T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

POLİKİSTİK OVER SENDROMLU HASTALARDA *AHSG* (ALPHA-2 HEREMANS SCHMID GLYCOPROTEİN) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esma KAPLANER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Halit AKBAŞ

ŞANLIURFA

2020

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

POLİKİSTİK OVER SENDROMLU HASTALARDA *AHSG* (ALPHA-2 HEREMANS SCHMID GLYCOPROTEİN) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esma KAPLANER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Halit AKBAŞ

Bu tez Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 19104 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2020

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca tez danışmanlığımı üstlenip tez konumun belirlenmesinde ve bu süreçte ilgisini ve güler yüzünü eksik etmeyen, zamanını ve bilgilerini benden esirgemeden çalışmamla yakından ilgilenerek, eleştirileri ile yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Halit AKBAŞ`a sonsuz teşekkürler dilerim.

Yüksek lisansım boyunca her daim beni destekleyen ve bilimsel olarak aydınlatan Anabilim başkanımız Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ'e ve yine desteğinden ötürü Doç. Dr. Feridun AKKAFA'ya,

Kontrol ve hasta gruplarının temininde emekleri geçen Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı hocalarından Doç. Dr. Adnan İNCEBIYIK ve Arş. Gör. Dr. Ömer TAMMO'ya,

Canım dostlarım Zeynep HAYIRLI, Hamza KAPAN ve Esma ALTUN'a,

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerime ve bana ikinci anne baba, dost olan ve sevgisini hiçbir zaman eksik etmeyen ablam Birgül AKATAY ve eniştem Şinasi AKATAY'a

Sonsuz teşekkür ederim.

Esma KAPLANER

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY……iii
TEŞEKKÜR……iv
İÇİNDEKİLER……v
ŞEKİLLER DİZİNİ……vii
TABLOLAR DİZİNİ……viii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ……ix
ÖZET……x
ABSTRACT……xi

1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Polikistik Over Sendromu Tanımı ve Tarihçesi 2
2.1.1. PKOS Prevelansı 3
2.1.2. Polikistik Over Sendromu Tanı Kriterleri ve Belirtileri 4
2.1.3. Etiyopatogenezi 5
2.1.4. PKOS Komplikasyonları 6
2.2. Diyabetes Mellitus (DM) 8
2.3. PKOS genetiği 8
2.4. FETUİN-A (*AHSG*) 11
2.5. *AHSG* Geni 12
3. GEREÇ VE YÖNTEM 13
3.1. Hasta-Kontrol Grubunun Oluşturulması ve Periferik Kan Örneklerinin Toplanması 13
3.2. Laboratuvarda Kullanılan Araç-Gereç ve Kimyasalları 13
3.2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler 13
3.2.2. Kullanılan Kimyasallar 14
3.3. DNA İzolasyonu 14
3.3.1. İnvitrogen Pure Link Genomik DNA Mini Kit K1820-02 yöntemi ile DNA izolasyonu Protokolü 14
3.4. DNA Örneklerindeki Polimorfizmlerin Real-Time PCR İle Analizi 15
3.4.1. *AHSG* Geninde Çalışılan SNP'lerin Özellikleri 17
3.5. Genotip analizi 18
3.6. İstatistiksel Analiz 19

4. BULGULAR 20
4.1. *AHSG* Geninin Genotip Dağılımı ile Allel Frekansının Değerlendirilmesi 20
4.1.1. *AHSG* geni 770C>G (rs4918) polimorfizminin genotip dağılımı ile allel frekansları 21
4.1.2. *AHSG* geni -469T>G (rs2077119) polimorfizminin genotip dağılım ve allel frekansları 23
5. TARTIŞMA 24
6. SONUÇ 26
7. KAYNAKLAR 27

8.EKLER……38
EK-1: ETİK KURUL KARAR
EK-2: TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU ve BEYAN BELGESİ
EK-3: TURNİTİN RAPORU
EK-4: TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fetuin-A proteinini sentezleyen *AHSG* geninin kromozom 3 üzerindeki konumu

Şekil 3.2. Temel PCR basamakları denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama

Şekil 3.3. Wild alleli belirleyici VIC (Yellow) probuyla işaretli, pozitif-negatif pik örnekleri

Şekil 3.4. Polimorfik alleli belirleyici FAM (Green) probuyla işaretli, pozitif-negatif pik örnekleri

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. NIH ve Rotterdam'a göre PKOS tanı kriterleri

Tablo 2.2. PKOS'la ilişkili bazı aday genler

Tablo 3.3. *AHSG* geninde bulunan SNP'lerin Real-Time PCR protokolü

Tablo 3.4. *AHSG* genine ait 770C>G polimorfizmi

Tablo 4.5. *AHSG* genine ait -469T>G polimorfizmi

Tablo 4.6. PKOS ve kontrol gruplarının demografik ve laboratuvar sonuçları

Tablo 4.7. *AHSG* geni 770C>G polimorfizminin kontrol grubu ve PKOS'lu hasta grubundaki genotip dağılımı

Tablo 4.8. *AHSG* geni 770C>G polimorfizminin kontrol grubu ve PKOS'lu hasta grubundaki allel frekansları

Tablo 4.9. *AHSG* geni -469T>G polimorfizminin kontrol grubu ve PKOS'lu hasta grubundaki genotip dağılımı

Tablo 4.10. *AHSG* geni -469T>G polimorfizminin kontrol grubu ve PKOS'lu hasta grubundaki allel frekansları

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABD **:** Amerika Birleşik Devletleri

AES **:** Androgen Excess Society

AHSG **:** Alfa 2-Heremans-Schmid Glikoprotein

AR **:** Androjen Reseptör

CRP **:** C Reaktif Protein

DHEA **:** Dehidroepiandrosteron

DHEA-S **:** Dehidroepiandrosteron Sülfat

DM **:** Diabetes Mellitus

FSH **:** Folikül Uyarıcı Hormon

GnRH **:** Gonadotropin Hormonu

HÜTF **:** Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi

LH **:** Luteinizan Hormonu

NICHHD **:** National Institute of Child Health and Human Dexelopment

NIH **:** National Institutes of Health

PKOS **:** Polikistik Over Sendromu

SHBG **:** Cinsiyet Bağlayıcı Globulin

SNP **:** Single nucleotid polymorphism

TGF-beta **:** Transforming Growht Factor-beta

TK **:** Tirozin Kinaz

TNF-alfa **:** Tumor Necrosis Factor-alpha

USG **:** Ultrason

ÖZET

POLİKİSTİK OVER SENDROMLU HASTALARDA *AHSG* (ALPHA-2 HEREMANS SCHMİD GLYCOPROTEİN) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esma KAPLANER

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Amaç: Bu çalışmada fetuin-A (Alpha-2-Heremans Schmid Glycoprotein, *AHSG*) genindeki rs2077119 ve rs4918 polimorfizmlerinin Polikistik Over Sendromu (PKOS) ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu araştırmaya Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniklerine müracaat eden ve polikistik over sendromu tanısı konulan 122 PKOS'lu hasta ile benzer yaş aralığındaki 124 normal kadın kontrol grubu dahil edilmiştir. Her bir 1'er ml kan örneği alınarak EDTA'lı tüplere kondu. Hasta ve kontrol gruplarına ait olan kan örneklerinden spin kolon metoduyla DNA izolasyonu yapılarak, her birinin *AHSG* genine ait olan 770C>G ve -469T>G polimorfizmleri Real-Time PCR metoduyla moleküler analizi yapıldı. Örneklerdeki söz konusu polimorfizmler Real-Time PCR yöntemi sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrileriyle genotiplendirildi.

Bulgular: Çalışmamız sonucunda fetuin-A geni 770C>G polimorfizmi açısından polimorfik homozigot GG genotipi 124 kişilik hasta grubunun 5'inde görülürken 122 kişilik kontrol grubunda ise 10 kişide görüldü. Kontrol ve hasta gruplarının homozigot GG ve homozigot CC genotipleri arasında bulunan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Fetuin-A geni -469T>G polimorfizim açısından polimorfik homozigot TT genotipi 122 kişilik hasta grubunda 35 bireyde görülürken, 124 kişilik kontrol grubunda ise 26 bireyde görülmüştür. Kontrol ve hasta gruplarının homozigot TT ve homozigot GG genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Sonuç: Çalışma sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, hem *AHSG* genindeki 770C>G (rs4918) ve -469T>G (rs2077119) polimorfizmlerinin PKOS'la ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gen, Polimorfizim, Fetuin-A, *AHSG*, PKOS

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *AHSG* (ALPHA-2 HEREMANS SCHMID GLYCOPROTEIN) GEN POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH POLICISTIC OVER SYNDROME

Esma KAPLANER

Medical Biology Department, Master's Thesis

Objective: In this study, it was aimed to determine rs2077119 and rs4918 polymorphisms in fetuin-A (Alpha-2-Heremans Schmid Glycoprotein. *AHSG*) Gene and to investigate its relationship with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS).

Method: This study included 122 PCOS Patients who Applied to the Outpatient Clinics of Harran University Faculty of Medicine, Ostetrics and Gynecology Depertmant and diagnosed with Polycystic Ovarian Syndrome and 124 normal woman as the control group with similar age range. 1 ml of blood samples were taken from each individual and placed in tubes which contain EDTA. In the next step, DNA isolation for patient and control group was performed by using spin column method from the blood samples. Then molecular analysis of 770C>G and -469T>G polymorphisms of *AHSG* Gene was performed via using the Real-Time PCR method. These polymorphisms in the samples were genotyped according to the amplification curves obtained from Real-Time PCR results.

Results: As a results of our study, the homozygous GG Genotype, which is polymorphic in terms of 770C>G polymorphism, of fetuin-A gene, was seen in 5 of 124 patients and 10 individuals of 122 the control group. The difference between homozygous GG and homozygous CC genotypes of the control and patient groups were not statistically significant ($p>0.05$). In terms of Fetuin-A gene -469T>G polymorphism, homozygous TT Genotype was polymorphic in 35 individuals of 122 patients, while it was seen in 26 individuals of 124 patients. Statistically no significant difference was found between homozygous TT and homozygous GG genotypes of the control and patient groups ($p>0.05$).

Conclusions: According to the data obtained as a result of the study, it was conclued that 770C>G (rs4918) and -469T>G (rs2077119) polymorphism in *AHSG* gene were not related to PCOS.

Keywords: Gene, Polymorphism, Fetuin-A, *AHSG*, PCOS

1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS); anovulasyon, hiperandrojenizm, oligo-anovülasyon ve polikistik overla karakterize bir bozukluk olup kadınların %5-10'unu etkileyen endokrinolojik bir hastalıktır (1).

PKOS'un etiyopatogenezi multifaktöriyel olup uzun süre devam ettiğinde sağlık üzerine birçok olumsuz etkileri olmaktadır. PKOS'ta sık rastlanan insülin direnci, hiperinsülinemi, pankreas beta hücre işlevlerinde bozulma ve tip II diyabet riskindeki yükseliş, hiperlipidemi, obezlik durumu gibi metabolik bozukluklara sebep olmaktadır. Bu bozukluklar kalp-damar hastalıklarına temel oluşturmakta ve endometrium kanseri riskini arttırmaktadır (2).

