

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Menopoza girme yaşı toplumlar arasında değişkenlik göstermektedir. Değişik toplumlarda ortalama yaşam süresinin uzaması ile menopoz dönemi kadınların yaşantısında daha önemli bir yer teşkil etmiştir. Menopoz yaşı 45 ila 60 yaşları arasında değişmekle birlikte, istatistiksel olarak ortalama yaş 51.4 civarındadır. Ülkemize baktığımızda bu ortalamanın 46 yaş civarında olduğu görülmektedir. Kadınların % 1-2'si 60 yaşından sonra ve %1-2'si 40 yaşından önce menopoza girmektedir<sup>1</sup>. Kırk yaşından önce menopoza girme Prematür Menopoz olarak adlandırılmaktadır. Bu durum bütün kadınların %1'inde, 30 yaşın altındaki kadınlarda ise %0.1 oranında görülmektedir<sup>2</sup>.

Kadınlar yaşamlarının 1/3'ünü menopoz döneminde geçirmektedirler, fakat bu oran normal yaşta menopoza giren kadınlar için geçerlidir. Bu oran prematür menopoza giren kadınlar için düşünüldüğünde yaklaşık hayatlarının 1/2'sine tekabül etmektedir. Yaşamın bu kadar büyük bir kısmını etkilemesinden dolayı menopoz, kadınlar için oldukça önemli bir devredir.

Prematür menopoz nedenleri açısından multifaktoriyel olarak değerlendirilmektedir. Etkileri kesin olmamakla birlikte nedenleri şu şekilde sıralanabilir: Menarş yaşı, sosyoekonomik durum, sigara ve alkol kullanımı, doğum kontrol haplarının kullanımı, beslenme alışkanlıkları ve genetik faktörler. Prematür menopoza neden olan bu faktörlerin belirlenmesi, bu bireylerin menopoz dönemini en hafif şekilde geçirmelerine ve prematür menopoz gerçekleşmeden önce risk tayini yapılabilmesine olanak verecektir<sup>2,3</sup>.

Çalışmamızda genetik faktörlerden biri olduğu düşünülen inhibin alfa gen mutasyonu ile prematür menopoz arasındaki ilişki incelenecektir.

Prematür menopoz veya diğer bir adıyla prematür over yetmezliği, 40 yaşın altındaki kadınlarda fonksiyonel foliküllerin kaybolması ile ortaya çıkar. Prematüre menopozlu hastaların yaklaşık %5'i bu hastalığın kalıtsal bir eğilim gösterdiğini doğrulayan bir aile öyküsüne sahiptir. Düşük östrojen miktarı ve yüksek FSH miktarı ile kendini gösterir (>40 IU/L)<sup>4,5</sup>. Son yıllarda gerek FSH sentez ve salgısını doğrudan etkileyen gerekse de gonadotropinlerin etkilerini

over içinde modifiye eden ve folikülogenezi düzenleyen önemli hormonlar tanımlanmıştır. Bunlardan biride inhibitörlerdir. İnhibinin, yumurta foliküllerinin gelişiminde rol oynayan FSH'ın negatif feed back mekanizmasındaki fonksiyonu nedeni ile prematür menopoza sorumlu olabileceği düşünülmektedir<sup>6,7</sup>. Herhangi bir inhibitör geninde meydana gelebilecek bir mutasyon, biyoaktif inhibitörlerin miktarında bir azalmaya neden olacaktır. Bu durum da hipofize uygulanan negatif feed back mekanizmasının ortadan kalkmasına ve FSH konsantrasyonunun artmasına neden olacaktır. Bunun sonucunda da foliküllerin erken tükenmesi olayı gerçekleşecektir. Bu mekanizmanın prematüre menopoza neden olduğu düşünülmektedir<sup>8,9</sup>. İnhibin glikoproteini; INH A ( $\alpha$ - $\beta$ A) ve INH B ( $\alpha$ - $\beta$ B) olmak üzere iki çeşittir ve 3 ayrı gen tarafından kodlanan 3 alt ünitelerden oluşur. INH  $\alpha$  geni 2. kromozom üzerinde q33-q36 bölgesinde lokalize olmuştur<sup>10,11</sup>.

INH $\alpha$  genindeki G769A varyasyonu ilk olarak Yeni Zellanda'da rapor edilmiştir. Bu çalışmada 43 prematür menopoz hastasında sadece 3 kişide bu varyasyon tespit edilmiştir<sup>12</sup>.

Yakın bir zamanda da İtalya'da yapılan bir çalışmada 7 prematür menopoz ve 3 primer amenore vakasında bu varyasyon tespit edilmiştir.

Kore'de yapılan çalışmada ise 84 prematür hasta ve 100 kontrolde bu varyasyona rastlanmamıştır<sup>7,12</sup>.

En son olarak 2004'de Hindistan'da yapılan çalışmada 80 prematür menopoz, 33 primer amenore ve 4 sekonder amenore hastası kullanılmıştır. 769. G→A (Ala257Thr) missense mutasyonu 80 prematür hastanın 9'unda, 33 primer amenore hastasının 3'ünde, 4 sekonder amenore hastasından 2'sinde tespit edilmiştir<sup>13</sup>.

Yaptığımız araştırmalar sonucunda, daha önceden farklı popülasyonlarda tespit edilen INH  $\alpha$  769. G→A missense mutasyonunun Türkiye'de çalışılmadığını tespit ettik. Bundan dolayı biz bu çalışmamızda Çukurova Bölgesinde bulunan ve daha önceden Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalında prematür menopoz teşhisi konmuş olan hastalara ait kan örneklerinden elde edilen DNA'larla RFLP tekniği kullanılarak bu mutasyonun görülme sıklığını çalışmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Tanım

Menopoz sözcüğü ilk olarak 1812 yılında Gardanne isimli bir Fransız jinekolog tarafından kullanılmıştır. Latince olarak Meno: Ay, Pause: Son anlamına gelen kelimelerin birleşiminden türetilmiştir<sup>1</sup>. Menopoz, klimakterium içerisinde bir nokta olarak kabul edilen ve üzerinden ortalama bir yıl geçtikten sonra tanı konulabilen en son adet kanamasının özel bir ismidir. Klimakterium, kadın yaşamının reproduktif dönemi ile yaşlılık dönemi arasında yer alan, overdeki morfolojik ve fonksiyonel değişimlere bağlı olarak hormonal dengenin farklılaşması sonucu ortaya çıkan semptomlar ile karakterize bir geçiş dönemidir. Yaklaşık 40 yaş civarında ovulasyon frekansının azalması ile başlar ve menopozdan sonraki belli bir süreyi de içine alarak yaşlılık dönemi olarak kabul edilen 65 yaş sınırına kadar devam eder. Adet düzensizlikleri, menopoz, sistemik değişimler, ilerleyici doku atrofilleri ve yaşlanma ile birlikte seyreder.

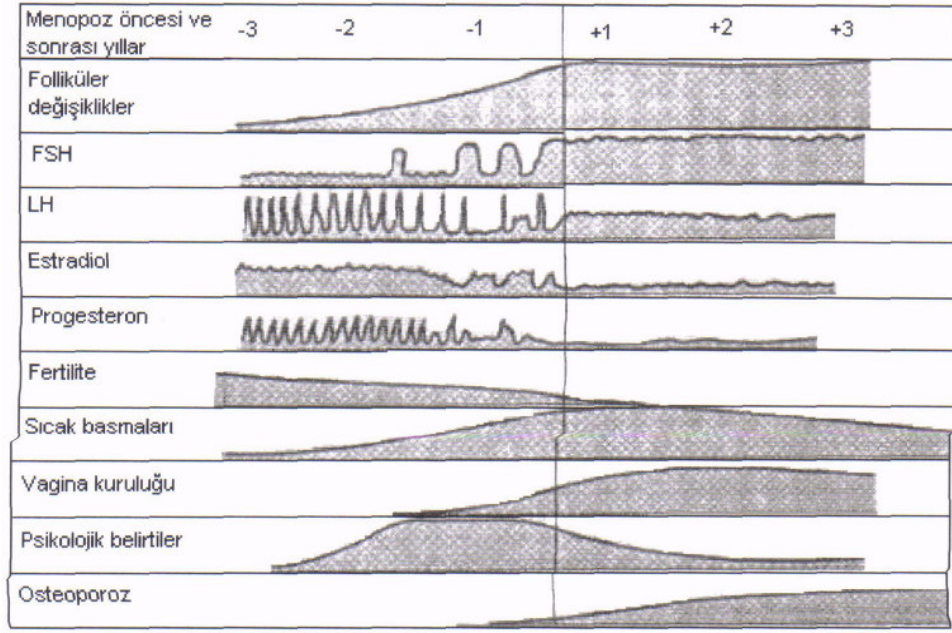
Başlıca üç bölüm altında incelenir (WHO Klasifikasyonu'na göre)

1. PREMENOPOZ: İlk semptomların görüldüğü klimakterium başlangıcından menopoza kadar geçen süre.
2. MENOPOZ: En son adet kanaması.
3. POSTMENOPOZ: Menopozdan yaşlılık dönemine kadar geçen süre.

