAYNAKLAR

1. Lobo RA. Reproductive endocrinology. In: Katz VL, Lobo RA, Lentz GM, Gershenson DM, editors. Comprehensive gynecology. 5th edition. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007: 73-121.
2. Üreme fizyolojisi. In: Speroff L, Fritz MA, editörler. Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite. 7. baskı. Kuzey Carolina: Lippincott Williams& Wilkins; 2005: 3-319.
3. Oktay K, Briggs DA, Gosden RG. Ontogeny of follicle stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 3748.
4. Christin S, Taylor AE, Khoury RH, Hall JE, Martin KA, Smith PC ve ark. Homologous in vitro bioassay for follicle stimulating hormone reveals increased FSH biological signal during the mid to late luteal phase of the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 2080.
5. Chabab A, Hedon B, Arnal F, Diafouka F, Bressot N, Flandre O ve ark. Follicular steroids in relation to oocyte development and human ovarian stimulation protocols. Hum Reprod 1986; 1: 449.
6. Greisen S, Ledet T, Ovesen P. Effects of androstenedione, insulin and LH on steroidogenesis in human granulosa cells. Hum Reprod 2001; 16: 2061.
7. Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S ve ark. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. Hum Reprod 1997; 12: 127.
8. McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ. The microenvironment of the human antral follicle; inter-relationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. J Clin Endocrinol Metab 1979; 49: 851.
9. Andersen CY. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. J Clin Endocrinol Metab 1993; 77: 1227.
10. Erickson GF. Physiologic basis of ovulation induction, Seminars Reprod Endocrinol 1996; 14: 287.
11. Voutilainen R, Franks S, Mason HD, Martikainen H. Expression of insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein, and IGF receptor messenger ribonucleic acids in normal and polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 1003.
12. Hillier SG, Reichert LE, Van Hall EV. Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. J Clin Endocrinol Metab 1981; 52: 847.

13. Birken S, Maydelman Y, Gawinowicz MA, Pound A, Liu Y, Hartree AS. Isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1996; 137: 1402.
14. Patton PE, Hess DL, Cook DM, Loriaux DL, Braunstein GD. Human chorionic gonadotropin production by the pituitary gland in a premenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 1138.
15. Tse A, Hille B. GnRH-induced Ca^{2+} oscillations and rhythmic hyperpolarizations of pituitary gonadotropes. *Science* 1992; 255: 462.
16. Kaiser UB, Conn PM, Chin WW. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr Rev* 1997; 18: 46.
17. Kovalevskaya G, Genbacev O, Fisher SJ. Trophoblast origin of hCG isoforms: cytotrophoblasts are the primary source of choriocarcinoma-like hCG. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 194: 147-55.
18. Tamarkin L, Baird CJ, Almeida OFX. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 1985; 22: 714.
19. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrin Rev* 1991; 12: 151.
20. Plant TM, Zorub DS. Pinealectomy in gonadal infantile male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) does not interrupt initiation of the prepubertal hiatus in gonadotropin secretion. *Endocrinology* 1986; 118: 227.
21. Zeitzer JM, Daniels JE, Duffy JF, Klerman EB, Shanahan TL, Dijk DJ ve ark. Do plasma melatonin concentrations decline with age? *Am J Med* 1999; 107: 432.
22. Sack RL, Lewy AJ, Blood ML, Keith LD, Nakagawa H. Circadian rhythm abnormalities in totally blind people: incidence and clinical significance. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 127.
23. Cole LA, Shahabi S, Oz UA. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin (invasive trophoblast antigen) immunoassay: a new basis for gestational Down syndrome screening. *Clin Chem* 1999; 45: 2109-19.
24. Pandian R, Cole LA, Palomaki GE. Second-trimester maternal serum invasive trophoblast antigen: a marker for Down syndrome screening. *Clin Chem* 2004; 50: 1433-5.
25. Bahado-Singh RO, Oz U, Shahabi S. Comparison of urinary hyperglycosylated human chorionic gonadotropin concentration with the serum triple screen for Down syndrome detection in high-risk pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1114-8.
26. Sturgeon CM, Ellis AR. Standardization of FSH, LH and hCG: current position and future prospects. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260: 301-9.