PKOS'lu çoğu kadında insülin seviyesi yükselir. Normal durumda yemekten sonra, pankreas kana insülin salgılar ve böylece glikoz hücre içine alınır, enerjiye dönüştürülür veya depolanır. Hücrelerin insüline karşı duyarsızlaşmasına insülin rezistansı (IR) denir. Hücreler insüline karşı duyarsızlaştıkça, pankreas tarafından insülin salınımı artar. Yükselen insülin düzeyi, overlerin androjen hormonunu fazla üretmesine yol açar. Hiperandrojenizm olarak adlandırılan bu durum, overlerin yumurta üretimini inhibe eder ve bunu sonucunda PKOS'un en karakteristik özelliklerinden biri olan adet düzensizliğine neden olur. Yüksek androjen miktarı akne, erkek tipi kellik ve kıllanmaya da neden olur (3). Yüksek insülin seviyesinin, yüksek androjen düzeyi ile birlikte oluşturduğu bu tablo PKOS'lu kadınlarda kardiyolojik hastalıkların ve diyabetin görülme riskini arttırır (4).

PKOS, birçok farklı genin minör katkıları ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile birlikte gelişen multifaktöriyel kalıtımlı bir hastalıktır. PKOS ile ilgili bugüne kadar çalışılmış olan aday genler genellikle PKOS bulgularından sorumlu olabilecek molekülleri sentezleten genlerden seçilmiştir. Bunlar karbonhidrat metabolizması, enerji homeostazisi, insülin metabolizması, steroid hormon sentezi, gonadotropin faaliyeti ve düzenlenmesinde yer alan genlerdir (5).

PKOS'lu hastalarda insülin düzeylerinin yüksek görülmesi, insülin direnci ile ilişkili moleküllerin ve bu molekülleri sentezleten genlerin araştırılmasını akla getirmektedir. İnsülin direnci ile ilişkili moleküllerden biri de Fetuin-A (alfa2-Heremans-Schmid glikoproteinin, *AHSG*) olup, 55-59 kilo dalton (kDa) ağırlığında olan bir glikoproteindir ve yetişkin bireylerde karaciğerdeki hepatositlerden sentezlenerek dolaşıma salınır (6).

Yapılan çalışmalarda, fetuin-A`nın insülin reseptör tirozin kinaza bağlanıp sinyal yolağını zayıflatarak insülin direncine yol açtığı görülmüştür (7). Nitekim fetuin A'nın insülin direnci ile ilişkisinden dolayı PKOS'lu hastalardaki seviyesinin arttığı bildirilmiştir (8-10).

Fetuin-A molekülünü sentezleyen *AHSG* geni, kromozom 3q27.3'te bölgesinde bulunan 8.40 kb uzunluğunda 6 intron ve 7 ekzondan meydana gelen oldukça polimorfik bir gendir. *AHSG* geni üzerindeki bazı polimorfizmlerin serumdaki Fetuin-A seviyesi ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (11, 12). Genin promotor bölgesinde bulunan -469T>G polimorfizminin (rs2077119), genin ekspresyon düzeyiyle bağlantılı olduğu ve serum fetuin A seviyesini etkilediği anlaşılmıştır (13). Genin 7 numaralı ekzonunda bulunan 770G>C polimorfizmininse (rs4918), protein ürününde Ser256Thr missens mutasyonuna sebep olduğu ve serum fetuin A seviyesini etkilediği tespit edilmiştir. Bu araştırmada; *AHSG* genindeki -469T>G ve 770G>C polimorfizmlerinin PKOS'la bağlantılı olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Mevcut literatüre göre bu araştırma, PKOS'lu hastalarda *AHSG* gen polimorfizmlerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polikistik Over Sendromu Tanımı ve Tarihçesi

Polikistik Over Sendromu (PKOS), hiperandrojenizm ve kronik anovulasyonla karakterize genetik faktörler ve çevrenin etkilediği endokrin bir işlevsel bozukluktur (14). Doğurganlık çağında olan kadınların %5-10'unda görülmektedir. Adet düzensizliği, hirşutizm ve oligoanovulasyon şeklinde kendini gösterir. Fakat etiyolojisi ve mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (15, 16).

Histolojik olarak PKOS'ta; yumurtalıklarda yüksek miktarda folikül mevcutken, iç teka hücre katmanındada luteinizasyon ve hipertrofi oluşmuş ve over kılıfı kalınlaşmıştır (16).

PKOS; üreme sorunlarına sebep olmasıyla birlikte böbreküstü adrenal bezler, hipofiz bezi, santral sinir sistemi ve ekstraglandüler dokuları da etkileyip birden fazla organ

yetersizliğine sebep olur. PKOS'lu kadınlarda obezitenin görülme sıklığı %50-65'ken bu kadınların %30-70'inde insülin direnci, %7-10'undaysa Tip II Diabetes Mellitus görülmüştür (17).

Üreme sisteminde görülen hastalıklar ise farklılık göstermektedir. Hastaların %72-82'sinde hiperandrojenizm, %20-60'ında genetik faktörler, %80'inde adetin seyrek olma durumu (18) ve yine %90'ında hirşutizm (19), %50'sinde ise obezite (kısır kadınlarda) (20) görüldüğü bildirilmiştir (18).

PKOS ilk olarak Michael Leventhal ve Irving F. Stein tarafından 1935'te obezite araştırmaları sırasında ortaya çıkmıştır. Şişmanlık ve aşırı kıllanmanın görüldüğü yedi kadın üzerinde yapılan araştırmalar neticesinde bu kadınlarda overlerin normalden daha büyük, tunikanın daha kalın olduğunu gözlemlemişlerdir. Hastalığa o zamanlar Stein-Leventhal Sendromu adını vermişlerdir (18, 21).

Ultrasonografinin gelişip, transvaginal ultrasonografinin kullanılmasıyla birlikte polikistik over yapısının daha ayrıntılı ve kesin bir şekilde değerlendirilmesi tanıyı güçlendirmiştir (22, 23).

1980'li yıllarda Burghen ve arkadaşları; insülin direnci ve polikistik over sendromunu ilişkilendirmiştir. Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü; 1990'da PKOS için tanı kriterleri belirlemişlerdir. Bu tanı kriterleri 2003'te güncellenip, son olarak 2006'da Avrupa Androjen Topluluğu tarafından belirlenen kriterler kabul edilmiştir (24).

Polikistik overin bir hastalık olarak değil de sendrom olarak adlandırılmasının sebebi; bir tanı testiyle belirti ve bulguların test edilemeyişindendir. Kimi araştırmacılar ise hastaların tümünde obezlik durumunun görüldüğünü öne sürmüşlerdir (17).

2.1.1. PKOS Prevelansı

PKOS'un görülme sıklığı; ırka, hastanın yaşına, yaşadığı bölgeye ve tanı için kullanılan kriterlere göre farklılık göstermektedir. Özellikle 35 yaş ve üzeri kadınlarda PKOS görülme sıklığı daha fazladır. İlk yıllarda yapılan araştırmalara göre PKOS prevelansının %6-10 arasında olduğu söylenmiştir (17). Fakat ultrasonografik yöntemlerin gelişimiyle birlikte tanı kriterlerinin genişlemesi, prevelansın artışını göstermiştir. Bu artışın bazı araştırmalarda

%26'ya vardığı söylenmiştir (24). Araştırmalar sonucunda siyahi kadınlarda PKOS görülme sıklığının %4 iken, Avrupa da yapılan araştırmada sıklığın %60'larda olduğu belirtilmiştir. Görüldüğü gibi farklı ırklarda çok farklı prevelanslar görülürken net bir prevelans henüz bildirilememiştir.

NIH'in belirlediği kriterlere göre PKOS görülme sıklığı %7-8,7'iken sonradan geliştirilmiş olan Rotterdam kriterlerine göre sıklığın %11,9-17,8 civarında olduğu bildirilmiştir. Avrupa Androjen Topluluğu kıstaslarına göre sıklık %12 düzeyindedir (25).

PKOS görülme sıklığı; klinik bulgulara göre farklılık gösterdiğinden dolayı bu konuda gerçekleştirilen çalışmalarda da değişik sonuçlar görülmektedir (26). Örnek olarak PKOS; hirşutizmli bireylerin %74'ünde, menstral disfonksiyonlu hastaların %22'sinde, obez bireylerinse %32'sinde görülmektedir (24).

Yapılan araştırmalar sonucu nüfus ile oranlandığında Türkiye'de yaklaşık olarak 1.000.000 PKOS hastası olduğu belirlenmiştir. Yani her 10 kadından 1'irinde PKOS görülmektedir (27). Rotterdam kriterlerine göre yapılan araştırmalarda sıklığın %20-60 arasında olduğu belirtilmişitr (21).

2.1.2. Polikistik Over Sendromu Tanı Kriterleri ve Belirtileri

PKOS tanısı için 1990'da yapılan National Institute of Child Health and Human Development (NICHHD) ve National Institutes of Health (NIH) konferansında bazı kriterler tanımlanmış fakat daha detaylı kriterlerin tanımlanması 2003'te birçok kuruluş tarafından özellikle Rotterdam kriterleriyle son halini almıştır (21, 28).

NICHHD kriterlerinde hiperandrojenizm ve onun eşlik ettiği hastalıklarla yumurtlama bozukluğu olmaması gerektiği söylenirken, Rotterdam kriterlerinde androjen fazlalığı ve oligo anovülasyon tanılarının ele alınması gerektiği söylenmiştir. (Tablo 2.1) (29).

Tablo 2.1. NIH ve Rotterdam'a göre PKOS tanı kriterleri (21).

	NIH-PKOS	Rott-PKOS (Hiperandrojenizm yok)	Rott-PKOS (Normal döngü)	Rott-PKOS (Bütün belirtiler var)
Oligo-anovülasyon	+	+		+
Hiperandrojenizm	+		+	+
Transvajinal sonografi		+	+	+

Ultrason yumurtalıklarda 2-9 milimetre çapında 12 veya daha çok folikül ya da artmış over görülmektedir (>10ml). Bir yumurtalığa polikistik over teşhisi koyabilmemiz için bu tanıma uyması yeterlidir. Hasta USG'ye hemen alınmamalıdır. Hasta eğer oligomenore ve hiperandrojenizm kriterlerinin her ikisini de taşıyorsa USG'de polikistik over olmayabilir ama yine de PKOS tanısı konabilir (29, 30).

2.1.3. Etiyopatogenezi

PKOS sık görülen bir hastalık olsa da patogenezi ve etiyolojisi hala tam anlamıyla anlaşılamamıştır (31). PKOS'un genetik bir hastalık olduğu yüksek oranda bilinse de; çevresel etkilerinde sendromun klinik ve biyokimyasında rol aldığı bilinmektedir.

Bu sendromun patofizyolojisinde 5 varsayım vardır (31-33):

- Düzenleyici bir hormon olan gonadotropin hormonunun salınım bozukluğuyla meydana gelen normalden fazla LH salgılanması ve kronik anovulasyon
- İnsülin direnci ve hiperinsülinemi
- Overin aşırı androjen üretimi
- Egzajere adrenarş
- Genetik etkenler

Gonadotropin hormon salınımındaki bozukluk

Sağlıklı bir bireyde hipotalamustan salgılanan gonadotropin hormonu (GnRH); folikül uyarıcı hormon (FSH) ve Luteinizan hormonunu (LH) hipofizden salgılatır. Ancak PKOS'lu hastalarda; progesteron hormonu az salgılandığından dolayı gonadotropin hormon salınımı

artış gösterir. Dolayısıyla Luteinizan hormon sentezinde de artış görülür. Yine östrojen hormonu da GnRH ‘ı etkileyerek hipofizer duyarlılığın artmasına sebep olur (34).

