

**POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA CAPN 10-19 (KALSİYUM İLE
AKTİVE EDİLMİŞ NÖTRAL PROTEİNAZ 10 SNP 19) VE CAPN 10-43
(SNP 43) GENİ POLİMORFİZMİ SIKLIĞI, BUNLARIN İNSÜLİN
DİRENCİ VE KLİNİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ**

Gülşah GÜNALTILI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2010

ANKARA

Gülşah GÜNALTILI tarafından hazırlanan “POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA *CAPN* 10-19 (KALSİYUM İLE AKTİVE EDİLMİŞ NÖTRAL PROTEİNAZ 10 SNP 19) VE *CAPN* 10-43 (SNP 43) GENİ POLİMORFİZMİ SIKLIĞI, BUNLARIN İNSÜLİN DİRENCİ VE KLİNİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Aydan BİRİ

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Leyla AÇIK

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Barbaros BALABANLI

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 02 / 07 / 2010

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gülşah GÜNALTILI

POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA *CAPN* 10-19 (KALSİYUM İLE AKTİVE EDİLMİŞ NÖTRAL PROTEİNAZ 10 SNP 19) VE *CAPN* 10-43 (SNP 43) GEN POLİMORFİZMİ SIKLIĞI, BUNLARIN İNSÜLİN DİRENCİ VE KLİNİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Gülşah GÜNALTILI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Temmuz 2010

ÖZET

Polikistik over sendromu (PKOS), yumurtlama olmaması (kronik anovulasyon) az adet görme veya hiç adet görmeme (oligoamenore) ve kanda androjen yüksekliği (hiperandrojenemi) ile karakterize üreme sistemi ile ilgili hormonal bozukluktur. Bu endokrin hastalığın, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle meydana geldiği öne sürülmektedir. *CAPN* geni trombosit aktivasyonu, membran füzyonu, apoptoz, farklılaşma, hücre döngüsünün devamlılığı ve sinyal iletimi gibi hücrel Ca^{+2} düzenleyici faaliyetlerde bulunmaktadır. Aktivitesinin düzenlenmesindeki bozukluklar sinirsel bozukluklar, Alzheimer, metastaz gibi patolojilere yol açabilmektedir. *CAPN* 10-19 ve *CAPN* 10-43 gen polimorfizmleri ile PKOS' lu hastalarda sıklıkla görülen insülin direnci, obezite, kanda HDL düşüklüğü LDL yüksekliği (dislipidemi) ve androjen yüksekliği gibi bazı belirtiler arasında yakın bir ilişki bulunmamasına karşın, PKOS'lu kadınlarda *CAPN* 10-19 ve *CAPN* 10-43 gen polimorfizmleri hakkında sınırlı sayıda çalışma ve elde edilen sonuçlarda çelişkiler bulunmaktadır.

Çalışmanın amaçlarından biri, Türk PKOS'lu hastalarda *CAPN 10-19* ve *CAPN 10-43* gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi incelemektir. İkinci amaç ise genotipler ile hastalığın bazı klinik ve biyokimyasal belirtileri arasında bir bağlantı olup olmadığını araştırmaktır.

Çalışmamıza yaş ve vücut kütle indeksi (VKİ) uyumlu olan 119 PKOS' lu ve 136 sağlıklı kadın dahil edilmiştir. Her iki grupta *CAPN 10-19* ve *CAPN 10-43* genlerinin genotip ve allel dağılımları saptanmıştır. Ayrıca bu genotiplerin VKİ, lipit profili, insülin direnci ve hormon parametreleri ile ilişkisi incelenmiştir. Çalışmamızda kontrol ve PKOS gruplarında *CAPN 10-19* genotip ve allel dağılımlarında istatistiksel bir fark göstermediği saptanmıştır. *CAPN 10-43* polimorfizmi incelediğinde G allel sıklığının kontrolde, A alleli sıklığının PKOS'da fazla olduğu ve farkın anlamlı olduğu saptanmıştır. *CAPN 10-19* polimorfizmi ile VKİ, lipit profili, insülin direnci ve hormon parametreleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamasına karşın, *CAPN 10-43* polimorfizmi hem kontrol hem de PKOS grubunda bu parametreler arasında yakın bir ilişki saptanmıştır. *CAPN 10-43* AA genotipli PKOS' lu hastalar GG ve GA genotipli PKOS' lu hastalara oranla daha yüksek insülin direnci, kolestrol, HOMA (Homeostasis model assesment) ve HOMA2 (Homeostasis model assesment 2) düzeyleri gösterilmiştir. *CAPN 10-43* AA genotipli kontrol ve PKOS'lu hastalar karşılaştırıldığında, PKOS'da insülin direnci, kolestrol, HOMA, HOMA2 değerlerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$).

Sonuç olarak, çalışmada kullanılan olgular değerlendirildiğinde *CAPN 10-19* polimorfizminin PKOS ile bir ilişkisi olmadığı, buna karşın *CAPN 10-43* polimorfizmin PKOS ve bu sendromun bazı metabolik bozuklukları ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.104
Anahtar Kelimeler : PKOS, *CAPN10- 19*, *CAPN10- 43*, gen polimorfizmi
Sayfa Adedi : 96
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

**CAPN 10-19 (CALCIUM-ACTIVATED NEUTRAL PROTEINASE 10 SNP 19)
AND CAPN 10-43 (CALCIUM-ACTIVATED NEUTRAL PROTEINASE 10
SNP 43) GENE POLYMORPHISMS IN POLYCYSTIC OVARY SENDROME
AND THEIR ASSOCIATION TO INSULIN RESISTANCE AND CLINICAL
PARAMETERS**

(M.Cs.Thesis)

Gülşah GÜNALTILI

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

July 2010

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a reproductive endocrinopathia characterized with chronic anovulation, olygoamenorhoea and hyperandrogenemia. It was suggested that this endocrinological disease is a consequence of the interaction of genetic and environmental factors. *CAPN 10-19* and *CAPN 10-43* gene polymorphisms are in close relationship with insulin resistance, obesity, dislipidemia and hyperandrogenizm, which are common findings of PCOS. The literature knowledge about the *CAPN 10-19* and *CAPN 10-43* gene polymorphisms in PCOS women are limited and still controversial.

The first aim of our study was to investigate the relationship between PCOS and *CAPN 10-19* and *CAPN 10-43* gene polymorphisms. Secondly, we wanted to investigate whether there is any relationship between genotypes and clinical/ laboratory findings of PCOS.

We compared *CAPN 10-19* and *CAPN 10-43* genotypes and allele frequencies in 119 women with PCOS and 136 healthy subjects of comparable age and body mass index (BMI). The relationship of these genotypes with BMI, insulin resistance and lipid and hormone profile parameters were also investigated.

The distribution of *CAPN 10-19* genotype and allele frequency in control and PCOS groups were not significantly different. *CAPN 10-43* gene polymorphism investigation shows that A allele frequency is higher in PCOS, and G allele frequency is higher in the control group. *CAPN 10-19* polymorphism does not have any significant relation to BMI, insulin resistance or lipid or hormone profile parameters, however, *CAPN 10-43* polymorphism in both control and PCOS groups was strongly associated with these parameters. Insulin resistance, cholesterol, HOMA(Homeostasis model assesment) and HOMA2 (Homeostasis model assesment 2) levels were higher in *CAPN 10-43* genotyped PCOS women compared to GG and GA genotyped PCOS ones. When *CAPN 10-43* AA genotyped controls and PCOS patients were compared, insulin resistance HOMA, HOMA2 and cholesterol levels were significantly increased in the PCOS groups.

In conclusion, we found no evidence that the *CAPN 10-19* gene polymorphism is associated with PCOS, while our results show that the *CAPN 10-43* polymorphism is associated with PCOS and some metabolic disturbances of syndome.

Science Code : 203.1.104
Key Words : PCOS, *CAPN 10-19*, *CAPN 10-43*, gene polymorphism
Page Number : 96
Advisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde her türlü desteği ve bilgiyi sağlayan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Leyla Açık'a

Çalışmam süresince gerekli kan örneği temin etmemde yardımcı olan; Ankara Numune Araştırma ve Eğitim Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Klinik şefi sayın Doç. Dr. Ferit SARAÇOĞLU ile Dr. Nezih DURMAZLAR'a, Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Klinik bölümünden sayın Yrd. Doç. Dr. Kazım Emre KARAŞAHİN'e,

Çalışmalarım boyunca dostluk ve desteklerini esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ'ye laboratuvar arkadaşlarım E.Burcu BALI, Emel AKYÜZ, Nagihan RAMAZANOĞLU ve Y.Ceren ÇİMEN'e

Yanımda olamasalar da varlıklarını her zaman hissettiğim canım annem merhum Ayten SEVİN ve canım babam Cevat DEMİR'e, abim Ercan DEMİR'e ve hayatıma girdiğinden bu yana mutluluğum için elinden geleni yapan sevgili eşim İlhan GÜNALTILI'ya

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Polikistik Over Sendromu	2
2.1.1. Tanım	2
2.1.2. Tarihçe	2
2.1.3. Görülme sıklığı	3
2.1.4. Tanı kriterleri	4
2.1.5. Klinik bulgular	8
2.1.6. Laboratuvar bulguları.....	12
2.1.7. Uzun dönem sağlık riskleri	13
2.1.8. Oluş Nedeni (Etiyoloji)	15
2.1.9. Glikoz tolerans bozukluğu ve insülin direnci.....	16
2.1.10. PKOS, insülin direnci ve diabet.....	22
2.2. Polikistik Over Sendromu ve Genetik	24
2.3. <i>Kalpain</i> 10 Geni	31

3. MUTASYON ANALİZLERİNDE MOLEKÜLER BİYOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER	34
3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	34
3.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	37
3.3. Agaroz Jel Elektroforezi	38
4. MATERYAL VE METOT	40
4.1. Materyal	40
4.1.1. Kan örneklerinin toplanması	40
4.1.2. Kimyasal maddeler.....	40
4.2. Metot	42
4.2.1. DNA izolasyonu.....	42
4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	43
4.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	44
4.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) - Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm Analizi (RFLP).....	45
4.2.5. İstatistiksel Analizler.....	45
5. BULGULAR.....	46
5.1. Klinik ve Laboratuar Bulguları	46
5.1.1. <i>CAPN</i> 10 SNP 19 Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması	48
5.1.2. <i>CAPN</i> 10 SNP 43 Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP)	53
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
KAYNAKLAR	73

Sayfa

EKLER.....	87
EK- 1 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu'nun tez projesi hakkındaki kararı.....	88
EK- 2 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu	89
ÖZGEÇMİŞ	96

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Modifiye Ferriman-Gallwey skorlama sistemi	10
Şekil 2.2. PKOS ile ilişkili bulguların yaşa bağlı ortaya çıkış zamanları	15
Şekil 2.3. PKOS'ta ortaya çıkış faktörleri.....	16
Şekil 2.4. Teka hücresinde androjen sentezi üzerinde insülin ve LH'nin etkileri	18
Şekil 2.5. İnsülin direnci ve artmış insülineminin PKOS'taki rolü.....	19
Şekil 2.6. PKOS'ta hipotalamus-hipofiz-yumurtalık döngüsü	20
Şekil 2.7. PKOS patogeneğinde insülin direncinin rolü.....	21
Şekil 2.8. <i>Kalpain</i> 10 geninin lokalizasyonu	32
Şekil 2.9. <i>Kalpain</i> 10 geninin yapısı	33
Şekil 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yapılan Cihaz (PZR).....	36
Şekil 3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Sıcaklık Değişimleri.....	37
Şekil 3.3. Agaroz Jel Elektroföresi Cihazı.....	39
Şekil 5.1. <i>CAPN</i> 10 SNP 19 bölgesi PZR sonuçlarının % 2'lik agaroz jel Elektroföresi.....	48
Şekil 5.2. <i>CAPN</i> 10 SNP 43 bölgesinin PZR sonuçlarının %2'lik agaroz jelde elektroföresi	53
Şekil 5.3. <i>Nde</i> I enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jel elektroföresi.....	54

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. PKOS tanı kriterleri	8
Çizelge 2.2. PKOS’nda klinik bulgular ve sıklığı.....	12
Çizelge 2.3. PKOS’ un sorumlu olabilecek aday genler.....	31
Çizelge 4.1. <i>CAPN</i> 10 geninin 6. İntron SNP 19 bölgesinin belirlenmesi için kullanılan primerler.....	43
Çizelge 4.2. <i>CAPN</i> 10 SNP 19 bölgesini çoğaltmak için PZR programı.....	44
Çizelge 4.3. <i>CAPN</i> 10 geninin 3. İntron SNP 43 bölgesinin belirlenmesi için kullanılan primerler.....	44
Çizelge 4.4. <i>CAPN</i> 10 SNP 43 bölgesini çoğaltmak için PZR programı.....	44
Çizelge 5.1. Kontrol grubu ve polikistik over sendromlu (PKOS) hastaların klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama \pm SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi	47
Çizelge 5.2. <i>CAPN</i> 10 SNP 19 genotipi ve allel dağılımının polikistik over sendromu (PKOS) ile ilişkisi	50
Çizelge 5.3. PKOS grubunda <i>CAPN</i> 10 SNP 19 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama \pm SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi	51
Çizelge 5.4. Kontrol grubunda <i>CAPN</i> 10 SNP 19 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama \pm SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi	52
Çizelge 5.5. <i>CAPN</i> 10 SNP 43 genotipi ve allel dağılımının polikistik over sendromu (PKOS) ile ilişkisi	55
Çizelge 5.6. PKOS grubunda <i>CAPN</i> 10 SNP 43 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama \pm SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi	57
Çizelge 5.7. Kontrol grubunda <i>CAPN</i> 10 SNP 43 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama \pm SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi	58

Çizelge**Sayfa**

Çizelge 5.8. Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri.....	59
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler açıklamalarıyla birlikte aşağıdaki gibi sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
χ^2	Ki-kare
β-HCG	İnsan karyonik gonadotropin β
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AES	Androgen Excess Society
ApoAI	Apolipoprotein AI
bç	Baz çifti
BGT	Bozulmuş Glikoz Toleransı
CAPN 10	Calpain 10- Kalsiyum ile Aktive olmuş Nötral Proteinaz 10
CYP 11a	Sitokrom P450 family 1, subfamily A polipeptid
CYP 17	Sitokrom P450, 17-hidroksilaz
CYP 19	Sitokrom P450, 19-hidroksilaz
CYP 21	Sitokrom P450, 21-hidroksilaz
DHEAS	Dihidroepiandrosteron sülfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ESHRE	İnsan Üreme ve Embriyolojisi Avrupa Topluluğu (European Society of Human Reproduction and Embryology)
FG	Ferriman- Gallwey
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GA	Güven Aralığı
HCl	Hidroklorik asit
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HOMA	Homeostasis model assesment
HOMA2	Homeostasis model assesment 2

Simgeler	Açıklama
IH	İdiopatik Hirsutizm
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IRS	İnsülin Reseptör Substrat
KAH	Konjenital Adrenal Hiperplazi
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LH	Lüteinize Hormon
MI	Miyokard İnfarktüsü
NIDDM	İnsülin Bağımsız Diabetes Mellitus
NIH	Amerikan Ulusal sağlık enstitüsü
NKAH	Nonklasik Konjenital Adrenal Hiperplazi
OD	Otozomal Dominant
OR	Risk Oranı (Odd ratio)
PAI	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
PKO	Polikistik Over
PKOS	Polikistik Over Sendromu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIA	Radyoimmunoassay
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum Dode sülfat
SHBG	Seks hormonu bağlayan globulin
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SS	Standart Sapma
STE	Sodyum Klorid Tris EDTA
ST3	Serbest Triiodothyronine
ST4	Serbest Tiroksin
TAE	Tris Asetat Edta
TE	Tris Edta
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TSH	Tiroit Uyarıcı Hormon
T2DM	Tip 2 Diabetes Mellitus

Simgeler**Açıklama****USG**

Ultrasonik Grafi

VKİ

Vücut Kütle İndeksi

VNTR

Variable Number Tandem Repeats

1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS) tüm kadınların %5-10'nu etkileyen endokrin bozukluklardan biridir [1-3]. PKOS, ilk kez 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından obezite, kıllanma (hirsutizm), kısırlık (infertilite) ve polikistik over morfolojisi olan bir kadında tanımlanmıştır [4]. PKOS'lu hastalarda kanda androjen fazlalığı ve yumurtlamanın olmaması anahtar rolü olan bulgulardır. İnsülin direnci ve obezite ile de sıklıkla karşılaşılmaktadır [5, 6]. Klinik olarak kıllanma, sebore (yağlı beze), akne gibi kanda aşırı androjen yüksekliği klinik bulguları yanında artmış plazma androjen düzeyinin biri ya da bir kaçının kombinasyonu vardır [7].

PKOS, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan ve bireysel farklılıklardan dolayı heterojen görünüm sergileyen ailesel kompleks bir hastalıktır. Genetik temeli, kalıtım şekli henüz aydınlatılamamıştır ve genetik yapısı tam olarak açıklık kazanmamıştır. Bu nedenle, sendromun gelişiminde farklı metabolik yollarda aday olduğu düşünülen genlerdeki polimorfizmler çalışılarak genetik temeli araştırılmaktadır [8, 9]. Ayrıca PKOS'un genetik temeline yönelik çalışılan çalışmalarda 30'dan fazla gen üzerinde çalışılmıştır [10]. Bunlardan birisi olan *CAPN10* genindeki polimorfizminin obezite, insülin direnci ve tip 2 diabet mellitus (T2DM) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [11, 12].

Çalışmanın ilk amacı, PKOS'lu olgularda *CAPN 10* geni SNP 19, 43 polimorfizmleri çalışılarak toplumumuzdaki sıklığın araştırılması ve sendromla bu polimorfizmin ilişkisinin olup olmadığının Türk hastalarda gösterilmesidir. İkinci amacı ise genotipler ile hastalığın bazı klinik ve biyokimyasal belirtileri arasında bir bağlantı olup olmadığını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polikistik Over Sendromu

2.1.1. Tanım

Polikistik over sendromu (PKOS), değişik derecelerde adet düzensizliği, kıllanma, akne ve obezite ile seyreden, ilk belirtileri erken ergenlik çağında ortaya çıkan kronik seyreden, gelecekte yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilen hastalıklara da zemin hazırlayan kompleks bir hastalıktır [13, 14, 15,16]. Doğurganlık çağındaki kadınlarda % 5-10'unda, ergenlik dönemindeki kızlarda % 3'ünde rastlanmaktadır [17].

Ergenlik dönemindeki kızlarda kıllanma artışı, akne, adet düzensizliği, obezite, cildin yağlanmasında artma, erkek tipi saç dökülmesi varlığında PKOS'tan şüphe edilmelidir. Sendromun seyri son derece değişken olup bazen başlangıçta bu bulgulardan sadece bir ya da ikisinin varlığı söz konusu olabilmektedir [13, 19, 20]. Erişkin kadınlarda endokrin kökenli kısırlığın en sık nedeni olup, endometrium kanseri, tip 2 diabet, hipertansiyon, aterosklerotik kalp ve damar hastalıkları için risk faktörüdür. PKOS'lu olgularda obezite, insülin direnci, kanda leptin hormonun yüksekliği (hiperleptinemi) ve kanda yağ oranı bozukluğu (dislipidemi) gibi risk faktörlerinin varlığı kalp ve damar hastalıklarına eğilimin arttığını düşündürmektedir [18].

2.1.2. Tarihçe

İlk olarak 1844 yılında Cherau, yumurtalıklarda sklerokistik değişiklikler tanımlamıştır. Aşırı androjen yüksekliği ve insülin ilişkisine ilk kez 1921'de Achard ve Thiers isimli araştırmacılar dikkati çekmiştir [4, 21]. 1935 yılında Irving F. Stein ve Micheal Leventhal, 4'ü obez olmak üzere çalışmaya aldığı 7 polikistik overli tanımladıkları olgularda adet düzensizliği bulgusu adet görememe (amenore), kısırlık öyküsü, kıllanma ve obezite içeren klinik bulgularla iki yönlü polikistik

overleri tanımlamışlar ve uzun bir süre sendrom Stein-Leventhal sendromu olarak isimlendirilmiştir [21].

İlk biyokimyasal bozukluk, 1958 yılında McArthur ve arkadaşları, polikistik overli kadınlar da idrarda artmış luteinize hormon (LH) düzeyi ve aşırı androjen düzeyi gözlemişler. 1970'lerde radyoimmunoassay (RIA) tekniklerinin geliştirilmesiyle biyokimyasal tanı daha da önem kazanmıştır. 1976 yılında Kahn ve arkadaşları ve 1980 yılında Burghen ve arkadaşları, insülin direnci ve polikistik over sendromu arasında ilişki kurarak kilometre taşı oluşturmuşlardır. Polikistik overlerin ultrasonografik bulgusu, 1981 yılında Swanson ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. 1985 yılında ise Adams ve arkadaşları, polikistik overlerin ultrasonografik varlığının tanı kriteri olabileceğini açıklamışlardır [21].

2.1.3. Görülme sıklığı

Polikistik over sendromu görülme sıklığını araştıran az sayıda çalışma mevcuttur. Doğurgan çağıdaki kadınların yaklaşık % 5- 10' unda PKOS' u bulunmaktadır. Bu hastaların % 50- 65' inde obezite, % 35- 45' inde insülin direnci ve % 7- 10' unda insülininden bağımsız diabetes mellitus (NIDDM) mevcuttur [22, 23].

Yapılan bir çalışmada, endokrin polikliniğine başvuran 175 hasta değerlendirilmiş, adetleri görmeleri azalmış veya hiç görmemeyen hastaların % 75' inde, adet görememe olan hastaların ise % 30' unda ultrasonografik olarak PKOS görünümü saptanmıştır. Bu kadınların % 60' ında kıllanma mevcut olup, hastaların % 90' ın da ise LH ve/veya serum androjen değerleri yüksek bulunmuştur [24].

Bu çalışmayla uyum gösteren başka bir çalışmada ise, ultrasonografik kriterler yerine klinik ve biyokimyasal bulgular ile PKOS tanısı tespit edilmiştir. Çalışmada adetleri görmeleri azalmış veya hiç görmemeyen hastaların % 90' ın da, adet göremeyen hastaların % 37' sinde, genel olarak da yumurtalık olmamasına bağlı kısırılık (anovulatuvar infertilitesi) olan hastaların % 73' ünde PKOS saptanmıştır. Bu

çalışmada da ultrasonografik bulgular; klinik ve biyokimyasal kriterlerle anlamlı bir uyumluluk göstermiştir [25].

Bunların yanı sıra; kıllanma ve adet düzensizliği olmadan sadece biyokimyasal olarak aşırı androjen düzeyi olup akne, saç ve deride rahatsızlık (alopesi veya seboresi) olan kadınlarda da ultrasonografik olarak polikistik ovaryum (PKO) sık görülmektedir. Bu nedenlerle yumurtlaması olan, aşırı androjen düzeyi ve buna bağlı kıllanma, akne, saç dökülmesi (alopesi) veya deride yağ bezesi olan ve de USG' de PKO saptanan hastaları PKOS' lu olarak kabul edip etmeme konusu hala tartışmalıdır [26].

Düzensiz yumurtlaması olan bir hasta grubunun uzun süre düzenli adet görebildikleri bilinmektedir. Dolayısıyla düzenli yumurtlaması olan fakat aşırı androjen düzeyi olan ve USG' de PKO saptanan hastaları PKOS' nun bir varyantı olarak kabul etmek mümkündür.

Hiç bir jinekolojik yakınması olmayan 257 gönüllü kadın üzerinde yapılan bir çalışmada, kadınların % 22' sinde ultrasonografik olarak PKO saptanmış; ultrasonografik, klinik ve biyokimyasal bulgular arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. Adet düzensizliği, USG' de PKO saptanan kadınların % 75' inde saptanırken, yumurtalıkları normal olan kadınların ise sadece % 1' inde saptanmıştır. Bu çalışmada genel olarak USG' de PKO saptanan kadınların yaklaşık % 94' ünde, PKOS göstergesi olan en az bir semptom veya bulgu saptanmıştır [27].

2.1.4. Tanı kriterleri

PKOS tanısı klinik muayene ve laboratuvar bulguları birlikte değerlendirilerek konulur. PKOS aşırı androjen düzeyi gibi bir durum olduğundan öncelikle serum total testosteron, serbest testosteron ve DHEAS (Dihidroepiandrosteron sülfat) düzeyleri değerlendirilmelidir [28].

Aşırı androjen düzeyi olan ergen kızlarda PKOS tanısı için PKOS'u taklit eden kadında erkeksi belirtiler yapan tümörler (virilizan tümörler), kanda prolaktin yüksekliği (hiperprolaktinemi), NKAH (nonklasik konjenital adrenal hiperplazi-doğuştan böbrek üstü bezi büyümesi) ve Cushing sendromu (Kortizol artışı ve obesite ile birlikte adale güçsüzlüğü, ince deri, potasyum eksikliği, kanda pH artışı, hipertansiyon, diabet ve hirsutizm ile karakterize bir hastalık) dışlanmalıdır [28]. Klinik görünümün heterojen olması ve başka endokrin sorunlarla benzerliği nedeniyle PKOS tanısı konulabilmesi için pek çok toplantı yapılmıştır [28].

