ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Halil İbrahim PAZARBAŞI

İNFERTİLİTE VE METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GENOTİP İLİŞKİSİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2016

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNFERTİLİTE VE METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GENOTİP İLİŞKİSİ

Halil İbrahim PAZARBAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14 /07/2016 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ DANIŞMAN	Doç. Dr. İbrahim Ferhat ÜRÜNSAK ÜYE	Yrd Doç. Dr. Akın YIĞIN ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2014-2830

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Kanundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNFERTİLİTE VE METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GENOTİP İLİŞKİSİ

Halil İbrahim PAZARBAŞI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
2. Danışman : Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Yıl: 2016, Sayfa 60
Jüri : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Doç. Dr. İbrahim Ferhat ÜRÜNSAK
: Yrd. Doç. Dr. Akın YIĞIN

Açıklanamayan infertilite, konvansiyonel tetkiklerle sebebi tespit edilemeyen ve infertil çiftlerin %15'inde görülen bir durumdur. Literatürde, daha önce yayımlanan sınırlı olgu sayılı çalışmalarda, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T ve A1298C polimorfizmleri ile açıklanamayan infertilite arasında bir ilişki olabileceğine dikkat çekilmiştir. Bu çalışmanın amacı, folat metabolizmasında yer alan MTHFR geninde meydana gelen polimorfizmlerin allel frekanslarını belirlemek ve infertilite riski ve genetik çeşitlilik açısından sonuçları değerlendirmektir. MTHFR geninin iki yaygın polimorfizmi (C677T ve A1298C) açıklanamayan infertilite tanısı alan çiftler ve sağlıklı kontrollerde çalışılmıştır (C677T polimorfizmi için n=60; A1298C polimorfizmi için n=62). MTHFR genotipleri, ABI Genetic Analyzer cihazında, multipleks PCR amplifikasyon/ligasyon ürünlerinin SNP (Single Nucleotide Polymorphism=Tek nükleotid polimorfizmi) analizi ile çalışılmıştır. DNA'lar Invitrogen Genomic DNA Mini Kit (CA, USA) ile lökositlerden izole edilmiştir. Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite ve kontrol grubu; kadın ve erkek cinsiyetleri arasında MTHFR C677T polimorfizminin genotip ve allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). A1298C polimorfizmi açısından CC genotip oranlarının açıklanamayan infertilite tanısı almış erkeklerde kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve bu farklılığında istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur. İnfertil ve kontrol grupları arasında serum folik asit ve homosistein düzeyleri karşılaştırıldığında; MTHFR C677T heterozigot bireylerin folat ve homosistein değerleri arasında; MTHFR C677T normal bireylerin homosistein değerleri arasında; MTHFR A1298C heterozigot, normal ve homozigot bireylerin homosistein değerleri arasında; kadın infertil ve kontrol gruplarında MTHFR C677T heterozigot ve normal bireylerin folat değerleri arasında; MTHFR C677T normal bireylerin homosistein değerleri arasında; MTHFR A1298C heterozigot ve normal bireylerin folat değerleri arasında istatistiki olarak önemli fark bulunmuştur. Açıklanamayan infertilite etiyopatogenezinde halen netleşmemiş noktalar mevcuttur. Bu çalışmanın sonucunda, MTHFR C677T polimorfizmi ile açıklanamayan infertilite arasında anlamlı bir ilişki çıkmamakla beraber, sadece erkeklerde, A1298C polimorfizmleri ile açıklanamayan infertilite arasında anlamlı bir ilişki mevcuttur. MTHFR geninin her iki polimorfizmi açısından ilişki gösterilen çalışmaların da literatürde mevcut olması nedeniyle bu konuyu netleştirebilmek için, gelecekte yapılacak geniş olgu sayılı araştırmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızın sonuçları, MTHFR A1298C polimorfizmi ve erkek fertilite problemleri arasındaki ilişkiyi desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Açıklanamayan İnfertilite; MTHFR polimorfizmleri; C677T; A1298C; folat metabolizması

ABSTRACT

MSc THESIS

ASSOCIATION OF INFERTILITY AND METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENOTYPES

Halil İbrahim PAZARBAŞI

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Second Supervisor : Associate Prof. Dr. M.Bertan YILMAZ
Year : 2016, Pages, 60
Jury : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Assoc. Prof. Dr. Ibrahim Ferhat ÜRÜNSAK
: Asst. Prof. Dr. Akın YIĞIN

Infertility is defined as unexplained when all of the tests of a basic infertility evaluation return within normal limits and present in 15% of infertile couples. Some studies indicate that male or female probands contribute to the association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) mutations with fertility problems in grown adults. The objective of this study was to analyze the ***MTHFR*** s C677T and A1298C genotype distributions in couples with unexplained fertility problems (UFP) and healthy controls. Two common variants C677T and A1298C of the MTHFR gene were screened in infertile couples (n =60 for C677T polymorphism; n=62 for A1298C polymorphism) and controls from Çukurova region of Turkey. The MTHFR genotypes were studied by automated SNP (Single Nucleotide Polymorphism) analysis of Multiplex PCR-amplification/ligation products with ABI Genetic Analyzer. DNA from blood leukocytes was obtained using an Invitrogen Genomic DNA Mini Kit (CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Statistically no difference found for frequencies of MTHFR genotypes and allels between the couples with UFP and healthy controls and between males and womens ($p>0.05$). Frequency of MTHFR 1298 CC genotype for UFP males was lower than control males and this difference was statistically significant ($p<0.05$). When we compared the folate and homocyctein levels between the couples with UFP and healthy controls and between males and womens, we found statistically significant difference between folate and homocyctein levels of MTHFR 677 heterozygote individuals; homocyctein levels of MTHFR 677 normal individuals; homocyctein levels of MTHFR 1298 heterozygote, normal and homozygote individuals; folate levels of MTHFR 677 heterozygote and normal womans; homocyctein levels of MTHFR 677 normal individuals; folate levels of MTHFR 1298 heterozygote and normal individuals ($p<0.05$). There are subjects that are not clear on etiopathogenesis of unexplained infertility. In this study, we don't find an association between unexplained infertility and MTHFR C677T polymorphism but we found an association only for MTHFR A1298C polymorphism between males with UFP and controls. There are literatures that showing association between unexplained infertility and two polymorphisms of MTHFR gene. So, there is a necessity for more studies with more case number to clarify this subject. The data presented in this study to support the relation between MTHFR A1298C polymorphisms and fertility problems in grown male adults.

Keywords: MTHFR polymorphisms; unexplained fertility problems; C677T; A1298C; folate metabolism

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca geniş bilgi birikimi ve deneyimiyle bana ışık tutan, yol gösteren, değerli emeğini, desteğini esirgemeyen danışmanım Prof.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ hocama sonsuz teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen ikinci Danışman hocam Doç.Dr. M. BERTAN YILMAZ'a, yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarına, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine teşekkür ederim. İnfertil hastaların bu çalışmaya dahil edilmesi ve klinik deneyimleri ile önemli katkılar sağlayan Çukurova Üniversitesi, Balcalı Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. İbrahim Ferhat ÜRÜNSAK'a, teşekkürlerimi sunarım. Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Müdürü Prof.Dr. Yıldız AKA KAÇAR ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.H.Ümit LÜLEYAP'a tez çalışmamız için gereken laboratuvarların kullanılabilmesinde verdikleri destek için, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim elemanları Uz.Dr.Sabriye KOCATÜRK SEL, Arş.Gör. Lütfiye ÖZPAK, Arş.Gör. Gamze CÖMERTPAY ve Yüksek Lisans Öğrencisi Nurşen KESER'e tez çalışmalarım esnasında verdikleri destek için; Balcalı Hastanesi, Merkez Laboratuvarı Sorumlu Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. Salih ÇETİNER, Doç.Dr. Özlem GÖRÜRÜĞLU-ÖZTÜRK ve Uz.Dr. Selçuk MATYAR Hocalarıma infertil ve kontrol bireylerinin serumlarında folat ve homosistein değerlerinin çalışılmasında verdikleri destek için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Maddi ve manevi destekleri ile bana her zaman yardımcı olan sevgili annem Ayfer PAZARBAŞI, sevgili babam Mehmet PAZARBAŞI ve sevgili kardeşim Deniz PAZARBAŞI' ya göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR X
1. GİRİŞ 1
1.1. İnfertilitenin Tanımı 3
1.2. Açıklanamayan İnfertilite 6
1.3. Erkek İnfertilitesi 8
1.4. Kadın İnfertilitesi 9
1.5. Folat Metabolizması ve MTHFR 10
2. Önceki Çalışmalar 17
2.1. MTHFR ve İnfertilite İlişkisi 17
3. MATERYAL VE METOD 21
3.1. Materyal, Hasta ve Kontrol grupları 21
3.2. Metod, Kan alınması ve Saklanması 21
3.3. DNA İzolasyonu 22
3.4. DNA Konsantrasyonunun ve Saflığının Ölçülmesi 23
3.5. MTHFR geninin iki polimorfizminin (C677T ve A1298C) genotiplendirme çalışılması 24
3.6. İstatiksel Analizler 27
4. BULGULAR 29
5. TARTIŞMA 43
6. SONUÇLAR 49
KAYNAKLAR 51
ÖZGEÇMİŞ 57
EKLER 58

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. İnfertilite sebep sıklığı 4
Çizelge 1.2. Dünya Sağlık Örgütü Anovulasyon Sınıflaması 5
Çizelge 1.3. Temel infertilite testleri 6
Çizelge 1.4. Erkek İnfertilitesinin etiyolojik kriterleri ve görülme oranları 9
Çizelge 3.1. Genotipleme çalışmalarında kullanılan multipleks PCR'ın bileşen ve hacimleri 25
Çizelge 3.2. Genotipleme çalışmalarında kullanılan multipleks PCR programı 25
Çizelge 3.3. Genotipleme çalışmalarında kullanılan prob ligasyonu'nun bileşen ve hacimleri 26
Çizelge 3.4. Genotipleme çalışmalarında kullanılan Prob Ligasyon Reaksiyon programı 26
Çizelge.4.1. İnfertil grubun homosistein, folat değerleri ve genotipler (MTHFR C677T ve A1298C) 31
Çizelge.4.2. Kontrol grubunun homosistein, folat değerleri ve MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerine ait genotipler. 33
Çizelge.4.3. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri açısından genotipleri 35
Çizelge.4.4. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T polimorfizmi açısından allel frekansları 36
Çizelge.4.5. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C polimorfizmi açısından allel frekansları 36
Çizelge.4.6. İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T heterozigot bireylerin folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması 36
Çizelge.4.7. İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T heterozigot bireylerin homosistein değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması 37
Çizelge.4.8. İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T normal bireylerin homosistein değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması 37

Çizelge.4.9. İnfertil ve kontrol grubu MTHFR A1298C heterozigot, normal ve homozigot bireylerin homosistein değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması..... 38
Çizelge.4.10. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T heterozigot genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması..... 38
Çizelge.4.11. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T normal genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması..... 39
Çizelge.4.12. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T normal genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması..... 39
Çizelge.4.13. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C heterozigot genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması..... 40
Çizelge.4.14. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C normal genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması..... 40

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Tek karbon ve transsülfürasyon Metabolizması:..... 12
Şekil 1.2. Homosistein'in transsülfürasyon ve remetilasyon ile metabolizma yolları MS: Metiyonin sentetaz, CS:Sistatyonin β sentetaz; BHMT:Betain homosistein metil transferaz, MT: Metil transferaz, SAM:S-adenozilmetiyonin, CL:Sistatyonin γ liyaz 14
Şekil 3.1. MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri açısından genotipleme analiz ekranı. Örnek normal ve mutant piklere sahip ise heterozigot olarak genotiplendirilir. Sadece normal pike sahip ise homozigot normal, sadece mutant pike sahip ise homozigot mutant olarak genotiplendirilir. 27

SİMGELER VE KISALTMALAR

bp	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
dak.	: Dakika
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran reseptörü
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
LH	: Luteinizan hormon
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzim bağlı immunolojik deney (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz enzimi
5,10-MTHF	: 5,10-metilen tetrahidrofolat
5-THF	: 5-metil tetrahidrofolat
kb	: Kilo baz
SAM	: S-adenozilmetiyonin
Cbl	: Kobalamin
MTR	: Metiyonin sentaz enzimi
FAD	: Flavin-Adenin-Dinükleotid kofaktörü
GnRH	: Gonadotropin-releasing hormone=Gonad hormonlarını salgılatan hormon
PCOS	: Polikistik over sendromu
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ESHRE	: Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyolojisi Derneği
USG	: Ultrasonografi
AMH	: Anti-Mullerian Hormon
FTHF	: Formiltetrahidrofolat
FPGS	: Folilpoliglutamat sentaz
$FADH_2$	: Flavin-Adenin-Dinükleotid kofaktörünün indirgenmiş formu

NADPH : Nikotinamid-Adenin-Dinükleotid-Fosfat koenziminin indirgenmiş formu

SHMT : Serinhidroksimetiltransferaz

CBS : Sistatiyon beta sentaz

OD : Optical density= optik yoğunluk

OR : Odd ratio= Tahmini rölatif risk

CI : Confidence interval= Güven aralığı

VTE : Venöz tromboemboli

MTRR : Metiyonin sentaz redüktaz

FH_2 : Dihidrofolat

FH_4 : Tetrahidrofolat

TMP : Timidin monofosfat

dUMP : deoksiuridin monofosfat

figlu : formiminoglutamat

1. GİRİŞ

İnfertilite, çiftlerin düzenli, korunmasız cinsel yaşamına rağmen bir yıl süresince gebeliğin gerçekleşememesi olarak tanımlanır. İnfertilite, evli çiftlerin yaklaşık olarak %15'ini etkileyen yaygın bir üreme sağlığı problemidir. Bu olguların yarısı erkekleri etkileyen faktörlerdir ve erkek infertilitesi olgularının %60-75'i altta yatan moleküler mekanizma bilinmediği için idiyopatiktir (Herodež ve ark, 2013). Açıklanamayan infertilite, konvansiyonel tetkiklerle sebebi tespit edilemeyen ve infertil çiftlerin %15'inde görülen bir durumdur (Mutlu ve ark, 2013). Nedeni tespit edilemediği için tedavisinde kullanılan yöntemler nedeni ortadan kaldırmaktan daha ziyade ampirik olarak fertilite oranlarını artırmaya yöneliktir. Bu amaçla; bekleme tedavisi, klomifen sitrat, gonadotropin ile ovaryen hiperstimulasyon, intraservikal inseminasyon, intrauterin inseminasyon ve in vitro fertilizasyon gibi tedavi yontemleri günümüze kadar tek başlarına veya kombine olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar erkek infertilitesinin sonradan ortaya çıkabildiği gibi, önemli bir kısmının da genetik kökenli olduğunu göstermektedir (Özpak ve Pazarbaşı, 2011). İnfertil erkekler uygun laboratuar testleri ışığında fiziksel muayene yapılarak değerlendirilir. Bu değerlendirmede erkek infertilitesinin etiyolojisi, sebepleri tanımlanır ve uygun tedavi yöntemleri belirlenir. Genel fizik muayene ve sekonder cinsiyet karakterleri, testis boyutları, vas deferens olup olmadığı değerlendirildikten sonra semen analizi, hormonlar [testosteron, folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinizan hormon (LH), prolaktin] tiroid fonksiyon testleri gibi biyokimyasal analizleri; kromozom analizi, Y kromozomu mikrodelesyon testi, kistik fibrozis gen mutasyonu testi (CFTR) gibi moleküler analizler takip edilerek değerlendirilir (Mark ve Sigman, 2000). Bu değerlendirmeler sonrasında özgün bir tedavi yöntemi uygulanabilir. İnfertilitede, uygulanan tedaviler ve önceki hamilelikler gibi, aile öyküsü de çok önemlidir. Bunun yanı sıra çiftlerin seksüel gelişimi özellikle de erkeklerin ergenlik ve çocukluk dönemlerindeki seksüel gelişimi mutlaka değerlendirilmelidir. İnfertil bireylerin bazılarında bazı hastalıkların (Ör: Diyabet) infertiliteyi tetikleyebileceği bildirilmiştir (Mark ve Sigman, 2000). Hastaların cerrahi operasyon geçirip geçirmedikleri, gonadotoksinlere maruz kalıp kalmadıkları da infertilitenin

değerlendirilmesinde oldukça önemlidir. Ayrıca seksüel farklılaşma yaratan hastalıklar ve kistik fibrozis için aile öyküsü araştırılmalıdır. Diğer yarıyı oluşturan kadına ait faktörlerse iyi belgelenmemiştir. Diğer taraftan, spontan abortus olarak sonlandırılan gebeliklerin %20'si nin anöploidilerden farklı olan genetik etyolojileri bilinmemektedir.