İnsülin direnci

PKOS’ta hiperinsülinemi ve insülin direnci yumurtalıkların teka hücrelerinde androjen hormonu üretimini arttırmakta ve karaciğerde globülin miktarını azaltıp serbest testesteron miktarını arttırmaktadır (35, 36).

Overin aşırı androjen üretimi

Fonksiyonel over hiperandrojenizmdeki fazlalaşmış over içi androjen seviyeleri, baskın folikül gelişimiyle foliküler olgunlaşmayı engellemekte ve sonuç olarak atretik foliküllerin artışına sebep olmaktadır. Androjen miktarındaki artış sebebiyle stroma tekalar genişler ve bu sebeple PKOS oluşabilmektedir (37).

Egzajere adrenarş

Adrenarş dönemi yani ergenlik başlangıcı; böbrek üstü bezi androjeninin (DHEA ve DHEA-S) senteziyle başlayan, pubik ve aksiller kıllanmayla karakterize bir dönemdir. Bu kurama göre PKOS’un oluşma ihtimali daha fazla olan ergen bireyler adrenarşı ileri derecelerde yaşarlar (38).

Genetik etkenler

PKOS’lu hastaların pedigrileri incelendiğinde kız kardeşler veya annede; hiperandrojenizm ve menstrual düzensizlik olduğu görülmüştür. Erkek kardeşler ve babadaysa serum androjen miktarının arttığı görülmüştür (39). Sendrom üzerinde yapılmış araştırmalar sonucunda; sendromun multifaktöriyel, poligenik bozukluk olduğu söylenmiştir (40).

2.1.4. PKOS Komplikasyonları

PKOS’lu hastalarda aşağıda verilen bulguların görülme ihtimali daha fazladır.

Kısırlık

Kısırlık bir yıl boyunca düzenli korunmasız ilişki durumunda bile hala hamile kalınamaması durumuna denir. PKOS’ta kısırlık sebebi; FSH ve LH hormonlarının dengesizliğiyle ilişkili olarak yumurtlamanın düzgün olmamasıdır. PKOS bu nedenden ötürü kısırlığa sebebiyet verir (41).

Düşük

Gebeliğin ilk 14 hafta içerisinde bitmesi durumuna düşük olarak adlandırılır. LH hormon seviyesi fazla olan PKOS hastalarının düşük ihtimalleri yüksektir. Düşük yapan kadınların %80'inden fazlasında PKOS görülür (42).

Endometrium Kanseri

Endometrium kanseri ve PKOS arasında bir ilişki olduğu tam olarak bilinmemekte ancak östrojen hormonunun kanserle bağlantısı olduğu bilinmektedir (41).

Hirşutizm

Hirşutizmli bireylerde normalde kıllanmanın az bulunduğu veya hiç bulunmadığı cildin androjene bağımlı bölgelerinde kıllanmanın yoğun ve kalın telli olduğu görülür. Cildin androjene bağımlı alanları; çene, karnın alt kısmı, dudak üstü, kulaklar, sırt, yanaklar, kalçanın alt bölümleri, göğüs ve ekstremitlerin üst bölümleri ve intergluteal alandır.

Bir topluluktan diğer topluluğa hirşutizm tanısı farklı olabilir. Akdeniz ülkelerinde bulunan kadınların vücutlarındaki kıllanma Uzak Doğulu veya Kuzey Avrupalı kadınların vücutlarındaki kıllanmaya göre hirşutizmli gibi değerlendirilebilirler. Diğer bir taraftan ise androjen sentezleyen tümörü bulunan bir Uzak doğulu kadının vücudunda kıllanma görülmeyebilir.

Hirşutizm ABD'de sıkça rastlanılan bir PKOS bulgusudur. Altı kadından birinde bulguya rastlanmaktadır. Fakat ülkemizde hastalığın görülme sıklığıyla ilgili net bir rakam yoktur. Bir akdeniz ülkesi olmamız sonucunda klinik çalışmalar bu hastalığın sık olduğunu saptamaktadır. Güney Asya ve Güney Avrupa'da ise ailesel hirşutizm sık görülmektedir. Hirşutizmin altında endokrin bir hastalık olduğu düşünülür ve yaygınlığı farklı endokrin hastalıklarla karşılaşma sıklığıyla ilişkili olarak toplumdan topluma farklılık gösterir (43).

Yapılan bir araştırmada PKOS'lu kadınların hirşutizm sıklığındaki artış; serumdaki toplam testesteron miktarının artması, obezitenin artması ve cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin 7 (SHBG) miktarının düşmesiyle ilişkilendirilmiştir (44).

Beslenme Bozukluğu

Son çalışmalarda PKOS'un beslenme bozukluklarına yol açmadığı görülmüştür. Ancak PKOS'lu kadınların çoğunda kilo sorunu vardır ve PKOS'lu hastaların %60'ından çoğunda anoreksiya blumia'nın görülmesi farklı bir tablonun oluşmasına sebep olamaktadır (45, 46).

2.2. Diyabetes Mellitus (DM)

İnsülin direnci PKOS patofizyolojisinde temel rol almaktadır. İnsülin direnci obezitenin etkileriyle birleşince PKOS'lu kadınların tip 2 diyabet ve bozulmuş glukoz toleransı riski artmaktadır. Üreme çağındaki PKOS'lu kadın bireylerde bozulmuş glikoz toleransının prevelansı %31-35, tip II diyabetin prevelansı ise %7,5-10 oranında bulunmuştur (46, 47). Bu prevelans yüzdeleri düzenli menstrüasyon geçiren sağlıklı kadınlara göre önemli derece yüksektir. Yapılan bir araştırmada Avustralya ve ABD'deki PKOS'lu kadınlarda tekrarlanan glukoz tolerans testleriyle, bozulmuş olan glukoz toleransından tip 2 diyabete geçişin 2 ila 5 kat arttığı gözlemlenmiştir (48).

PKOS'lu kadınların insülin direnci taşımaları ve DM riski bulundurmaları, sendromun uzun süreli sağlıkta öneminin olduğunu göstermiştir. İnsülin direncinin kısmen ağır olduğu bilinirken, 40'lı yaşlarda hastaların %20-40'ında tip 2 diyabet ya da glukoz intoleransı oluşacaktır (49-51).

Artmış diyabet olasılığı ile uyumlu olarak, tip 2 diyabet ve PKOS aile hikayesi olanlar insülin direnci derecesine oranla insülin yüklemesine, azalmış insülin salgısı cevabı verdiği gözlemlenmiştir (52). Anormal diyabet ve glukoz toleransı riski sadece PKOS'lu kadınlarda bulunmaz. Hastaların birinci derece olan akrabalarında artmış insülin konsantrasyonu görülmüştür (53). Yapılan son çalışmalarda PKOS'u olan kadınların ebeveynlerinde diyabet ve bozuk glukoz intoleransının birlikte görülme oranları sırasıyla %58 ve %46'dır. Bu oranların PKOS öyküsü bulunmayan ailelerdekine oranla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (54).

Ek olarak PKOS'u bulunan kadınların, hastalıktan etkilenmiş olan kız kardeşlerinde, hastalıktan etkilenmemiş olan kız kardeşlerine göre insülin/glukoz oranının yüksek olduğu anlaşılmıştır (55).

Sonuç olarak elde edilen bu bulgular, PKOS'u olan kadınların ve aile üyelerinin insülin direncine eğilimini göstermektedir.

2.3. PKOS genetiği

PKOS'un kalıtım şekli henüz anlaşılamamıştır ancak ailevi yönleri kalıtımsal olduğuna dair ipuçları vermektedir. Hastalıktan etkilenmiş olan ikizlerde serum androjen miktarları ve açlık insülin seviyeleri bakımından bir uyum görülmüştür. Ancak ikiz kızlarda

yapılan araştırmalar sonucu polikistik overler için güçlü genetik veriler ortaya koyulmamıştır (56-58).

Anovulasyon, hiperandrojenizm ve polikistik overlerin laboratuvar ve klinik incelemelerine dayalı yapılan çalışmalarda PKOS'un birinci derece olan akrabalarında görülme sıklığına bakılmıştır. Araştırma sonucunda hastalıktan etkilenmiş olan kadınların kız kardeş ve annelerinde PKOS olma olasılığının hasta olmayan kontrol grubundaki kadınlardan daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Yapılan bir diğer çalışma sonucunda hasta olmayan kadınların kız kardeşlerine bakıldığında %22'sinde PKOS, %24'ünde ise hiperandrojenemi görülmüştür. Ancak PKOS'lu olan kadın bireylerinin kız kardeşlerinin %66'sı, annelerininse %52'sinde PKOS görülmüştür. Hasta grubunda çıkan oranların kontrol grubundaki oranlara göre önemli derecede yüksek olduğu anlaşılmıştır (59). Bu bilgiler doğrultusunda PKOS için akrabalık derecesi arttıkça PKOS riski de artmaktadır. Yine bu veriler hiperandrojeneminin bir genetik temel olabileceğini, az da olsa sendromun ailesel olabileceğini göstermektedir.

PKOS'da yapılan genetik çalışmaların tümünde hastalıkla ilgili anormalliklere değinilmiş ve karbonhidrat metabolizması, steroid hormonlar ve gonadotropin salınımıyla bağlantılı aday genler ele alınmıştır. Bu genlerden steroid biyosentezinde görev alan CYP21, CYP17 ve CYP11A genleri PKOS ile ilişkisi yönünden incelenmiştir. Çalışmalar sonucu CYP11A'nın allellik varyantlarının PKOS'da hirşutizm ve aşırı androjen üretiminde rol aldığına dair ipuçları vardır. CYP21 ve CYP17 genlerinin ise PKOS'da rollerini destekleyecek herhangi bir olguyla karşılaşılmamıştır (60-63).

AR genindeki CAG (trinükleotid) tekrar sayıları ve androjen etkisi arasında ters bir ilişki vardır. Bu ilişki göz önünde bulundurulduğunda androjen reseptör (AR) geni PKOS'ta aday gen olarak düşünülür (64). Aynı zamanda SHBG (Seks hormon bağlayıcı globülin) allelinde frameshift (çerçeve kayması) mutasyon ve missense (yanlış anlamlı) mutasyona bağlı olarak; bir vakada hamilelik esnasında hiperandrojenizm ve dört vakada PKOS olması bu proteinin PKOS gelişiminde genetik bir rolünün olabileceğini düşündürmüştür (65).

PKOS'lu kadınlarda insülin direncine eğilim olduğu için, karbonhidrat metabolizmasında görev alan genlerin söz konusu sendromla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan iki araştırma sonucu insülin gen lokusu yanında bulunan bir alanın PKOS'la bağlantılı olduğu anlaşılmış ve önemli görülen bu alanın PKOS için aday bir gen bulundurabileceği bildirilmiştir (66, 67). Bu metabolizmada bulunan PKOS için diğer aday

genler ise resitin, TNF-alfa ve leptin genleridir. Fakat TNF-alfa ve resitin geni için PKOS'la bir bağlantı bulunamamıştır (68-70).

Gonadotropin salınımı bakımından PKOS için aday gen çalışması, sınırlı sayıda araştırmada ele alınmıştır. Dopamin GnRH salınımını engellediğinden dopamin reseptör gen farklılıkları PKOS'taki fazlalaşmış LH hormonu salgılanmasına katkıda bulunabileceği ile sürülmüştür (71).