1990 Yılı Birleşmiş Milletler Uluslararası Sağlık Örgütü (NIH) Kriterleri

İlk kez 1990 yılında PKOS tanısı için özgün kriterler getirilmiştir. Bu tarihten önce düzenli adet döngüleri olup klinik veya biyokimyasal aşırı androjen düzeyi bulguları olan veya yumurtalıkları ultrasonda polikistik olarak saptanan kadınlar da PKOS kapsamında ele alınmaktaydı [29, 30]. 1990 yılında Amerika Birleşik Devletleri Uluslararası Sağlık Örgütü' nün PKOS tanısı için belirlediği kriterler önem sırasına göre (a) androjen yüksekliği ve/veya kanda androjen yüksekliği, (b) kronik yumurtlamama, (c) bunlarla ilişkili prolaktin yüksekliği, tiroid hastalıkları ve konjenital adrenal hiperplazi (KAH) gibi diğer durumların dışlanması, olarak sıralanmaktadır [31]. Bu tanıma göre hastada polikistik over görünümü olabilir fakat bu tanısal bir kriter değildir. Amerika Birleşik Devletleri Uluslararası Sağlık Örgütü' nün kriterlerine göre üç fenotipten bahsedilir: (a) kılınma, androjen yüksekliği ve yumurtalamada azalma (oligo-ovulasyon), (b) androjen yüksekliği ve yumurtalamada azalma (c) kılınma ve yumurtalamada azalma. Birleşmiş Milletler Uluslararası Sağlık Örgütü Kriterleri tanımlamasında ultrasonun yeri yoktu; çünkü o yıllarda ultrasonografi Kuzey Amerika'da yaygın olarak kullanılmıyordu [32]. Amerika Birleşik Devletleri Uluslararası Sağlık Örgütü' nün tanımlamasında her bir kriterin tanımı yeterince açık olarak yapılmamıştı fakat yine de bu kriterlerin daha sonra temel alan büyük çalışmalar sayesinde hastalığın yüksek görülme sıklığı [33–36], insülin direnci [33, 37, 38] ile ilişkisi ve bu kadınlarda yaşamlarının ileriki dönemlerinde Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) gelişme riski gibi değerli bilgiler elde edilmiştir [39, 40].

2003 Rotterdam Amerikan Üreme Derneği / Avrupa Üreme Dernekleri (ASRM/ESHRE) Kriterleri

1990 yılındaki Amerika Birleşik Devletleri Uluslararası Sağlık Örgütü' nün kriterleri, PKOS'un tanısı ve önemi konusunda atılmış ilk ve büyük bir adım olup, bu tarihten sonra yapılan çok merkezli çalışmalar için mihenk taşı oluşturmuştur. Bu tarihten sonra yapılan uluslararası kongrelerde PKOS'un daha geniş bir spektrumda yer alan klinik görünümle ortaya çıkabileceği görüşü hakim olmaya başlamıştır [41]. Bu nedenle 2003 yılında Rotterdam'da PKOS çalışma grubu ile Amerikan Üreme Derneği ve Avrupa Üreme Dernekleri, PKOS tanımını yeniden düzenlemiş ve genişletmiştir. Bu uzlaşmaya göre PKOS ilk olarak yumurtalıkların işlev bozukluğu olup hiperandrojenizm ve polikistik over morfolojisi bu sendromun esas özelliklerini oluşturmaktadır. Bu toplantıda PKOS ilk olarak yumurtalıkların işlev bozukluğu nedeniyle oluşan, hipofizden prolaktin salgılayan iyi huylu tümör (prolaktinoma), KAH veya androjen salgılayan tümör gibi durumların dışlanması koşulu ile birlikte aşağıdaki kriterlerden en az ikisini içeren bir sendrom olarak tanımlanmıştır. Bu kriterler yumurtlamada azalma ve/veya yumurtlama olmaması, androjen yüksekliği klinik ve/veya biyokimyasal işaretleri ve ultrasonografide en azından bir yumurtalıkta polikistik over görünümü olması olarak belirtilmektedir [41, 42]. PKOS'un tek bir belirtisinin olmaması ve tanısı için tek bir testin yeterli olmaması nedeniyle, PKOS bir sendrom olarak kabul edilmiştir. İnsülin direnci ve yüksek LH seviyeleri bu sendromun belirgin özelliklerini oluşturduğu ve PKOS'un T2DM, kardiyovasküler hastalık ve metabolik sendrom ile önemli derecede ilişkili olduğu ayrıca belirtilmiştir [41]. 2003 yılında PKOS tanımının genişletilmesi ile (a) yumurtlamada bozukluk olmadan, polikistik overler ile birlikte klinik ve/veya biyokimyasal androjen fazlalığı (b) klinik ve/veya biyokimyasal androjen fazlalığı olmadan, polikistik overler ile birlikte yumurtlamada bozukluk gibi yeni PKOS fenotipleri ortaya çıkmıştır. Klinik spektrumun genişlemesi beraberinde, yapılan çalışmalar (değerlendirilen populasyonun heterojenitesinin artması), klinik pratik (bütün bu hastalara ultrasonografi yapılması), uzun dönem hasta takibi (bu hastalarda metabolik sendrom gelişme olasılığı nedeniyle uzun dönem takip edilmesinin ekonomik giderleri) açısından bazı dezavantajlar getirmiştir [42].

2006 Androgen Fazlalığı Derneği (AES) Kriterleri

2003 Rotterdam kriterlerinin doğurduğu dezavantajlar nedeniyle PKOS tanısının daha doğru ve daha sıkı olarak yapılmasının gerektiği düşünülmüş ve 2006 yılında Androgen Fazlalığı Derneği kriterleri yayınlanmıştır [43]. Androgen Fazlalığı Derneği kriterleri, literatürdeki PKOS konusunda uzman olan doktorların yayınlanmış bütün çalışmaları derleyerek PKOS'un hastalık sıklığı ve fenotipik etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmanın sonucunda PKOS'un birincil olarak androjen fazlalığı nedeniyle meydana geldiği kararına varılmıştır. Bu kriterlere göre 1990 yılı Birleşmiş Milletler Uluslararası Sağlık Örgütü fenotiplerine ek olarak bir fenotip (yumurtlama işlevi bozukluğu olmaksızın, polikistik overler ile birlikte androjen yüksekliği) daha eklenmiş olup, bu hafif PKOS olarak adlandırılmıştır. Çünkü bu olgularda, tam PKOS karakterli olgulara göre uzun dönem doğurganlık ve metabolik etkilerinin olmayabileceği vurgulanmıştır. Fakat bu olguları içeren uzun dönemli çalışmaların olmadığı da ayrıca belirtilmektedir. Bunun yanında androjen yüksekliği olmadan polikistik overler ile yumurtlama bozukluğu olan kadınların metabolik açıdan hastalığa yakalanma riski olup olmadığı da açık değildir. Çünkü polikistik over görünümü PKOS'lu hastalarda insülin direncini önceden bildirmektedir [44].

Çizelge 2.1'de PKOS tanı kriterleri özet şeklinde verilmiştir.

Çizelge 2.1. PKOS tanı kriterleri [32- 44]

Tanımlama/yıl	Tanımsal kriterler	Dışlama kriterleri
NIH / 1990	Her iki kriterin varlığı gerekli: 1. Klinik (hirsutizm, alopesi, akne) ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm 2. Menstruel disfonksiyon	Konjenital adrenal hiperplazi Androjen salgılayan tümörler Cushing sendromu Hiperprolaktinemi
Rotterdam / 2003	En az iki kriterin varlığı gerekli: 1. Klinik (hirsutizm, akne) ve /veya biyokimyasal hiperandrojenizm 2. Ovulatuvar disfonksiyon 3. Polikistik over morfolojisi	Konjenital adrenal hiperplazi Androjen salgılayan tümörler Cushing sendromu
AES / 2006	Hiperandrojenizmin klinik ve /veya biyokimyasal bulgularının yanı sıra birinin varlığı gerekli: 1. Oligo-anovulasyon 2. Polikistik over morfolojisi	Konjenital adrenal hiperplazi Androjen salgılayan tümörler Cushing sendromu Hiperprolaktinemi Androjenik /anabolik ilaç kullanımı Ciddi insülin direnci sendromları Tiroid disfonksiyonu

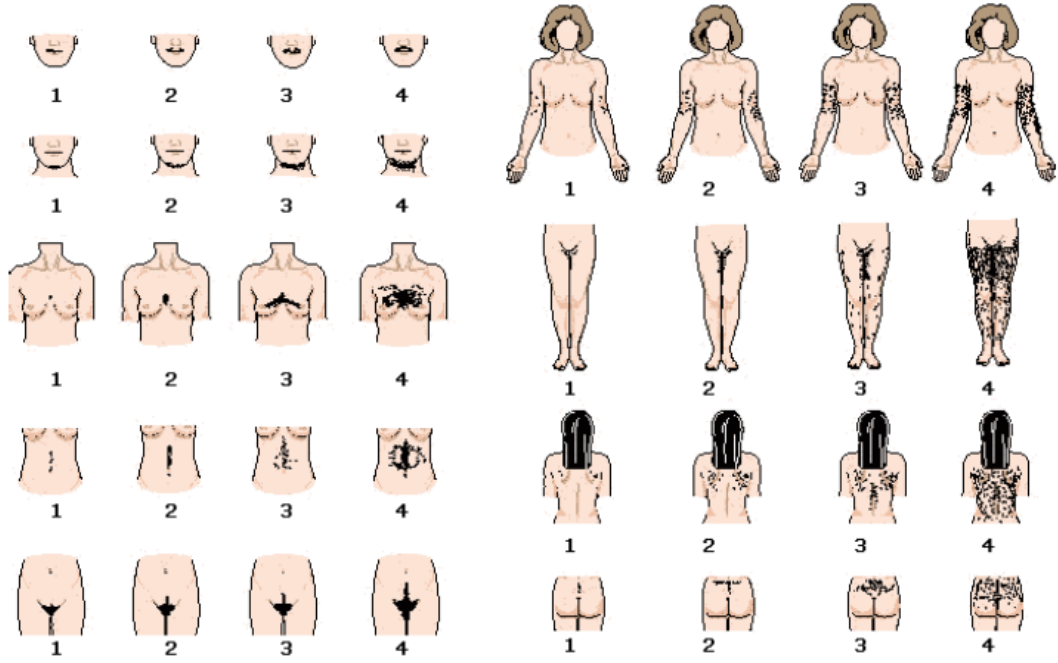
2.1.5. Klinik bulgular

PKOS genellikle ergenlik öncesi dönemden itibaren başlayan adet düzensizlikleri (az adet görme veya hiç adet görmeme, uterus kanaması), aşırı androjen bulguları (kılınma, akne, ciltte yağlanma, androjenik saç dökülmesi) ve kısırılık ile ortaya çıkmaktadır. Obezite kliniğe eşlik edebilir. Fizik muayenede nadiren sesde kalınlaşma (virilizasyon) bulguları ve akne (akantozis nigrikans) saptanabilir. PKOS' lu olgularda %20' lere ulaşan sıklıkta adetlerin düzenli olabileceği de bildirilmiştir. Erken yaşlarda daha sık adet düzensizlikleri görülmekte olup, daha ileri yaşlarda ise kılınma ve kısırılık ön plana çıkmaktadır [45].

Kıllanma (Hirsutizm)

Kıllanma, kadınlarda vücudun androjenlere hassas bölgelerinde (üst dudak, çene, göğüs, sırt, bel, üst karın, alt karın, üst kol, uyluk) aşırı kalın yapılı kıl büyümesi olarak tanımlanır. Kıllanma sıklığı etnik yapıya göre değişiklik göstermekle birlikte üreme çağındaki kadınların yaklaşık % 5 ile 8' inde görülmektedir [46, 47]. Kıllanma kadınlarda önemli psikososyal sonuçları olan medikal bir problemdir ve nadiren hayatı tehdit eden hastalıkların bir işareti olabilir. Kıllanmanın en sık nedenleri PKOS ve idiopatik hirsutizm (IH)'dir. Daha nadir olarak Cushing Sendromu, nonklasik konjenital adrenal hiperplazi (NKAH), adrenal ve over tümörleri kıllanmanın sebebi olabilirler [47].

PKOS' un en belirgin klinik belirtisi hafiften şiddetliye kadar değişebilen kıllanmadır. Kıllanma modifiye Ferriman-Gallwey (FG) metodu ile değerlendirilir. Bu metod ile üst dudak, çene, göğüs bölgesi, sırtın alt ve üst kısımları, alt ve üst karın, kol ve bacakların üst kısımları olmak üzere toplam 9 alanda kıl dağılımı 0- 4 arasında skorlandırılarak toplam FG skoru ≥ 6 kıllanma olarak tanımlanır. Kılların büyüme hızı klinik olarak önemlidir, yavaş ve uzun süredir olması, işlevsel oluşumu, oysa kalın ve koyu pigmentli kılların hızlı şekilde birden ortaya çıkması sıklıkla androjen üreten tümörü gösterir. PKOS' da artmış kıl gelişimi genellikle yüzün yanlarında, üst dudak ve boyun bölgesine yayılacak şekilde çenededir. Gittikçe artan androjen yüksekliğinde alın yan tarafı saç dökülmesi ve erkek tipi kellik olabilir. Tiroid bezinin az çalışması (Hipotiroidizm) ve obezite gibi androjenlerin bioaktivitesini değiştiren durumlar da artan kıl büyümesine neden olabilir. Bu durumlar SHBG seviyesini düşürerek kullanılabilir serbest testosteronun artmasına neden olurlar [48].



Şekil 2.1. Modifiye Ferriman-Gallwey skorlama sistemi [48]

Adet (Menstruel) Düzensizlikleri

PKOS'lu olguların jinekolojik olarak en sık başvuru nedeni adet düzensizliğidir. Bu genellikle düzensiz yumurtlama sonucunda az adet görme şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu olgularda adet görme yaşı gecikmemekle birlikte, ilk adetler genellikle düzensizdir. İleriki yıllarda birtakım streslere maruz kalma veya kilo alma gibi nedenlerden sonra adet görememe gelişebilir [49]. Obezite periferik östrojen dönüşümünü ve insülin düzeyini artırarak LH seviyelerinde yükselmeye yol açmaktadır [50].

Balen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre PKOS'lu olguların %30'u düzenli menstruel döngüye sahipken, %50'sinde adette azalma ve %20'sinde adet olmama bulunmaktadır [51].

Obezite

PKOS'da obezite görülme sıklığı %40-60 olarak bildirilmektedir [45]. Farklı ülkelerdeki PKOS hastalarında obezite görülme sıklığı farklılık gösterebilir. Obezite sıklıkla bel/kalça oranının arttığı karın bölgesinde yağlanma tipinde obezite olup PKOS'lu hastalara ek riskler getirmektedir [52]. Normal vücut ağırlığına sahip PKOS hastalarında da ağırlık yönünden eşleştirilmiş sağlıklı kontrollere göre bel/kalça oranı artmıştır [53]. 1982'de yapılan bir çalışmada, obez PKOS'lu hastaların %75' de ağırlıklarının %10- 15' ni verdiklerinde tedavi görmeden gebelik oluşmuş, bu sonuçlar daha sonraki çalışmalarla da doğrulanmıştır [54].

Kısırlık

Klasik olarak PKOS'da kısırlığın ilk sebebi yumurtlama olmamasıdır. Yumurtlamamaya neden olan LH aşırı salgılanması ile kısırlık arasındaki ilişki sanıldığından daha komplekstir. LH ayrıca bilinmeyen bir mekanizma ile erken gebelik kayıpları ile de ilişkili olabilir [55]. Metforminle tedavi edilen kadınlarda ilk üç ay gebelik kayıplarında önemli bir azalma gösteren çalışmalarda PKOS'da insülin direnci ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında muhtemel ilişki ileri sürülmüştür [56].

Akne

Epidermal deri kalınlaşması (hiperkeratozis) ve dermal fibroblast çoğalması (proliferasyonu) ile oluşan; en sık olarak ense, deri kıvrımları, dirsek ve dış genital organda (vulvada) görülebilen koyu, kadife plaklar şeklindedir [57, 58]. Belirgin artmış pigmentasyona rağmen melanosit sayısında artma veya melanosit depolanması yoktur. Hiperinsülineminin varlığı ve şiddeti ile ilişkilidir [59, 60]. PKOS' da hiperinsülineminin azaltılması koyu deri bölgelerinde iyileşmeyi sağlar. Çizelge 2.2'de klinik bulgular ve sıklıkları verilmiştir.

Çizelge 2.2. PKOS’nda klinik bulgular ve sıklığı [22].

BULGULAR	SIKLIK (%)
Hirsutizm	60-90
Akne	24-27
Obezite	40-60
İnfertilite	55-75
Amenore	26-51
Oligomenore	50-90
Regüler menstrüel siklus	22
Disfonksiyonel uterin kanama	29
Virilizasyon	0-28

2.1.6. Laboratuvar bulguları

Sendroma tek başına tanı koyduracak bir biyokimyasal test henüz bulunmamaktadır.

- ❖ LH/FSH oranı menopoz öncesi kadınlarda 1: 1 iken, PKOS’ lu kadınlarda bu değer 2: 1’ den daha büyüktür.
- ❖ FSH seviyesi normal veya normalin altındadır.
- ❖ LH seviyesi artmıştır.
- ❖ Total testosteron veya serbest testosteron düzeyleri artmıştır. Bu test en faydalı test olarak görülmektedir.
- ❖ Prolaktin düzeyleri normal veya artmış bulunabilir.
- ❖ DHEA-S düzeyleri çok az olarak artmış bulunabilir.
- ❖ Östrojen seviyesi normal veya yüksek bulunur.
- ❖ SHBG seviyesi azalmış bulunur.
- ❖ Lipit profili: LDL-Kolesterol, Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri artmış
- ❖ HDL düzeyi ise azalmış olarak bulunur.
- ❖ Glikoz düzeyi artmıştır.
- ❖ İnsülin genellikle artmış bulunur.

Bu testlere ilaveten ultrason ve/veya laproskopi de tanı için kullanılmaktadır.

Laboratuvar testleri ayırıcı tanı için de gereklidir.

Adet görmemenin nedenlerini saf dışı bırakmak için;

- ❖ β -HCG (gebelik)
- ❖ Prolaktin (hiperprolaktinemi)
- ❖ TSH (tiroid işlev bozukluğu)

Hiperandrojenizmin diğer sebeplerini saf dışı bırakmak için:

- ❖ DHEA-S
- ❖ Androstenedion
- ❖ 17α -OH progesterone

2.1.7. Uzun dönem sağlık riskleri

Kronik yumurtlamamaya bağlı kısırlığın en sık nedeni olan PKOS; çok faktörlü, üreme sistemi ile ilgili, metabolik bir sendrom olarak Tip 2 diyabet, HDL düşüklüğü LDL yüksekliği, kardiovasküler hastalıklar ve endometrium kanseri gibi uzun dönem sağlık riskleri taşıması nedeniyle günümüzde bir halk sağlığı problemi olarak ön plana çıkmaktadır (Şekil 2.2).

Glikoz Tolerans Bozukluğu ve Tip 2 Diyabet

PKOS'li hastalarda diyabet gelişimi yönünden risk artışı bulunmaktadır. Yaş, vücut kitle indeksi, bel çevresi ve bel/kalça oranında artış ve birinci dereceden yakınlarda diyabet öyküsü PKOS'da diyabet risk faktörleri arasında sayılabilir [39].

PKOS hastalarında glikoz toleransında bozulma ve tip 2 diyabet kombine görülme sıklığı değişik çalışmalarda % 35- 40 arasında bulunmuştur [39, 61]. Bu nedenlerle PKOS tip 2 diyabet gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmekte ve tüm PKOS hastalarında diyabet yönünden tarama yapılması önerilmektedir. PKOS'da glikoz dengesi anormalliklerinin belirlenmesinde en iyi metot oral glikoz

tolerans testidir [62]. PKOS hastalarının yanı sıra, anne, baba, kız kardeş ve erkek kardeş olmak üzere tüm birinci dereceden yakınların da glikoz dengesi bozuklukları yönünden yüksek risk taşıdıkları gösterilmiştir [63].

Lipid Profili ve Kardiovasküler Hastalık

Kalp hastalığına elverişli ortam oluşturan birkaç risk faktörünün varlığına dayanarak PKOS' lu kadınların kardiovasküler hastalık için genellikle artmış risk altında olduklarına inanılır. Bu faktörler bozuk glikoz toleransı, android obezite (erkek tipi obezite), androjen fazlalığı, HDL düşüklüğü LDL yüksekliği ve hipertansiyondur. Yapılan bir çalışmada PKOS grubu normal kontrollerden anlamlı derecede daha yüksek total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserit seviyelerine sahip olduğu bulundu. Ayrıca HDL kolesterol ve ApoAI düzeyleri düşük seviyelerdedir. Lipid düzeyi değişikliklerinde en önemli rol oynayan faktörün hiperinsülinemi olduğu söylenmektedir [64]. PKOS' lu kadınlarda hepatik lipaz aktivitesinin artmasından dolayı büyük lipoprotein partiküllerinin daha küçük partiküllere dönüşümü artmaktadır. Bunlar da daha damar tıkanıklığı yapan (aterojenik) özelliktedirler. Bu da bize HDL' de azalma ve LDL' de artmayı açıklamaktadır [65].

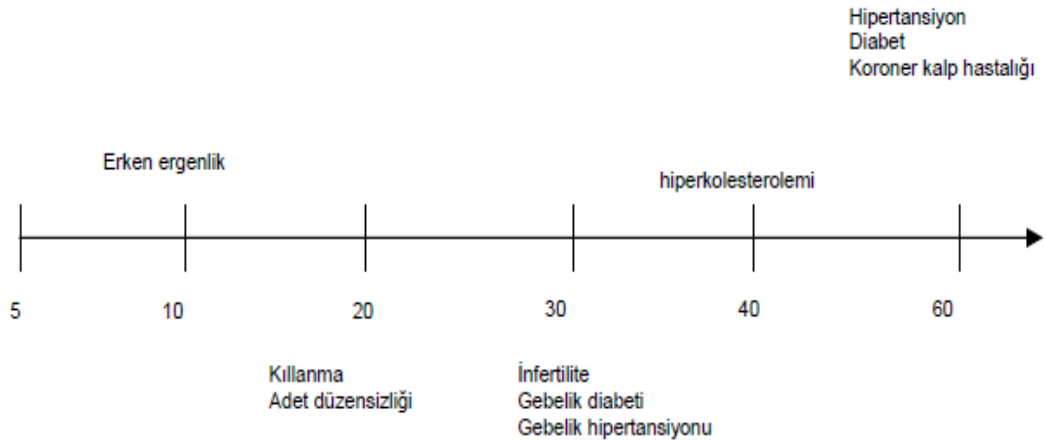
PKOS' lu kadınlarda ayrıca fibrin parçanlanmasının (fibrinolizisin) güçlü bir engelleyicisi olan plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI) konsantrasyonu da artmıştır. Bu da tromboz eğilimini artırıp miyokard infarktüsü (MI) gelişimi için kolaylaştırıcı bir faktördür [66, 67].

Geriye dönük yapılan çalışmalarda kardiovasküler hastalık riskinin arttığını gösteren bulgular elde edilmiştir. 20- 30 yıl önce operasyon ile koni tipi kist çıkarılması (ovaryan wedge rezeksiyonu) ile tedavi edilmiş PKOS' lu hastaların 4 kat daha fazla hipertansiyon tedavisi gördüğü, 7 kat daha fazla da diabet tanısı aldığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [68].

Sonuç olarak, PKOS kardiovasküler hastalık açısından bir risk faktörü olarak değerlendirilmelidir.

Kanser

PKOS' lu hastalarda kronik karşılanmamış östrojen etkisi rahim iç yüzeyinin kalınlaşması (endometriyal hiperplazi) ve adenokarsinom riskini arttırabilecek özelliklerdir. Ancak PKOS hastalarında endometriyal kanser sıklığının ya da endometriyal kansere bağlı ölümlerin artmış olduğu kesin olarak gösterilememiştir [69]. PKOS ile meme ve yumurtalık kanseri arasındaki ilişki olduğu gündeme gelmişse de uzun dönem geriye dönük takip çalışmalarında PKOS hastalarında bu kanserlerin gelişme riskinde veya neden oldukları ölüm oranında artış bulunmamıştır [70]. Meme kanseri ile PKOS' un ilişkisini araştıran çalışmaların çoğu kesin bir pozitif ilişki göstermek için yetersizdir.