### 2.2. Menopozun Tarihçesi

Bilimsel olarak tıp Rönesans'tan sonra gelişmeye başlamıştır. Bu devreden sonra ölümlerde otopsiler yapılabilmiş, insan organlarının özellikleri saptanmaya başlanmıştır. Menopoz konusuna gelince, ancak 19. yüzyılda modern tıp açısından en çok Fransız tıp araştırmacılarının bu konuyu fizyolojik bir olay olarak nitelermeleri sonucu, ilk defa bu ülkede incelemeler başlamış ve olay hakkında teoriler ileri sürülmüştür. Özellikle 1890'lı yılların başından itibaren menopoz ile ilgili çalışmalar giderek artmıştır<sup>3,14</sup>. Eldeki bilgilere göre ilk defa

1776 yılında İngiltere'de Fothergill "*Medical Observations and Inquiries*" adlı dergide, kadında yaşlanınca ortaya çıkan adet kesilme konusu ele alınmış ve hatta çözümünü değerlendirme yönünde tartışmalar açılmıştır<sup>15</sup>. Fransa'da Gardanne 1816 yılında, menopozu çeşitli yönleriyle ele almış, bu konudaki görüşlerini bir kitapta toplamıştır. Bu araştırmacı, bir bakıma menstruasyonun kesilmesi anlamında "*La Menespausie*" deyimini ortaya atan ilk kişidir. Daha sonra da aslı eski Yunanca'dan gelen bu iki kelime "men" ve "pause" (adet/ay kesilmesi), kadınların bu devrelerini ifade eden deyim olarak günümüze kadar gelmiştir<sup>14,15</sup>. Tilt 1857 yılında İngiltere'de ilk defa 500 klimakterik kadını incelemiş, bu kadınların sıkıntılarının ciddiyetini ortaya koyarak onların rahat etmeleri için tedaviler geliştirilmesini önermiştir<sup>15</sup>. Fraenkel, Almanya'da 1903 yılında menopoz hakkında çok ciddi araştırmalar yapmıştır. Premenopoz ve menopozda over fonksiyonunun bozulması sonucu ortaya çıkan östrojen azalmasına bağlı olayları (ateş basması, çarpıntı, depresyon, vs.) tanımlamıştır. Bu dönemden sonra menopoz konusu üzerindeki araştırmalar hızla devam etmiştir. Menopoz konusundaki ilk uluslararası kongre Fransa'da (Haziran 1976) La Grande Motte'de yapılmıştır<sup>3</sup>. Ülkemizde menopozun ciddi olarak değerlendirilmesi 1970'li yıllardan sonra olmuştur. 1985'li yıllardan sonra östrojen ile endometrium ve meme kanseri ilişkilerine aydınlık getiren geniş hasta sayısına dayalı yayın ve araştırmalar, *menopozda hormon tedavisini* yaygın hale getirmeye başlamıştır. Günümüze gelindiğinde, özellikle menopozda hormon tedavisi konusundaki çalışmaların hızla devam ettiğini görmekteyiz. Bugün menopozdaki modern yaklaşım ve tedavi görüşüne göre, menopoz olgusu sadece Kadın-Doğum kliniğine ait olmayıp, aynı zamanda Psikiyatri, Fizik Tedavi, Kardiyoloji, Genel Cerrahi, Biyokimya, Diyet ve Genetik bölümlerinin de ilgi alanına girmektedir. Multidisipliner bir ekip organizasyonu ile bu dönemin en iyi şekilde geçirilmesinin sağlanması ve yaşam kalitesinin yükseltilmesi amaçlanmaktadır. Premenopozal ve postmenopozal dönemde hormon düzeylerinde meydana gelen değişimler ve buna bağlı olarak gelişen belirtilerin dağılımı aşağıda Şekil 2.1'de verilmiştir<sup>5,14</sup>.



**Şekil 2.1.** Hormon düzeylerindeki değişiklikler ve buna bağlı olarak gelişen belirtilerde gözlenen değişimler<sup>15</sup>.

### 2.3. Menopoz Yaşı

Menopoza girme yaşı toplumlar arasında değişkenlik göstermektedir. Değişik toplumlarda ortalama yaşam süresinin uzaması ile menopoz dönemi kadın yaşantısında daha önemli bir yer teşkil etmiştir. Menopoz yaşı 45 ila 60 yaşları arasında değişmektedir. İstatistiksel olarak ortalama yaş 51.4 civarındadır. Yapılan çalışmalar sonucunda Amerika'da 50-52 yaşlarında görülen menopoz, Avrupa orijinli beyaz kadınlarda yaklaşık 50 yaş civarında olarak gösterilmiştir. Yine bu çalışmalarda Asyalı, Afrikalı ve Uzak Doğulu ırklarda ortalama menopoz yaşının 43-49 arasında olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de ise menopoz ortalama olarak 46 yaş civarında görülür<sup>10</sup>. Kadınların %1-2'si 60 yaşından sonra ve %1-2'si 40 yaşından önce menopoza girmektedir<sup>16</sup>. Kırk yaşından önce menopoza girme erken menopoz olarak adlandırılmaktadır. Bu durum bütün kadınların %1'inde, 30 yaşın altındaki kadınlarda ise %0.1 oranında görülmektedir. Menopoz yaşını belirleyen en önemli etken genetik faktörlerdir. Ayrıca çevresel etkenlerde menopoz yaşını etkileyebilmektedir<sup>6</sup>.

## **2.4. Prematür Menopoz ve Nedenleri**

**1.Genetik Nedenler:** Prematür menopoz olan hastaların % 40'ında genetik nedenler görülmektedir. Prematüre menopozlu hastaların yaklaşık %5'i bu hastalığın kalıtsal bir eğilim gösterdiğini doğrulayan bir aile öyküsüne sahiptir<sup>17</sup>. Genetik geçiş şekli X' bağılı, otomozomal dominant veya resesif olabilmektedir. Ancak genetik geçişin nasıl olduğu konusunda kesin bir veri ortaya konamamıştır. Bu ailelerde erkek bireylerde bir bozukluk görülmemektedir.

### **a.Turner Sendromu**

### **b. X-kromozomu defektleri**

### **c. Enzim Eksiklikleri**

### **d. Follikül Uyarıcı Hormon Reseptöründe Genetik Mutasyonlar**

### **e. Perrault Sendromu**

### **f. Ataxia-telenjektazia**

### **g. İnhibin geni bozuklukları**

## **2. Yumurtalıkların Viruslara Bağlı Enfeksiyonları:**

## **3. Kemoterapi ve Radyoterapi**

## **4. Bağışıklık Sistemine ait Bozukluklar**

## **2. 5. Menstrüel Siklusda Nöroendokrin Kontrolü**

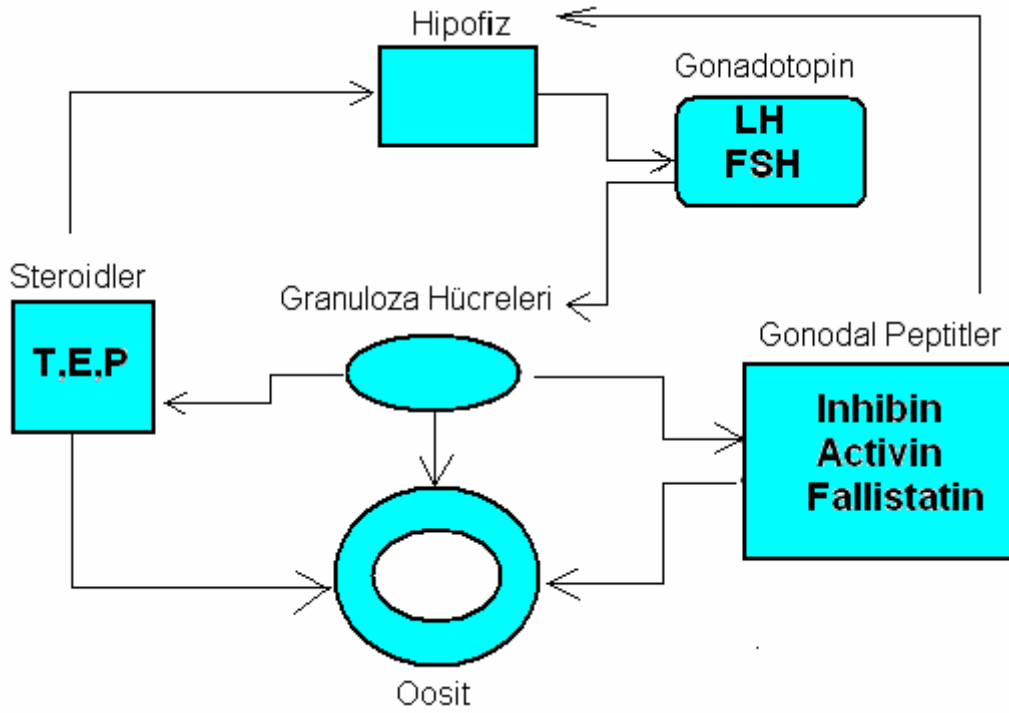
Menstrüel siklus düzenli aralıklarla görülen vajinal kanamalarla karakterizedir. Adet kanamalarının düzenliliği hipotalamus, hipofiz ve over

arasındaki koordinasyona ve buna bağlı olarak hedef organ endometriumda meydana gelen değişikliklere bağlıdır. Menstrüel siklus sırasıyla foliküler ve luteal olmak üzere iki kısma ayrılır.

### **2.5.1. Foliküler Faz**

Bir önceki siklusun sonunda serum FSH düzeyi yükselmeye başlar ve siklusun foliküler fazının ilk beş gününde de devam eder. FSH'deki bu yükselme daha önce büyümeye başlayıp 1-2mm. çapına ulaşmış olan 3 ila 30 antral folikülün büyümelerini sürdürebilmelerini sağlar. Bu grup folikülden sadece bir tanesi büyümesini sürdürecektir; diğerleri ise atreziye uğrayacaktır.