Yapılan çalışmalar sonucu follistatin geninin PKOS'da aşırı sentezlendiği gözlemlenmiştir (72). Aktivin bağlayıcı protein diye de bilinen follistatin sentezinin artması FSH seviyesini düşürerek foliküllerin faaliyetinin durmasına sebep olur (73). PKOS ile ilişkili olduğu ileri sürülen aday genler tablo 2.2.'de listelenmiştir.

Tablo 2.2. PKOS'la ilişkili bazı aday genler (74)

Aday gen	**Polimorfizm**	**Kromozom Yerleşimi**
Steroid hormon bağlantılı genler		
Seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG)	(TAAAA)n	17p12-13
Androjen reseptör geni(AR)	(CAG)n	Xq11-12
İnsülin metabolizma genleri		
IRS	Gly972Arg	2q36
İnsülin geni (INS)	INS VNTR	11p15.5
İnsülin reseptör geni (INSR)	Ekson 17 C/T	19p13.3
Calpain 10	SNP –44,-43,-19,63	2q37
Gonadotropin metabolizma genleri		
Follistatin	D5S474 D5S623 D5S822	5q11.2
LH β	Trp8Arg Ile15Thr	19q13.32

Tablo 2.2. PKOS ile ilişkili bazı aday genler (74) (devam)

Ovaryan ve adrenal steroidogenez genleri		
CYP 11α	(tttta)n	15q23-24
CYP 17	Promotor bölge T/C	10q24.3
CYP 19	Aromataz SNP 50	15p21.1
CYP 21	Heterozigot CYP 21 mutasyonları	6p21.3
Enerji metabolizması genleri ve diğer genler		
Adiponektin	Ekson 2 T45G	3q27
TNFα	-308G/A	6p21.3
Leptin	(ttttt)n ins	7q31.3

2.4. FETUİN-A (*AHSG*)

Bir plazma proteini olan fetuin A, Alfa 2-Heremans Schmid glikoprotein (*AHSG*) olarak da adlandırılır. Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 60kD'dur. Sistein proteinaz inhibitörlerinden olan sistatin ailesinin üyelerinden biridir. Fetuin A proteini, serum elektroforezinde en büyük α2 bandını oluşturmaktadır. Fetuin A sentezi fetal gelişim sırasında birçok doku tarafından yapılırken (Koroid pleksus, böbrek ve diğer tüm büyük organlar) erişkinlerde sentez yeri karaciğerdir (75-78).

Fetuin A'nın serum miktarı 0,5-1 g/L'dir. Bu miktar inflamasyon durumunda azalır (78). Ketteler ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada C reaktif protein ve fetuin A geni arasında ters ilişki gözlemlenmiştir (79). Bu özellik sonucu fetuin A'nın bir negatif akut faz reaktanı olduğunu göstermiştir.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar sonucu fetuin A'nın bir kalsifikasyon inhibitörü olduğu anlaşılmıştır. Fetuin A aynı zamanda $Ca \times PO_4$'ün çökmesini de engeller (80-83).

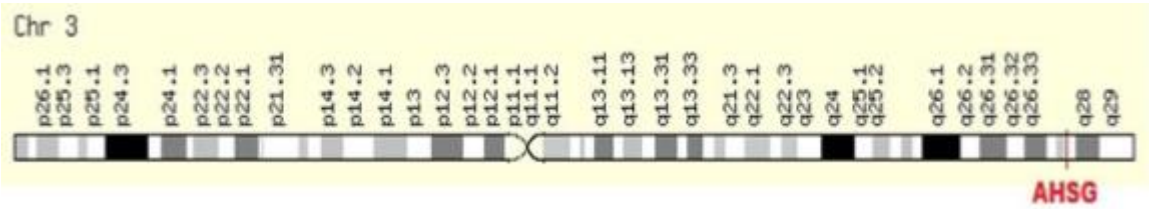
Yapılan bir çalışmada fareden fetuin A gen delesyonu yapılmış ve bunun sonucunda fare dokularında kalsifikasyon oluşumu görülmüştür (84). Fetuin A'nın kalsifikasyonun engellenmesinin dışında vücutta başka fonksiyonları da vardır;

Transforming growht factor-β (TGF-β) antagonisti olarak işlev görür (85). İnterensek tirozin kinaz (TK) aktivitesiyle kontrolü yapılan insülin reseptörü otofosforilasyonunu engeller (86-88). Fetuin A'nın biyolojik fonksiyonları ve özellikleri maddeler halinde verilmiştir. Bunlar;

- Damar düz kas hücrelerinde matriks vezikül kalsifikasyonun hücre içindeki engelini
- $CaxPO_4$ presipitasyonunun kinetik önlenmesini
- İnsülin reseptörünün tirozin reseptör aktivitesini ve otofosforilasyonunu engelleyerek insülin hassasiyetinin baskılanmasını
- Negatif akut faz reaktanı olarak fetuin-A gen ifadesinin düzenlenmesini
- Calsiprotein partiküllerinin oluşmasıyla kristal büyümesini inhibe ederek
- Hidroksiapatit kristalizasyonunun stabilizasyonu
- TGF-β tip 2 reseptörünü etkileyerek TGF-β inhibisyonudur.

2.5. *AHSG* Geni

Fetuin A'yı sentezleyen *AHSG* (HGNC:349) geni, kromozom 3q27.3 bölgesinde 8.40 kilobayt (kb) uzunluğunda 6 intron ve 7 ekzondan oluşur (89). Genin bulunduğu kromozom bölgesinin metabolik sendrom ve tip II diyabetle bağlantılı olduğu görülmüştür (90).



Şekil 2.1. Fetuin-A proteinini sentezleyen *AHSG* geninin kromozom 3 üstündeki konumu

Genomik yapı 6 intron ve 7 ekzondan meydana gelir (91). *AHSG* geni polimorfik bir yapıdadır. Bu gen üstünde, çeşitli tek nükleotit polimorfizmler saptanmıştır. Fetuin-A serum miktarının, *AHSG* geni içinde bulunan SNP`lerle bağlantısı gözlemlenmiştir (92). *AHSG* geni üstünde 1560 adet polimorfik alan olduğu saptanmıştır (93, 94).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta-Kontrol Grubunun Oluşturulması ve Periferik Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışma materyalleri Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde PKOS tanısı konulmuş kadınlar ve yaş aralığı aynı olan sağlıklı kadınlardan oluşmuştur. Araştırmaya dahil olan kadınlar, HÜTF Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğinde izlenen, Rotterdam kriterlerine bağlı olarak PKOS tanısı konmuş hasta kadın bireylerdi. Araştırmaya dahil olan ve onay veren kadınlar, PKOS tanısı konulmuş olan 122 hasta ve 124 sağlıklı kadın olmak üzere iki gruba ayrıldı.

Kullanılan Rotterdam kriterlerinde PKOS tanısı için aşağıdaki parametrelerden ikisinin bulunması yeterlidir.

- Adet düzensizliği
- Biyokimyasal hiperandrojenizm ve/veya Klinik hiperandrojenizm
- Polikistik over morfolojisi

Araştırmaya HÜTF Etik Kurulunun, 21.02.2019-E.8245 tarih ve sayılı onayı alınarak başlanıldı.

3.2. Laboratuvarda Kullanılan Araç-Gereç ve Kimyasalları

3.2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Real-Time PCR cihazı (Rotor-Gene Q Series, Qiagen)
- Standart 36 Kuyucuklu Real Time PCR Plate
- İnkübatör (Nüve EN-500)
- 1,5 ml'lik Santrifüj Tüpleri (BD Falcon)
- Otoklav cihazı (Nüve OT 4060 V, OT 40 L)
- Vorteks cihazı (VELP)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Santrifüj cihazı (Nüve NF-800)
- Distile su cihazı
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)
- Derin Dondurucu (SANYO, Biomedical Freezer)
- Hassas Terazi (AND)
- Pipet ucu- 200 ul- DNA & RNA free

- Pipet ucu- 1000 ul - DNA & RNA free
- Pipet ucu- 10 ul- DNA & RNA free
- Mikrosantrifüj tüpü- 1,5 ml- DNA & RNA free
- Nitril eldiven pudrasız
- qPCR tüpleri - düz kapaklı - 0,2 ml

3.2.2. Kullanılan Kimyasallar

- Saf Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Proteinaz K (Invitrogen 46-7285)
- Distile su (Respiflo 21000)
- DNA ekstraksiyon kiti (İnvitrogen Pure Link Genomik DNA Mini Kit K1820-02)
- 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4364340)
- 40X Pre-designed TaqMan Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Assays Mix (Applied Biosystems) *AHSG* geni NM_00135571:c.770C>G (rs4918)
- 40X Pre-designed TaqMan Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Assays Mix (Applied Biosystems)*AHSG* geni NM:001354571:c.-469T>G(rs2077119)

3.3. DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından alınan 2 ml`lik kan EDTA`lı tüplere alındıktan sonra kadınların 200 µl`lik periferik kanından İnvitrogen Pure Link Genomik DNA Mini Kit K1820-02 metoduyla DNA izolasyonu yapıldı (95).

3.3.1. İnvitrogen Pure Link Genomik DNA Mini Kit K1820-02 yöntemi ile DNA izolasyonu Protokolü

1. Steril olan mikrosantrifüj tüplerine 200 µl taze ya da dondurulmuş kan eklendi.

2. Kan örneğine kit ile birlikte verilen 20 µl proteinaz K ve 20 µl RNAase A eklenerek, vortekslenip 2 dk oda sıcaklığında bekletildi.

3. 200 µl purelink genomik lizis tamponu eklendikten sonra vorteksleme tekrar yapıldı.

4. Karışım örneği 10 dakika boyunca 55℃`de inkübasyana bırakıldı.

5. Elde edilen lizat etüvden alınarak üzerine 200 µl %96-100 etanol eklenip 5 sn vortekslendi.

6. Örnekler mikrosantrifüj tüplerinden spin kolonun bulunduğu toplama tüplerine konuldu.

7. Toplama tüpleri santrifüje alınıp 1 dakika boyunca 10.000xg'de santrifüj edildi. Santrifüj cihazından çıkarılan toplama tüpleri atılıp kalan kolon, temiz olan tüplere konuldu.

8. Etanolle hazırlanılmış olan 500 µl WB1 (Wash Buffer 1) ilave edildi ve kolon 1 dakika boyunca 10.000xg'de santrifüj edildi. Cihazdan çıkarılan toplama tüpleri atılıp kolon, temiz olan tüplere konuldu.

