

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ (BAP)
PROJE KESİN RAPORU

PROJE KODU	02/2015-03
PROJE TÜRÜ	(X) Bağımsız Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) () Yüksek Lisans () Doktora () Tıpta Uzmanlık () Altyapı Projeleri () Çok Disiplinli Araştırma Projeleri () Sanayi İşbirliği Projeleri
PROJE ADI	İnfertilite Hastalarında Angiotensin Converting Enzim (ACE) Polimorfizminin İncelenmesi
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ	Prof.Dr. Aymelek GÖNENÇ
PROJE EKİBİ	Prof.Dr. Aymelek GÖNENÇ Prof.Dr. Ali ERGÜL Doç.Dr. Zehra Candan İLTEMİR DUVAN Arş.Gör. Taylan TURAN Uzm. Biyolog Aslıhan PEKEL
FAKÜLTE/ENSTİTÜ/YÜKSEK OKUL	Eczacılık Fakültesi
BÖLÜM/ANABİLİM/BİLİM DALI	Temel Eczacılık Bilimleri/Biyokimya ABD
RAPOR TARİHİ	01.11.2016

22 sayfadan oluşan bu rapordaki bilgilerin/belgelerin doğruluğunu kabul ediyorum.

İmza:

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. PROJE RAPORU.....	3
2. PROJE BÜTÇESİ ÖZET BİLGİLERİ.....	20
3. PROJE ÇIKTILARI	21
4. PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ TARAFINDAN YAPILACAK GENEL DEĞERLENDİRME	22

1. PROJE RAPORU

Özet

Çiftlerin çocuk sahibi olmayı istemelerine ve düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen en az bir yıl süreyle gebelik elde edememeleri olarak tanımlanan infertilite, üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10-15' ini etkileyen bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir glikoprotein (dipeptit karboksipeptidaz) olan Angiotensin Converting Enzim (ACE), endotelial hücrelerde, akciğerlerde ve plazmada bulunmaktadır. Renin-Angiotensin-Aldosteron sisteminde önemli bir enzim olan ACE, Anjiyotensin I' in fizyolojik olarak aktif formu olan oktapeptit yapısındaki Anjiyotensin II' ye çevrilmesinde görev almaktadır. Anjiyotensin II, adrenal korteksten aldosteron sekresyonunu uyarmakta ve sıvı-elektrolit dengesi ile sistemik kan basıncının düzenlenmesinde kuvvetli bir vazokonstriktör olarak görev almaktadır. ACE geninin fertilitede önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. ACE ve ürünlerinin in vitro ovaryum endotelinin anjiyojenezi, mayozun devamı, steroidlerin oluşumu ve foliküler büyüme ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. İnsan ACE geninin intron 16 bölgesinde polimorfik I/D değişkenliğinin olduğu daha önceki bilimsel çalışmalar ile gösterilmiştir. Literatürde, ACE gen polimorfizmi ile erkek infertilitesi arasında nasıl bir ilişki olduğuna dair yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak, kadınlarda infertilitenin önemli bir kısmını oluşturan açıklanamayan infertilite ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, toplumumuzda açıklanamayan infertilite hastalarında ACE gen polimorfizmini tespit etmek ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırarak gen polimorfizmi ve infertilite arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Ayrıca açıklanamayan infertilite olgularında serum ACE ve Anti-Müllerin Hormon (AMH) düzeyleri ölçülmüştür. ACE geni I/D polimorfizmi ve infertilite riski arasındaki ilişki incelendiğinde, ID genotipi referans kabul edildiğinde, DD genotipine sahip olan kadınların açıklanamayan infertiliteye sahip olma riski 2.33 kat daha fazla olarak bulunmuştur (DD vs. ID: risk oranı [OR] = 2.33, 95% güven aralığı alt ve üst sınır [CI] (0,88-6,19); p=0,086. Bu bulgu, DD genotipinin açıklanamayan infertilite için yüksek risk grubu olabileceğini göstermektedir. Bu bulguları doğrulamak için daha büyük popülasyonlar ile yeni çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Açıklanamayan infertilite, Angiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE), Polimorfizm, Anti-Müllerin Hormon (AMH)

Abstract

Infertility defined conventionally as the inability or failure of a couple to initiate a pregnancy after at least a year of unprotected sexual intercourse emerges as a problem that effect approximately %10-15 of couples in reproductive age. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) which is a glycoprotein (dipeptide carboxypeptidase), located in endothelial cells, lungs and plasma. ACE is a significant component of the Renin-Angiotensin-Aldosterone system which catalyzes the conversion of Angiotensin I to its physiologically active form Angiotensin II that has the octapeptide structure. Angiotensin II stimulates the aldosterone secretion from the adrenal cortex and acts as a potent vasoconstrictor in the regulation of fluid and electrolyte balance with systemic blood pressure. ACE gene is considered to have an important role in fertility. The ACE and its products are associated with the angiogenesis of ovarian endothelium in vitro and the resumption of meiosis, steroid genesis and follicular growth. The insertion/deletion (I/D) polymorphism within the intron 16 region of ACE gene has been recently identified. There has been lots of studies in the literature concerning how ACE gene polymorphism and male infertility are related with each other. But, there have not any study associated with unexplained infertility that has the most remarkable ratio in female infertility. The main aim of this study is that both identify the ACE gene polymorphism in patients with unexplained infertility in our society and show whether there is any relationship between gene polymorphism and infertility by comparing with healthy female controls. In addition to this, serum ACE and Anti-Müllerian Hormon (AMH) levels were measured in unexplained infertility.

When the relationship were analyzed between ACE gene I/D polymorphism and infertility risk, and ID genotype were chosen as a reference, it was found to be 2.33 times more risk of unexplained infertility that the women have DD genotype (DD vs. ID: odds ratio [OR] = 2.33, 95% confidence interval [CI] (0,88-6,19); $p=0,086$. This finding indicates that DD genotype may be high risk group for unexplained infertility. Further studies are warranted to confirm this finding, especially with a larger population.

Keywords: Unexplained infertility, Angiotensin Converting Enzyme (ACE), Polymorphism, Anti-Müllerian Hormon (AMH)

Projenin Amacı, Önemi, Kapsamı ve Yapılan Çalışmaların Belirtilmesi

İnfertilite, çiftlerin çocuk sahibi olmayı istemelerine ve düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen en az bir yıl süreyle gebelik elde edememeleri olarak tanımlanmaktadır (1-4). Üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10-15' ini etkileyen bir problem olarak karşımıza çıkan (2,4) infertilitenin bilinen nedenleri arasında hormonal, yapısal ve genetik anormallikleri sayabiliriz (5,6). Cinsiyetin infertilite üzerindeki etkisi incelendiğinde; erkeğe ait nedenlerle ortaya çıkan infertilitenin %30-40 oranında, kadına ait infertilitenin %40-50, erkek ve kadın faktörünün birlikte bulunduğu infertilitenin de %25 civarında olduğu saptanmıştır (4). Bunun yanı sıra, tüm araştırmalara rağmen infertiliteyi açıklayabilecek bir sebep bulunamamasından dolayı, açıklanamayan infertilite olarak isimlendirilen %10-15' lik paya sahip bir grup daha bulunmaktadır (4). Kadınlardaki en önemli infertilite sebepleri arasında yumurtlama bozuklukları, endometriozis ve tüplerin hasarlı veya tıkalı olması (4) sayılabilirse de, özellikle olgularının önemli bir bölümünde etiyojoli aydınlatılamamıştır.

Anti-Müllerin Hormon (AMH), Transforming growth faktör- b (TGF-b) ailesinin bir üyesi olup kromozom 19' un kısa kolunda lokalizedir. Pro-hormon olarak sentezlenen ve glikoprotein yapıda olan AMH etkilerini biyolojik aktif olan C terminal yıkım ürünü üzerinden gösterir. Over rezervin değerlendirilmesinde önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir (7).

Bir dipeptit karboksipeptidaz olan Angiotensin Converting Enzim (ACE), endotelial hücrelerde, akciğerlerde ve plazmada bulunmaktadır (8). Vasküler endotelial hücreler tarafından sentezlenen ACE, sınıf-1 integral ektoenzim olarak plazma membranında eksprese edilmektedir (9). ACE gen ekspresyonu hakkında hala büyük ölçüde bilinmeyenler olmasına karşın, dokuya özgü olabileceği düşünülmektedir (10). Renin-Anjiyotensin-Aldosteron sisteminde önemli bir enzim olan ACE, Anjiyotensin I' in fizyolojik olarak aktif formu olan oktapeptit yapıdaki Anjiyotensin II' ye çevrilmesinde görev almaktadır (11). Anjiyotensin II, adrenal korteksten aldosteron sekresyonunu uyarmakta ve sıvı-elektrolit dengesi ile sistemik kan basıncının düzenlenmesinde kuvvetli bir vazokonstriktör olarak görev almaktadır (12).