FSH foliküldeki granüloza hücrelerinden aktivin ve inhibin salgılatır. İnhibin hipofiz bezinden FSH sentez ve salgısını doğrudan inhibe eder ve teka hücrelerinden LH'a bağımlı androjen salgısını da artırır. İnhibin birbirlerine disülfid bağları ile bağlı iki peptidten oluşur. İnhibin A ve İnhibin B denilen iki tipi vardır. Bunlarda  $\alpha$  ünitesi ortaktır,  $\beta$  ünitesi farklılık gösterir. Yalnızca  $\beta$  alt ünitelerinin bir araya gelmesiyle Aktivinler oluşur ve etkileri inhibinin tam tersidir. FSH'a bağımlı esterojen ve inhibin salgısını güçlendirir. Granüloza hücrelerinden progesteron salgısını baskılar. Aktivin aromataz aktivitesini artırarak estrojen sentezini uyarırken FSH reseptörlerinin çoğalmasını da stimüle eder. İnhibin ise teka hücrelerinden androjen salgılatır ki bu da estrojen yapımı için öncü madde görevi görür. Ancak artan estrojen ve inhibin negatif feed-back ile FSH'ı baskılar ve sonuçta siklusun 5-7. günlerinde düşmeye başlar. Foliküler fazın oluş mekanizması Şekil 2.2'de verilmiştir.

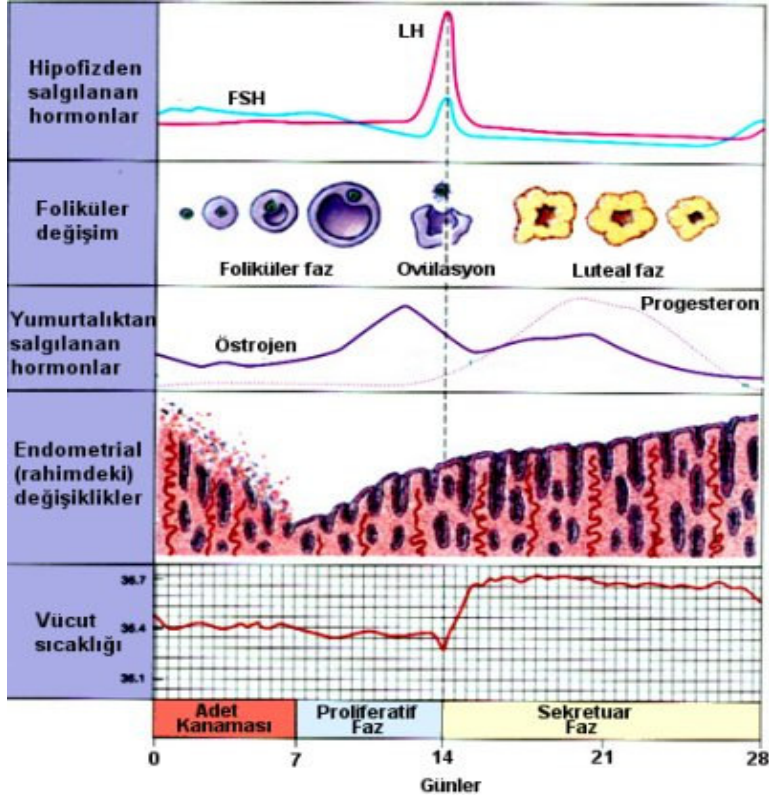


**Şekil 2.2.** Foliküler fazın oluş mekanizması.

FSH reseptörü açısından en zengin olan folikül dominans kazanıp gelişirken diğerleri geriler. Dolaşımdaki FSH, foliküler fazın ikinci yarısında düşerken bazal LH da yavaş yavaş yükselir. FSH ve östrojen sinerjistik olarak granuloza hücrelerinde LH reseptörlerinin oluşumunu indüklerler. Östrojen gonadotropin salgısının en güçlü inhibitörü iken 200-300pg/ml düzeylerinde 50 saat kadar kalması hipofize pozitif feed-back etki yapar ve LH'nin ani yükselmesine(surge) neden olur. Artan östrojen hipofiz bezinin GnRH'ye duyarlılığını logaritmik olarak artırır ve GnRH'nin gonadotropin salgılatıcı etkisi LH surge'ü olana kadar devam eder<sup>18</sup>.

Menstrual döngü esnasında FSH, LH ve östrojen hormonlarının düzeyleri ve meydana gelen diğer olayların şeması Şekil 2.3'de verilmiştir.





Şekil 2.3. Menstrual döngü ve hormon konsantrasyonları.

İnhibinin temel fonksiyonu, hipofizden FSH salgılanmasını negatif feedback mekanizması ile düzenlemektir. MacNaughton ve arkadaşlarının 1992 yılında yaptıkları çalışma neticesinde ileri sürdükleri görüşe göre, serum inhibin konsantrasyonunda bir azalma olduğu takdirde, yumurta foliküllerinde de bir azalma görülür. Bundan dolayı inhibin salgılanmasında ki bir azalma, FSH miktarındaki artıştan sorumludur denebilir. FSH miktarında ki artış yumurta rezervinin azalmasına neden olur. Menopoza geçiş döneminde FSH salgılanmasındaki artışın folikül tükenme oranındaki artışla paralel oluşu, bu görüşün doğru olduğunu göstermektedir<sup>19</sup>.

Prematür menopoz hastalarının hormon testleri de bu görüşü desteklemektedir. Pampfer ve Thomas tarafından 1989'da yapılan bir çalışmada prematür menopozlu kadınlarda inhibin salgılanmasında bir azalma tespit edilmiştir. Prematür menopozlu kadınlarla infertil kadınlar karşılaştırıldığında, prematür menopozlu kadınlarda yumurtlama zamanında inhibin seviyesinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca prematür menopozlu kadınlarda

folikül safhasında ve luteal fazda inhibin konsantrasyonlarının daha düşük olduğu bildirilmiştir<sup>20</sup>.

Sonuç olarak herhangi bir inhibin geninde meydana gelebilecek bir mutasyon, aktif olan inhibinlerin miktarında bir azalmaya neden olacaktır. Bu durumda, hipofize uygulanan negatif feed back mekanizmasının ortadan kalkmasına ve FSH konsantrasyonunun artışına neden olacaktır. Bu durumun sonucunda da foliküllerin erken tükenmesi olayı gerçekleşecektir. Bu mekanizmanın da prematüre menopoza neden olduğu düşünülmektedir<sup>8,21</sup>.

## 2.6. İnhibin Proteini ve İnhibin Alfa Geni

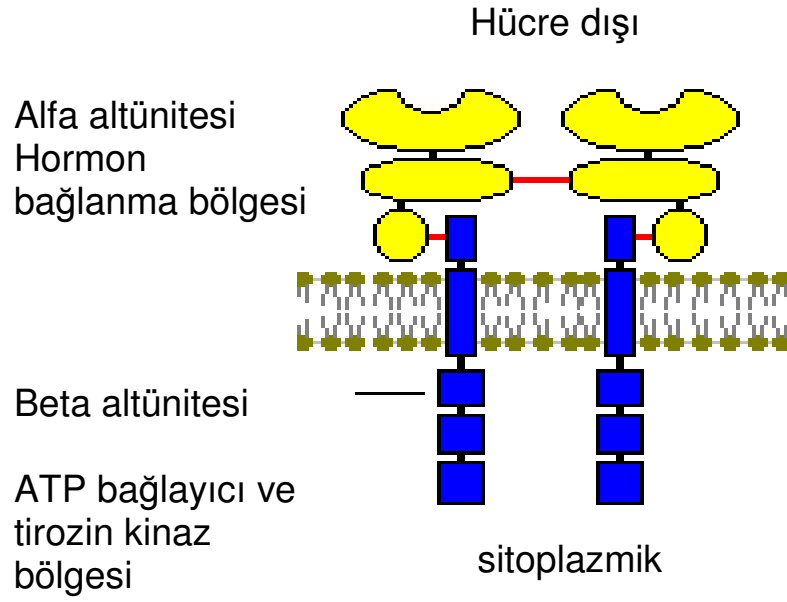
İnhibinin proteininin, yumurta foliküllerinin gelişiminde rol oynayan FSH'ın negatif feed back mekanizmasındaki önemli fonksiyonu nedeni ile prematür menopozdan sorumlu olabileceği düşünülmektedir<sup>6,7</sup>. İnhibinler ve aktivinler, proteinlerin TGF- $\beta$  süper ailesinden olan multifonksiyonel hormonlardır. FSH sentez ve sekresyonunu inhibe ve stimule etmekle görevlidirler.

Olgunlaşmış bir inhibin 31-32 kDa'luk heterodimerik bir glikoproteindir. Bunun 18kDa'lık  $\alpha$ -subünitesi, 14 kDa'lık  $\beta$ -subünitesine disülfid bağlarla bağlıdır.

İnhibin A ( $\alpha$ - $\beta$ A)

İnhibin B ( $\alpha$ - $\beta$ B)

$\beta$ -alt ünitesinin homodimeri ise bir glikoprotein olan aktivindir. İnhibinin tam tersi bir fonksiyona sahiptir<sup>22,23,24</sup>. İnhibin proteininin yapısı Şekil 2.4'de verilmiştir.