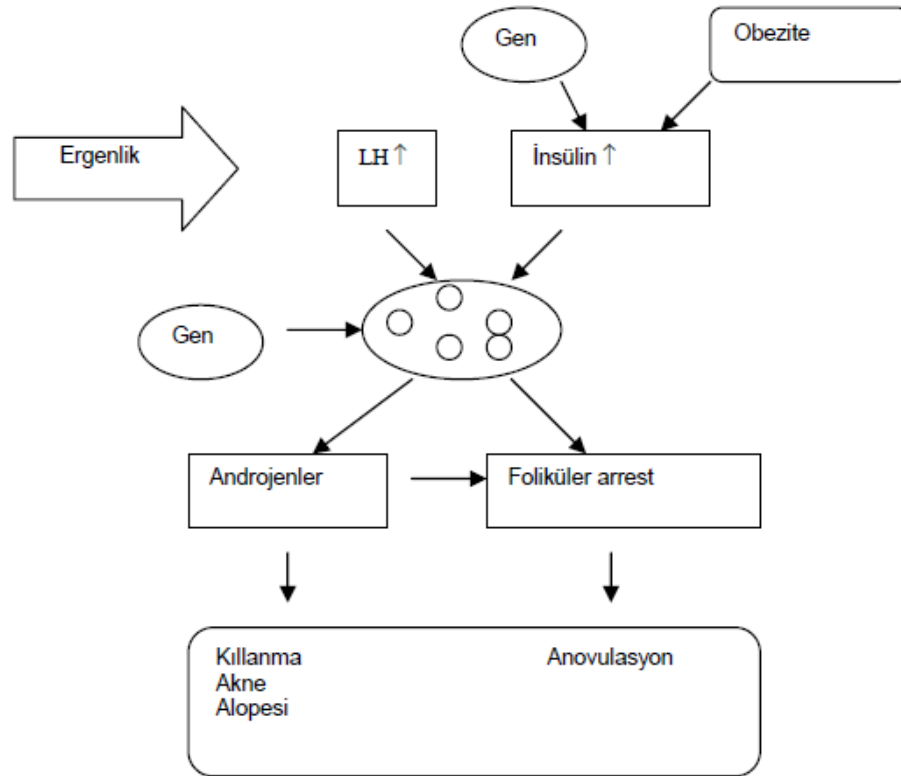


Şekil 2.2. PKOS ile ilişkili bulguların yaşa bağlı ortaya çıkış zamanları [21].

2.1.8. Oluş nedeni (Etiyolojisi)

PKOS'un nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte steroid hormon, gonadotropik hormon üretimi, androjen salınımında ifadelenen genlerde polimorfizmler ve glikoz toleransı, insülin direnci gibi metabolik bulguları içeren biyokimyasal faktörlerle etkileşim halinde, genetik temelli yumurtalık kaynaklı bir bozukluk olduğu konusunda çalışma sonuçları yaygındır [13]. Obezite ve ergenlik gibi çevresel

faktörler insülin direnci gelişimini uyarmaktadır. PKOS'lu hastalarda insülin salınımında tip 2 diabette olana benzer dengesizlik gözlenir [13, 71, 72] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. PKOS'un oluş nedenleri [72].

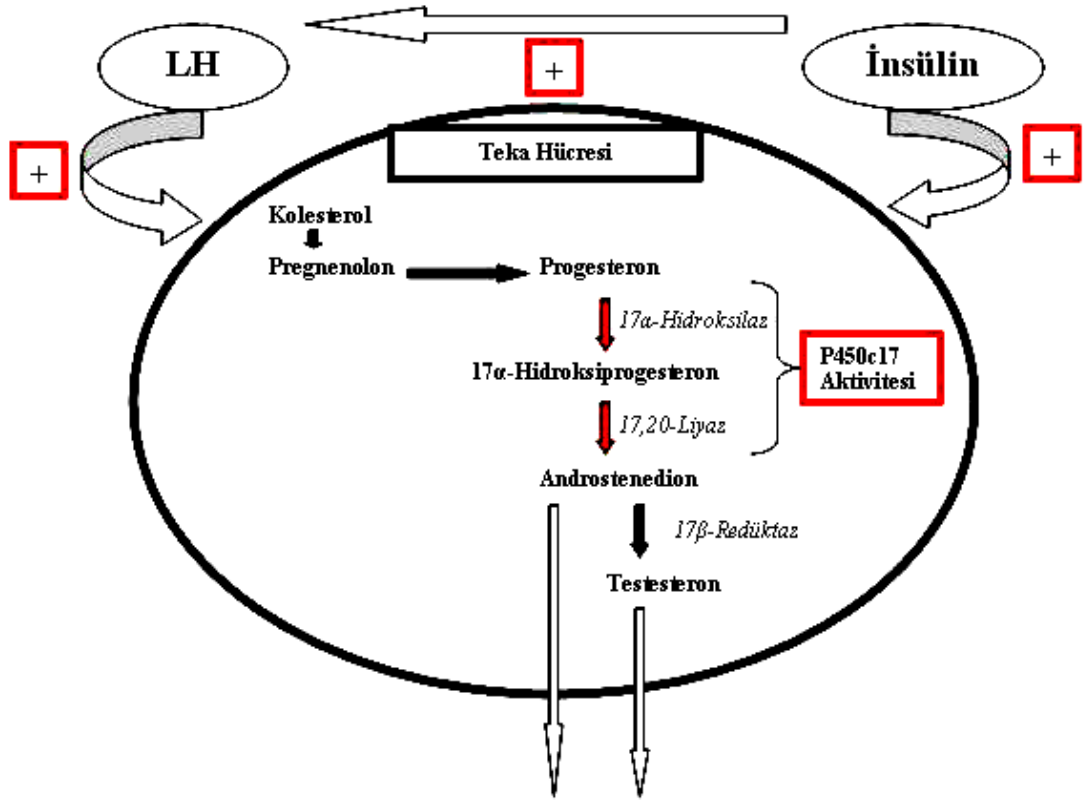
2.1.9. Glikoz tolerans bozukluğu ve insülin direnci

İnsülin direnci, hiperinsülinemi ve androjen sentezi arasındaki ilişki PKOS temel oluşma mekanizmasının olduğu düşünülmektedir [73]. Klinik olarak yaş ve vücut kitle indeksine göre eşleştirilmiş PKOS'lu ve normal olgular, insülin direnci bakımından kıyaslanınca, PKOS'lu olgularda insülin direncinin daha fazla olması PKOS'da esas olarak insülin duyarlılığında bir azalma olduğu kanıtlanmıştır. PKOS'lu obez olgularda PKOS'lu zayıf olgulara göre insülin direncinin daha baskın olarak saptanması da aslında obezitenin PKOS'ta birincil olarak insülin direncine yol açmadığı, olan insülin direncini artırdığı şeklinde yorumlanabilir [74]. Pratikte,

insülin duyarlılığını artıran ilaçlar, kilo verme gibi koruyucu yöntemler insülin duyarlılığını artırıp yumurtlama işlevini düzeltmeleri, PKOS ile insülin direnci arasında doğrudan bir ilişki olduğunu, obezitenin bu ilişkiyi arttırdığı kanıtlanmaktadır.

Hücrel ve moleküler çalışmalar ışığında insülin direnci insülin-reseptör bağlanmasından sonraki son uyarıcı sinyal iletimindeki bozukluklardan kaynaklandığı düşünülmektedir [5]. İnsülin reseptör fosforilasyon düzenlenmesindeki genetik anormallikler, insülin bağımlı olmayan serin fosforilasyonunda artmaya, insülin bağımlı tirozin fosforilasyonunda azalmaya, son uyarıcı sinyal iletiminde bozukluğa ve sonuçta insülin duyarlılığında azalmaya ve hiperinsülinizme yol açtığı belirtilmektedir [5,7].

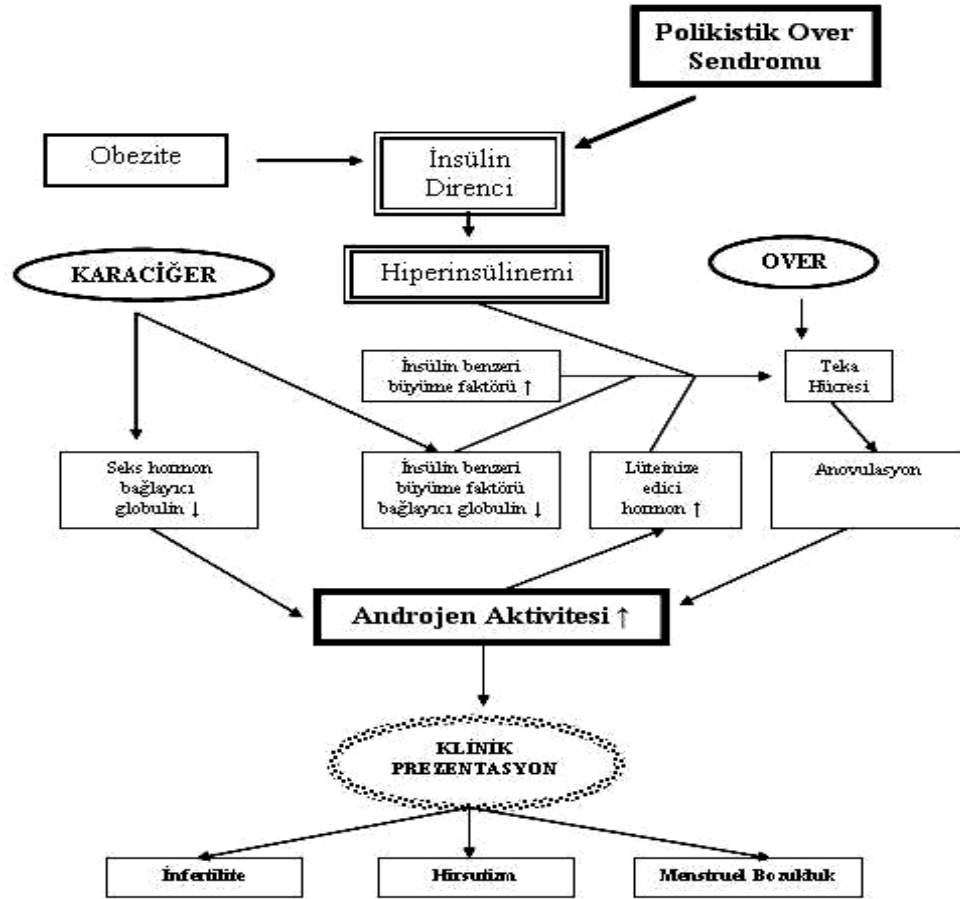
Yumurtlama olan veya yumurtlama olmayan PKOS'lu kadınların teka hücrelerinden P450c17 aktivite artışına ikincil olarak androjen sentezi artmıştır. P450c17, androjen sentezinde anahtar enzim rolü [hız kısıtlayıcı basamak] oynamaktadır. Çünkü yumurtalık sitokrom P450c17'nin içsel, hem 17 α -hidroksilaz hem de 17, 20-liyaz aktivitesi vardır. PKOS'da bu enzimin aktivite artışına ikincil olarak progesterondan 17 α -hidroksiprogesteron sentezi artmıştır. Bu enzimin düzenlenmesi serin fosforilasyonu ile düzenlenmektedir. P450c17'nin serin hiperfosforilasyonu enzimin 17, 20-liyaz aktivitesinde artış oluşturmakta ve bu da aşırı androjen üretimine yol açmaktadır [75–79]. Serin fosforilasyonundaki aşırılık insülin reseptörünü de hedef almakta ve insülin-reseptör sinyalinde azalmaya yol açmaktadır. Bu bir genetik bozukluk olup tek bir nedenden dolayı PKOS'ta hem insülin direnci hem de aşırı androjen salgılanmasına yol açıklanabilmektedir [75, 76]. Fakat fibroblastlar üzerinde yapılan bir çalışmada hiperfosforilasyona yol açan tek bir anormal kinaz saptanamamıştır [77]. Ek olarak PKOS'lu olgulardaki hiperinsülinizmin metformin ile düzeltilmesi yumurtalık sitokrom P450c17 aktivitesinde azalmaya yol açmakta ve androjen seviyelerinin düşmesini sağlamaktadır [78]. Teka hücrelerindeki androjen sentezi şekil 2.4.'de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Teka hücrelerinde androjen sentezi üzerinde insülin ve LH'nin etkileri [78].

Yumurtalıkta sentezlenen androjen miktarı foliküler gelişim için çok önemlidir ve normalde bu sentezin sıkı bir düzenlemesi vardır. PKOS 'da bu düzenleme bozulmakta ve fazla olan androjenler foliküler tıkanmaya yol açmaktadır. Bu durumu düzeltmek için hiperinsülinizm, LH'nin [lüteinize edici hormon] etkisini arttırdığı, LH'nin da teka hücrelerinde steroid yapıdaki (steroidojenik) enzim aktivitesini artırarak androjen biyosentezini arttırdığı düşünülmektedir [80, 81]. Hiperinsülinemi insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein -1 sentezinde dengesizlik yaparak anormal bölgesel yağ yapımına yol açmaktadır. Hiperinsülinizmin hem LH' yı arttırıp hem de yumurtalık stromal hücrelerine doğrudan etki ederek kanda serbest androjen seviyelerini arttırması, [SHBG] düzeyinde azalmaya yol açmaktadır [80]. İnsülin direnci, bir proteinaz inhibitörü olan overyan plasminojen aktivatör inhibitör -1 [PAI -1] üzerine doğrudan uyarıcı etki göstererek foliküler büyüme ve çatlamının anormal gelişime yol açabilmektedir [82]. Fakat bu etki açısından normal veya anovulatuvar

polikistik overlerde anlamlı bir fark saptanmamıştır [83]. Sonuç olarak hiperinsülinemi, androjen yüksekliğine yol açmakta ve hiperandrojenizm de foliküler gelişmeyi bozmakta ve apoptozisi engellemektedir [75] (Şekil 2.5).



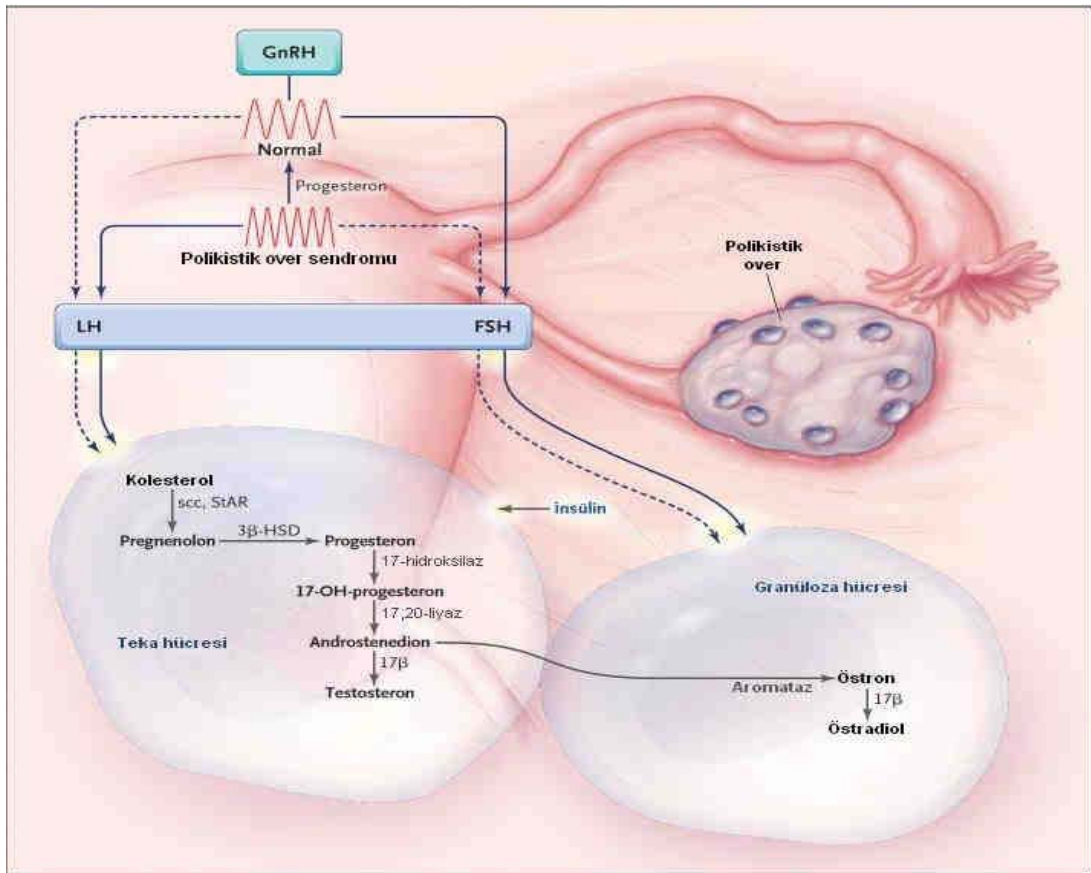
Şekil 2.5. İnsülin direnci ve hiperinsülineminin PKOS'taki rolü [75- 83].

PKOS' lu olgularda kalça ve karın bölgesi tipi obezite, insülin direnci, HDL düşüklüğü LDL yüksekliği ve hipertansiyon sık görülmekle birlikte ve bu olgularda uzun dönemde kardiyovasküler hastalıklar ve T2DM gelişme riski yüksektir. [84, 85]. Kesitsel çalışmalar, PKOS ile yetersiz kanlanmaya bağlı (iskemik) kalp hastalığı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya koymuşsa da, sonuçlar çelişkilidir ve bu bilginin uzun dönemli, çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir [84–86]. Metabolik hastalık riski belirteçleri olarak, insülin direnci, HDL düşüklüğü sayılabilir. Aynı zamanda PKOS' lu olgularda etkili bir fibrinolizis inhibitörü olan PAI-1

konsantrasyonunun serum insülin konsantrasyonuyla doğrudan ilişkili olması, miyokard infarktüs riskinin önemli bir belirteçidir. PKOS'lu olgularda yetersiz kanlanmaya bağlı kalp hastalığı belirteçlerinden bir tanesi de homosistein yüksekliği olabilir [86].

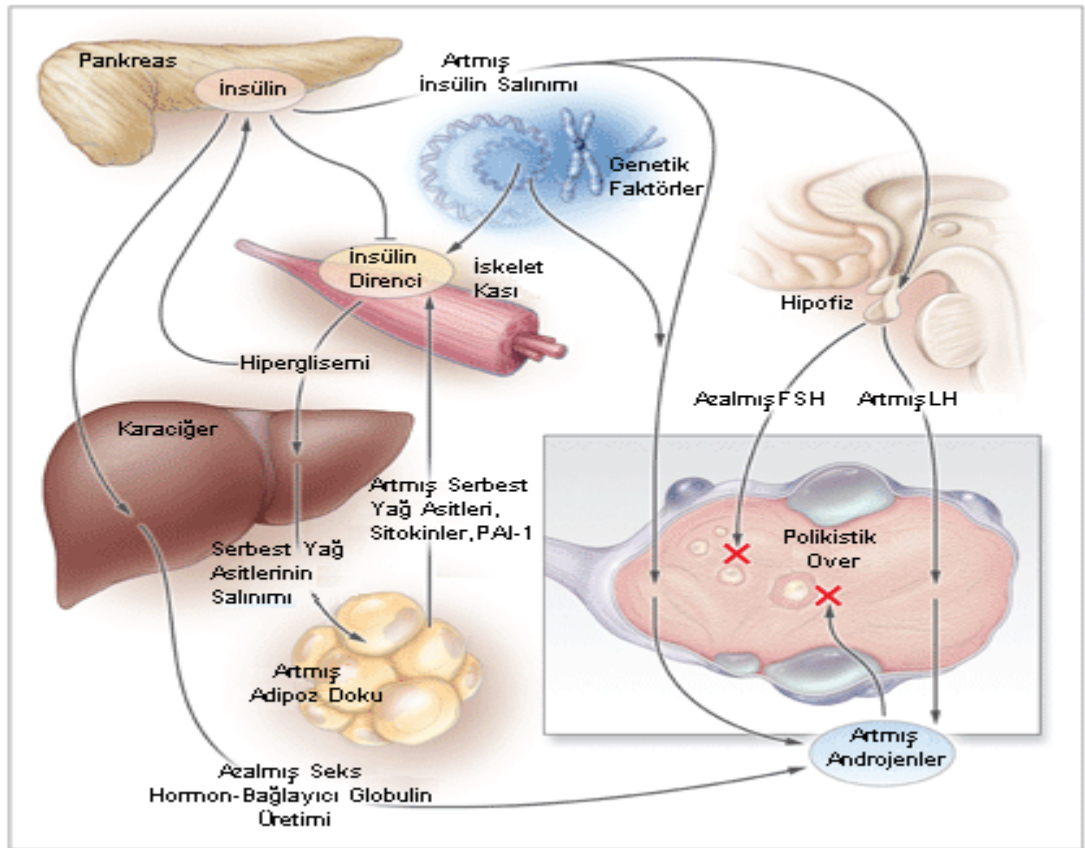
İnsülin, PKOS'ta hiperandrojeneminin patogenezinde doğrudan ve dolaylı rol oynar. LH ile sinerjik olarak teka hücrelerinden androjen sentezini uyarır. Aynı zamanda hepatic seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) sentezini inhibe eder. Sonuç olarak plazmada dolaşan serbest testosteron artar. PKOS'lu hastaların önemli bir kısmında saptanan hiperinsulinemi, total testosteron miktarı normal veya hafif yüksekken serbest testosteronun yüksek olmasını açıklar.

Şekil 2.6.'de PKOS'un hipotalamus-hipofiz ve yumurtalık döngüsü açıklayan mekanizma anlatılmaktadır.



Şekil 2.6. PKOS'ta hipotalamus-hipofiz-yumurtalık aksı [7].

Yukarda açıklanan veriler ışığında PKOS oluşu nedeninde ana rolü insülin direnci oynamaktadır. Bununla birlikte her PKOS'lu olguda insülin direncinin gösterilememesi PKOS oluşumunda halen tespit edilememiş başka faktörlerin de olduğunu düşündürmektedir [87, 88]. Bu noktada çeşitli hipotezler üretilmiştir. Bunlardan birisi polikistik overli olgularda insülin direncinin artması olabilir [89]. PKOS oluşumunda insülin direnci dışında başka önemli faktör veya faktörlerin de rol oynadığı düşünülmektedir. Rol oynayan diğer faktör veya faktörler insülin ile yakın ilişkilidir. Çünkü tipik PKOS'lu olgularda, insülin direnci gösterilemese bile, insülin duyarlılaştırıcı ilaçların [metformin, rosiglitazon] tedavide kullanımları, androjen seviyelerinde ve yumurtlamada iyileşme sağlamaktadır [87–89] (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. PKOS oluşu mekanizmasında insülin direncinin rolü [7].

2.1.10. PKOS, İnsülin direnci ve diabet

İnsülin direnci, obezitenin derecesine bağlı olarak genel populasyonun % 10-25'ini etkilemektedir. PKOS üreme çağındaki kadınların % 4-10'unda, T2DM benzer yaş grubunun %2'sinde görülür. PKOS' lu kadınların yaklaşık % 50-70'inde ve tip 2 diyabetlilerin % 80-100'ünde değişik derecelerde insülin direnci mevcuttur (90, 39). PKOS artmış T2DM gelişme riskiyle birlikte. Bu risk normal popülasyona göre 5-10 kat artmıştır [91].

Legro ve arkadaşlarının 254 PKOS' lu hasta ile yaptıkları geleceğe yönelik bir çalışmada obez PKOS' lulara %31 oranında BGT (bozulmuş glikoz toleransı), %7,5 oranında diyabet saptanırken, obez olmayan PKOS' lu grubunda bu oranlar sırasıyla %10 ve %1.5 bulunmuştur [39].

T2DM' lu menopoz öncesi kadınların % 27 kadarında ise PKOS bulunur ki bu durum, hem insülin direncinin önemini, hem de T2DM'lu kadınların çoğunda PKOS' a yol açan sebebin tek başına insülin direnci olmadığını vurgulamaktadır. T2DM ve PKOS arasındaki ilişkinin doğası ve mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber, her iki hastalığın gelişiminde asıl rolü insülin direncinin oynadığı kabul edilmektedir. İnsülin direnci çeşitli klinik fenotiplerde ortaya çıkmaktadır. Bazı insüline dirençli kadınlarda birincil olarak androjen fazlalığıyla karakterize PKOS bulunmakta ve bu hastaların bir kısmında BGT (bozulmuş glikoz toleransı) veya T2DM tabloya eşlik etmekte veya daha sonra gelişmektedir. Bazı insüline dirençli kadınlarda ise androjen fazlalığı bulguları sınırlıdır ve mutlak surette glukoz toleran bozulmasının bulunduğu T2DM gelişmektedir. Diğer bazı insüline dirençli kadınlarda ise metabolik sendrom denilen ve metabolik bozuklukların daha şiddetli olduğu tablo gelişmektedir. İnsülin direncinin farklı klinik tablolarda ortaya çıkmasını belirleyen faktör henüz bilinmemektedir. Muhtemelen PKOS ve T2DM, aynı insüline dirençli sendromun farklı klinik şekilleridir ve fenotipik farklılıkları yumurtalık veya pankreas seviyesinde rastlantısal genetik bir bozukluğun eşlik edip etmemesine bağlıdır. İnsülin direnci ve hiperinsülinemi olan her hastada PKOS gelişmemesi, yumurtalık işlevleri ile ilgili özgün bir bozukluğun rastlantısal olarak

varlığına işaret etmektedir. Diğer alternatif bir düşünce ise, PKOS ve T2DM'un insülin duyarlılığındaki farklı moleküle-özü ve dokuya-özü bozukluklarla karakterize, oluş nedeni olarak insülin direncinin farklı alttiplerinden kaynaklanan, birbiriyle ilişkisiz hastalıklar olduğudur [86].