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), DNA, RNA ve protein metabolizmasında önemli bir rol oynamakta ve spermatogenez ile yakından ilişkilendirilmektedir. MTHFR, homosistein'in (Hcy) metiyonine metilasyonu için metil grubu vericisi ve dolaşımdaki temel folat formu olan 5,10-metilen tetrahidrofolat'ın (5,10-metilen THF) 5-metil THF'a dönüşümünden sorumlu enzimdir. Bir sonraki reaksiyon, kofaktör olarak vitamin B12 veya kobalamin (Cbl) gerektiren ve DNA metilasyon reaksiyonları için temel metil donörü olan S-adenozilmetiyonin (SAM) oluşumunu sağlayan Metiyonin sentaz (MTR) enzimince katalizlenir. Böylece MTHFR, DNA metilasyonunun düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynar. 677 C→T polimorfizminin, enzimin flavin-adenin-dinükleotid (FAD) kofaktörüne olan afinitesini azaltmak yolu ile enzimin aktivitesini düşürdüğü bilinmektedir (Guenther ve ark, 1999; Yamada ve ark, 2001; Eggermann ve Schwanitz, 2011). MTHFR 677 CT genotipinin enzim aktivitesini %35, homozigot TT genotipinin ise %70 civarında düşürdüğü bildirilmiştir (Frosst ve ark, 1995; Eggermann ve Schwanitz, 2011). MTHFR A1298C polimorfizmi açısından homozigot CC genotipinin de heterozigot genotipe oranla enzim aktivitesinde daha belirgin bir azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (van der Put ve ark, 1998; Eggermann ve Schwanitz, 2011).

Bu çalışmada MTHFR genine ait iki farklı polimorfizm araştırılmıştır. Bu amaçla, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İnfertilite Polikliniğine başvuran çiftlerden alınan kanlar kullanılmıştır. Çalışma gurubu infertil çiftlerden, kontrol grubu ise fertil çiftlerden oluşturulmuştur. Çalışmada yer alan tüm hasta ve kontrol grubunun çalışmaya katılımları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi bilgi ve taahhüt formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış DNA çalışması onam formları doldurularak sağlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı folat metabolizmasında yer alan MTHFR geninde meydana gelen polimorfizmlerin (C677T, A1298C) allel frekanslarını belirlemek ve infertilite riski ve genetik çeşitlilik açısından sonuçları değerlendirmektir. Kan homosistein-folat değerleri ile polimorfizmler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi, infertilite için ortak etkiye sahip olup olmadıklarının ortaya çıkarılması, bu gen bölgelerindeki genetik çeşitliliğin infertilite için risk faktörü olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede ilgili genlerdeki polimorfizmlerin Türk toplumundaki insidansının ortaya konması beklenmektedir. Yapılan literatür taramasında İnfertilite ve MTHFR geni polimorfizmleri ile ilgili ülkemizde ve ülkemiz dışında bu konuda yapılan çalışmaların çok fazla olmadığı görülmüştür. Çalışmanın sonunda sonuçlarımızın SCI'da taranan bir dergide yayınlanarak bu konudaki Türk toplumunda yapılmış çalışmalara ve literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.

1.1. İnfertilitenin Tanımı

İnfertilite çiftin bir yılı aşan sürede düzenli ve korunmasız cinsel ilişkisine rağmen gebe kalınamaması olarak tanımlanır. Fekundite, bir menstruel siklusta canlı doğum elde etme ihtimalidir ve aylık konsepsiyon hızı ortalama %20-25'dir. Bu tanım epidemiyolojik çalışmalara dayanarak yapılmıştır zira genel popülasyonda çiftlerin %85'inde 12 ay içinde gebelik oluşur. Gebeliklerin %72'si ise ilk 6 siklusta oluşur ve siklus sayısı arttıkça gebelik oranları azalmaya başlar. Düzenli ilişkiye rağmen 3 yılın sonunda hiç gebelik olmamışsa fertil olabilme ihtimali %1'e düşer (Dilbaz ve Özdeğirmenci, 2009). Gelişmiş ülkelerde çiftlerin %15'inin infertil olduğu tahmin edilmektedir. Prevalansta belirgin bir değişiklik olmamasına rağmen, tedavi için talep zamanla artmıştır. İnfertilite %23 oranında erkek faktörü, %49 oranında kadına ait faktörlere (%18 ovulatuar disfonksiyon, %14 tubal faktör, %9 endometriozis, %5 koital problemler, %3 servikal faktör) bağlıdır. %28 oranında da açıklanamayan infertilite söz konusudur.

Genel olarak infertilitenin nedenleri %15 ovulatuar disfonksiyon, %30-40 tuboperitoneal patoloji, %30-40 erkek faktörüdür (Çizelge 1.1.1.).

Çizelge 1.1. İnfertilite sebep sıklığı

Çiftlere bağlı sebepler	**Sıklık (%)**	**Kadına bağlı sebepler**	**Sıklık (%)**
Erkeğe bağlı nedenler	35	Tuboperitoneal faktör	40
Tuboperitoneal faktör	35	Ovulatuar bozukluk	40
Ovulatuar bozukluk	15	Açıklanamayan infertilite	10
Açıklanamayan infertilite	10	Diğer sebepler	10
Diğer Sebepler	5		

Uterin sebepler daha azdır ve kalan diğer çiftler de açıklanamayan infertiliteye sahiptir (Doğan, 2008). Gebeliğin oluşmasını engelleyen nedenleri araştırırken 4 ana sebep araştırılmalıdır:

1. **Erkek faktörü:** Oositi fertilize etmeye yetecek sayıda, morfolojide ve motilitede sperm varlığı araştırılmalıdır.
2. **Tuboperitoneal faktör:** Tuba uterinalar (Yumurta kanalları) overden atılan olgun (matür) bir oositi yakalayabilmeli, oosit ile spermin ve daha sonra da fertilize ovumun transportunu sağlayabildiği gösterilmelidir.
3. **Ovaryan faktör:** Fertilize edilebilir matür bir oositin overlerden düzenli olarak üretildiği ve oosit havuzunda yeterli sayıda oosit bulunduğu bilinmelidir.

Normal bir ovulasyon olması için hipotalamo-hipofiz-over ekseninin düzenli çalışması gerekmektedir. Hipotalamusun arkuat nukleusundan pulsatil olarak salgılanan GnRH (Gonadotropin-releasing hormone: Gonad hormonlarını salgılatan hormon), hipofiz ön lobunda FSH ve LH sekresyonunu sağlamalı, FSH ve LH birlikte overde folikül gelişimini uyarmalı ve östrojen piki sonucunda LH pikinin tetiklediği ovulasyonun oluşmasına kadar geçen olayların normal olarak cereyan etmesi gerekmektedir. Ovulasyon sonrasında oluşan korpus luteum, endometriumda sekretuar değişikliklere yol açan östrojen ve progesteron hormonlarını yeterli miktarda ve sürede salgılamalıdır. Ovulasyon bozukluğuna yol açan birçok sebep sayılabilir. Aşırı egzersiz, stres, yeme bozukluğu gibi hipotalamik nedenler olabilir.

İdiopatik hipotalamik amenore (hipogonadotropik hipogonadizm) veya Kallman sendromu gibi nöroolfaktör bulbusun eksik transmigrasyonu gibi konjenital hastalıklar da anovulasyon (ovulasyon bozukluğu) sebepleridir. Overe ait sebeplerden en sık olanı polikistik over sendromudur (PCOS). Bunlara ek olarak özellikle hipotiroidi ve hiperprolaktinemi gibi endokrin hastalıklarda menstrüel bozuklukların yanı sıra luteal faz yetmezliği, oligoovulasyon veya anovulasyona neden olabilir. Dünya Sağlık Örgütünün (DSÖ) 2009 yılında yayınlanan ovulasyon bozuklukları sınıflaması Çizelge 1.1.2'te özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. Dünya Sağlık Örgütü Anovulasyon Sınıflaması

Grup	**Sorun**	**Hormonal durum**	**Hastalık**
1	Hipotalamik disfonksiyon	Hipogonadotropik	Anoreksi,egzersiz, Kalman sendromu
2	Ovulatuar Disfonksiyon	Normogonadotropik	PCOS
3	Hiperprolaktinemi	Normogonadotropik	Hipofiz adenomu
4	Ovaryan Yetmezlik	Hipergonadotropik	Erken menapoz

4. **Uterin faktör:** Uterus normal yapıda olmalı, embriyo için reseptif (kabul edici, alıcı) olmalı ve daha sonra da embriyonun gelişimine izin vermelidir. Çizelge 1.1.3. te temel infertilite testleri gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Temel infertilite testleri

Ovulasyon Bozukluğu	Serum orta luteal progesteron ölçümü
	TSH, prolaktin
	Endometrial biyopsi*
	Üriner LH ölçümleri
	Bazal vücut ısısı
Over rezerv testleri	Bazal FSH,LH,E2
	Antral folikül sayımı
	Antimüllerian hormon*
Tubo/peritoneal faktör	Histerosalpingografi
	Diagnostik laparoskopi*
Uterin faktör	Transvaginal ultrasonografi
	Salin infüzyon sonografisi*
	Histeroskopi*
	Manyetik rezonans görüntüleme*
Erkek Faktör	Temel semen analizi

**rutin olarak yapılmaz*

1.2. Açıklanamayan İnfertilite

İnfertilite nedeni ile başvuran bir çiftte nedene yönelik klinik ve laboratuar araştırması yapmak soruna yönelik tedavinin verilebilmesini sağlar. Araştırmalardan elde edilen kanıtlar sonucunda, infertilite nedenleri 5 temel öğede incelenmektedir; erkek faktörü, tubal faktör, anovulasyon, endometriozis ve açıklanamayan infertilite (Zeyneloğlu ve Önalan, 2009).

Tüm değerlendirmelere rağmen infertiliteyi açıklayacak neden bulunmayabilir. Bu değerlendirme bazal infertilite tetkiklerini içerir. Değerlendirmede ovulasyon varlığı, yeterli sperm üretimi ve fallop tüplerinin patensisine (açılmış, engelsiz olma hali) bakılır (Dilbaz ve Özdeğirmenci, 2009).

Açıklanamayan infertilite tüm infertilite nedenlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. İnsidans %0'dan %37'e kadar değişkenlik gösterir. Bu değişiklik, çalışma

popülasyonlarındaki değişiklik kadar, referans merkezlerindeki infertilite uygulamalarındaki seçim kıstaslarına göre de değişir. İnsidans ayrıca infertilite süresine göre de değişiklik gösterebilir. En az iki yıl bebek için uğraşılmasına rağmen hala gebelik açısından başarılı olunmadığında, yapılan semen analizi, ovulasyon ve tubal açıklığı değerlendiren standart testlerde herhangi bir bozukluk saptanmadığı durumlarda tanı olarak açıklanamayan infertilite düşünülmelidir. Açıklanamayan infertilitenin etiyolojisinde net bir durum gösterilememekte ve endokrinolojik, immünolojik, genetik ve üreme fizyolojisiyle ilgili olası birçok nedenin yer aldığı heterojen kavramdır.

Fiziksel olarak bir engeli bulunmayan ve haftada 2-3 kez normal bir şekilde koitusda bulunan bir çiftte bir yıl içerisinde gebelik elde edilemiyorsa, temel infertilite araştırmaları yapılmalıdır (Smith ve ark., 2003). Bunlar; erkekte Dünya Sağlık Örgütü'nün son kriterlerine göre yapılmış semen analizi; kadında ise, ovulasyonun tayini için bazal vücut ısısı izlenimi, ultrasonografik foliküler monitorizasyon, siklusun 20-22. günleri arasında yapılmış serum progesteron düzeyleri, beklenen menstruasyondan 2 gün öncesinde endometrial günlendirme için biyopsi; tubal açıklığın ve uterusun değerlendirmesinde ise histerosalpingografi, histerosonografi, laparoskopi, hidrolaparoskopi ve selektif salpingografidir. Kadında peritoneal faktörler sadece laparoskopi ve hidrolaparoskopi ile değerlendirilir. Eğer bu temel testler anormal bulgularla sonuçlanmaz ise, diğer infertilite nedenleri dışlanır ve açıklanamayan infertilite tanısı konulur.

Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyolojisi Derneği (ESHRE) açıklanamayan infertilite için 1992'de bir çalıştay yaparak infertilite testlerini gebelik hızlarını göstermedeki başarısına bağlı olarak 3 kategoride değerlendirmiştir. Gebelik hızları üzerinde kanıtlanmış ve kesin etkisi olan ilk kategori testler semen analizi, histerosalpingografi veya laparoskopi ile tubal açıklığın değerlendirilmesi ve ovulasyon tayini için luteal faz ortası progesteron ölçümüdür. Daha sonradan bu rehber bilgilerin güncellenmesiyle, özellikle kontrast medya ile kullanılan ultrasonografinin etkin bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Laparoskopi zahmetli ve invazif bir yöntem olduğundan ancak başka bir yöntem kalmadığında veya endoskopik cerrahi ile birleştirildiğinde kullanılması önerilmiştir. İkinci kategori

testler, gebelik oranları ile düzgün bir korelasyon göstermeyen testleri içerir, bunlar: zona free hamster yumurta penetrasyon testi, post koital test ve antisperm antikor değerlendirmeleridir. Üçüncü kategori testler ise, gebelik oranları ile hemen hiç korelasyon göstermeyen testlerdir; bunlar endometrial günlendirme, varikosel değerlendirmesi ve klamidya testidir (Doğan, 2008; Dilbaz ve Özdeğirmenci, 2009).

1.3. Erkek İnfertilitesi

Fiziksel incelemede semen analizi köşe taşlarından biri konumundadır fakat fertilitenin belirlenmesinde çoğunlukla tatmin edici sonuçlar vermez. Semen analizi (spermiyogram); sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisini inceleme işlemidir. Aslında erkek fertilizasyonunu ölçen herhangi bir test yoktur. Semen analizinde de analiz değerlerinin normal değerler ile karşılaştırılması söz konusudur. Oligoazospermi sınıflandırılması sperm sayısı ile bağlantılı yapılmaktadır. Normal erkeklerde sperm sayısı 20 milyonun üstünde iken, hafif oligozoospermide 5-2 milyon arasında, ılımlı oligozoospermide 1-5 milyon arasında, şiddetli oligozoospermide 1 milyonun altındadır ve Azospermide hiç sperm bulunmamaktadır.

İnfertil vakaların bulunduğu bir populasyonda yapılan çalışmada infertilitenin etiyolojik kriterleri ve oranları incelenmiştir (Çizelge 2.3.4). İlginçtir ki aralarında kan bağı bulunan hastalardaki incelemede genetik temelli infertilite vakaları yalnızca %0.23 oranında bulunmuştur (Mark ve Sigman, 2000; Özpak ve Pazarbaşı, 2011). Çizelge 1.3.4'den görüleceği gibi sebebi bilinemeyen ve bulunamayan idiyopatik grup infertil vakalardan oluşan bu grupta % 24,78 iken nedenin genetik olduğu düşünülen grubun oranı ise % 0,23 olarak bulunmuştur (Mark ve Sigman, 2000; Özpak ve Pazarbaşı, 2011).

Çizelge 1.4. Erkek İnfertilitesinin etiyolojik kriterleri ve görülme oranları

Kategori	**%**
Varikosel	38.17
Idiyopatik	24.78
Tıkanma	13.15
Normal	9.86
Kriptokidism	3.58
Antisperm antikorlar	2.52
Ejekulatör bozukluk	1.29
İlaç	1.0
Endokrinopati	1.0
WBC	1.0
Seksüel bozukluk	0.59
Testikuler bozukluk	0.47
Genetik	0.23
Ultrastrüktür	0.23
Sertoli hüvresi kaynaklı	0.23
Kanser	0.18
Vücut ısısı	0.06
Radyasyon	0.06
Sistemk hastalıklar	0.06
Testis kanseri	0.06
Diğer nedenler	1.48

1.4. Kadın İnfertilitesi

Kadın yaşının ilerlemesi ile fertilitenin azaldığı artık kesin kabul gören bir gerçektir. Çeşitli çalışmalara göre kadınlarda 20-24 yaşlarında fertilite doruk noktaya çıkar ve 30-32 yaşlarına kadar değişmeden devam eder. Bu yaşlardan sonra progresif olarak düşmeye başlar ve 40 yaşından sonra bu azalma iyice artarak devam eder (Doğan, 2008). Bu azalma kendini erken foliküler fazda FSH'ın artması, inhibin

B'nin azalması siklusun herhangi bir günü ölçülen AMH (Anti-Mullerian Hormon) değerinin düşmesi ile ya da yine erken foliküler fazda yapılan transvaginal ultrasonografide (USG'de) overlerdeki antral folikül sayılarının azalması ile kendini belli eder. Kadın fertilitesindeki bu yaşa bağlı azalmanın mekanizmaları büyük oranda hızlanmış foliküler atrezi ve yaşlanan oositlerde anöploidi sıklığındaki artıştır. Oosit havuzundaki sayı ve kalitenin azalması ile birlikte fertiliteyi azaltan diğer faktörler, ilerleyen yaşla birlikte koit sıklığının azalması, subklinik abortus oranlarının artması ve fertiliteyi olumsuz etkileyen pelvik enfeksiyonlar, endometriozis ve uterus leiomyomları gibi diğer hastalıkların daha çok görülmesi olarak sayılabilir.

1.5. Folat Metabolizması ve MTHFR

Folik asit (folat), son dönemlerde biyolojik önemi ile öne çıkan bir moleküldür. Pteridin, p-aminobenzoik asit ve glutamik asitten oluşan pteroilglutamik asit yapısında, suda çözünen bir vitamindir. Folik asit ve türevleri başta purin, pirimidin metabolizması ve homosistein, metionin aminoasitlerinin metabolizması gibi önemli biyokimyasal olaylarda rol almaktadırlar. Bu nedenle hematopoetik dokular, gastrointestinal kanal mukozası ve gelişen embriyo gibi DNA yapım ve yıkımının hızlı olduğu dokularda folat esansiyeldir. Normal DNA ve protein sentezinde folik asit ve B12 vitamininin gerekliliği bilinmektedir.

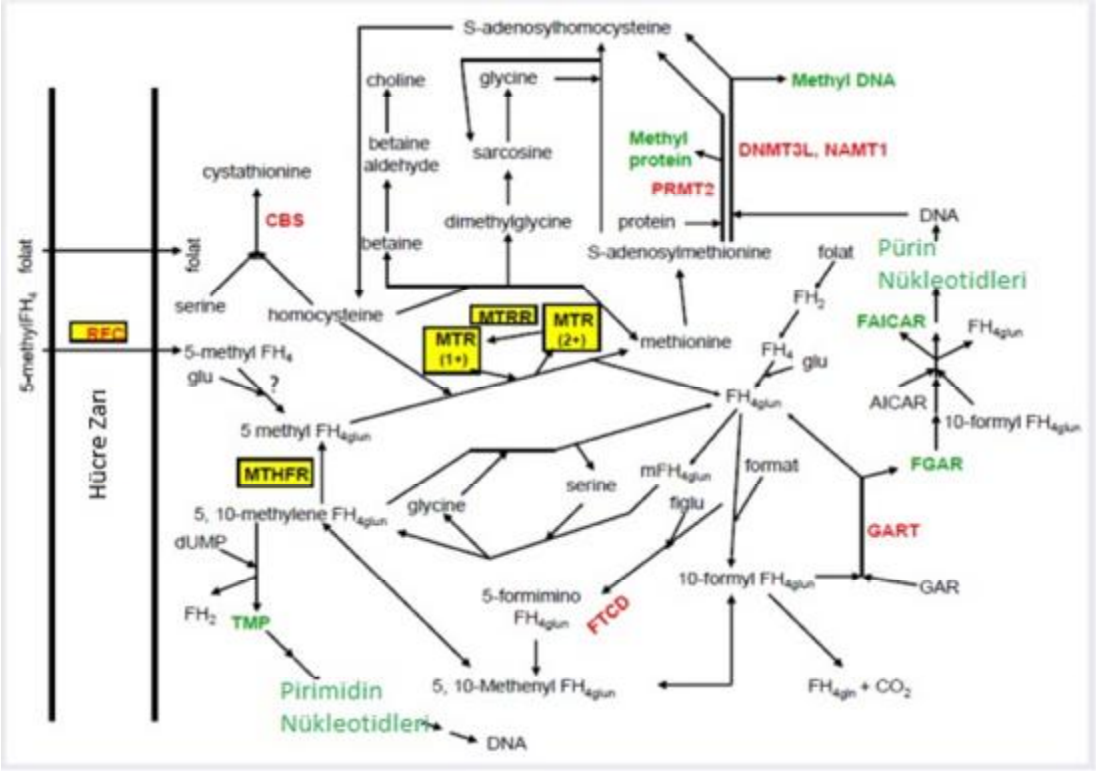
Folatlar yiyeceklerde 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF) ve formiltetrahidrofolat (FTHF) olarak bulunmaktadır. 5-MTHF, besinsel folatların en baskınıdır ve 5-metil-5,6-dihidrofolata kolayca okside edilir. Bu okside form, toplam besin folatlarının tamamını sunabilir ve yemekten sonra midede etkin olan asit şartları altında hızlıca indirgenir. Aynı koşullarda 5-MTHF nisbeten stabildir. Normal mide, bir konsantrasyon gradientine karşı lümene, nitrit ve reaktif oksijen metabolitlerinin güçlü inhibitörü olan askorbik asiti salgılamaktadır. Askorbik asit, 5-metil-5,6-dihidrofolatın asidik koşullarda değerlendirilmesinde kritik bir faktör olabilir. Bu mekanizma, besinlerden folatın biyoyararlılığının optimize edilmesinde önemli olabilir. Beslenme ile alınan folatın taşınımı, transmembran pH gradienti ile

anyon değişim mekanizmasını devam ettiren süreçler aracılığıyla enterosit fırça membranında yapılır. Lümen pH'sında folat anyoniktir. Absorbsiyon, proksimalde (Bağırsağın başlangıç kısımları) daha etkili olmak üzere jejenum (orta barsak) boyunca devam eder. Poliglutamil folatlar, pteroil-ɣ -glutamil hidrolaz tarafından folilmonoglutamatlara dönüştürülür ve enterositlerde 5-metiltetrahidrofolata metabolize olur. Monoglutamil folat koenzimi, vitaminin plazma formudur ve B12 ye bağımlı metionin sentaz tarafından monoglutamil tetrahidrofolata dönüştürüldüğü periferal dokulara taşınmaktadır. Monoglutamil tetrahidrofolat, oligo-ɣ -glutamil tetrahidrofolat oluşturmak için glutamat parçalarını biraraya getiren folilpoliglutamat sentaz (FPGS) enziminin substratıdır. Bu reaksiyonun ürünü hekzaglutamil tetrahidrofolattır (Keser ve ark. 2014).

Folatın metabolik rolü, oksidasyonun değişik düzeylerinde ortaya çıkan tek karbon birimlerini taşımasıdır. Tek karbon transfer reaksiyonlarından en önemli 5 tanesi; serinin glisine dönüşümü, histidin katabolizması, timidilat, metiyonin ve pürin sentezidir (Şekil 1.5.1). Bu reaksiyonlar, FADH2 ve NADPH gibi koenzimler ve özgün enzim sistemleri aracılığı ile kolaylaştırılmış farklı elektron transfer basamaklarında yer almaktadır. Folat hücrelere 5-metiltetrahidrofolat olarak girmektedir. Folatın hücresel alımı için B12'ye bağımlı metiyonin sentaz oranı sınırlayıcıdır. Çünkü bu enzim, 5-MTHF den THF üretimi için gereklidir. Folata bağımlı tek karbon metabolizmasında tek karbon birimlerinin ana orjini serinhidroksimetiltransferaz (SHMT) tarafından katalizlenen reaksiyonda serinin beta karbonudur. Bu reaksiyonda glisin oluşturulur ve tetrahidrofolat, 5,10-MTHFR'ye dönüştürülür (Patterson, 2008; Keser ve ark. 2014).

Kronik folat ve metil eksikliği, anormal DNA metilasyonu, DNA kırıkları ve kromozom ayrılmasındaki kusurlarla sonuçlanmaktadır. Klinik ve deneysel çalışmalar, genomik DNA hipometilasyonunun kromozomal yapısal değişimler ve anormal segregasyon (ayrılma) ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Metilentetrahidrofolat Redüktaz enzimi (MTHFR), homosisteinin metionine remetilasyonu için 5,10-metilen tetrahidrofolatın, metil vericisi olan 5-metiltetrahidrofolata dönüşümünü katalizler. Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5-metil tetrahidrofolat düzeyi azalmakta, 5,10-metilen tetrahidrofolat ile plazma

homosistein düzeyleri artmaktadır. Yüksek homosistein seviyesi ise kusurlu folat metabolizmasına işaret etmektedir (Patterson, 2008; Keser ve ark. 2014).



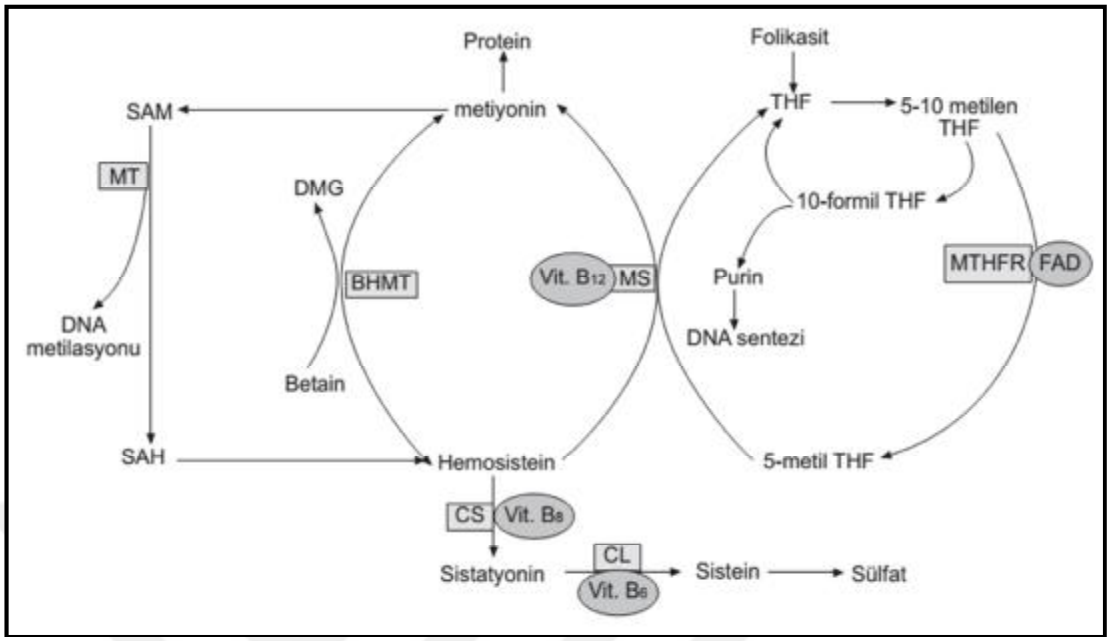
Şekil 1.1. Tek karbon ve transsülfürasyon Metabolizması: Bazı çalışmalarda Down sendromlu çocuk doğma insidansını etkilediği belirtilen enzimler koyu ve sarı renkte gösterilmiştir. Kırmızı renkte olan enzimler, 21. kromozomda kodlanan genlerdir. Yeşil renkte gösterilen bileşenler hücre yaşamı, replikasyon ve fonksiyonunda kritik role sahip olan metilasyon reaksiyonlarının ürünleridir. Soru işareti (?) ile gösterilenler o reaksiyonda önemi net olarak bilinmeyenlerdir. Kısaltmalar; MTHFR: Metilen tetrahidrofolat redüktaz; MTR: Metiyonin sentaz; MTRR: Metiyonin sentaz redüktaz; FH_2 : Dihidrofolat; FH_4 : Tetrahidrofolat; glun: Poliglutamatlar; TMP: Timidin monofosfat; dUMP: deoksiuridin monofosfat; figlu: formiminoglutamat; GAR: Fosforibozilglisinamid; FGAR: Fosforibozilformilglisinamid; AICAR: Fosforibozilamino imidazol karboksamid; FAICAR: Fosforibozilformilamino imidazol karboksamid; NAMT1: putatif N6-DNA metil transferaz; RFC: İndirgenmiş folat taşıyıcısı; GART: Fosforibozilglisinamidtransformilaz; PRMT2: Protein arjinin N-metil transferaz 3-like; CBS: Sistation beta sentaz; FTCD: Formimino tetrahidrofolatsiklodeaminaz (Patterson, 2008).