**Şekil 2.4.** İnhibin proteinin subüniteleri<sup>25</sup>.

İnhibinin alt üniteleri 3 ayrı gen tarafından kodlanmaktadır. Bu genler ve kodlandıkları bölgeler;

- INH  $\alpha$  (2q33-q36)
- INH $\beta$ A (2cen-q13)
- INH $\beta$ B (7p15-p14)

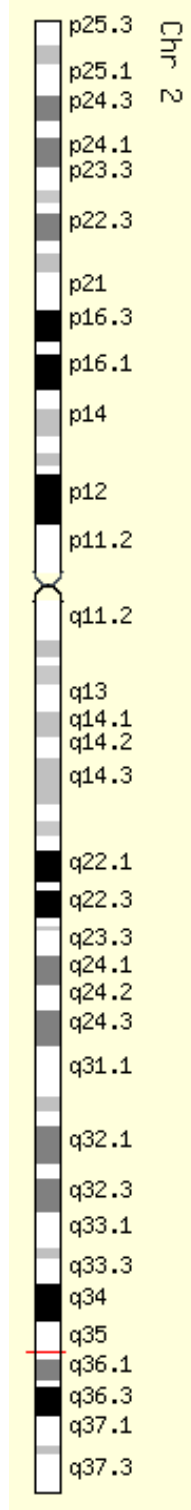
İnhibin  $\alpha$  geni 2. kromozomun q33-q36 bölgesinde lokalize olmuştur. 366 aminoasitten oluşan inhibin alfa geni 39669 Da ağırlığındadır<sup>9</sup>. İnhibin alfa geninin amino asit dizisi Şekil 2.5' de, inhibin alfa geninin dizisi Şekil 2.6'da ve 2. kromozom üzerinde lokalize olduğu bölge Şekil 2.7'de verilmiştir.

MVLHLLLFLL LTPQGGHSCQ GLELARELVL AKVRALFLDA LGPPAVTREG GDPGVRRLPR RHALGGFTHR  
 GSEPEEEEDV SQAILFPATD ASCEDKSAAR GLAQEAEEGL FRYMFRPSQH TRSRQV TSAQ LWFHTGLDRQ  
 GTAANSSEPE LLGLLALSPG GPVAVPMSLG HAPPHWAVLH LATSALSLLT HPVLVLLLRRC PLCTCSARPE  
 ATPFLVAHTR TRPPSGGERA RRS TPLMSWP WSPSALRLLQ RPPEEPAAHA NCHRVALNIS FQELGWERWI  
 VYPPSFIFHY CHGGCGLHIP PNL SLPVPGA PPTPAQPYSL LPGAQPCCAA LPGTMRPLHV RTTSDGGYSE  
 KYETVPNLLT QHCACI

**Şekil 2.5.** İnhibin alfa geninin aminoasit dizisi<sup>26</sup>.

GAAGGACTGG GGAAGACTGG ATGAGAAGGG TAGAAGAGGG TGGGTGTGGG ATGGGGAGGG GAGAGTGAA  
 AGGCCCTGGG CAGACCCTGG CAGAAGGGGC ACGGGGCAGG GTGTGAGTTC CCCACTAGCA GGGCCAGGTG  
 AGCTATGGTG CTGCACCTAC TGCTCTTCTT GCTGCTGACC CCACAGGGTG GGCACAGCTG CCAGGGGCTG  
 GAGCTGGCCC GGGAACTTGT TCTGGCCAAG GTGAGGGCCC TGTTCTTGGA TGCCTTGGGG CCCCCGCGG  
 TGACCAGGGA AGGTGGGGAC CCTGGAGTCA GCGGCTGCC CCGAAGACAT GCCCTGGGGG GCTTCACACA  
 CAGGGGCTCT GAGCCCGAGG AAGAGGAGGA TGTCTCCCAA GCCATCCTTT TCCCAGCCAC AGATGCCAGC  
 TGTGAGGACA AGTCAGCTGC CAGAGGGCTG GCCCAGGAGG CTGAGGAGGG CCTCTTCAGA TACATGTTCC  
 GGCCATCCCA GCATACACGC AGCCGCCAGG TGACTTCAGC CCAGCTGTGG TTCCACACCG GGCTGGACAG  
 GCAGGGCACA GCAGCCTCCA ATAGCTCTGA GCCCTGCTA GGCCTGCTGG CACTGTCACC GGGAGGACCC  
 GTGGCTGTGC CCATGTCTTT GGGCCATGCT CCCCTCACT GGGCCGTGCT GCACCTGGCC ACCTCTGCTC  
 TCTCTTGCT GACCCACCCC GTCCTGGTGC TGTGCTGCG CTGTCCCCTC TGTACCTGCT CAGCCCGGCC  
 TGAGGCCACG CCCTTCTGG TGGCCACAC TCGGACCAGA CCACCCAGTG GAGGGGAGAG AGCCCGACGC  
 TCAACTCCCC TGATGTCCTG GCCTTGGTCT CCCTCTGCTC TCGCCTGCT GCAGAGGCT CCGGAGGAAC  
 CGGCTGCCCA TGCCAACTGC CACAGAGTAG CACTGAACAT CTCCTTCCAG GAGCTGGGCT GGGAACGGTG  
 GATCGTGTAC CCTCCAGTT TCATCTTCCA CTACTGTCAT GGTGGTTGTG GGCTGCACAT CCCACCAAAC  
 CTGTCCCTTC CAGTCCCTGG GGCTCCCCCT ACCCCAGCCC AGCCCTACTC CTGCTGCCA GGGGCCAGC  
 CCTGCTGTGC TGCTCTCCCA GGGACCATGA GGCCCTACA TGTCCGCACC ACCTCGGATG GAGGTTACTC  
 TTCAAGTAT GAGACAGTGC CCAACCTTCT CACGCAGCAC TGTGCTTGTA TCTAAGGGTG GGGGGTCTTC  
 CTCTTAATC CCATGGCTGG TGGCCACGCC CCCACCATCA TCAGCTGGGA GGAAAGGCAG AGTTGGGAAA  
 TAGATGGCTC CCACTCCTCC CTCCTTTCAC TTCTCTGCT ATGGGCTACC CTCCCACCC CACTTCTATC  
 TCAATAAAGA ACACAGTGCA TATG

**Şekil 2.6.** İnhibin alfa geninin dizisi<sup>26</sup>.



**Şekil 2.7.** İnhibin alfa geninin 2. kromozom üzerinde yeri<sup>27</sup>.

İnhibin alfa geni üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde prematür menopozdan sorumlu olabileceği düşünülen bir mutasyon tespit edilmiştir. İnhibin alfa geninin ekson 2 bölgesinde bulunan 769. nükleotit olan guanin adenine dönüşmektedir. Bu bir missense mutasyondur. 257. kodona tekabül eden bu mutasyon neticesinde alanin aminoasiti treonin aminoasitine dönüşmektedir. Bu genin, mutasyon bulunduğu belirlenen ekson 2 bölgesini içine alan 243 bç'lik alanı PCR/RFLP yöntemi kullanılarak incelendiğinde normal, heterozigot mutant ve homozigot mutant olduğu takdirde beklenmesi gereken bant uzunlukları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Mutasyon için kullanılan enzim ve kesim sonucu oluşan bant uzunlukları.

<b>Mutasyon</b>	<b>Enzim</b>	<b>Normal</b>	<b>Mutant Heterozigot</b>	<b>Mutant Homozigot</b>
<b>769 G→A (Missense)</b>	<b>BvbI</b>	<b>25 bç 85 bç 134 bç</b>	<b>25 bç 85 bç 134 bç 159 bç</b>	<b>85 bç 159 bç</b>

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Kan Eldesi**

Bu tez çalışmasında çalışma grubunu Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı'nda ve Doğuş Tıp Merkezi'nde Prematür Menopoz klinik tanısı konulmuş 28 hasta oluşturmuştur. Bu hastalardan alınan kan örnekleri DNA izolasyonu amacı için EDTA'lı tüplere (2-3 cc) alınmış ve moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere laboratuvarımıza getirilmiştir.

#### **3.2. Araçlar ve Gereçler**

##### **3.2.1. Cihazlar**

Bu çalışmada kullanılan başlıca cihazlar ve teknik malzemeler aşağıda verilmiştir:

1. Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler)
2. Jel görüntüleme cihazı (Uvitec)
3. Santrifüj (Universal 16R)
4. Hassas terazi (Sartorius)
5. Su banyosu (Elektromas)
6. Otomatik pipetler (Gilson, Pipetman ve Socorex)
7. Vorteks ( Nüve NM110)
8. UV transilluminatör (Vilber Lourmat)
9. Yatay ve dikey elektroforez tankları ve güç kaynağı (Biogen, Biolab, Maxicell)
10. Deepfreeze (Siemens)
11. Buzdolabı (Arçelik 450)

Bu teknik malzemeler araştırmanın yapıldığı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Laboratuvarlarında bulunmaktadır.

### 3.2.2. Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir:

1. Taq polimeraz (Fermantas)
2. Magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ) (Fermantas)
3. PCR tamponu (Fermantas)
4. Restriksiyon enzimi (Delta Kimya)
5. Msp ile kesilmiş pUC 19 marker DNA (Fermantas)
6. Primerler (Fermantas)
7. Deoksinükleosit Trifosfat seti (Delta Kimya)
8. Agaroz (Promega)
9. Akrilamid (Delta Kimya)
10. Saf Etanol (Riedel-de Haen)
11. DNA izolasyonu, PCR ve Elektroforez ile ilgili diğer kimyasal maddeler (Delta Kimya, Sigma ve Merck)

### 3.3. Yöntem

Prematür Menopoz teşhisi konulmuş hastalardan alınan kan örneklerinden tuzla çöktürme yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Inhibin  $\alpha$  geninin exon 2 bölgesinin içinde bulunan 243 bç'lik bölge Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmiştir. PCR işleminde bu bölgeyi kapsayan uygun Forward ve Reverse primerler kullanılmıştır. PCR ile çoğaltılan bölgeler uygun Restriksiyon endonukleaz enzimleri kullanılarak kesilmiştir. Kesim işleminden sonra örnekler %10'luk poliakrilamid jelde ve agaroz jelde yürütülerek elde edilen bantlara göre sonuçlar yorumlanmıştır.