2.2. Polikistik Over Sendromu ve Genetik

PKOS, doğurganlık çağındaki kadınlarda yaygın bir endokrin ve metabolik bozukluk olup güçlü bir genetik alt yapısı vardır [92]. İlk genetik çalışma Cooper ve arkadaşlarının yaptığı 18 hastadan oluşan çalışmadır [93]. Ardından Givens ve arkadaşları 1970'lerde PKOS' un X' e bağlı kalıtım gösterdiğini rapor etmişlerdir [94]. Bu çalışmada PKOS' un tanı kriteri olarak, kıllanma ile birlikte polikistik ve iki taraflı genişlemiş yumurtalıkları almışlardır. Daha sonraki yıllarda İngiltere'de yapılan çalışmalarla PKOS' un otozomal dominant (OD) kalıtımına dair yeni bilgiler elde eklenmiştir [3, 95]. Bu çalışmalardan biri olan Carey ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, % 50 oranında OD geçiş gösterilmiştir [3].

Heterojen bir bozukluk olan PKOS' da, klinik bilgilerin çoğu OD geçişten bahsetmesine rağmen, son yapılan çalışmalarda birden fazla genin hastalığın oluşmasından sorumlu olabileceği belirtilmektedir [96, 10].

PKOS' da heterojen biyokimyasal anormallikler olsa da, genlerin etkisi sonucu ortaya çıkan ve çok iyi bilinen birkaç ortak biyokimyasal değişiklik bulunur. En önemli biyokimyasal anormallik, aşırı androjen salgılanmasıdır [97]. Birçok araştırmada ek olarak adrenal anormallik olduğu söylene de, androjen fazlalığının asıl nedeni yumurtalıklarda aşırı üretilmesidir. LH baskılanması ile androjen konsantrasyonunda belirgin düşüş sağlanması ve PKOS' lu kadınların yumurtalık hücre kültürlerinde, teka hücrelerinde normal yumurtalıklı kadınlara göre 20 kat daha fazla androstenedion salgılanmasının saptanması bu over kaynaklı aşırı üretimin kanıtlarıdır [98, 99]. Ayrıca polikistik over teka hücrelerinde yağ sentezlenmesi (steroidogenez) yolunun bütün basamaklarında artış vardır [100]. PKOS' da teka hücrelerindeki bu artmış yağ sentezlenmesi, genetik anormalliğin bir sonucu olabilir. Yumurtalık kökenli androjen fazlalığı LH salgılanmasının artmasına bağlıdır [24]. Androjen üretimi ve metabolizmasında LH, LH reseptör ve P450 steroidojenik enzim ve genlerdir (P450scc, P450c17 α , gibi). Aynı zamanda granüloza hücrelerinde androjenin östrojene dönüşümünde rol oynayan P450 aromatazı kodlayan *CYP19* da

önemlidir [101]. Aile çalışmalarında genetik olarak geçen en önemli bulgunun androjen fazlalığı olduğu saptanmıştır.

Klasik sendromda insülin direnci bulunmaktadır [5]. PKOS' lu kadınlarda yüksek serum glukozu ve insülini ile beraber insülin duyarlılığında bir düşüş mevcuttur. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, klinik ve deneysel çalışmalarında insülin reseptörüne bağlanma, postreseptör sinyal ve insülin salgılanmasındaki birincil anormallikler gibi genetik kökenli olabilecek bozukluklardan bahsedilmektedir.

Holte ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada PKOS' lu obez bayanlar zayıflatıldıklarında insülin hassasiyetlerinde düzelmeye başladıklarını saptamışlar; fakat toplar damara glukoz verildiğinde (intravenöz glukoz uygulamasında) birinci faz insülin salgılamaya cevabında düzelmeye başlamadıklarını görmüşlerdir [102]. Bu bulgu PKOS 'un oluş nedenlerinin genetik temel kadar çevresel ve beslenme faktörlerinin de önemli rolü olduğunu göstermektedir.

Polikistik over morfolojisinin oluşmasında önemli genler rol oynar. Polikistik overde sadece antral foliküller değil, preantral foliküllerin sayısında da artış vardır [103, 104]. Erken foliküler gelişim gonad hormonularını salgılatan hormonlar (gonadotropinlerden) bağımsızdır. Polikistik overin oluşumunda yumurtalıklara bağlı bölgesel faktörler de rol oynar. Erken folikülogenezde birçok genin rolü (*TGF- α* ailesi, *IGF-I* ve II ve *TGF- α* gibi) vardır.

Ailelerde yapılan bağlantı çalışmalarında genler ile hastalık riski arasındaki ilişki araştırılmaya çalışılmıştır. Birçok çalışmada PKOS' da genetik geçiş gösterilmiştir. PKOS ile ilgili 2002'den bu yana yayınlanan bu ilişki çalışmalarında 42- 331 arasında değişen sayılarda olgu kullanılmıştır [105]. Diğer kompleks çalışmalara göre bu çalışmalardaki vaka sayısı oldukça azdır. Bu nedenle yeterli büyüklükte topluluk, kopya ve uygun istatistik metotlarının kullanıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

PKOS' un genetik temeline yönelik yapılan çalışmalarda 30'dan fazla gen üzerinde çalışılmasına rağmen genetik alt yapısı tam olarak belirlenememiştir [9, 10, 101]. Üzerinde en çok çalışılan genler aşağıda sıralanmıştır :

LH ve LH Reseptör Geni

Son zamanlarda yapılan çok merkezli bir çalışmada, *LH-β* geninde populasyonlar arasında belirgin farklılıklar olduğu saptanmış fakat PKOS ile net bir ilişki görülmemiştir [106]. Franks ve arkadaşları *LH* reseptör genindeki bir mutasyonun PKOS' da ki androjen fazlalığından sorumlu olabileceği yolunda bir hipotez ortaya koymuşlardır [101].

CYP11a (P450scc) Geni

Sitokrom P450, kolesterol yan zincir yaran enzimi (*P450scc*) kodlar. Hem vaka-kontrol çalışmalarında, hem de parametrik olmayan bağlantı analizlerinde, *CYP11a* 5' düzenleyici bölgesinde polimorfik bir dizi bulunmuştur [101].

Gharani ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, serum testosteron artışı ile genotipin çok sıkı bağlantı içinde olduğu ve (216+) genotipe sahip olanlarda testosteron konsantrasyonunun yüksek olduğu belirtilmektedir [107]. PKOS ile *CYP11a* ilişkisini gösteren iki çalışması daha bulunmaktadır. Pugeat ve arkadaşları (TTTTA)n polimorfizmi ile androjen düzeyleri arasındaki ilişkiyi 88 hasta kadında göstermişlerdir [108]. Bu araştırmacılar *CYP11a* genotipi pozitif olan kılıklı kadınlarda PKOS' un habercisi olduğunu bulmuşlardır. Diamanti- Kandarakis ve arkadaşları *CYP11a* genotipinin hem polikistik over hem de total testosteron konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir [109].

CYP17 (P450c17 α) Geni

Sitokrom P450, 17-hidroksilaz/17,20-liyaz enzimlerini (P450c17 α) kodlar. PKOS'da 17 α -hidroksilaz ve 17- 20 liyaz düzenlenmesindeki anormallikler bildirilmiştir [110]. İlk vaka-kontrol çalışmalarına göre, *CYP17*'nin bir varyant formunun PKOS ile ilişkili olduğu; fakat genotip ve serum testosteron düzeyi ile ilişkisi olmadığı saptanmıştır. Daha büyük diğer vaka-kontrol çalışmalarında da ilişki saptanmamıştır [9, 96, 110].

CYP21 (P450c21 α) Geni

21-hidroksilaz enzimini (P450c21 α) kodlayan gen olan *CYP21*, (KAH) sorumlu tutulmaktadır. Ancak son yapılan çalışmalarda, ACTH uyarısına normal 17-OH Progesteron yanıtı PKOS' lu kadınlarda, artmış sıklıkta *CYP21* gen mutasyonlarına rastlanmıştır. Bu durum PKOS ve KAH arasındaki ayırıcı tanıda soruna yol açmıştır [111, 112].

Diğer Steroidogenik Genler

Ne Franks ve arkadaşları, ne de Urbanek ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda *CYP19* lokusu (P450 aromatazı kodlar) ile PKOS oluşumu arasında ilişki saptamamışlardır [9, 101]. Urbanek ve arkadaşları yumurtalık kaynaklı steroidogenezin tüm yollarındaki genleri araştırmışlar, fakat PKOS etyopatogenezinde rol oynayan temel faktörü saptayamamışlardır [9].

Androjen Düzenleyici Gen

Urbanek ve arkadaşları X' e bağlı androjen reseptör geninde, tekrarlayan CAG polimorfizmi ile PKOS ilişkisini göstermek amacıyla 150 olguda çalışmışlardır [9]. Bununla birlikte Mifsud ve arkadaşları tekrarlayan kısa CAG polimorfizmi ile androjen düzeyleri arasında ters bir ilişki olduğunu bulmuşlardır [113]. Yüz yirmi iki PKOS' lu kadınla yapılan bir diğer çalışmada ise, bu hastalarda normal kadınlara

göre uzun CAG allellerinin sıklığının anlamlı derecede fazla olduğu saptanmıştır [114].

SHBG Geni

Hogenveen ve arkadaşları 482 PKOS' lu kadının 4'ünde SHBG' yi kodlayan gende P156L mutasyonu saptamışlardır [115]. Xita ve arkadaşları da SHBG' deki TAAAA polimorfizmi ile PKOS arasında ilişki olduğunu görmüşler ve PKOS' lu kadınlarda, normal kadınlara göre önemli derecede daha sık uzun TAAAA allelleri bulunduğunu saptamışlardır [116].

İnsülin Salınımı ve Etkisi ile İlişkili Genler (*INS-VNTR*)

PKOS' da ki en önemli sorumlu lokus *INS-VNTR*' dir [117]. *INS-VNTR* (İnsülin Variable Number Tandem Repeats), 5' düzenleyici bölgede bulunur ve insülin gen ifadesi ile T2DM oluşumunda önemli rol oynar. Franks ve arkadaşları sınıf III allellerin yumurtlama olmayan PKOS'dan sorumlu olduğunu bulmuşlardır [101].

İnsülin Reseptör Geni ve İnsülin Reseptör Substrat (*IRS- 1* ve *IRS-2*) Proteinler

İnsülin reseptör geni, hiperinsülinemik PKOS 'lu kadınlarda iyi incelenmiştir. Conway ve arkadaşları 22 hastada insülin reseptör genini incelemişler fakat anormallik bulamamışlardır [118]. Talbot ve arkadaşları da 24 hiperinsülinemik PKOS' lu hastada insülin reseptör geninde önemli mutasyonlar saptayamamışlardır [119]. Böylece insülin reseptör genindeki mutasyonların PKOS' da ki insülin direncinin esas sebebi olmadığı anlaşılmıştır.

Son zamanlarda yapılan iki vaka-kontrol çalışmasında, kromozom 19'un kısa kolu üzerindeki insülin reseptör genine yakın bir lokus ile PKOS' un ilişkili olabileceği gösterilmiştir [120, 121]. Bu lokus PKOS' da insülin salgılanması ve etkisinde önemli bir işleve sahip olabilir. Ancak bunu kanıtlamak için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

Benzer çalışmalar insülin reseptör substrat- 1 ve 2 (*IRS- 1* ve *IRS-2*) genleri ile de yapılmış ve desteklenmiştir [122, 123]. Az sayıda vaka ve kontrol ile Fransa’da yapılan bir çalışmada, *IRS- 1* ve 2’deki polimorfizmlerle PKOS’ un metabolik bulguları arasında ilişki saptanmıştır [123]. Yaklaşık 200 vakayı içeren bir Amerikan çalışmasında ise *IRS- 1* varyantları ile PKOS arasında bir ilişki bulunmamıştır. Ancak aynı çalışmada *IRS- 2* varyantları ve glukoz dengesi arasında bir bağlantı tespit edilmiştir [122].

Follistatin Geni

Folikül oluşumunda rol oynayan genlerdendir. Urbanek ve arkadaşları kromozom 5 üzerindeki follistatin lokusunu incelemişler ve beklenmedik bir biçimde PKOS ile arasında güçlü bir bağlantı olduğuna dair kanıtlar elde etmişlerdir [9].

Bununla birlikte, son zamanlarda elde edilen bilgiler, mevcut bilgilere daha geniş aile çalışmalarından sağlanan bilgiler eklendiğinde, bulguların anlamlı olmadığını belirtmektedir [124].

PPAR- α Geni

PPAR- α geni kromozom 3q25’de bulunmaktadır. *PPAR- α* 1 ve 2 olmak üzere iki izoformu vardır. *PPAR- α* ’ nın transkripsiyonel etkinliğinin azalması insülin duyarlılığının artması ile ilişkilidir. Kodon 12’de prolinin alanin ile yer değiştirmesi (Pro12Ala) reseptör etkinliğinin kısmi kaybına neden olmaktadır. Bu durum *PPAR- α* ’nın transkripsiyonel etkinliğini azaltmakta, insülin duyarlılığını arttırmakta ve T2DM gelişim riskini azaltmaktadır [125].

PKOS’ lu olgularda yapılan çalışmalarda Pro allelinin PKOS gelişim riskinde artmaya neden olduğu; Ala allelinin ise PKOS gelişiminden koruyucu olduğu gösterilmiştir [126, 127, 128]. *PPAR- α* . Pro12Ala polimorfizminin PKOS kliniğine nasıl katkıda bulunduğu tam bilinmemekle birlikte, bunun insülin direnci üzerinden olabileceği ileri sürülmektedir.

Hara ve arkadaşları PKOS' lu beyaz kadınlarda Pro12Ala allelinin koruyucu olduğunu saptarken; Afrika kökenli Amerikalı PKOS' lu kadınlarda bu ilişkiyi saptayamamışlardır [126]. Orio ve arkadaşları PKOS' da ki obezitenin etiyopatogenezinde rol oynadığını düşündükleri *PPAR- α* geninin 6. eksonundaki C – T yer değişimi oranını yüksek oranda bulurken; Pro12Ala polimorfizminin VKİ üzerine etkisinin olmadığını saptamışlardır [128].

Adiponektin Geni

Adiponektin geni, 3q27 kromozomunda yerleşiktir [129, 130]. Dizileri insanlarda belirlenmiş ve insülin direnci ve dolaşımdaki adiponektin konsantrasyonları ile ilişkisi araştırılmıştır [131, 132, 133, 134]. Birçok çalışmada 2. ekzon da sessiz T-G (45T>G) ve 2. intron 'da G-T (276G>T) polimorfizmini içeren değişiklikler gösterilmiştir [135, 136, 137, 138]. Son yapılan bir çalışmada 45T>G polimorfizmi PKOS' lu kadınlarda çalışılmış ve Δ^4 -androstenedion konsantrasyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür [139].

Özet olarak; PKOS oluşma nedenleri tam olarak aydınlatılamamış, fakat genetik bileşenlerin varlığını gösteren açık kanıtların olduğu, sık rastlanılan kompleks bir hastalıktır. Şimdiye kadar yapılan birçok çalışmada bazı aday genler üzerinde durulmuş, fakat herhangi bir genin sorumlu olduğuna ait net bir sonuç çıkarılamamıştır. Başlangıç bilgilerde *P450c17 α* genini kodlayan *CYP17* allellerinin PKOS ile ilişkili olduğu belirtilmesine rağmen, bu bulgular daha sonra ardı ardına yapılan çalışmalarda desteklenmemiştir. *CYP11 α* genindeki anormallikler, PKOS' lu kadınlardaki hiperandrojenizmde önemli bir role sahip olsalar da, androjen biyosentezindeki yollarda rol alan diğer enzimlerin de etkisinden dolayı, yağ sentezlenmesinde tek sorumlu faktör olmadıkları görülmüştür. Şimdiye kadar PKOS' da ki metabolik anormalliklerden en çok sorumlu olduğu düşünülen gen, insülin gen VNTR (Variable Number Tandem Repeats)'dir. Fakat bununla ilgili ilerbilg da henüz yetersizdir. Diğer aday genler ise, insülin geni yanında, kromozom 19 üzerindeki insülin reseptör geni ve insülin reseptör substrat- 1 ve 2'yi kodlayan genlerdir.

Heterojen bir sendrom olan PKOS' da ki birincil anormallikler, genetik olarak da belirlenmiş, androjen aşırı salgılanması ve buna aşırı LH yanıtına neden olan yumurtalık anormallikler, insülin direnci ve yumurtalama olmamasıdır. Diğer genler, çevresel faktörler (özellikle nutrisyon) klinik ve biyokimyasal fenotip oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Çizelge 2.3'de PKOS'un oluşmasında sorumlu olduğu düşünülen aday genler gösterilmektedir.

Çizelge 2. 3. PKOS' un sorumlu olabilecek aday genler [157].

Gonadotropin salgılanmasını etkileyen genler	Androjen üretimi ve salgılanmasını etkileyen genler	İnsülin salgılanması ve obeziteyi etkileyen genler
ACTR1 (activin receptor 1)	AR (androgen receptor)	ADIPOQ (adiponectin)
ACTR2A	GDF9 (growth differentiation factor 9)	CAPN10 (calpain 10)
ACTR2B	CYP11A (cytochrome P ₄₅₀ , family 11, subfamily A polypeptide)	INSR (insulin receptor)
FSH (follicle-stimulating hormone receptor)	CYP17AA	IRS1 (insulin receptor substrate 1)
FST (follistatin)	CYP19AA	IRS2
INH A, βA, βB (inhibin subunit A, βA and βB)	HSD3B1 (hydroxyl-6-5-steroid dehydrogenase, 3β-and steroid-iso-merase 1)	IGF1 (insulin-like growth factor 1)
SHBG (sex hormon binding globulin)		IGF2
LHCGR (luteinizing hormone choriogonadotropin receptor)		LEPR (leptin receptor)
		OB (leptin)
		TNF (tumor necrosis factor)
		POMC (proopiomelanocortin)

2.3. Kalpain 10 (CAPN 10) Geni

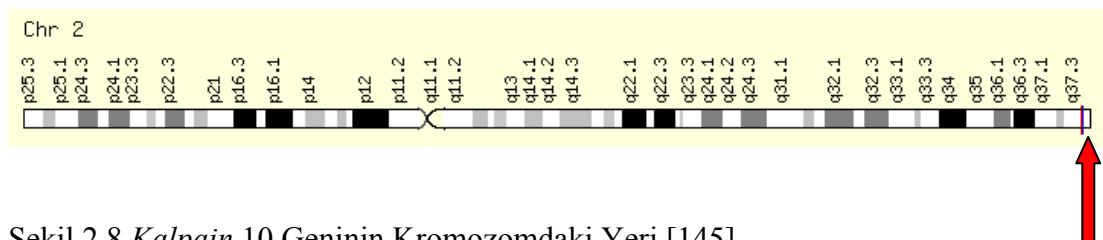
Kalpain'ler, aktivite gösterebilmek için Ca⁺² iyonlarına ihtiyaç duyan sitoplazmik sistein proteazlardır [140]. Fizyolojik işlevleri tam olarak aydınlatılmamış olmasına karşın trombosit aktivasyonu, membran füzyonu, apoptoz, farklılaşma, hücre

döngüsünün devamlılığı ve sinyal iletimi gibi hücrel Ca^{+2} düzenleyici faaliyetlerde bulunmaktadır. Aktivitesinin düzenlenmesindeki bozukluklar sinirsel bozukluklar, Alzheimer, metastaz gibi patolojilere yol açabilmektedir [140].

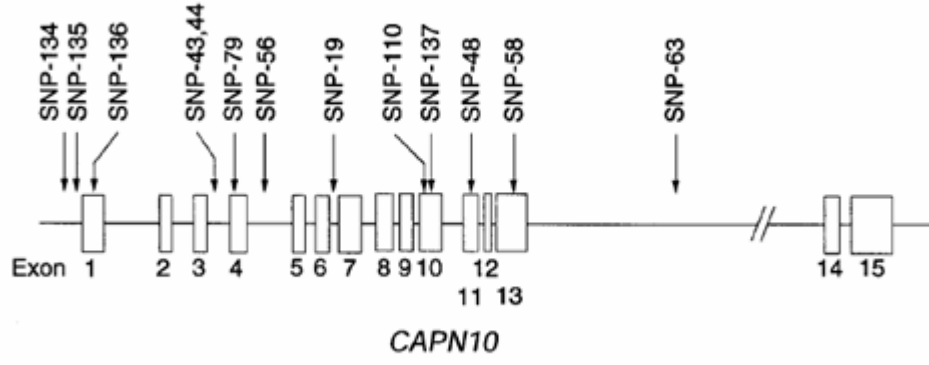
Moleküler çalışmalar, Kalpain'lerin insandan mikroorganizmalara kadar uzanan süper aile olduğunu göstermektedir. İnsanlardaki hastalıklar ve Kalpain geni mutasyonları arasındaki ilişkilerin keşfi nedeni ile üç boyutlu yapıları ve Ca^{+2} uyarımlı aktivasyon mekanizmaları çalışılmaktadır [140, 141].

Kalpain 10'u kodlayan gen, 2. kromozom üzerinde (2q37.3) yerleşiktir [12]. Onbeş ekzondan oluşur, 31 kb büyüklüğündedir ve T2DM ile ilgili ilk klonlanan gendir [11, 141, 142]. Horikawa ve ekibi 3, 6, 13. intron bölgelerinde üç ayrı polimorfizm (UCSNP -43,-19,-63) tanımlamışlardır [143].

Kalpain 10 geni, insülin salınımlında önemli rolü olan bir sistein proteazı kodlar. Bu gen, tüm erişkin ve fetal dokularda ifadenmektedir. En yüksek oranda kalp dokusunda daha sonra pankreas, böbrek ve karaciğer olmak üzere farklı düzeylerde ifadenmektedir. *Kalpain 10a*'dan *10h*' ye dek sekiz farklı tipi tanımlanmıştır. *Kalpain 10* geninde genetik varyantlar serbest yağ asitleri ve insülin direnci ile ilişkilidir [11]. Çalışmalar serbest yağ asitlerinin, insülin reseptörlerinin fazla fosforilasyonu sonucu reseptör kinaz aktivitesini azaltarak insülin direncini kuvvetlendiren protein kinaz C'yi aktive ettiğini göstermiştir. Bu nedenle, protein kinaz C'nin negatif düzenlenmesi insülin reseptör fosforilasyonunun devamlılığı için önemli bir faktördür. *Kalpain 10*' un 3. intronundaki tek nükleotid polimorfizmi (UCSNP43), mRNA ifadenmesini etkiler. Protein kinaz C'nin pozitif düzenlenmesi, azalmış insülin sinyali ile sonuçlanır [144].



Şekil 2.8. *Kalpain 10* Geninin Kromozomdaki Yeri [145].



Şekil 2.9. *Kalpain* 10 geninin yapısı [105].

3. MUTASYON ANALİZİNDE MOLEKÜLER BİYOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, özgün bir DNA parçasının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir [146]. 1980'li yılların ortalarında Cetus firması araştırmacılarından Kary Mullis tarafından geliştirilmesinin ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalanması gibi) ve birçok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, "Kırılgan X" sendromu, AIDS, lösemi vb.) DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır. Şekil 3.1'de PZR cihazı görülmektedir [146].

PZR ile istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin, döngülere bağlı replikasyonu hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. Aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi, PZR replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 döngü sonra seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katını kopyalar [146].