İnsan ACE geni kromozom 17q23 de lokalizedir ve burada klonlanır (13). ACE geni toplamda 26 ekson ve 25 intron bölgesinden oluşmaktadır (11). İnsan ACE geninin intron 16 bölgesinde polimorfik insersiyon/delesyon (I/D) değişkenliğinin olduğu daha önceki bilimsel çalışmalar ile gösterilmiştir (9,13-16). 78 çeşit polimorfizm saptanan (10) ACE geninin fertilitede önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (17).

Literatürde, ACE gen polimorfizmi ile erkek fertilitesi arasındaki ilişkiye yönelik yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. 2008 yılında ülkemizde yapılan bir çalışmada, Azospermi, Oligospermi ve son 5 yıl içerisinde çocuk sahibi olmuş erkek bireylerin ACE polimorfizmleri analiz edilmiştir. Azospermik, oligospermik ve kontrol gruplarındaki polimorfizmler, genotip ve alel frekansları açısından kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca DD polimorfizm oranının, normal ve azospermli erkeklere kıyasla oligospermi tanısı konan bireylerde düşük olduğu bulunmuş ancak istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (8). Toplam 405 erkek ile yapılan, 2012 yılına ait bir diğer çalışmada erkekler sağlıklı, astenozospermi, astenoteratozozospermi ve oligoastenoteratozozospermi olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. I/I genotipi 182 erkekte tayin edilmiş ve sırasıyla %76.5-%47.4-%39.8 ve %17.6 olarak bulunmuştur. I/D genotipi 133 erkekte belirlenmiş ve sırasıyla %13.7-%42.3-%27.5 ve %47.2 olarak bildirilmiştir. D/D genotipi ise 90 erkekte saptanmış ve sırasıyla %9.8-%10.3-%32.7 ve %35.2 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, D/D ve I/D genotipi gösteren erkeklerin sperm sayısı ve hareketliliğinde önemli derecede düşüş olduğu bildirilmiştir (11).

Literatürde erkek fertilitesi ve ACE polimorfizmi arasındaki ilişkiyi değerlendirmeye yönelik yapılmış çalışmaların sayısını arttırmak mümkündür. Kadınlarda endometriozis hastalarında ACE Single Nükleotit Polimorfizmi (SNP) ile yapılmış bir çalışma bulunmakla birlikte (18), açıklanamayan infertilite ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, toplumumuzda açıklanamayan infertilite hastalarında ACE gen polimorfizmini tespit etmek ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırarak gen polimorfizmi ve infertilite arasındaki olası ilişkiyi irdelemek amaçlanmıştır.

Projenin Yöntemi

Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri, Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Ünitesine başvuran açıklanamayan infertilite teşhisi konulan kadın hasta ve sağlıklı kontrollerden sağlanmıştır. Çalışma öncesinde, Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Karar No: 2015/01, Sayı No: 99950669/10 Tarih: 09.01.2015). Çalışmayla ilgili olarak aday katılımcı ön bilgilendirilmesi yapılmıştır. Kabul edenlere çalışma ile ilgili ayrıntılı bilgiler verilmiş ve birer anket uygulanmıştır. Çalışmaya, açıklanamayan infertilite tanısı almış 47 hasta dahil edilmiştir. Total hasta grubunun yaş ortalaması $32,2 \pm 4,7$ ve vücut kitle indeksi ortalaması $25,3 \pm 10,0 \text{ kg/m}^2$ 'dir. Kontrol grubu, herhangi bir sistematik hastalığı bulunmayan, 41 sağlıklı kişiden (Erkek faktörü) oluşturulmuştur. Kontrol grubunun yaş ortalaması ise $30,4 \pm 4,8$ ve vücut kitle indeksi ortalaması $24,8 \pm 3,4 \text{ kg/m}^2$ olarak hesaplanmıştır. Hasta ve sağlıklı kontrollere ait kan örnekleri K_3EDTA 'lı tüplere alınarak çalışılacak güne kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için, GeneMatrix Quick Blood DNA Purification Kit (Cat No: E3565) kullanılmıştır. DNA izolasyonu sonucu, DNA kalite ve miktar ölçümleri ; %1'lik Agaroz Jel ve Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Kite ait protokol şu şekildedir;

- Kitin kutusunda bulunan spin kolonlar çıkarılarak, $40\mu\text{L}$ Buffer QB ilavesiyle kolonların aktifleştirilmesi sağlanır ve lizat transfer edilinceye kadar oda sıcaklığında bekletilir. (Bu aşamada membranın tamamen ıslanması ve DNA'nın maksimum düzeyde bağlanması amacıyla Buffer QB'yi membranın tam ortasından ilave etmek esastır).
- Yeni bir ependorf tüpüne ($1.5\text{--}2 \text{ mL}$), EDTA'lı tüpte bulunan kan örneğinden $200\mu\text{L}$ alınır. (Eğer kan örneğinin hacmi $200 \mu\text{L}$ 'den az ise PBS (Phosphate-Buffered Saline) ilave edilerek hacim $200 \mu\text{L}$ 'ye tamamlanır).

✓ Steril PBS hazırlamak için;

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na_2HPO_4

0.24 g KH_2PO_4 tartılarak 800 mL distile suda çözülür, HCl ile pH'ı 7.4'e ayarlanır ve distile su ile hacim 1 L'ye tamamlanır.

✓ Eğer downstream uygulamalar için RNA'sız (RNA-free) DNA gerekli ise, $2 \mu\text{L}$ RNase A ilave edilir. Karışım iyice vortekslenir ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.

- Karışıma $10 \mu\text{L}$ Proteinase K eklenir ve daha sonra 200 mL Sol QB Buffer ilave edilir.
- Karışım iyice vortekslenir.
- $10 \text{ dk } 70^\circ\text{C}$ 'de kuru ısı bloğunda inkübe edilir.
- $200\mu\text{L } 96\%$ lık etanol eklenerek dikkatlice pipetaj yapılır.
- Karışım iyice vortekslenir.
- Daha sonra $1 \text{ dk } 12000\text{rpm}$ 'de santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası elde edilen lizat, toplama tüpünün (collection tube) içerisinde yer alan ve Buffer QB ile aktifleştirilen spin kolana transfer edilir.
- $2 \text{ dk } 12000\text{rpm}$ 'de santrifüj edilir. (Santrifüj işlemine bütün lizat kolonu geçinceye kadar devam edilir).
- Santrifüj sonrası alt fazdaki sıvı dökülür ve kolon, toplama tüpüne yeniden yerleştirilir.
- Kolon $500\mu\text{L}$ Wash QBX1 Buffer ile yıkanır ve $1 \text{ dk } 12000\text{rpm}$ 'de santrifüj edilir.
- Santrifüj beklenirken, Elution Buffer ısınması amacıyla 70°C 'de bulunan kuru ısı bloğuna koyulur.
- Santrifüj sonrası alt süzüntü atılır ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- Kolon bu kez $500\mu\text{L}$ Wash QBX2 Buffer ile yıkanır ve $2 \text{ dk } 12000\text{rpm}$ 'de santrifüj edilir.

- Santrifüj sonrası alt süzöntü atılır ve kolon yeni bir 1.5 mL' lik ependorf üzerine alınır. Kolonda bağlı olan DNA' yı membrandan ayırmak amacıyla önceden 70°C' de ısıtılan Elution Buffer' dan 50-200 µL kolona eklenir ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. (Daha fazla DNA ürünü elde edebilmek amacıyla Elution Buffer önceden 70°C' de ısıtılarak, membrana ve kolonun duvarlarına değdirilmeden direkt olarak membranın merkezinden ilave edilmelidir).
- 1 dk 12000rpm' de santrifüj edilir. Kolondan DNA eldesini arttırmak amacıyla, alt süzöntü (santrifüj sonrası elute olmuş DNA) pipetle çekilerek tekrar kolona bırakılır ve tekrar 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 1 dk 12000rpm' de santrifüj edilir.
- Kolon ependorfun üzerinden alınarak, ependorfun kapağı kapatılır. Elde edilen DNA analiz için hazırdır. Ne zaman kullanılacağına bağlı olarak 2-8 °C ve ya -20 °C' de saklanabilir.