Kullanılan restriksiyon endonukleaz enzimi ve kesim noktası çizelge 3.1'de verilmiştir.



**Çizelge 3.1.** Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ve Kesim Noktası.

Restriksiyon endonükleaz enzimi	Kesim Noktası
Bse XI (BbvI)	5' <b>G C A G C (N)<sub>8</sub></b> 3' 3' <b>C G T C G (N)<sub>12</sub></b> 5'

### 3.3.1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda Miller et al.'in tuzla çöktürme (salting out) yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. DNA izolasyonunda kullanılan kan miktarı ve kimyasal bileşikler izolasyon protokolünde yer alan miktarlara bağlı kalınarak belirlenmiştir. İzolasyonda kullanılan solüsyonlar ve izlenilen yol aşağıdaki şekildedir.

1. 1,5 ml'lik steril bir tüpe 1 ml Eritrosit lizis tamponu ilave edildi. Tüpün kapağı kapatılıp alt-üst edilerek homojen karışım sağlandı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
2. 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve pipetle supernatan uzaklaştırıldı.
3. Aynı işlem ikinci bir kez tekrarlandı.
4. Lökosit pelleti üzerine 1 ml fizyolojik tampon ilave edildi.
5. 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra supernatan uzaklaştırıldı. Bu işlem eğer lökosit pelleti kirliyse tekrarlanabilir.
6. Lökosit pelleti üzerine 300 µl TE-9 tamponu ilave edildi ve pipetleme yapılarak tüpün dibindeki çökelti dağıtılarak homojen hale getirildi.
7. Daha sonra bu karışımın üzerine 100 µl %10'luk SDS ve 15 µl Proteinaz K ilave edildi. Tüp alt-üst edilerek homojen karışım sağlandı.
8. 55-60 C°'de Ben-Maride 1 gece inkübe edildi.
9. 1 gecelik inkübasyondan sonra karışımın üzerine 150 µl doymuş tuz çözeltisi (6 M) ilave edildi. Bu aşamada beyaz bir bulanıklığın oluşması beklenir. Bulanıklık olmazsa 50 µl daha tuz çözeltisi ilave edilebilir.

10. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra supernatan steril bir ependorfa aktarıldı. Supernatan DNA içermektedir.

11. Daha sonra aktarılan supernatan bir kez daha santrifüj edilerek tuzun tamamı karışımdan uzaklaştırılmaya çalışıldı.

12. Santrifüj sonrasında supernatan ependorfa aktarıldıktan sonra solüsyonun hacminin 2-2.5 katı %99,5'lük etanol eklendi. Tüp 2-3 kez yavaşça baş aşağı edilerek DNA'nın presipite olması sağlandı. Bu aşamada DNA yumak şeklinde görüldü.

13. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra tüp ters çevrilerek alkol uzaklaştırıldı ve tüpün ağzı baş aşağı gelecek şekilde bir kurutma kağıdı üzerine konularak alkolün tamamının uzaklaştırılması için 15 dakika bekletildi.

14. Tüpe yaklaşık olarak 100 µl steril distile su konuldu.

15. DNA'nın tamamen çözünmesi ve DNAaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için 65 C°'de Ben-maride 10 dakika bekletildi.

16. Örnekler -20 C°'de PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir<sup>28,29</sup>.

### 3.3.2. PCR Reaksiyonunun Hazırlanması

PCR reaksiyonu hazırlanırken kullanılan bileşenler aşağıda verilmiştir.

- Primerler
- Termostabil DNA polimeraz
- dNTP karışımı
- MgCl<sub>2</sub>
- Reaksiyon tamponu
- Kalıp DNA

PCR reaksiyonları hazırlanmadan önce kullanılacak olan reaksiyon bileşenlerinin stokları günlük kullanımlar şeklinde hazırlanarak kontaminasyon riskini önlemek amacı ile steril ependorflara belirli hacimlerde paylaştırıldı. Örneklerimiz için optimum amplifikasyon koşullarının belirlenmesi için bazı denemeler gerçekleştirildi. Bu denemeler esnasında farklı tampon bileşimi, dNTP ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları denendi. Her denemede sadece bir değişken

dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyon koşullarının gerçekleştiği denemedeki konsantrasyonlar bütün PCR reaksiyonları için kullanıldı.

**Çizelge 3.2.** Optimal Amplifikasyonun Gerçekleştiği PCR Reaksiyonu

Reaksiyon bileşenleri	Stok Konsantrasyonları	Alınan Miktar
Primer (R)	20pmol/μl	1μl
Primer (F)	20pmol/μl	1μl
dNTP karışımı	25Mm	0,4μl
MgCl <sub>2</sub>	25Mm	3μl
Taq DNA polimeraz	1.25Ü/μl	0,06μl
Genomik DNA	35μl	0,5μl
PCR Tamponu	10X	5μl
Su (distile)	39,04	39,04 μl
<b>Toplam</b>		<b>50μl</b>

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri şu şekilde programlandı:

PCR reaksiyonunun hazırlanmasında sırasıyla şu basamaklar izlendi:

- Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar ve çözeltiler -20 °C'den alınıp çözdürüldü.
- %70'lik alkolle temizlenmiş laminar flow kabin içinde, üzerlerine örnek kodu yazılarak 200μl'lik PCR tüpleri hazırlandı.
- Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vortekslendi, daha sonra tüpün duvarındaki tüm damlaları toplamak amacıyla kısa bir süre santrifüj edildi.
- Reaksiyon hacmini tamamlamak için steril bidistile su içeren bir ampül kullanıldı.
- PCR mix hazırlamak için 200 μl'lik bir PCR tüpüne buz üzerinde daha önce hesap edilen miktarlarda 10X tampon, MgCl<sub>2</sub>, primerler, dNTP mix ve Taq polimeraz eklendi.
- Tüp önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Kodlanmış her bir PCR tüpüne önceden hesap edilen miktarda su ve kodunu taşıdıkları DNA eklendi.

- Daha sonra PCR mix tüplere eşit olarak dağıtıldı.
- Böylece tüplerin her birine tüm PCR bileşenleri yani DNA, 1OX tampon, MgCl<sub>2</sub>, primerler, dNTP'ler, Taq polimeraz ve su, buz üzerinde eklenmiş oldu.
- Tüpler önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Tüpler önceden programlanmış thermal cycler'a yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

Cihaz durduktan sonra PCR amplifikasyon ürününün elde edilip edilmediğini görmek amacıyla ürünler öncelikle %1.5'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Ürünler, 243 bp uzunluğunda olması beklenen fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker olan Msp I ile kesilmiş pUC18 veya pUC19 ile beraber yürütüldü. Uvitec jel görüntüleme cihazında diskete alınan jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı<sup>30</sup>.

#### **3.3.2.1. Primer Seçimi**

Prematür menopozdan sorumlu olduğu düşünülen inhibin alfa geninin baz dizisi internet taramaları yoluyla bulunmuştur. Bu konuyla ilgili daha önceden yayınlanmış olan makalelerden, bu çalışmada da mutasyon taraması yapılacak olan, genin exon 2 bölgesi içinde bulunan 243 bp'lik alana uygun primerler tespit edilmiştir<sup>31</sup>.

**Şekil 3.1.** İnhibin geninin tamamının amplifikasyonu için kullanılan primerler.

<b>Frgment</b>	<b>Size (bp)</b>	<b>Primers (5' to 3')</b>	<b>Location</b>
Inhibin alpha		<b>Forward</b>	
INH	<b>601</b>	<b>GCTGCTGCGCTGTCCCCTCTGTA</b>	<b>732...754</b>
		<b>Reverse</b>	
		<b>TATTTCCCAACTCTGCCTTTCCTC</b>	<b>1332...1309</b>
INH	1	<b>243</b>	<b>792...811</b>
		<b>Forward</b>	
		<b>GGCCCACACTCGGACCAGAC</b>	
		<b>Reverse</b>	
		<b>AGCCCACAACCACCATGACAGTAG</b>	<b>1034...1011</b>
INH	2	<b>139</b>	<b>963...983</b>
		<b>Forward</b>	
		<b>GCTGGGCTGGGAACGGTGGAT</b>	
		<b>Reverse</b>	
		<b>GGAGTAGGGCTGGGCTGGGGTAGG</b>	<b>1101...1078</b>
INH	3	<b>254</b>	<b>1079...1102</b>
		<b>Forward</b>	
		<b>CTACCCCAGCCCAGCCCTACTCCT</b>	
		<b>Reverse</b>	
		<b>TATTTCCCAACTCTGCCTTTCCTC</b>	<b>1332...1309</b>

5'

CCGGGTGTG AGCCTGGTCT GGTGGGTCAC CTCCCCTCTC

GGCCACAC TCGGACCAGA C

----->>

TCGGGCTGCG AGTTGAGGGG ACTACAGGAC CGGAACCAGA

GGGAGACGAG ACGCGGACGA CGTCTCCGGA GGCCTCCTTG

GCGCACGGGT ACGGTTGACG GTGTCTCATC GTGACTTGTA

GAGGAAGGTC CTCGACCCGA CCCTTGCCAC CTAGCACATG

CTACTGTCAT GGTGGTTGTG GGCT

-----<<

GGAGGGTCAA AGTAGAAGGT GATGACAGTA CCACCAACAC CCGA

3'

**Şekil 3.2.** İnhibin Alfa geninin 243 bç'lik bölgesi için kullanılan primer dizisi ve çoğaltılan bölge.

### 3.3.2.2. Programlama

PCR döngüleri denatürasyon, annealing (yapışma) ve ekstension (uzama) olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada primerlerin yapışacağı (annealing) ve DNA sentezinde kalıp görevi yapacak tek iplikli DNA molekülleri oluşturulur. Bu aşamada primerler tek iplikli DNA molekülüne bağlanmaktadır. Annealing sıcaklığı primerlerin nükleotid dizisine göre değişmektedir. İdeal annealing sıcaklığı primer kompleksinin erime sıcaklığı (Tm) hesaplanarak saptanabilir. Tm sıcaklığının yaklaşık olarak 5 C°'ye kadar aşağısındaki sıcaklık primer ile kalıp arasında ideal bağlanmayı sağlamaktadır. Tm sıcaklığının tespitinde, 20-mer'e kadar olan primerler için,  $Tm=4.(G+C)+2.(A+T)C^{\circ}$  formülü kullanılmıştır<sup>30</sup>.