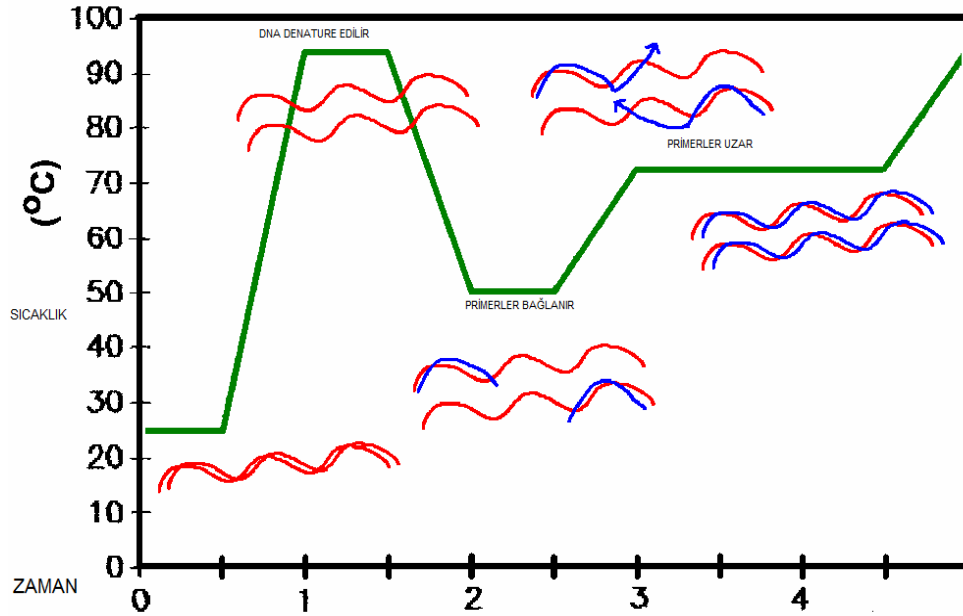
Çoğaltma son derece başarılı olabildiğinden, bazen başlangıç kalıbının bir molekül kadar az miktarının bile PZR'da çoğaltılabileceği gösterilmiştir. Bundan dolayı bir veya daha fazla hedef molekül temin eden herhangi bir DNA kaynağı prensipte PZR için kalıp olarak kullanılabilir. Kan, sperm, eski adli örnekler, atasal biyolojik örnekler gibi herhangi bir dokudan veya laboratuardaki bakteriyel kolonilerden veya faj plaklarından hazırlanan DNA kalıp işlevi görebilir [146].

Bir çift DNA primerinin her biri yaklaşık 18- 30 bç uzunluğa ve benzer G+C içeriğine sahip olması gerekmektedir. Böylece primerler benzer sıcaklıklarda tamamlayıcı dizilere tutunabilirler. Kısa oligonükleotitler için (<25bç) için bağlanma sıcaklığı, $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü kullanılarak hesaplanabilir. Uzun primerler daha yavaş kalıp DNA ile eşleşirler ve bu da PZR etkinliğini düşürür. Pratikte 30 nükleotitten daha uzun primerler çok ender kullanılmaktadır [146].

PZR ile DNA sentezinde kullanılan enzim, kaplıca sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen yüksek sıcaklıklarda uzun süre kararlı olan *Taq* DNA polimerazdır. Bu enzim sayesinde, *in vitro* DNA çoğaltılmasında otomasyona geçilmiş ve ardışık sentez reaksiyonlarında kısa sürede yüksek miktarlarda elde edilmesi mümkün olmuştur [146, 147].

PZR, tek iplikli DNA'yı kalıp alan ve deoksiribonükleotitleri substrat olarak kullanan DNA polimeraz enzimi ile gerçekleştirilir. DNA polimeraz, bütün diğer polimerazlar gibi, 5' → 3' yönünde sentez yapar ve senteze başlaması için mutlaka serbest 3'-OH grubuna gereksinim duyar. PZR'da kullanılan oligonükleotitler (primerler), enzimin senteze başlaması için bu 3'-OH grubunu sağlar. Özetle kalıp DNA, DNA polimeraz, deoksiribonükleotitler ve oligonükleotitlerin bulunduğu bir karışım, uygun koşullar sağlandığında, primerler kalıp DNA üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle eşlenerek enzimin senteze başlaması için başlatıcı görev yaparlar. Daha sonra DNA polimeraz, primerlerin ucuna serbest deoksiribonükleotitleri ekleyerek tamamlayıcı DNA ipliğini sentezler. Bu karışım, enzimin verimli çalışması amacıyla en uygun koşulları sağlamak için tampon bir çözelti de hazırlanır [146, 147].

aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72 °C kullanılır. Uzama aşaması için çoğu zaman iki dakika yeterli olmakla birlikte daha uzun DNA parçaları çoğaltılıyorsa süre arttırılabilir. Şekil 3.2’de PZR sıcaklık değişimleri görülmez. [146].



Şekil 3.2. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Sıcaklık Değişimleri.

3.2. Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Nükleik asit seviyesinde yapılacak incelemeler için Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) tekniği DNA dizisinde olan değişiklikleri dolaylı olarak belirleyen bir metottur [156]. Restriksiyon enzimleri (RE) çok özgül olarak DNA'yı belli bölgelerden keserek genellikle 1.000- 20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. DNA'nın istenilen bölgesi uygun primerlerle çoğaltıldıktan sonra DNA enzimler ile kesilir. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülür. Etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak oluşan çeşitliliğe RFLP adı verilir. DNA'lar restriksiyon enzimi ya da restriksiyon endonükleaz adı verilen enzimlerle küçük parçalara ayrılabilir [156]. Bu enzimler 4- 8 baz çifti uzunluğunda özgün bir dizisini tekrarlanabilir bir

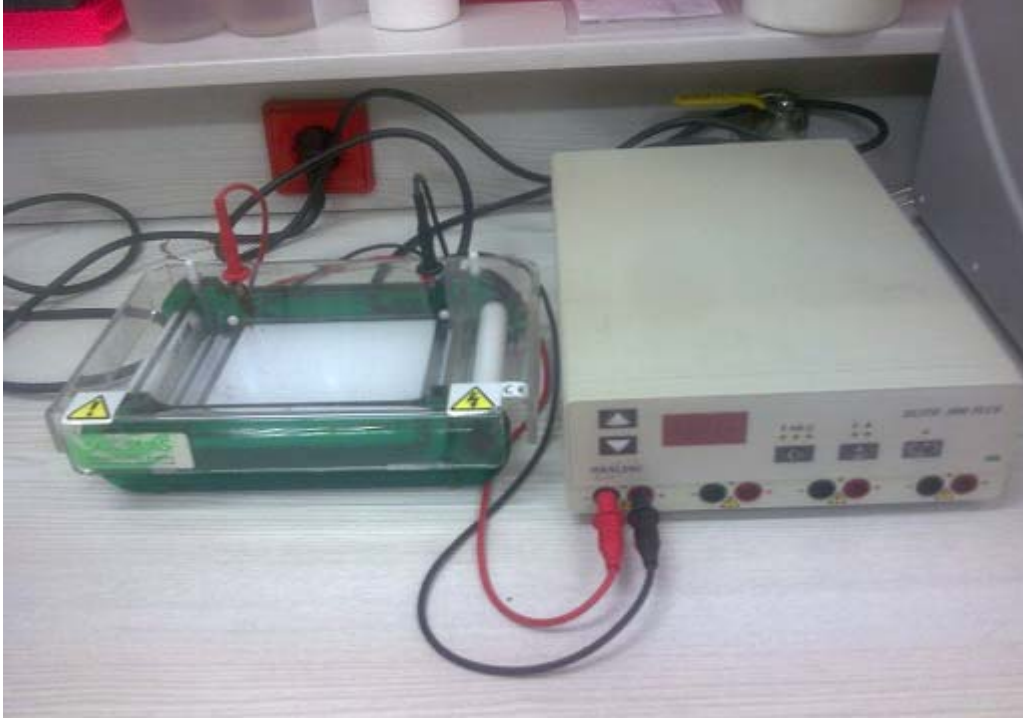
şekilde keser. DNA'nın RE ile muamelesi sonucunda çeşitli uzunlukta DNA parçaları oluşmaktadır [156].

3.3. Agaroz Jel Elektrofezi

Elektroforez farklı büyüklükte, yükte ya da üç boyutlu yapıda olan makromolekülleri, özellikle protein ve nükleik asitleri, ayırmak, saflaştırmak ve molekül ağırlıklarını saptamak amacıyla biyokimya ve moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [156].

Elektroforezde yüklü moleküllerin, bir elektriksel alan uygulandığında, sıvı içeren bir ortamda hareket hızları karşılaştırılır. Eksi yüklü DNA molekülleri (anyonlar), artı yüklü elektroda (anoda) hareket ederler [156].

200- 50.000 bç boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem destek ortamı olarak agarozun kullanıldığı elektroforezdir. Jel, elektroforez tamponuna konmuş agarozun yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi ve ~ 50°C kadar soğutulması ile jel tabaklarına dökülür. Ayırımı yapılacak örnek taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara konur ve ayırım tamamlanıncaya kadar voltaj uygulanır. DNA örnekleri jel içinde göç eder. Şekil 3.3'de Agaroz Jel Elektroforez tankı ve güç kaynağı görülmektedir [156].



Şekil 3.3. Agaroz Jel Elektforez Tankı ve Güç Kaynağı.

DNA, jeldeki etidyum bromür kapsarıyla ya da elektforezden sonra jel etidyum bromür ile boyanır. UV DNA görüntüleme sisteminde görüntülenir [156].

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Materyal

4.1.1. Kan örneklerinin toplanması

Bu çalışmada 119 polikistik over sendromu teşhisi konmuş (PKOS) hasta ve 136 kontrol olmak üzere toplam 255 kan örneği kullanılmıştır. Kan örneklerinin temini Kadın Hastalığı ve Doğum Kliniği Ünitesi Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Kadın Hastalığı ve Doğum Kliniği Ünitesi Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden sağlanmıştır. Alınacak örneklerinin temininde Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurul tarafından onaylanmış "Bilgilendirilmiş Gönüllü olur formu" kullanılmıştır (Ek-A, Ek-B). Tüm bireylerden etik kurulda belirtilen ve onaylanan koşullara bağlı kalınarak 9 ml periferik kan alınmıştır. Polikistik Over Sendromunda *CAPN* 10-19 (Kalsiyum ile Aktive Edilmiş Nötral Proteinaz 10 SNP 19) ve *CAPN* 10-43 (SNP 43) Geni Polimorfizmi Sıklığı, Bunların İnsülin Direnci ve Klinik Parametreler ile İlişkisi konulu tezde yapılan tüm deneysel çalışmalar, Gazi Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

4.1.2. Kimyasal maddeler

Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar
Eritrosit parçalama tamponu: 1,5 M NH_4Cl , 100 mM NaHCO_3 , 0,5 M EDTA (pH:8,0).

Lökosit parçalama tamponu:(STE; sodyum klorid tris EDTA): 10 mM Tris-HCl (pH: 7,4), 400 mM NaCl ve 2 mM EDTA (pH: 8,0).

Proteinaz K:(20 mg/ml): 0,2 gr proteinaz K, 10 ml TE tamponu.

%10' luk Sodyum Dodesil Sülfat: (SDS): 10 gr SDS 100ml steril distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi: Fenol, kloroform ve izoamil alkol verilen oranlarda karıştırılarak elde edilmiştir ve kullanılmadan önce 24 saat +4⁰C'de bekletilmiştir.

2M Sodyum asetat (NaCH₃CO₂) Çözeltisi: 1,64 gr sodyum asetat, 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

%70'lik ve %95'lik etil alkol çözeltileri

TE çözeltisi: 10 mM Tris (pH: 8,0), 1 mM EDTA (pH: 8,0).

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Taq polimeraz tamponu 5x: GoTaq Flexi (Promega)

Magnezyum Klorür (MgCl₂): 25 mM (Promega)

Nükleotit Karışımı: 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) (Promega)

Taq polimeraz: 5U/μl (Promega)

Primerler: Çalışmada kullanılan primerler (Çizelge 4.2.2.1 ve 4.2.2.3'de verilmiştir).

Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler

Tris-Asetik Asit- EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH: 8,0): 242 g Tris, 57,1 ml glasiyal asetik asit, 0,5 M 100ml EDTA (pH 8,0) distile su içerisinde çözülerek hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Agaroz: % 0,8 ve % 2'lik agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.

Yükleme tamponu: 40 gr sükröz, 0,025 gr bromofenol mavisi, 0,25 gr ksilen siyanol
100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Etidyum bromür: 10 mg/ml

Moleküler ağırlık belirteci (Marker) :100 bç'lik (FERMANTAS)

PZR- RFLP için Gerekli Enzimler

NdeI Enzimi: Enzim (FERMANTAS), tampon.

4.2. Metot

4.2.1. DNA izolasyonu

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan 9 ml'lik periferik kan örnekleri içinde 1 ml EDTA bulunan tüplere alınmıştır. Tüplerdeki kanlar hafifçe altüst edildikten sonra 50 ml'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine hacimlerinin 2,5 katı kadar eritrosit parçalama tamponu eklenmiştir. Falkon tüpleri de çalkalandıktan sonra 20 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Örnekler daha sonra 4000 rpm'de 4 °C'de 20 dk santrifüj edilerek parçalanmış kan hücreleri ile eritrosit parçalama tamponunun birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Ardından üstteki süpernatant dökülerek hacmin 2,5 katı eritrosit parçalama tamponu yeniden eklenerek santrifüj edilmiştir. Bu işleme tüpün dibinde parçalanmış kırmızı kan hücrelerinin üzerinde beyaz lökosit tabakası görülene kadar devam edilmiştir. Süpernatantın dökülmesinden sonra kalan pelletin üzerine 1000 µl eritrosit parçalama tamponu ilave edilmiş ve vorteksle homojen hale getirilmiştir. Falkon tüpünden 200 µl örnek 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne alınıp işleme devam edilmiş geriye kalan örnek depolanmıştır. İşlem yapılacak eppendorf tüpüne 500 µl STE, 30 µl SDS (% 10'luk), 20 µl Proteinaz K ilave edilmiş ve bir gece 56 °C su banyosunda bekletilmiştir. İkinci gün örneğin üzerine 750 µl fenol: kloroform: izoamil alkol ilave edilmiş ve 10 dk elde alt üst edilerek çalkalanmıştır. Ardından örnekler 20 dk buzda bekletilmiştir. 4000 rpm'de 4 °C'de 20 dk santrifüj

edildikten sonra oluşan 2 fazdan üst kısım pipet ile yeni bir tüpe aktarılmış, üzerine de 1:1 oranında kloroform ilave edilmiştir. Örnek 10 dk elde alt üst edilerek çalkalandıktan sonra 20 dk buzda bekletilmiştir. 4000 rpm'de 4 °C'de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yine pipet yardımı ile dikkatlice başka bir eppendorfa alınmıştır. Hacmin 1\10'u kadar Na asetat ve toplam hacmin 2 katı kadar % 95'lik etanol ilave edilip DNA iplikçikleri beyaz yumak şeklinde görünür hale gelinceye dek tüp yavaşça alt üst edilmiştir. Örnek -20 °C'de 1 gece bekletilmiştir. Üçüncü gün örnek 4000 rpm'de 4 °C'de 20 dk santrifüj edildikten sonra sıvı kısım dökülmüştür. Tüpe 500 µl %70'lik etanol ilave edilip 20 dk 4000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası alkol dikkatlice dökülüp kurumaya örnek bırakılmıştır. 2. Günün son aşamasında DNA yumağının görünürlüğü oranına göre 100–400 µl aralığında TE ilave edilip 37 °C su banyosunda bir gece bekletilmiştir.

4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

CAPN 10 SNP 19 ve CAPN 10 SNP 43 gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve PZR koşulları

CAPN 10-19 ve CAPN 10-43 geninin çoğaltılması için örnek başına polimeraz tamponu, primer, kalıp DNA ve Taq enzimi eklenmiş ve reaksiyon hacmi steril distile su ile 50 µl' ye tamamlanmıştır.

Çizelge 4.1. CAPN 10 geninin 6. İntron SNP 19 bölgesinin belirlenmesi için kullanılan primerler

CAPN 10 geni 6. intronda SNP 19
F: 5' – GTTTGGTTCTCTTCAGCGTGCAG – 3'
R: 5' – CATGAACCCTGGCAGGGTCTAAG – 3'

Çizelge 4.2. *CAPN* 10 SNP 19 bölgesini çoğaltmak için PZR programı

Başlangıç Denatürasyonu	Tepkime Döngüsü (30 Döngü)			Son Sentez Aşaması
	Denatürasyon Aşaması	Hibridizasyon Aşaması	Sentez (Uzama) Aşaması	
94 °C'de 5 dk	94 °C'de 30 sn	60 °C'de 60 sn	72 °C'de 90 sn	72 °C'de 5 dk

Çizelge 4.3. *CAPN* 10 geninin 3. İntron SNP 43 bölgesinin belirlenmesi için kullanılan primerler

<i>CAPN</i> 10 geni 3. intronda SNP 43
F: 5' - GCAGGGTTGGAGCTTGAGAG -3'
R: 5' - AAGTCAAGGCTTAGCCTCACCTTATA -3'

Çizelge 4.4. *CAPN* 10 SNP 43 bölgesini çoğaltmak için PZR programı

Başlangıç Denatürasyonu	Tepkime Döngüsü (30 Döngü)			Son Sentez Aşaması
	Denatürasyon Aşaması	Hibridizasyon Aşaması	Sentez (Uzama) Aşaması	
94 °C'de 5 dk	94 °C'de 30 sn	55 °C'de 60 sn	72 °C'de 90 sn	72 °C'de 5 dk

4.2.3. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Tampon olarak TAE kullanılmıştır. Jeller etidyum bromid boyanmıştır. 10 µl PZR ürünü yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir. Örnekler 30 dk 90 V'luk bir voltaj uygulanarak yürütülmüştür. Yürütme işleminin ardından PZR ürünleri Biometra BioDoc Analyze görüntüleme cihazı ile UV ışık altında görüntülenmiştir.

4.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) - Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm analizi (RFLP)

CAPN 10 SNP 43 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZR Ürünlerinin *NdeI* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

NdeI, *Neisseria denitrificans* türünden elde edilen tip 2 restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı 5'-CA ↓ TATG-3' dizisinden tanıyarak kesim yapar. *NdeI* enzim kesimi gerçekleştirildi ve 37°C 'de 24 saat kesime bırakılmıştır. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, dijital görüntüleme sisteminde değerlendirilmiştir.

4.2.5. İstatiksel analizler

İstatiksel analizler için SPSS paket programı kullanılmıştır. Çeşitli genotipler ve bunların birbiri ile kombinasyonlarını değerlendirmek için Odds Oranı (OR) ve %95 güven aralığı (GA) hesaplanmıştır. Gruplar arası anlamlılığı karşılaştırmak için Ki kare (χ^2) testi kullanılmıştır. Klinik ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, parametreler arasında korelasyon olup olmadığını değerlendirmek için Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Genotip dağılımlarının gerçek Mendeliyen populasyonunu yansıtmadığını, yani Hardy – Weinberg eşitliğine uyum sağlayıp sağlamadığını kontrol etmek için gruplarda normal ve mutant allellerin sıklığı bulunmuştur.

5. BULGULAR

5.1. Klinik ve Laboratuvar Bulguları

Çalışmamızda 255 kadından kan alınmış ve bunların klinik ve laboratuvar bulguları incelenmiştir. Bütün gruplarda biyokimyasal parametreler açlık glikoz, açlık insülin, HOMA (Homeostasis model assesment), HOMA2 (Homeostasis model assesment 2), LH, estradiol, progesteron, DHEAS (Dihidroepiandrosteron sülfat), total kolesterol, trigliserit ve LDL kolesterol düzeyleri ve diğer parametrelere bakılarak incelenmiştir. İncelenen kişilerin, Kronik az adet olma (<8 döngü/yıl) ve/veya kıllanma; Ultrasonografide inci kolyesi tarzında dizilmiş 10'dan fazla 2,8 mm' lik foliküller, LH/FSH oranının 1,5 veya üzerinde olması, Artmış kan androjen düzeylerine bakılarak doktorlar tarafından; 119 kişiye PKOS tanısı konmuştur (Yukarıda sayılan kriterlerden en az 2'nin mevcut olması, PKOS tanısını koymak için yeterlidir; Rotterdam 2003 Kriterleri).

Kontrol ve PKOS' lu hastalarda saptanan klinik ve laboratuvar bulguları Çizelge 5. 1'de verilmiştir. Buna göre, PKOS'lu hastalarda açlık glikoz, açlık insülin, HOMA, HOMA2, LH, estradiol, progesteron, DHEAS, total kolesterol, trigliserit ve LDL kolesterol düzeyleri daha yüksek, HDL kolesterol düzeyinin ise daha düşük olduğu görülmektedir.

Kontrol grubu en az 1 normal gebelik süreci geçirmiş ve sağlıklı çocuk sahibi olan, adet düzensizliği ve/veya kıllanma şikayeti olmayan sağlıklı kadınlardan oluşturulmuştur. Alınan serum/plazma örneklerinde; rutin biyokimyasal parametreler olan açlık kan şekeri, trigliserit, kolesterol, HDL, LDL konsantrasyonlarının ölçümü, rutin hormonal parametreler olan LH, FSH, TSH, ST3 (serbest T3), ST4 (serbest T4), total testosteron, DHEA-S, insülin, prolaktin, progesteron, estradiol, 17-OH progesteron ölçümü yapılmıştır. HOMA, HOMA2 ve vücut kütle indeksleri hesaplanmıştır.

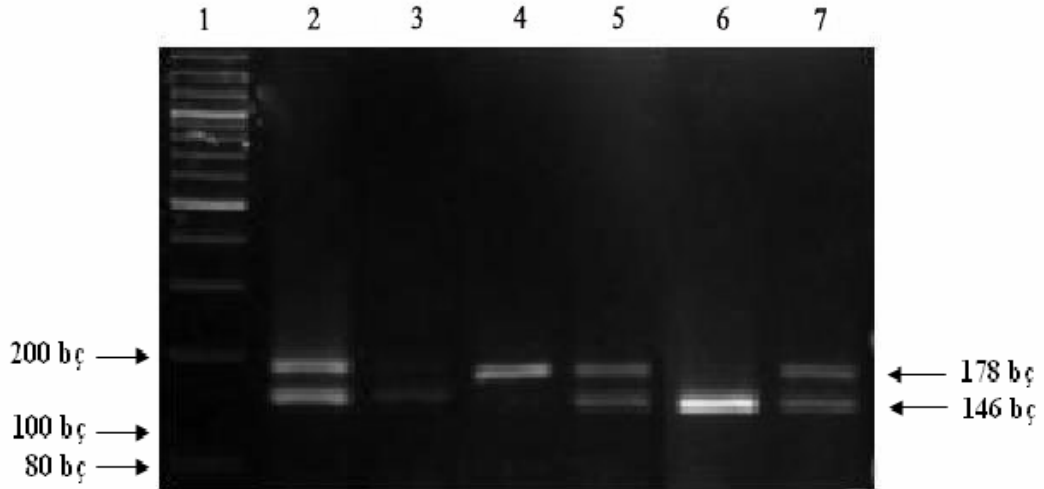
Çizelge 5.1. Kontrol grubu ve polikistik over sendromlu (PKOS) hastaların klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama \pm SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi

	KONTROL (n=136)	PKOS (n=119)	P
Yaş(yıl)	29,47 \pm 9,9	25.19 \pm 7.25	p>0,05
VKI (kg/m ²)	23,39 \pm 2,03	23,75 \pm 2,23	p>0,05
Açlık glikoz (mg/dl)	84.96 \pm 11.17	94.19 \pm 10.27	p<0,05
Açlık insülin (μ U/mL)	10.85 \pm 6.25	15.58 \pm 5.04	p<0,05
HOMA	2,48 \pm 1,57	3,66 \pm 1,14	p<0,05
HOMA2	1,39 \pm 0,79	1,98 \pm 0,62	p<0,05
LH (mIU/mL)	7.05 \pm 3.75	11.19 \pm 4,33	p<0,05
FSH (mIU/mL)	9,23 \pm 6,20	10,86 \pm 6.03	p>0,05
TSH (uIU/mL)	2.55 \pm 1.67	2,29 \pm 1.16	p>0,05
ST ₃ (pg/ml)	3.08 \pm 0.43	3.23 \pm 0,35	p>0,05
ST ₄ (ng/dL)	0.91 \pm 0.28	0,91 \pm 0.21	p>0,05
Estradiol (pg/mL)	109,54 \pm 47,4	114,80 \pm 37,73	p>0,05
Progesteron (ng/mL)	4,64 \pm 2,97	5,24 \pm 3.96	p>0,05
Prolaktin (ng/mL)	13.39 \pm 6.84	13.99 \pm 6.91	p>0,05
Total Testosteron (ng/mL)	0.45 \pm 0.2	0,52 \pm 0.19	p>0,05
Serbest Testosteron (pg/mL)	1.88 \pm 0.71	1,91 \pm 0.71	p>0,05
DHEAS (ug/dL)	162,39 \pm 84,87	205,06 \pm 95,51	p<0,05
Total Kolesterol (mg/dLl)	150.2 \pm 31.6	169.09 \pm 32.23	p<0,05
Trigliserit (mg/dL)	99.46 \pm 30.83	107.13 \pm 58.91	p<0,05
HDL Kolesterol (mg/dL)	58.04 \pm 18.63	49.38 \pm 13.39	p<0,05
LDL Kolestrol (mg/dL)	104.08 \pm 25.5	113.05 \pm 22.01	p<0,05
17-OH Progesteron (ng/ml)	2.56 \pm 1.40	2.36 \pm 1.22	p>0,05

5.1.1. *CAPN 10* SNP 19 bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması

Hastalar ve kontrol gruplarının kanlarından DNA izole edildikten sonra uygun primerlerle polimeraz zincir reaksiyona tabi tutularak *CAPN 10* geni 6. İntron SNP-19 polimorfizmi ihtiva eden bölgesi çoğaltılmıştır. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezde DNA belirteci varlığında yürütülerek. PZR ürününü uzunluğu 178 ve 146 bç olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.1).