Agaroz Jel Elektrophorezi ve Spektrofotometrik Ölçüm

Hasta ve kontrollere ait DNA' ların izolasyonunu takiben, hem izolasyonun görsel kontrolünü (olup olmadığını) sağlamak, hem de izole edilen DNA örneğinin kalite ve miktarını tespit etmek amacıyla Agaroz Jel Elektrophorezi ve Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümlerin, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü bünyesinde, aşağıdaki prosedürlere göre gerçekleştirilmiştir.

Agaroz Jel Hazırlanması ;

- Gerekli miktarda agaroz tartılarak erlene koyulur.
- Yine gerekli hacimde TBE (Tris-borate-EDTA) Buffer ilave edilir.
- Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyulur.
- Mikrodalga fırın örnek kaynamaya başlayana kadar yüksek ayarda çalıştırılır.
- Aralıklarla erlen mikrodalgadan çıkarılıp çalkalanır.
- EtBr (Etidyum bromür) eklenir ve çalkalayarak tüm çözeltiye dağılması sağlanır.
- Çözelti muslukta biraz soğutulur.
- Agaroz jel yavaş bir şekilde jel tepsisine dökülür, uygun taraklar takılır ve jelin polimerize olması için en az yarım saat beklenir.

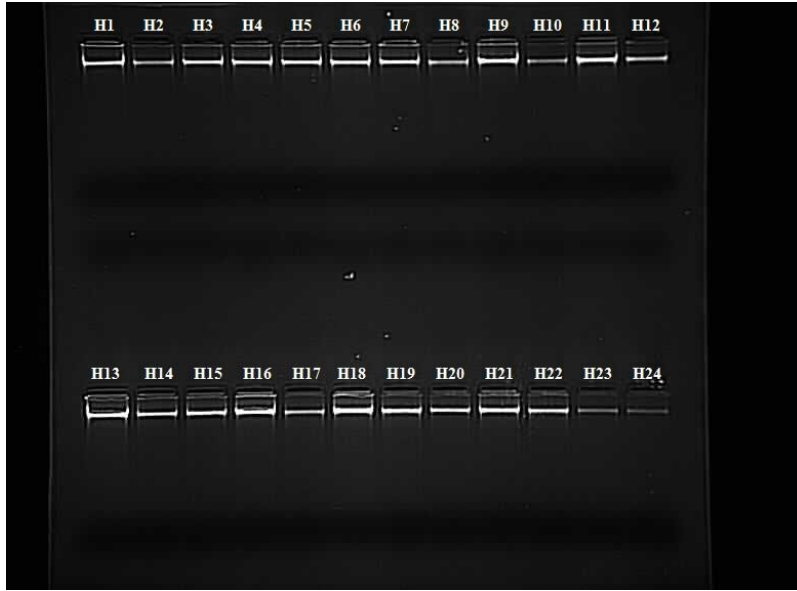
Örneklerin Jele Yüklenmesi ;

- Jel tanka yerleştirilir.
- Tank jelin üstünü kapatacak kadar TBE ile doldurulur.
- PZR ürünlerinde bir kuyucuğa da markır koyulur.
- 80-100 V' da 30-60 dk yürütülür.

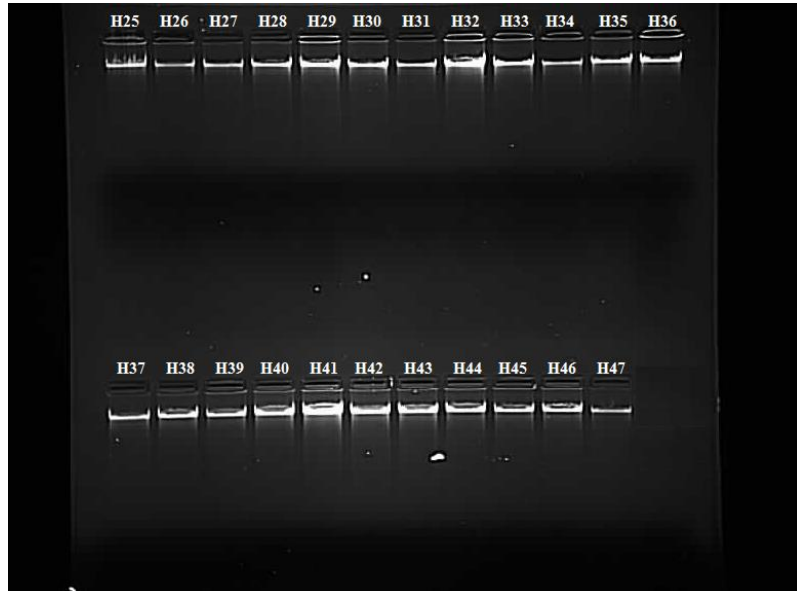
Elde edilen izole DNA örnekleri %1' lik agaroz jelde görsel olarak kontrol edilerek, miktar ve saflık tayinleri ise, Nanodrop ND-1000 spektrofotometre aletinde belirlenmiştir.

Nükleik asitlerin konsantrasyonu genellikle PZR suyuna karşı 260 nm' de absorbans ölçülerek belirlenmektedir. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilebilmektedir. 280 nm, proteinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu ifade ettiği için, A_{260}/A_{280} oranı nükleik asitin saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf bir DNA izoasyonu için bu değer 1.8-2.0 aralığında olmalıdır. 230 nm' de görülen absorbsiyon ise nükleik asitin peptidler, karbonhidratlar, fenoller, aromatik bileşenler ve benzeri diğer safsızlıklarla kontaminasyonunu göstermektedir. Saf örneklerde A_{260}/A_{230} oranı ise 2.0-2.2 aralığında olmalıdır. Bu sebeple DNA' nın saflığı değerlendirilirken, A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları esas alınarak, saflık ve miktar analizleri yapılacaktır.

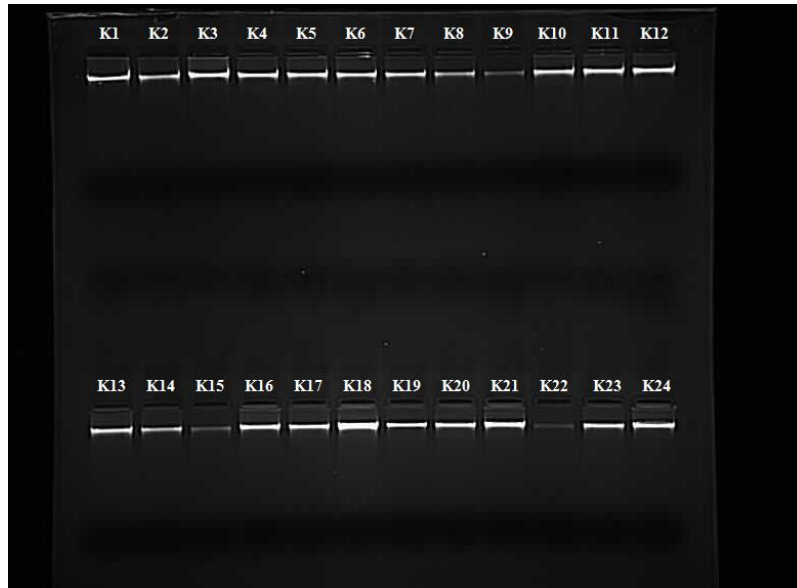
Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarına ait örneklerin DNA izolasyonları gerçekleştirildikten sonra, %1' lik agaroz jel elektrophorez ile görüntülenmeleri sağlanmıştır. Gruplara ait örneklerin DNA izolasyon görüntüleri sırasıyla Şekil 1 (a,b) ve 2 (a,b,c)'de gösterilmiştir.



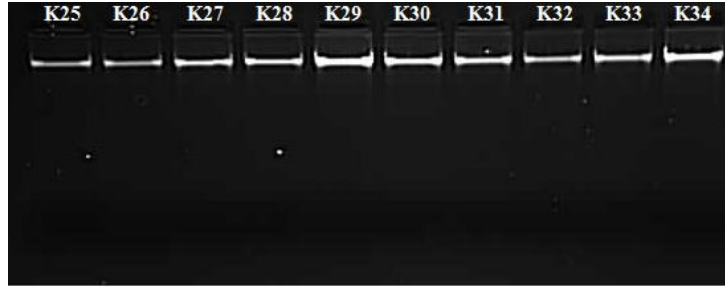
Şekil 1a. (H1-H24) Hasta grubuna ait örneklerin DNA izolasyon görüntüleri (%1'lik agaroz jel)



Şekil 1b. (H25-H47) Hasta grubuna ait örneklerin DNA izolasyon görüntüleri (%1'lik agaroz jel)



Şekil 2a. (K1-K24) Kontrol grubuna ait örneklerin DNA izolasyon görüntüleri (%1'lik agaroz jel)



Şekil 2b. (K25-K34) Kontrol grubuna ait örneklerin DNA izolasyon görüntüleri (%1'lik agaroz jel)



Şekil 2c. (K35-K41) Kontrol grubuna ait örneklerin DNA izolasyon görüntüleri (%1'lik agaroz jel)

Çalışma grubuna ait izole DNA'ların miktar ölçümleri Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır, sonuçlar Tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo 1. İzole edilen hasta ve kontrol gruplarına ait DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri (ND-1000)

No	Örnek Adı	ng/ μ L	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230
1	H1	54,8	24,138	13,336	1,81	1,61
2	H2	39,0	26,358	14,808	1,78	1,44
3	H3	56,8	24,426	12,924	1,89	1,68
4	H4	28,6	29,125	15,575	1,87	1,76
5	H5	41,3	26,194	14,552	1,80	1,41
6	H6	31,1	30,378	17,359	1,75	1,87
7	H7	56,2	28,869	16,128	1,79	1,61
8	H8	41,5	26,682	14,906	1,79	1,65
9	H9	61,0	24,812	13,633	1,82	1,54
10	H10	39,2	20,224	12,183	1,66	1,39
11	H11	81,9	26,224	14,330	1,83	1,44
12	H12	27,8	26,548	13,545	1,96	1,17
13	H13	80,4	22,837	12,278	1,86	1,45
14	H14	57,7	25,192	13,842	1,82	1,29
15	H15	75,0	27,842	14,501	1,92	1,79
16	H16	38,9	26,613	14,156	1,88	1,17
17	H17	57,4	24,867	14,129	1,76	1,34
18	H18	27,4	25,000	13,298	1,88	1,23
19	H19	45,3	30,306	16,120	1,88	1,48
20	H20	67,9	32,182	17,028	1,89	1,78
21	H21	81,1	31,550	16,347	1,93	1,91
22	H22	52,7	24,952	13,710	1,82	1,39
23	H23	43,2	27,005	15,344	1,76	1,59
24	H24	64,6	31,550	16,347	1,93	1,84
25	H25	30,3	34,692	18,652	1,86	1,18
26	H26	31,0	27,869	15,397	1,81	1,50
27	H27	45,3	29,892	15,329	1,95	1,56
28	H28	72,9	35,360	18,321	1,93	1,67
29	H29	52,1	20,843	11,452	1,82	1,31

30	H30	33,0	26,801	14,807	1,81	1,61
31	H31	90,2	38,011	19,695	1,93	1,97
32	H32	55,0	28,325	14,908	1,90	1,48
33	H33	22,0	26,347	14,165	1,86	1,35
34	H34	63,9	32,474	17,941	1,81	1,24
35	H35	62,3	35,721	18,801	1,90	1,87
36	H36	33,4	26,369	14,982	1,76	1,13
37	H37	44,4	28,135	15,459	1,82	1,52
38	H38	73,6	29,107	15,565	1,87	1,39
39	H39	109,1	24,547	13,414	1,83	1,31
40	H40	61,2	26,466	14,622	1,81	1,35
41	H41	62,4	32,543	17,686	1,84	1,33
42	H42	71,2	21,758	12,224	1,78	1,29
43	H43	42,1	29,851	16,492	1,81	1,34
44	H44	55,3	31,694	17,510	1,81	1,64
45	H45	32,9	20,189	12,089	1,67	1,15
46	H46	111,8	37,597	19,998	1,88	1,71
47	H47	54,0	22,944	13,111	1,75	1,44
48	K1	40,2	25,487	14,818	1,72	1,44
49	K2	78,2	33,939	18,345	1,85	1,59
50	K3	52,7	30,632	16,924	1,81	1,37
51	K4	68,5	27,074	15,210	1,78	1,61
52	K5	65,1	24,544	13,412	1,83	1,55
53	K6	51,4	25,493	14,322	1,78	1,11
54	K7	60,8	27,315	14,845	1,84	1,43
55	K8	39,3	27,464	15,173	1,81	1,16
56	K9	75,7	30,479	16,475	1,85	1,66
57	K10	39,3	33,359	18,741	1,78	1,54
58	K11	56,7	28,212	15,587	1,81	1,42
59	K12	91,6	22,696	12,628	1,85	1,56
60	K13	45,8	24,715	14,123	1,75	1,58
61	K14	30,3	32,342	17,870	1,81	1,79
62	K15	83,9	29,782	16,364	1,82	1,74
63	K16	56,9	21,319	11,977	1,78	1,37
64	K17	50,4	30,856	16,861	1,83	1,42
65	K18	91,3	24,616	13,525	1,82	1,78
66	K19	63,9	27,979	15,458	1,81	1,51
67	K20	57,2	19,972	11,348	1,76	1,52
68	K21	75,4	26,831	14,906	1,80	1,57
69	K22	74,7	24,449	13,813	1,77	1,66
70	K23	86,6	19,896	10,583	1,88	1,73
71	K24	57,5	31,941	17,359	1,84	1,90
72	K25	70,6	25,813	14,183	1,82	1,70
73	K26	104,4	22,469	12,278	1,83	1,76
74	K27	43,8	27,474	15,263	1,80	1,41
75	K28	67,5	26,203	14,557	1,80	1,60
76	K29	78,7	22,755	12,642	1,80	1,51
77	K30	96,2	26,466	14,542	1,82	1,62
78	K31	37,5	24,758	14,229	1,74	1,15
79	K32	117,0	29,104	15,732	1,85	1,82
80	K33	77,0	21,307	11,643	1,83	1,51
81	K34	45,4	25,031	13,604	1,84	1,51
82	K35	36,6	25,556	14,772	1,73	1,24

83	K36	44,2	30,243	16,348	1,85	1,42
84	K37	108,1	24,764	13,758	1,80	0,54
85	K38	41,1	21,824	11,861	1,84	1,57
86	K39	61,0	34,159	18,666	1,83	1,62
87	K40	56,6	24,751	13,525	1,83	1,60
88	K41	45,1	29,338	16,861	1,74	1,46

PCR Reaksiyonlarının Hazırlanması ve PCR

İnsan ACE genine ait PCR reaksiyonu; 20-150 ng DNA, 5 pmol ileri (forward) primer, 5 pmol ters (revers) primer, 0.5mM toplam dNTP, 0.5 ünite Taq DNA Polymerase (Promega), 25mM MgCl₂, 5µL buffer (5X Buffer) olmak üzere toplam 12µL’ de gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı (Touch down PCR):

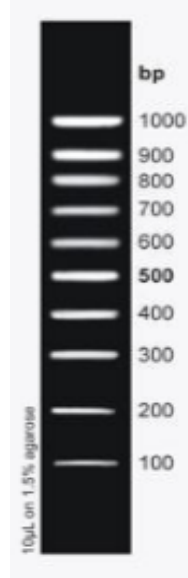
1. 94 °C’ de 3 dk,
2. 94 °C’ de 1 dk
3. 67 °C’ den, 58°C’ ye 1 dk 45sn
4. 72 °C’ de 2 dk
5. 72 °C’ de 10 dk olmak üzere toplam 21 döngü olarak uygulanmıştır. PCR sonrası genotiplere ait PCR ürünleri %2’ lik agaroz jel elektroforezde görüntülenerek bant profilleri belirlenmiştir.

ACE Geni I/D polimorfizmini tayin etmek amacıyla kullanılan primerlere ait bilgiler Tablo 2’ de verilmiştir.

Tablo 2. ACE I/D geni polimorfizm primerlere ait dizi bilgileri

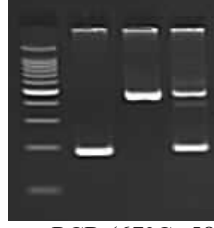
Primerler	Markır dizi (5’-3’)	Kaynaklar
İleri (Forward)	CTGGAGACCACTCCCATCCTTCT	Namazi et al., 2013 (19)
Ters (Reverse)	GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT	Namazi et al., 2013 (19)

Agaroz jel elektroforezde elde edilen bantların kaç baz çiftine karşılık geldiğini belirleyebilmek amacıyla markır kullanılmıştır. Kullanılan markır şekil 3 ‘ de gösterilmiştir.



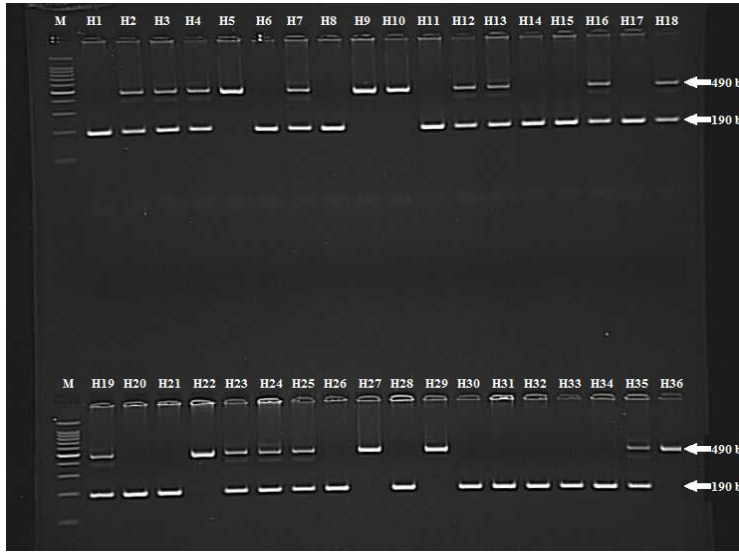
Şekil 3. Çalışmada kullanılan markırın özelliği

İnsan ACE geninde Touch down PCR yöntemi ile II, ID ve DD genotiplerinde optimizasyon reaksiyonları (çeşitli bağlanma sıcaklıkları aralıklarında) gerçekleştirilmiş olup, optimizasyon görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4).

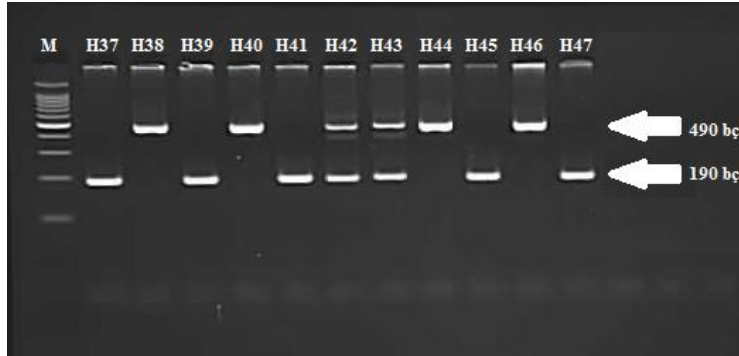


Şekil 4. İnsan ACE geninde Touch down PCR (67°C- 58°C) bant profilleri (%2' lik agaroz jel)

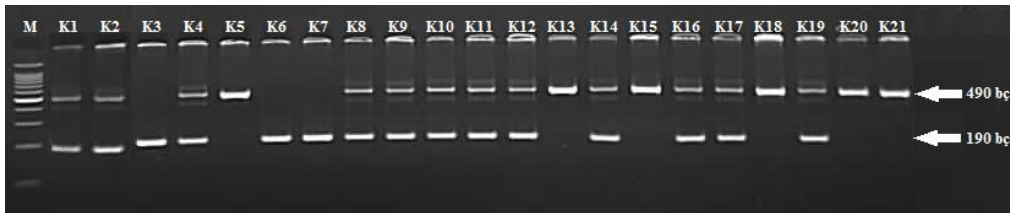
Optimizasyon sonunda, yöntem kısmında belirtilen koşullarda PCR gerçekleştirilmiş olup, PCR sonrası jel görüntüleri Şekil 5 (a,b) ve 6 (a,b)' da gösterilmiştir. 490 baz çifti içeren PCR ürünü II genotipini, 190 baz çifti içeren PCR ürünü DD genotipini ve hem 490 baz çifti hem de 190 baz çiftini birlikte içeren PCR ürünü de ID genotipini göstermektedir (20).



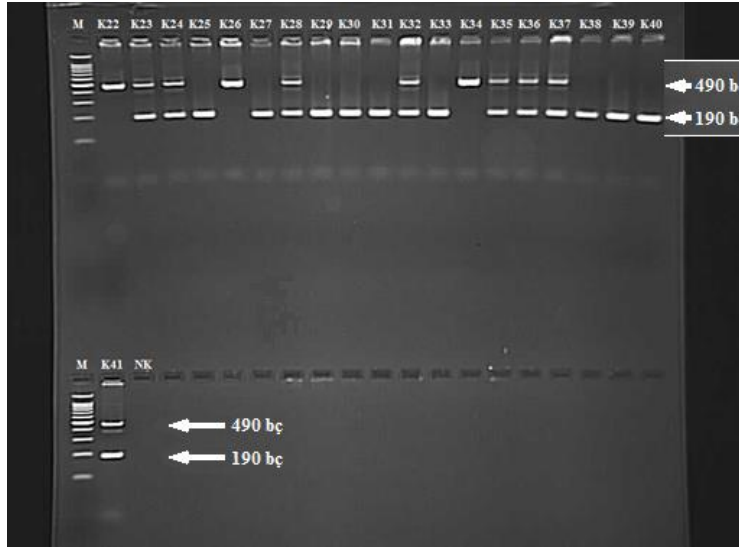
Şekil 5a. (H1-H36) Hasta grubuna ait PCR sonrası jel görüntüleri (M: Markır) (%2' lik agaroz jel)



Şekil 5b. (H37-H47) Hasta grubuna ait PCR sonrası jel görüntüleri (%2' lik agaroz jel)



Şekil 6a. (K1-K21) Kontrol grubuna ait PCR sonrası jel görüntüleri (M: Markır, NK: Negatif Kontrol)



Şekil 6b. (K22-K40) Kontrol grubuna ait PCR sonrası jel görüntüleri (%2' lik agaroz jel)

Serum Örneklerinin Elde Edilmesi

Hasta ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örnekleri 4000 rpm' de 15 dk santrifüj edilerek serum örnekleri elde edilmiştir. Bu serum örnekleri -80°C' de dondurularak çalışılacak güne kadar saklanmıştır.

Serum ACE Düzeyi Tayini

Serum ACE düzeyinin tayini için Eastbiopharm Human ACE ELISA kit (Catalog No: CK-E11125) kullanılmıştır. ACE, Anjiyotensin I' in fizyolojik olarak aktif formu olan Anjiyotensin II' ye çevrilmesinde görev alan önemli bir glikoproteindir. Yöntem ACE tanıyan biotinlenmiş antikorların serumda bulunan ACE' yi yakalaması ve bu antikorların da streptavidin konjuge peroksidaz tarafından tespit edilmesi esasına dayanır. Kit prosedürüne uygun olarak yapılan işlemlerden sonra 450 nm dalga boyunda okuyucuda absorbanslar ölçülmüştür. Konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur ve serum ACE konsantrasyonları standart kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem ile hesaplanmıştır.

Serum AMH Düzeyi Tayini

Serum AMH düzeyinin tayini için Eastbiopharm Human ACE ELISA kit (Catalog No: CK-E11351) kullanılmıştır. AMH, over rezervin değerlendirilmesinde önemli bir glikoproteindir. Yöntem AMH tanıyan biotinlenmiş antikorların serumda bulunan AMH' yi yakalaması ve bu antikorların da streptavidin konjuge peroksidaz tarafından tespit edilmesi esasına dayanır. Kit prosedürüne uygun olarak yapılan işlemlerden sonra 450 nm dalga boyunda okuyucuda absorbanslar ölçülmüştür. Konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur ve serum AMH konsantrasyonları standart kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem ile hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmede SPSS 17.0 paket programı kullanılmıştır. Verilerin normalliği Saphiro-Wilks testi ile sınanmıştır. Veri yapısının normal dağılım göstermesi durumunda incelenen parametrelerin karşılaştırılmasında bağımsız gruplarda T testi, normal dağılım özelliği göstermeyen değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren iki grup arasındaki ortalamalar arası farklılık student t testi ile incelenmiştir. ACE Genotipi ve Alel Frekansı ile hasta ve kontrol grupları arasındaki farklılığının belirlenmesinde ki-kare analizi kullanılmıştır.

Popülasyon genetiği göz önünde bulundurulduğunda, Hardy-Weinberg Dengesi, bir popülasyondaki alel ve genotip oranları arasında bir bağıntı olup, bu oranların genetik dengede

bulunduğunu ve sabit kaldığını varsaymaktadır. Bu sebeple ACE geni I/D polimorfizminin genotip ve alel frekansları Hardy-Weinberg Dengesine göre ki-kare analizi ile değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler %5 hata payı ile incelenmiştir.

