



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

**MÜLLERYAN AGENEZİ OLGULARINDA FOLİKÜL  
STİMULE EDİCİ HORMON RESEPTÖR (FSHR)  
GENOTİPLERİNİN KLİNİK VERİLERLE İLİŞKİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ash BİLEKDEMİR**

**Antalya, 2014**



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

**MÜLLERYAN AGENEZİ OLGULARINDA FOLİKÜL  
STİMÜLE EDİCİ HORMON RESEPTÖR (FSHR)  
GENOTİPLERİNİN KLİNİK VERİLERLE İLİŞKİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ash BİLEKDEMİR**

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. Münire ERMAN AKAR**

*“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir ”*

**Antalya, 2014**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Sayın Prof.Dr. Münire ERMAN AKAR başta olmak üzere, tecrübelerinden faydalandığım çok değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. İnanç MENDİLCİOĞLU'na, Sayın Prof.Dr. Mine ÜNER'e, Sayın Prof.Dr. Tayup ŞİMŞEK'e, Sayın Prof.Dr. Mehmet ŞİMŞEK'e, Sayın Doç.Dr. Abdullah BOZTOSUN'a, Sayın Yrd.Doç.Dr. Murat ÖZEKİNCİ'ye, Sayın Yrd.Doç.Dr. N. Utku DOĞAN'a, Sayın Yrd.Doç.Dr. Metin KABA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarında yardımını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Özgül ALPER'e ayrıyeten teşekkür ederim.

Aramızdan ayrılan değerli hocam Prof.Dr. Bilal TRAK'a rahmet dilerim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm.Dr. Tayfun TOPTAŞ, Uzm.Dr. Cem SANHAL, Uzm.Dr. Selen DOĞAN, Uz.Dr. Şafak OLGAN'a ve kliniğin tüm çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Hayata dair her konuda beni hiç yalnız bırakmayan canım aileme, sevgili eşim Utku'ya sonsuz teşekkür ederim.

Ve varlığı yaşamıma anlam katan canım oğlum ULAŞ'a sevgiyle...

# İÇİNDEKİLER

|                                                          | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Simgeler ve Kısaltmalar Dizini</b>                    | <b>v</b>     |
| <b>Çizelgeler Dizini</b>                                 | <b>vi</b>    |
| <b>Şekiller Dizini</b>                                   | <b>vii</b>   |
| <br>                                                     |              |
| <b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>                                  | <b>1</b>     |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                 | <b>2</b>     |
| 2.1. Mülleryan Kanalların Konjenital Yokluğu             | 2            |
| 2.1.1. Tanım                                             | 2            |
| 2.1.2. Embriyoloji                                       | 2            |
| 2.1.3. Etiyoloji                                         | 5            |
| 2.1.4. Mülleryan ageneziye eşlik eden anomaliler         | 6            |
| 2.1.5. İnsidans ve klinik bulgular                       | 7            |
| 2.1.6. Laboratuvar ve tanısal testler                    | 7            |
| 2.1.7. Ayırıcı tanı                                      | 8            |
| 2.1.8. Tedavi                                            | 8            |
| 2.2. Gonadotropin Reseptörleri                           | 10           |
| 2.2.1. Gonadotropinlerin yapı ve fonksiyonları           | 11           |
| 2.2.2. Gonadotropin reseptörleri                         | 12           |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>                             | <b>16</b>    |
| 3.1. Hasta Seçimi                                        | 16           |
| 3.2. Periferik Kan Örneklerinin Alınımı                  | 16           |
| 3.3. Periferik Kandan DNA Eldesi                         | 16           |
| 3.3.1. Kullanılan solüsyonlar                            | 16           |
| 3.3.2. İşlemler                                          | 17           |
| 3.3.3. DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümü         | 18           |
| 3.3.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi         | 19           |
| 3.3.5. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme sistemi   | 19           |
| 3.3.6. Amplikonların temizlenmesi                        | 20           |
| 3.3.7. DNA dizi analizi                                  | 20           |
| 3.3.8. Dizi analizi yapılacak amplikonların temizlenmesi | 21           |
| 3.3.9. DNA dizi analizi                                  | 21           |
| 3.4. İstatistiksel Analiz                                | 21           |

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                 | <b>22</b> |
| 4.1. Klinik Bulgular                                                               | 22        |
| 4.2. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları                                            | 24        |
| 4.3. Kontrol Grubunun SNP Analizi                                                  | 27        |
| 4.3.1. p.Ala307Thr polimorfizmi açısından değerlendirme                            | 27        |
| 4.3.2. p.Ser680Asn polimorfizmi açısından değerlendirme                            | 27        |
| 4.4. Mülleryan Agenezi Grubunun SNP Analizi                                        | 28        |
| 4.4.1. Ala307Thr polimorfizmi açısından değerlendirme                              | 28        |
| 4.4.2. Ser680Asn polimorfizmi açısından değerlendirme                              | 28        |
| 4.5. Gruplar Arası Karşılaştırma                                                   | 29        |
| 4.5.1. Kontrol ve MA grubu bireylerin p. Ala307Thr genotip verilerinin dağılımları | 29        |
| 4.5.2. Kontrol ve MA grubu bireylerin p.Ser680Asn polimorfizm genotip dağılımları  | 30        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                                 | <b>31</b> |
| <b>6. SONUÇLAR</b>                                                                 | <b>36</b> |
| <b>7. ÖZET</b>                                                                     | <b>37</b> |
| <b>8. ABSTRACT</b>                                                                 | <b>39</b> |
| <b>9. KAYNAKLAR</b>                                                                | <b>41</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                            |                                            |
|----------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Ala</b>                 | : Alanin                                   |
| <b>Asn</b>                 | : Asparajin                                |
| <b>FSH</b>                 | : Folikül Stimulan Hormon                  |
| <b>FSHR</b>                | : Folikül Stimulan Hormon Reseptörü        |
| <b>GH</b>                  | : Büyüme Hormonu                           |
| <b>GnRH</b>                | : Gonadotropin Salgılatıcı Hormon          |
| <b>HCG</b>                 | : Human Koryonik Gonadotropin              |
| <b>IVF</b>                 | : İn vitro Fertilizasyon                   |
| <b>IVP</b>                 | : İntravenöz Pyelografi                    |
| <b>LH</b>                  | : Luteinizan Hormon                        |
| <b>LHR</b>                 | : Luteinizan Hormon Reseptörü              |
| <b>MRKH</b>                | : Mayer Rokitansky Küstner Hauser Sendromu |
| <b>PZR</b>                 | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu              |
| <b>Ser</b>                 | : Serin                                    |
| <b>SNP</b>                 | : Tek Nükleotid Polimorfizmi               |
| <b>Thr</b>                 | : Treonin                                  |
| <b>TSH</b>                 | : Tiroid Stimulan Hormon                   |
| <b>TSHR</b>                | : Tiroid Stimulan Hormon Reseptörü         |
| <b><math>\alpha</math></b> | : Alfa                                     |
| <b><math>\beta</math></b>  | : Beta                                     |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <b><u>Cizelge</u></b>                                                              | <b><u>Sayfa</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1. Uterovajinal anomalilerin Amerikan Fertilite Derneği<br>klasifikasyonu        | 3                   |
| 4.1. Mülleryan agenezizli olguların klinik özellikleri ve SNP genotipleri          | 22                  |
| 4.2. Kontrol grubunda p.Ala307Thr polimorfizm genotipleri ve oranları              | 27                  |
| 4.3. Kontrol grubunda p. Ser680Asn bölgesi polimorfizm genotipleri ve<br>oranları  | 27                  |
| 4.4. Mülleryan agenezi grubunda p.Ala307Thr polimorfizm genotip ve<br>oranları     | 28                  |
| 4.5. Mülleryan agenezi grubunda p.Ser680Asn polimorfizm genotip ve<br>oranları     | 29                  |
| 4.6. Kontrol ve MA grubu bireylerin yaş dağılımları                                | 29                  |
| 4.7. Kontrol ve MA grubu bireylerin p.Ala307Thr polimorfizm genotip<br>dağılımları | 30                  |
| 4.8. Kontrol ve MA grubu bireylerin p.Ser680Asn polimorfizm genotip<br>dağılımları | 30                  |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Sekil</u></b>                                                                                                  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>2.1.</b> A) Gestasyonun 2. ayının sonunda dişi genital kanallar, B) Overlerin inişi sonrası dişi genital kanallar | <b>2</b>            |
| <b>2.2.</b> Mülleryan kanalların gelişimi                                                                            | <b>4</b>            |
| <b>4.1.</b> FSHR geninin ekzon 10 amplikonunun agaroz jel görüntüsü                                                  | <b>24</b>           |
| <b>4.2.</b> FSHR geninin ekzon 10 bölgesinin DNA referans dizisi                                                     | <b>25</b>           |
| <b>4.3.</b> Kontrol ve MA gruplarında FSHR genotiplmelerinden örnekler                                               | <b>26</b>           |
| <b>4.4.</b> Kontrol ve MA gruplarında FSHR genotiplmelerinden örnekler                                               | <b>26</b>           |

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mülleryan aplazi, Mayer Rokitansky Küstner Hauser Sendromu veya vajinal agenezi olarak tanımlanan Mülleryan Agenezi (MRKH) [OMIM 277000] 4.000 ila 10.000 kadında bir görülen klinik durumdur (1). Menstruasyon, penetran cinsel ilişki ve çocuk doğurmaya engel olan bu klinik durum kişilerin seksüalite, psikolojik durum ve yaşam kalitesini önemli derecede etkilemektedir (2).

Anatomik durumları gereği, Mülleryan agenezi olguları önemli reproduktif sorunlar ile karşı karşıyadırlar. Bu hastaların çoğu ovulasyon indüksiyonu, oosit toplanması ve taşıyıcıya transfere olanak sağlayacak en az bir normal overe sahiptirler (3). Ayrıca; yakın geçmişte hastalığın hipotezsel tedavisi olarak düşünülen uterus transplantasyonuna dair olumlu gelişmelerin sonuçları da elde edilmek üzeredir (4).

Ancak Mülleryan agenezi hastalarının taşıyıcı annelik veya uterus transplantasyonu sonucu kendileriyle benzer genetik özellikte çocuk sahibi olmalarına olanak sağlayan yardımcı üreme teknikleri, ovulasyon indüksiyonu, over rezervleri ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada; 2009-2011 yıllarında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran Mülleryan Agenezi tanılı olgularda, over rezervlerine yönelik moleküler belirteç olarak saptanmış olan iki FSHR polimorfizminin (p.Ala307Thr; p.Ser680Asn) değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mülleryan Kanalların Konjenital Yokluğu

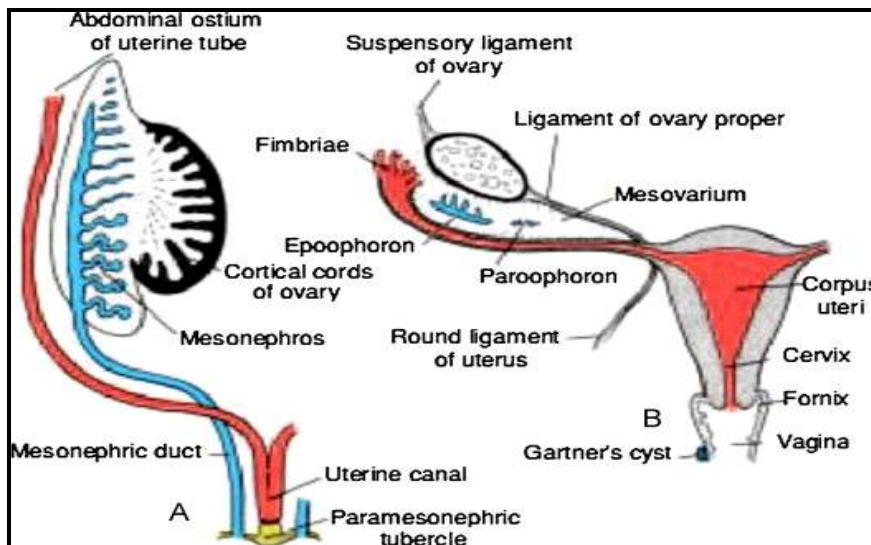
#### 2.1.1. Tanım

Amerikan Üreme Derneğinin (AFS) 1988 yılında Mülleryan anomalilerin sınıflandırılmasına yönelik uterin gelişimdeki yetersizliklere dayanan sınıflandırma sistemi, vajina ve tubaların da olaya katılmasıyla yeni bir sınıflandırma sistemine modifiye edilmiştir (Çizelge 2.1) (5).

#### 2.1.2. Embriyoloji

Dişi genital organların embriyolojik gelişiminin betimlenmesi, Mülleryan anomaliye sahip hastaların çok çeşitlilik gösteren fenotiplerinin anlaşılmasında kritik öneme sahiptir. İnsanların genetik cinsiyetinin, fertilizasyonla birlikte belirlenmesine rağmen, dişi yada erkek fenotip gelişimin 6. haftasından önce belirlenmez (6). Dişi genital organların gelişimi primordial böbrekler ile yakın ilişki içerisinde (7).

Gonadal gelişim, yolk kesesinin dorsal duvarında bulunan endodermal hücrelerden köken alan primordial germ hücresi olarak embriyolojik gelişimin dördüncü haftasında başlar. Daha sonra hindgut dorsal mezenteri boyunca gelişimin altıncı haftasında genital tüberküle ulaşacak şekilde migrasyon gösterirler (8). Overler orijin aldıkları böbreklerin yakınındaki pozisyonda gerçek pelvise ulaşırlar. Overlerin gelişimde rol oynayan *EMX2*, *Igf1r*, *Irr*, *Ir*, *LHX9*, *M33*, *SF1* ve *Wt1* gibi bazı genler tanımlanmıştır (9,10) (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.**

A) Gestasyonun 2. ayının sonunda dişi genital kanallar, B) Overlerin inişi sonrası dişi genital kanallar (6).