1- Ön denatürasyon: 95 °C'de 5 dk

2- Denatürasyon : 94 °C'de 45 sn

Yapışma: 62 °C'de 45 sn

Sentez: 72 °C'de 45 sn

Toplam 30 döngü

- 3- Final sentez : 72°C'de 5 dk  
4- 4°C'de muhafaza

### 3.3.3. PCR Ürünlerinin Elektrofrez ve Kesimi

Her mutasyon için öngörülen PCR programları tamamlandıktan sonra amplifiye olan bölgeler %2'lik agaroz jelde analiz edildi. Bunu için PCR reaksiyonu ürünlerine 6X yükleme tamponundan 1/5 oranında (1 hacim yükleme tamponu, 5 hacim PCR reaksiyonu ürünü) eklendi. Örnekler agaroz jele yüklendikten sonra 100mA, 70V watt'ta 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu<sup>34</sup>. Elektrofrez sonucu Uvitec jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekilerek yorumlandı. Sonuçlar her mutasyon için kullanılan primerlerin çoğalttığı bölgelere göre beklenen bant uzunlukları moleküler weight marker yardımıyla yorumlanmıştır. Beklenen bantlar elektroforez sonucu tespit edildikten sonra mutasyon için öngörülen restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesim reaksiyonu hazırlanmıştır. Bu reaksiyon hazırlanırken kullanılan bileşenler ve stok solüsyonları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Kesim reaksiyonu bileşenleri.

	<b>Stok</b>	<b>Son hacim</b>
Restriksiyon enzim tamponu	10X	1X (2,5 µl)
Restriksiyon enzimi	3Ü/µl	1Ü/µl (0,5 µl)
PCR ürünü	–	10 µl
Distile su	–	12 µl
Son Hacim	–	25 µl

Çalışılan mutasyonlar %10'luk poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra Uvitec jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilip analizleri yapılmıştır.

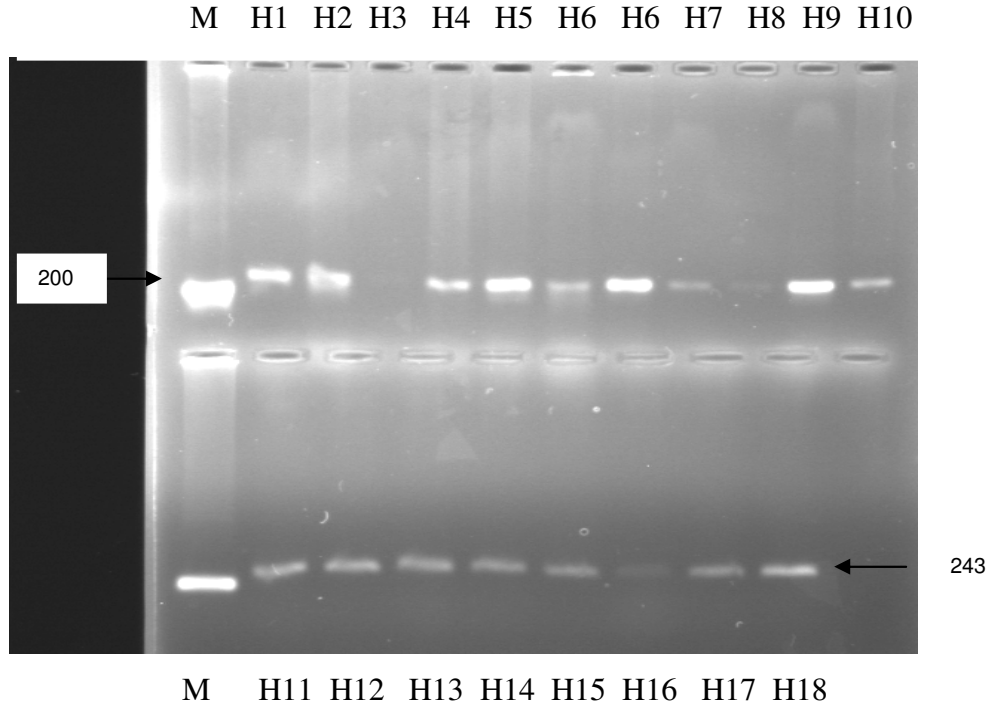
## 4. BULGULAR

Bu çalışma esnasında kullanılan DNA'lar, Ç.Ü Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında Prematür Menopoz tanısı konmuş 27 hasta ve Doğuş Tıp merkezi'nden de 1 hastaya ait kan örneklerinden ve 9 kişilik kontrol grubunun kan örneklerinden izole edilmiştir. Toplam 28 hastanın ve 9 kontrolün kullanıldığı çalışma populasyonunun özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Bu çalışmada, hipofiz bezinden FSH salgılanmasını regüle eden bir glikoprotein olan inhibinin, alfa subünitesini kodlayan inhibin alfa genindeki 769. nükleotiddeki Adenin Treonine dönüşmesi sonucu meydana gelen missense bir mutasyon taranmıştır. Hastalardan çalışma esnasında elde edilen PCR ve RFLP görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5'de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan örneklerden elde edilen, 243 bç'lik PCR ürünleri %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde marker ile birlikte yürütülmüştür. Daha sonra bu jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Bu örneklerin PCR amplifikasyon ürünleri Şekil 4.1' de verilmiştir.

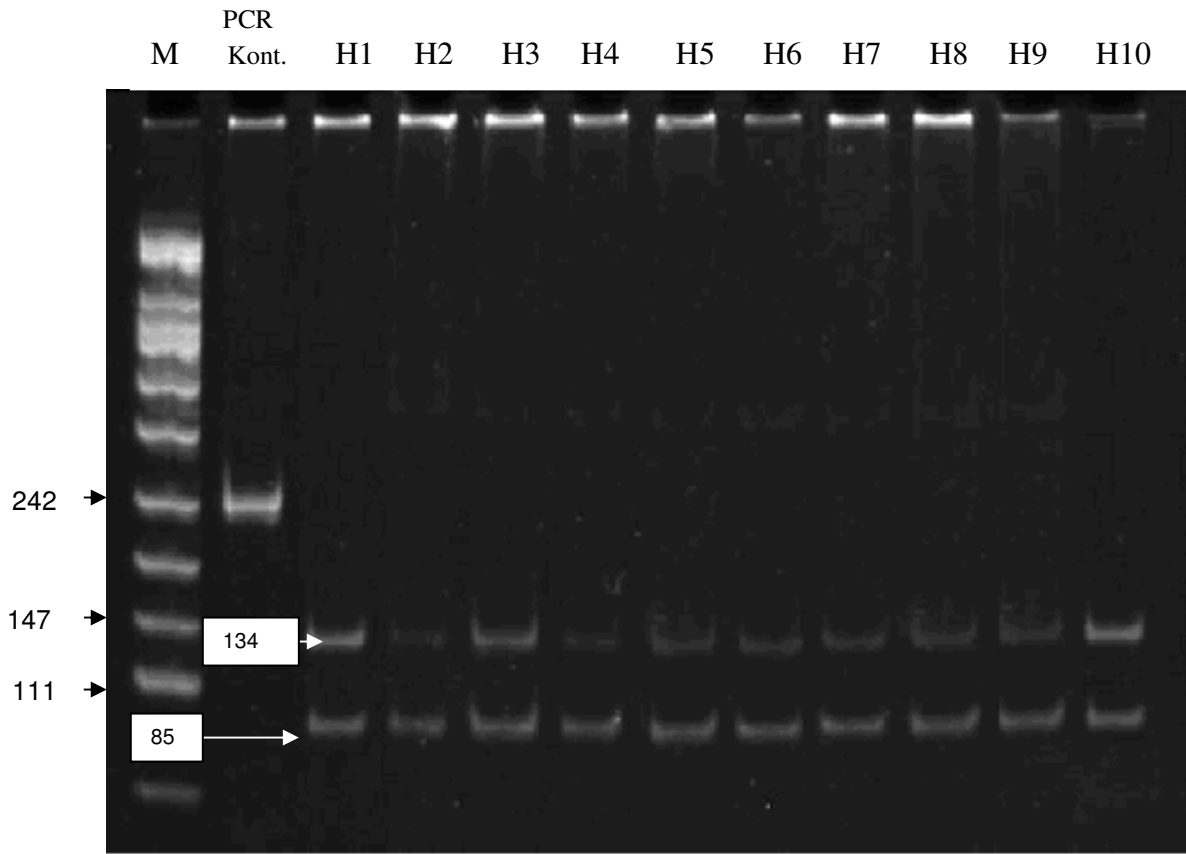




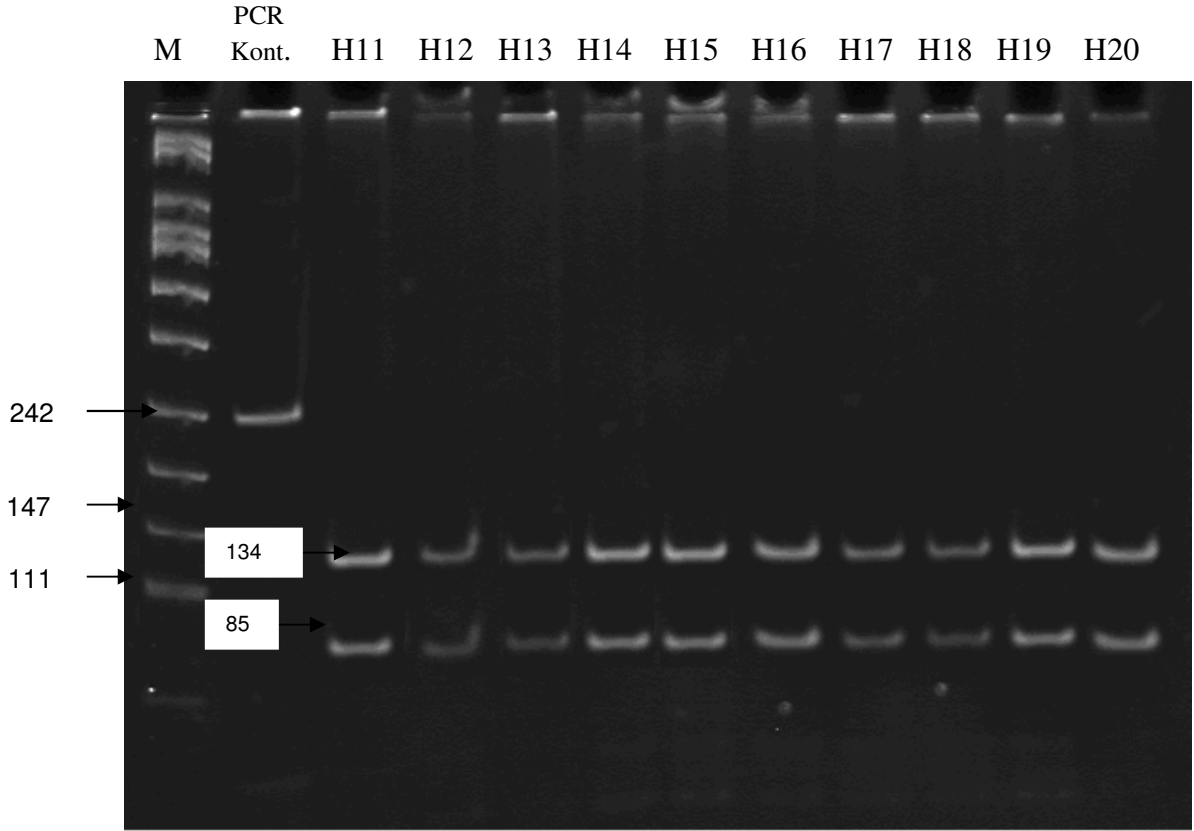
**Şekil 4.1.** Çalışmada kullanılan hastaların PCR görüntüleri.

İstenilen PCR ürünlerinin elde edildiği tespit edildikten sonra, bütün örneklerle, normal ürünleri belli bir bölgeden tanıyıp kesen Bbv I enzimi ile RFLP analizi yapılmıştır. Elde edilen kesimlerin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.2, 4.3, 4.4'de verilmiştir. Kesim ürünleri %10'luk jelde yürütülmüştür.

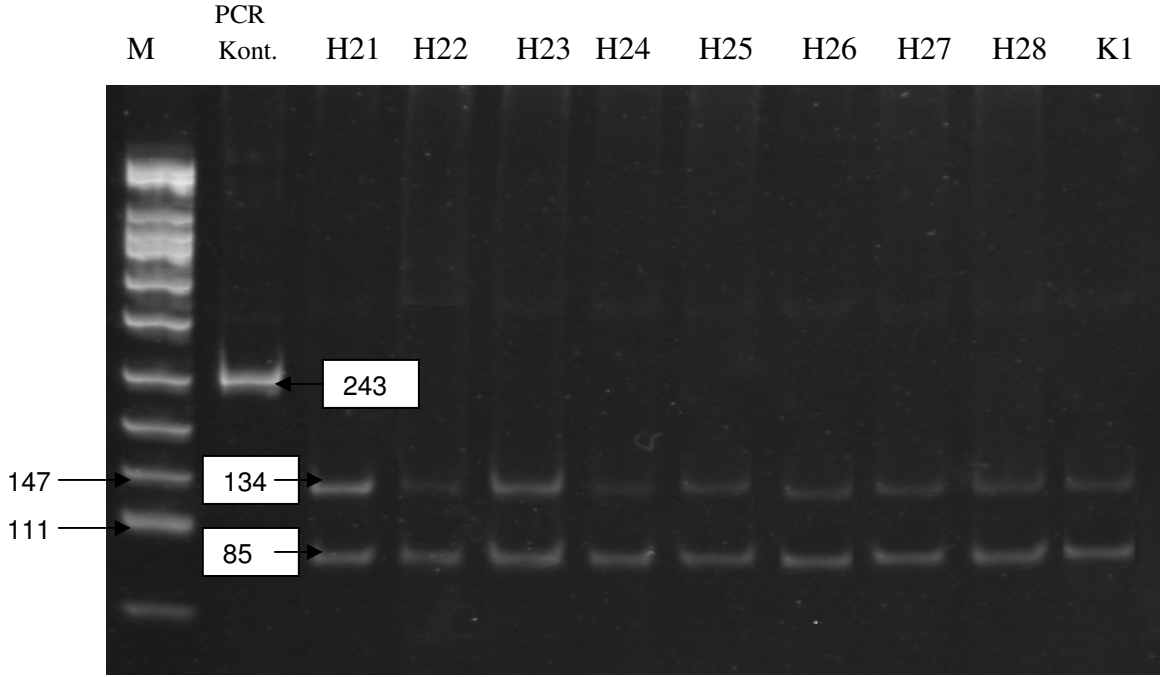
Bu çalışma da 28 hasta ve 9 kontrol kullanılmıştır. Hastaların hiçbirinde aradığımız 769 G→A mutasyonuna rastlanmamıştır. Beklenen mutasyon tespit edildiği takdirde görülmesi gereken 150bç ve 85bç'lik parçalar elde edilememiştir. Çalışılan hasta ve kontrollerde 134bç ve 85bç'lik parçalar elde edilmiştir.



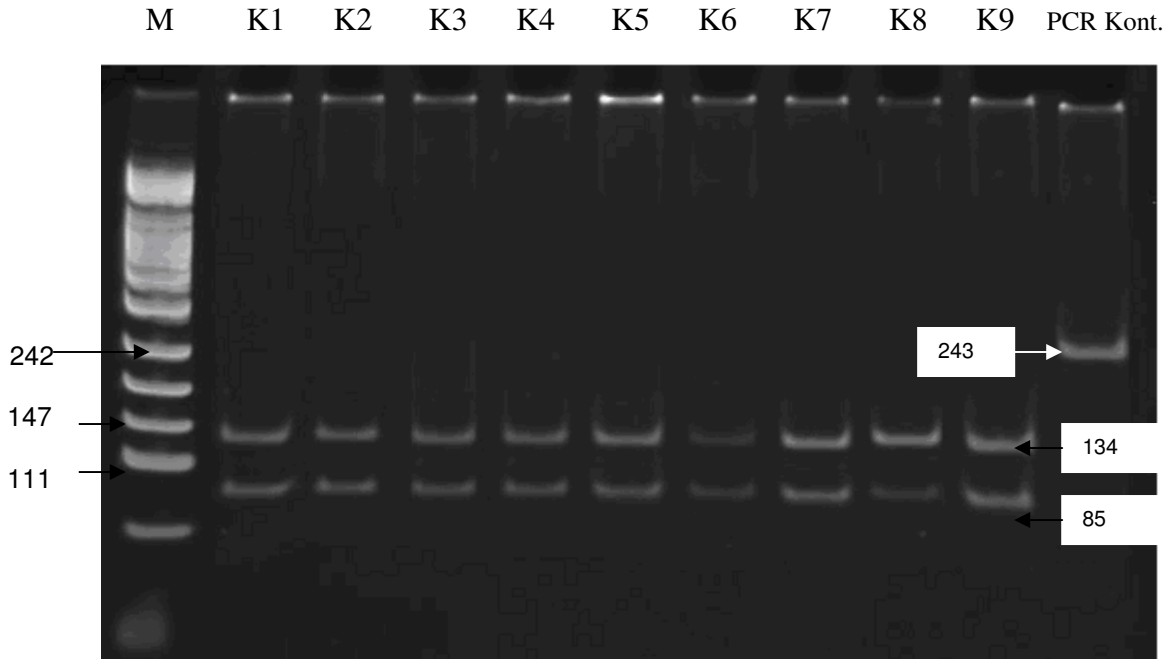
**Şekil 4.2.** Çalışmada kullanılan ilk 10 (1-10) hastanın Bbv I enzimi ile kesim ürünleri



**Şekil 4.3.** Çalışmada kullanılan 10 (11-20) hastanın Bbv I enzimi ile kesim ürünleri.



**Şekil 4.4.** Çalışmada kullanılan son 8 (21-28) hastanın Bbv I enzimi ile kesim ürünleri.



**Şekil 4.5.** Çalışmada kullanılan 9 kişilik kontrolün Bbv I enzimi ile kesim ürünleri.

## 5. TARTIŞMA

Prematür menopoz, 40 yaşın altındaki kadınlarda yumurtalıkların fonksiyonunu yitirmesi ile karakterize olan bir durumdur. Prematür menopoz'un en belirgin sonucu; fertilitenin yok olması ve hipo-östrojenizmdir. Prematür menopozun nedenleri olarak, X kromozom defektleri gösterilse de gerçek anlamda nedenleri bilinmemektedir<sup>12</sup>.