MTHFR enziminin, metilentetrahidrofolat'ı (MTHF) tetrahidrofolat'a (THF) dönüştürdüğü reaksiyonun bulunduğu nokta, DNA metilasyonu, folik asit,

homosistein ve nükleotid sentezini etkileyen kavşak bir noktadır (Şekil 1.5.2). Bu yüzden ilgili metabolik yolları da etkilemekte ve bu mekanizmalar ile ilgili olan yolaklara da etki etmektedir (İzmirli ve ark., 2014). DNA Metilasyonu, epigenetik mekanizmalardan olup gen ekspresyonunun düzenlenmesinde hayati önem taşıyan bir işlemdir. Burada, DNA üzerindeki CpG adalarındaki sitozinin 5' ucuna bir metil grubu takılır ve bu işlem gen ifadesinin kontrol edilmesi ya da susturulmasında görev yapar. Bu yolakta metil vericisi olarak normal memeli hücrelerinde önemli bir vitamin olan folik asit kullanılır. Folik asit çok önemli bir kavşak noktasında bulunmakta ve burada MTHFR, metiyonin, S-adenozil metiyoninin (SAM) ve DNA sentezi arasındaki dengeyi sağlamaktadır.

Homosistein metabolizması, kofaktör veya kosubstratlar olarak vitaminlere bağlıdır. Transsülfürasyon yolağında homosistein, sistatiyon β sentaz (CBS) tarafından sistatiyona dönüştürülür (Patterson , 2008). Sistatiyonun sistein ve α keto butirik aside dönüştürülmesi için de vitamin B6 gerekmektedir. Bu reaksiyon tek-karbon metabolizmasında önemlidir çünkü metiyonin, DNA, protein ve lipid metilasyonunda metil donorü olan S-adenozil metiyoninin (SAM) öncülüdür. MTHFR geninde bir mutasyon varlığında, 5-metil tetrahidrofolat ve metiyonin seviyelerinin azalması ile birlikte homosistein seviyelerinde artış gerçekleşmektedir (Şekil 1.5.2).

Serbest sülfidril grubu taşıyan bir aminoasit olan homosistein diyetle alınmaz, proteinlerin yapısına katılmaz ve sadece metionin metabolizmasının bir ara ürünü olarak vücutta oluşturulur. Metilasyonla metionine dönüştürülmesi B12, transsülfürasyonla sisteine dönüştürülmesi ise B6 vitaminine bağımlı enzimatik reaksiyonlardır (Patterson, 2008). Normal koşullarda homosistein üretimi ve metabolizması arasında sıkı bir denge mevcuttur. Populasyonlar arasında farklılık gösterse de plazma homosistein düzeyi 5-15 mmol/L olarak kabul edilmektedir.



Şekil 1.2. Homosistein'in transsülfürasyon ve remetilasyon ile metabolizma yolları MS: Metiyonin sentetaz, CS:Sistatyonin β sentetaz; BHMT:Betain homosistein metil transferaz, MT: Metil transferaz, SAM:S-adenozilmetiyonin, CL:Sistatyonin γ liyaz

Homosistein düzeyi, metabolizmadaki genetik bozukluklar, kronik hastalıklar, vitamin ve beslenme eksiklikleri, kişisel özellikler (yaş, cinsiyet vb.) ve bazı ilaçlardan etkilenmektedir. Özellikle yaşla birlikte artış göstermekte olup, erkeklerde kadınlara oranla daha yüksektir. Hiperhomosisteinemi ve dolayısı ile homosisteinüriye neden olan artmış plazma homosistein düzeyi, arteriyal ve venöz trombozis, strok (inme), miyokardial infarkt ve kronik renal yetersizlik gibi birçok hastalıklar için önemli risk faktörüdür. Artan homosistein düzeyi, folik asit alımı ile normal seviyelere çekilebilir. Bu nedenle artışın nedeninin araştırılması ve diyetle normal seviyelere çekilmesi sağlık açısından önem taşımaktadır.

MTHFR geni, 1998 yılında klonlanmış olup 102 bp'den 432 bp'ye değişen uzunluklarda 11 ekzondan oluştuşmaktadır. Bu gen birinci kromozomun kısa kolu üzerinde (1p36.3) yer almaktadır (Botto ve Yang, 2000; Esfahani ve ark., 2003; İzci-Ay ve ark., 2015). C677T, Ala222Val ve A222V olarak ta bilinen SNP'nin Rs kodu Rs1801133'tür. Yine MTHFR geninde bir SNP olan ve mRNA'nın 1298. pozisyonunda A>C sübstitüsyonunu temsil eden A1298C, E429A ve glu429ala'nın Rs kodu Rs1801131 dir (İzci-Ay ve ark., 2015).

MTHFR genindeki varyasyonlara bağlı olarak aktivitesinin azalması, DNA hipometilasyonu ile sonuçlanmaktadır. Anormal folat seviyeleri ve metilasyon metabolizması, anormal kromozom dağılımına yol açabilmektedir (Park ve ark., 2005). Folat durumu homosistein metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Sıklıkla folat eksikliği görülebilir ve bununla ilişkili olarak hiperhomosisteinemi infertilite de dahil olmak üzere birçok hastalık için risk faktörü olarak değerlendirilir. Wong ve arkadaşlarının çalışmasına göre çinko sülfat ve folik asit kombine tedavisinin subfertil ve fertil erkeklerde total normal sperm sayısını arttırdığı rapor edilmiştir (Wong ve ark., 2002).

2. Önceki Çalışmalar

2.1. MTHFR ve İnfertilite İlişkisi

Fertilite ve folik asit tedavisi ilişkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Wong ve arkadaşlarının çalışmasına göre çinko sülfat ve folik asit kombine tedavisinin subfertil ve fertil erkeklerde total normal sperm sayısını arttırdığı rapor edilmiştir (Wong ve ark., 2002).

Bilinen standart testlerin yanı sıra, son zamanlarda açıklanamayan infertilite etiyolojisinde MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerine ve metilasyon durumlarına da bakılmaktadır (Azem ve ark., 2004; Di Micco ve ark., 2004; Park ve ark., 2005; Casadei ve ark., 2010; Singh ve ark., 2010; Wu ve ark., 2010; Herodež ve ark., 2013; Adıgüzel ve ark., 2015).

Di Micco ve arkadaşlarının (2004) yaptığı bir çalışmada 39 açıklanamayan infertiliteye sahip kadın hasta ve 15 infertilite sorunu olmayan kadında MTHFR C677T mutasyonu da dahil olmak üzere kalıtsal trombofili çalışılmıştır. Sonuç olarak infertil kadın grubunda yüksek bir MTHFR C677T homozigositesi (Homozigotluk) bulunmuştur. (Di Micco ve ark., 2004).

Azem ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları başka bir çalışmada, 4 veya daha fazla IVF başarısızlık öyküsü olan 45 infertil kadın (grup A), 44 sağlıklı kadınla MTHFR C677T mutasyonu da dahil olmak üzere kalıtsal trombofililer açısından karşılaştırılmış ve trombofilinin tekrarlayan gebelik kayıplarında özellikle de açıklanamayan infertilite grubunda etiyolojide rol oynayabileceğini bulmuşlardır (Azem ve ark., 2004). Ayrıca bu çalışmada MTHFR C677T mutasyonu açısından homozigositenin kadınlarda tekrarlayan gebelik kaybı için risk oranında küçük bir artışa yol açtığını belirtmişlerdir (Azem ve ark., 2004).

Coulam ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada açıklanamayan infertilite ve kalıtsal trombofili arasında muhtemel bir ilişkiyi, özellikle de MTHFR C677T polimorfizmi ve açıklanamayan infertilite arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişkiyi rapor etmişlerdir (Coulam ve ark., 2008).

Bianca ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada, açıklanamayan infertilitesi olan 32 çift, tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan 130 çift ile trombofili ve MTHFR geninin C677T ve A1298C mutasyonları açısından karşılaştırılmıştır. Bu araştırıcılar, MTHFR C677T mutasyonu açısından homozigosite ve açıklanamayan infertilite arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki bulmuşlardır ($p<0.05$). MTHFR A1298C mutasyonu ve açıklanamayan infertilite arasında herhangibir ilişki bulamamışlardır (Bianca ve ark., 2009).

MTHFR genindeki varyasyonlara bağlı olarak enzim aktivitesinin azalması, DNA hipometilasyonu ile sonuçlanmaktadır. Anormal folat seviyeleri ve metilasyon metabolizması, anormal kromozom dağılımına yol açabilmektedir (Park ve ark., 2005). Folat durumu homosistein metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Sıklıkla folat eksikliği görülebilir ve bununla ilişkili olarak hiperhomosisteinemi infertilite de dahil olmak üzere birçok hastalık için risk faktörü olarak değerlendirilir.

Casadei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2010) 100 açıklanamayan infertil tanısı almış kadın ve 200 sağlıklı fertil kadından oluşan kontrol grubu ile vaka-kontrol çalışması yapılmış, her iki grup kadınlar MTHFRC677T mutasyonu açısından incelenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Casadei ve ark., 2010).

Singh ve ark. Hint toplumunda yaptıkları iki farklı çalışmadan (2010) birincisinde; C677T mutasyonu açısından homozigotluğun (TT genotipi) idiyopatik erkek infertilitesi açısından bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir. Aynı grubun ikinci çalışmalarında ise MTHFR A1298C polimorfizmi açısından CC genotipinin Hint toplumunda idyopatik erkek infertilitesi için genetik bir risk faktörü olduğunu rapor etmişlerdir (Singh ve ark., 2010).

Wu ve ark. nın, (2010) Çin'de spermlerde yaptıkları bir çalışmada, MTHFR geni promotorunun hipermetilasyonu idiyopatik erkek infertilitesi ile ilişkili bulunmuştur (Wu ve ark., 2010).

Herodež ve ark. nın Slovak çiftlerde yaptığı çalışmada (2013) açıklanamayan infertilite tanısı almış erkeklerde 677T alleli ile anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p = 0.036). Yine açıklanamayan infertilite tanısı almış erkeklerde A1298C polimorfizmi açısından CA and CC haplotipleri kontrole göre düşük (p= 0.021), C677T

polimorfizmi açısından CT genotipi kontrole göre istatistiki olarak önemli oranda yüksek (p = 0.001) bulunmuştur (Herodež ve ark., 2013). Bu çalışmaya göre sadece erkeklerde, MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri ile açıklanamayan infertilite arasında anlamlı bir ilişki mevcuttur (Herodež ve ark., 2013).

Adıgüzel ve ark. nın çalışmasında (2015) hasta ve kontrol grubu kadınlar arasında MTHFR C677T mutasyonu, açısından açıklanamayan infertilite sebebi olabileceğini gösterecek anlamlı bir fark saptanmamıştır (Adıgüzel ve ark., 2015).

MTHFR polimorfizmleri, infertilite dışında diğer hastalıklarda da çalışılmıştır. Papapetrou ve ark. (1996) MTHFR 677T homozigotluğunun sadece bazı etnik gruplarda nöral tüp defekti (NTD) için risk faktörü olabileceğini önermişlerdir (Papapetrou ve ark., 1996). Isotalo ve ark. nın (2000) yenidoğan ve fetal olgularda MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerini değerlendirdiği bir çalışmada, her iki polimorfizmin mutant formlarından oluşan kombine (bileşik) MTHFR mutasyonlarının (TT/CC, CT/AC gibi) fetal kayıp riskinden sorumlu olabileceğini bildirmişlerdir (Isotalo ve ark., 2000). Gonzalez-Herrera ve arkadaşlarının (2002), Meksika Yucatan da yaptıkları bir çalışmada, 65 nöral tüp defekti olgusu (NTD), 60 NTD olgusunun annesi ve 110 kişiden oluşan kontrol grubunda MTHFR C677T polimorfizmi analiz edilmiştir. Bu çalışmada, T allelinin frekansı NTD olgularında, annelerinde ve kontrol grubunda sırasıyla %57, %52 ve %54 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada olgular ve kontrol grubu arasında bir fark bulunmamış olsa da kontrol grubundaki T alleli frekansının yüksekliği ilgi çekicidir. Bu araştırıcılar, kontrol grubundaki T alleli frekansı, diğer populasyonlarda yapılan çalışmalardaki kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmuşlardır (Gonzalez-Herrera ve ark., 2002).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal, Hasta ve Kontrol grupları

MTHFR geninin iki yaygın polimorfizmi (C677T ve A1298C), Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İnfertilite Polikliniğine başvuran çiftlerden açıklanamayan infertilite tanısı alan ve düşük öyküsü olmayan 30 çift ve sağlıklı 31 kontrol çiftinde çalışılmıştır. Bu amaçla, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İnfertilite Polikliniğine başvuran çiftlerden alınan kanlar kullanılmıştır. Çalışma grubu infertil çiftlerden, kontrol grubu ise fertil çiftlerden oluşturulmuştur. Çalışmanın uygunluğu, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmada yer alan tüm hasta ve kontrol gruplarının çalışmaya katılımları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi bilgi ve taahhüt formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış DNA çalışması onam formları doldurularak sağlanmıştır (EK-1 de).