32 bç'lik insersiyon/delesyon nedeni ile ortaya çıkan SNP 19 polimorfizmin genotiplendirmesi doğrudan PZR sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yapılmıştır. İnsersiyon taşıyan alel jelde 178 bç, delesyon taşıyan alel ise 146 bç olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.1. *CAPN 10* SNP 19 bölgesi PZR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.1: 100 bç'lik Marker; 2, 3, 5 ve 7: Heterozigot (146/178) genotip; 6: 146/146 homozigot genotip ve 4: 178/178 homozigot genotip.

CAPN 10 SNP 19 bölgesine ait sonuçlar istatistiksel olarak Hardy-Weinberg ve Pearson's çift yönlü Ki-Kare (χ^2) testine göre değerlendirilmiştir. Öncelikle SNP 19 polimorfizmi hasta ve kontrol grubuna ait verilerinin Hardy-Weinberg eşitliğine

uygunluğu araştırıldığında tüm grupların Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, bu genin polimorfik dağılımları bakımından hasta ve kontrol grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bütün PKOS ve kontrollere ait allel dağılımları izelge 5.2’de verilmiştir.

CAPN 10 SNP 19 Genotipi ve Allel Dağılımı

- Kontrol grubundaki kadınların % 36,8’ inin 178/178, % 47,8’ inin 178/146 ve % 15,4’ nn 146/146 genotipinde olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda 178 b alleli görülme sıklığı % 60,7, 146 b alleli görülme sıklığı % 39,3’dr (izelge 5.2).
- PKOS hastaların % 20,2’ sinin 178/178, % 66,4’ ünün 178/146 ve % 13,4’ ünün 146/146 genotipinde olduğu saptanmıştır. PKOS hastalarında 178 b alleli görülme sıklığı % 53,6, 146 b alleli görülme sıklığı % 26,6’dr (izelge 5.2).
- Kontrol ve PKOS gruplarının CAPN 10 SNP 19 genotipi ve allel dağılımları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (izelge 5.2).

Çizelge 5.2. *CAPN* 10 SNP 19 genotipi ve allel dağılımının polikistik over sendromu (PKOS) ile ilişkisi

	KONTROL (n=136)	PKOS (n=119)	RO	%95 GA	χ^2	P
Genotip						
178/178	50 (% 36,8)	24 (% 20,2)	1.0 (ref)			
178/146	65 (% 47,8)	79 (% 66,4)	1,673	0,967- 3,876	1,01	0,234
146/146	21 (% 15,4)	16 (% 13,4)	1,134	1,025- 4,237	0,87	0,673
178/146+146/146	86 (% 63,2)	95 (% 79,8)	0,988	1,245- 2,959	1,65	0,301
Allel						
178	165 (% 60,7)	127 (% 53,6)	1.0 (ref)			
146	107 (% 39,3)	111 (% 26,6)	1,564	1,131- 3,281	0,745	0,572

RO = Risk Oranı ; GA = Güven Aralıkları

Hasta ve Kontrol Grubunda *CAPN* 10 SNP 19 Genotipine Göre Klinik ve Laboratuvar Bulgularının karşılaştırılması

32 bç'lik insersiyon/delesyona sahip PKOS' lu kadınlarda saptanan klinik ve laboratuvar parametrelerinden total kolesterol ve DHEAS' da istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. Fakat diğer klinik ve laboratuvar parametreler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çizelge 5.3'de PKOS grubunda *CAPN 10* SNP 19 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları verilmiştir.

32 bç'lik insersiyon/delesyona sahip sağlıklı kadınlarda saptanan klinik ve laboratuvar parametrelerinden DHEAS' da istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuş, fakat diğer klinik ve laboratuvar parametreler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çizelge 5.4'de kontrol grubunda *CAPN 10* SNP 19 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları verilmiştir.

Çizelge 5.3. PKOS grubunda *CAPN 10* SNP 19 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama \pm SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi

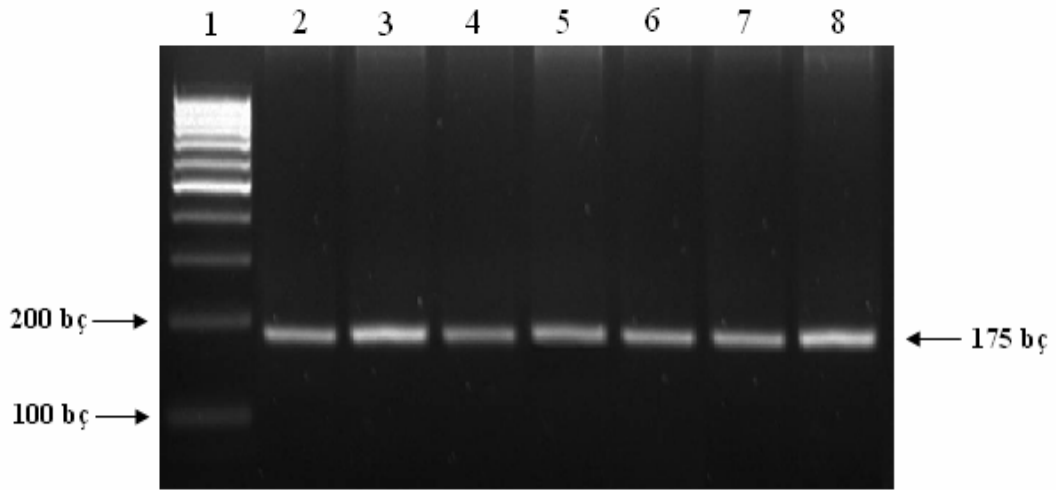
	178/178 (n=24)	178/146 (n=79)	146/146 (n=16)	P
Yaş(yıl)	24,88 \pm 6,97	25,27 \pm 7,44	25,31 \pm 7,13	p>0,05
VKI (kg/m ²)	23,56 \pm 1,65	23,72 \pm 2,32	24,15 \pm 2,58	p>0,05
Açlık glikoz (mg/dl)	88,38 \pm 6,98	94,87 \pm 10,7	99,56 \pm 8,5	p>0,05
Açlık insülin (μ U/mL)	15,88 \pm 5,11	15,37 \pm 4,76	16,18 \pm 6,43	p>0,05
HOMA	3,63 \pm 1,27	3,64 \pm 1,11	3,79 \pm 1,15	p>0,05
HOMA2	1,95 \pm 0,68	1,98 \pm 0,58	2,06 \pm 0,73	p>0,05
LH (mIU/mL)	11,35 \pm 3,97	11,26 \pm 1,04	9,91 \pm 3,93	p>0,05
FSH (mIU/mL)	9,8 \pm 3,72	11,26 \pm 6,89	10,47 \pm 3,93	p>0,05
TSH (μ U/mL)	2,75 \pm 1,27	2,08 \pm 1,04	2,63 \pm 1,41	p>0,05
ST ₃ (pg/ml)	3,25 \pm 0,31	3,24 \pm 0,37	3,19 \pm 0,26	p>0,05
ST ₄ (ng/dL)	0,92 \pm 0,23	0,91 \pm 0,21	0,94 \pm 0,17	p>0,05
Estradiol (pg/mL)	112,59 \pm 41,27	115,61 \pm 38,79	114,11 \pm 27,38	p>0,05
Progesteron (ng/mL)	4,48 \pm 2,99	4,98 \pm 2,86	5,74 \pm 3,35	p>0,05
Prolaktin (ng/mL)	16,74 \pm 10,26	13,12 \pm 5,78	14,14 \pm 5,02	p>0,05
Total Testosteron (ng/mL)	0,55 \pm 0,21	0,51 \pm 0,19	0,51 \pm 0,16	p>0,05
Serbest Testosteron (pg/mL)	1,98 \pm 0,78	1,89 \pm 0,70	1,94 \pm 0,62	p>0,05
DHEAS (μ g/dL)	190,3 \pm 80,84	210,91 \pm 96,17	185,84 \pm 74,91	p<0,05
Total Kolesterol (mg/dL)	172,58 \pm 37,52	164,38 \pm 28,74	187,12 \pm 74,91	p<0,05
Trigliserit (mg/dL)	103,12 \pm 30,8	101,66 \pm 47,42	140,12 \pm 113,17	p>0,05
HDL Kolesterol (mg/dL)	53,25 \pm 13,82	49,06 \pm 13,05	45,12 \pm 13,73	p>0,05
LDL Kolestrol (mg/dL)	116 \pm 22,33	110,24 \pm 20,95	122,5 \pm 24,78	p>0,05
17-OH Progesteron	2,13 \pm 0,97	2,33 \pm 1,24	2,85 \pm 1,37	p>0,05

Çizelge 5.4. Kontrol grubunda *CAPN* 10 SNP 19 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama± SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi

	178/178 (n=50)	178/146 (n=65)	146/146 (n=21)	P
Yaş(yıl)	29,5±9,53	28,85±10,1	31,33±10,42	p>0,05
VKI (kg/m ³)	23,29±1,94	23,32±2,08	23,81±2,12	p>0,05
Açlık glikoz (mg/dl)	83,60±11,10	85,31±10,42	85,67±10,83	p>0,05
Açlık insülin (µU/mL)	9,70±4,66	10,20±7,05	13,09±6,51	p>0,05
HOMA	2,17±1,15	2,54±1,75	3,04±1,71	p>0,05
HOMA2	1,24±0,59	1,42±0,89	1,68±0,85	p>0,05
LH (mIU/mL)	7,57±4,47	6,61±3,28	7,09±3,18	p>0,05
FSH (mIU/mL)	8,86±5,54	9,29±6,36	10,18±7,19	p>0,05
TSH (uIU/mL)	2,36±1,76	2,48±1,10	3,23±2,61	p>0,05
ST ₃ (pg/ml)	3,02±0,46	3,10±0,42	3,16±0,40	p>0,05
ST ₄ (ng/dL)	0,92±0,33	0,88±0,22	0,95±0,32	p>0,05
Estradiol (pg/mL)	109,76±48,13	108,59±47,39	111,86±47,93	p>0,05
Progesteron (ng/mL)	4,68±3,02	4,78±3,04	4,08±2,58	p>0,05
Prolaktin (ng/mL)	12,20±5,24	14,55±7,90	11,24±6,03	p>0,05
Total Testosteron (ng/mL)	0,46±0,19	0,44±0,20	0,45±0,19	p>0,05
Serbest Testosteron (pg/mL)	2,01±0,63	1,79±0,74	1,82±0,77	p>0,05
DHEAS (ug/dL)	148,59±93,26	179,32±81,25	143,79±64,93	p<0,05
Total Kolesterol (mg/dL)	150,48±31,58	147,88±32,19	156,71±30,32	p>0,05
Trigliserit (mg/dL)	98,88±31,28	99,25±29,58	101,48±34,86	p>0,05
HDL Kolesterol (mg/dL)	60,38±18,17	57,49±19,86	54,14±15,54	p>0,05
LDL Kolestrol (mg/dL)	105,12±26,43	101,29±25,06	110,24±52	p>0,05
17-OH Progesteron	2,34±1,45	2,59±1,38	2,97±1,31	p>0,05

5.1.2. *CAPN 10* SNP 43 bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (RFLP)

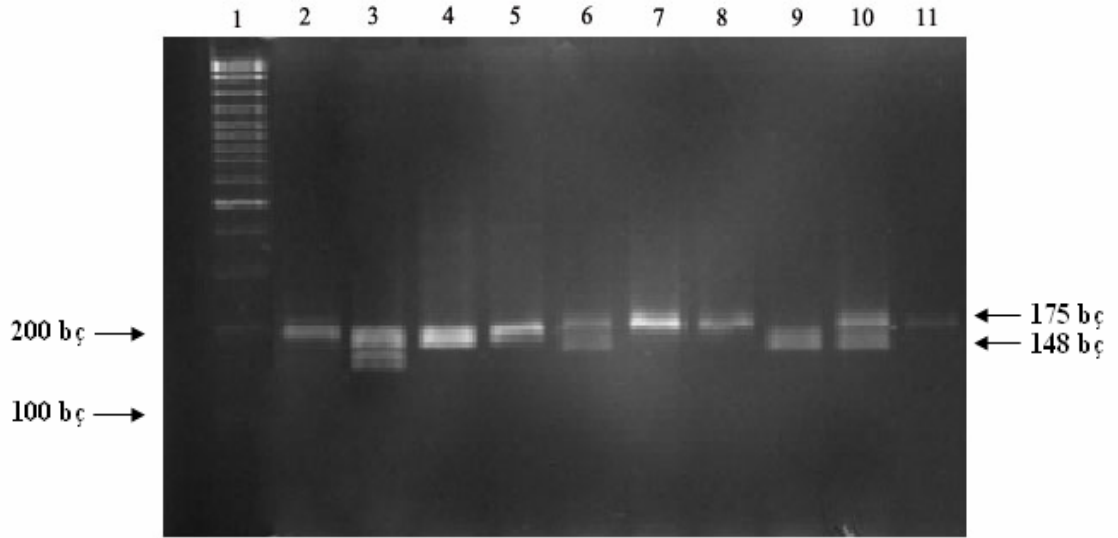
Hastalar ve kontrol gruplarının kanlarından DNA izole edildikten sonra uygun primerlerle polimeraz zincir reaksiyona tabi tutularak *CAPN 10* geni 3. intron SNP 43 polimorfizmi ihtiva eden bölgesi çoğaltılmıştır. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezde DNA belirteci varlığında yürütülerek PZR ürününü uzunluğu 175 bç olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. *CAPN 10* SNP 43 bölgesinin PZR sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1: 100 bç'lik Marker; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 no'lu kuyular: PZR ürünleri

43 nolu SNP'i belirlemek için 175 bç'lik hastalara ve sağlıklı kontrollere ait PZR ürünleri *NdeI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede *NdeI* için tek kesim noktası bulunmaktadır. Bu noktada guanin (G) içeren alel *NdeI* enzimi için kesim noktası içermez. Adenin (A) içeren alel ise, ilgili enzim için kesim noktası taşımaktadır. PZR ürünleri *NdeI* enzimi ile kesim yapılarak % 3' lük agaroz jel elektroforezde yürütülmüştür (Şekil 5.3). Kesim sonucu bazı örneklerde 175 bç'lik fragment büyüklüğü tespit edilirken (GG allaline sahip bireyler) bazı örneklerde 175, 148 ve 27 bç'lik üç bant gözlenmiştir (AA allaline sahip bireyler). Homozigot GG

genotipli bireylerde 175 bç'lik tek bant, GA genotipli heterozigot bireylerde 175, 148 ve 27 bç'lik üç bant, AA genotipli homozigot bireylerde 148 ve 27 bç'lik iki bant oluşmuştur. 27 bç'lik bant agaroz jelde görüntülenemediği için değerlendirme 175 ve 148 bç'lik bantların varlığına göre yapılmıştır (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. *NdeI* enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. 1: 100 bç'lik Marker, 2: Kesim yapılmamış PZR ürünü; 3, 6 ve 10: GA genotipli heterozigot bireyler; 4, 5, 7, 8,11: GG genotipli homozigot bireyler; 9: AA genotipli homozigot birey

CAPN 10 SNP 43 gen bölgesine ait sonuçlar istatistiksel olarak Hardy-Weinberg ve Pearson's çift yönlü Ki-Kare (χ^2) testine göre değerlendirilmiştir. Öncelikle *CAPN* 10 SNP 43 (G/A) değişiminin, hasta ve kontrol grubuna ait verileri Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu araştırıldığında tüm grupların Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, bu genin polimorfik dağılımları hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmuştur. Bütün PKOS ve kontrollere ait allel dağılımları çizelge 5.5'de verilmiştir

CAPN 10 SNP 43 Genotipi ve Allel Dağılımı

- Kontrol grubundaki kadınların % 63,2' sinin GG, % 32,4' ünün GA ve % 4,4' nün AA genotipinde olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda G alleli görülme sıklığı % 79,4, A alleli görülme sıklığı % 20,4'dür (Çizelge 5.5).
- PKOS hastaların % 33,6' sının GG, % 47,1' inin GA ve % 19,3' ünün AA genotipinde olduğu saptanmıştır. PKOS hastalarında G alleli görülme sıklığı % 57,2 , A alleli görülme sıklığı % 42,9'dur (Çizelge 5.5).
- Kontrol ve PKOS gruplarının CAPN 10 SNP 43 genotipi ve allel dağılımları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Çizelge 5.5).
- PKOS hasta grubuna ait dağılımlar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm genotip ve alleller istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$) (Çizelge 5.5).

Çizelge 5.5. CAPN 10 SNP 43 genotipi ve allel dağılımının polikistik over sendromu (PKOS) ile ilişkisi

	KONTROL (n=136)	PKOS (n=119)	RO	%95 GA	χ^2	P
Genotip(%)						
GG	86 (% 63,2)	40 (% 33,6)	1.0(ref)			
GA	44 (% 32,4)	56 (% 47,1)	0,567	0,291- 1,34	3,13	0,032
AA	6 (% 4,4)	23 (% 19,3)	0,462	0,121- 1,23	1,01	0,059
GA+AA	50 (% 36,8)	79 (% 66,4)	0,613	0,311- 1,07	2,13	0,045
Allel (%)						
G	216 (% 79,4)	136 (% 57,2)	1.0 (ref)			
A	56 (% 20,4)	102 (% 42,9)	0,652	0,398- 1,12	2,21	0,039

RO = Risk Oranı ; GA = Güven Aralıkları

Hasta ve Kontrol Grubunda CAPN 10 SNP 43 Genotipine Göre Klinik ve Laboratuvar Bulgularının karşılaştırılması

CAPN 10 SNP 43 (GG), (GA) ve (AA) genotipine sahip PKOS' lu kadınlarda saptadığımız klinik ve laboratuvar parametrelerinden açlık insülin, HOMA, HOMA2, total kolesterol ve trigliseritde istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. Diğer klinik ve laboratuvar parametreler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çizelge 5.6'da PKOS grubunda CAPN 10 SNP 43 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları verilmiştir.

CAPN 10 SNP 43 (GG), (GA) ve (AA) genotipine sahip sağlıklı kadınlarda saptadığımız klinik ve laboratuvar parametrelerinden arasındaki istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çizelge 5.7'de kontrol grubunda CAPN 10 SNP 43 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları verilmiştir.

Ayrıca çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri çizelge 5.8' de verilmiştir.

Çizelge 5.6. PKOS grubunda *CAPN 10* SNP 43 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama± SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi

	GG (n=40)	GA (n=56)	AA (n=23)	P
Yaş(yıl)	25,28±8,76	26,07±6,53	22,91±5,66	p>0,05
VKI (kg/m ²)	23,88±2,12	23,78±2,18	23,41±2,57	p>0,05
Açlık glikoz (mg/dl)	90,98±12,02	96,73±8,65	93,61±9,32	p>0,05
Açlık insülin (µU/mL)	9,42±3,46	10,37±5,12	18,7±6,74	p<0,05
HOMA	2,90±0,77	3,36±1,19	3,55±1,37	p<0,05
HOMA2	1,56±0,45	1,9±0,62	2,23±0,79	p<0,05
LH (mIU/mL)	11,77±5,03	11,04±4,03	10,75±3,64	p>0,05
FSH (mIU/mL)	11,37±8,87	10,94±4,17	9,8±3,24	p>0,05
TSH (uIU/mL)	2,2±1	2,57±1,23	1,78±0,92	p>0,05
ST ₃ (pg/ml)	3,29±0,41	3,24±0,29	3,14±0,35	p>0,05
ST ₄ (ng/dL)	0,87±0,2	0,97±0,23	0,89±0,14	p>0,05
Estradiol (pg/mL)	118,27±43,7	114,82±36,96	108,71±27,8	p>0,05
Progesteron (ng/mL)	4,39±2,53	5,51±3,54	4,74±1,61	p>0,05
Prolaktin (ng/mL)	13,36±7,46	14,63±6,37	13,52±7,37	p>0,05
Total Testosteron (ng/mL)	0,5±0,2	0,51±0,15	0,58±0,25	p>0,05
Serbest Testosteron (pg/mL)	1,84±0,68	1,9±0,63	2,08±0,9	p>0,05
DHEAS (ug/dL)	214,58±87,16	192,31±93,17	210,87±91,09	p>0,05
Total Kolesterol (mg/dL)	155,85±33,48	160,29±33,35	177,74±25,98	p<0,05
Trigliserit (mg/dL)	90,95±51,22	117,34±66,96	96,48±47,43	p<0,05
HDL Kolesterol (mg/dL)	48,78±13,4	49,02±12,81	51,3±15,13	p>0,05
LDL Kolestrol (mg/dL)	104,35±23,96	117,93±20,5	116,3±17,89	p>0,05
17-OH Progesteron	2,24±1,16	2,54±1,26	2,13±1,2	p>0,05

Çizelge 5.7. Kontrol grubunda *CAPN* 10 SNP 43 geninin genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları (ortalama± SS) Nonparametric Mann-Whitney U Testi

	GG (n=86)	GA(n=44)	AA(n=6)	P
Yaş(yıl)	29,79±10,18	29,30±9,73	26,17±7,57	p>0,05
VKI (kg/m²)	23,42±1,89	23,47±2,36	22,2±1,07	p>0,05
Açlık glikoz (mg/dl)	85,73±10,69	83,27±10,53	81,17±11,92	p>0,05
Açlık insülin (µU/mL)	11,49±6,13	10,11±6,62	6,96±2,54	p>0,05
HOMA	2,67±1,62	2,21±1,48	1,98±0,84	p>0,05
HOMA2	1,48±0,79	1,29±0,82	1,39±0,38	p>0,05
LH (mIU/mL)	7,02±3,77	7,01±3,82	7,56±3,43	p>0,05
FSH (mIU/mL)	9,36±5,95	9,37±6,98	9,09±2,06	p>0,05
TSH (uIU/mL)	2,48±1,64	2,58±1,39	3,16±3,39	p>0,05
ST₃ (pg/ml)	3,04±0,44	3,16±0,4	3,07±0,45	p>0,05
ST₄ (ng/dL)	0,89±0,31	0,93±0,17	0,92±0,46	p>0,05
Estradiol (pg/mL)	106,48±46,71	118,99±50,19	100,08±13,76	p>0,05
Progesteron (ng/mL)	4,53±2,8	4,98±3,24	3,65±1,98	p>0,05
Prolaktin (ng/mL)	12,34±6,23	14,9±7,78	12,45±6,57	p>0,05
Total Testosteron (ng/mL)	0,45±0,2	0,44±0,19	0,47±0,22	p>0,05
Serbest Testosteron (pg/mL)	1,9±0,7	1,78±0,72	2,01±0,8	p>0,05
DHEAS (ug/dL)	162,8±91,69	165,09±75,62	159,67±20,54	p>0,05
Total Kolesterol (mg/dL)	152,78±33,57	147,14±28,4	135,67±20,54	p>0,05
Trigliserit (mg/dL)	102,37±30,11	94,98±31,95	90,5±32,61	p>0,05
HDL Kolesterol (mg/dL)	60,12±17,21	53,93±21,38	58,33±13,56	p>0,05
LDL Kolestrol (mg/dL)	106,45±26,37	99,86±24,33	101±19,73	p>0,05
17-OH Progesteron	2,52±1,42	2,61±1,39	2,64±1,55	p>0,05

Çizelge 5.8. Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Sağlıklı	CAPN 10-19	CAPN 10-43
1	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
2	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
3	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
4	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
5	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
6	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
7	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
8	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
9	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
10	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
11	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
12	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
13	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
14	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
15	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
16	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
17	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
18	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
19	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
20	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
21	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
22	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
23	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
24	PKOS	Homozigot Normal	Heterozigot
25	PKOS	Homozigot Normal	Heterozigot
26	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
27	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
28	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot

Çizelge 5.8.(Devam) Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Sağlıklı	CAPN 10-19	CAPN 10-43
29	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
30	PKOS	Homozigot Normal	Heterozigot
31	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
32	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
33	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
34	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
35	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
36	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
37	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
38	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
39	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
40	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
41	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
42	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
43	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
44	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
45	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
46	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
47	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
48	PKOS	Homozigot Normal	Heterozigot
49	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
50	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
51	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
52	PKOS	Homozigot Normal	Heterozigot
53	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
54	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
55	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
56	PKOS	Homozigot Normal	Heterozigot

Çizelge 5.8.(Devam) Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Sağlıklı	CAPN 10-19	CAPN 10-43
57	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
58	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
59	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
60	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
61	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
62	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
63	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
64	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
65	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
66	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
67	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
68	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
69	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
70	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
71	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
72	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
73	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
74	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
75	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
76	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
77	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
78	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Mutant
79	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
80	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
81	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Mutant
82	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Mutant
83	PKOS	Homozigot Mutant	Homozigot Mutant
84	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal

Çizelge 5.8. (Devam) Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Sağlıklı	CAPN 10-19	CAPN 10-43
85	PKOS	Homozigot Normal	Heterozigot
86	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
87	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
88	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
89	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
90	PKOS	Homozigot Mutant	Homozigot Mutant
91	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
92	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
93	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
94	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
95	PKOS	Homozigot Mutant	Heterozigot
96	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
97	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
98	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
99	PKOS	Homozigot Mutant	Homozigot Mutant
100	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
101	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
102	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
103	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
104	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
105	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
106	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
107	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
108	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
109	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal
110	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
111	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
112	PKOS	Homozigot Normal	Homozigot Normal

Çizelge 5.8.(Devam) Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Kontrol	CAPN 10-19	CAPN 10-43
113	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
114	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
115	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
116	PKOS	Heterozigot	Heterozigot
117	PKOS	Heterozigot	Homozigot Normal
118	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
119	PKOS	Heterozigot	Homozigot Mutant
120	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
121	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
122	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
123	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
124	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
125	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
126	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Mutant
127	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
128	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
129	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
130	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
131	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
132	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
133	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Mutant
134	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
135	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
136	Kontrol	Homozigot Mutant	Heterozigot
137	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
138	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
139	Kontrol	Homozigot Mutant	Heterozigot
140	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Mutant

Çizelge 5.8.(Devam) Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Kontrol	CAPN 10-19	CAPN 10-43
141	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
142	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
143	Kontrol	Homozigot Mutant	Heterozigot
144	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
145	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
146	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
147	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
148	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
149	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
150	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
151	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
152	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
153	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
154	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
155	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
156	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
157	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
158	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
159	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
160	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
161	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
162	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
163	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
164	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
165	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
166	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
167	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
168	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal

Çizelge 5.8. (Devam) Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Kontrol	CAPN 10-19	CAPN 10-43
169	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
170	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
171	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
172	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
173	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
174	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
175	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
176	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
177	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
178	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
179	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
180	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
181	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
182	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
183	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
184	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
185	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
186	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
187	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
188	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
189	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
190	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
191	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
192	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
193	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
194	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
195	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Mutant
196	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot

Çizelge 5.8. (Devam) Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Kontrol	CAPN 10-19	CAPN 10-43
197	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
198	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
199	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
200	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
201	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
202	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
203	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
204	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
205	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
206	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
207	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
208	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
209	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
210	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
211	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
212	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
213	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
214	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
215	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
216	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
217	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
218	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
219	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
220	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
221	Kontrol	Homozigot Normal	Heterozigot
222	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
223	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
224	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot

Çizelge 5.8.(Devam) Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Kontrol	CAPN 10-19	CAPN 10-43
225	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
226	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
227	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
228	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
229	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Normal
230	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
231	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
232	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
233	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
234	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
235	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
236	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
237	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
238	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
239	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
240	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
241	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
242	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
243	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
244	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
245	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
246	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Mutant
247	Kontrol	Heterozigot	Homozigot Normal
248	Kontrol	Homozigot Mutant	Homozigot Mutant
249	Kontrol	Heterozigot	Heterozigot
250	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
251	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
252	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal

Çizelge 5.8. (Devam) Çalışma kapsamında incelenen PKOS ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu No	PKOS/Kontrol	CAPN 10-19	CAPN 10-43
253	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
254	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal
255	Kontrol	Homozigot Normal	Homozigot Normal

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

PKOS, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen ve bireysel farklılıklardan dolayı heterojen görünüm sergileyen, kompleks bir sendromdur [8,9]. Sendromun ilk belirtileri ergenlik döneminde ortaya çıkmaktadır. Ergen kızlarda, kıllanma artışı, akne, adet düzensizliği ve obezite bulguları bulunmaktadır. PKOS, erişkin bireylerde ise, T2DM, hipertansiyon, kalp damar hastalıkları ve endokrin kökenli kısırlığın en sık nedeni olarak gösterilmektedir [18].

PKOS, genetik faktörlerin etkisiyle ortaya çıktığı için, sendromun temelinde rol oynayan (steroid hormon sentezi ve faaliyetinde yer alan, karbonhidrat metabolizması ve enerji homeostasisinde yer alan, gonadotropin faaliyetinde ve düzenlenmesinde yer alan ve insülin metabolizmasında yer alan) genlerdeki polimorfizmler, genetik temelin aydınlatılmasında önemli yer tutmaktadır [71].

PKOS'ta *CAPN 10* geni arasındaki bağlantıya dair ilk deliller İngiltere'de yapılan çalışmalarda ileri sürülmüştür. Bu çalışmalarda -44 aleli ile PKOS yatkınlığı arasında belirgin bir bağlantı olduğu önerilmiştir. Ancak, sonradan yapılan daha geniş kapsamlı çalışmalarda bu öneri doğrulanmamıştır [123]. Bir çalışmada, -43 ve 11 bç uzaklıktaki -44 polimorfizminin transkripsiyonel düzenlemede 'güçlendirici' benzeri element görevi üstlendikleri önerilmektedir [143, 148].

Avrupa kökenli hasta ve kontrol grubundan oluşan bir çalışmada, *CAPN 10* genine ait polimorfizmler ve PKOS ilişkisi araştırılmıştır. *CAPN 10* geni ile PKOS arasında herhangi bir bağlantı kurulamadığı gösterilmiştir [105]. Bu gen ile T2DM arasındaki ilişkiden yola çıkılarak yapılan çalışmalardan -44, -43, -19, -63 polimorfizmlerinin T2DM'a yatkınlık sağladığı bilinmektedir. PKOS ve tip 2 diabet arasındaki fizyolojik ve epidemiyolojik benzerlikler, her iki hastalığın aynı oluşma nedenini paylaştığını önermektedir. Bazı araştırmalar bu ortak mekanizmaların bir bölümünün kalıtsal olduğunu göstermektedir [117, 149, 150, 151]. *CAPN 10* geni düzenlenmesinin veya değişmiş işlevinin T2DM oluşturma mekanizması açık değildir. Ancak, bu proteazın normal insülin salınımında rolü olduğu yönünde

öneriler vardır. Eğer bu öneriler doğrulanırsa, sonuç, bozulmuş *CAPN 10* işlevinin PKOS'a kıyasla T2DM'a yakınlıkta daha etkin olduğu sonucu ile uyumlu olacaktır [105]. Bu farklılık, her iki hastalık için gen faaliyetinin henüz açıklanamamış farklı mekanizmalarla düzenlenmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Aynı araştırmada, *CAPN 10* genindeki polimorfizmlerin T2DM'a yakınlık bakımından Avrupalılarda, Meksika kökenli Amerikalılara kıyasla daha az etkili olduğu bildirilmiştir [105]. Bunun nedenleri arasında, risk ilişkili haplotiplerin sıklığında etnik temele bağlı farklılıklar ve diğer lokuslarda değiştirici edici genlerin varlığı tartışılabilir.

Farklı etnik kökenden gelen Amerikalılar üzerinde yapılan bir çalışmada, *CAPN 10* geni, -43, -19, -63 polimorfizmlerinin PKOS ile ilişkili olarak hormonal ve metabolik ölçümleri etkilemediği ileri sürülmüştür. Ancak, 112 /121 haplotip kombinasyonunun diğer haplotip kombinasyonları ile karşılaştırıldığında Afrika kökenli Amerikalı ve Beyazlarda PKOS'a yakınlıkta iki kat daha fazla ilişkili olduğu bildirilmiştir [122].

CAPN 10 geni SNP 43 polimorfizmi Pima yerlilerinde tip 2 diabet ile olan bağlantı yönünden çalışılmış, ancak bir ilişki gösterilememiştir. Ancak, -43'teki G aleli için homozigot olan normal glikoz toleransına sahip hastaların, A alelini taşıyan hastalara kıyasla, iskelet kaslarında daha düşük mRNA ifadenmesine ve daha fazla insülin direncine sahip oldukları bulunmuştur [123, 152, 153]. Bu sonuç, G alelinin tip 2 diabet gelişiminde rolü olduğu fikrini tartışmalı hale getirmektedir. Bu tez çalışmasında ise, yabancı alel olan G aleli sıklığının, hasta grubunda % 82,3 olduğu ve kontrol grubu ile paralellik gösterdiği bulunmuştur.

Alman PKOS'lu hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, AA genotipi taşıyan kadınlarda GG genotipi taşıyan kadınlara kıyasla, -56 polimorfizmi ile PKOS'a yakınlık arasında bağlantı bulunmuştur. Aynı çalışmada, -19 ile de ilişki gösterilmiştir [154]. Bu iki polimorfizm ile PKOS arasındaki ilişkinin temelinde transkripsiyonel süreçte oluşan modifikasyonlar önerilmektedir. – 56, transkripsiyon

esnasında, bağlayıcı veya etkileşim halindeki birimlerde değişime neden olmazken, -19'da 32 bç'lik tekrar dizileri Pdx 1 (pankreatik ve intestinal homeodomain) transkripsiyon faktörünün (TF) olası bağlanma birimlerini içerir. -19'da, 32 bç'lik delesyon durumunda bu TF'nün iki olası bağlayıcı birimi varken, insersiyon durumunda üç bağlayıcı birim vardır. Pdx 1'in fare pankreası β hücrelerinin olgunlaşmasında rolü olduğu düşünülmektedir. PKOS ile diabetes arasındaki ilişki ve insülin duyarlılaştırıcı ilaçların olumlu etkisi göz önüne alındığında, -19 polimorfizminin pdx 1 TF aracılığıyla PKOS üzerinde risk yarattığı önerilmektedir [154].

Şili'li kadınlarda yapılan bir çalışmada *CAPN 10* SNP 19'da ki-kare analizine göre PKOS ve kontroller arasında genotip sıklıklarında anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir ($p > 0,05$). Delesyon(146 bç) allel sıklığı PKOS'da % 39, kontrolde % 41($p= 0,894$), delesyon alleli taşıyan PKOS arasında risk oranı (RO) 0,93 (% 95 GA: 0,55- 1,57) olarak bulunmuştur [162]. Bizim çalışmamız da ise SNP 19'da bu çalışmayla paralel olarak ki-kare analizine göre PKOS ve kontroller arasında genotip sıklıklarında anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir ($p > 0,05$). Delesyon (146 bç) allel sıklığı PKOS'da % 26,6, kontrolde % 39,3 ($p= 0,572$), delesyon alleli taşıyan PKOS arasında risk oranı (RO) 1,564 (% 95 GA: 1,131- 3,281) olarak bulunmuştur (Çizelge 5.2).

CAPN 10 SNP 43 'de ki-kare analizine göre PKOS hastalar ve kontrol bireyleri arasında genotip sıklıklarında anlamlı fark gösterilmiştir ($p= 0,036$). Mutant A alleli sıklığı PKOS'da % 40 kontrolde % 26 ($p = 0,027$), A alleli taşıyan PKOS hastaları arasında risk oranı (RO) 1,93 (% 95 GA: 1,11- 3,34) olarak bulunmuştur [162]. Bizim çalışmamız da ise SNP 43 'de bu çalışmayla paralel olarak ki-kare analizine göre PKOS hastalar ve kontrol bireyleri arasında genotip sıklıklarında anlamlı olarak fark gösterilmiştir ($p= 0,045$). Mutant A allel sıklığı çalışmamızda % 42,9, kontrolde % 20,4, A alleli taşıyanlarda PKOS hastalar arasında risk oranı (RO) 0,652 (% 95 GA : 0,398- 1,12) olarak bulunmuştur (Çizelge 5.5).

Yine aynı çalışmada PKOS ve kontroller arasında klinik ve laboratuvar değerleri karşılaştırılmış; VKİ, total kolesterol, trigliserit, LDL kolesterol, açlık kan şekeri, total testosteron ve ürik asit konsantrasyonu PKOS'da daha yüksek ($p < 0,05$), PKOS'da HDL kolesterolün daha düşük ($p < 0,001$) olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda PKOS ve kontrol arasında klinik ve laboratuvar değerleri karşılaştırıldığında açlık glikoz, açlık insülin, HOMA, HOMA2, LH, DHEAS, total kolesterol, trigliserit, LDL kolesterol PKOS'da daha yüksek, PKOS'da HDL kolesterolün daha düşük olduğu gösterilmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 5. 1).

Çalışmamızda ayrıca genotip dağılımlarına göre klinik ve laboratuvar bulguları değerlendirilmiştir. *CAPN 10 SNP 19*'da PKOS hastalarda DHEAS ve Total Kolesterolde anlamlı olarak farklılık gösterilmiştir ($p < 0,05$). Bu farklılık DHEAS'da insersiyon/delesyon (178/146), total kolesterol delesyonda (146/146) daha yüksektir (Çizelge 5.3). Kontrol değerlerinde sadece DHEAS'da insersiyon/delesyon (178/146)'da farklılık olduğu gözlenmiştir (Çizelge 5.4).

CAPN 10 SNP 43'de PKOS hastalarda açlık insülin, HOMA, HOMA2 ve total kolesterolde AA genotipinde, trigliserit GA genotipinde anlamlı olarak daha yüksektir ($p < 0,05$) (Çizelge 5.6). Kontrol değerlerinde herhangi bir değerde farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Çizelge 5.7).

KAYNAKLAR

1. Asuncion M, Calvo R.M, San Millan JL, Sancho J, Avilla S, Escobar-Morreale HF. "A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain", *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 2434-2438 (2000).
2. Knochenhauer E.S, Key T.I, Kasher-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. "Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the Southeastern United States: a prospective study", *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 3078- 3082 (1998).
3. Carey A.H, Chan K.L, Short F. "Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male patterns baldness", *Clin Endocrinol*, 38: 653- 658, (1993).
4. Stein I.F, Leventhal M.L. "Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries", *Am J Obstet Gynecol*, 29: 181- 186, (1935).
5. Dunaif A. "Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis", *Endocr Rev*, 18: 774- 800 (1997).
6. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. "Obesity and the polycystic ovary syndrome", *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26: 883-96.(2002).
7. Franks S. "Polycystic over syndrome", *N Engl J Med*, 333: 853- 61 (1995).
8. Haap M, Machicao F, Stefan N, Thamer C, Tschritter O, Schnuck F, Wallwiener D, Stumvoll M, Haring HU, Fritsche A. "Genetic determinants of insulin action in polycystic ovary syndrome", *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 113(5):275-81(2005).
9. Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, Azziz R, Ehrmann DA, Norman RJ et al. "Thirty seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin", *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 558- 565 (1999).
10. Franks S, Gharani N, McCarthy M. "Candidate genes in polycystic ovary syndrome", *Hum Reprod Update*, 7: 405- 410, (2001).
11. Wiltgen D, Furtado L, Kohek MB, Spritzer PM. "CAPN10 UCSNP- 43, UCSNP- 19 and UCSNP- 63 polymorphisms and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome", *Gynecol Endocrinol*, 23 (3): 173- 8 (2007).

12. Permutt M.A, Bernal-Mizrachi E, Inoue H. "Calpain 10: the first positional cloning of a gene for type 2 diabetes? ", *J Clin Invest*, 106 (7): 819- 21 (2000).
13. Pang S. "Hirsutism, polycystic ovary syndrome and menstrual disorders", *Pediatric Endocrinology, Lifshitz F, (ed) 4th ed*, New York, Marcel Dekker, 277- 309 (2003).
14. Ojaniemi M, Pugeat M. "An adolescent with polycystic ovary syndrome", *Eur J Endocrinol*, 155 11: 149- 52 (2005).
15. Witchel S.F. "Puberty and polycystic ovary syndrome", *Mol Cell Endocrinol*, 25; 254- 255: 146- 53 (2006).
16. Pabuçcu R. "Polikistik Ovaryan Sendrom", Ankara (2001).
17. Hashemipour M, Faghihimani S, Zolfaghary B, Hovsepian S, Ahmadi F, Haghghi S. "Prevalance of polycystic ovary syndrome in girls aged 14- 18 years in Isfahan, Iran", *Horm Res*, 62: 278- 282(2004).
18. Solomon C.G. "The epidemiology of PCOS. Prevalance and associated disease risks", *Endocrinol Metab North Am*, 28: 247- 263(1999).
19. Baumann E.E, Rosenfield RL. "Polycystic ovary syndrome in adolescence", *The Endocrinologis*,12: 333- 348 (2002).
20. Hamburg R. "Management of polycystic ovary syndrome in adolescence", *Reviews in Gynecological Practice*,4: 148- 155 (2004).
21. Koivunen R, "Endocrine and metabolic changes in women with polycystic ovaries", *University of Oulu, Finland*, (2001).
22. Slowey M.J. "Polycystic ovary syndrome: new perspective on an old problem", *South Med J*, 94: 190- 6 (2001).
23. Kidson W. "Polycystic ovary syndrome: a new direction in treatment", *Med J* ,169:537- 40 (1998).
24. Franks S. "Polycystic ovary syndrome: a changing perspective", *Clin Endocrinol*, 31: 87- 120 (1989).
25. Hull M.G. "Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: Endocrinological and demographic studies", *Gynecol Endocrinol*, 1: 235- 45 (1987).
26. Jacobs H.S. "Polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome", *Gynecol Endocrinol*, 1: 113- 31 (1987).

27. Polson D.W, Wadsworth J, Adams J, Franks S. ‘‘Polycystic ovaries: a common finding in normal women’’, *Lancet*,1: 870- 2 (1988).
28. Goodarzi M.O, Azziz R. ‘‘Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome’’, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20 (2): 193- 205 (2006).
29. Adams J, Polson D.W & Franks S. ‘‘Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism’’, *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, 293:355- 359 (1986).
30. Franks S. ‘‘Polycystic ovary syndrome: a changing perspective’’, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 31: 87–120 (1989).
31. Zawadzki J.K, Dunaif A. ‘‘Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach.’’, *Blackwell Scientific Publications*, 377–384 (1992).
32. Norman R.J, Hickey T, Moran L, Boyle J, Wang J, Davies M. ‘‘Polycystic ovary syndrome—diagnosis and etiology’’, *International Congress Series*, 1266: 225–232 (2004).
33. Chang W.Y, Knochelhauer E.S, Bartolucci A.A, Azziz R. ‘‘Phenotypic spectrum of the polycystic ovary syndrome (PCOS): Clinical and biochemical characterization of the major clinical subgroups’’, *Fertil. Steril*, 83: 1717–1723 (2005).
34. Azziz R, Woods K.S, Reyna R, Key T.J, Knochelhauer E.S, Yildiz B.O. ‘‘The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population.’’ *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 89: 2745–2749 (2004).
35. Diamanti-Kandarakis E, Kouli C.R, Bergiele A.T, Filandra F.A, Tsianateli T.C, Spina G.G, Zapanti E.D, Bartzis M.I. ‘‘A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile’’, *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 84: 4006–4011 (1999).
36. Asuncion M, Calvo R.M, San Millan J.L, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale H.F. ‘‘A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain’’, *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 85:2434–2438 (2000).
37. DeUgarte C.M, Bartolucci A.A, Azziz R. ‘‘Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment’’,*Fertil. Steril*, 83: 1454–1460 (2005).

38. Legro R.S, Finegood D, Dunaif A. ‘A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome’, *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 83: 2694–2698 (1998).
39. Legro R.S, Kunselman A.R, Dodson W.C, Dunaif A. ‘Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women.’ *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 84: 165–169 (1999).
40. Ehrmann D.A, Kasza K, Azziz R, Legro R.S, Ghazzi M.N; ‘PCOS/Troglitazone Study Group. Effects of race and family history of type 2 diabetes on metabolic status of women with polycystic ovary syndrome’, *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 90: 66–71 (2005).
41. ‘The Rotterdam ESHRE/ASRM – Sponsored PCOS consensus work shop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome’, *Fertil. Steril*, 81: 19–25 (2004).
42. ‘The Rotterdam ESHRE/ASRM – Sponsored PCOS consensus work shop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)’, *Hum. Reprod*, 19: 41–47 (2004).
43. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF; ‘Androgen Excess Society. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline’, *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 91: 4237–4245 (2006).
44. Legro R.S, Chiu P, Kunselman A.R, et al. ‘Polycystic ovaries are common in women with hyperandrogenic chronic anovulation but do not predict metabolic or reproductive phenotype’, *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 90: 2571–2579 (2005).
45. Goldzieher J.W, Green J.A. ‘The polycystic ovary I. Clinical and histological features’, *J Clin. Endocrinol Metab*, 22: 325- 338 (1961).
46. Azziz R. ‘The evaluation and management of hirsutism’, *Obstet Gynecol*, 101: 1995- 1007- 10 (2003).
47. Azziz R, Sanchez L.A, Knochenhouer E.S et al. ‘Androgen excess in women: Experience with over 1000 consecutive patients’, *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 453- 62 (2004).
48. Hatch R, Rosenfield R.L, Kim M.H, Tredway D. ‘Hirsutism: implications, etiology, and management’, *Am J Obstet Gynecol*, 140: 815- 830 (1981).

49. Fraser S, Kovacs G. "Current recommendations for the diagnostic evaluation and follow-up of patients presenting with symptomatic polycystic ovary syndrome", *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*, 18(5):813–823 (2004).
50. Hart R, Hickey M, Franks S. "Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome", *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 18(5): 671–683 (2004).
51. Balen A.H, Conway G.S, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning P.J, West C, Jacobs H.S. "Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients", *Hum. Reprod.*, 10: 2107–2111 (1995).
52. Bjorntorp P. "The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease", *Acta Med. Scand Suppl.*, 723: 121- 134 (1988).
53. Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Labate A.M, Venturoli S, Paradisi R, Zannafini L. "Insulin and androgen relationships with abdominal body fat distribution in women with and without hyperandrogenism", *Horm.Res.*, 39: 179- 187 (1993).
54. Bates G.W, Whitworth N.S. "Effect of body weight reduction of plasma androgens in obese, infertile women", *Fertil Steril*, 38: 406- 409 (1982).
55. Balen A.H, Tan S.L, Jacobs H.S. "Hypersecretion of luteinising hormone: a significant cause of infertility and miscarriage", *Br J Obstet Gynaecol*, 100: 1082- 1089 (1993).
56. Glueck C.J, Phillips H, Cameron D, Sieve-Smith L, Wang P. "Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: A pilot study", *Fertil Steril*, 75: 46- 52 (2001).
57. Grasinger C.C, Wild R.A, Parker IJ. "Vulvar acanthosis nigricans: A marker for insulin resistance in hirsute women", *Fertil Steril*, 59: 583- 586 (1993).
58. Hud J.A Jr, Cohen J.B, Wagner J.M, Cruz P.D Jr. "Prevalance and significance of acanthosis nigricans in an adult obese population", *Arch Dermatol*, 128: 941- 944 (1992).
59. Flier JS, Eastman R.C, Minaker KL, Matteson D, Rowe JW. "Acanthosis nigricans in obese women with hyperandrogenism. Characterization of an insulin-resistant state distinct from the type A and B syndromes", *Diabetes*, 34: 101- 107 (1985).
60. Stuart C.A, Peters E.J, Prince M.J, Richards G, Cavallo A, Meyer W.J 3rd. "Insulin resistance with acanthosis nigricans: The roles of obesity and androgen excess", *Metabolism*, 35: 197- 205 (1986).

61. Weerakiet S, Srisombut C, Bunnag P, Sangtong S, Chuangsoongnoen N, Rojanasakul A. "Prevalence of type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Asian women with polycystic ovary syndrome", *Int J Gynaecol Obstet*, 75: 177- 84 (2001).
62. Yildiz B.O, Gedik O. "Assessment of glucose intolerance and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome", *Reprod Biomed Online*, 8: 649- 56 (2004).
63. Yildiz B.O, Yarali H, Oguz H, Bayraktar M. "Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 2031- 6 (2003).
64. Robinson S, Henderson A.D, Gelding S.V, Kiddy D, Niththyananthan R, Bush A, Richmond W, Johnston D.G, Franks S. "Dyslipidaemia is associated with insulin resistance in women with polycystic ovaries", *Clin Endocrinol*, 44: 277- 284 (1996).
65. Pirwani I, Sattar N, Packard C.J, Wallace A.M, Fleming R, Greer IA. "Lipoprotein subfraction changes in women with oligomenorrhea: relationship to metabolic, hormonal and anthropometric indices", *J Soc Gynecol Invest*, 4(suppl): 90 (1997).
66. Ehrmann D, Schneider D.J, Sobel B.E, Cavaghan M.K, Imperial J, Rosenfield R.L, Polonsky K.S. "Troglitazone improves defects in insulin action, insulin secretion, ovarian steroidogenesis, and fibrinolysis in women with polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 2108- 2116 (1997).
67. Velazquez E.M, Mendoza S.G, Wang P, Glueck C.J. "Metformin therapy is associated with decrease plasma plasminogen activator inhibitor- 1, lipoprotein (a) and immunoreactive insulin levels in patients with polycystic ovary syndrome", *Metabolism*, 46: 454- 457 (1997).
68. Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G, Knutsson F, Oden A, Janson P.O, Mattson L.A, Crona N, Lundberg PA. "Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long-term follow-up focusing on natural history and circulating hormones", *Fertil Steril*, 57: 505- 513 (1992).
69. Hardiman P, Pillay O.C, Atiomo W. "Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma", *Lancet*, 361:1810- 1812 (2003).
70. Pierpoint T, McKeigue P.M, Isaacs A.J, Wild S.H, Jacobs H.S. "Mortality of women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up.", *J Clin Epidemiol*, 51: 581- 586 (1998).

71. Escobar-Morreale H.F, Luque-Ramirez M, San Millan J.L. "The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome", *Endocr Rev*, 26 (2):251- 82 (2005).
72. Franks S. "Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood", *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16(2): 263- 72 (2002).
73. Balen A.H. "The pathogenesis of polycystic ovary syndrome: the enigma unravels", *Lancet*, 354: 966–967 (1999).
74. Dunaif A, Segal K.R, Futterweit W, Dobrjansky A. "Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome", *Diabetes*, 38: 1165–1174 (1989).
75. Dunaif A, Xia J, Book C.B, Schenker E, Tang Z. "Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome", *J. Clin. Invest*, 96(2): 801–810 (1995).
76. Van der Spuy Z.M, Dyer S.J. "The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome", *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*, 18(5): 755–771 (2004).
77. Martens JW, Geller DH, Arlt W, Auchus RJ, Ossovskaya VS, Rodriguez H, Dunaif A, Miller WL. "Enzymatic activities of P450c17 stably expressed in fibroblasts from patients with the polycystic ovary syndrome", *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 2000; 85(11): 4338–4346
78. Nestler J.E, Jakubowicz D.J. "Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome", *N. Engl. J. Med*, 335(9): 617–623 (1996).
79. Qin K.N, Rosenfield R.L. "Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome", *Mol. Cell. Endocrinol*, 25; 145(1–2): 111–121 (1998).
80. Amato P, Simpson J.L. "The genetics of polycystic ovary syndrome", *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*, 18(5): 707–718 (2004).
81. Balen A. "Pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology", *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*, 18(5): 685–706 (2004).
82. Atiomo W.U, Condon J, Adeganmi O, Friend J, Wilkin T.J, Prentice A.G. "Are women with polycystic ovary syndrome resistant to activated protein C?", *Fertil. Steril*, 74: 1229–1232 (2000).

83. Atiomo W.U, Bates S.A, Condon J.E, Shaw S, West J.H, Prensice A.G. "The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome." *Fertil. Steril*, 69: 236–241 (1998).
84. Balen A, Rajkowha M. "Polycystic ovary syndrome--a systemic disorder?" *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*, 17(2): 263–274 (2003).
85. Topcu S, Caliskan M, Ozcimen E.E, Tok D, Uckuyu A, Erdogan D, Gullu H, Yildirim A, Zeyneloglu H, Muderrisoglu H."Do young women with polycystic ovary syndrome show early evidence of preclinical coronary artery disease?", *Hum. Reprod*, 21(4): 930–935 (2006).
86. Yarali H, Yildirim A, Aybar F, Kabakci G, Bukulmez O, Akgul E, Oto A. "Diastolic dysfunction and increased serum homocysteine concentrations may contribute to increased cardiovascular risk in patients with polycystic ovary syndrome", *Fertil. Steril*, 76(3): 511–516 (2001).
87. Baillargeon J.P, Jakubowicz D.J, Iuorno M.J, Jakubowicz S, Nestler J.E. "Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity", *Fertil. Steril*, 82(4): 893–902 (2004).
88. Baillargeon J.P, Carpentier A.C. "Role of insulin in the hyperandrogenemia of lean women with polycystic ovary syndrome and normal insulin sensitivity", *Fertil. Steril*, (2007).
89. Baillargeon J.P, Nestler J.E. "Commentary; polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin?", *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 91(1): 22–24 (2006).
90. Phipps WR. "Polycystic ovary syndrome an ovulation induction", *Obstet Gynecol Clin North Am*, 28: 165- 82(2001).
91. Ehrmann D.A, Barnes R.B, Rosenfield R.L, Cavaghan M.K. "Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome", *Diabetes Care*, 22: 141- 46 (1999).
92. Legro R.S. "The genetics of polycystic ovary syndrome", *Am J Med*, 98: 95-165 (1995).
93. Cooper H.E, Spellacy W.N, Prem K.A, Cohen W.D. "Hereditary factors in the Stein- Leventhal syndrome", *Am J Obstet Gynecol*, 100: 371- 387 (1968).
94. Givens J.R, Wiser W.L, Coleman S.A. "Familial ovarian hyperthecosis: a study of two families", *Am J Obstet Gynecol*, 110: 959- 972 (1971).

95. Hague W.M, Adams J, Reeders S.T. "Familial polycystic ovaries: a genetic disease?", *Clin Endocrinol*, 29: 593- 605 (1988).
96. Franks S, Gharani N, Waterworth D, Batty S, White D, Williamson R, McCarthy M. "The genetic basis of polycystic ovary syndrome", *Hum Reprod*, 12: 2641-2648 (1997).
97. Zawadzki J.K, Dunaif A. "Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach: Polycystic ovary syndrome." Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR (eds), *Blackwell Scientific, Boston*, 377- 384 (1992).
98. Gilling-Smith C, Willis D.S, Beard R.W, Franks S. "Hypersecretion of androstenedione by isolated theca cells from polycystic ovaries", *J Clin Endocrinol Metab*, 79: 1158- 1165 (1994).
99. Steingold K, De Ziegler D, Cedars M, Meldrum D.R, Lu J.K, Judd H.L, Chang R.J. "Clinical and hormonal effects of chronic gonadotropin-releasing hormone agonist treatment in polycystic ovarian disease", *J Clin Endocrinol Metab*, 65: 773- 778 (1987).
100. Nelson V.L, Legro R.S, Strauss J.F III, McAllister J.M. "Augmented androgen production is a stable phenotype in propagated theca cells from polycystic ovaries", *Mol Endocrinol*, 13: 946- 957 (1999).
101. Franks S, McCarthy M. "Genetics of ovarian disorders: Polycystic Ovary Syndrome", *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 5: 69- 76 (2004).
102. Holte J, Bergh T, Berne C, Wide L, Lityell H. "Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, 80: 2586- 2593 (1995).
103. Hughesden P.E. "Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called hyperthecosis", *Obstet Gynecol Survey*, 37: 59- 77 (1982).
104. Webber L, Stubbs S, Stark J, Trew G, Margara R, Hardy K, Franks S. "Formation and development of follicles in the polycystic ovary", *Lancet*, 362 (9389):1017- 21 (2003).
105. Haddad L, Evans J.C, Gharani N. "Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain- 10 and polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2606- 2610 (2002).
106. Tapanainen J.S, Koivunen R, Fauser B.C, Taylor A.E, Clayton R.N, Rajkova M, White D, Franks S, anttila L, Pettersson K.S, Huhtaniemi I.T. "A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: The genetic variant of luteinizing hormone", *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 1711- 1715 (1999).

107. Gharani N, Waterworth D.M, Batty S, White D, Gilling-Smith C, Conway G.S, McCarthy M, Franks S, Williamson R. "Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism", *Hum Mol Genet*, 6: 397- 402 (1997).
108. Pugeat M, Cousin P, Nicolas M.H, Mirakian P, Sayegh M, Barret C, Ducros C.I, Dechaud H, Forest M.G, Lejeune H. "Pentanucleotide repeat polymorphism in the promoter region of the human CYP11a gene and polycystic ovaries in hirsute women", *Proceedings of the Endocrine Society, 81st Annual Meeting San Diego California, abstract*, 1-29 (1999).
109. Diamanti-Kandarakis E, Bartzis M.I, Bergiele A.T, Tsianateli T.C, Kouli. "Microsatellite polymorphism (tttta)(n) at n528 base pairs of gene CYP11a alpha influences hyperandrogenemia in patients with polycystic ovary syndrome", *Fertil Steril*, 73: 735- 741 (2000).
110. Gharani N, Waterworth D.M, Williamson R, Franks S. "'5' polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women with polycystic ovaries (letter)", *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 4174 (1996).
111. Escobar-Morreale H.F, San Millan J.L, Smith R.R. "The presence of the 21-hydroxylase deficiency carrier status in hirsute women: phenotype-genotype correlations", *Fertil Steril*, 72: 629- 638 (1999).
112. Witchel S.F, Aston C.E. "The role of heterozygosity for cyp21 in the polycystic ovary syndrome", *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 13 (suppl 5): 1315- 1317 (2000).
113. Mifsud A, Ramirez S, Yong L. "Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries", *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 3484- 3488 (2000).
114. Hickey T, Chandy A, Norman R.J. "The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 161- 165 (2002).
115. Hogenveen K.N, Cousin P, Pugeat M. "Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction", *Clin Invest* 109: 973- 981 (2002).
116. Xita N, Tsatsoulis A, Chatzikyriakidou A, Georgiou I. "Association of the (TAAAA)n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels", *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 5976- 5980 (2003).

117. Waterworth D.M, Bennett S.T, Gharani N, McCarthy M.I, Hague S, Batty S, Conway G.S, White D, Todd J.A, Franks S, Williamson R. "Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome", *Lancet*, 349: 986- 990 (1997).
118. Conway G.S, Avey C, Rumsby G. "The tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is normal in women with hyperinsulinaemia and polycystic ovary syndrome." *Hum Reprod*, 9: 1681- 1683 (1994).
119. Talbot J.A, Bicknell E.J, Rajkhowa M, Krook A, O'Rahilly S, Clayton R.N. "Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 1979- 1983 (1996).
120. Tucci S, Futterweit W, Concepcion E.S, Greenberg D.A, Villeneuve R, Davies TF, Tomer Y.A. "Evidence of association of polycystic ovary syndrome in Caucasian women with a marker at the insulin receptor gene", *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 446- 449 (2001).
121. Villuendas G, Escobar-Morreale H.F, Tosi F, Sancho J, Moghetti P, San Millan JL. "Association between the D 19S884 marker at the insulin receptor gene locus and polycystic ovary syndrome (comment)", *Fertil Steril*, 79: 219- 220 (2003).
122. Ehrmann D.A, Tang X, Yoshiuchi I, Cox N.J, Bell G.I. "Relationship of insulin receptor substrates- 1 and n2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 4297- 4300 (2002).
123. El Mkaem S.A, Lautier C, Marcari F, Molinari N, Lefebvre P, Renard E, Gris J.C, Cros G, Daures J.P, Bringer J, White M.F, Grigorescu F. "Role of allelic variants Gly972Arg of IRS- 1 and Gly1057Asp of IRS- 2 in moderate-to-severe insulin resistance of women with polycystic ovary syndrome", *Diabetes*, 50: 2164- 2168 (2001).
124. Urbanek M. "Proceedings of "Polycystic Ovary Syndrome: Basic Biology and Clinical Intervention", *National Institute of Environmental of Health Sciences (NIH)*, (2000).
125. Sarabia V, Lam L, Burdett E. "Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. Stimulation by insulin and metformin", *J Clin Invest*, 90: 1386- 1395 (1992).
126. Henry R.R "Thiazolidinediones", *Endocrinol Metab Clin North Am*, 26: 553- 573 (1997).
127. Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, Deninger M, Renn W, Haring HU. "The PPARgamma2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects", *Diabetologia*, 42: 758- 62 (1999).

128. Orio F Jr, Matarese G, Di Biase S, Palomba S, Labella D, Sanna V, Savastano S, Zullo F, Colao A, Lombardi G. "Exon 6 and 2 peroxisome proliferator-activated receptor-gamma polymorphisms in polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 5887- 92 (2003).
129. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. "AdipoQ is a novel adipose specific gene dysregulated in obesity", *J Biol Chem*, 271: 10697- 10703; 1996
130. Scherer P.E, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish H.F. "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes", *J Biol Chem*, 270: 26746 -26749 (1995).
131. Gu H.F, Abulaiti A, Ostenson C.G, Humphreys K, Wahlestedt C, Brookes A.J. "Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish Caucasians", *Diabetes*, 53 (Suppl 1): S31- 5 (2004).
132. Hu F.B, Doria A, Li T, Meigs J.B, Liu S, Memisoglu A. "Genetic variation at the adiponectin locus and risk of type 2 diabetes in women", *Diabetes*, 53: 209-13 (2004).
133. Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes. "A candidate gene for insulin resistance syndrome", *Diabetes*, 51: 2325- 8 (2002).
134. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S. "Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyted-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians", *Hum Mol Genet*, 11: 2607- 14 (2002).
135. Filippi E, Sentinelli F, Trischitta V, Romeo S, Arca M, Leonetti F. "Association of the human adiponectin gene and insulin resistance", *Eur J Hum Genet*, 12: 199- 205 (2004).
136. Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K. "Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population", *Diabetes*, 51: 536- 540 (2002).
137. Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg A.H, Warram J.H, Scherer P.E, Trischitta V, Doria A. "A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome", *Diabetes*, 51: 2306- 2312 (2002).
138. Stumvoll M, Tschrutter O, Fritsche A, Staiger A, Renn W, Weisser M, Machicao F, Haaring H. "Associatin of the T-G polymorphism in adiponectin gene (exon

- 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes”, *Diabetes*, 51: 37- 41 (2002).
139. Panidis D, Kourtis A, Kukuvtis A, Farmakiotis D, Xita N, Georgiou I. “Association of the T45G polymorphism in exon 2 of the adiponectin gene with polycystic ovary syndrome: role of D4-androstenedione”, *Hum Reprod*, 19: 1728- 33 (2004).
140. Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. “Structure, activation, and biology of calpain”, *Diabetes*, Feb; 53 Suppl 1: S12- 8 (2004).
141. Huang Y, Wang K.K. “The calpain family and human disease”, *Trends Mol Med*, 7 (8): 355- 62 (2001).
142. Turner M.D, Cassell P.G, Hitman G.A. “Calpain-10: from genome search to function”, *Diabetes Metab Res Rev*, 21 (6): 505- 14 (2005).
143. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M et al. “Genetic variation in the gene encoding Calpain 10 is associated with type 2 diabetes mellitu”, *Nat Genet*, 26: 163- 175(2002).
144. Baier L.J, Permana P.A, Yang X, Pratley R.E, Hanson RL, Shen G.Q, et al. “A calpain- 10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance”, *J Clin Invest*, 106 (7): 819- 21 (2000).
145. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CAPN10>
146. Mullis, K. B. *Sci. Am*, 262, 56-65 (1990).
147. Russel P. J., “Genetics: A Molecular Approach,” *Second Ed., Pearson*, 606 (2006).
148. Evans J.C, Frayling T.M, Cassell P.G, Saker P.J, Hitman G.A, Walker M. “Studies of association between the gene for calpain- 10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom”, *Am J Hum Genet*, 69 (3): 544- 52 (2001).
149. McKeigue P, Wild S, Bennett S.D, Todd J.A, Waterworth D.M, Franks S, McCarthy M.I. “Association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome”, *Lancet*, 349: 1771- 1772 (1997).
150. Bennett S.D, Todd J.A. “Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes”, *Annu Rev Genet*, 30: 343- 370 (1996).
151. Huxtable S.J, Saker P.J, Haddad L.Ş, Walker M, Frayling T.M, Levy J.C et al. “Analysis of parent offspring trios provides evidence for linkage and association between the insulin gene and type 2 diabetes mediated exclusively through paternally transmitted class III VNTR alleles”, *Diabetes*, 49: 126- 130 (2000).

152. Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Manaka H, Kato T. "Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese", *Diabetes Res Clin Pract*, 56 (2): 147- 52 (2002).
153. Escobar-Morreale H.F, Peral B, Villuendas G, Calvo R.M, Sancho J, San Millan JL. "Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain- 10 gene influence hirsutism", *Fertil Steril*, 77(3):581- 7 (2002).
154. Vollmert C, Hahn S, Lamina C, Huth C, Kolz M, Schopfer-Wendels A, et al. "Calpain- 10 variants and haplotypes are associated with polycystic ovary syndrome in Caucasians", *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292 (3): E836- 44 (2007).
155. José Luis Márquez , Alejandro Pacheco, Patricio Valdés , Luis A. Salazar. "Association between CAPN10 UCSNP- 43 gene polymorphism and polycystic ovary syndrome in Chilean women", *Clinica Chimica Acta*, 398: 5–9 (2008).
156. Sambrook, I., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., "Molecular cloning, A Laboratory Manual, second edition", *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*, (1989).
157. Andrea Dunaif, R. Jeffrey, Stephen Franks, Richards S. Legro. "Polycystic Ovary Syndrome ; Current Controversies, from the Ovary to the Pancreas" (2002).

EKLER


EK-1 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu'nun tez projesi hakkındaki kararı

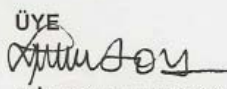
T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
ETİK KURUL TOPLANTI RAPORU

OTURUM NO : 122
OTURUM TARİHİ : 04 Kasım 2008
OTURUM BAŞKANI : Prof. Dz. Diş Tbp. Kd. Alb. Deniz SAĞDIÇ
OTURUM SEKRETERİ : Doç. Dr. Ecz. Kd. Alb. Adnan ATAÇ

GATA Etik Kurulu'nun 04 Kasım 2008 günü yapılan 122. oturumunda, GATA Kadın Hastalıkları ve Doğum AD'dan Yrd. Doç. J. Tbp. Yb. Emre Kardeş'in sorumlu araştırmacılığını yaptığı "**Polikistik Overli Olgularda CYP11A Gen Mutasyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Dizi Analizi İle Araştırılması**" başlıklı çok merkezli çalışma olan dosya değerlendirildi.

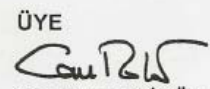
Araştırma dosyasının amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere UYGUN olduğuna karar verildi.


BASKAN

Deniz SAĞDIÇ
Prof.Dz.Diş Tbp.Alb.


ÜYE

H.İbrahim ALTINSOY
Prof.Tbp.Alb.


ÜYE


Cem TAYFUN
Prof.Tbp.Alb.


ÜYE

Can Polat EYİĞÜN
Prof.Hv.Tbp.Alb.

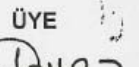
ÜYE

Ali Uğur URAL
Prof.Tbp.Alb.


ÜYE

Ali İhsan UZAR
Prof.Hv.Tbp.Alb.


ÜYE

Tunçer HAZNEDAROĞLU
Prof.Dz.Tbp.Alb.


ÜYE

Hasan OZAN
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE

Şefik GÜRAN
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE

Onur GENÇ
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE

Adnan ATAÇ
Doç.Dr.Ecz.Alb.

ÜYE

Mükerrrem SAFALI
Doç.Tbp.Alb.

ÜYE

Nalan AKBAYRAK
Prof. Dr. Sağ. Yb.

EK-2. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ HASTANESİ
GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK ARAŞTIRMALAR
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: “Polikistik Overli Olgularda *CYP11A* Gen Mutasyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Dizi Analizi ile Araştırılması”

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr.Leyla AÇIK

Diğer Araştırmacıların Adı: Yrd. Doç. Dr. Emre KARAŞAHİN, Gülşah DEMİR

Destekleyici (varsa): Destekleyici Yoktur. Laboratuarda araştırma için gereken makine, kimyasal, malzeme ve enzimler mevcuttur.

“Polikistik Overli Olgularda *CYP11A* Gen Mutasyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Dizi Analizi ile Araştırılması” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amacı ile yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

EK-2. (Devam) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

1. Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

a. *Neden özellikle bu kişi / hasta seçilmiştir?*

Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sizde polikistik over sendromu tanısı konmasıdır. Katılımınız ile bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir.

b. *Çalışmanın önemi ve gerekliliği nelerdir?*

Genler, DNA olarak isimlendirilen genetik materyalden oluşurlar. DNA hücrenin bir bölümüdür ve kalıtsal özelliklerin (göz rengi gibi) oluşmasından sorumludur. "Polikistik over" hastalığı ile ilişkilendirilen çeşitli genler bulunmuştur. Bu araştırma ile sizin DNA'nızı çalışmak ve genlerinizde herhangi bir anormallik olup olmadığını ya da bu soruna neden olabilecek yeni genler olup olmadığını bulmak istiyoruz.

c. *Çalışmaya toplam kaç kişinin katılması planlanmaktadır?*

Çalışmaya toplam 200 kişinin katılması planlanmaktadır

2. Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Böyle bir karar vermeniz durumunda tıbbi bakımınız bu durumdan etkilenmeyecektir.

3. Genetik araştırma nasıl yapılacaktır?

a. *Hangi örnek (ler) alınacak ve nasıl alınacak ?*

Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, 10 ml kadar bir miktarda kolunuzdan kan alınacaktır. Genellikle bir tek örnekleme yeterlidir ancak bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.

EK-2. (Devam) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

b. Örnekte neler araştırılacak?

Örneklerden DNA izole edilerek polikistik overe sebep olan gen mutasyonları araştırılacaktır. Bu çalışma için kan örnekleri RBC lizis tamponu serilerinden geçirilir. Santrifüj serilerinden sonra, proteinler ve DNA dışındaki tüm moleküller uzaklaştırılır. Alkol serilerinden geçirilerek DNA'nın kümeleşmesi sağlanır. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra DNA çözücü, TE tamponunda saklanacaktır. Daha sonra PZR işlemi yapılacak PAGE ve agoroz jelde ürünleri yürütülerek PZR'in başarılı olup olmadığına bakılacaktır. RFLP tekniği ile polimorfizm olup olmadığına bakılacaktır.

Örnekler nerede çalışılacak?

Toplanan kanlar ile Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarında çalışılacaktır.

c. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor?

Elde edilen DNA, DNaz enzimi ile parçalanarak, atılacaktır.

4.Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilir mi?

(Bu bölümde katılımcıdan "Tabakalandırılmış olur" olarak isimlendirilen bir onay alınmalıdır. Aşağıda yazılı olan bölüm aynen korunarak katılımcının aşağıdaki 4 seçenekten birini işaretlemesi istenmelidir.)

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin iznimize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

1- Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

2- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

EK-2. (Devam) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

3- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

4- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

5. Çalışmanın riskleri nelerdir?

- Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz ve kolda morarma olabilir. Düşük bir olasılık da olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması, veya enfeksiyon riski vardır.
- Yapılacak genetik teste bağlı oluşabilecek riskler: Yapılan testler sizin veya ailenizin bir ferdinin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötüye kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de olumsuz etkileyebilir.

6. Çalışmanın yararları nelerdir?

Çalışmadaki genler pek çok kanser türüne sebep olmaktadır. Polikistik Overli olguların %8-16'sinde görülen bir mutasyondur. Bu çalışma sayesinde kanserleşmeye sebep olan mutant genin özellikleri araştırılarak, Türkiyede ki, bizim çalıştığımız hastalardaki polimorfizmin durumunu ortaya çıkaracaktır.

7. Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar ve destekleyici (varsa, firma adını belirtiniz) kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Size ait bulgular üçüncü kişilere, onayınız dışında hiçbir şekilde açıklanmayacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

EK-2. (Devam) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

- Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum
- Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Kendinizle ilgili genetik bilgiyi öğrenmeyi seçmeniz durumunda size (varsa) sağaltım ile ilgili bilgiler ve genetik danışmanlık hizmeti verilecektir.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

(Çalışma için eğer gerekiyorsa aşağıdaki standart durumlar açıklanmalıdır)

- *Örnek: Kanınız genetik faktörler açısından test edilecek ve elde edilen bilgi sizin hakkınızda bize genetik bilgi verecektir. Genetik testler, bu araştırma ile ilgisi olmayan size ait çok özel başka bilgiler de verebilir. Böyle bir durumda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacak ve bilgiler üçüncü şahıslara sizin onayınız olmaksızın açıklanmayacaktır.)*

8. Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?

a. *Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.*

9. Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır?

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

10. Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak?

- *Araştırmadan dolayı katılımcının göreceği olası bir zararda bunun sorumluluğunun ve giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahalenin yapılacağını; bu konudaki tüm harcamaların üstlenileceğini belirtiriz.*

EK-2. (Devam) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

11. Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Prof. Dr. Leyla AÇIK

GÖREVİ : Öğretim Üyesi

TELEFON : (312) 202 11 85

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

GÜFEF Biyoloji Anabilim dalında, Prof. Dr. Leyla AÇIK tarafından genetik bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimlerle ilgili olarak parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr.....(Doktor ismi),(telefon ve adres) ‘ten arayabileceğimi biliyorum.

(Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir).

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu genetik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

EK-2. (Devam) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Etik Kurulu tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Kıssel Bilgiler

Soyadı, Adı : Gülşah GÜNALTILI
Uyruğu : T.C.
Dogum Yeri ve Tarihi : 04.02.1985 Ankara
Medeni Hali : Evli
Telefon : (312) 389 34 02
E-mail : gulsahdemir85@yahoo.com

Eğitim Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans Gazi Üniversitesi	Biyoloji Bölümü	2010
Lisans Kırıkkale Üniversitesi	Biyoloji Bölümü	2006
Lise Tuzluçayır Lisesi		2002

Yabancı Dil

İngilizce, Temel Almanca