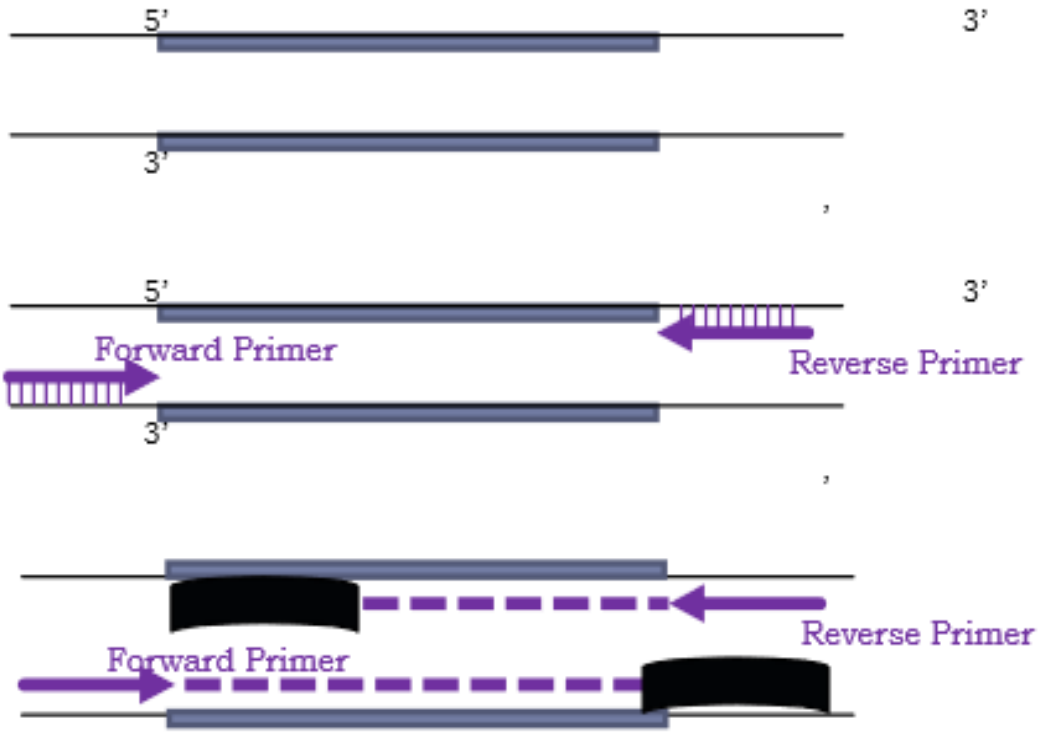
9. Etanolle hazırlanmış olan 500 µl WB2 (Wash Buffer 2) ilave edildi. Kolon 14.000xg'de 3 dakika boyunca santrifuj edilip, toplama tüpleri atıldı.

10. Spin kolon steril olan 1.5 ml`lik ependorf tüplerine konuldu. Üzerine 200 µl purelink genomik Elution buffer ilave edilerek 1 dk bekletilip sonra 1 dk 14.000xg de santrifüj edildi.

11. Santrifüjden sonra kolon atılıp, içerisinde DNA bulunan tüplerin kapakları kapatılıp -20℃'ye alındı.

3.4. DNA Örneklerindeki Polimorfizmlerin Real-Time PCR İle Analizi

DNA üzerinde bulunan, önceden bilinen iki segment arasındaki belirli bir bölgeyi çoğaltmak için PCR metodu kullanılır. Bu metot çift iplikli olan DNA'da hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanıp, uzamasına dayalı bir metotdur. Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılır ve oluşan tek zincirli DNA molekülleri üzerine komplomenter olan oligonükleotid primerler bağlanır. Dört farklı deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) ve uygun tampon varlığında DNA polimeraz enzimi, primerin 3' ucundan uzamasını sağlar. Böylece yeni DNA molekülü sentezlenir. Sonuç olarak PCR'da denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama 20-40 döngü tekrarlanarak çoğaltmak istediğimiz DNA'dan milyonlarca kopyalanmış olur (96).



Şekil 3.2. Temel PCR basamakları; denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama

Kandan DNA izolasyonu aşamasından sonra hasta ve kontrol grupları üstünde genotiplendirme yapıldı. Bu çalışma *AHSG* genindeki 770C>G (rs4918) ve -469T>G (rs2077119) polimorfizmleri "TaqMan SNP Genotyping Assays" primer ve probları kullanılarak Real-Time PCR cihazı (Rotorgene- Qiagen) ile yapılmıştır. Tablo 3'te PCR'da uygulanmış olan bağlanma süreleri ve sıcaklıkları gösterilmiştir.

Tablo 3.3. *AHSG* geninde bulunan SNP'lerin Real-Time PCR protokolü

Süre	Sıcaklık(℃)	Döngü Sayısı
3 dk	95℃	1
15 sn Denatürasyon	95℃	40
60 sn bağlanma/uzama	60℃	40

3.4.1. *AHSG* Geninde Çalışılan SNP'lerin Özellikleri

Tablo 3.4. *AHSG* genine ait 770C>G polimorfizmi

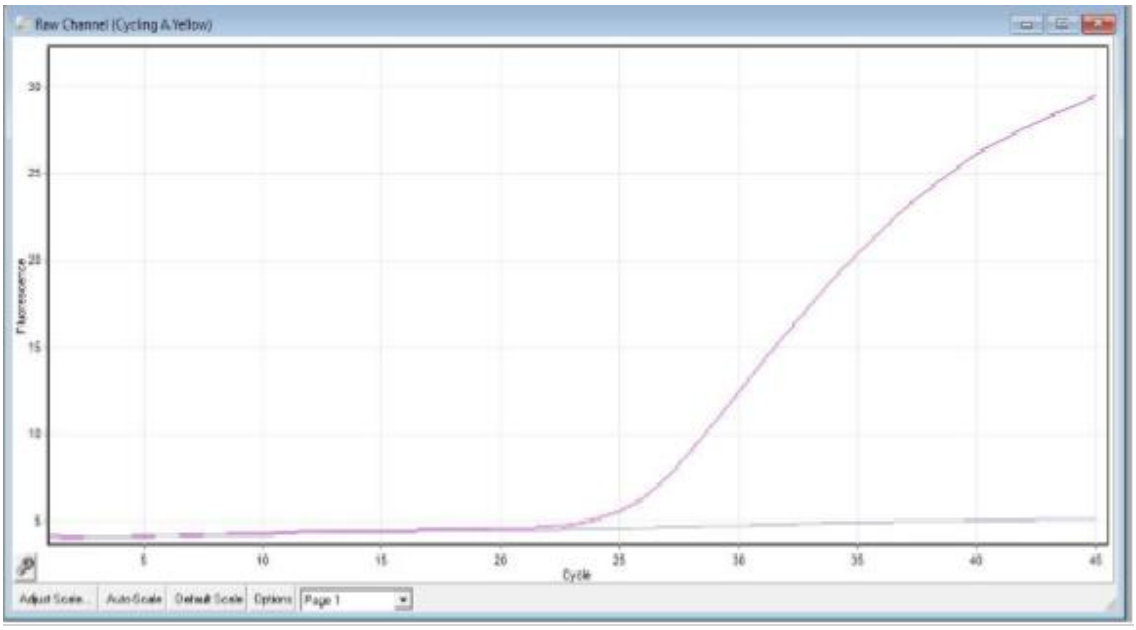
Gen Adı	Değişen Nükleotid	SNP referans no
AHSG	Ekzon7 770C>G	rs4918
Çoğaltılan DNA Bölgesi	ACAAAGACAATCCTAGTGAGGCCGGGGCCAACATAGGCCAGTCACC CCTCCTTGTAACCTTGATGACAATCCCTTGTACTTGGGTAGGTCCTTT CTTGCTAGACTCTTTGCAAATAAAAATGTATAATGTGAGGAAATTGG GTGCCAGTGCCACCTGGGCCTGTGGGTTGTCTTGCCTGGGAGGAGGA AGCAAACTAACTGAAGG**AAATGGTCCTTTTTCCAGCCCGTGA[C/G]CTCACAGCCCCAACCAGAAGGTGCC**AATGAAGCAGTCCCCACAC CCGTGGTGGACCCAGATGCACCTCCGTCCCCTCCACTTGGCGCACCT GGACTCCCTCCAGCTGGCTCACCCCCAGACTCCCATGTGTTACTGGC AGCTCCTCCAGGACACCAGTTGCACCGGGCGCACTACGACCTGCGCC	

Tablo 4.5. *AHSG* genine ait -469T>G polimorfizmi

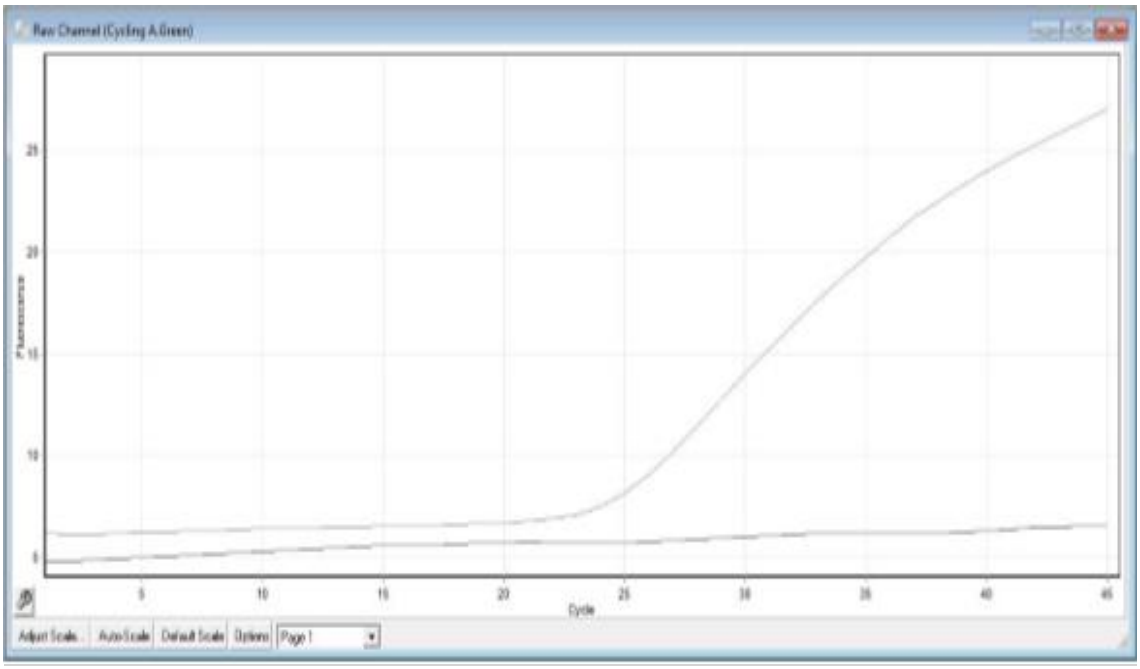
Gen Adı	Değişen Nükleotid	SNP referans no
AHSG	-469T>G	rs2077119
Çoğaltılan DNA Bölgesi	AAAATCTTGGCATCTCCTATACACATCTGTACCTTTGCTATATCTGTG GGCCTTGTTCTCCCTGTAGGACTCCTCTTGGAAAG**CTAACTCCCCCT GACAT**[T/G]**GGAGAATTTTATCAAATTGCTGA**GTATCCTCCCTTCCC TCTCACAGACCCCATGGCATGCTCAGATCACAGTAGAAGACATTTCC TCTGCTGCCAAACCC	

3.5. Genotip analizi

AHSG (rs4918, rs2077119) gen polimorfizmleri için 122 PKOS hasta ve 124 sağlıklı kontrol grubundan oluşan bu araştırma, her kadın için "Pre-designed TaqMan Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Assays" sistemine göre Real-Time PCR işlemiyle genotip analizi yapıldı. Gen polimorfizmlerine ait olan aleller onlara uygun floresan boyalarla işaretlendikten sonra bulunan amplifikasyon eğrileriyle her bir örneğin genotip tayini yapıldı. Kullanılmış olan primer-prob setinde polimorfik allel FAM (Green)'le wild allel ise VIC (yellow)'le işaretlenmiştir. Wild'e ve Polimorfik allele ait negatif-pozitif örnekler Şekil 3.3 ve 4'te görülmektedir (Şekil 3.3-4).



Şekil 3.3. Wild alleli belirleyici VIC (Yellow) probuyla işaretli, pozitif-negatif pik örnekleri (sigmoidal eğri pozitif; yatay eğri negatiftir)



Şekil 3.4. Polimorfik alleli belirleyici FAM (Green) probuyla işaretli, pozitif-negatif pik örnekleri (sigmoidal eğri pozitif; yatay eğri negatiftir).