Projenin Sonuçları/Bulguları

Çalışma grubuna ait klinik özellikler ve bazı biyokimyasal değerler Tablo 3' de verilmiştir. Yaş, kuatelet indeksi, infertilite süresi, estradiol düzeyi (E₂), TSH düzeyi, üre, glomerüler filtrasyon hızı, kreatinin, AST, ALT ve progesteron düzeyleri açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. FSH ve LH düzeyleri açısından ise p<0,05 düzeyinde anlamlı farklılık bulunmaktadır. İnfertil hastalardaki bu yüksek düzeyler artan infertilite riski sebebiyledir.

Tablo 3. Çalışma grubunun klinik özellikleri

	Kontrol Grubu (N=41)	İnfertil Hasta Grubu (N=47)	p değeri
Yaş (yıl)	30,4±4,8	32,2±4,7	p=0.075
Kuatelet indeksi (kg/m²)	24,8±3,4	25,3±10,0	p=0.762
İnfertilite Süresi (yıl)	4,2±3,4	4,2±3,0	p=0.999
FSH (mIU/mL)	6,3±2,0	7,8±4,2	p=0.042
E₂ (pg/mL)	35,0±15,4	40,4±15,7	p=0.104
TSH (uIU/mL)	2,1±0,9	2,3±1,1	p=0.362
Üre (mg/dL)	20,7±4,2	20,9±5,5	p=0.809
Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR) (mL/dk/1,73m²)	121,05±7,79	116,98±11,91	p=0.058
Kreatinin (mg/dL)	0,61±0,08	0,64±0,10	p=0.132
AST (U/L)	16,1±3,1	18,2±10,0	p=0.197
ALT (U/L)	16,4±6,9	15,9±11,9	p=0.798
LH (uIU/mL)	3,3±2,9	4,9±4,2	p=0.041
Progesteron (ng/mL)	0,64±0,30	0,60±0,27	p=0.596

Çalışma grubuna ait tedavi sonuçları ve siklus özellikleri Tablo 4' de gösterilmiştir. Kullanılan total gonadotropin dozu, endometrium kalınlığı, transfer edilen oosit sayısı, fertilizasyon oranı, total embriyo sayısı ve transfer edilen embriyo sayısı açısından kontrol ve infertil hasta grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. HCG verildiği gündeki E₂ düzeyi ve olgun oosit sayısı açısından infertil hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılıklar bulunmaktadır (p<0,05).

Tablo 4. Çalışma grubunun tedavi sonuçları ve siklus özellikleri

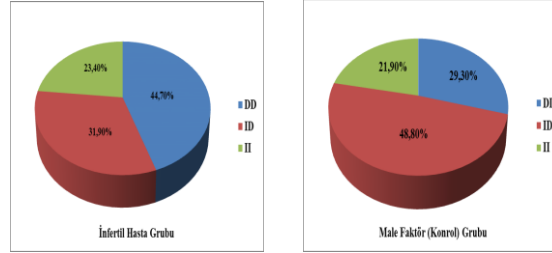
	Kontrol Grubu (N=41)	İnfertil Hasta Grubu (N=47)	p değeri
Kullanılan Total Gonadotropin Dozu (IU)	1528,7±505,1	1598,9±574,7	p=0.547
HCG verildiği gündeki E₂ Düzeyi (pg/mL)	1530,4±715,9	1955,7±852,8	p=0.014
Endometrium Kalınlığı (mm)	10,2±1,9	9,7±2,2	p=0.196
Transfer Edilen Oosit Sayısı	11,3±6,5	12,4±6,3	p=0.420
Olgun Oosit Sayısı	7,6±4,7	9,4±4,6	p=0.028
Fertilizasyon Oranı (%)	71,2±17,2	73,3±15,3	p=0.546
Total Embriyo Sayısı	4,8±2,9	5,9±3,2	p=0.082
Transfer Edilen Embriyo Sayısı	1,71±0,46	1,70±0,46	p=0.958
Klinik Gebelik Oranı (%)	(25/41) %60,98	(20/47) %42,55	p=0.086

PCR sonuçlarına göre ACE I/D genotipinin dağılımı değerlendirildiğinde, hasta grubunda 21 kişi DD, 15 kişi ID ve 11 kişi ise II genotipine sahip iken, kontrol grubunda genotiplerin dağılımı; 12 kişi DD, 20 kişi ID ve 9 kişi II şeklindedir (Tablo 5, Şekil 7). Sağlıklı kişilerde ACE I ve D alellerinin dağılımları açısından farklılık gözlenmemiştir. ACE geni I/D polimorfizminde

genotip frekansları ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldığında, hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 5. Çalışma grubuna ait ACE I/D genotipinin dağılımı

Değişken		İnfertil Hasta Grubu (n=47)	Kontrol Grubu (Erkek Faktörü) (n=41)	X ² Test
ACE Genotipi	DD	21 (%44,7)	12 (%29,3)	X ² =2,974 p=0,226
	ID	15 (%31,9)	20 (%48,8)	
	II	11 (%23,4)	9 (%21,9)	
Alel Frekansı	D	57 (%60,6)	44 (%53,7)	X ² =0,873 p=0,350
	I	37 (%39,4)	38 (%46,3)	



Şekil 7. %ACE genotip dağılımı

Genotip ve alel frekansları değerlendirildiğinde; infertil hasta grubunun genotip dağılımı Hardy Weinberg dengesi içinde değilken ($p<0,05$), sağlıklı kontrollerin genotip dağılımlarının bu denge içinde olduğu saptanmıştır ($p>0,05$) (Tablo 6).

Tablo 6. ACE geni I/D polimorfizminin genotip ve alel frekansları (Hardy-Weinberg)

	Genotip Frekansı			Alel Frekansı		p değeri
	DD	ID	II	D Aleli	I Aleli	
İnfertil Hasta Grubu	17,28 (%36,77)	22,44 (%47,74)	7,28 (%15,49)	%60,64	%39,36	0,0231*
Kontrol Grubu	11,80 (%28,79)	20,39 (%49,73)	8,81 (%21,48)	%53,66	%46,34	0,9025

* İnfertil hasta grubunda genotip ve alel frekansındaki anlamlı farklılık ($p<0,05$)

ACE geni I/D polimorfizmi ve infertilite riski arasındaki ilişki incelendiğinde; ID genotipi referans kabul edildiğinde, DD genotipine sahip olan kadınların açıklanamayan infertiliteye sahip olma riski 2.33 kat daha fazladır (Tablo 7).

Tablo 7. Çalışma grubuna ait ACE I/D genotipinin dağılımı

Değişken		Kontrol Grubu (Erkek Faktörü) (n=41)	İnfertil Hasta Grubu (n=47)	COR (%95 güven aralığı üst ve alt limitler)	p değeri
ACE Genotipi	DD	12 (%29,3)	21 (%44,7)	2.33 (0,88-6,19)	0,086
	ID	20 (%48,8)	15 (%31,9)	1.0(Referans)	
	II	9 (%21,9)	11 (%23,4)	1.63 (0,54-4,93)	0,386
Alel Frekansı	D	44 (%53,7)	57 (%60,6)	1.33 (0,73-2,42)	0,351
	I	38 (%46,3)	37 (%39,4)	1.0(Referans)	

Literatürde, farklı popülasyonlarda ACE I/D polimorfizmi ile çeşitli hastalıkların patojenezi arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Cheng ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, ACE ID polimorfizmi ve akciğer kanseri arasındaki ilişki araştırılmış, sonuçta ACE polimorfizmi ve akciğer kanseri arasında genotip ve alel dağılımı açısından herhangi bir ilişki bulunamamıştır (21). Benzer şekilde, çalışmamızda infertilite hastalarında genotip ve alel dağılımı açısından anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Yapılan genetik bir çalışmada, ACE

genindeki polimorfizmin polikistik over sendromu (PCOS) için bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Jia ve ekibinin yaptığı bu çalışmada, ACE ID polimorfizminin PCOS için artmış bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca popülasyonun yaklaşık %55'inde bulunan D alelinin artan ACE aktivitesiyle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (22). Çalışmamızda DD genotipine sahip olan kadınların açıklanamayan infertiliteye sahip olma riskinin 2.33 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu elde edilen sonuçlar aşağıda bahsedilen çalışmalar ile uyumludur. 2012 yılında Yapıjakis ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada bazal hücreli karsinomda ACE gen polimorfizmi incelenmiş ve ID heterozigotlar ile karşılaştırıldığında DD homozigotlarda 3.06 kat artan kanser riski bulunmuştur. Araştırmacılar düşük ekspresyonda ACE I aleli taşıyan kişilerin bazal hücreli karsinoma yakalanma riskinin düşük olduğunu bildirmişlerdir (23). González-Zuloeta Ladd ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, DD aleli taşıyanların II aleli taşıyanlara kıyasla daha yüksek meme kanseri riskine sahip olduğu gösterilmiştir (24).

Yukarıda bahsedilen bazı literatürlerde, ACE geni I/D polimorfizminin farklı hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda, ACE geni I/D polimorfizmi ile açıklanamayan infertilite arasında ilişkinin bulunmamasının sebebi, kadın infertilitesi olabilir veya çalışma grubunu oluşturan bireylerin sayılarındaki farklılık ya da polimorfik alelin görülme sıklığıyla açıklanabilir. Çalışmamızda ACE geni için infertil hasta grubunun genotip dağılımının istatistiksel olarak Hardy-Weinberg dengesi içinde olmaması istatistiksel sonuçları etkilemiş olabilir düşüncesindeyiz.

Serum ACE düzeyinin belirlenmesine yönelik over hiperstimülasyon sendromu olan hastalarda yapılan bir çalışmada kontrollere kıyasla artmış ACE konsantrasyonu bulunmuşken (25), obez PCOS hastalarında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır (26). Over düzeyinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olan serum AMH düzeyinin PCOS' lu kadınlarda 2-4 kat yüksek olduğunu gösteren çalışmalar mevcutken (27-28), PCOS haricindeki infertilitede önemli derecede düştüğü bildirilmiştir (29).

Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla açıklanamayan infertilite olgularında serum ACE düzeyi azalmış olmasına rağmen bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Benzer şekilde hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında serum AMH düzeyleri açısından istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 8).

Tablo 8. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında serum ACE ve AMH düzeylerinin karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (N=41)	İnfertil Hasta Grubu (N=47)	p değeri
ACE (U/L)	113,05±75,26	107,73±71,92	p=0.736
AMH (ng/mL)	2,40±2,69	2,45±2,60	p=0.933

Serum ACE düzeyleri bir kişide stabil olmasına rağmen, kişiler arasında farklılıklar göstermektedir. ACE düzeyleri arasında görülen bu farklılıklar özellikle ACE' nin genetik polimorfizmi sebebiyledir. ACE geni, serum ACE düzeylerinin düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. ACE genindeki ID polimorfizmi serum ACE konsantrasyonlarındaki değişikliklerin %50' sinden sorumludur (30). Serum ACE düzeylerine genotipin etkisinin değerlendirildiği toplam 404 kişide yapılan bir çalışmada, ACE genotipinin serum ACE düzeylerini etkilediği ve DD genotipi taşıyan kişilerin ACE düzeylerinin II genotipini taşıyanlara kıyasla iki kat fazla olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada ebeveynlerde yaşı ACE düzeyine bir etkisi olmadığı saptanmışken, çocuklarda yaşı ACE düzeyi ile negatif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (31). Ülkemizde gerçekleştirilen benzer bir çalışmada ise, preeklampitik ve sağlıklı gebelerde ACE aktivitesi değerlendirilmiş ve her iki grupta da en yüksek ACE aktivitesi DD genotipine sahip kadınlarda gözlenmiştir (32). Tseng ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada da serum ACE düzeyleri DD genotipine sahip hastalarda II genotipine sahip olanların yaklaşık iki katı kadar yüksek bulunmuştur (33). 2003 yılında gerçekleştirilen bir başka çalışmada; DD genotipine sahip bireyler en yüksek, II genotipine sahip olanlarsa en düşük serum ACE aktivitesi göstermişlerdir (34).

Genotipe göre, infertil hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında serum ACE düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte, ID genotipi için kontrollere (1,34 ng/mL) kıyasla infertil hasta grubunda (2,82 ng/mL) AMH düzeylerinde artış bulunmuştur (p=0,098) (Tablo 9).

Tablo 9. Genotipe göre, infertil hasta ve kontrol gruplarında serum ACE ve AMH düzeylerinin karşılaştırılması

Genotip	ACE (U/L)			AMH (ng/mL)		
	İnfertil Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p değeri	İnfertil Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p değeri
DD	89,10	123,28	p=0.253	1,71	2,95	p=0.186
ID	104,91	87,58	p=0.460	2,82	1,34	p=0.098
II	147,17	156,02	p=0.811	3,36	4,04	p=0.636

DD ve II genotiplerine sahip infertil hasta grubu ACE ve AMH düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; II genotipine sahip hastaların serum ACE ve AMH düzeyleri (147,17 U/L, 3,36 ng/mL), DD genotipi taşıyanlara (89,10 U/L, 1,71 ng/mL) kıyasla daha yüksek bulunmuştur (p=0,051, p=0,061). II genotipine sahip kontrollerin serum ACE ve AMH düzeyleri (156,02 U/L, 4,04 ng/mL), ID genotipi taşıyanlara (87,58 U/L, 1,34 ng/mL) kıyasla daha yüksek bulunmuştur (p=0,011, p=0,058). ACE düzeylerine genotipin etkisi yönünden bulduğumuz sonuçlar, Rigat ve ark., Jalil ve ark. ve Kumari ve ark.'nın yaptıkları çalışmalardan farklılık göstermektedir (13,35-36) (Tablo 10).

Tablo 10. Farklı genotiplere sahip infertil hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki serum ACE ve AMH düzeylerinin karşılaştırılması

		DD	II	ID	p değeri
ACE (U/L)	İnfertil Hasta Grubu	89,10	147,17	-	p=0,051
	Kontrol Grubu	-	156,02	87,58	p=0,011
AMH (ng/mL)	İnfertil Hasta Grubu	1,71	3,36	-	p=0,061
	Kontrol Grubu	-	4,04	1,34	p=0,058

Hem kontrol hem de infertil hasta grubunda serum ACE ve serum AMH düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (sırasıyla, r=0.911, p<0.01, r=0.893, p<0.01) (Tablo 11).

Tablo 11. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında serum ACE ve AMH düzeyleri arasındaki korelasyonlar

	ACE	AMH
Kontrol (n=41)		
ACE	1,000	0,911**
AMH	0,911**	1,000
İnfertil Hasta (n=47)		
ACE	1,000	0,893**
AMH	0,893**	1,000

** Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında serum ACE ve AMH düzeyleri arasındaki korelasyonlar (p<0,01)

Sonuç olarak, ACE geni I/D polimorfizminin genotip ve alel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Genotip dağılımının infertilite riski üzerine etkisi yönünden DD genotipine sahip olan kadınlardaki risk, ID genotipine sahip olanlara kıyasla 2.33 kat daha fazla bulunmuştur. Ancak, genotipin açıklanamayan infertilite üzerindeki etkisinin, daha büyük popülasyonlu bir çalışma grubu oluşturularak değerlendirilmesi gerektiği kanısındayız.