27. Birken S, Kovalevskaya G, O'Connor J. Immunochemical measurement of early pregnancy isoforms of hCG: potential applications to fertility research, prenatal diagnosis, and cancer. *Arch Med Res* 2001; 32: 635-43.
28. Kovalevskaya G, Kakuma T, Schlatterer J. Hyperglycosylated HCG expression in pregnancy: cellular origin and clinical applications. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260: 237-43.
29. Mitchell H, Seckl MJ. Discrepancies between commercially available immunoassays in the detection of tumour-derived hCG. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260: 310-3.
30. Bristow A, Berger P, Bidart JM. Establishment, value assignment, and characterization of new WHO reference reagents for six molecular forms of human chorionic gonadotropin. *Clin Chem* 2005; 51: 177-82.
31. Fares FA, Suganuma N, Nishimori K. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the c-terminal sequence of the chorionic-gonadotropin beta-subunit to the follitropin beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4304-8.
32. Lapolt PS, Nishimori K, Fares FA. Enhanced stimulation of follicle maturation and ovulatory potential by long-acting follicle-stimulating-hormone agonists with extended carboxyl-terminal peptides. *Endocrinology* 1992; 131: 2514-20.
33. Bouloux PMG, Handelsman DJ, Jockenhovel F. First human exposure to FSH-CTP in hypogonadotrophic hypogonadal males. *Hum Reprod* 2001; 16: 1592-7.
34. Duijkers IJM, Klipping C, Boerrigter PJ. Single dose pharmacokinetics and effects on follicular growth and serum hormones of a long-acting recombinant FSH preparation (FSH-CTP) in healthy pituitary-suppressed females. *Hum Reprod* 2002; 17: 1987-93.
35. Adams TE, Boime I. The expanding role of recombinant gonadotropins in assisted reproduction. *Reprod Dom Animals* 2008; 186: 192.
36. Perlman S, van den Hazel B, Christiansen J. Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in vivo activity of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3227-35.
37. Janssens JP, Russo J, Irma RD. Human chorionic gonadotropin (hCG) and prevention of breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 269: 93-8.
38. Lunardi Y, Bryant JL, Zeman RA. Human chorionic gonadotropin (hCG) induces apoptosis of neoplastic Kaposi's sarcoma cell lines (ks y-1 and ks slk). *Blood* 1995; 86: 1514.
39. Samaniego F, Bryant JL, Liu N. Induction of programmed cell death in Kaposi's sarcoma cells by preparations of human chorionic gonadotropin. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 135-43.

40. Pfeffer U, Bisacchi D, Morini M. Human chorionic gonadotropin inhibits Kaposi's sarcoma associated angiogenesis, matrix metalloprotease activity, and tumor growth. *Endocrinology* 2002; 143: 3114-21.
41. Casadesus G, Webber KM, Atwood CS. Luteinizing hormone modulates cognition and amyloid-deposition in Alzheimer APP transgenic mice. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 447-52.
42. Casadesus G, Milliken EL, Webber KM. Increases in luteinizing hormone are associated with declines in cognitive performance. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 269: 107-11.
43. Webber KM, Casadesus G, Atwood CS. Gonadotropins: a cohesive gender-based etiology of Alzheimer disease. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260: 271-5.
44. Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1049-54.
45. Jia XC, Oikawa M, Bo M. Expression of human luteinizing hormone (LH) receptor: interaction with LH and chorionic gonadotropin from human but not equine, rat, and ovine species. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 759-68.
46. Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 1125-30.
47. Kelton C, Cheng SVY, Nugent NP. The cloning of the human follicle stimulating hormone receptor and its expression in cos-7, cho, and y-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 89: 141-51.
48. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 2000; 21: 90-113.
49. Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4903-8.
50. Ballesteros JA, Shi L, Javitch JA. Structural mimicry in G protein coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 1-19.
51. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor: a 2002 perspective. *Endocr Rev* 2002; 23: 141-74.
52. Sanders J, Chirgadze DY, Sanders P. Crystal structure of the TSH receptor in complex with a thyroid-stimulating autoantibody. *Thyroid* 2007; 17: 395-410.
53. Costagliola S, Panneels V, Bonomi M. Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *EMBO J* 2002; 21: 504-13.
54. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* 2000; 289: 739-45.