**Çizelge 2.1. Uterovajinal anomalilerin Amerikan Fertilite Derneği klasifikasyonu.**

**Klas I. Müllerian kanalların disgenezisi**

**Klas II. Müllerian kanalların vertikal füzyon bozuklukları**

- A. Transvers vajinal septum
  - 1. Obstrükte
  - 2. Obstrükte olmayan
- B. Servikal agenezi ve disgenezi

**Klas III. Müllerian kanalların lateral füzyon bozuklukları**

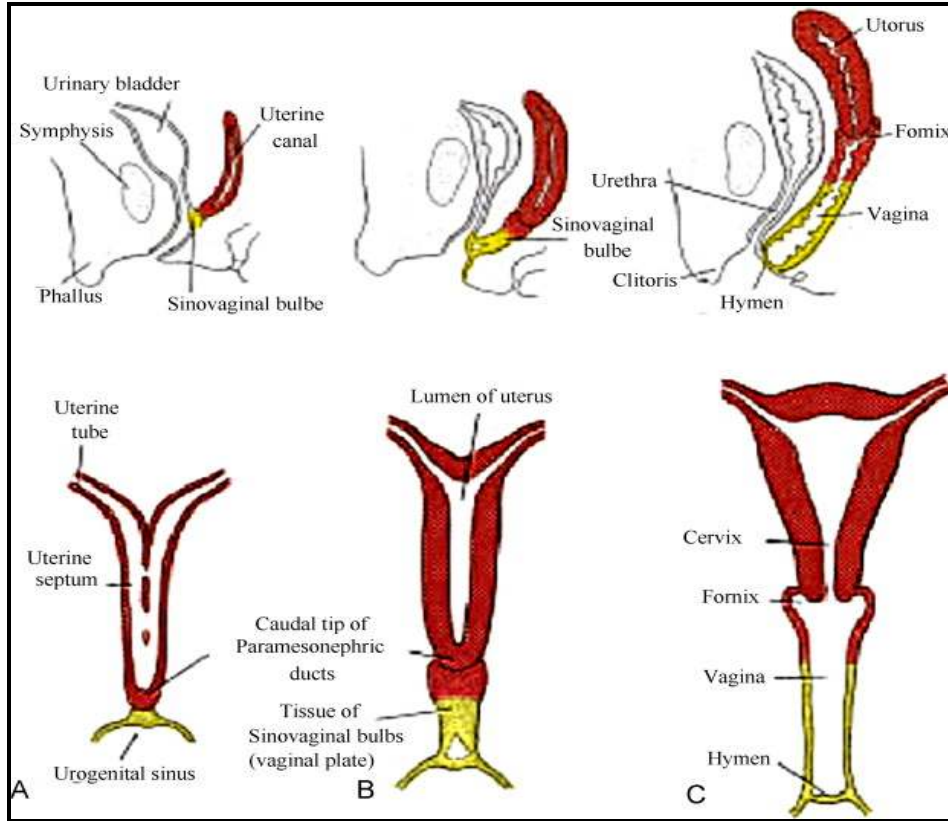
- A. Genellikle ipsilateral renal agenezi ile birlikte olan uterus ve vajinal asimetrik obstrükte bozuklukları
  - 1. Bağlantısız rudimenter taslak ya da horn ile birlikte olan unikornuat uterus
  - 2. Çift uterus kavitesinin unilateral obstrüksiyonu,
  - 3. Çift uterus ile birlikte olan unilateral vajinal obstrüksiyon
- B. Simetrik-obstrükte olmayan
  - 1. Didelfik uterus
    - a. Komplet longitudinal vajinal septum
    - b. Parsiyel longitudinal vajinal septum
    - c. Longitudinal vajinal septum yok
  - 2. Septat uterus
    - a. Komplet
      - 1. Komplet longitudinal vajinal septum
      - 2. Parsiyel longitudinal vajinal septum
      - 3. Longitudinal vajinal septum yok
    - b. Parsiyel
      - 1. Komplet longitudinal vajinal septum
      - 2. Parsiyel longitudinal vajinal septum
      - 3. Longitudinal vajinal septum yok
  - 3. Bikornuat uterus
    - a. Komplet
      - 1. Komplet longitudinal vajinal septum
      - 2. Parsiyel longitudinal vajinal septum
      - 3. Longitudinal vajinal septum yok
    - b. Parsiyel
      - 1. Komplet longitudinal vajinal septum
      - 2. Parsiyel longitudinal vajinal septum
      - 3. Longitudinal vajinal septum yok
  - 4. T şeklinde uterin kavite (diethylstilbestrol ile ilişkili)
  - 5. Unikornuat uterus
    - a. Rudimenter horn ile birlikte
      - 1. Endometrial kaviteli
        - a) Bağlantılı
        - b) Bağlantısız
      - 2. Endometrial kavitesiz
    - b. Rudimenter hornu olmayan

**Klas IV. Vertikal lateral füzyon bozukluklarının olağan dışı konfigürasyonları**

Amerikan Fertilite Derneğinden modifiye edilmiştir (5).

Erken dönemde, gebeliğin beş ile sekizinci haftaları arasında mesonefrik (wolfian) ve paramezonefrik (Mülleryan) kanalların oluşmasına izin verecek şekilde fenotip gelişimi cinsiyet farklılaşmasıyla devam eder. MIS (Mülleryan inhibiting substance)'ın sertoli hücrelerinde üretiminin yokluğunda, Mülleryan kanallar uterus, fallopian tüpleri, serviks ve üst vajen olarak gelişim gösterirler. Bu süreçte wolfian kanallar regrese olsa da, Mülleryan kanalların göçünde kılavuz olarak rol oynadıkları düşünülmektedir (11). 8 ve 18'inci haftalar arasında Mülleryan kanallar elongasyon, füzyon, kanalizasyon ve septal çözülme gösterirler. 12'nci hafta civarında, Mülleryan kanalların kaudal kısmı uterovajinal kanalı oluşturmak üzere kaynaşır. İki kanalın sonraki internal kanalizasyonu, 20'nci haftada rezorbe olacak bir septumla iki kanal oluşturacaktır. Septumun rezorbsiyonu ile uterus ve üst vajen oluşacaktır. İki Mülleryan kanalın kaynaşmamış alt kısımları ise iki Mülleryan kanala ait fallop tüpleri olarak kalacaklardır.

Alt vajen, Mülleryan kanalların kaudal füzyonunu takiben sinovajinal bulbustan köken alır. Oluşan vajinal tabaka santral dejenerasyona uğrayarak 20. hafta civarında tam kanalizasyona olanak sağlar (12) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Mülleryan kanalların gelişimi (6).

### **Uterus ve vajen gelişimi**

Mülleryan embriyolojik gelişimin tanımlayıcı genetik temeline dair daha çok çalışmaya ihtiyaç olsa da HOX (Homebox) serisi genlerin paramezofrik kanalların gelişiminde kritik rolü tesbit edilmiştir. Örneğin kromozom 7p15'de lokalize HoxA9 [OMIM 142956] gen grubu fallopian tüplerin gelişiminde, Hoxa10 [OMIM 142957] uterus gelişiminde, Hoxa11 [OMIM 142958] alt uterin segment ve serviks gelişiminde regülatör gen olarak rol oynamaktadır (13). HOX genlerindeki mutasyonların fareler üzerinde belirgin reproduktif anomaliye neden olduğu saptanmıştır (14).

Bu embriyonik gelişim aşamasında Mülleryan kanalın çöломik epitelden köken aldığı 5. embriyonik hafta ile ürogenital sinüsle birleştiği 8. embriyonik hafta arasında gelişimi başarısız olursa, ürogenital sinüstan sinovajinal bulbuslar çoğalamaz ve sonucunda uterus ve vajen gelişemez, sonuç itibarı ile Mayer-Rokitansky-Kustner-Hauser Sendromu (MRKH) [OMIM 277000] olarak bilinen klinik durum ortaya çıkmaktadır.

#### **2.1.3. Etiyoloji**

Hemen hemen tüm hastaların normal karyotipe (46,XX) sahip olması ve üç kez monozigotik ikizlerden sadece birinde vajinal agenezi rapor edilmiş olması nedeni ile vajinal agenezilere özel bir genetik etiyoloji atfedilmemiştir. 46,XX karyotipli kız kardeşlerde tam vajinal agenezinin tekrar ediyor olması, bu hastalar için otozomal bir kalıtım olduğunu düşündürmektedir. Shokeir ve ark. tarafından aralarında akrabalığı olmayan 13 Mülleryan agenezili bireylerin aileleri incelendi.10 ailede benzer şekilde etkilenmiş başka kadın bireyler belirlenmiştir. Genellikle baba tarafından olan akrabalarda etkilenmiş bir kadının olması, erkekler tarafından taşınan dişiye-özgü otozomal dominant geçişli bir genin varlığını düşündürmektedir (5).

Günümüze değin yapılan çalışmalarla, Homebox (HOX) genlerinin ekspresyon farklılıkları Mülleryan kanal agenezileri ile ilişkilendirilmiştir (15). Ayrıca, galaktoz metabolizma bozukluklarının ve galaktoz-1fosfat-uridil transferaz eksikliğinin de Mülleryan kanal aplazilerine neden olabileceği düşünülmektedir (16,17).

1982 yılında Willemsen ve ark. tarafından MRKH sendromunun Klippel-Feil sendromu ile bir ilişkisi gösterilmiştir (18). Bununla birlikte, bazı araştırmacılar ise anti-Mülleryan hormon ve anti Mülleryan hormon (AMH) geninde [OMIM 600957] var olan mutasyonların bu anomaliden sorumlu olabileceğini düşünmektedir (19).

MRKH sendromunun mümkün olabilecek 5 etiyolojik faktörü şöyle belirtilmiştir:

1. Dişi embriyonik gonad içerisinde Mülleryan inhibe edici faktörün yetersiz üretimi
2. Sadece alt Mülleryan kanalda östrojen reseptörlerinin bölgesel yokluğu ve eksikliği
3. Teratojenik bir ajana maruz kalma nedeniyle Mülleryan kanal gelişiminde duraklama
4. Mezenkimal indüksiyon hasarı
5. De nova gen mutasyonları

Teratojenik ve mutant gen etiyolojilerinin çok daha olası nedenler olduğuna inanılmaktadır (5).

#### **2.1.4. Mülleryan ageneziye eşlik eden anomaliler**

Mülleryan kanal anomalileri uterus ve vajenin tek veya çok çeşitli kombine anomalilerine neden olabilir. Overlerin kökeninin tamamen gonadal çıkıntılardan olması, uterovajinal anomaliler ile over anomalilerinin nadiren birlikte olmasını açıklamaktadır. Ancak wolfian ve Mülleryan kanalların yakın gelişimsel ilişkisi de dişi genital sistem anomalilerinin sıkça birlikteliğini düşündürmektedir (20).

Mülleryan kanalların gelişim başarısızlığı wolfian kanalların kaudal ucundan üreterik çıkıntısının gelişmemesi ile ilişkilendirilebilir. Bu nedenle Mülleryan kanal agenezisi olan tarafta böbreğin tamamen bulunmama hali eşlik edebilir.

Renal ünitelerin eksik, yapışık veya değişik lokalizasyonlarda olması teratojenitenin zamanına bağlı olarak görülebilir. Üreterler duplike olabileceği gibi vajen ya da uterus gibi alışılmadık yerlere açılabilir. Konjenital renal agenezili hastaların yaklaşık %40'ında genital anomaliler izlenebileceği gibi, Mülleryan agenezi vakalarının üçte birinde unilateral renal agenezi, unilateral veya bilateral pelvik böbrek, at nalı böbrek, hidronefroz, hidroüreter ve çeşitli paternlerde üriner anomaliler izlenmektedir (5,21).

Bu hastalarda iskelet anomalilerine ve kardiyak anomalilere de rastlanmaktadır. Yaklaşık %10-15 oranında izlenen iskelet anomalilerine en çok kama vertebra, vertebra füzyon bozuklukları, rudimental vertebral korpuslar ve normalden çok sayıda vertebra gibi spinal kanal bozuklukları şeklinde rastlansa da sindaktili, parmak eksikliği gibi

iskelet anomalileri de görülebilir. Ayrıca; konjenital kalp hastalıkları ve inguinal herni gibi anomaliler de Mülleryan ageneziye eşlik edebilir (22,23,24).

### **2.1.5. İnsidans ve klinik bulgular**

Mülleryan aplazi, Mayer-Rokitansky-Küstner-Hauser sendromu ve vajinal agenezi olarak bilinen Mülleryan agenezi 4000 ile 10.000 kadında bir görülen klinik durumdur (1). Mülleryan agenezi hastaları normal sekonder seks karakterleri gelişimine ve fonksiyonel overlere sahiptirler. Bu hastaların çoğunda uterus, serviks ve 2/3 vajen yoktur. Normal fallop tüpleri çoğu zaman vardır ve küçük müsküler uterin katlantılara bağlıdır (25).

Bu hastalar tipik olarak adolösan dönemde primer amenore ile başvururlar. Mülleryan agenezi, gonadal disgeneziden sonra primer amenorenin en sık nedenidir (26). Mülleryan agenezi hastalarının %2-7'sinde uterin kalıntılarında aktif endometrium bulunmaktadır. Bu nedenle bu hastalar siklik veya kronik karın ağrısı yakınması ile de başvurabilirler (27).

Seksüel organlardaki anomaliler derin kişilik problemlerine, vücut imajının bozukluğuna ve hamile kalamamaya bağlı düşük özgüvene yol açabilir (28).

### **2.1.6. Laboratuvar ve tanısal testler**

Tüm hastalarda kromozomal analiz yapılmalıdır. Ovaryan disgenezi, androjen insensitivite sendromu veya klasik MRKH sendromundan sapmalar varsa muhtemel bir Y kromozomu varlığını araştırmak için SRY (Sex determining region, Y) gen analizi yapılmalıdır (5).

Konvansiyonel transabdominal, translabial veya transrektal ultrasonografi, 3D ultrasonografi ve MRI (Manyetik Rezonans İnceleme) Mülleryan yapıların değerlendirilmesinde kullanılabilir ve anatomi tanımlamaya yardımcıdır (1).

Laparaskopi Mülleryan agenezide tanısal amaçlı önerilmese de, fonksiyonel rudimenter uterus varlığında tedavi amaçlı yardımcı olabilir (1). %53'e varan oranda abdominal duvar, üriner trakt ve iskelet anomalilerinin de bulunması nedeniyle bu anomalilere yönelik klinik değerlendirme yapılmalıdır. Ultrasonografi pelvik böbrek veya renal ageneziye dair bilgi vermede kullanılabilir (29). Operasyon öncesinde tüm hastalara IVP (İntravenöz pyelografi) çekilmelidir. IVP aynı zamanda spinal anomalilerin de araştırılmasında yararlıdır (5).

Bazı merkezlerde manyetik rezonans görüntüleme ile kombine manyetik urogram yapılarak tek bir radyolojik çalışma ile r prod ktif, ürolojik ve iskelet sistemlerinin araştırılması hızlandırılmaktadır (5).

#### **2.1.7. Ayırıcı tanı**

Mülleryan agenezinin ayırıcı tanıları arasında konjenital vajen yokluğu, transvers vajinal septum, imperfore himen, androjen insensitivite sendromu ve 17  hidroksilaz eksikliği sayılabilir (1).

Mülleryan aplazi ile karşılaştırıldığında imperfore himen hastalarında tipik anuleri sağaksı himen dokusu bulunmamaktadır. Transvers vajinal septumu olan hastalarda ise proksimal vajinal kanalla birlikte normal himenal doku izlenir. Primer amenoreye ilaveten bu iki durum siklik abdominopelvik ağrı ve traktın obstrüksiyonuna bağlı pelvik kitle ile görünebilir (1).

Androjen insensitivite sendromunda hastalar XY karyotipe ve normal düzeyde androjen üreten testislere sahiptirler. Androjen reseptör fonksiyon bozukluğuna bağlı pubik ve aksiller kıllanma izlenmez, periferik androjen-östrojen dönüşümüne bağlı meme dokusu normal olarak gelişir. Vajen kısa veya normaldir ancak intrautein dönemde testiküler antiM lleryan hormon varlığına bağlı uterus ve serviks izlenmez (1).