Kaynaklar

- 1- Missmer SA, Abusief ME, Barbieri RL and Goldman MB. Women and Health (Second Edition), Chapter 17, 2013, Pages 251-270, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384978-6.00017-0>.
- 2- Baylis F. Infertility, Encyclopedia of Applied Ethics (Second Edition), 2012, Pages 712-720.
- 3- Burger HG. Infertility, Principles of Medical Biology, Volume 12, Reproductive Endocrinology and Biology, 1998, Pages 317-332, ISBN: 1-55938-817-X.
- 4- Pekel A. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Hastalarında Serum ve Foliküler Sıvıda Solübl FAS, Solübl FAS Ligand ve Oksidatif Stres Biyomarkerlerinin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Mart 2013.
- 5- Eniola OW, Adetola AA and Abayomi BT. A review of Female Infertility; important etiological factors and management, J. Microbiol. Biotech. Res., 2012, 2 (3):379-385, ISSN : 2231 –3168.
- 6- Matzuk MM and Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges, Nat Med. 2008 Nov;14(11):1197-213. doi: 10.1038/nm.f.1895.
- 7- Demir M. Anti-Mullerian Hormone (AMH): As the Best Marker of Ovarian Reserve, Türk Klinik Biyokimya Derg. 2013, 11(2): 79-85.
- 8- Pehlivan S, Onay H, Tavmergen E, Göker NT, Çoğlu Ö and Özkinay F. Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms in male infertility, Gaziantep Tıp Dergisi, 2008, 14:15-17.
- 9- Baudin B, Berard M, Carrier JL, Legrand Y and Drouet L. Vascular origin determines angiotensin I-converting expression in endothelial cells, Endothelium, 1997;5(1):73-84.
- 10- Baudin B. New aspect on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease, Clin Chem Lab Med. 2002 Mar;40(3):256-65.
- 11- Zalata AA, Morsy HK, Badawy AE, Elhanbly S and Mostafa T. ACE Gene Insertion/Deletion Polymorphism Seminal Associations in Infertile Men, The Journal of Urology, Volume 187, Issue 5, May 2012, Pages 1776-1780, DOI:10.1016/j.juro.2011.12.076.
- 12- Turgut S. Anjiotensin dönüştürücü enzim ve I/D polimorfizmi, S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2005;12(4)/ 53-57.
- 13- Rigat B, Hubert C, Aihence-Gelas F, et al. An insertion /deletion polymorphism in the angiotensin-I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels, J Clin Invest, 1990; 86: 1343-6.
- 14- Kaysuya T, Horiuchi M, Koike G and Dzau VJ. Cloning and characterization of human angiotensin II type 2 receptor gene and its polymorphism, Circulation, 92 Suppl: I-282, 1995.
- 15- Prasad A, Narayanan S, Waclawiw MA, Epstein N and Quyyumi AA. The insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene determines coronary vascular tone and nitric oxide activity, J Am Coll Cardiol. 2000 Nov 1;36(5):1579-86.
- 16- Rieder MJ, Taylor SL, Clark AG and Nickerson DA. Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme, Nat Genet., 1999 May;22(1):59-62.
- 17- Pan PP, Zhan QT, Le F, Zheng YM and Jin F. Angiotensin-Converting Enzymes Play a Dominant Role in Fertility, Int. J. Mol. Sci., 2013;14, 21071-21086; doi:10.3390/ijms141021071, ISSN 1422-0067.
- 18- Lamp M, Saare M, Laisk T, Karro H, Kadastik Ü, Metspalu A, Peters M and Salumets A. Genetic variations in vascular endothelial growth factor but not in angiotensin I-converting enzyme genes are associated with endometriosis in Estonian women. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 153 (2010) 85–89.
- 19- Namazi, S., Monabati, A., Ardeshtir-Rouhani-Fard, S. ve Azarpira, N. 2013. “Lack of association of genetic polymorphisms of angiotensin converting enzyme 1 and angiotensin II type 1 receptor with breast cancer risk in Iranian population”, Tumour Biol., 34(5), 2899-907. doi: 10.1007/s13277-013-0852-6.
- 20- Liu, S.Y., Sima, X., Wang, C.H. ve Gao, M. 2011. “The association between ACE polymorphism and risk of colorectal cancer in a Chinese population”, Clin. Biochem., 44(14-15), 1223-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.07.016.
- 21- Cheng, Z., Ma, R., Tan, W., Zhang, L. ve Tan, Q. 2015. “Lack of association between ACE insertion/deletion polymorphism and lung cancer: A meta-analysis”, J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst., 16(2), 453-8. doi: 10.1177/1470320314544163.
- 22- Jia, H.; Wang, B.; Yu, L.; Jiang, Z. Association of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with polycystic ovary syndrome: A meta-analysis. J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2012, 14, 255–262.
- 23- Yapijakis, C., Koronellos, N., Spyridonidou, S., Avgoustidis, A.V.D., Goutas, N., Vlachodimitropoulos, D. ve Vairaktaris, E. 2013. “Association of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with decreased risk for basal cell carcinoma”, Arch. Dermatol. Res., 305(4), 333-9. doi: 10.1007/s00403-012-1312-7.
- 24- González-Zuloeta Ladd, A.M., Arias Vásquez, A., Sayed-Tabatabaei, F.A., Coebergh, J.W., Hofman, A., Njajou, O., Stricker, B. ve van Duijn, C. 2005. “Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and breast cancer risk”, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 14(9), 2143-6.
- 25- Morris, R.S. ve Paulson, R.J. 1999. “Increased angiotensin-converting enzyme activity in a patient with severe ovarian hyperstimulation syndrome”, Fertility and Sterility, 71(3), 562-563.
- 26- Alphan, Z., Berberoglu, Z., Gorar, S., Candan, Z., Aktas, A., Aral, Y. ve Ademoglu, E. 2013. Increased Total Renin Levels but Not Angiotensin-Converting Enzyme Activity in Obese Patients with Polycystic Ovary Syndrome, Med. Princ. Pract., 22:475–479. DOI: 10.1159/000351572.

- 27- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003;88:5957–62.
- 28- Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BC. Anti-Mullerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004;89:318–23.
- 29- Tayrab, E., Ali, M., Modawe, G.A., Naway, L. ve Abdrabo, A.A., Serum Anti-Müllerian hormone as laboratory predictor in infertile women with and without polycystic ovary syndrome, American Journal of Research Communication, 2014; 2(3), 61-66.
- 30- Hessner, MJ., Dinanuer, DM., Kwiatowski, R., Neri, B., Raife, TJ., Age depended prevalence of vascular disease associated polymorphism among 2689 volunteer blood donors, Clin. Chem. 2001; 47: 1879-1884.
- 31- Tired, L., Rigat, B., Visvikis, S., Breda, C., Corvol, P., Cambien, F., Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels, Am. J. Hum. Genet. 1992; 51: 197-205.
- 32- İşbilen, E., Ünlüçerçi, Y., Gürdöl, F., Yılmaz, H., İsbir, T., Ceylan, Y., Has, R., Preeklampitik Olgularda ACE Gen Polimorfizmi ve Hiperhomosisteinemi, Türk Klinik Biyokimya Derg. 2003; 1: (27-32).
- 33- Tseng, CH., Tseng, CP., Lack of association between angiotensin converting enzyme gene polymorphism and peripheral vascular disease in type 2 diabetic patients in Taiwan, Circ. J. 2002; 66:1014-1018.
- 34- Daimon, M., Oizumi, T., Saitoh, T., Kameda, W., Hirata, A., Yamaguchi, H., Ohnuma, H., Igarashi, M., Tominaga, M., Kato, T., The D allele of the angiotensin-converting enzyme insertion/ deletion (I/D) polymorphism is a risk factor for type 2 diabetes in a population-based Japanese sample, Endocr. J. 2003 Aug;50(4):393-8.
- 35- Jalil, JE., Piddo, AM., Cordova, S., Chamorro, G., Braun, S., Jalil, R. et al., Prevalence of the angiotensin I converting enzyme insertion/deletion polymorphism, plasma angiotensin converting enzyme activity, and left ventricular mass in a normotensive Chilean population, Am. J. Hypertens., 1999; 12, 697–704.
- 36- Kumari, S., Sharma, N., Thakur, S., Mondal, PR., Saraswathy, KN., Beneficial role of D allele in controlling ACE levels: a study among Brahmins of north India, J. Genet., 2016 Jun;95(2):291-5.

2. PROJE BÜTÇESİ ÖZET BİLGİLERİ

Proje Süresi: 24 (Ay)				
Başlama Tarihi	Bitiş Tarihi	Ek Süre (Ay)	Ek Süre Dahil Bitiş Tarihi	Toplam Proje Süresi (Ay)
13.02.2015	20.10.2016	-	-	20 ay

Proje Bütçesi: 10 888,00 TL		
Harcanan	Kalan	Ek Bütçe
11491,00	162	765

3. PROJE ÇIKTILARI

(Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nde istenilen hususlar dikkate alınarak aşağıdaki başlıklar açıklanmalı ve yönergede belirtilen belgeler eklenmelidir.)

Yazılı Ürünler

Proje kapsamında yapılan çalışma 10-13 Kasım 2016 tarihleri arasında Amsterdam'da (Hollanda) gerçekleştirilecek olan 24th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI) isimli uluslararası kongrede sunulmak üzere poster olarak kabul edilmiştir. Poster kabulüne ilişkin yazı ve hazırlanan poster ekte yer almaktadır. Söz konusu çalışma en kısa sürede bilime katkı sağlamak üzere makale olarak hazırlanacaktır.

Üniversiteye, Ülkeye ve/veya Bilime Sağlanan Katkılar

Bu bölüme proje faaliyetleri neticesinde elde edilen yararlar eklenmelidir

Yapılan çalışma ile bilimsel literatüre katkı, yüksek lisans öğrencisinin yetiştirilmesi, bilgi birikimi, deneysel bir çalışmayı yürütebilme tecrübesine sahip olması hedeflenmiştir ve hedeflere önemli ölçüde ulaşılmıştır.

4. PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ TARAFINDAN YAPILACAK GENEL DEĞERLENDİRME

(Bu bölümde, projenin kabulünden itibaren geçen süre ve süreçler, yazışmalar ve değerlendirmelerle ilgili karşılaşılan sorunlar özetlenir. Bu kısmın sonunda BAP süreçleri ile ilgili öneriler de BAP Komisyonuna iletilmek üzere sunulabilir.)