55. Kleinau G, Brehm M, Wiedemann U. Implications for molecular mechanisms of glycoprotein hormone receptors using a new sequence-structure-function analysis resource. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 574-80.
56. Van Durme J, Horn F, Costagliola S. Gris: Glycoprotein hormone receptor information system. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2247-55.
57. Jaschke H, Neumann S, Moore S. A low molecular weight agonist signals by binding to the transmembrane domain of thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR). *J Biol Chem* 2006; 281: 9841-4.
58. Heitman L, Oosterom J, Bonger K. [3H]Org 43553, the first low molecular weight agonistic and allosteric radioligand for the human luteinizing hormone receptor. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 518-24.
59. Dufau ML, Tsai Morris CH. *The Leydig Cell in Health and Disease*. Humana Press 2007; 227-52.
60. Herman BP, Heckert LL. Transcriptional regulation of the FSH receptor: new perspectives. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-62: 100-8.
61. Linder CC, Heckert LL, Goetz TL. Follicle-stimulating hormone receptor gene promoter activity. *Endocrine* 1994; 2: 957-66.
62. Griswold MD, Kim JS. Site-specific methylation of the promoter alters deoxyribonucleic acid-protein interactions and prevents follicle-stimulating hormone receptor gene transcription. *Biol Reprod* 2001; 64: 602-10.
63. Heckert LL, Griswold MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 129-48.
64. Xing W, Ram Sairam M. Characterization of regulatory elements of ovine follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene: the role of e-box in the regulation of ovine FSH receptor expression. *Biol Reprod* 2001; 64: 579-89.
65. Heckert LL. Activation of the rat follicle-stimulating hormone receptor promoter by steroidogenic factor 1 is blocked by protein kinase a and requires upstream stimulatory factor binding to a proximal e box element. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 704-15.
66. Heckert LL, Daggett MAF, Chen J. Multiple promoter elements contribute to activity of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene in testicular Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1499-512.
67. Heckert LL, Daley IJ, Griswold MD. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 70-80.
68. Heckert LL, Griswold MD. Expression of follicle-stimulating hormone receptor mrna in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 670-7.

69. Khan H, Yarney TA, Sairam MR. Cloning of alternately spliced mrna transcripts coding for variants of ovine testicular follitropin receptor lacking the G protein coupling domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190: 888-94.
70. Sairam MR, Babu PS. The tale of follitropin receptor diversity: a recipe for fine tuning gonadotropin responses?. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-62:c 163-71.
71. Costagliola S, Urizar E, Mendive F. Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors. *Reproduction* 2005; 130: 275-81.
72. 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: 949-58.
73. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 2000; 21: 551-83.
74. Piersma D, Verhoef-Post M, Berns EMJJ. LH receptor gene mutations and polymorphisms: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-2: 282-6.
75. Gromoll J, Eiholzer U, Nieschlag E. Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: differential action of human chorionic gonadotropin and LH. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2281-6.
76. Muller T, Gromoll J, Simoni M. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2242-9.
77. Liu G, Duranteau L, Carel JC. Leydig-cell tumors caused by an activating mutation of the gene encoding the luteinizing hormone receptor. *N Engl J Med* 1999; 341: 1731-6.
78. Richter-Unruh A, Wessels HT, Menken U. Male LH-independent sexual precocity in a 3.5-year-old boy caused by a somatic activating mutation of the LH receptor in a Leydig cell tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1052-6.
79. Canto P, Soderlund D, Ramon G. Mutational analysis of the luteinizing hormone receptor gene in two individuals with Leydig cell tumors. *Am J Med Genet* 2002; 108: 148-52.
80. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A. A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1151-5.
81. Smits G, Latunbosun O, Delbaere A. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle stimulating hormone receptor. *N Engl J Med* 2003; 349: 760-6.

82. Montanelli L, Delbaere A, Di Carlo C. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1255-8.
83. Montanelli L, Van Durme JJ, Smits G. Modulation of ligand selectivity associated with activation of the transmembrane region of the human follitropin receptor. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2061-73.
84. Rodien P, Bremont C, Sanson ML. Familial gestational hyperthyroidism caused by a mutant thyrotropin receptor hypersensitive to human chorionic gonadotropin. *N Engl J Med* 1998; 339: 1823-6.
85. Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; 82: 959-68.
86. Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet* 1997; 15: 205-6.
87. Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13612-7.
88. Perez-Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3365-9.
89. Sundarajan C, Liao W, Roy AC, Ng SC. Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 797-802.
90. Scott RT, Hofmann GF. Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril* 1995; 63: 12-4.
91. Loutradis D, Elsheikh A, Kallianidis K, Drakakis P, Stefanidis K, Milingos S et al. Results of controlled ovarian stimulation for ART in poor responders according to the short protocol using different gonadotrophins combinations. *Arch Gynecol Obstet* 2003.
92. McLachlan RI, Robertson DM, Healy DL, de Kretser DM, Burger HG. Plasma inhibin levels during gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation for IVF: A new index of follicular function? *Lancet* 1986; 31: 1233-4.
93. Scott RT, Navot D. Enhancement of ovarian responsiveness with microdoses of gonadotropin-releasing hormone agonist during ovulation induction for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1994; 61: 880-5.

94. Loutradis D, Patsoula E, Minas V, Koussidis G, Antsaklis A, Michalas S ve ark. FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. *Jou Assist Repro Gene* 2006; 23: 177-84.
95. Castro F, Ruiz R, Montoro L, Perez D, Sanchez E, Real L, Ruiz A. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphisms in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 2003; 80: 571-6.
96. Surrey E, William B. Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 2000; 73: 667-76.
97. Raga F, Bonilla-Musoles F, Casan EM, Bonilla F. Recombinant follicle stimulating hormone stimulation in poor responders with normal basal concentrations of follicle stimulating hormone and oestradiol: improved reproductive outcome. *Hum Reprod* 1999; 14: 1431-4.
98. Busacca M, Fusi F, Brigante C, Bonzi V, Gonfiantini C, Vignali M. Use of growth hormone-releasing factor in ovulation induction in poor responders. *J Reprod Med* 1996; 41: 699-703.
99. Feldberg D, Farhi J, Ashkenazi J, Dicker D, Shalev J, Ben Rafael Z. Minidose gonadotropin releasing hormone agonist is the treatment of choice in poor responders with high follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril* 1994; 62: 343-6.
100. Fridstrom M, Akerlof E, Sjoblom P, Hillensjo T. Serum levels of luteinizing and follicle-stimulating hormones in normal and poor-responding patients undergoing ovarian stimulation with urofollitropin after pituitary down regulation. *Gynecol Endocrinol* 1997; 11: 25-8.
101. Serafini P, Stone B, Kerin J, Batzofin J, Quinn P, Marrs R. An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in "poor responders": pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog. *Fertil Steril* 1988; 49: 90-5.
102. Surrey E, Bower J, Hill D, Ramsey J, Surrey M. Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998; 69: 419-24.
103. Lindheim S, Barad D, Witt B, Ditkoff E, Sauer M. Short-term gonadotropin suppression with oral contraceptives benefits poor responders prior to controlled ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet* 1996; 16: 745-7.
104. Land J, Yarmolinskaya M, Dumoulin J, Evers J. High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1996; 65: 961-5.