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 20 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Demografik ve rutin laboratuvar testleri ile ilgili değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogrov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleriyle incelenmiştir. Sayısal değişkenler ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. Dağılımın normal olduğu değişkenlerin karşılaştırılması amacıyla Independent-samples t-test kullanıldı. Sayısal dağılımın anormal olduğu durumlarda ise Mann–Whitney U test kullanılmıştır. *AHSG* genindeki allel frekansları, genotip dağılımı ve bu dağılımın beklenilen değerlerle uyumunun (Hardy-WeinbergEquilibrium) incelenmesinde Pearson ki-kare testi uygulanmıştır. Allellerin ve genotiplerin riskleri odds oranını hesaplanmasıyla belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık analizinde %95 güven aralığında $p<0,05$ olduğunda sonuçlar anlamlı olarak kabul görülmüştür (97).

4. BULGULAR

Bu araştırma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği Bölümünde Polikistik Over Sendromu (PKOS) tanısı konmuş 122 kadın ile aynı yaş aralığında bulunan 124 sağlıklı kadın üzerinde yapılmıştır. PKOS ve kontrol gruplarının demografik ve laboratuvar sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir. Tablo 4.6' da görüldüğü gibi hasta grubunun yaş ortalaması 24,81 (±3,20), kontrol grubunun yaş ortalaması da 24,96 (±3,26) olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol gruplarının arasında yaş dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Hasta ve kontrol grupları rutin laboratuvar sonuçları bakımından karşılaştırıldığında; Glukoz, LH, LH/FSH oranı ve total testesteronun hasta grubunda anlamlı derecede artmış olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). HDL düzeyinin ise PKOS grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak daha az seviyede olduğu görülmüştür ($p=0,001$). Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında BMI, insülin, FSH, estradiol, progesteron, DHEAS, trigliserid ve LDL düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,01$).

4.1. *AHSG* Geninin Genotip Dağılımı ile Allel Frekansının Değerlendirilmesi

Bu araştırmada *AHSG* (fetuin A) geni üzerinde bulunan 2 polimorfizmin hasta ve kontrol gruplarının allel frekansları ile genotip dağılımları incelenmiştir. Polimorfizmlerden ilki *AHSG* geninin 7. ekzonunda bulunan 770C>G polimorfizmidir (rs4918). İkinci polimorfizm ise söz konusu genin promotor bölgesinde bulunan -469T>G polimorfizmidir (rs2077119).

Tablo 4.6. PKOS ve kontrol gruplarının demografik ve laboratuvar sonuçları

	PKOS grubu	**Kontrol grubu**	**P**
Yaş (Yıl)	24,81±3,20	24,96±3,26	0,729
BMI (kg/m^2)	24,03±1,89	23,94±1,83	0,728
Glucose (mg/dl)	86,41±6,94	82,51±6,54	**<0,001**
İnsülin (IU/ml)	19,15±4,84	17,84±3,83	0,083
FSH (IU/ml)	6,03±0,81	5,94±0,78	0,362
LH (IU/ml)	10,68±1,11	8,43±1,08	**<0,001**
LH FSH oranı	1,79±0,21	1,43±0,18	**<0,001**
Estradiol (pg/ml)	58,22±7,82	57,94±7,70	0,779
Progesteron (ng/ml)	1,14±0,18	1,13±0,18	0,774
Totaltestesteron (ng/dl)	28,45±5,03	22,33±3,87	**<0,001**
DHEAS (ng/dl)	303,71±19,17	317,10±43,89	0,482
Kollesterol (mg/dl)	194,34±13,83	193,88±13,79	0,795
Trigliserid (mg/dl)	195,27±14,60	195,06±13,92	0,906
HDL (mg/dl)	51,31±7,41	53,98±4,17	**<0,001**
LDL (mg/dl)	192,10±14,56	195,13±13,97	0,131

4.1.1. *AHSG* geni 770C>G (rs4918) polimorfizminin genotip dağılımı ile allel frekansları

PKOS hasta grubunda homozigot CC genotipi %62 oranında 76 hasta bireyde, heterozigot CG genotipi %33 oranında 40 hasta bireyde ve homozigot GG genotipi ise %5 oranında 6 hasta bireyde saptanmıştır. Kontrol grubuna baktığımızda ise homozigot CC genotipi %55 oranında 68 bireyde, heterozigot CG genotipi %37 oranında 46 bireyde ve homozigot GG genotipi ise %8 oranında 10 bireyde saptanmıştır. *AHSG* geni 770C>G (rs4918) polimorfizminin hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımı açısından

istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p=0,18). *AHSG* geni 770C>G polimorfizminin PKOS hasta ile kontrol grubundaki oran ve dağılımı tablo.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. *AHSG* geni 770C>G polimorfizminin kontrol grubu ve PKOS'lu hasta grubundaki genotip dağılımları

***AHSG* 770C>G**	Hasta n=122 (%)	Kontrol n=124 (%)	Chi-Square	P
Genotype				
CC	76 (%62)	68(%55)		
CG	40 (%33)	46 (%37)	1,82	0.18
GG	6 (%5)	10 (%8)		

PKOS hasta grubundaki allel sıklığı C allelinde %79 oranında G allelinde ise %21 oranında olup, kontrol grubunda C allel oranı %73 ve G allel oranı %27 oranında olduğu tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında alel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p=0,17). *AHSG* geni 770 C>G polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki alel frekansları tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. *AHSG* geni 770C>G polimorfizminin kontrol grubu ve PKOS'lu hasta grubundaki allel frekansları

***AHSG* 770C>G**	Hasta n=122 (%)	Kontrol n=124 (%)	Chi-Square	P
Allele				
C	192 (%79)	182 (%73)	1,9	0.17
G	52 (%21)	66 (%27)		

4.1.2. *AHSG* geni -469T>G (rs2077119) polimorfizminin genotip dağılım ve allel frekansları

PKOS hasta grubunda homozigot TT genotipi %29 oranında (35 bireyde), heterozigot TG genotipi %49 oranında (60 bireyde), homozigot GG genotipi ise %22 oranında (27 bireyde) gözlenmiştir. Kontrol grubunda homozigot TT genotipi %21 oranında (26 bireyde), heterozigot TG genotipi %49 oranında (61 bireyde) ve homozigot GG genotipi %30 oranında (37 bireyde) olduğu gözlemlenmiştir. *AHSG* geni -469T>G polimorfizminin PKOS hasta ve kontrol grubu üzerindeki dağılımı tablo.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. *AHSG* geni -469T>G polimorfizminin kontrol grubu ve PKOS'lu hasta grubundaki genotip dağılımı

***AHSG* -469T>G**	Patients n=122 (%)	Controls n=124 (%)	Chi-Square	P
Genotype				
TT	35 (%29)	26 (%21)		
TG	60 (%49)	61 (%49)	2,88	0,09
GG	27 (%22)	37 (%30)		

Pearson Chi-Square testi uygulandı.

PKOS hasta grubundaki allel sıklığı T allel frekansı %53 ve G allel frekansı %47 oranında olup, kontrol grubunda ise T allel frekansı %46 ve G allel frekansı ise %64 oranında saptanmış olup hasta ve kontrol grubundaki allel dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (p=0,09). *AHSG* geni -469T>G polimorfizminin PKOS hasta ve kontrol grubundaki allel dağılım frekansı tablo.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10. *AHSG* geni -469T>G polimorfizminin kontrol grubu ve PKOS'lu hasta grubundaki allel frekansları

***AHSG* -469T>G**	Patients n=122 (%)	Controls n=124 (%)	Chi-Square	P
Allele				
T	130 (%53)	113 (%46)	2,93	0.09
G	114 (%47)	135 (%64)		

5. TARTIŞMA

PKOS üreme çağındaki kadınlarda görülen endokrinolojik bir hastalık olmakla birlikte hipertansiyon, diyabet ve koroner arter hastalığı gibi uzun dönem riskleri beraberinde getirebilecek metabolik bir bozukluktur. PKOS'lu hastalarda yüksek insülin düzeyi, insülin direnci ve obezite sık olarak görülmekte ve en başta diyabet olmak üzere uzun dönemli risklerin gelişmesinde en önemli faktörler olarak görülmektedir. İnsülin direnci ve obezitenin oluşturduğu olumsuz metabolik sonuçların hangi mekanizmalarla oluştuğu halen netlik kazanmamıştır.

PKOS'lu hastalarda insüline duyarlılığın %35-40 oranında azaldığı ve bu durumun hastalığın patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (22). PKOS'lu hastalarda insülin direnci görülmesi, insülin direnci oluşumunda etkili olan moleküllerin PKOS üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim insülin direnci ile ilişkili moleküllerden fetuin A düzeyindeki artışının PKOS gelişimi ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (8-10). Enli ve ark. PKOS'lu kadınlarda artan Fetuin A düzeyinin, insülin direnci ve overian hiperandojenizm ile ilişkili olduğunu ve fetuin A'nın insülin direnci ve androjen artışını tetikleyebileceğini ileri sürmüşlerdir (9). Fetuin A'nın kodlanmasından sorumlu *AHSG* genindeki bazı polimorfizmlerin, söz konusu molekülün fonksiyonel aktivitesi ve serumdaki düzeyi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu polimorfizmlerinde insülin direnci yoluyla tip II diyabet, gestasyonel diyabet ve metabolik sendromla bağlantılı olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (98-100). Bu çalışmamızda da *AHSG* genindeki iki önemli polimorfik bölgenin PKOS üzerinde etkili olup olmadığını araştırdık. Bu polimorfizmlerden biri sentezlenen proteinde aminoasit değişikliğine yol açan 770C>G diğeri de genin promotor bölgesinde yer alan -469T>G polimorfizmidir.

AHSG 770C>G polimorfizmi, genin 7. Egzonunda yer almakta olup sentezlenen proteinin 256. pozisyonunda serin yerine tirozin amino asidinin gelmesine yol açmaktadır. Daha ince yapılan çalışmalarda bu polimorfizmin birçok hastalıkla ilişkili olduğu saptanmıştır. Stenvinkel ve ark. Düşük kilolu İsveçli erkeklerde 770G allelinin daha sık olduğunu saptamışlardır (11). Siddig ve arkadaşları Fransızlarda yaptıkları araştırmada *AHSG* genindeki rs1071592 polimorfizminin tip II diyabetle bağlantılı olduğunu ve çalışmamızdaki rs4918 (770C>G) polimorfizminin de bununla bağlantılı olduğunu saptamışlardır (101). Akbaş ve ark. ise minör homozigot GG genotipinin gestasyonel diyabetli hastalarda kontrol grubuna oranla daha sık görüldüğünü ve gestasyonel diabet gelişimine karşı koruyucu bir

etkisinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir (99). Temesszentandrási ve arkadaşları sağlıklı çalışma grubunda, yüksek leptin düzeyleri ile düşük TNF alfa ve adiponektin düzeylerinin 770G varyantıyla bağlantılı olduğunu, miyokard enfarktüsü geçmişi olan grupta ise bu varyantın olumlu obezite parametreleriyle bağlantılı olduğunu tespit etmişlerdir (102). Bu çalışmamızda ise *AHSG* 770C>G polimorfizminin PKOS ile ilişkili olmadığını saptadık.