3.2. Metod, Kan alınması ve Saklanması

Hasta ve kontrol bireylerinden üç farklı tüpe alınan kanlardan mor kapaklı EDTA'lı tüpe alınan DNA izolasyonunda kullanılmak üzere -20 C˚de saklanmıştır. Mor kapaklı EDTA'lı tüpe alınanlardan diğeri folat ölçümünde kullanılmak üzere 1000 devir/dak santrifüj edilerek serumları steril bir ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra -20˚C de saklanmıştır. Kırmızı kapaklı antikoagülansız alınan kanlar 1000 devir/dak santrifüj edilerek plazmaları steril bir ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra homosistein değerleri çalışılacağı zaman çözdürülmek üzere -20˚C de saklanmıştır. MTHFR geninin etkilediği homosistein düzeyleri (serumda) human hcy ELISA kiti ile folat değerleri ise Beckman coulter Unicel DxI 800 kemilüminisans test kitleri ile Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez laboratuvarında belirlenmiştir. Çalışma, Beckman firması tarafından önerilen prosedüre uygun olarak yapılmıştır.

Kitler projemizin BAP bütçesi ile satın alınmış ve çalışmalar protokole uygun şekilde birlikte yürütülmüştür. Homosistein ELISA kiti çalışma prensibi şu şekildedir:

- Belirteç, örnekler ve standartlar hazırlanır
- Örnek, standartlar ve enzim ile işaretlenmiş antikorlar 37˚C de 60 dk. inkübe edilir.
- Plate'ler 5 kez yıkanır, A ve B kromojen çözeltileri eklenerek 37˚C de 10 dk. inkübe edilir. B çözeltisi ışığa hassastır. Işıktan korumak gerekir.
- Stop çözeltisi eklenir
- OD (Optical density) değerleri stop çözeltisi eklendikten sonra 15 dk içinde okunur. Blank kuyucuğu (kör) sıfırlanır. Kör ve örnekler 450 nm de okunur. Okumalar Biotek Elisa okuyucu ile yapılmıştır.
- Hesaplamalar yapılır

3.3. DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubu bireylerden alınan kanlardan DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA'lar Invitrogen Genomic DNA Mini Kit (CA, USA) ile hasta ve kontrol grubundan EDTA'lı tüplere alınan periferik kanlardan, lökositlerden izole edilmiştir. Yöntem şu basamaklardan oluşmaktadır:

1. Ependorf tüpe 200 µl kan alınır
2. Üzerine 20 µl proteinaz K, 20 µl RNAz A ve 200 µl Genomik Liziz tamponu eklenir.
3. Vortekslenen karışım 55 C˚de 10 dk su banyosunda bekletilir.
4. Üzerine 200 µl %100 etanol eklenir.
5. Vorteksle karıştırılan karışım kolona aktarılır.
6. 12000 devir/dak de 1 dk santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılır.
7. Kolona 500 µl yıkama çözeltisi (Wash buffer 1) eklenerek 12000 rpm de 1 dk santrifüj edilir.
8. Toplama tüpü atılır

9. Kolona 500 µl yıkama çözeltisi (Wash buffer 2) eklenerek maksimum hızda 3 dk santrifüj edilir.
10. Toplama tüpü atılır
11. Kolona 50-200 µl yıkama ve ayrıştırma tamponu (Elution buffer) eklenir. Maksimum hızda 90 sn santrifüj edilir. Toplama tüpünde, DNA elde edilmiş olur.

3.4. DNA Konsantrasyonunun ve Saflığının Ölçülmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve endonükleazlarla kesim reaksiyonları amacıyla izole edilen DNA örneklerinin miktarını ve saflığını bilmek önemlidir. 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunan her absorbansın değeri 50 µg/ml DNA miktarına karşılık gelmektedir. Bu absorbans değeri DNA'nın saflık değerini kontrol etmek amacıyla da kullanılabilmektedir. Saf bir DNA örneğinde spektrofotometrede 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı A_{260}/A_{280}= 1.8 dir. Bu rakamdan düşük değerler **proteinlerle**, büyük değerler ise **RNA** ile kontaminasyonu göstermektedir.

DNA konsatrasyonu ve saflığı 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu dalga boylarında ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/µl veya µg/ml düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanıldı. DNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek için izole edilen her bir DNA örneğine aşağıda gösterildiği gibi sulandırma yapıldı:

DNA örneği → 4µl
Su (DNAz sız) → 96 µl
} Sulandırma oranı 1:24

Bu dilusyonun 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik absorbsiyonları ölçüldü. Konsantrasyonun hesaplanması aşağıdaki reaksiyonda gösterilmiştir.

Total DNA(ng/µl)=260 nm'deki×40×Dilüsyon faktörü: İzole edilen DNA'lar spektrofotometrede ölçümü yapıldıktan sonra -20 C˚de saklandı. Ölçümler Tıbbi biyoloji Anabilim Dalında bulunan İmplen nanofotometre ile yapıldı. Konsantrasyonu düşük okunan örneklerden tekrar DNA izolasyonu yapıldı.

3.5. MTHFR geninin iki polimorfizminin (C677T ve A1298C) genotiplendirme çalışılması

ABI (Applied Biosystems) Genetic Analyzer cihazında, multipleks PCR amplifikasyon/ligasyon ürünlerinin SNP analizi (Fragman analizi) kiti ile metilentetrahidrofolat redüktaz genindeki C677T ve A1298C mutasyonları saptanmıştır. Böylece bu yöntemle hasta ve kontrol gruplarının genotipleri belirlenmiştir. Kit (GML SNP Detective Panel v.21) iki hedef dizinin amplifikasyonu için 2 primer çifti içerir. SNP'lerin saptanması için de 4 adet tek baza özgün DNA probları kullanılmaktadır. Kit, otomize SNP analizi için tek tüpte multipleks amplifikasyon/ligasyon reaksiyonlarını içeren 2- boyalı floresan sistemi kullanır. Florokrom boyalar, GML-105 büyüklük standardı ile birlikte kullanılan FAM (C677T için) ve JOE (A1298C için) dan oluşur. Genomik DNA ve problardaki sorunları tanımlamak için kit, her iki mutasyonun heterozigot formunda bir eksternal kontrol içerir. Analiz için GeneMapper yazılımı kullanılmaktadır. Yöntemin aşamaları şu şekilde özetlenebilir:

- DNA'nın izole edilmesi
- DNA'nın konsantrasyonunun ölçülmesi
- Multipleks PCR
- Prob ligasyonu
- Elektroforez
- Analiz

Multipleks PCR'ın hazırlanması Çizelge 3.1 de gösterilmiştir

Çizelge 3.1. Genotipleme çalışmalarında kullanılan multipleks PCR'ın bileşen ve hacimleri. PCR karışımında, primer, Taq Polimeraz ve tampon dışındaki dNTP'ler ve Mg gibi bileşenler bulunmaktadır.

Bileşen	**Hacim (µl)**
Primer karışımı	2.0
PCR karışımı	5.0
Taq Polimeraz	0.1
Tampon	2.0
DNA	1.0
Toplam	10.0

PCR Programı Çizelge 3.2.de verildiği gibi uygulanmıştır:

Çizelge 3.2. Genotipleme çalışmalarında kullanılan multipleks PCR programı

Aşama	**Tanım**	**Isı**	**Zaman**
1	Aktivasyon	96 C˚	5 dk.
2	Amplifikasyon 35 döngü	95 C˚ 60 C˚ 72 C˚	45 sn 1 dk 45 sn
3	Uzama	72 C˚	5 dk
4	Enzim inaktivasyonu	99.9 C˚	30 dk
5	Bitiş-Muhafaza	4 C˚	Muhafaza

Eksternal kontrol PCR ürünü içerdiği için yeniden PCR'a alınması gerekmez. Sadece prob ligasyon reaksiyonuna alınır.

Prob Ligasyonu Çizelge 3.3. te verildiği gibi uygulanmıştır:

Çizelge 3.3. Genotipleme çalışmalarında kullanılan prob ligasyonu'nun bileşen ve hacimleri

Bileşen	**Hacim (µl)**
Prob Karışımı	2.0
DNA Ligaz	0.5
10XLigaz Tamponu	2.0
Distile Su	5.5
PCR ürünü	10.0
Toplam	20.0

Prob Ligasyon Reaksiyonu Çizelge 3.4. te verildiği gibi uygulanmıştır:

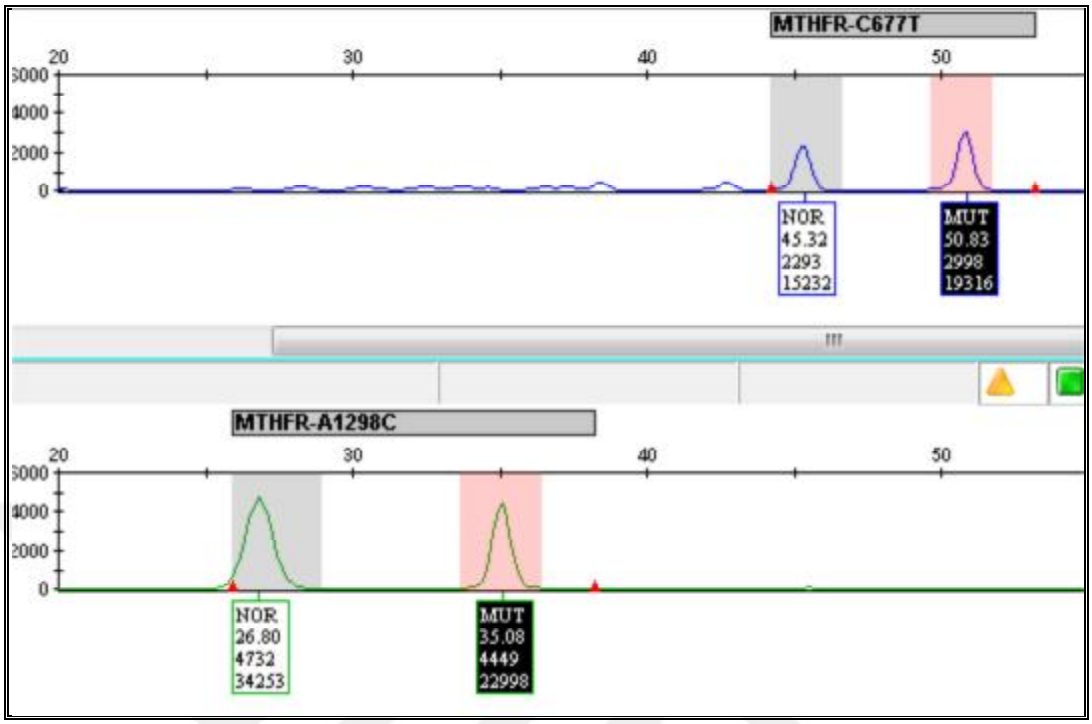
Çizelge 3.4. Genotipleme çalışmalarında kullanılan Prob Ligasyon Reaksiyon programı

Aşama	**Tanım**	**Isı**	**Zaman**
1	Ligasyon 35 döngü	95 C˚ 60 C˚	30 sn 2 dk
2	Enzim İnaktivasyonu	99 C˚	10 dk
3	Bitiş-Muhafaza	4 C˚	Muhafaza

Elektroforez ve Analiz: ABI 3130 Genetic Analyzer cihazında kapiller elektroforez için her bir tüpe:

- 10 µl Hi-Di Formamid ve 0.3 µl GML-105 Büyüklük standardı
- 1 µl PCR ürünü eklenir
- Data collection Software ile plate oluşturulur
- Uygun sonuç grubu seçilir
- Cihaza uygun çalıştırma modülü (Run module) seçilir
- Çalıştırma modül parametreleri ve şartları Pop 7 polimer ve 36 cm kapillerde uygulanır.

Analiz ekranı ve genotiplerin okunması şekil 3.1 de gösterilmiştir:



Şekil 3.1. MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri açısından genotipleme analiz ekranı. Örnek normal ve mutant piklere sahip ise heterozigot olarak genotiplendirilir. Sadece normal pike sahip ise homozigot normal, sadece mutant pike sahip ise homozigot mutant olarak genotiplendirilir.

3.6. İstatiksel Analizler

Klinik verilerin istatistiksel değerlendirilmeleri için Student t-testi uygulanmıştır. Hasta-kontrol gruplarının allel ve genotip dağılımlarındaki farklar için istatiksel analizler SPSS 11.5 yazılımı ve Pearson Ki-kare (x^2) testi kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel önem seviyesi $p<0.05$ olarak tanımlanmıştır. Hasta-kontrol gruplarının farklı genotipleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Odd ratio (OR) ve 95% confidence interval (95% CI= güven aralık) değerleri hesaplanmıştır. MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin arasındaki etkileşim lojistik regresyon modeli kullanılarak saptanmıştır.

4. BULGULAR

Açıklanamayan infertilite tanısı almış bireylerden oluşan grup ve kontrol grubu bireylerden alınan kan örneklerinden izole edilen DNA konsantrasyonları, A260/280 oranları, homosistein, folat değerleri ve MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerine ait genotipleri, Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Bu araştırmada; açıklanamayan infertilitesi olan grupta MTHFR C677T polimorfizminin CC, CT ve TT genotipleri için dağılımı sırasıyla %52, %42 ve %6 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise %48, %42 ve %10 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Açıklanamayan infertilitesi olan grupta allel sıklığı C alleli için %72.5, T alleli için %27.5 olarak; kontrol grubunda ise allel sıklığı C alleli için %69, T alleli için %31 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Çalışmamızda, yapılan istatistiksel analiz sonucunda; açıklanamayan infertilite ve kontrol grubu arasında MTHFR C677T polimorfizminin genotip ve allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Açıklanamayan infertilitesi olan kadın grubunda MTHFR C677T polimorfizminin CC, CT ve TT genotipleri için dağılımı sırasıyla %37, %50 ve %13 olarak bulunmuştur. Kontrol kadın grubunda ise %52, %35 ve %13 olarak bulunmuştur. Açıklanamayan infertilitesi olan erkek grubunda MTHFR C677T polimorfizminin CC, CT ve TT genotipleri için dağılımı sırasıyla %67, %33 ve 0 olarak bulunmuştur. Kontrol erkek grubunda ise %45, %48 ve %7 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite ve kontrol grubu; kadın ve erkek cinsiyetleri arasında MTHFR C677T polimorfizminin genotip ve allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çalışmamızda, açıklanamayan infertilitesi olan grupta MTHFR A1298C polimorfizminin AA, AC ve CC genotipleri için dağılımı sırasıyla %38, %50 ve %12 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise %47, %37 ve %16 olarak bulunmuştur. Açıklanamayan infertilitesi olan grupta allel sıklığı A alleli için %63, C alleli için %37 olarak; kontrol grubunda ise allel sıklığı A alleli için %65, C alleli için %35 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5). Çalışmamızda, yapılan istatistiksel analiz sonucunda; açıklanamayan infertilite ve kontrol grubu arasında MTHFR A1298C

polimorfizminin genotip ve allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Genotipler için p=0.896>0.05; Allel sıklığı için p=0.827>0.05) (Çizelge 4.3, Çizelge 4.5).