Inhibinin, yumurta foliküllerinin gelişiminde rol oynayan FSH'ın negatif feed back mekanizmasındaki fonksiyonu nedeni ile prematür menopozdan sorumlu olabileceği düşünülmektedir<sup>6,7</sup>.

Alaninin treonine dönüşümü korunumlu olmayan bir yer değiştirmedir ve fonksiyonel grubun yan zincirine bir alifatik hidroksil grubun eklenmesi ile sonuçlanır.

İnsan ile birçok hayvan INH  $\alpha$  gen dizisi arasında %80 oranında homoloji gözlenmektedir. Bu türlerin inhibin alfa proteinlerinin aminoasit dizileri karşılaştırıldığında, mutasyonun tespit edildiği 257. kodondaki alanin aminoasitinin bulunduğu bölgenin, bu türlerde yüksek korunumlu olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgi doğrultusunda, 257. kodondaki alaninin protein fonksiyonu üzerinde önemli bir rolü olduğunu düşünebiliriz. 257. kodonda meydana gelen aminoasit varyasyonunun fonksiyonel önemi henüz bilinmemektedir. Protein yapısının analizi sonucunda, bu kodonun reseptör bağlanma bölgesinde olduğu düşünülmektedir.

Inhibin molekülü, bir grup multifonksiyonel büyüme ve farklılaşma faktörü olan TGF- $\beta$  süper ailesinin bir üyesidir. INH  $\alpha$ , diğer TGF- $\beta$  ailesi üyeleri gibi, 7 korunumlu sisteine sahiptir. Fakat, inhibin alfa geninin birinci sisteininin upstreaminde bulunan aminoterminal bölgesi ile TGF- $\beta$  süper ailesinin diğer üyelerinden farklılık gösterir. Bu bölgenin reseptör bağlanma bölgesi olduğu düşünülmektedir. Alaninin Treonine dönüşmesi son olgunlaşmış peptidin reseptör bağlanma bölgesinde meydana geldiği düşünülmektedir. Bu da gösteriyor ki, 257'inci kodondaki Alanin, protein fonksiyonunda önemli bir role

sahip olabilir. Sonuç olarak bu mutasyonun prematür menopozlu hastalarda tespit edilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir<sup>32</sup>.

INH $\alpha$  genindeki G769A varyasyonu ilk olarak Yeni Zellanda'da rapor edilmiştir. Bu çalışmada 43 prematür menopoz hastasında sadece 3 kişide bu varyasyon tespit edilmiştir. 150 kişi kontrol grubu olarak kullanılmıştır sadece 1 kişi de bu varyasyon tespit edilmiştir<sup>12</sup>.

Yakın bir zamanda da İtalya'da yapılan bir çalışmada 7 prematür menopoz ve 3 primer amenorea vakasında bu varyasyon tespit edilmiştir.

Kore'de yapılan çalışmada ise 84 prematür hasta ve 100 kontrolde bu varyasyona rastlanmamıştır<sup>7,12</sup>.

En son olarak 2004'de Hindistan'da yapılan çalışmada 80 prematür menopoz, 33 primer amenorea ve 4 sekonder amenore hastası kullanılmıştır. Ala257Thr missense mutasyonu 80 prematür hastanın 9'unda (% 11.2), 33 primer amenorea hastasının 3'ünde (%9.1), 4 sekonder amenore hastasından 2'sinde (%50) tespit edilmiştir. Kontrollerde ise bu mutasyona hiç rastlanmamıştır<sup>13</sup>.

Yapılan bu çalışmalar sonucunda; tespit edilen bu mutasyonla prematür menopoz arasında bir korelasyon olduğu düşünülmektedir. Bu korelasyon sayesinde de prematür menopozun erken teşhisinin mümkün olabileceği ileri sürülmüştü<sup>12,13,33</sup>.

Bizim yaptığımız çalışmada ise Çukurova Bölgesinden elde edilen 28 hasta ve 9 kontrol kullanılmıştır. INH  $\alpha$  geninin ekson 2 bölgesinde olduğu tespit edilen 769 G $\rightarrow$ A mutasyonu açısından taranmıştır fakat bu varyasyona hiçbir hasta ve kontrolde rastlanmamıştır.

Yapılan araştırmalar sonucunda bu gende bazı etnik farklılıkların olduğu bildirilmiştir<sup>34,35</sup>.

Menopoz multifaktöriyel bir durumdur bu nedenle sadece INH  $\alpha$  geninin incelenmesiyle sonuca gidilemeyeceğini düşünmekteyiz. Daha kesin bir sonuca ulaşmak için menopozun oluş mekanizmasında ki diğer genlerle de kombine bir çalışma yapmak gerekir. Daha anlamlı bir sonuç elde etmek için hasta sayısının artırılması ve farklı etnik kökenlerden hasta gruplarının kullanılması da gerekmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### SONUÇLAR;

- Çalışmamızda FSH hormonunun sekresyonunu regüle ve stimüle eden inhibin protein geninin inhibin alfa alt ünitesindeki 257. kodondaki Alanin'in Treonin'e dönüşmesi ile sonuçlanan mutasyon 28 hasta ve 9 kontrol üzerinde çalışılmıştır. RFLP tekniği kullanılarak yaptığımız çalışmada hiçbir hastanın ve kontrolün bu mutasyonu homozigot veya heterozigot olarak taşımadığını tespit ettik.

### ÖNERİLER;

- Prematür menopozda INH alfa geni 769 A→G mutasyonu taraması yapılırken farklı etnik gruplardan ve daha fazla sayıda hasta kullanıldığı takdirde daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.
- PCR/PFLP tekniğinin, bu mutasyonun taranmasında güvenilir ve pratik bir yol olduğunu düşünmekteyiz.
- Prematür menopoz hastaları üzerinde yapılacak olan daha ileri çalışmalarla elde edilen varyasyonun kalıtımı daha fazla açıklığa kavuşacaktır.
- Bbv1 restriksiyon enzim analizine dayalı bir genetik test ile prematür menopozunun tanısı kolaylaşacaktır.
- Bu hastalığı taşıyan bireyler daha önceden bilgilendirilebilir. Erken teşhis edildiği takdirde bu hastalara hormon tedavisi uygulanabilir ve prematür menopoz geciktirilebilir.

## EKLER

### 1. Deneyleerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

#### 1.1. Stok Solüsyonlar

##### a) 1M Tris-HCl, pH 7.5

- 12,11 g Tris-base 100 ml distile su içinde çözümlü pH HCl ile 7.5'a ayarlandı.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak oda ısısında saklandı.

##### b) 6M NaCl

- 35,06 g NaCl 100 ml distile su içinde çözüldü.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak oda ısısında saklandı.

##### c) 1mM EDTA (Etilen diamin tetraasetik asit), pH 8,0

- 0,3722 g disodyum EDTA 1000 ml distile suda çözümlü pH 8'e ayarlandı.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak oda ısısında saklandı.

#### 1.2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar

##### a) Eritrosit Lizis Tamponu

- 2 ml Tris-HCl, pH 7,5 (final konsantrasyon 10mM)
- 1 ml 1M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (final konsantrasyon 5mM)
- 10,9 g Sukroz (final konsantrasyon 0,32 M)
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak +4 C°de saklandı.

##### b) Fizyolojik Tampon

- 0,4383 g NaCl (final konsantrasyon 0,075 M)
- 5 ml EDTA (final konsantrasyon 0,025 M)
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak +4 C°de saklandı.



**c) SDS Solüsyonu**

- 0,1 g SDS (final konsantrasyon %1)
- 0,08 g NaOH (final konsantrasyon 0,2 M)
- Distile su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak +4 C<sup>o</sup>'de saklandı.

**d) %70 Etil alkol**

- 70 ml %99,5 etil alkol'e 30 ml distile su eklendi.
- -20 C<sup>o</sup>'de saklandı.

**e)TE-9 Tamponu (pH 9)**

- 500 mM Tris base
- 20 mM EDTA pH 9,0
- 10 mM NaCl
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak +4 C<sup>o</sup>'de saklandı.

**1.3. Elektroforetik Analiz Solüsyonları**

**a) 10 X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu**

- 108 g Tris-base (0,9 M)
- 55 g Borik asid (0,9 M)
- 8,3 g EDTA pH 8,0 (20mM)
- Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- Manyetik karıştırıcıda çözülerek pH 8,0'e ayarlandı.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak oda ısısında saklandı.

**b) 1X TBE (Çalışma solüsyonu)**

- 100 ml 10X TBE üzerine, 900 ml distile su eklendi.
- Elektroforez tankına konularak kullanıldı.

**c) Etidiyum Bromid Solüsyonu (10mg/ml)**

- 0,1 g etidiyum bromid 10 ml distile su içinde çözüldü.
- Işığa hassas olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak +4C<sup>o</sup>'de saklandı.

**d) Yükleme tamponu (6X)**

- 1 X TBE
- %40 Sukroz
- %0,025 Brom fenol mavisi

**e) %40 Akrilamid**

- 39 g akrilamid
- 1 g N,N' metilen bisakrilamid
- 80 ml distile su içinde çözüldü.
- Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**f) %25 Amonyum persülfat**

- 0,25 g Amonyum persülfat
- 0,5 ml distile su içinde çözüldü.
- Son hacim distile su ile 1 ml'ye tamamlandı.
- +4'de muhafaza edildi<sup>31</sup>.