Araştırmamızda incelediğimiz ikinci polimorfizm ise *AHSG* geninin promotor bölgesinde bulunan -469 T>G polimorfizmidir. Andersen ve ark. bu polimorfizmin tip II diyabetle bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (103). Teo ile ark. *AHSG* geni -469T>G polimorfizmini obezite ve metabolik sendrom ile ilişkili SNP olarak bildirmişlerdir (104). Dahlman ve ark. ise *AHSG* geni -469T>G polimorfizminin insülin aracılı lipolizin inhibisyonu ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (105). Bizim PKOS'lu çalışma grubunda yaptığımız araştırmada ise söz konusu polimorfizmin genotip dağılımı ve allel frekanslarının PKOS ile ilişkili olmadığını saptadık.

6. SONUÇ

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilere göre *AHSG* geni 770C>G (rs4918) polimorfizminin genotip dağılımının PKOS ile ilişkili olmadığını aynı şekilde *AHSG* geni -469T>G (rs2077119) polimorfizminin genotip dağılımının da PKOS ile ilişkili olmadığını saptadık.

7. KAYNAKLAR

1. Franks S. Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med, 1995; 333: 853-61.

2. Kousta E, Efstathiadou Z, Lawrence NJ, Godsland IF, Barrett SC, Doré CJ, et al. The impact of ethnicity on glucose regulation and the metabolic syndrome following gestational diabetes. Diabetologia, 2006; 49: 36-40.

3. Yen BS. Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, andClinical Management. 5th.ed. Elsevier Saunders Publishing, Berlin, 2001; 597–632.

4. Harris C, Cheung T. PCOS Diet Book. Thorsons Publishing, London, 2002; p:368.

5. Hickey JT, Hickey L, Yancy WS, Hepburn J, Westman EC. Clinical use of acarbohydrate-restricted diet to treat the dyslipidemia of the metabolic syndrome. MetabSyndr Relat Disord, 2003; 1:227-232.

6. Cell Signal. The "thrifty" gene encoding hsg/Fetuin-A meetstheinsulin receptor: Insightsintothe Mechanism of insulin resistance. Goustin AS1, Abou-Samra AB, 2011; (6):980-90.

7. Mathews ST, Rakhade S, Zhou XH, Parker GC , Coscina DV, Grunberger G. Fetuin-null mice are protected against obesity and insulin resistance associated with aging. Biochem Biophys Res Commun, 2006; 350: 437–43.

8. Sak S, Uyanikoglu H, Incebiyik A, Incebiyik H, Hilali NG, Sabuncu T, ve ark. Associations of serum fetuin-A and oxidative stress parameters with polycystic ovary syndrome. Clin Exp Reprod Med, 2018; 45(3):116-121.

9. Enli Y, Fenkci SM, Fenkci V, Oztekin O. Serum Fetuin-A levels, insulin resistance and oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol, 2013; 29(12):1036-1039.

10. Abali R, Celik C, Tasdemir N, Alpsoy Ş, Yüksel A, Çelik E. The serum protein α2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-a concentration and carotid intima-media thickness in women with polycystic ovary syndrome. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013; 169(1):45-49.

11. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B. DialGene Consortium. Gene polymorphism association studies in dialysis: the nutrition-inflammation axis. Semin Dial, 2005; 18(4):322-330.

12. Osawa M, Yuasa I, Kitano T, Henke J, Kaneko M, Udono T, et al. Haplotype analysis of the human alpha2-HS Glycoprotein (fetuin) gene. Ann Hum Genet, 2001; 65:27–34.

13. Inoue M, Takata H, Ikeda Y, Suehiro T, Inada S, Osaki F, et al. A promoter polymorphism of the alpha2-HS glycoprotein gene is associated with its transcriptional activity. Diabetes Res Clin Pract, 2008; 79(1):164-170.

14. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group: 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term healt h risks related to polycystic ovary syndrome[J] Fertil Steril 0000 81 1 19 25 10.1016/j.fertnstert, 2003.10.004

15. Sharaf R, Saygılı H, Kartal A. Polikistik over sendromlu hastalarda insülin direnci ile klinik ve laboratuvar bulguları arasındaki ilişki, J Turkish German Gynecol Assoc 2004; 5(4): 303.

16. American Society For Reproductive Medicine. Hirsutism and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), A Guide for Patients Revised, 2012.

17. Ou HT, Wu MH, Lin CY, Chen PC. Development of Chinese Version of Polycystic Ovary Syndrome Health-Related Quality of Life Questionnaire (Chi-PCOSQ), PLOS ONE, 2015; 10(10): 11.

18. Guilherme B, Larissa S, Denise Rosso R, Alberto A. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Fertility, Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases, 2016; 6, 58-65.

19. Beji NK, Kadıoğlu M. Polikistik Over Sendromu ve Hemşirelik Yaklaşımı. Florence Nightingale Hemşirelik Dergisi, 2012; 21(3), 187-197.

20. Cronin L, Guyatt G, Griffith L, Wong E, Azziz R, Futterweit W, et al. Development of a Health-Related Quality-of-Life Questionnaire (PCOSQ) for Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), JCE, 1998: 83(6): 1977-1984.

21. Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC. PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: Change in prevalence among WHO-II

anovulation and association with metabolic factors. BJOG:An International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2006; 113(10): 1210-7.

22. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. Fertil Steril 2009; 91: 456-88.

23. Beji NK, Kadıoğlu M. Polikistik Over Sendromu ve Hemşirelik Yaklaşımı. Florence Nightingale Hemşirelik Dergisi, 2012; 21(3): 187-197.

24. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. J Clin Endocrinol Metab, 2004; 89(6): 2745–9.

25. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. Human Reproduction, 2010 Feb; 25(2):544-51.

26. Lindhom AM. Metabolic aspects in the PCOS, 2010; 11-12.

27. Polikistik Over Sendromu. URL: http://www.saglikaktuel.com/haber/polikistik-over-sendromu-10-kadindan1inde-goruluyor-58818.htm 7 kasım, 2017.

28. Malik-Aslam A, D. Reaney M, Speight J. The Suitability of Polycystic Ovary Syndrome-Specifi Questionnaires for Measuring the Impact of PCOS on Quality of Life in Clinical Trialsvh, International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research (ISPOR), 2010; 13(4): 440-446.

29. Lujan ME, Chizen DR, Pierson RA. Diagnostic Criteria for Polycystic Ovary Syndrome: Pitfalls and Controversies, JOGC AOÛT, 2008; 30(8): 671-690.

30. Alsamarai S, Adams JM, Murphy MK, Post MD, Hayden DL, Hall JE, et al. Criteria for polycystic ovarian morphology in polycystic ovary syndrome as a function of age. J Clin Endocrinol Metab, 2009; 94(12): 4961-70.

31. Barbosa G, Sá LBPC, Rocha DRTW, Arbex AK. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Fertility, Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases, 2016; 6: 58-65.

32. Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS), Hum Reprod, 2004; 19: 41-47.

33. Ricardo A, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Futterweit W, S.Legro R, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report, Fertility and Sterility, 2009; 91(2): 458-459.

34. Mortensen M, Ehrmann DA, Littlejohn E, Rosenfield RL. Asymptomatic volunteers with a polycystic ovary are a functionally distinct but heterogeneous population. J Clin Endocrinol Metab, 2009; 94:1579.

35. Paccini G, Mari A. Methods for clinical assesment of insulin sensitivity and betacell function. Best. Pract. Res.Clin. Endocrinol Metab, 2003; 17: 305-322.

36. Andrea D. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis, Endocrine Reviews, 1997; 18(6): 774–800.

37. Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. Hum Reprod Update, 2004; 10:107.

38. Avi Ben-Haroush, Yariv Y, Benjamin F. Insulin resistance and metformin in polycystic ovary syndrome. Eur J of Obstet Gynecol and Reprod Biology, 2004; 115:125-33.

39. Yildiz BO, Yarali H, Oguz H, Bayraktar M. Glucose intolerance, insülin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab, 2003; 88: 2031-2036.

40. Crosignani PG, Nicolosi AE. Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. Hum Reprod Update, 2001; 7: 3-7

41. Kiddy DS, Sharp PS, Beyaz DM, Tarama MF, Mason HD, Bray CS, et al. Differences in clinical and endocrine features between obese and non-obese subjects with polycystic ovary syndrome: an analysis of 263 cases'. Clinical Endocrine, 1990; 32(2): 213–220.

42. Smith S. Polycystic Ovary Syndrome. Postgraduate Obstetrics&Gynecology, 2005; 25: 1–7.

43. Harris C, Cheung T. PCOS Diet Book. Thorsons Publishing, London, 2002; p:368.

44. Ruth Clapauch R, Mattos TM. Triplet pregnancy after metformin in a woman with polycystic ovary syndrome, 2008; 89:1260.

45. Legro RS. Polycystic Ovary Sendrome: Current and future treatment paradigms. Am J Obstet Gynecol, 1998; 179:94–100.

46. Legro RS, Kunselman AR, Dudson WC, Dunaif A. Prevelence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndome: a prospective, controled study in 254 affected women. J Clin Endocrinol Metab, 1999; 84:165-9.

47. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevelence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome.Diabetes Care, 1999; 22:141-6.

48. Solomon CG, Hu FB, Dunaif A, Rich-Edwards J, Willet WC, Hunter DJ, et al. Long or highly irregular menstrual cycles as a marker for risk of type 2 diabetes mellitus. Jama, 2001; 286:2421-6.

49. Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A. Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance and /or hyperinsulinemia. J Clin Endocrinol Metab, 1987; 65:499-507.

50. Dunaif A. Diabetes mellitus and polycystic ovary syndrome. In Dunaif A, Givens JR, Hasetline F, Merriam G(eds). Current instuties in endocrinology and metabolism: Polycystic ovary syndrome. Cambridge, MA: Blackwell Scientific, 1992; 34: 347-358.

51. Ovalle F, Aziz R. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. Fertil Steril, 2002; 77: 1095-1052.

52. Ehrmann DA, Sturis J, Byme MM, Karrison T, Rosenfield RL, Polonsky KS. Insulin secretory defects in polycystic ovary syndrome: Relationship to insulin sensitivity and familiy history of non insulin dependent diabetes mellitus. J Clin Invest, 1995; 96:520-527.

53. Norman RJ, Masters S, Hague W. Hyperinsulinemia is common in familiy members of women with polycystic ovary syndrome. fertil Steril, 1994; 66:942-947.

54. Yıldız BO, Yaralı H, Oğuz H, Bayraktar M. Glucose intolerance, insulin resistance and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab, 2003; 88:2031-2036.

55. Legro RS, Bentley-Lewis R, Driscol D, Wang SC, Dunaif A. Insulin resistance in the sisters of women with polycystic ovary syndrome: Association with hyperandrogenemia rather than menstrual irregularity. J Clin Endocrinol Metab, 2002; 87:2128-2133.

56. McDonough PG, Mahesh VB, Ellegood JO. Steroid FSH and LH profiles in identical twins with polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol, 1972; 113:1072-1078.

57. Hulton C, Clark F. Polycystic ovarian syndrome in identical twins. Postgrad Med J, 1984; 60:4-65.

58. Jahanfar S, Eden JA, Warren P, Seppala M, Nguyen TV. A twin study of polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, 1995; 63:478-486.

59. Govind A, Obhrai MS, Clayton RN. Policystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: Analysis of 29 polycystic ovary syndrom and 10 control families. J Clin Endocrinal Metab, 1999; 84:38-43.

60. Gharani N, Waterworth DM, Williamson R, Franks S. 5'polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab, 1996; 81:4174.

61. Witchel SF, Lee PA, Suda-Hartman M, Smith R, Hoffman EP. 17 alpha-hydoxylase/17,20-lyase dysregulation is not caused by mutations in coding regions of CYP17. Pediatr Adolesc Gynecol, 1998; 11:133-137.

62. Escobar-Moreale HF, San milian JL, Smith RR, Sancho J, Witchel SF. The presence of the 21hydoxilase deficiency carrier carrier status in hirsute women: phenotype-genotype correlations. Fertil Steril, 1999; 72:629-638.

63. Witchel SF, Aston CE. The role of hetterozygosity for CYP21 in the polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab, 2000; 13:1315-1317.

64. Mifsud A, Ramirez S, Yong EL. Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab, 2000; 85:3484-3488.

65. Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M, Dewailly D, Soudan B, Hammond GL. Human sex hormonebinding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. J Clin Invest, 2002; 109:973-981.

66. San Milian JL, Sancho J, Calvo RM, Escobar-Morreale HF. Role of the pentanucleotide (tttta)(n) polymorphism in the prometer of the CYP1 la gene in the pathogenesis of hirsutism. Fertil Steril, 2001; 75:797-802.

67. Tucci S, Futterweit W, Concepcion ES, Greenberg DA, Villanueva R, Davies TF, et al. Evidence of association of polycystic ovary syndrome in caucassion women with a marker at the insulin gene locus. J Clin Endocrinol Metab, 2001; 86:446-449.

68. Korhonen S, Rompannen EL, Hiltunen M, Mannermaa A, Punnonen K, Heinonen S, et al. Lack of association between C-850T polymorphism of the gene encoding tumor necrosis factor-alpha and polycystic ovary syndrome. Gynelogical Endocrinol, 2002; 16:271-274.

69. Tong Y, Liao WX, Roy AC, Ng SC. Association of Acd polymorphisim in the FSH beta gene with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, 2000; 74:1233-1236.

70. Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M. Mutation screening and isoform prevelence of the FSH receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab, 1999; 51:97-99.

71. Legro RS, Muhleman DR, Comings DE, Lobo RA, Kovacs BW. A dopamine D3 receptor genetype is associated with hyperandrogenetic chronic anovulation and resistant to ovulation induction with clomiphene citrate in fanele hispanics. Fertil Steril, 1995; 63:779-784.

72. Urbanek M, Legro RS, Drisscol DA, Azziz R, Ehrmann DA, Norman RJ, et al. Thirty – seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: Strongest evidence for linkage is with follistatin. proc Nati Acad Sci USA, 1999; 96:8573-8578.

73. Urbanek M, Wu X, Vickery KR, Kao LC, Christenson LK, Schneyer A, et al. Allelic variants of the follistatin gene in polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab, 2000; 85:4455-4461.

74. Unluturk U, Harmanci A, Kocaefe C, Yildiz BO. The Genetic Basis of the Polycystic Ovary Syndrome: A Literature Review Including Discussion of PPAR-gamma. February 21, 2007; 49109.

75. Dziegielewska KM, Matthews N, Saunders NR, Wilkinson G. Alpha2HS-glycoprotein is expressed at high concentration in human fetal plasma and cerebrospinal fluid. Fetal Diagn Ther, 1993; 8:22–27.

76. Mizuno M, Farach-Carson MC, Pinero GJ, Fujisawa R, Brunn JC, Seyer JM, et al. Identification of the rat bone 60K acidic glycoprotein as alpha 2HS glycoprotein. Bone Miner, 1991; 13:1–21.

77. Terkelsen OB, Jahnen-Dechent W, Nielsen H, Moos T, Fink E, Nawratil P, et al. Rat fetuin: distribution of protein and mRNA in embryonic and neonatal rat tissues. Anat Embryol, 1988; 197:125–133.

78. Lebreton JP, Joisel F, Raoult JP, Lannuzel B, Rogez JP, Humbert G. Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. J Clin Invest, 1979; 64:1118-1129.

79. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. Lancet, 2003; 361:827-833.

80. Jahnen-Dechent W, Schinke T, Trindl A, Müller-Esterl W, Sablitzky F, Kaiser S. Cloning and targeted deletion of the Mouse fetuin gene. J. Biol. Chem, 1997; 272:31496–31503.

81. Price PA, Lim JE. The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex, J. Biol. Chem, 2003; 278:22144–22152.

82. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein a2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification, J. Clin. Invest, 2003; 112:357–366.

83. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzinger J, Yamamoto K, Renne T, et al. Structural basis of calcification inhibition by a2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles, J. Biol. Chem, 2003; 278:13333–13341.

84. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein alpha 2-Heremans Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. J Clin Invest, 2003; 112:357–366.

85. Demetriou M, Binkert C, Sukhu B, Tenenbaum HC, Dennis JW. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. J Biol Chem, 1996; 271:12755–12761.

86. Auberger P, Falquerho L, Contreres JO, Pages G, Le Cam G, Rossi B, et al. Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity, Cell, 1989; 58:631–640.

87. Mathews ST, Srinivas PR, Leon MA, Grunberger G. Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase, Life Sci, 1997; 61:1583–1592.

88. Mathews ST, Chellam N, Srinivas PR, Cintron VJ, Leon MA, Goustin AS, et al. a2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor, Mol. Cell. Endocrinol, 2000; 164:87–98.

89. Human Chromosome 3: 186,612,923-186,621,318 URL: http://www.ensembbl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core:g=ENSG00000145192;r=3 : 18 6612923-186621318, 2020.

90. Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. Am J Hum Genet, 2000; 67(6):1470-80.

91. Osawa M, Umetsu K, Sato M, Ohki T, Yukawa N, Suzuki T, et al. Structure of the gene encoding human alpha 2-HS glycoprotein (AHSG), Gene, 1997; 196:121-125.

92. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B, DialGene C. Gene polymorphism association studies in dialysis: the nutrition-inflammation axis. Semin Dial, 2005; 18:322-330.

93. ALFA: Allele Frequency Aggregator. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=Ahsg. March 10, 2020

94. Aliases for AHSG Gene. URL: http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AHSG, 2017.

95. PureLink Genomic DNA Kits.URL:https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf, 2012.

96. Temizkan G, Yılmazer S, Öztürk M, Arı Ş, Ertan H, Sarıkaya A, ve ark. Polimeraz Zincir Raksiyonu Oluşum Mekanizması. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. baskı, İstanbul: Nobel matbaacılık, 2004; 102.

97. Çelik M.Y. Biyoistatistik Araştırma İlkeleri (Ders Kitabı), 1. Baskı; D.Ü. Rektörlüğü Basımevi, 1999.

98. Vörös K, Graf L Jr, Prohaszka Z, Graf L, Szenthe P, Kaszas E, et al. Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction. European Journal of Clinical Investigation, 2011; 41:703–709.

99. Akbas H, Kahraman S, Sak S, Akkafa F. Minor variant of AHSG gene 767C>G polymorphism may decrease the risk of gestational diabetes mellitus. J Obstet Gynaecol, 2020; 40(3):303-307.

100. Xu Y, Xu M, Bi Y, Song A, Huang Y, Liu Y, et al. Serum fetuin-A is correlated with metabolic syndrome in middle-aged and elderly Chinese. Atherosclerosis, 2011; 216:180–186.

101. Siddiq A, Lepretre F, Hercberg S, Froguel P, Gibson F. A synonymous coding polymorphism in the alpha2-Heremans-schmid glycoprotein gene is associated with type 2 diabetes in French Caucasians. Diabetes, 2005; 8:2477–2481.

102. Temesszentandrasi GVK, Markus B, Borocz Z, Kaszas E, Prohaszka Z, Falus A, et al. Human fetuin-A Rs4918 polymorphism and its association with obesity in healthy persons and in patients with myocardial infarction in two Hungarian Cohorts. Medical Science Monitor, 2016; 22: 2742–2750.

103. Andersen G, Burgdorf KS, Sparsø T, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T, et al. AHSG tag single nucleotide polymorphisms associate with type 2 diabetes and dyslipidemia: studies of metabolic traits in 7,683 white Danish subjects. Diabetes, 2008; 57(5):1427-1432.

104. Teo AK, Gupta MK, Doria A, Kulkarni RN. Dissecting diabetes/metabolic disease mechanisms using pluripotent stem cells and genome editing tools. Mol Metab, 2015; 4(9):593-604.

105. Dahlman I, Eriksson P, Kaaman M, Jiago H, Lindgren C, Kere J, et al. alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein gene polymorphisms are associated with adipocyte insulin action. Diabetologia, 2004; 47(11):1974-1979.

8. EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 21/02/2019-E.8245

HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ Etik Kurul Kararı	
TARİH	: 11.02.2019
OTURUM	: 02
SAAT	: 13:00

HRÜ/19.02.15	**Karar:** Üniversitemiz Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Halit AKBAŞ'ın yürütücüsü olduğu **"Polikistik Over Sendromlu Hastalarda AHSG (Alpha-2 Heremans Schmid Glycoprotein) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması"** başlıklı çalışmaya Etik Kurul onayı verilmesine, Oy birliği ile karar verilmiştir. **ASLI GİBİDİR** **Prof. Dr. Zehra YILMAZ** **Etik Kurul Başkanı**

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ÇALIŞMASI ORİJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

Öğrencinin
Numarası : **175308002**
Adı, Soyadı : **Esma KAPLANER**
Anabilim Dalı : **Tıbbi Biyoloji**
Programı : **Yüksek Lisans**
Tezin Adı : **"POLİKİSTİK OVER SENDROMLU HASTALARDA AHSG (ALPHA-2 SCHMİD GLYCOPROTEİN) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI"**

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisana Tez çalışmamın; ***kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç*** kısımlarından oluşan toplam 57 sayfalık kısmına ilişkin, 10/10/2020 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, benzerlik oranı % 22'dir.

Uygulanan filtrelemeler:
1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
2- Kaynakça hariç
3- Alıntılar hariç
4- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orijinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntıların bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden her hangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 10/10/2020

Tezi Hazırlayan Öğrencinin
Adı-Soyadı: Esma KAPLANER
İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. …./…../20…

Danışmanın
Unvanı-Adı-Soyadı:
İmzası:

POLİKİSTİK OVER SENDROMLU HASTALARDA AHSG (ALPHA-2 HEREMANS SCHMİD GLYCOPROTEİN) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%22	%7	%3	%18
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Harran Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%15
2	toad.halileksi.net İnternet Kaynağı	%2
3	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
5	Submitted to TechKnowledge Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
7	ginecologia.net İnternet Kaynağı	<%1
8	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015	<%1

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10360422
Yazar Adı / Soyadı	ESMA KAPLANER
Orcid	
T.C.Kimlik No	47431043534
Telefon	5551794179
E-Posta	esmakplnr@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	POLİKİSTİK OVER SENDROMLU HASTALARDA AHSG(ALPHA-2HEREMANS SCHMİD GLYCOPROTEİN) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI
Tezin Tercümesi	INVESTIGATION OF AHSG(ALPHA-2 HEREMANS SCHMID GLYCOPROTEIN) GEN POLYMORPHISMSIN WITH POLICISTIC OVER SYNDROME
Konu	Tıbbi Biyoloji = Medical Biology
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2020
Sayfa	57
Tez Danışmanları	PROF. DR. HALİT AKBAŞ
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	

13.10.2020

İmza:.....