Çalışmamızda, açıklanamayan infertilitesi olan kadın grubunda MTHFR A1298C polimorfizminin AA, AC ve CC genotipleri için dağılımı sırasıyla %43, %40 ve %17 olarak bulunmuştur. Kontrol kadın grubunda ise %48, %39 ve %13 olarak bulunmuştur. Açıklanamayan infertilitesi olan erkek grubunda MTHFR A1298C polimorfizminin AA, AC ve CC genotipleri için dağılımı sırasıyla %33, %60 ve 7 olarak bulunmuştur. Kontrol erkek grubunda ise %45, %36 ve %19 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite ve kontrol grubu; kadın ve erkek cinsiyetleri arasında MTHFR A1298C polimorfizminin AA ve AC genotip sıklığı; A ve C allel sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05).

A1298C polimorfizmi açısından CC genotip oranlarının açıklanamayan infertilite tanısı almış erkeklerde kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve bu farklılığında istatistiksel olarak önemli (p<0.05; oranların farkına ait hipotez testi uygulanmış olup z=1.9) olduğu bulunmuştur.

Çizelge.4.1. İnfertil grubun homosistein, folat değerleri ve genotipler (MTHFR C677T ve A1298C)

	DNA Konsantrasyonu	**A260/280**	**Homosistein**	**Folat**	**C677T**	**A1298C**
1	67.5	1.80	9.303	5.25	Heterozigot	Normal
2	102	1.70	7.877	4.4	Normal	Heterozigot
3	90	1.80	14.032	7.6	Heterozigot	Heterozigot
4	72.5	1.81	9.390	7.24	Normal	Normal
5	62.5	1.92	42.929	9.44	Heterozigot	Heterozigot
6	130	1.73	8.606	3.64	Heterozigot	Heterozigot
7	87.5	1.75	20.917	19.15	Heterozigot	Normal
8	65	1.73	9.050	6.1	Normal	Heterozigot
9	100	1.74	18.079	3.32	Heterozigot	Normal
10	70	1.75	7.865	5.29	Normal	Heterozigot
11	50	1.81	8.752	6.24	Normal	Heterozigot
12	77.5	1.82	15.551	5.58	Normal	Normal
13	52.5	1.75	9.109	10.62	Normal	Homozigot
14	50	1.66	7.698	2.93	Heterozigot	Normal
15	27.5	1.83	8.561	13.46	Normal	Homozigot
16	47.5	1.7	8.947	7.19	Normal	Heterozigot
17	45	1.6	8.203	>25.40	Normal	Heterozigot
18	15	1.5	7.926	9.2	Normal	Normal
19	17.5	1.6	>64	12.17	Heterozigot	Heterozigot
20	20	1.6	8.599	8.83	Normal	Heterozigot
21	65	1.63	7.213	15.28	Heterozigot	Normal
22	57.5	1.6	14.723	4.33	Normal	Normal
23	25	1.67	12.698	18.55	Heterozigot	Heterozigot
24	40	1.6	31.984	3.82	Normal	Homozigot
25	47.5	1.6	7.798	14.58	Normal	Homozigot
26	40	1.6	7.993	6.5	Normal	Homozigot
27	32.5	1.63	44.642	11.36	Heterozigot	Heterozigot
28	25	1.68	10.036	4.34	Normal	Heterozigot
29	32.5	1.5	7.811	5.92	Normal	Homozigot
30	47.5	1.73	13.337	2.74	Heterozigot	Normal
31	42.5	1.7	8.369	7.68	Heterozigot	Normal
32	57.5	1.65	9.612	8.03	Normal	Heterozigot
33	35	1.57	12.814	16.47	Heterozigot	Heterozigot
34	37.5	1.67	9.604	5.24	Heterozigot	Heterozigot
35	40	1.6	10.685	9.63	Normal	Heterozigot

Çizelge.4.1. Devamı

36	50	1.6	8.962	7.13	Normal	Heterozigot
37	80	1.7	7.791	9.86	Heterozigot	Heterozigot
38	70	1.75	>64	>25.40	Homozigot	Normal
39	95	1.81	13.507	12.16	Normal	Heterozigot
40	82.5	1.83	9.643	6.67	Normal	Normal
41	40	1.78	>64	21.24	Normal	Normal
42	45	1.65	7.257	7.3	Normal	Heterozigot
43	40	1.78	7.705	7.61	Heterozigot	Heterozigot
44	45	1.65	9.054	>25.40	Homozigot	Normal
45	100	1.81	8.816	21.41	Normal	Normal
46	87.5	1.84	8.582	4.12	Heterozigot	Normal
47	77.5	1.72	10.084	6.16	Heterozigot	Normal
48	87.5	1.84	22.395	17.17	Heterozigot	Heterozigot
49	25	1.67	8.704	8.54	Heterozigot	Heterozigot
50	60	1.6	8.051	13.08	Heterozigot	Normal
51	55	1.69	7.695	7.63	Normal	Heterozigot
52	67.5	1.69	7.739	13.5	Normal	Normal
53	80	1.68	6.452	5.65	Heterozigot	Normal
54	70	1.64	9.756	15.63	Heterozigot	Heterozigot
55	60	1.6	10.370	9.68	Normal	Heterozigot
56	50	1.67	7.436	8.47	Heterozigot	Normal
57	42.5	1.7	7.924	5.19	Normal	Heterozigot
58	82.5	1.73	9.000	5.51	Homozigot	Homozigot
59	125	1.73	3.640	5.83	Normal	Heterozigot
60	30	1.7	>64	22	Homozigot	Normal

Çizelge.4.2. Kontrol grubunun homosistein, folat değerleri ve MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerine ait genotipler.

Örnek No	DNA Kons.	A260/280	Homosistein	Folat	C677T	A1298C
1	50	1.67	10,455	8.34	Homozigot	Normal
2	62.5	1.78	12,348	7.24	Heterozigot	Heterozigot
3	47.5	2.00	14,367	6.57	Heterozigot	Normal
4	72.5	1.70	24,764	5.11	Heterozigot	Heterozigot
5	40	2.00	13,422	9.86	Normal	Normal
6	42.5	1.70	12,068	9.53	Heterozigot	Normal
7	37.5	1.66	14,501	7.87	Homozigot	Normal
8	47.5	1.60	13,171	5.05	Normal	Heterozigot
9	27.5	1.60	28,978	9.08	Normal	Homozigot
10	55	1.50	<0	6.86	Normal	Heterozigot
11	30	1.50	27,804	6.5	Homozigot	Normal
12	20	1.50	13,216	3.54	Heterozigot	Normal
13	22.5	1.50	3,762	8.94	Heterozigot	Normal
14	52.5	1.65	11,914	5.89	Normal	Homozigot
15	37.5	1.66	12,159	6.25	Normal	Heterozigot
16	25	1.50	11,442	3.55	Normal	Normal
17	52.5	1.90	15,631	5.15	Heterozigot	Heterozigot
18	65	1.73	12,585	6.75	Heterozigot	N
19	20	1.50	22,26	9.72	Normal	Normal
20	38	1.67	12,425	10.18	Heterozigot	Heterozigot
21	60	1.70	>32	7.89	Heterozigot	Heterozigot
22	43	1.67	14,884	3.56	Normal	Homozigot
23	33	1.63	14,367	10.43	Normal	Heterozigot
24	25	1.50	24,764	8.25	Normal	Heterozigot
25	20	1.50	13,422	6.81	Normal	Normal
26	25	1.60	12,068	8.75	Normal	Homozigot
27	50	1.67	>32	5.8	Normal	Heterozigot
28	45	1.88	12,757	5.33	Heterozigot	Heterozigot
29	85	1.80	7,616	6.28	Normal	Homozigot
30	35	1.63	26,014	11.34	Heterozigot	Heterozigot
31	40	1.78	>32	4.51	Heterozigot	Normal
32	38	1.87	11,911	6.89	Normal	Heterozigot
33	35	1.75	27,804	3.26	Normal	Homozigot
34	63	1.67	14,297	7.64	Normal	Homozigot
35	30	1.71	19,172	4.64	Heterozigot	Hetereozigot

Çizelge.4.2. Devamı

36	58	1.65	12,423	2.99	Homozigot	Normal
37	33	1.50	10,824	7.9	Heterozigot	Normal
38	98	1.80	16,666	8.89	Normal	Homozigot
39	15	1.50	12,159	6.69	Normal	Normal
40	83	1.80	11,442	7.1	Heterozigot	Normal
41	60	1.80	>32	13	Heterozigot	Normal
42	25	2.00	12,021	8.13	Heterozigot	Normal
43	15	1.50	14,054	9.42	Homozigot	Normal
44	30	1.75	7,042	9.69	Heterozigot	Heterozigot
45	38	2.00	7,977	12.68	Normal	Normal
46	45	1.80	0,076	16.07	Normal	Normal
47	30	1.72	>32	9	Normal	Normal
48	25	1.50	11,911	5.96	Homozigot	Normal
49	20	1.65	3,762	4	Heterozigot	Heterozigot
50	25	1.67	11,914	8.58	Normal	Homozigot
51	25	1.50	7,616	7.89	Heterozigot	Heterozigot
52	33	1.80	26,014	5.37	Heterozigot	Normal
53	268	1.80	>32	9.48	Normal	Heterozigot
54	40	1.80	9,044	7.75	Heterozigot	Normal
55	25	1.50	22,26	10.25	Normal	Normal
56	35	1.70	12,425	11.21	Normal	Normal
57	20	1.60	13,26	3.49	Normal	Homozigot
58	15	2.00	12,395	3.99	Heterozigot	Normal
59	20	1.50	12,446	5.83	Normal	Heterozigot
60	15	1.50	14,609	4.9	Normal	Normal
61	20	1.50	15,631	8.88	Heterozigot	Heterozigot
62	30	1.67	12,585	6.76	Heterozigot	Heterozigot

Çizelge.4.3. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri açısından genotipleri

	INFERTIL GRUP (1-60)						**TOPLAM**
MTHFR	**NORMAL**		**HETEROZİGOT**		**HOMOZİGOT**		
C677T	CC	(%)	CT	(%)	TT	(%)	
	31	(52)	25	(42)	4	(6)	60
Kadın	11	(37)	15	(50)	4	(13)	30
Erkek	20	(67)	10	(33)	0	0	30
	KONTROL GRUBU (61-122)						**TOPLAM**
MTHFR	**NORMAL**		**HETEROZİGOT**		**HOMOZİGOT**		
C677T	CC	(%)	CT	(%)	TT	(%)	
	30	(48)	26	(42)	6	(10)	62
Kadın	16	(52)	11	(35)	4	(13)	31
Erkek	14	(45)	15	(48)	2	(7)	31
	INFERTIL GRUP (1-60)						**TOPLAM**
MTHFR	**NORMAL**		**HETEROZİGOT**		**HOMOZİGOT**		
A1298C	AA	(%)	AC	(%)	CC	(%)	
	23	(38)	30	(50)	7	(12)	60
Kadın	13	(43)	12	(40)	5	(17)	30
Erkek	10	(33)	18	(60)	2	(7)	30
	KONTROL GRUBU (61-122)						**TOPLAM**
MTHFR	**NORMAL**		**HETEROZİGOT**		**HOMOZİGOT**		
A1298C	AA	(%)	AC	(%)	CC	(%)	
	29	(%47)	23	(%37)	10	(%16)	62
Kadın	15	(%48)	12	(%39)	4	(%13)	31
Erkek	14	(%45)	11	(%36)	6	(%19)	31

Çizelge.4.4. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T polimorfizmi açısından allel frekansları

	Allel Frekansları	
	A	**C**
	n (%)	**n (%)**
İnfertil	**76 (63)**	**44 (37)**
Kontrol	**81 (65)**	**43 (35)**
X^2 testi	**0.827**	

Çizelge.4.5. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C polimorfizmi açısından allel frekansları

	Allel Frekansları	
	C	**T**
	n (%)	**n (%)**
İnfertil	**87 (72.5)**	**33 (27.5)**
Kontrol	**86 (69)**	**38 (31)**
X^2 testi	**0.796**	

İnfertil ve kontrol gruplarına ait tüm folat ve homosistein değerlerinin ortalamaları aykırı değerler çıkarıldıktan sonra elde edilip istatistiksel testlerde kullanılmışlardır. Ortalaması alınan grupların bazıları sayısal olarak oldukça küçük sayıda elde edilebildiği için böyle durumlarda nonparametrik testler uygulanmıştır.

İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T heterozigot bireylerin folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.6).

Çizelge.4.6. İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T heterozigot bireylerin folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

p<0.05	**Ortalama**	**Standart Hata**	**P değeri**
İnfertil heterozigot	9.48	1.03	0.047
Kontrol heterozigot	7.19	0.47	

İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T normal bireylerin folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T homozigot bireylerin folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T heterozigot bireylerin homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.7).

Çizelge.4.7. İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T heterozigot bireylerin homosistein değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

p<0.05	**Ortalama**	**Standart Hata**	**P değeri**
İnfertil heterozigot	15.64	2.83	0.023
Kontrol heterozigot	15.51	1.62	

İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T normal bireylerin homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.8).

Çizelge.4.8. İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T normal bireylerin homosistein değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

p<0.05	**Ortalama**	**Standart Hata**	**P değeri**
İnfertil normal	11.61	1.93	0.000
Kontrol normal	15.84	1.52	

İnfertil ve kontrol grubu MTHFR C677T homozigot bireylerin homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol grubu MTHFR A1298C heterozigot, normal ve homozigot bireylerin folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol grubu MTHFR A1298C heterozigot, normal ve homozigot bireylerin homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.9).

Çizelge.4.9. İnfertil ve kontrol grubu MTHFR A1298C heterozigot, normal ve homozigot bireylerin homosistein değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

p<0.05	**Ortalama**	**Standart Hata**	**P değeri**
İnfertil heterozigot	13.82	2.4	0.002
Kontrol heterozigot	16.16	1.89	
p<0.05	Ortalama	Standart Hata	P değeri
İnfertil normal	17.40	3.92	0.008
Kontrol normal	15.16	1.44	
p<0.05	Ortalama	Standart Hata	P değeri
İnfertil homozigot	11.75	3.37	0.008
Kontrol homozigot	15.94	2.20	

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T heterozigot genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.10).

Çizelge.4.20. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T heterozigot genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

p<0.05	**Ortalama**	**Standart Hata**	**P değeri**
İnfertil heterozigot	12.04	1.28	0.004
Kontrol heterozigot	7.21	0.79	

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T normal genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.11).