105. Lashen H, Ledger W, Lopez-Bernal A, Barlow D. Poor responders to ovulation induction: is proceeding to in-vitro fertilization worthwhile? *Hum Reprod* 1999; 14: 964–9.
106. Schoolcraft W, Schlenker T, Gee M, Stevens J, Wagley L. Improved controlled ovarian hyperstimulation in poor responder in vitro fertilization patients with a microdose follicle-stimulating hormone flare growth hormone protocol. *Fertil Steril* 1997; 67: 93–7.
107. Karande V, Morris R, Rinehart J, Miller C, Rao R, Gleicher N. Limited success using the “flare” protocol in poor responders in cycles with low basal follicle-stimulating hormone levels during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997; 67: 900–3.
108. Faber B, Mayer J, Cox B, Jones D, Toner J, Oehninger S. Cessation of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy combined with high-dose gonadotropin stimulation yields favorable pregnancy results in low responders. *Fertil Steril* 1998; 69: 826–30.
109. Toth T, Awwad J, Veeck L, Jones H, Muasher S. Suppression and flare regimens of gonadotropin-releasing hormone agonist: use in women with different basal gonadotropin values in an in vitro fertilization program. *J Reprod Med* 1996; 41: 321–6.
110. Brzyski R, Muasher S, Droesch K, Simonetti S, Jones G, Rosenwaks Z. Follicular atresia associated with concurrent initiation of gonadotropin-releasing hormone agonist and follicle-stimulating hormone for oocyte recruitment. *Fertil Steril* 1988; 50: 917–21.
111. Karande V, Jones G, Veeck L, Muasher S. High-dose follicle-stimulating hormone stimulation at the onset of the menstrual cycle does not improve the in vitro fertilization outcome in low-responder patients. *Fertil Steril* 1990; 53: 486–9.
112. Olivennes F, Righini C, Fanchin R, Torrisi C, Hazout A, Glissant A. A protocol using a low dose of gonadotropin-releasing hormone agonist might be the best protocol for patients with high follicle stimulating hormone concentrations on day 3. *Hum Reprod* 1996; 11: 1169–72.
113. Droesch K, Muasher S, Brzyski R, Jones G, Simonetti S, Liu H-C. Value of suppression with a gonadotropin-releasing hormone agonist prior to gonadotropin stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1989; 51: 292–7.
114. Salat-Baroux J, Rolten D, Alvarez S, Antoine J. Comparison of growth hormone responses to growth hormone-releasing factor and clonidine in women with normal or poor ovarian response to gonadotropin stimulation. *Fertil Steril* 1993; 60: 791–9.
115. Lussiana C, Guani B, Mari C, Restagno G, Massobrio M, Revelli A. *Obstet Gynecol Surv* 2008; 12: 785-95.

116. Aittomaki K, Lucena JLD, Pakarinen P. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; 82: 959–68.
117. Conway GS, Conway E, Walker C. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1999; 51: 97–9.
118. Simoni M, Gromoll J, Hoppner W. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 751–5.
119. Sudo S, Kudo M, Wada S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 893–9.
120. Jun JK, Joon JS, Ku SY. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet* 2006; 51: 665–70.
121. Koning C, Benjamins T, Harms P, Homburg R, Montfrans J, Gromoll J ve ark. The distribution of FSH receptor isoforms is related to basal FSH şevels in subfertile women with normal menstrual cycles. *Hum Repro*; 21: 443-6.
122. Van Montfrans JM, Hoek A, van Hooff MHA, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal FSH concentrations in a general subfertility population. *Fertil Steril* 2000; 74: 97–103.
123. Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, Velde ER. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 79: 482–8.
124. Hasbargen U, Thaler CJ, Ruebsamen H, Fuchshuber S, Lohse P. S680N substitution of the follicle-stimulating hormone receptor is a common polymorphism not associated with spontaneous human twinning. *Eur J Med Rep* 2001; 6: 315–6.
125. Perez M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Hieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3365–9.
126. Achrekar S, Modi D, Desai S, MAngoli V, Mangoli R, Mahale S. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (Thr307Ala) is associated with variable ovarian response and ovarian hyperstimulation syndrome in Indian women. *Fertil Steril*; 91: 432-9.

127. Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Repro* 2002; 8: 413-21.
128. Laven J, Mulders A, Suryandari D, Gromoll J, Nieschlag E, Fauser B ve ark. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility. *Fertil Steril* 2003; 80: 986-92.