Fenotipik olarak dişi eksternal genitalya, k r vajen izlenen, uterusu olmayan 17  hidroksilaz eksikliği olan hastalar da XY erkek karyotipe sahiptirler.

#### **2.1.8. Tedavi**

Mülleryan agenezi hastalarının yönetimi, genital anomalilerin fonksiyonel ve emosyonel etkileri ele alınarak hem psikososyal yönden, hem de anatomik defektin düzeltilmesi ile yapılmalıdır. Tanı sonrasında hastalara sağlıklı cinsel ilişki olabileceği vurgulanmalıdır. Hasta ve ailesine gelecekteki fertilite seğenekleri hakkında bilgi verilmelidir. Yardımcı  reme teknikleri ve taşıyıcı gebelik kullanımı ile gelecekte biyolojik anne olabileceği anlatılmalıdır (30,31).

Dilatasyon ve cerrahi olarak neo-vajen oluşturma zamanlaması elektif olarak seğilir, ancak hastanın emosyonel olgunluğa ulaştığı ve tedaviyi talep ettiği zaman en uygun zamandır. Dilatasyon ile vajen oluşturulması, çoğu hasta için ilk tedavi seğeneği olmalıdır (1).

1938 yılında Frank, operasyonsuz suni bir vajina yaratmanın metodunu tanımlamıştır. Bu metod, hastanın litotomi pozisyonunda vajinal poşa dilatatörler yerleştirerek yeni vajen oluşturulmasına dayanmaktadır. 1940 yılında bu metodla tedavi edilen hastalarda başarılı sonuçlar alınmıştır. Düşük morbidite nedeniyle önemli bir yaklaşımdır ancak bu yöntem sonrası enterosel vakaları bildirilmiştir (5).

Bir diğer pasif dilatasyon tekniği Ingram tarafından tanımlanmıştır. Hasta özel bir bisiklet selesi sandalyesi ile kendi vücut ağırlığından faydalanıp dilatatörleri içeri iterek pasif dilatasyon sağlar. Günde en az 2 saat 15-30 dakikalık intervallerde, yerden yaklaşık 60 santimetre yüksekte sandalyeye oturur. Her ay kontrollerinde bir büyük ebada geçilebilir (5).

Yakın zamanda Mülleryan agenezi vakalarının %90-95'inin vajinal dilatasyondan anatomik ve fonksiyonel fayda sağladığı bildirilmiştir (32,33). Eğer dilatasyon başarısız olursa cerrahi dilatasyon endikasyonu vardır. Yeni vajen oluşturmaya yönelik cerrahinin amacı ilişkiye izin verecek uygun genişlikte ve sekreatuar kapasiteye sahip vajinal kanal oluşturmaktır. Zaman hastaya ve uygulanacak prosedüre göre değişmektedir. Genellikle geç adölesan ve erken erişkin dönem (17-21 yaş) tercih edilir, çünkü hastanın postoperatif uyum sağlayacak olgunluğa erişmesi önemlidir (1).

Yeterli vajen oluşturmak için en çok kullanılan metod, 1950 yılında McIndoe tarafından tanımlanan Abbe-McIndoe tekniğidir (34). Bu teknik rektum ve mesane arasında boşluk yaratacak uygun bir diseksiyon gerektirir ve postoperatif dilatasyon, özellikle greft kontraktürünü önlemek için kesinlikle gereklidir (1). Yeni vajen oluşumu için kullanılan diğer yöntemler Vecchietti işlemi ve daha önce laparatomik uygulanan operasyonların laparoskopik versiyonlarıdır (35).

Daha az sıklıkta kullanılan cerrahi yöntemler ise barsak, bukkal mukoza, amnion zarı gibi diğer çeşitli allogreftlerin kullanıldığı tekniklerdir (1). Ortotopik replasman, alınan uterusun fiksasyonu ve revaskülarizasyonuna dayanan uterus transplantasyonunun özellikle fertilité adına hastalığın tedavi prosedürleri arasında yer alması beklenmektedir (4).

Hasta doku ve organların; tamir, replasman ve rejenerasyonunun sonucu normal fonksiyon görmelerini amaçlayan rejeneratif tıbbın reproduktif sistem üzerindeki çalışmaları da devam etmektedir. Otolog kök hücrelerden üretilen fonksiyonel uterin dokunun kullanılabilirliği mümkünleşir ise mülleryan agenezi olgularını da kapsayan

toplumun %3 ila 5'ini etkileyen uterin faktör nedenli infertilitenin tedavisi hususunda önemli bir yol katedilmiş olacaktır (36).

## **2.2. Gonadotropin Reseptörleri**

Gametogenezis ve steroidogenezis olarak adlandırılan gonadal fonksiyonların regülasyonu hipotalamik dekaeptid olan gonadotrop releasing hormon (GNRH) ve iki hipofizer gonadotropin olan luteinizan hormon (LH) ve folikül stimulan hormon (FSH) tarafından yapılır. Plasental salgılanan HCG (hüman koryonik gonadotropin) ile birlikte bu üç gonadotropin; androjen, östrojen progesteron üretimi, folikül ve sperm maturasyonu, ovulasyon ve erken gebeliğin devamını içeren kadın ve erkek üreme endokrinolojisini regüle eder (37).

### **2.2.1. Gonadotropinlerin yapı ve fonksiyonları**

Üç gonadotropin olaral bilinen FSH, LH ve HCG ile TSH (tiroid stimüle edici hormon) glikoprotein hormon ailesindendir (38). Yapısal olarak bu üç gonadotropin ve TSH ortak  $\alpha$  subünitesine ve homolog hormon-spesifik  $\beta$  subünitesine sahip heterodimerlerdir (37). Glikozillenmiş polipeptid alt üniteler kovalent olmayan bağlarla birbirlerine bağlanırlar. Üç boyutlu yapı ise disülfid bağlarıyla sağlanır. Bu üç boyutlu yapı, hormon-reseptör ilişkilerini ve hormonun biyolojik aktivitelerini belirlemektedir (39).

Luteinizan hormon (LH) ve folikül stimulan hormon (FSH) sinerjik olarak etki etseler de, LH esas olarak teka hücrelerini uyarak steroidogenez; FSH ise granülosa hücrelerini uyarak folikül gelişimini sağlar.

İki Hücre - İki Gonadotropin Sistemi: Bu sistem folikül gelişiminin esasını oluşturmaktadır. LH uyarısıyla teka hücrelerinde kolestrolen androjen üretimi gerçekleşir, üretilen androjen FSH ile uyarılmış olan granülosa hücresine geçer ve östrodiol dönüştürülür. FSH ve üretilen östrodiol, FSH reseptörlerini ve östrodiol sentezini daha da artırır, oluşan sıvı folikül ortasında birikmeye devam eder (40).

#### **2.2.1.1. Foliküler gelişme ve FSH fonksiyonları**

Folikül gelişimi menarştan menapoza kadar devam eden bir olaydır. Her ay bir grup öncül (primordial) folikül olgunlaşma sürecine girer ve sadece tek bir olgun folikülün

çatlama ile yumurtlama olur (41). Oogenezis ve sonuç olarak doğumdaki folikül sayısı aslında genetik kontrol altındadır (42).

Primordial folikül grubunun seçimi gonadotropin etkisinden bağımsız olarak gerçekleşmekte ancak bu ilk seçimden sonraki gelişim ve farklılaşma FSH kontrolü altında olmaktadır. FSH etkisi altındaki oositler büyümekte ve tek sıralı olan granüloza hücreleri çok sıralı küboid yapıya geçmektedirler. FSH etkisi devam etmez ise oluşan bu primer foliküller atreziye gitmektedir (41).

FSH etkisiyle oositler büyümeye devam eder ve etraflarında 'zona pellucida' adı verilen glikoproteinden zengin bir tabaka oluştururlar. Granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi artarken dış kısımdaki teka hücreleri de farklılaşırlar. Östrodiol üretimi bu iki hücrenin çalışmasıyla gerçekleşirken, FSH reseptör sayısı da hızla yükselir (iki hücre, iki gonadotropin teorisi).

Östrojen ve FSH'nin sinerjistik etkisi ile granülozanın interselüler boşluklarında biriken folikül sıvısının yapımı çoğalır. Folikül aşamalı olarak antral safhaya geçtikçe kavite oluşturma eğilimi belirlemektedir. Folikül sıvısının birikmesi ile, oosit ve onu çevreleyen granüloza hücrelerinin spesifik endokrin ortamlarında beslenmeleri sağlanmaktadır. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri artık kümülüs ooforusu oluşturmaktadır. Bu kümülüs ooforusun farklılaşması oositin köken alan sinyallerle gerçekleşmektedir (43).

Granülozadaki yüksek proliferasyon alanları ile, antral foliküller yüksek konsantrasyonda östrojen içerirler. En düşük androjen/östrojen oranlarını içeren foliküller, sağlıklı oosit barındırma ihtimalleri en yüksek olanlardır (44). Sistemik dolaşıma da geçen östrodiol, negatif geri bildirim etkisiyle FSH'ı azaltmaya başladığında, sadece en fazla FSH reseptörüne sahip olan folikül hayatta kalabilecektir. FSH reseptörleri yeterli olmayan folikül ise küçülmeye gidecektir. Yine bu aşamada FSH ve östrodiol etkisiyle granüloza hücrelerinde LH reseptörü sentezi de başlamaktadır. Normalde siklus ortasına kadar folikülde LH reseptörü bulunmaz, erken LH yükselmesi androjen düzeyini arttırmakta, granüloza hücrelerinde mitotik süreci baskılamakta ve sonuç olarak folikülü küçülmeye götürmektedir (41).

Ovulasyondan hemen önceki dönemde, granüloza hücreleri büyümekte, teka tabakasında damarlanma artmakta ve oositin mayozu tekrar başlamaktadır. Foliküler fazda östrojen hızlı bir artış göstermekte, bunu LH ani artışı takip etmektedir. LH etkisiyle progesteron üretimi de yükselmekte, luteal faza geçiş süreci başlamaktadır (41).

Ovulasyon LH artışında 10-12 saat önce, östrodiol artışından 24-36 saat sonra gerçekleşir. LH ani artışı oositteki mayoz bölünmenin yeniden başlamasını, granülozanın lüteinizasyonunu, folikülde progesteron ve prostaglandinlerin sentezini uyarır. Progesteron ve prostaglandinler, folikül duvarının sindirim ve yırtılmasından sorumlu başta plazmin olmak üzere birçok proteolitik enzim aktivitesini artırır. Folikül duvarındaki kollajen sindirimiyle, folikül duvarının yırtılması ve ovulasyon gerçekleşir.

## **2.2.2. Gonadotropin reseptörleri**

### **2.2.2.1. Gonadotropin reseptörlerinin yapısı**

Gonadotropinler gonadlarda bulunan reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler (42). Guanin nükleotidi ile bağlanan proteinleri nedeniyle G protein reseptör ailesine dahil edilen reseptörlerdir (45).

İnsan LH reseptörü (hLHR) ve insan FSH reseptörü (hFSHR) sırasıyla 675 ve 678 aminoasit uzunluğundadır. hLHR ve hFSHR aminoasit rezidüleri başlatıcı metioninden itibaren numaralanmıştır (37). Hücre dışında bir amino ucu, hücre içinde bir karboksi ve hücre zarı arasında da yedi hidrofobik bağlantı alanı mevcuttur. Aynı gen ailesinde TSH, muskarinik, adrenerjik, kolinerjik, dopamin ve substans-K reseptörleri vardır. Hücre zarı arasındaki kısım, bu reseptörlerin en sabit bölümleridir, hücre dışı kısımlarında ise çoğunlukla kısa bir amino ucu bulunur (30-40 aminoasit). LHR, FSHR ve TSHR'nin bulunduğu grupta ise çok uzun bir amino ucu mevcuttur (45).

Gonadotropin reseptörlerinin ekstraselüler bölgelerinin aminoasit kısmı %46 oranında aynıdır. Bu bölge özel bir önem taşır, çünkü hormonları reseptörlerine yüksek derecede bağlanmalarından ve tanınmalarından sorumludur (46). FSHR'nin ekstraselüler bölümünün büyük bir kısmının kristal yapısı, bu önemli reseptörün üç boyutlu yapısı ve ligand bağlanması konusunda çok ihtiyaç duyulan bilgiler son yıllarda yapılan çalışmalarla elde edilmiştir (47).

Bir aminoasit, tyr110 glikoprotein hormon reseptörleri arasında tamamen korunmuştur (47). Bu, dimerdeki moleküller arası temasın çoğunu sağlar (47) FSHR'nin 1-268 aminoasitleri (kristal yapı için kullanılan parça) FSH'ı kuvvetli şekilde bağlar. Bu bulgu FSHR'nin menteşe bölgesinin bağlanmada yer almadığını gösterir (37). Glikoprotein hormonların  $\beta$  alt üniteleri ve reseptörleri benzer genler tarafından kodlanmaktadır (48,49).

#### **2.2.2.2. Gonadotropin reseptör genleri**

FSH reseptör ve LH reseptör genleri 2 nolu kromozomun p21 bölgesinde yer almaktadır (50). Rousseau-Merck ve arkadaşları (1990) tarafından tanımlanan LHR yaklaşık olarak 80 Kb uzunluğunda olup, 11 ekzondan oluşmaktadır [OMIM 152790]. FSHR ise yaklaşık 190 Kb uzunluğunda, 10 ekzondan oluşmaktadır [OMIM 136435]. Ayrıca bu ekzonlar reseptörlerin ekstraselüler bölgelerinin menteşe bölgesinde bulunan C-terminal ucunu da kodlarlar (37).

LHR ve FSHR'nin 5' yan bölgeleri GC açısından zengin, genlerin promotör bölgeleri ise TATA kutularından yoksundurlar. Sıçan FSHR'sinin promotörü, kopyalama başlangıç bölgesinin 200bp üzerinde olup, bu bölge translasyon başlangıç bölgesinin 100 bp üzerinde bulunan iki transkripsiyon başlangıç bölgesi taşır. GATA, E2F, API bölgesi ve bir E box bu bölgede bulunan ve transkripsiyon için önemli birkaç elementtir. Buna karşın E box ve bağlayıcı proteinleri FSHR'nin overlerdeki ekspresyonu için özellikle önemlidir (37).

#### **2.2.2.3. Gonadotropin reseptör gen varyasyonları (Mutasyon ve SNPlar)**

Gonadotropin reseptör genlerinin mutasyonları ve bunların patofizyolojik sonuçları hakkındaki ilk kapsamlı araştırma 2000 yılında yapılmış, 5 yıl sonra yeni gelişmeler tekrar yayınlanmıştır (51,52).

Gonadotropin reseptör genleri mutasyonları baskılayıcı ve uyarıcı olarak iki şekilde görülebilir. Uyarıcı mutasyonlarda fenotipik değişiklik oluşturmak için heterozigot olması yeterlidir. Baskılayıcı mutasyonların fenotipe yansımaları için homozigot olması gerekmektedir. Ebeveynlerden gelen gen allelerinden sadece birisinde bile mutant allelin olması halinde, reseptörlerin bir kısmı sürekli olarak fazla uyarılacak ve bu fenotipe yansıyacaktır. Baskılayıcı mutasyonların fenotipe yansımaları için iki ebeveyninden mutant allelerin olması gerekecektir. Tek bir baskılayıcı mutant, reseptörlerin bir kısmının sessiz kalmasına yol açarken diğerleri normal çalışacağından hastalık oluşmayacaktır. LHR gen mutasyonlarının çoğu, G proteinlerinin önemli bir bağlanma yeri olan hücre zarı içerisindeki kısımda bulunur (53).

Baskılayıcı LHR gen mutasyonu olan kadınlar, normal fenotipik farklılaşma ve ergenlik gelişimi gösterirler ancak ergenlik sonrasında LH etkisinin olmaması nedeniyle amenore ve infertilite ile karşıma çıkarlar (54). 46, XY karyotipine sahip kişilerde en şiddetli fenotip leydig hücrelerinin tamamen yokluğu (leydig hücre hipoplazisi) ve

psödohermafroditizmdir. Daha ılımlı fenotipler ise hipospadias ve mikropenistir (51-55). FSH reseptörlerinde ilk baskılayıcı mutasyon p.Ala189Val olup, Finlandiyalı ailelerin taranması sonucu 1995 yılında saptanmıştır (56). Hastalarda primer veya erken başlangıçlı sekonder amenore, hipergonadotropik hipogonadizm, primordial ve preantral evrelerde folikül matürasyonun durması, değişik evrelerde sekonder seks karakterleri izlenmiştir. Mutant FSH reseptörü hücre yüzeyinde çok az sentezlenmekte, FSH ile bağlanamamakta, bağlansa bile ikincil uyarı yapmamaktadır (57).

Benzer özellikte diğer yanlış anlamlı bir mutasyon olan p.Pro519Thr ise aynı şekilde hipergonadotropik prematüver yetmezliği, çok düşük östrojen düzeyleri ve yüksek doz FSH'a yanıtızsızlık saptanmıştır. Yapılan over biopsilerinde folikül olgunlaşmasının preantral dönemden daha ileri gitmediği gözlenmiştir (58). Saptanan diğer baskılayıcı FSHR gen mutasyonlarında ise sekonder amenore, gonadotropin direnci, normale yakın over büyüklüğü ve antral düzeye ulaşan foliküller gibi daha iyi gidişli fenotiplerle karşılaşmıştır (59,60).

FSHR geninde p.Ala41Thr mutasyonunda, östrojen düzeyleri normalden daha düşük olmasına rağmen, gestagen ile çekilme kanaması elde edilebilmiştir (61). Son yıllarda saptanan p.Pro348Arg mutasyonunda ise reseptörde oluşan yapısal değişiklik nedeniyle hiçbir şekilde FSH bağlanamamaktadır. Sonuç olarak hastada hipergonadotropik hipogonadizm, primer amenore ve gecikmiş puberte ortaya çıkmaktadır.

FSH reseptör mutasyonları nadir görülmesine rağmen; fenotip, reseptör baskılama oranı, mutasyon bölgesi ve işlevsel sonuçlar açısından yakın bir ilişki vardır. Reseptörün hücre dışında kalan kısmındaki mutasyonlar (p.Ile160Thr, p.Ala189Val, p.Asn191Ile, p.Asp224Val ve p.Pro346Arg), FSH ile bağlanmayı doğrudan engellerken fenotipin de ağır seyretmesine neden olmaktadır. Hücre membranında kalan kısmın mutasyonlarında (p.Ala419Thr, p.Arg573Cys ve p.Leu602Val) ise sinyal iletimi aksamakla birlikte hastaların durumu daha iyi seyretmektedir. Bu hastalarda yüksek doz FSH uyarısına yanıt alınmakta ve yapılan genetik çalışmalar infertilite sebeplerini aydınlatmaktadır. Heterozigot mutasyonu olan hastalarda fenotipin normal geliştiği yani çalışan tek bir normal allelinin, FSH normal fonksiyonunu devam ettirdiği görülmüştür (52).

Bugüne kadar FSHR geninin kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan bölgelerinde birbirinden farklı tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tanımlanmıştır. Bunların sayısı yaklaşık >1300 civarındadır. Kodlayıcı bölgede yer alan toplam sekiz SNP den özellikle iki tanesi ekzon 10 bölgesinde yer alan 680 pozisyonundaki asparajin-serin (p.Asn680Ser;

rs 6166) ve 307 pozisyonundaki alanin-threonin (p.Ala307Thr; rs6165) değişimleri üzerine yoğunlaşmıştır. Dolayısı ile, fosforilasyon ve glikozilizasyon moleküler mekanizmalarındaki değişikliklerden dolayı FSHR varyantlarının FSH üzerinde farklı şekillerde etki edebileceği hipotezini doğurmuştur (62,63). Her iki polimorfizmde aynı ekzonik bölgede yer almasından dolayı p.Thr307-p.Asn680 ve p.Ala307-p.Ser680 kombinasyonları birlikte kalıtılmakta olup, linkaj disequilibrium olarak gözlenmektedir (64).

Folikul stimule edici hormon folikuler büyümede merkezi rol oynadığından IVF protokollerinde ve diğer değişik dişi ve erkek infertilite problemlerinde over stimülasyonunda kullanılmaktadır. 2013 yılında Desai ve arkadaşları tarafından bir derlemede bugüne değin yapılan tüm çalışmalara dayalı olarak FSHR polimorfizmlerinin over cevabını öngörmeye bir genetik marker/belirteç olabileceği üzerinedir. 2010 ve 2011 yıllarında yapılan meta-analiz çalışmalarına dayanarak sadece Ser<sup>680</sup> allelinin, klinik uygulamalarda FSH stimülasyonu ile over cevabını belirlemede güvenilir bir marker olabileceği gösterilmiştir (64).

Tüm literatür verileri göz önüne alındığında, anatomik nedenli infertil bireylerdeki gonadotropin reseptör genlerinde yer alan tek nükleotid polimorfizmleri, gen içi kırılma hataları, ve mutasyonlar genetik temelin anlaşılmasında önem kazanmaktadır. Ayrıca, üreme abnormalitelerine yönelik uygulanan tedavi protokollerinde *FSHR* gen polimorfizmlerinin moleküler belirteç olarak düşünülmesi bireysel farmakogenetik yaklaşımları da beraberinde getirmektedir.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Hasta Seçimi**

Çalışmamız, 2009-2011 yıllarında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran hastalarda yapılmıştır. Çalışmaya katılan tüm hastalara çalışma hakkında bilgi verildi ve onam formları imzalatıldı.

İlgili çalışma için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Bilimsel Çalışmalar Etik Kuruluna başvurularak 20.12.2012 tarih ve B.30.2.AKD.0.20.05.06/338 sayılı karar ile ön onay alındı. Kontrol grubuna seçilen hastalarda çalışmaya katılma kriteri olarak spontan gebe kalan 23-39 yaş aralığındaki hastalar seçildi. İnfertilite öyküsü olan, cinsel aktif olduktan sonra korunmasız ilişkiye rağmen 1 yıl içerisinde gebe kalamayan hastalar çalışmaya alınmamıştır.

Mülleryan agenezi hasta grubunda ise kliniğimizde Mülleryan agenezi tanısı alan ya da dış merkezden bu tanı ile hastanemize refere edilen 15-39 yaş arasındaki kadınlar seçilmiştir. Anormal sekonder seks karakteri gelişimi izlenen ve anormal karyotipe sahip hastalar çalışmadan dışlanmışlardır.

#### **3.2. Periferik Kan Örneklerinin Alınımı**

Çalışma kapsamına alınan olgulara onam formu doldurularak, 5 ml olacak şekilde periferik kan örnekleri K<sub>3</sub>EDTA'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 solüsyonlar**

##### **CLB 1X (Hücre Liziz Tamponu)**

0.32 M Sükroz (Merck)

10 mM Tris HCl pH 7.6 (Sigma)

5 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck)

%1 Triton-X (Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan CLB 1X tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra +4°C’de saklandı.

**TKM1 (Düşük konsantrasyonlu tuz solüsyonu)**

10 mM Tris HCl pH 7.6 (Sigma)

10 mM KCl (Reidel-de Haen)

10 mM MgCl<sub>2</sub> (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.

**TKM2 (Yüksek konsantrasyonlu tuz solüsyonu)**

10 mM Tris HCl pH 7.6 (Sigma)

10 mM KCl (Reidel-de Haen)

10 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck)

0.4 mM NaCl (Carlo Erba)

2 mM EDTA pH 8.0 (Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlananTKM2 tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

**%10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi**

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

**6 M NaCl (Sodyum klorür)**

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

**%70’lik etanol**

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

### 3.3.2. İşlemler

K<sub>3</sub>EDTA'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 100 µl %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 gece boyu 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. 5 µl DNA örneği 995 µldH<sub>2</sub>O 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 50 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

### **3.3.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi**

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

#### **3.3.4.1. PZR reaksiyonu içeriği**

PZR içeriği; H<sub>2</sub>O, 10X tampon (Fermentas), MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Fermentas), dNTP (10 mM) karışımı, ileri 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 ekzon 10 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. PZR 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. PZR ürünü ve 50 bç'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 PZR ürün pürifikasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

#### **3.3.6.1. İşlemler**

PZR 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 (10 µM), kalıp DNA ve H<sub>2</sub>O konularak final hacmi 10 µl olacak şekilde hazırlandı.

#### **3.3.7.2. Dizileme PZR 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 dizi analizi v3.1 yazılım programında değerlendirildi.

### **3.4. İstatistiksel Analiz**

Veriler SPSS (version 20.0)(SPSS, Inc., Chicago, USA) kullanılarak analiz edildi. Örnekleri tanımlamak için frekans dağılımı, ortalama, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. p.Ala307 ve p.Ser680 değişimleri için ayrı ayrı genotiplemelere ve gruplara göre yaşlarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. Analizlerde farklılıkların belirlenmesi için %95 anlamlılık düzeyi (ya da  $\alpha=0.05$  hata payı) kullanıldı.

## 4. BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından Mülleryan agenez tanısı konmuş 61 olgu değerlendirilerek aydınlatılmış onam alındıktan sonra çalışma kapsamına alınmıştır. 61 olgunun tümünde MRKH ile uyumlu klinik bulgular saptanmıştır.

### 4.1. Klinik Bulgular

Çalışmamıza dış merkezlerden Mülleryan Agenezi tanısı ile refere edilen ve kliniğimizde Mülleryan Agenezi tanısı alan 15-39 yaş aralığında (yaş ortalaması  $26,67 \pm 5,97$ ), dişi genetik cinsiyete (karyotipi 46,XX) sahip 61 hasta dahil edildi. Yapılan sitogenetik analiz sonucunda tüm olgularda sayısal ve yapısal kromozomal bir abnormalite saptanmamıştır. Sadece 12 olguda kromozomal heteromorfizm gözlenmiştir (1qh+, 9qh+, 13pss, 14pss, 15pss, 21pss, 22pss).

Biyokimyasal hormonal testler sonucunda ise 6 olgunun FSH değerleri 12-65 mIU/ml belirlenmiş olup, diğer olguların değerleri normal sınırlar arasında saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen bireylere ait klinik bulgular ve değerlendirilmeye alınan iki SNP bölgesinin genotiplemeleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çalışma kapsamına alınan 61 hastanın 3’ünde vajinal agenezi nedeniyle operasyon geçirme öyküsü mevcuttu. Elli sekiz tanesi ise vajinal dilatasyon vb. yöntemle oluşturulmuş yeterli vajene sahip olduğu belirlendi. Olguların klinik incelemelerinde 13 bireyde tek böbrek, atnalı böbrek, pelvik böbrek, bilateral pelvikalisyal dilatasyon gibi renal anomali hikayesi saptandı (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Mülleryan agenesizli olguların klinik özellikleri ve SNP genotipleri.

|         | Yaş | Karyotip | p.Ala307T<br>hr | p.Ser680A<br>sn | FSH değerleri<br>mIU/ml | Ek bulgular                                    |
|---------|-----|----------|-----------------|-----------------|-------------------------|------------------------------------------------|
| OLGU 1  | 31  | 46,XX    | A/T             | S/N             | 7.40                    | Bilateral pelvikalisyal dilatasyon             |
| OLGU 2  | 26  | 46,XX    | A/T             | S/N             | 2.30                    | Anne-baba birinci derece akraba, pelvik böbrek |
| OLGU 3  | 30  | 46,XX    | A/T             | S/N             | 2.00                    |                                                |
| OLGU 4  | 25  | 46,XX    | A/A             | S/S             | 4.40                    |                                                |
| OLGU 5  | 28  | 46,XX    | T/T             | N/N             | 6.30                    |                                                |
| OLGU 6  | 17  | 46,XX    | T/T             | N/N             | 7.10                    |                                                |
| OLGU 7  | 17  | 46,XX    | A/A             | S/S             | 7.40                    | Unilateral renal agenezi, rudimenter uterus    |
| OLGU 8  | 17  | 46,XX    | A/T             | S/N             | 4.80                    |                                                |
| OLGU 9  | 25  | 46,XX    | A/T             | S/N             | 5.40                    |                                                |
| OLGU 10 | 21  | 46,XX    | A/T             | S/S             | 3.70                    | Rudimenter uterus                              |
| OLGU 11 | 27  | 46,XX    | A/T             | S/N             | 3.80                    |                                                |
| OLGU 12 | 28  | 46,XX    | T/T             | N/N             | 4.30                    |                                                |

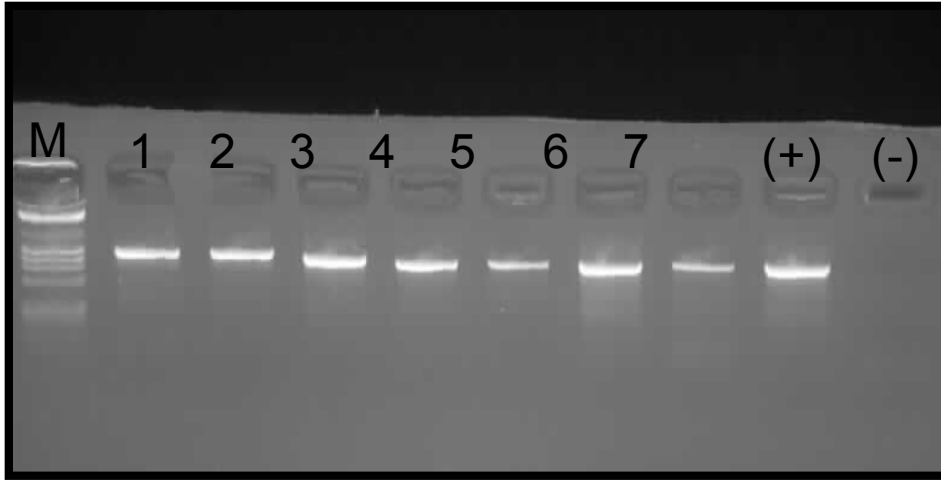
**Çizelge 4.1 (Devam).** Mülleryan agenesizli olguların klinik özellikleri ve SNP genotipleri.

|         |    |                   |     |     |       |                                                                                             |
|---------|----|-------------------|-----|-----|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| OLGU 13 | 23 | 46,XX             | A/A | S/S | 2.80  |                                                                                             |
| OLGU 14 | 24 | 46,XX             | A/T | S/N | 6.70  |                                                                                             |
| OLGU 15 | 18 | 46,XX             | T/T | N/N | 4.09  |                                                                                             |
| OLGU 16 | 18 | 46,XX             | A/T | S/N | 1.50  | Anne-baba birinci derece akraba                                                             |
| OLGU 17 | 39 | 46,XX             | A/T | S/N | 5.30  | Unilateral renal agenezi                                                                    |
| OLGU 18 | 30 | 46,XX             | A/T | S/N | 4.10  | Unilateral renal agenezi                                                                    |
| OLGU 19 | 20 | 46,XX             | A/T | S/N | 4.30  | Anne-baba birinci derece akraba,bilateral pelvikalisyal dilatasyon,tiroid gland hipoplazisi |
| OLGU 20 | 24 | 46,XX             | A/T | N/N | 9.80  |                                                                                             |
| OLGU 21 | 21 | 46,XX;9qh+,21pss  | A/T | S/N | 3.80  |                                                                                             |
| OLGU 22 | 29 | 46,XX             | A/T | S/N | 1.50  | Parsiyel empty sella sendromu                                                               |
| OLGU 23 | 26 | 46,XX             | A/T | S/S | 3.25  | Anne-baba birinci derece akraba                                                             |
| OLGU 24 | 32 | 46,XX             | A/T | S/S | 2.90  |                                                                                             |
| OLGU 25 | 19 | 46,XX;21pss       | A/T | S/N | 4.90  |                                                                                             |
| OLGU 26 | 37 | 46,XX             | A/A | S/S | 14.00 |                                                                                             |
| OLGU 27 | 25 | 46,XX;9qh+        | A/T | S/N | 7.50  | Anne-baba birinci derece akraba, unilateral renal agenezi                                   |
| OLGU 28 | 28 | 46,XX             | A/A | S/S | 6.40  |                                                                                             |
| OLGU 29 | 29 | 46,XX             | A/T | S/N | 3.10  |                                                                                             |
| OLGU 30 | 19 | 46,XX;14pss       | T/T | N/N | 65.00 |                                                                                             |
| OLGU 31 | 22 | 46,XX             | A/T | S/N | 6.40  | Unilateral renal agenezi                                                                    |
| OLGU 32 | 24 | 46,XX             | A/T | S/S | 3.30  |                                                                                             |
| OLGU 33 | 39 | 46,XX             | A/T | S/N | 12.00 | At nalı böbrek                                                                              |
| OLGU 34 | 31 | 46,XX             | T/T | N/N | 4.30  |                                                                                             |
| OLGU 35 | 23 | 46,XX             | A/T | S/S | 3.30  | Anne-baba birinci derece akraba,unilateral renal agenezi                                    |
| OLGU 36 | 21 | 46,XX             | A/A | S/S | 5.50  |                                                                                             |
| OLGU 37 | 24 | 46,XX             | A/A | S/S | 3.80  |                                                                                             |
| OLGU 38 | 24 | 46,XX             | T/T | N/N | 15.00 | Yarı damak-dudak                                                                            |
| OLGU 39 | 19 | 46,XX             | A/T | S/N | 6.40  | Anne-baba birinci derece akraba                                                             |
| OLGU 40 | 23 | 46,XX             | A/A | S/S | 6.40  |                                                                                             |
| OLGU 41 | 20 | 46,XX             | T/T | N/N | 5.20  | Sağ ektopik pelvik böbrek                                                                   |
| OLGU 42 | 33 | 46,XX;14pss       | A/A | S/S | 9.90  | Anne-baba birinci derece akraba                                                             |
| OLGU 43 | 38 | 46,XX;13pss,22pss | A/A | S/S | 4.00  |                                                                                             |
| OLGU 44 | 25 | 46,XX             | T/T | N/N | 4.50  | Ektopik pelvik böbrek                                                                       |
| OLGU 45 | 15 | 46,XX;13pss,22pss | A/T | S/N | 8.70  |                                                                                             |
| OLGU 46 | 22 | 46,XX             | A/T | S/S | 13.00 | Anne-baba birinci derece akraba                                                             |
| OLGU 47 | 39 | 46,XX;1qh+        | T/T | S/N | 7.50  |                                                                                             |
| OLGU 48 | 26 | 46,XX             | A/T | S/N | 9.80  |                                                                                             |
| OLGU 49 | 38 | 46,XX             | A/A | S/S | 9.50  |                                                                                             |
| OLGU 50 | 25 | 46,XX             | A/T | S/N | 8.90  |                                                                                             |
| OLGU 51 | 23 | 46,XX             | A/T | S/S | 7.70  |                                                                                             |
| OLGU 52 | 28 | 46,XX             | A/A | S/S | 6.20  | Anne-baba birinci derece akraba                                                             |
| OLGU 53 | 26 | 46,XX             | A/T | S/S | 4.60  |                                                                                             |
| OLGU 54 | 23 | 46,XX             | A/T | S/N | 3.70  | Halasında Mülleryan Agenezi tanısı mevcut                                                   |
| OLGU 55 | 24 | 46,XX             | A/T | S/S | 8.70  |                                                                                             |
| OLGU 56 | 33 | 46,XX;13pss       | A/T | S/N | 6.40  |                                                                                             |
| OLGU 57 | 19 | 46,XX;15pss       | T/T | N/N | 15.00 |                                                                                             |
| OLGU 58 | 28 | 46,XX;13pss,21pss | T/T | N/N | 1.40  |                                                                                             |
| OLGU 59 | 24 | 46,XX;13pss       | A/T | S/S | 5.10  |                                                                                             |
| OLGU 60 | 31 | 46,XX             | A/A | S/S | 8.1   |                                                                                             |
| OLGU 61 | 23 | 46,XX             | A/T | S/S | 4.7   |                                                                                             |

Ayrıca, çalışma kapsamına 100 bireyden oluşan, yaş ortalaması  $29\pm4,89$  olan bireylerde dahil edilerek kontrol grubu oluşturulmuştur. Bireylerin yaşları 23 ile 38 arasında değişmekte olup, fertilité sorunu bulunmayan ve normal değerlere sahip over rezervleri olan bireylerden oluşmaktadır.

#### 4.2. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları

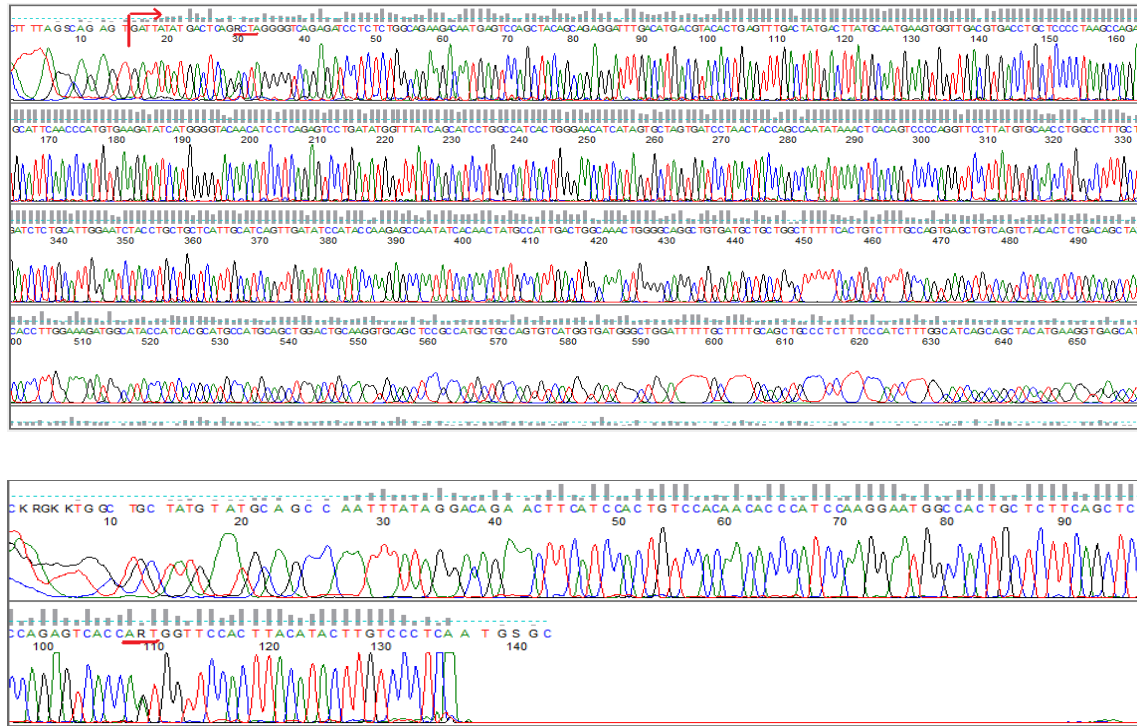
Çalışma kapsamına alınan tüm olguların genomik DNA örneklerinde, FSHR geninde [NM\_000145.3] moleküler genetik analiz yapılmıştır. Mülleryan agenezi ve kontrol grubundaki olguların FSHR geninin ekzon 10 bölgesi PCR tekniği kullanılarak amplifiye edilmiştir. Elde edilen amplifikasyon ürünleri konsantrasyonu %1 olarak hazırlanan agaroz jelde yürütülmüştür. Amplikon büyüklüğü 1200bp olan FSHR amplikonunun agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1’de sunulmuştur.



M: marker; olgu no, 1-7;(+), pozitif kontrol; (-), negatif kontrol.

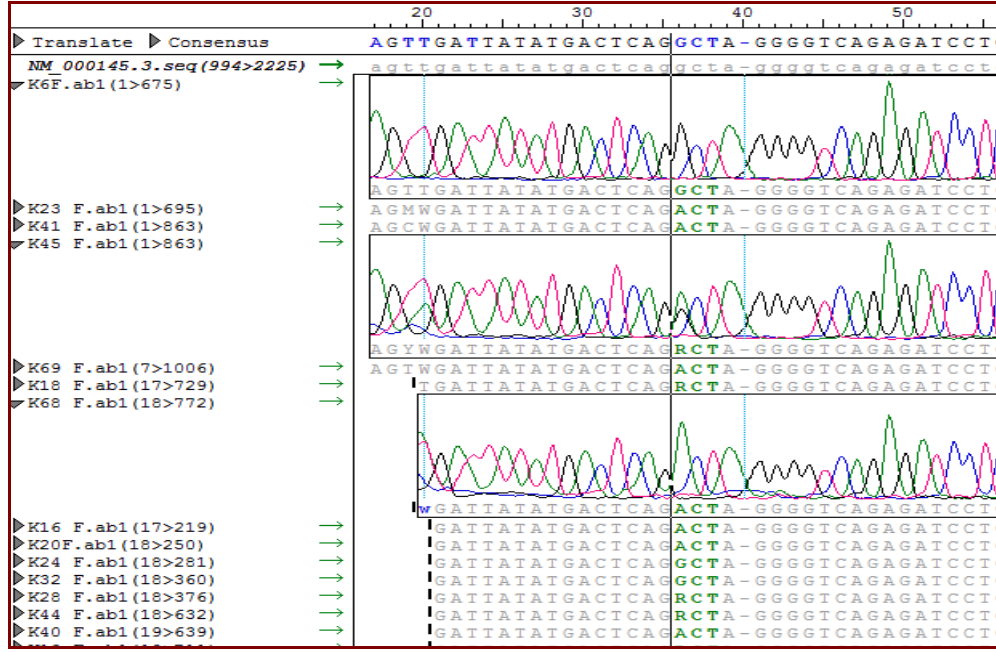
**Şekil 4.1.** FSHR geninin ekzon 10 amplikonunun agaroz jel görüntüsü.

Çalışma kapsamına alınan 100 kontrol, 61 Mülleryan agenezi grubuna ait olguların FSHR gen amplikonları DNA dizi analizine alınmıştır. Her iki bölgenin referans DNA dizisi Şekil 4.2’de sunulmuştur.

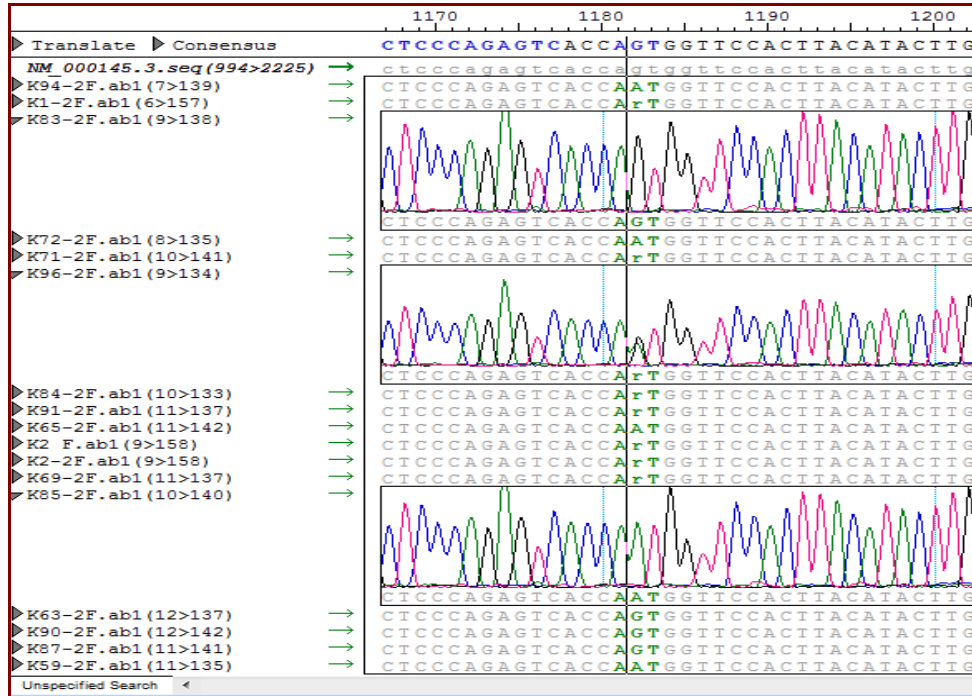


**Şekil 4.2.** FSHR geninin ekzon 10 bölgesinin DNA referans dizisi, elektroferogramda yer alan ok işareti, *FSHR* geninin ekzon 10 ampliconunun okuma başlangıcı, altı kırmızı çizili yerler p.Ala307Thr (c.919G>A; rs6165) ve p.Ser680Asn (c.2039G>A; rs6166) SNPolimorfizmlerini göstermektedir.

Çalışma kapsamında yer alan tüm olguların, FSHR ampliconlarının dizi analizi sonuçları, NCBI veri tabanında yer alan ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) FSHR geninin [NM\_000145.3] nükleotit dizisi referans alınarak değerlendirilmiştir. Olgularımızda saptanan p.Ala307Thr ve p.Ser680Asn polimorfizmlerinin kontrol, ve MA gruplarındaki genotiplerine ait dizileme örnekleri Şekil 4.3 ve 4.4’de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Kontrol ve MA gruplarında FSHR genotiplerinden örnekler (p.Ala307Thr; gCT>aCT değişiminde 919 pozisyonunda homozigot wild tip G/G, Ala/Ala genotipi; heterozigot G/A, Ala/Thr genotipi ve homozigot A/A, Thr/Thr genotiplemesi)



**Şekil 4.4.** Kontrol ve MA gruplarında FSHR genotiplerinden örnekler (p.Ser680Asn; AgT>AaT değişiminde 2039 pozisyonunda homozigot wild tip G/G, Ser/Ser genotipi; heterozigot G/A, Ser/Asn genotipi ve homozigot A/A, Asn/Asn genotiplemesi).

### 4.3. Kontrol Grubunun SNP Analizi

Kontrol grubu bireylerin genomik DNA örneklerinde iki SNP bölgesi; p.Ala307Thr ve p.Ser680Asn açısından değerlendirildi. p.Ala307Thr (GCT>ACT) bölgesindeki referans dizi ile karşılaştırılmalarında wild tip homozigot Ala/Ala; homozigot polimorfizm için Thr/Thr, heterozigot polimorfizm için Ala/Thr şeklinde belirlendi. Diğer SNP için ise, p.Ser680Asn (AGT>AAT) polimorfizmi için referans dizi için Ser/Ser, homozigot polimorfizm için Asn/Asn, heterozigot polimorfizm için Ser/Asn şeklinde değerlendirildi.

#### 4.3.1. p.Ala307Thr polimorfizmi açısından değerlendirme

Yapılan genetik analizler sonucu kontrol grubu bireylerin p.Ala307Thr (GCT>ACT) polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde 28 bireyde T/T homozigot genotipi belirlendi. Heterozigot A/T genotipine sahip 51 birey, A/A genotipine sahip 21 birey saptandı (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Kontrol grubunda p.Ala307Thr polimorfizm genotipleri ve oranları.

| p.Ala307Thr | T/T | A/T | A/A |
|-------------|-----|-----|-----|
| N           | 28  | 51  | 21  |
| %           | 28  | 51  | 21  |

N: Birey sayısı, %: yüzde, T/T: homozigot; A/T : heterozigot; A/A: wild genotip

Kontrol grubuna dahil edilen 100 bireyin p.Ala307Thr polimorfizmi incelendiğinde %51 oranında bireylerin heterozigot genotipe sahip oldukları saptandı.

#### 4.3.2. p.Ser680Asn polimorfizmi açısından değerlendirme

Kontrol grubu bireylerinin diğer SNP olan p.Ser680Asn (AGT>AAT) açısından değerlendirildiğinde S/S genotipi izlenen 21, N/N homozigot genotipi 26, S/N heterozigot genotipe sahip 53 birey saptandı (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Kontrol grubunda p. Ser680Asn bölgesi polimorfizm genotipleri ve oranları.

| p. Ser680Asn | N/N | S/N | S/S |
|--------------|-----|-----|-----|
| N            | 26  | 53  | 21  |
| %            | 26  | 53  | 21  |

N: Birey sayısı, %: yüzde, N/N: homozigot, S/N: heterozigot, S/S: wild genotip

100 kontrol grubu bireyin p.Ser680Asn polimorfizmleri incelendiğinde N/N tipinde polimorfizm olanların sayısı 26 olarak bulundu.

#### 4.4. Mülleryan Agenezi Grubunun SNP Analizi

Mülleryan Agenezi grubu hastaların genomik DNA örneklerinde FSHR polimorfizmleri (p.Ala307Thr ve p.Ser680Asn) değerlendirildi.

p.Ala307Thr(GCT>ACT) polimorfizmi referans dizi için A/A, homozigot polimorfizm için T/T, heterozigot polimorfizm için A/T şeklinde; diğer SNP olan p.Ser680Asn polimorfizmi referans dizi için S/S, homozigot polimorfizm için N/N, heterozigot polimorfizm için S/N şeklinde değerlendirildi.

##### 4.4.1. Ala307Thr polimorfizmi açısından değerlendirme

Mülleryan agenezi grubunu oluşturan 61 hastanın genomik DNA örneklerinde yapılan genetik analiz sonucunda 12 hastada T/T tipinde homozigot, 36 hastada A/T tipinde heterozigot polimorfizm saptanmıştır. 13 hastanın homozigot referans diziyeye (A/A) sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** Mülleryan agenezi grubunda p.Ala307Thr polimorfizm genotip ve oranları.

| p.Ala307Thr | T/T  | A/T | A/A  |
|-------------|------|-----|------|
| N           | 12   | 36  | 13   |
| %           | 19,7 | 59  | 21,3 |

N: Hasta sayısı, %: yüzde, T/T: homozigot polimorfizm; A/T: heterozigot polimorfizm, A/A: wild genotip

Mülleryan agenezis grubuna dahil edilen 61 hastanın p.Ala307Thr değişimi incelendiğinde, % 59 oranında heterozigot, % 21,3 oranında homozigot referans formda saptandı.

##### 4.4.2. Ser680Asn polimorfizmi açısından değerlendirme

p.Ser680Asn değişimi için yapılan genetik analizde, Mülleryan agenezi grubundaki 12 hastanın N/N şeklinde homozigot, 25 hastanın S/N şeklinde heterozigot polimorfizme sahip olduğu görüldü. Hasta grubunda %39,3 oranında homozigot referans allel izlendi (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Mülleryan agenezi grubunda p.Ser680Asn polimorfizm genotip ve oranları.

| p.Ser680Asn | N/N  | S/N | S/S  |
|-------------|------|-----|------|
| N           | 12   | 25  | 24   |
| %           | 19,7 | 41  | 39,3 |

N: Hasta sayısı, %: yüzde, N/N: homozigot polimorfizm; S/N: heterozigot polimorfizm, S/S:wild genotip

#### 4.5. Gruplar Arası Karşılaştırma

Kontrol ve Mülleryan agenezi grubu bireyler yaş ve SNP genotip verileri bakımından karşılaştırıldı.

Her iki gruba ait bireylerin yaş oranları Çizelge 4.6’da verilmiştir. Kontrol grubu hastaların yaş ortalaması  $29,25 \pm 4,89$  iken, Mülleryan agenezi hasta grubunun yaş ortalaması  $25,67 \pm 5,97$  olarak belirlenmiştir. İki grup arasında yaş açısından istatistiksel fark bulunmamıştır ( $p=0,000$ ) (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** Kontrol ve MA grubu bireylerin yaş dağılımları.

|         | N   | Minimum | Maksimum | Ortalama | SD   |
|---------|-----|---------|----------|----------|------|
| Kontrol | 100 | 23,0    | 38,0     | 29,25    | 4,89 |
| Hasta   | 61  | 15,0    | 39,0     | 25,67    | 5,97 |

N: Birey sayısı, N/N: homozigot polimorfizm, S/N: heterozigot polimorfizm, S/S: normal, SD: standart sapma

##### 4.5.1. Kontrol ve MA grubu bireylerin p. Ala307Thr genotip verilerinin dağılımları

p.Ala307Thr normal allel genotipi, A/T şeklinde heterozigot görülmesi, T/T şeklinde homozigot genotip görülmesi kontrol grubu ve çalışmaya katılan tüm hasta bireyler için incelendiğinde heterozigot polimorfizm kontrol grubunda %51 oranında, hasta grubunda %59 oranında, çalışmaya katılan tüm hasta ve kontrol grubu bireylerinde ise %54 oranında izlenmiştir, homozigot genotip görülme oranı ise kontrol, hasta ve tüm hasta ve kontrol grubu bireyleri için sırasıyla %28, %19,7 ve %24,8 olarak, normal allel görülme durumu da üç grup için sırasıyla %21, %21,3, %21,1 olarak hesaplanmış ve bu üç durumun hasta ve kontrol grubu içerisinde değerlendirilmesinde istatistiksel fark bulunmamıştır ( $p=0,470$ ) (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** Kontrol ve MA grubu bireylerin p.Ala307Thr polimorfizm genotip dağılımları.

| p.Ala307Thr |         | Heterozigot<br>A/T | Normal<br>A/A | Homozigot<br>T/T | Total |        |
|-------------|---------|--------------------|---------------|------------------|-------|--------|
| Grup        | Kontrol | N                  | 51            | 21               | 28    | 100    |
|             |         | %                  | 51,0%         | 21,0%            | 28,0% | 100,0% |
|             | MA      | N                  | 36            | 13               | 12    | 61     |
|             |         | %                  | 59,0%         | 21,3%            | 19,7% | 100,0% |
| Total       |         | N                  | 87            | 34               | 40    | 161    |
|             |         | %                  | 54,0%         | 21,1%            | 24,8% | 100,0% |

MA: Mülleryan agenezi, N: sayı, %: yüzde

#### 4.5.2. Kontrol ve MA grubu bireylerin p.Ser680Asn polimorfizm genotip dağılımları

p.Ser680Asn polimorfizmi S/S şeklinde normal allel genotipi, S/N şeklinde heterozigot, N/N şeklinde homozigot görülmesi durumları hasta, kontrol grubu ve çalışmaya katılan tüm bireyler için incelendiğinde heterozigot polimorfizm kontrol grubunda %53, hasta grubunda %41, çalışmaya dahil edilen tüm bireyler içerisinde %48,4 oranında izlenmiştir. Homozigot polimorfizm görülme durumu ise kontrol, hasta ve çalışmaya dahil edilen tüm bireyler için sırasıyla %26, %19,7 ve % 23,6'dır. Normal allel izlenme durumunun üç grupta izlenme oranları ise sırasıyla %21, %39,3 ve %28'dir. Heterozigot, homozigot ve normal allel genotipleri kontrol ve hasta grubu ile olan ilişkisinin istatistiksel analizinde istatistiksel anlamlı farklılık izlenmiştir ( $p=0.042$ ) (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.8.** Kontrol ve MA grubu bireylerin p.Ser680Asn polimorfizm genotip dağılımları.

| p.Ser680Asn |         |   | Heterozigot<br>S/N | Normal<br>S/S | Homozigot<br>N/N | Total  |
|-------------|---------|---|--------------------|---------------|------------------|--------|
| Grup        | Kontrol | N | 53                 | 21            | 26               | 100    |
|             |         | % | 53,0%              | 21,0%         | 26,0%            | 100,0% |
|             | MA      | N | 25                 | 24            | 12               | 61     |
|             |         | % | 41,0%              | 39,3%         | 19,7%            | 100,0% |
| Total       |         | N | 87                 | 78            | 45               | 38     |
|             |         | % | 54,0%              | 48,4%         | 28,0%            | 23,6%  |

MA: Mülleryan agenezi, N: sayı, %: yüzde

## 5. TARTIŞMA

Mülleryan aplazilerin 1988 yılında sınıflandırılmasından bu yana, halen moleküler genetik düzeyde yapılan çalışmalar yeterli değildir. Bugüne kadar yapılmış olan araştırmalar sonucunda, konjenital uterus ve vajina yokluğunun etiyolojisi tam olarak tanımlanmış değildir. Bu durum hastalığın gelişiminde; değişken ekspresivite, eksik penetrans, dengesiz X inaktivasyonu, genomik baskılanma gibi genetik olayların rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Mülleryan agenezli olgularının çok azında resiprokal translokasyonlar gibi kromozomal abnormalite saptanmışken, birçoğunda karyotip normal (46,XX) olup infertildirler (65). Çalışmamızda bizde literatürle uyumlu olarak tüm olgularımızın sitogenetik analizleri normal olarak saptanmıştır.

Bilindiği gibi, Mülleryan agenezi hastalarının çoğu ovülasyon indüksiyonu, oosit toplanması ve taşıyıcıya yapılacak transfere olanak sağlayan en az bir overe sahip olduğu belirtilmiştir (3). Ancak overyan rezerv testlerinin nerede ise tamamı menstruel siklus bağımlı testler olduğu için ve mülleryan agenezi olgularında menstruel siklus tahmini yapılamadığı için, bu hastaların test sonuçlarını yorumlamak yeteri kadar objektif değildir ve bu konuya ışık tutacak yeni metotlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Mülleryan agenezi olgularında, ovulasyon indüksiyonu normal hormonal düzeylere ve pelvik anatomiye sahip kişilerle benzer şekilde yapılmaktadır (66,67). Ancak Mülleryan agenezi hastalarının over rezervleri ve IVF başarıları ile ilgili veriler yetersizdir. Bu hastalar ile ilgili prematür overyan yetmezlik olgusu, normal karyotipe sahip gonadal agenezi olguları da bildirilmiştir (68,69). Ayrıca yapılan literatür taramalarında bugüne değin Mülleryan agenezi olgularında FSHR polimorfizmlerine yönelik çalışma bulunmamıştır.

Biyolojik etkileşim mekanizmasına bakıldığında, FSH stimulan etkisini overlerdeki granuloza hücrelerinde bulunan folikül stimulan hormon reseptörlerine (FSHR) bağlanarak göstermektedir (70). Mutant FSH reseptörü, hücre yüzeyinde çok az sentezlenmekte, FSH ile bağlanamamakta, bağlansa dahi ikincil uyarı yapamamaktadır (57). Üreme sorunu ile karşı karşıya olan bu hastalar yüksek doz rekombinant FSH ile tedavi edilseler de işlevsel yanıt alınamamaktadır (71).

Konjenital anomalilere, ya da hastalıklara neden olan genom mutasyonlarının yanı sıra, mitokondriyal ya da nuklear genomda yer alan tek nükleotid polimorfizmleri

(SNP) de zaman zaman hastalık etkeni olarak karsımıza çıkmaktadır. İnsan genomunda 3.2 milyar baz çifti bulunmaktadır ve bireyler arasında %99.9'luk benzerlik göstermektedir. %0.1'lik farklılıktan büyük ölçüde SNP'ler sorumludur. Bu SNP'lerde çevreye verdiğimiz yanıtların farklı olmasından sorumludur. Çok sayıda polimorfizmin komplike etkileşimi bireylerin ve hatta toplum alt gruplarının boyutlu olarak yanıtlarını etkilediği açıktır.

Bugüne değin değişik popülasyonlarda FSHR geninin kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan bölgelerinde >1300 SNP belirlenmiştir. Son yıllarda da önemli olabileceği düşünülen bu iki polimorfizm (p.Thr307Ala ve p.Ser680N) üzerine odaklanılmıştır.

Üreme fonksiyonları ile ilişkili olan gonadotropin gen mutasyonları ile ilgili ilk çalışma 1995 yılında yapılmıştır (56). İlk olarak bulunan baskılayıcı mutasyon 'Ala189Val' Finlandiyalı ailelerin taranması sonucu saptanmıştır (56). 2008 yılında ilk defa, nokta mutasyonlarını dışında özellikle kodon 307 ve 680'de görülen FSHR polimorfizmlerinin de FSH yanıtında değişikliklere neden olabildiği belirtilmiştir (72).

Bulunan mutasyonlar önce 2000 yılında, son olarak da 2005 yılında topluca yayımlanmıştır (51,52). FSHR gen mutasyonlarının dokuzu baskılayıcı özellikte iken, iki tanesinin uyarıcı özellikte olduğu saptanmıştır. FSHR gen mutasyonları değişik toplumlarda araştırılmış, izole olgular şeklinde tespit edilmiş, ancak Finlandiya toplumunda yoğun olarak rastlanmıştır (73). Bu durum bilinen FSHR mutasyonlarının coğrafi olarak izole kalmış Fin halkına özgü olabileceği fikrini doğurmuştur (74).

2001 yılında, Takakuna ve ark. Japonya'da yapmış oldukları çalışmalarında, sekonder amenore ile başvuran, erken overyan yetmezliği olan ve polikistik over sendromu tanısı olan toplam 53 kadın hastada baskılayıcı FSH reseptör mutasyonlarını araştırmışlardır. Çalışma ve kontrol grubunda herhangi bir FSHR mutasyonuna rastlanmaması üzerine tüm gen dizisi tek tek doğrudan dizi analizine alınmış ancak yeni bir mutasyon bulunamamıştır (75).

2004 yılında, Sundblad ve ark.'nın Arjantin'de yapmış oldukları benzer bir çalışmada ise, sekonder amenore tanısı olan, FSH düzeyi iki ölçümde yüksek saptanan erken overyan yetmezliği tanısı konulan 20 kadın hastada FSHR mutasyonlarını araştırmışlar, kontrol ve çalışma grubunda hiçbir mutasyona rastlayamamışlardır (76).

Polimorfizm analizlerinde ise, 1999 yılında İngiltere'de Conway ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada polikistik over sendromu, erken overyan yetmezliği, dirençli over sendromu saptanan 147 kadın hastada FSHR gen mutasyonları ve

infertilite ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışma ve kontrol grubunda özellikle over rezervleri ve infertilite açısından bakılan FSHr gen polimorfizmlerinde gruplar arası farklılık izlenmemiştir (77).

2006 yılında Loudradis ve ark. ise Yunanistan'da infertilite nedeniyle kontrollü over stimülasyonu sonrası yetersiz yanıt alınan hastalarda baskılayıcı FSHR gen mutasyonlarını araştırmışlardır. Çalışma ve kontrol grubunda ekzon 6, 7 ve 10'da FSHR gen mutasyonuna rastlanmamıştır (78).

2001 yılında yine Singapur'da Tong ve ark. tarafınca yürütülen bir çalışmada erken overyan yetmezlik ve polikistik over sendromu tanısı alan hastalar çalışma grubuna dahil edilmişlerdir. Bu çalışmada da hiçbir FSHR gen mutasyonu saptanmamıştır (79).

Çalışmamızda ise, mulleryan agenezli ve kontrol olgularda yapılan dizi analizi sonucunda iki SNP dizisinin değişimi analiz edilmiştir. Daha önceki çalışmalarla da oldukça polimorfik olduğu belirlenen bu iki polimorfik dizi ile ilgili sonuçlarımız bu açıdan literatürle uyumludur. 2013 yılında Desai ve arkadaşlarının yayınlamış olduğu derlemede FSH reseptör mutasyon ve polimorfizmlerinin üreme üzerine olan etkisi detayları ile tartışılmıştır. Genotip – fenotip ilişkisinin bilinmesi ve mutantlar üzerinde yapılabilecek *in vitro* fonksiyonel karakterizasyonlar ile dişi infertilitesinin altında yatan genetik nedenlerinin anlaşılabilceğini vurgulanmaktadır (64).

Günümüze değin yapılan polimorfizm analiz çalışmaları, bireye özgü tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi açısından oldukça önem kazanmaktadır. Bireyler arasında genetik varyasyonlar bulunması onların sağlık durumlarını, verilecek tedavinin yönelimini etkilemektedir. Bu farklılıklar, zaman zaman bireylerin tedaviye verdiği cevabı da belirlemekte, diğer bireylerden farklı kılabilmektedir. Dolayısı ile çalışmamız, moleküler epidemiyolojik çalışmalara ek veri sağlamak ve saptanan varyasyonların MA ile ilişkisini değerlendirmek açısından önem kazanmaktadır. Bu özgün olgu grubunda halen nuklear SNP analizlerine yönelik veri mevcut değildir.

Bütün bu çalışmalara bakıldığı zaman, Mülleryan aplazinin moleküler patogenezi halen aydınlatılamamıştır. Bunun nedenleri aday genlerin belirlenmesindeki zorluklar ve olası aday gen bölgelerinin detaylı çalışılmamasıdır. Hastalık ile ilişkili genlerin tanımlanması, hastalıkların patofizyolojisinin aydınlatılması ve hatta normal insan gelişim biyolojisi ile ilgili bilinmeyenlerin açığa çıkması açısından oldukça önemlidir. Ülkemizde gerek genetik açıdan, gerekse klinik açıdan bu değerli nadir görülen

olgular üzerinde hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Araştırma projemiz doğuştan gelişimsel hasarların genetiği üzerine dayalı özgün bir tez olup, bu alanda yapılmış olan ilk çalışmadır.

Bilindiği gibi, kontrollü overyan stimülasyonunda bu iki SNP bölgesi moleküler marker olarak kabul edilmiş ve çeşitli çalışmalar önem kazanmıştır.

2009 yılında, Hindistan'da, Achrekar ve arkadaşları tarafınca yapılan bir çalışmada yardımcı üreme teknikleri programına alınan 50 çalışma grubu hastasında p.Ala307Thr ve p.Ser680Asn polimorfizmleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda AA normal genotipe sahip hastaların overyan stimülasyon sırasında daha az rekombinant FSH dozu kullandıkları ve OHSS için daha fazla risk oluşturdukları saptanmıştır (80).

2011 yılında ise, Sheikha ve arkadaşlarının 108 kontrollü overyan hiperstimülasyon yapılan hastada çalışmış oldukları p.Ser680Asn polimorfizminin, overyan stimülasyona yanıt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (81).

2012 yılında, Mohiyiddeen ve arkadaşları 421 infertilite nedeniyle kontrollü overyan stimülasyon yapılan kadın hasta ile yapmış oldukları çalışmada FSHR genotiplerinin (Ser680Asn, Ala307Thr) bazal FSH, anti-Mülleryan hormon ve antral folikül sayısı ile ilişkisi açısından farklılık göstermediğini göstermişlerdir (82).

Bu çalışmalardan farklı olarak, bizim çalışmamızda normal over rezervine sahip olduğu düşünülen Mülleryan agenezi olgularının FSHR genotipleri değerlendirilmiştir. p.Ala307Thr polimorfizmi çalışma ve kontrol grubu karşılaştırmasında homozigot, heterozigot polimorfizm ve normal genotip durumları değerlendirildiğinde istatistiksel farklılık saptanmamıştır ( $p=0,470$ ). Değerlendirme herhangi bir polimorfizm varlığı (heterozigot veya homozigot) durumu ve normal allele sahip olma durumu için yapıldığında da çalışma ve kontrol grubu sonuçlarında istatistiksel farklılık bulunmamıştır ( $p=0,963$ ).

p.Ser680Asn polimorfizm kontrol grubu karşılaştırmamızda ise homozigot, heterozigot polimorfizm varlığı ve normal allel izlenme durumları istatistiksel olarak incelenmiş ve değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,042$ ). Ancak bu farklılığın polimorfizmlerin kontrol grubunda daha fazla saptanması kaynaklı olduğu düşünülerek, çalışma ve kontrol gruplarında heterozigot polimorfizm-normal allel durumu, homozigot polimorfizm-normal allel durumu ve heterozigot polimorfizm-homozigot polimorfizm durumları, ikili durum karşılaştırması olarak istatistiksel değerlendirilmeye alınmıştır. Normal allel izlenme durumunun hem heterozigot, hem

homozigot polimorfizm durumları ile ayrı ayrı ikili değerlendirilmesinde kontrol grubunda polimorfizm izlenen hasta sayısının daha fazla olması nedeni olduğu düşünülen istatistiksel fark izlenmiştir (sırasıyla p değeri 0.02 ve 0.046).

Yapılan çalışmaların çoğunluğunda infertilite ve over rezervi kötü olan hastalar çalışmaya müdahil edilseler de, FSHr mutasyonları saptanamamıştır. Mülleryan agenezi olgularının over rezervlerinin normal olduğu düşünülse de, bu vakaların over rezervlerine yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın sonucunda Mülleryan agenezi olgularında FSHr genotiplerinin değerlendirilmesinin over rezervleri hakkında yeterli fikir veremeyeceği sonucuna ulaşılmış, daha fazla olguda tarama yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## 6. SONUÇLAR

Mülleryan agenezi olgularını over fonksiyonları, normal dişi genital anotomiye sahip kadınlarınkine benzer olduğu düşünülse de; bu görüşü destekleyen yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Karşılaştırılan çalışmalardaki hasta profili Mülleryan agenezi olgularından daha önce benzer çalışma yapılmaması nedeniyle farklı olsa da; FSHR polimorfizlerine kötü over rezervli hastalarda olduğu gibi Mülleryan agenezi hastalarında da istatistiksel fark yaratacak düzeyde rastlanmamıştır. p.Ser680Asn polimorfizmi bizim çalışmamızda istatistiksel fark yaratacak düzeyde kontrol grubunda daha fazla izlenmiştir. İlerleyen yıllarda bulunacak yeni FSHR mutasyonları kötü overyan rezerv, erken overyan yetmezlik gibi durumların aydınlatılmasında; over fonksiyonlarının değerlendirilmesinde yardımcı olabilir.

Anatomik nedenli infertilite sorunu olan Mülleryan agenezi hastalarının FSHR genotiplerinin IVF başarısı hakkında fikir vermesi açısından değerlendirilmesinin eldeki veriler doğrultusunda gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır.

## 7. ÖZET

### **Mülleryan Agenezi Olgularında Folikül Stimule Edici Hormon Reseptör (FSHR) Genotiplerinin Klinik Verilerle İlişkisinin Değerlendirilmesi**

**Amaç:** Anatomik durumları gereği, Mülleryan agenezi olguları önemli röprodüktif sorunlar ile karşı karşıyadırlar. Bu hastaların çoğunun ovulasyon indüksiyonu, oosit toplanması ve taşıyıcı anneye transfere olanak sağlayacak en az bir normal overe sahip olduğu düşünülmektedir. Ancak Mülleryan agenezi hastalarının taşıyıcı annelik veya uterus transplantasyonu sonucu kendileriyle benzer genetik özellikte çocuk sahibi olmalarına olanak sağlayan yardımcı üreme teknikleri, ovulasyon indüksiyonu, over rezervleri ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada 2009-2011 yıllarında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran Mülleryan Agenezi tanılı olgularda, over rezervlerine yönelik FSHR genotiplerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamız, 2009-2011 yıllarında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran hastalarda yapılmıştır. Çalışmaya katılan tüm hastalara çalışma hakkında bilgi verildi ve onam formları imzalatıldı. Etik Kurul onayı alındı.

Kontrol grubuna seçilen hastalarda çalışmaya katılma kriteri olarak spontan gebe kalan 23-39 yaş aralığındaki hastalar seçildi. Mülleryan agenezi hasta grubunda ise kliniğimizde Mülleryan agenezi tanısı alan ya da dış merkezden bu tanı ile hastanemize refere edilen 15-39 yaş arasındaki kadınlar seçilmiştir.

Olguların genomik DNA'ları, p.Ala307Thr ve p.Ser680Asn genotiplerini değerlendirmek amacı ile periferik kandan modifiye non-enzimatik metod ile izole edildi. PZR reaksiyonu, Bio-Rad (MyCycler) ve PCR System 9700 (Gene Amp<sup>R</sup>) marka PZR cihazlarında gerçekleştirildi. Denatüre edilen PZR ürünleri ABI 3130 dizileme cihazına yüklenerek sonuçlar ABI sequence analysis v3.1 yazılım programında değerlendirildi.

Veriler SPSS (version 20.0) (SPSS, Inc., Chicago, USA) kullanılarak analiz edildi. Örnekleri tanımlamak için frekans dağılımı, ortalama, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. p.Ala307 ve p.Ser680 değişimleri için ayrı ayrı genotipleme ve gruplara göre yaşlarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis analizi

kullanıldı. Analizlerde farklılıkların belirlenmesi için %95 anlamlılık düzeyi (ya da  $\alpha=0.05$  hata payı) kullanıldı.

**Bulgular:** Kontrol grubu ve Mülleryan agenezi grubu hastalar moleküler genetik analiz ve yaşları bakımından karşılaştırıldılar. Kontrol grubu hastaların yaş ortalaması  $29\pm4,8$ , Mülleryan agenezi hasta grubunun yaş ortalaması  $25,6\pm5,9$ 'dur. İki grup arasında yaş açısından istatistiksel fark bulunmamıştır ( $p=0,000$ ).

p.Ala307Thr normal allel genotipi, A/T şeklinde heterozigot görülmesi, T/T şeklinde homozigot genotip görülmesi kontrol grubu ve çalışmaya katılan tüm hasta bireyler için incelendiğinde, bu üç durumun hasta ve kontrol grubu içerisinde değerlendirilmesinde istatistiksel fark bulunmamıştır ( $p=0,470$ ).

p.Ser680Asn polimorfizm kontrol grubu karşılaştırmamızda ise homozigot, heterozigot polimorfizm varlığı ve normal allel izlenme durumları istatistiksel olarak incelenmiş ve değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,042$ ). Ancak bu farklılığın polimorfizmlerin kontrol grubunda daha fazla saptanması kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

**Sonuç:** Mülleryan agenezi olgularının over rezervlerinin normal olduğu düşünülse de bu vakaların over rezervlerine yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Mülleryan agenezi olgularında FSHR genotiplerinin değerlendirilmesinin over rezervleri hakkında yeterli fikir vermediği, bu vakaların over rezervlerinin değerlendirilmesinde farklı yöntemlere ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Mülleryan Agenezi, FSHR Genotipleri, Overyan Rezerv.

## 8. ABSTRACT

### **Evaluating the Association Between Clinical Spectrum and Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR) Genotypes in Mullerian Agenesis Cases**

**Background:** Due to their genital system anatomy, patients with Mullerian Agenesis face with considerable reproductive problems. Most of these patients have at least one ovary that enable ovulation induction, oocyte collection and transfer of the embryo to a gestational surrogate. More data are still needed on assisted reproduction techniques, ovulation induction and ovarian reserves which guide these patients to bear child having their genetic traits via surrogation or uterin transplantation. In this study, we aim to determine the association between FSHR genotypes and ovarian reserve in patients with Mullerian Agenesis.

**Material and Methods:** Our study was designed with patients who admitted to Akdeniz University Hospital between 2009 and 2011. All patients have been informed about the details of the study and have signed the consent forms. Institutional Ethical Approval was obtained for the study.

Patients at 23-39 years of age with the history of spontaneous conception were included as the control group. Case group constituted of 15-39 year-old patients with Mullerian agenesis who has been diagnosed either in our hospital or in another facility.

Genomic DNA of patients was extracted from peripheral blood via non-enzymatic method to identify p.Ala307Thr and p.Ser680Asn genotype statuses. PCR reactions have been set up in Bio-Rad (MyCycler) and PCR System 9700 (Gene Amp<sup>R</sup>) PCR devices. Denaturated PCR products were loaded into ABI 3130 sequence analyzer and analyzed via ABI Sequence Analysis v3.1 software.

Data were analyzed using SPSS version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA). Descriptive statistics such as frequency distribution, mean and standart deviation were used to define samples. Kruskal-Wallis analysis were used to compare ages between genotypes and groups for p.Ala307 and p.Ser680 changes. 95% confidence interval (or  $\alpha=0.05$ ) were used to determine differences.

**Results:** Case and control groups were compared in terms of molecular genetic analyses and age group. Mean ages of case and control groups were  $25,6\pm 5,9$  and

29±4,8, respectively. No statistically significant difference for mean ages was found between two groups (p=0,000).

No statistical difference was found between case and control groups for distributions of p.Ala307Thr wild type, A/T heterozygote and T/T homozygote genotypes (p=0,470).

Comparision of p.Ser680Asn polymorphism genotypes revealed statistically significant difference between groups (p=0,042). However, this difference was attributed to preponderance of polymorphisms in control group.

**Conclusion:** Although the conclusion was made that ovarian reserves of Mullerian Agenesis cases were normal, more studies that focused ovarian reserves of those cases are still needed. We concluded that identifying FSHR genotypes in Mullerian agenesis cases couldn't give reliable information regarding ovarian reserves of these patients and alternative methods are required to assess these patients' ovarian reserves.

**Key words:** Mullerian Agenesis, FSHR Genotypes, Ovarian Reserve.

## 9. KAYNAKLAR

1. Committee opinion: no. 562. Mülleryan agenesis: diagnosis, management, and treatment. *Obstet Gynecol* 2013; 121(5).
2. Bean EJ, Mazur T, Robinson AD. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: sexuality, psychological effects, and quality of life. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2009; 22(6): 339-46.
3. Reichman DE, Laufer MR. Congenital uterine anomalies affecting reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010; 24(2): 193-208.
4. Erman Akar M, Ozkan O, Aydinuraz B, Dirican K, Cincik M, Mendilcioglu I, et al. Clinical pregnancy after uterus transplantation. *Fertility and Sterility* 2013; 100(5): 1358-63.
5. Mülleryan Kanal Anomalilerine Yönelik Cerrahi. In: Rock JA, Jones III HW, editörler. *Te Linde Operatif Jinekoloji* 10. baskı 2013; 546-84.
6. Sadler TW. *Langman's medical embryology*. 12th ed. Baltimore: Williams&Wilkins 2012; 243-59.
7. Akar M, Bayar D, Yildiz S. Reproductive outcome of women with unicornuate uterus. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005; 45(2): 148-50.
8. Motta PM, Nottola SA, Makabe S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 75(1): 5-10.
9. Maclaughlin DT, Donahoe PK. Sex determination and differentiation. *N Engl J Med* 2004; 350(4): 367-78.
10. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 2004; 5(7): 509-21.
11. Marshall FF, Beisel DS. The association of uterine and renal anomalies. *Obstet Gynecol* 1978; 51(5): 559-62.
12. Northcutt RC, Underwood PB. Congenital absence of the vagina: embryology, diagnosis and management: report of five cases. *Med Ann Dist Columbia* 1966; 35(6): 316-9.
13. Taylor HS. The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. *Semin Reprod Endocrinol* 2000; 18(1): 81-9.
14. Du H, Taylor HS. Molecular regulation of Mullerian development by Hox genes. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034: 152-65.
15. Falcone T. *Falcone: Clinical Reproductive Medicine and Surgery*, 1st ed: Mosby Elsevier 2007.

16. Cramer DW, Ravnikar VA, Craighill M, Ng WG, Goldstein DP, Reilly R. Mullerian aplasia associated with maternal deficiency of galactose-1-phosphate uridyl transferase. *Fertil Steril* 1987; 47(6): 930-4.
17. Aughton DJ. Mullerian duct abnormalities and galactosaemia heterozygosity: report of a family. *Clin Dysmorphol* 1993; 2(1): 55-61.
18. Willemssen WN. Combination of the Mayer-Rokitansky-Küster and Klippel-Feil syndrome -a case report and literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1982; 13(4): 229-35.
19. Lindenman E, Shepard MK, Pescovitz OH. Mülleryan agenesis: an update. *Obstet Gynecol* 1997; 90(2): 307-12.
20. Li S, Qayyum A, Coakley FV, Hricak H. Association of renal agenesis and Mullerian duct anomalies. *J Comput Assist Tomogr* 2000; 24(6): 829-34.
21. Acién P, Ruiz JA, Hernandez JF, Susarte F, Martin del Moral A. Renal agenesis in association with malformation of the female genital tract. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165(5 Pt 1): 1368-70.
22. Pittock ST, Babovic-Vuksanovic D, Lteif A. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser anomaly and its associated malformations. *Am J Med Genet A* 2005; 135(3): 314-6.
23. Kim HH, Laufer MR. Developmental abnormalities of the female reproductive tract. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1994; 6(6): 518-25.
24. Fisher K, Esham RH, Thorneycroft I. Scoliosis associated with typical Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *South Med J* 2000; 93(2): 243-6.
25. Lalwani S, Wu HH, Reindollar RH, Gray MR. HOXA10 mutations in congenital absence of uterus and vagina. *Fertil Steril* 2008; 89(2): 325-30.
26. Reindollar RH, Byrd JR, McDonough PG. Delayed sexual development: a study of 252 patients. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 140(4): 371-80.
27. Evans TN, Poland ML, Boving RL. Vaginal malformations. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141(8): 910-20.
28. Freundt I, Toolenaar TA, Huikeshoven FJ, Jeekel H, Drogendijk AC. Long-term psychosexual and psychosocial performance of patients with a sigmoid neovagina. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169(5): 1210-4.
29. Oppelt P, Renner SP, Kellermann A, Brucker S, Hauser GA, Ludwig KS, et al. Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging. *Hum Reprod* 2006; 21(3): 792-7. Epub 2005 Nov 10.
30. Petrozza JC, Gray MR, Davis AJ, Reindollar RH. Congenital absence of the uterus and vagina is not commonly transmitted as a dominant genetic trait: outcomes of surrogate pregnancies. *Fertil Steril* 1997; 67(2): 387-9.

31. Carson SA, Simpson JL, Malinak LR, Elias S, Gerbie AB, Buttram VC Jr, Sarto GE. Heritable aspects of uterine anomalies. II. Genetic analysis of Mülleryan aplasia. *Fertil Steril* 1983; 40(1): 86-90.
32. Roberts CP, Haber MJ, Rock JA. Vaginal creation for Mülleryan agenesis. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185(6): 1349-52; discussion 1352-3.
33. Edmonds DK, Rose GL, Lipton MG, Quek J. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a review of 245 consecutive cases managed by a multidisciplinary approach with vaginal dilators. *Fertil Steril* 2012; 97(3): 686-90. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.12.038. Epub 2012 Jan 21.
34. Folch M, Pigem I, Konje JC. Mülleryan agenesis: etiology, diagnosis, and management. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55(10): 644-9.
35. Brucker SY, Gegusch M, Zubke W, Rall K, Gauwerky JF, Wallwiener D. Neovagina creation in vaginal agenesis: development of a new laparoscopic Vecchietti-based procedure and optimized instruments in a prospective comparative interventional study in 101 patients. *Fertil Steril* 2008; 90(5): 1940-52. Epub 2007 Dec 3.
36. Yalcinkaya TM, Sittadjody S, Opara EC. Scientific principles of regenerative medicine and their application in the female reproductive system. *Maturitas* 2014; 77.1: 12-9.
37. Yen&Jaffe's Reproductive Endocrinology 7th ed: Saunders, An Imprint of Elsevier; 2013; 2: 35-55.
38. Boime I, Ben-Menahem D. Glycoprotein hormone structure-function and analog design. *Recent Prog Horm Res* 1999; 54: 271-88; discussion 288-9.
39. Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 1990; 11(1): 177-99.
40. Jamnongjit M, Hammes SR. Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle* 2006; 5(11): 1178-83. Epub 2006 Jun 1.
41. Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. Novak's Gynecology, 12th ed. Baltimore: Williams & Wilkins 1996.
42. La Marca A, Sighinolfi G, Argento C, Grisendi V, Casarini L, Volpe A, Simoni M. Polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes as markers of ovarian reserve and response in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2013; 99(4):970-8.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.086. Epub 2013 Feb 4.
43. Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, Wigglesworth K. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod* 1997; 12(11 Suppl): 127-32.
44. Andersen CY. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(5): 1227-34.

45. Vassart G, Pardo L, Costagliola S. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(3): 119-26.
46. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 2002; 23(2): 141-74.
47. Sanders J, Chirgadze DY, Sanders P, Baker S, Sullivan A, Bhardwaja A, et al. Crystal structure of the TSH receptor in complex with a thyroid-stimulating autoantibody. *Thyroid* 2007; 17(5): 395-410.
48. Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Ibuki Y, Igarashi M, Minegishi T [corrected to Minegishi T]. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175(3): 1125-30.
49. Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, Igarashi M, Minegishi T [corrected to Minegishi T]. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172(3): 1049-54.
50. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54(1-2): 77-9.
51. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 2000; 21(5): 551-83.
52. Huhtaniemi IT, Themmen AP. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine* 2005; 26(3): 207-17.
53. Tsigos C, Latronico C, Chrousos GP. Luteinizing hormone resistance syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 816: 263-73.
54. Toledo SP, Brunner HG, Kraaij R, Post M, Dahia PL, Hayashida CY, et al. An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(11): 3850-4.
55. 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(4): 949-58.
56. Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; 82(6): 959-68.
57. Rannikko A, Pakarinen P, Manna PR, Beau I, Misrahi M, Aittomäki K, Huhtaniemi I. Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(4): 311-7.
58. Meduri G, Touraine P, Beau I, Lahuna O, Desroches A, Vacher-Lavenu MC, et al. Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human

- follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(8): 3491-8.
59. Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, et al. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 1998; 102(7): 1352-9.
  60. Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, et al. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol* 1999; 13(11): 1844-54.
  61. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, Aittomäki KA. Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3): 1151-5.
  62. Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, Lopez FJ. Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol* 1997; 11(5): 517-26.
  63. Davis D, Liu X, Segaloff DL. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol Endocrinol* 1995; 9(2): 159-70.
  64. Desai SS, Roy SB, Mahale SD. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction. *Reproduction* 2013; 146(6): R235-48.
  65. Klipstein S, Bhagavath B, Topipat C, Sasur L, Reindollar RH, Gray MR. The N314D polymorphism of the GALT gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 171-4.
  66. Wood EG, Batzer FR, Corson SL. Ovarian response to gonadotrophins, optimal method for oocyte retrieval and pregnancy outcome in patients with vaginal agenesis. *Hum Reprod* 1999; 14(5): 1178-81.
  67. Ben-Rafael Z, Bar-Hava I, Levy T, Orvieto R. Simplifying ovulation induction for surrogacy in women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Hum Reprod* 1998; 13(6): 1470-1.
  68. Gorgojo JJ, Almodóvar F, López E, Donnay S. Gonadal agenesis 46,XX associated with the atypical form of Rokitansky syndrome. *Fertil Steril* 2002; 77(1): 185-7.
  69. Plevraki E, Kita M, Goulis DG, Hatzisevastou-Loukidou H, Lambropoulos AF, Avramides A. Bilateral ovarian agenesis and the presence of the testis-specific protein 1-Y-linked gene: two new features of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81(3): 689-92.
  70. Yao Y, Ma CH, Tang HL, Hu YF. Influence of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn polymorphism on ovarian function and in-vitro fertilization outcome:

- a meta-analysis. *Mol Genet Metab* 2011; 103(4): 388-93. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.04.005. Epub 2011 Apr 17.
71. Vaskivuo TE, Aittomäki K, Anttonen M, Ruokonen A, Herva R, Osawa Y, et al. Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotropin in individuals with an inactivating mutation of the FSH receptor. *Fertil Steril* 2002; 78(1): 108-13.
  72. Lussiana C, Guani B, Mari C, Restagno G, Massobrio M, Revelli A. Mutations and polymorphisms of the FSH receptor (FSHR) gene: clinical implications in female fecundity and molecular biology of FSHR protein and gene. *Obstet Gynecol Surv* 2008; 63(12): 785-95. doi: 10.1097/OGX.0b013e31818957eb.
  73. Layman LC, Amde S, Cohen DP, Jin M, Xie J. The Finnish follicle-stimulating hormone receptor gene mutation is rare in North American women with 46,XX ovarian failure. *Fertil Steril* 1998; 69(2): 300-2.
  74. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 1997; 18(6): 739-73.
  75. Takakura K, Takebayashi K, Wang HQ, Kimura F, Kasahara K, Noda Y. Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are rare in Japanese women with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 75(1): 207-9.
  76. Sundblad V, Chiauuzzi VA, Escobar ME, Dain L, Charreau EH. Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol* 2004; 222(1-2): 53-9.
  77. Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M. 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 (Oxf)* 1999; 51(1): 97-9.
  78. Loutradis D, Patsoula E, Stefanidis K, Drakakis P, Antonakis G, Bletsas R, et al. Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are not evident in Greek women with premature ovarian failure and poor responders. *Gynecol Obstet Invest* 2006; 61(1): 56-60. Epub 2005 Sep 30.
  79. Tong Y, Liao WX, Roy AC, Ng SC. Absence of mutations in the coding regions of follicle-stimulating hormone receptor gene in Singapore Chinese women with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Horm Metab Res* 2001; 33(4): 221-6.
  80. Achrekar SK, Modi DN, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale SD. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (Thr307Ala) is associated with variable ovarian response and ovarian hyperstimulation syndrome in Indian women. *Fertil Steril* 2009; 91(2): 432-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.093. Epub 2008 Mar 5.

81. Sheikhha MK, Eftekhar M, Kalantar SM. Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation. *J of Human Reprod Sci* 2011; 4(2): 86.
82. Mohiyiddeen L, Newman WG, McBurney H, Mulugeta B, Roberts SA, Nardo LG. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve markers. *Fertil Steril* 2012; 97(3): 677-81. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.12.040. Epub 2012 Jan 21.