Çizelge.4.11. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T normal genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

p<0.05	**Ortalama**	**Standart Hata**	**P değeri**
İnfertil normal	14.01	1.9	0.009
Kontrol normal	7.8	0.66	

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T homozigot genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T heterozigot genotipli kadın bireylerinde homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T normal genotipli kadın bireylerinde homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.12).

Çizelge.4.12. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T normal genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

p<0.05	**Ortalama**	**Standart Hata**	**P değeri**
İnfertil normal	14.08	5.01	0.015
Kontrol normal	19.01	2.24	

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR C677T homozigot genotipli kadın bireylerinde homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C heterozigot genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.13).

Çizelge.4.13. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C heterozigot genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

p<0.05	**Ortalama**	**Standart Hata**	**P değeri**
İnfertil heterozigot	13.48	1.55	0.002
Kontrol heterozigot	6.93	0.63	

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C normal genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.14).

Çizelge.4.14. İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C normal genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

p<0.05	**Ortalama**	**Standart Hata**	**P değeri**
İnfertil normal	15.47	2.11	0.007
Kontrol normal	8.6	0.56	

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C homozigot genotipli kadın bireylerinde folat değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun folat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C heterozigot genotipli kadın bireylerinde homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C normal genotipli kadın bireylerinde homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnfertil ve kontrol gruplarının MTHFR A1298C homozigot genotipli kadın bireylerinde homosistein değerlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grubun homosistein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Standart testlerden sonra infertilite nedeninin ortaya konamadığı durumlar, açıklanamayan infertilite olarak tanımlanmaktadır. Bunda genellikle oosit kalitesindeki, fertilizasyondaki veya implantasyondaki bozuklukların etkili olduğu düşünülmekle beraber, bu bozukluklar standart testler ile anlaşılamamaktadır (Adıgüzel ve ark., 2015). Bilinen standart testlerin yanı sıra, son zamanlarda açıklanamayan infertilite etiyolojisinde MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerine de bakılmaktadır (Frosst ve ark, 1995; van der Put ve ark, 1998; Guenther ve ark, 1999; Yamada ve ark, 2001; Eggermann ve Schwanitz, 2011). Polimorfizmler etnik kökene ve ırklara göre farklılık gösteren ve biyoçeşitlilikte rol oynayan faktörlerdir. MTHFR enzimi folik asit döngüsünü ve homosistein düzeyini etkileyen bir enzim olduğu için onu kodlayan gende bulunan ve gen ürününe etki eden polimorfizmler tüm dünyada önemsenmiş ve çeşitli hastalıklarda araştırılan bir konudur.

MTHFR, DNA metilasyonunun düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynar. 677 C→T polimorfizminin, enzimin flavin-adenin-dinükleotid (FAD) kofaktörüne olan afinitesini azaltmak yolu ile enzimin aktivitesini düşürdüğü bilinmektedir (Guenther ve ark., 1999; Yamada ve ark., 2001; Eggermann ve Schwanitz, 2011). MTHFR 677 CT genotipinin enzim aktivitesini %35, homozigot TT genotipinin ise %70 civarında düşürdüğü bildirilmiştir (Frosst ve ark., 1995; Eggermann ve Schwanitz, 2011). MTHFR A1298C polimorfizmi açısından homozigot CC genotipininde heterozigot genotipe oranla enzim aktivitesinde daha belirgin bir azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (van der Put ve ark., 1998; Eggermann ve Schwanitz, 2011). Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5-metil tetrahidrofolat düzeyi azalmakta, 5,10-metilen tetrahidrofolat ile plazma homosistein düzeyleri artmaktadır. Yüksek homosistein seviyesi ise kusurlu folat metabolizmasına işaret etmektedir.

MTHFR genindeki varyasyonlara bağlı olarak aktivitesinin azalması, DNA hipometilasyonu ile sonuçlanmaktadır. Anormal folat seviyeleri ve metilasyon metabolizması, anormal kromozom dağılımına yol açabilmektedir (Park ve ark.,

2005). Folat durumu homosistein metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Sıklıkla folat eksikliği görülebilir ve bununla ilişkili olarak hiperhomosisteinemi infertilite de dahil olmak üzere birçok hastalık için risk faktörü olarak değerlendirilir. Wong ve arkadaşlarının çalışmasına göre çinko sülfat ve folik asit kombine tedavisinin subfertil ve fertil erkeklerde total normal sperm sayısını arttırdığı rapor edilmiştir (Wong ve ark., 2002).

Normal gebelikte fibrinojen, faktör II, VII, X, XII ve plazminojen aktivatör inhibitör– 1(PAI–1) seviyelerinde artış ve protein S miktarlarında azalma sonucu pıhtılaşma eğilimi artmaktadır. Trombofili (hiperkoagülibilite veya protrombotik durum) ise tromboz (Kan damarlarındaki kan pıhtıları) eğiliminin arttığı bir grup pıhtılaşma bozukluklarını içermektedir (Fatini ve ark., 2012). Koagulasyona artmış eğilim, edinsel veya kalıtsal nedenlerle olabilir. Herediter trombofililerin tekrarlayan gebelik kayıplarında ve infertilitede önemine dikkat çekilmiştir (Letsky ve Swiet, 1994). Kalıtsal trombozların en sık sebebi nokta mutasyonudur (Faktör V Leiden, FVL). Bu mutasyon taşıyıcılarında tromboz riski heterozigotlarda 5–10 kat, homozigotlarda 80–100 kat artmıştır. Tromboz riski heterozigot protrombin mutasyon taşıyıcılarında (Faktör II G20210A) 2 kat, homozigot hiperhomosistinemide (metilen tetrahidrofolat redüktaz; MTHFR C677T) ise 2 kat artmıştır. Hemostatik hataların plasental yatak damarlarında tıkanıklığa yol açarak, gebelik sırasında koagülasyon faktörlerindeki değişikliklerin abortusa neden olabileceği düşünülebilir. Gebeliğin başarılı gidişatı için etkili bir uteroplasental dolaşım şarttır ve bu dolaşım hemostaz bozukluklarından etkilenebilir. Hem gebeliğin oluşabilmesi ve devamlılığı açısından ve hem de obstetrik açıdan maternal trombofililer (MTHFR C677T ve A1298C mutasyonları, Faktör V Leiden, Protrombin G20210A, D-Dimer), oldukça önemlidir. Uteroplasental dolaşım bozukluğu fetal kayıplarda önemli bir faktördür. Tekrarlayan fetal kayıpları olan hastalarda Faktör V Leiden ve vasküler plasental yetmezlik arasında çalışmaların çoğu sıkı bir bağ olduğunu göstermektedir (Brigden,1997; Ridker ve ark.,1998; Adıgüzel ve ark., 2015).

Ekzojen hormon kullanımı, koagülasyon ve fibrinolitik sistemi etkileyip protrombotik fenotipi uyarabileceğinden, vasküler hastalık ve trombofili ilişkili riski

temsil eden kalıtsal trombofililer yardımcı üreme tekniklerinin uygulandığı kadınlarda riski arttırabilir (Fatini ve ark., 2012).

Homosistein, metionin metabolizması sırasında oluşan bir aminoasittir. Transsülfürasyon yolu sırasında katabolize olur (sistationin B sentetaz) ya da remetilasyon yolu ile metionine geri çevrilir (5,10 metilentetrahidrofolat redüktaz). Her iki yoldaki defektler homosistein artışına neden olur. Homosistein ateroskleroz ve venöz tromboemboli (VTE) için bağımsız bir risk faktörüdür.

Bizim çalışmamızın sonucunda, açıklanamayan infertilite ve kontrol grubu; kadın ve erkek cinsiyetleri arasında MTHFR C677T polimorfizminin genotip ve allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). A1298C polimorfizmi açısından CC genotip oranlarının açıklanamayan infertilite tanısı almış erkeklerde kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$; oranların farkına ait hipotez testi uygulanmış olup $z=1.9$) olduğu bulunmuştur. Bu sonuca göre CC genotipi, infertil olmayan normal erkek populasyonunda koruyucu bir etkiye sahipmiş gibi görünmektedir. Adıgüzel ve ark. nın çalışmasında hasta ve kontrol grubu kadınlar arasında MTHFR C677T mutasyonu açısından açıklanamayan infertilite sebebi olabileceğini gösterecek anlamlı bir fark saptanmamıştır (Adıgüzel ve ark., 2015). Casadei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2010) 100 açıklanamayan infertil tanısı almış kadın ve 200 sağlıklı fertil kadından oluşan kontrol grubu ile vaka-kontrol çalışması yapılmış, her iki grup kadınlar MTHFRC677T mutasyonu açısından incelenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Casadei ve ark., 2010). Singh K ve ark. Hint toplumunda yaptıkları iki farklı çalışmadan birincisinde; C677T mutasyonu açısından homozigotluğun (TT genotipi) idyopatik erkek infertilitesi açısından bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir. Aynı grubun ikinci çalışmalarında ise MTHFR A1298C polimorfizmi açısından CC genotipinin Hint toplumunda idiyopatik erkek infertilitesi için genetik bir risk faktörü olduğunu rapor etmişlerdir (Singh K ve ark., 2010). Wu ve ark. nın, Çin'de spermlerde yaptıkları bir çalışmada, MTHFR geni promotorunun hipermetilasyonu idiyopatik erkek infertilitesi ile ilişkili bulunmuştur (Wu ve ark., 2010)). Herodež ve ark. nın Slovak çiftlerde yaptığı çalışmada (2013) açıklanamayan infertilite tanısı almış erkeklerde MTHFR C677T ve A1298C

polimorfizmleri ile açıklanamayan infertilite arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Herodež ve ark., 2013).

Bu çalışmada, infertil ve kontrol gruplarında MTHFR C677T heterozigot bireylerin folat ve homosistein değerleri arasında; MTHFR C677T normal bireylerin homosistein değerleri arasında; MTHFR A1298C heterozigot, normal ve homozigot bireylerin homosistein değerleri arasında; kadın infertil ve kontrol gruplarında MTHFR C677T heterozigot ve normal bireylerin folat değerleri arasında; MTHFR C677T normal bireylerin homosistein değerleri arasında; MTHFR A1298C heterozigot ve normal bireylerin folat değerleri arasında istatistiki olarak önemli fark bulunmuştur.

Folat metabolizmasındaki anormalliklerin tam olarak hangi mekanizma ile üreme problemlerine yol açtığı bilinmemektedir (Coulam ve Jeyendran, 2009). Kritik metabolitlerin yetersiz metilasyonu, hücre bölünmesindeki problemlerin olası düzenleyicisi olarak önerilmiştir (Coulam ve ve Jeyendran, 2009). MTHFR C677T veya A1298C allelleri açısından homozigot bireylerin homosistein seviyeleri, folat alımında yetersizlik olmadığı sürece normal bulunmuştur (Coulam ve Jeyendran, 2009). Coulam ve Jeyendran isimli araştırıcıların 2009 da yayınladığı bu çalışmanın bulguları, önceki çalışmalarda belirtildiği gibi koagülasyon ve fibrinolize dahil olduğu düşünülen proteinlerin hemostatik fonksiyona sahip olmadığı düşüncesini desteklemektedir. Trombojenik proteinleri kodlayan genlerin sadece koagülasyon ve fibrinolize dahil olmakla kalmayıp fertilizasyon, embriyonik gelişim, doku yenilenmesi (Rawlins ve Barrett, 1993), tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (Coulam ve ark., 2006a), tekrarlayan gebelik kayıpları (Coulam ve ark., 2006a; Goodman ve ark., 2006; Coulam ve ark., 2008; Bianca ve ark., 2009) ve konjenital anomaliler ile de (Botto ve Yang, 2000) ilişkilendirildiği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Trombofilik gen mutasyonlarının, tekrarlayan düşük sıklığını etkilemesi, plasental damarlardaki pıhtılaşma ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür (Many ve ark., 2001). Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında, hipofibrinolizin trofoblast göçünü etkilediği (Axelrod, 1985; Aflalo ve ark., 2004), açıklanamayan infertilite üzerine etkisinin, folik asit metabolizmasını gerektirdiği bildirilmiştir (Coulam ve Jeyendran, 2009).

Coulam ve Jeyendran isimli araştırıcıların 2009 da yayınladığı çalışmada MTHFR C677T polimorfizmi homozigotluğunu açıklanamayan infertilite ile ilişkilendirmişlerdir. Diğer çalışmalarda ise MTHFR C677T polimorfizmi homozigotluğu tekrarlayan gebelik kayıpları (Goodman ve ark., 2006) ve nöral tüp anomalisi gibi konjenital anomaliler (Botto ve Yang, 2000) ile de ilişkilendirilmiştir. Tekrarlayan açıklanamayan düşükleri olan MTHFR C677T polimorfizmi açısından homozigot kadınlar, folik asit verildikten sonra folat seviyesinde artış ve homosistein seviyesinde azalma sergilemişlerdir (Nelen ve ark., 1998). Buna ilaveten MTHFR C677T polimorfizmi açısından homozigot kadınlarda folik asit tedavisinin ayrı yumurta ikiz oranında artışa (Kallen, 2005) ve nöral tüp anomalilerinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir.

6. SONUÇLAR

1. Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubu; kadın ve erkek cinsiyetleri arasında MTHFR C677T polimorfizminin genotip ve allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).
2. Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubu; kadın ve erkek cinsiyetleri arasında MTHFR A1298C polimorfizminin AA ve AC genotip sıklığı; A ve C allel sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).
3. MTHFR A1298C polimorfizmi açısından CC genotip oranlarının açıklanamayan infertilite tanısı almış erkeklerde kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve bu farklılığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur.
4. İnfertil ve kontrol gruplarında MTHFR C677T heterozigot bireylerin folat ve homosistein değerleri arasında; MTHFR C677T normal bireylerin homosistein değerleri arasında; MTHFR A1298C heterozigot, normal ve homozigot bireylerin homosistein değerleri arasında; kadın infertil ve kontrol gruplarında MTHFR C677T heterozigot ve normal bireylerin folat değerleri arasında; MTHFR C677T normal bireylerin homosistein değerleri arasında; MTHFR A1298C heterozigot ve normal bireylerin folat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir fark bulunmuştur.
5. Açıklanamayan infertilite etiyopatogenezinde halen netleşmemiş noktalar mevcuttur.
6. Bu çalışmanın sonucunda, MTHFR C677T polimorfizmi ile açıklanamayan infertilite arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış olmakla beraber, sadece erkeklerde, A1298C polimorfizmi ile açıklanamayan infertilite arasında anlamlı bir ilişki dikkat çekmektedir. Bu çalışmanın sonucuna göre CC genotipi, infertil olmayan normal erkek populasyonunda koruyucu bir etkiye sahipmiş gibi görünmektedir. İki cinsiyet arasında gözlenen fark belki de MTHFR geninin gametogenezde üstlendiği farklı rollerden kaynaklanmaktadır.

7. MTHFR geninin her iki polimorfizmi açısından ilişki gösterilen çalışmaların da literatürde mevcut olması nedeniyle bu konuyu netleştirebilmek için, daha yüksek sayıda olgunun araştırılmasına gereksinim duyulmaktadır.
8. Açıklanamayan infertilite etiyopatogenezinde trombofili önemli bir yere sahiptir. Açıklanamayan infertilite ve tromboz hikayesi olan vakalarda MTHFR geninin mutasyonlar açısından incelenmesi hem tanı hem de tedavi açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

ADIGÜZEL, F.I., ADIGÜZEL, C., SEYFETTİNOĞLU, S. ve ÜRÜNSAK I.F., 2015. Açıklanamayan İnfertilite Etiyolojisinde Olası Risk Faktörü Olarak Herediter Trombofilinin Yeri. Bakırköy Tıp Dergisi, 11(4):162-166.

AFLALO E.D., SOD-MORIAH U.A., POTASHNIK G. and HAR-VARDI I.,2004. Differences un the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators. Fertil Steril;81:780–5.

AXELROD H.R., 1985. Altered trophoblast functions in implantation-defective mouse embryos. Dev Biol;108:185–90.

AZEM, F., MANY, A., YOVEL, I., AMIT, A., LESSING, J.B., and KUPFERMINC, M.J., 2005. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. Hum Reprod 2004; 19:368-370.

BEHJATİ, R., MODARRESSİ, M.H., JEDDİ-TEHRANİ, M., DOKOOHAKİ, P., GHASEMİ, J., ZARNANİ, A.H., AARABİ, M., MEMARİANİ, T., GHAFFARİ, M. and AKHONDİ, M.A., 2006. Thrombophilic mutations in Iranian patients with infertility and recurrent spontaneous abortion. Ann Hematol, 85: 268–271. DOI 10.1007/s00277-005-0021-0.

BIANCA, S., BARRANO, B., CUTULI, N., INDACO, L., CATALIOTTI, A., MILANA, G., BARONE, C. and ETTORE, G., 2009. Unexplained infertility and inherited thrombophilia. Fertility and Sterility; Vol. 92, No. 1, July

BOTTO L.D. and YANG Q., 2000. 5,10-methylenetrtrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol; 151: 862–77.

BRIGDEN, M.L., 1997. The hypercoagulable state. Who, how, and when to test and treat. Postgrad Med, 101: 249-262.

CASADEİ, L., PUCA, F., PRİVİTERA, L., ZAMARO, V. and EMİDİ, E., 2010. Inherited thrombophilia in infertile women: implication in unexplained infertility. Fertil Steril, 94: 755-757.

COULAM, C.B. and JEYENDRAN, R.S., 2009. Thrombophilic gene polymorphisms are risk factors for unexplained infertility. Fertil Steril., 91:1516–7.

COULAM, C.B., JEYENDRAN, R.S., FISHEL, L.A. and ROUSSEV, R.G., 2006a. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. Reprod Biomed Online, 12: 322–7.

COULAM, C.B., JEYENDRAN, R.S., FISHEL, L.A. and ROUSSEV, R.G., 2006b. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. Am J Reprod Immunol, 55: 360–8.

COULAM, C.B., WALLIS, D., WEINSTEIN, J., DASGUPTA, D.S. and JEYENDRAN, R.S., 2008. Thrombophilic gene mutations among patients experiencing recurrent miscarriage and deep vein thrombosis. Am J Reprod Immunol., 60: 426-431.

DI MICCO, P., D'UVA, M., STRINA, I., MOLLO, A., AMATO, V., NIGLIO, A., and DE PLACIDO, G., 2004. The role of d-dimer as first marker of thrombophilia in women affected by sterility: implications in pathophysiology and diagnosis of thrombophilia induced sterility. J Transl Med; 2: 38.

DİLBAZ, S. ve ÖZDEĞİRMENCİ, Ö., 2009. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Hasta Seçimi. A'dan Z'ye Yardımcı Üreme Teknikleri kitabında 1. Bölüm. Editörler: ÇİÇEK, N., MOLLAMAHMUTOĞLU, L. Palme Yayıncılık, 1-10.

DOĞAN, E., 2008. İnfertil Çiftin Araştırılmasında Tanısal Yöntemler. Üreme Endokrinolojisi Teknikleri ve Cerrahisi. Editör: GÜLEKLİ, B. Üreme Tıbbi Derneği Yayınları, 357-368

EGGERMANN, T. and SCHWANITZ, G., 2011. Abnormal Folate Metabolism and Maternal Risk for Down Syndrome. In: DEY, S., Ed. Genetics and Etiology of Down Syndrome, Part 1. Rijeka, Croatia: InTech. 97-107.

ESFAHANI, S.T., COGGER, E.A. and CAUDILL, M.A., 2003. Heterogeneity in the Prevalence of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms in Women of Different Ethnic Groups. Journal of The Amerıcan Dıetetıc Association, 103: 200-207.

FROSST, P., BLOM, H.J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C.A., MATTHEWS, R.G., BOERS, G.J.H., DEN HEIJER, M., KLUIJTMANS, L.A.J., VAN DEN HEUVE, L.P. and ROZEN, R., 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in Methylenetetrahydrofolate reductase. Nature Genetics,Vol.10,No.1, pp. 111-113, ISSN 1061-4036

GONZALEZ-HERRERA, L., GARCIA-ESCALANTE, G., CASTILLO-ZAPATA, I., CANTO HERRERA, J., CEBALLOS-QUINTAL, J., PINTO-ESCALANTE, D., DIAZ-RUBIO, F., DEL ANGEL, R.M. and OROZCO-OROZCO, L., 2002. Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of Yucatan, Mexico.Clin Genet: 62: 394–398.

GOODMAN, C.S., COULAM, C.B., JEYENDRAN, R.S., ACOSTA, V.A. and ROUSSEV, R., 2006. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? Am J Reprod Immunol; 56: 230–6.

GUENTHER, B.D.F., SHEPPARD, C.A., TRAN, P., ROZEN, R., MATTHEWS, R.G. and LUDWİG, M.L., 1999. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from Escherichia coli suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. Nature Structural and Molecular Biology, Vol.6, No.4, (April 1999), pp. 359-365, ISSN 1072-8368

HERODEŽ, Š.S., ZAGRADIŠNIK, B., ERJAVEC ŠKERGET, A., ZAGORAC, A., TAKAČ, I., VLAISAVLJEVIČ, V., LOKAR, L. and KOKALJ VOKAČ, N., 2013. MTHFR C677T and A1298C genotypes and haplotypes in Slovenian couples with unexplained infertility problems and in embryonıc tissues from spontaneous abortions. BJMG 16/1, 31-40.

ISOTALO, P.A., WELLS, G.A. and DONELLY, J.G., 2000. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: An examination of C677T and A1298C mutations. Am J Hum Genet: 67: 986–990.

İZCİ-AY, O., AY, M.E., ERDAL, M.E., CAYAN, F., TEKİN, S., SÖYLEMEZ, F., SUNGUR, M.A. ve DERİCİ-YILDIRIM, D., 2015. Folate metabolism gene polymorphisms and risk for down syndrome offspring in Turkish women. Genet Test Mol Biomarkers, 19(4):191-7.

İZMİRLİ, M., ALDEMİR, Ö., GÖĞEBAKAN, B. ve ALPTEKİN, D., 2014. MTHFR 677 C›T Polimorfizmi ile ilintili olduğu düşünülen hastalıklara dair Türk populasyonundaki çalışmalar. Dicle Medical Journal,41(1): 224-256.

KALLEN, B., 2005. Use of folic acid supplemantation and risk for dizygotic twinning. Obstet Gynecol Surv., 60:212–4.

KESER, N., PAZARBAŞI, A. ve ÖZPAK, L., 2014. Methylenetetrahydrofolate Reductase Activity and Folate Metabolism. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. Archives Medical Review Journal; 23(2):237-256.

LETSKY, E.A., SWIET, M., 1994. Maternal hemostasis coagulation problems of pregnancy in; Thrombosis and Hemorrhagie Loscalzo J, Schafer AI, Blackwell Scientific Publications, 965-998.

MANY, A., SCHRIEBER, L., ROSNER, S., LESSING, J.B., ELDOR, A., KUPFERMINC, M.J., 2001. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. Obstet Gynecol; 98:1041–4.

MARK, H.F.L., SIGMAN, M., 2000. Cytogenetics of Male Infertility. İn: Medical Cytogenetics, First Edition, New York: Marcel Dekker; 247-273.

MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res.; 16(3): 1215.

MUTLU, MF, BAŞTU, E, ÖKTEM, M., 2013. Açıklanamayan İnfertiliteye Güncel Bakış. Gazi Medical Journal (GMJ); 24: 29-32.

NELEN, W.L., BLOM, H.J., THOMAS, C.M., STEEGERS, E.A., BOERS, C.H., ESKES, T.K., 1998. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. J Nutr., 128:1336–41.

ÖZPAK, L., PAZARBAŞI, A., 2011. **"**Erkek İnfertilitesinin Sitogenetiği". Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 20(4): 230-245.

PAPAPETROU, C., LYNCH, S.A., BURN, J., EDWARDS, Y.H., 1996. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. Lancet, 1996 348: 58.

PARK, J.H., LEE, H.CH., JEONG, Y.M., CHUNG, T.G., KIM, H.J., KIM, N.K., LEE, S.H., LEE, S., 2005. MTHFR C677T polymorphism associates with unexplained infertile male factors. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 22(9/10): 361-368.

PATTERSON, D., 2008. Folate metabolism and the risk of Down syndrome. Down Syndrome Research and Practice, Volume 12, Issue 2, October: 93-97. www.Down syndrome.org/research-practice.

RAWLINS, N.D., BARRETT A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. Biochem J;290:205–18.

RIDKER, P.M., MILETICH, J.P., BURING, J.E., et al.,1998. Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. Ann Intern Med.; 128: 1000-1003.

ROZEN, R., 1997. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Thromb Haemost;78:523–6.

SINGH, K., SINGH, S.K., RAMAN, R., 2010. MTHFR A1298C polymorphism and idiopathic male infertility. J Postgrad Med.; 56(4): 267-269.

SMITH, S., PFIEFER, S.M., COLLINS, J., 2003. Diagnosis and management of female infertility. JAMA; 290: 17.

TAŞHAN, F., 2007. Tekrarlayan Erken Gebelik Kayıplarında Maternal Trombofililer (Uzmanlık Tezi), T.C. Sağlık Bakanlığı, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, III. Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Danışman: Prof. Dr. Melahat Dönmez.

VAN DER PUT, N.M., GABREËLS, F., STEVENS, E.M., SMEITINK, J.A., TRIJBELS, F.J., ESKES, T.K., VAN DEN HEUVEL, L.P., BLOM H.J., 1998. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? American Journal of Human Genetics, Vol.62, No.5, pp. 1044-1051, ISSN 0002-9297.

WONG, W.Y., MERKUS, H.M., THOMAS, C.M., MENKVELD, R., ZİELHUİS, G.A., STEEGERS-THEUNİSSEN, R.P., 2002. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Fertil Steril.; 77: 491-498.

WU W., SHEN O., QIN Y., NIU X., LU C., XIA Y., et al., 2010. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). PloS One; 5: e13884.

YAMADA, K., CHEN, Z., ROZEN, R., MATTHEWS, R.G., 2001. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.98, No.26, pp. 14853-14858, ISSN 0027-8424.

ZEYNELOĞLU, H.B., ÖNALAN, G., 2009. Açıklanamayan İnfertilite. A'dan Z'ye Yardımcı Üreme Teknikleri kitabında 10. Bölüm. Editörler: Çiçek N, Mollamahmutoğlu L. Palme Yayıncılık; 121-125.

ÖZGEÇMİŞ

15 Şubat 1989 yılında Adana'da doğdu. 1995-2000 yılları arasında Adana Özel Gönen İlköğretim okulunda, 2000-2003 yılları arasında Adana Mustafa Kemal Atatürk Ortaokulunda, 2003-2006 yılları arasında Adana Özel Akdeniz Koleji'nde okudu. 2007 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne yerleşti. 2011 yılında Biyoloji lisans eğitimini tamamladı. 2012 Eylül ayında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Programında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Erasmus öğrenci değişimi programı ile eylül 2013-ocak 2014 tarihleri arasında Valencia Politeknik Üniversitesinde "Molecular methods for detecting and typing bacteria in food and environmental samples" adlı projede çalıştı. 12-17 temmuz 2008 de Berlin'de düzenlenen XX. Uluslararası Genetik, 27-30 haziran 2011 de İstanbul Yeditepe Üniversitesinde düzenlenen IV. Uluslararası Moleküler Tıp, 6-8 ekim 2014 te Londra'da düzenlenen Pregnancy Summit, 5-7 mayıs 2016 tarihinde Gaziantep'te düzenlenen 2. Uluslararası Tıpta İnovasyon Günleri ve 21-24 mayıs 2016 tarihinde Barcelona'da düzenlenen Avrupa İnsan Genetiği kongrelerine bildirili olarak katıldı.

EKLER

EK 1

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Çalışmamızda MTHFR genine ait iki farklı polimorfizm araştırılacaktır. Bu amaçla, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İnfertilite Polikliniğine başvuran çiftlerden alınan kanlar kullanılacaktır. Çalışma grupları İnfertil çiftler grubu, fertil kontrol grubu olarak belirlenecektir.

(Çalışmanın Adı)

İNFERTİLİTE VE METHYLENTETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENOTİP İLİŞKİSİ

(Hekimin Açıklaması)

Sonuçlar öncelikle bilimsel amaçla kullanılacak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacak, sorun saptanması halinde durum size bildirilecek ve alınması gereken önlemler konusunda ayrıntılı bilgilendirme yapılacaktır. Parasal bir bedel ödemenizi gerektirmeyen ve size de bir ödeme yapılması söz konusu olmayan bu çalışmaya katılmama ve katıldıktan sonra çekilme hakkınız bulunmaktadır. Ek bilgi talebiniz olursa sözlü olarak karşılanacaktır.

Araştırmamıza katılmayı kabul ediyorsanız, lütfen aşağıdaki bölüme adınızı-soyadınızı yazıp tarih ve imza atınız. Teşekkür ederiz.

Katılımcı ile görüşen hekim

SÖZ KONUSU ARAŞTIRMAYA, YUKARIDA BELİRTİLEN KOŞULLAR ÇERÇEVESİNDE HİÇBİR BASKI VE ZORLAMA OLMAKSIZIN KENDİ RIZAMLA KATILMAYI KABUL EDİYORUM.

TARİH:

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. İmza

Görüşme tanığı		**Katılımcı ile görüşen hekim**	
Adı, soyadı:		Adı soyadı, unvanı	
Adres:		Adres:	
Tel.	İmza:	Tel	İmza: