

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PREMATÜR MENOPOZ VE KATEKOL-O-METİLTRANSFERAZ
(COMT) GEN POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Ebru DERİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

MERSİN – 2003

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

PREMATÜR MENOPOZ VE KATEKOL-O-METİLTRANSFERAZ
(COMT) GEN POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Ebru DERİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

Tez No: 11...

MERSİN – 2003

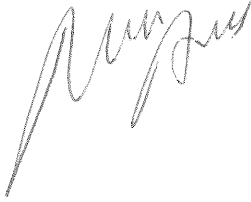
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Prematür Menopoz ve Katekol-O-Metiltransferaz (COMT) Gen Polimorfizmi Arasındaki İlişki” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

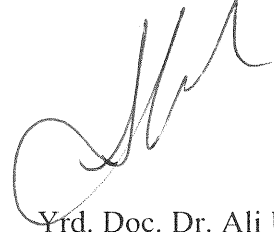
Tez Savunma Tarihi 18/04/2003



Doç. Dr. M. Emin ERDAL
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Ali ÜNLÜ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun...28.04.2003..tarih ve...4132..sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Canan ERDOĞAN

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince değerli yardım ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Sn. Yrd. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ'e teşekkür ederim.

Tezimin başlangıcından itibaren fikirleri ile bana yol gösteren, bu çalışma için gerekli malzeme olanaklarını sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Doç. Dr. M. Emin ERDAL'a teşekkür ederim.

Lisans eğitimine başladığım zamandan itibaren desteğini her zaman hissettiğim Anabilim Dalımız Öğretim Üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. Etem AKBAŞ'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimine başladığım andan itibaren desteklerini benden esirgemeyen, bu çalışma süresince de gerek manevi destekleri, gerekse örnek sağlama konusundaki katkılarından dolayı Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Ali MATUR'a teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında özellikle vaka ve deney gruplarındaki örnekleri sağlamamdaki desteklerinden dolayı Sn. Dr. Bayram Ali GÜVELİOĞLU'na teşekkür ederim.

Tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. Handan ÇAMDEVİREN'e teşekkür ederim.

Bu çalışmam sırasında fikirleri ve her türlü destekleri ile katkıda bulunan tüm mesai arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam sırasında da beni sürekli olarak manevi açıdan destekleyen anneme ve babama sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Menopozun Tarihi.....	3
2.2. Tanım ve Terminoloji.....	5
2.3. Menopozun Sosyolojik Açısından Değerlendirilmesi.....	7
2.4. Menopoz Yaşı.....	8
2.5. Prematür Menopoz.....	10
2.5.1. Tanı.....	11
2.5.2. Prematür Menopozun Etiyolojisi ve Etkileyen Faktörler.....	11
2.6. Prematür Menopoz ve Katekol-O-Metiltransferaz (COMT) Geni.....	12
2.6.1. COMT Geni ve Proteinler.....	13
2.6.1.1. Bir COMT Geni ve İki Protein.....	13
2.6.1.2. COMT'un Üç Boyutlu Yapısı.....	15
2.6.1.3. COMT ve Enzimolojik Olaylar.....	16
2.6.1.4. COMT'un Genetik Polimorfizmi.....	17
2.6.1.5. COMT'un Vücuttaki Dağılımı.....	18
2.6.2. COMT'un Substratları.....	20
2.6.3. Östrojen Metabolizması ve COMT'un Rolü.....	21
2.6.4. Menopozal Durumda COMT'un Rolü.....	23
2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği (PCR).....	25
2.7.1. PCR'nin Temel Bileşenleri.....	25
2.7.2. PCR'nin Evreleri.....	28

2.8. Restriksiyon Enzimi Parça Uzunluk Polimorfizmi Tekniği (RFLP).....	31
2.9. Elektroforez Teknikleri.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	36
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
3.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	37
3.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	37
3.3.2. PCR-RFLP İçin Kullanılan Kimyasallar.....	38
3.3.3. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	39
3.4. DNA İzolasyonu.....	40
3.5. Moleküler Analizi.....	41
3.5.1. PCR Tekniği.....	41
3.5.2. Elektroforez Tekniği.....	42
3.5.3. RFLP Tekniği.....	43
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi.....	44
3.7. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
7. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-2.1.....	7
Şekil-2.2.....	9
Şekil-2.3.....	15
Şekil-2.4	19
Şekil-2.5	22
Şekil-2.6	23
Şekil-2.7	30
Şekil-2.8	34
Şekil-4.9	46
Şekil-4.10	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge-2.1.....	12
Çizelge-4.2.....	45
Çizelge-4.3.....	47
Çizelge-4.4	48
Çizelge-4.5.....	48

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

16α-OH-E:	16 α -hidroksiöstrojen
2-CH₃O-E:	2-metoksiöstrojen
3-OMD:	3-O-metil-dopa
4-CH₃O-E:	4-metoksiöstrojen
4-OH-E:	4- hidroksiöstrojen
AdoMet:	S-adenozil L-methionine
Asn:	Asparajin
Asp:	Aspartik asit
bp:	Baz Çifti
cDNA:	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CE:	Katekolöstrojen
COMT:	Katekol-O-Metiltransferaz
COMT-HH:	Yüksek Akitiviteli Katekol-O-Metiltransferaz Genotipi
COMT-HL:	Orta Akitiviteli Katekol-O-Metiltransferaz Genotipi
COMT-LL:	Düşük Akitiviteli Katekol-O-Metiltransferaz Genotipi
dATP:	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP:	Deoksisitozin trifosfat
dGTP:	Deoksiguanozin trifosfat
DNA:	Deoksiribonükleik asit
dNTP:	Deoksiribonükleosid trifosfat
dTTP:	Deoksitimidin trifosfat

EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
FSH:	Folikül Stimulan Hormon
GSH:	Glutation S-transferaz
H₂O:	Su
kb:	Kilobaz
kDa:	Kilodalton
Lys:	Lizin
MAO:	Monoamin oksidaz
MB-COMT:	Membrana Bağlı Katekol-O-Metiltransferaz
Met:	Methionin
MgCl₂:	Magnezyum klorür
mRNA:	“Messenger” (haberci) ribonükleik asit
NaCl:	Sodyum klorür
Na₂ EDTA:	Sodyum-2-etilendiamintetraasetik asit
OR:	Odds oranı
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PET:	Positron Emisyon Tomografi
Pro:	Prolin
RE:	Restriksiyon Endonükleazı
RFLP:	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA:	Ribonükleik asit
S-COMT:	Soluble (Erimiş) Katekol-O-Metiltransferaz
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
TBE:	Tris-borat- etilendiamintetraasetik asit

TE:	Tris-etilendiamintetraasetik asit
Tm:	Erime Isısı
Tris-HCl:	Tris-Hidroklorid
Trp:	Triptofan
Topt:	Optimum Isı
UV:	Ultraviöle
Val:	Valin

ÖZET

Prematür Menopoz ve Katekol-O-Metiltransferaz (COMT) Gen Polimorfizmi Arasındaki İlişki

Menopoz, ovaryum follikül aktivitesinin kaybı nedeniyle menstruasyonun kalıcı olarak sonlanmasıdır (47). Prematür menopoz, 40 yaş ya da altındaki bayanlarda menstruasyonun sonlanmasıdır. Prematür menopozun etiolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır ancak olayın temel nedeni ovaryumlardaki folliküllerin tükenmesi sonucu östrojen miktarındaki azalmadır (15).

Katekolöstrojenler (CE), östrojen metabolizmasında ana metabolik yolda rol oynar (8). Katekol-O-metiltransferaz (COMT), S-adenozilmethionin'deki bir metil grubunun, dopamin, epinefrin ve neorepinefrini içeren katekolaminlere transferini katalizler. COMT enzim aktivitesi, yüksek, orta ve düşük aktivite olmak üzere insanda karaciğer ve critrositlerde genetik olarak polimorfiktir. COMT genindeki 158. pozisyonda G-A transisyonundan kaynaklanan bu polimorfizm, valin aminoasitinin methionin'e substitüsyonu ile sonuçlanır. Bu iki allel, Nla III restriksiyon enzimi kullanılarak, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ve RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) analizleri ile tanımlanabilir (27).

Bu çalışmada, COMT gen polimorfizmi ile prematür menopoz arasındaki ilişkiyi incelemek amaçlandı. PCR-RFLP yöntemi ile 37 prematür menopoz ve 38 menopozlu hastanın genotiplenmesi yapıldı. H/H, H/L ve L/L genotiplerinin dağılımı prematür menopoz grubunda sırasıyla % 13.5, % 67.6 ve % 18.9, menopoz grubunda ise % 15.8 % 73.7 ve % 10.5 olarak saptandı. Prematür menopoz ve menopoz grupları arasında, COMT-HH, COMT-HL ve COMT-LL genotipleri açısından bir fark saptanmadı ($p>0.05$ ve $\beta=0.595$).

Anahtar Sözcükler: Katekol-O-metiltransferaz (COMT), prematür menopoz, genetik polimorfizm

ABSTRACT

Association Between Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Gene Polymorphism and Premature Menopause

Menopause is the permanent cessation of menstruation resulting from the loss of ovarian follicular activity (47). Premature menopause is defined as the cessation of menstruation at age 40 or under. The etiology of premature menopause is still uncertain although the fundamental reason is known to be ovarian follicul failure that reduced of estrogen level (15).

Catecholestrogens (CE) represent a major metabolic pathway in estrogen metabolism (8). Catechol-O-methyltransferase (COMT) catalyzes the transfer of a methyl group from S-adenosylmethionine to catecholamines, including the neurotransmitters dopamine, epinephrine, and norepinephrine. The level of COMT enzyme activity is genetically polymorphic in human red blood cells and liver, with a trimodal distribution of low, intermediate, and high levels of activity. This polymorphism is due to a G-to-A transition at codon 158 of the COMT gene, resulting in a valine-to-methionine substitution. The 2 alleles could be identified with a PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis using the restriction enzyme Nla III (27).

In this study we aimed to investigate the effects of COMT genotype on premature menopause. Genotyping of 37 premature menopausal and 38 menopausal patients were carried out using PCR-RFLP method. The distributions of the H/H, H/L, and L/L genotypes were 13.5%, 67.6% and 18.9%, respectively, in the premature menopausal patients and 15.8%, 73.7%, and 10.5% in the menopausal patient. No differences in COMT-HH, COMT-HL, and COMT-LL polymorphism was detected between premature menopause and menopause groups ($p > 0.05$ ve $\beta = 0.595$).

Key Words: Catechol-O-methyltransferase (COMT), premature menopause, genetic polymorphism

1. GİRİŞ

Günümüzde yapılan sayımlara göre dünyada yaklaşık olarak 6 milyar insan yaşamaktadır. Bu sayı, ülke ve bölgelere göre değişmekle beraber, yarısının erkekler ve yarısının da kadınlar olduğu tahmin edilmektedir (1).

Kadınların ölüm yaşı ortalamaları ülkeden ülkeye değişmektedir ancak gelişmiş ülkelerde bu yaş ortalaması 81-82 dolaylarındadır. Ülkemizde yapılan araştırmalara göre kadınlarda ortalama ölüm yaşı 72 olarak saptanmıştır. Diğer yandan menopoza girme yaşı ortalaması da bölge ve toplum gelişmişliğine göre 46-52 yaş arasında değişiklik göstermektedir. Ülkemizde ise çeşitli araştırmalarda menopoza girme yaş ortalaması 46.5 olarak bulunmuştur. Bütün bunlar, ayrıca bölgeler ve ülkeler arasındaki farklar hesaplanarak, dünyada 1 milyar 300 milyon civarında menopoz dönemine girmiş olan kadın olduğu tahmin edilmektedir (2).

İçinde bulunduğumuz yüzyılda ortalama ölüm yaşının uzaması nedeniyle, kadınlar yaşamlarının 1/3'ünü menopoz döneminde geçirmektedirler. Ancak bu oran, normal yaşta menopoza giren kadınlar için geçerlidir. Kadınların prematür menopoza girme olasılıkları da göz önünde bulundurulacak olursa, bu oran 1/2'ye kadar düşmektedir. Yaşamın bu derecede geniş bir dilimini etkilemesinden dolayı menopoz, özellikle bayanlar için oldukça önemli bir devredir (1,2).

Kadınların prematür olarak menopoza girmeleri, multifaktöriyel bir olaydır. Bu faktörlerin belirlenmesi, gerek bu bireylerin menopoz dönemini en hafif şekilde geçirmeleri, gerekse yaşam kalitesini yükseltme açısından oldukça önem taşımaktadır. Ortaya pek çok faktör ileri sürülmesine karşılık, söz konusu faktörlerin kesin olduğuna ilişkin bir görüş birliği yoktur. Bu faktörler şu şekilde sıralanabilir: Menarş yaşı, sosyoekonomik durum, sigara ve alkol kullanımı, doğum kontrol haplarının kullanımı, eğitim düzeyi, beslenme alışkanlıkları ve genetik faktörler (2,3).

Çalışmamızda genetik faktörlerden biri olan ve özellikle de meme ve ovaryum kanserlerinden sorumlu olabileceği düşünülen katekol-O-metiltransferaz (COMT) gen polimorfizmi üzerinde durulmuştur.

Katekol-O-metiltransferaz (COMT), katekolamin ve katekolamin içeren ilaçların metabolizmasında rol oynayan bir enzimdir. COMT, katekol östrojenlerinin temel konjugasyon yoludur. Ayrıca COMT enzim aktivitesi, yüksek, orta ve düşük aktivite olmak üzere trimodal dağılım gösterir ve genetik olarak polimorfiktir (4). Çeşitli çalışmalarla, COMT genindeki polimorfizm ile premenopoz ve postmenopoz durumuyla değişebilen meme kanseri riskinin arttığı ortaya konmuştur (5,6,7). COMT'un rolü, menopoz tanısında temel rol oynayan ve seviyesi oldukça azalan bir hormon olan östrojenin O-metilasyonudur. Bununla birlikte, yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, COMT ve temel östrojen metaboliti olan katekol östrojenlerin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır (8,9).

Bir bayanın sosyal, maddi ve manevi olgunluğa eriştiği, hatta bazı meslek ve konumlarda kişinin bilgi, tecrübe ve beceri açısından mesleğinin zirvesinde bulunduğu ve hayatının en verimli olacağı bu dönemde, menopozdan kaynaklanan sağlık sorunları ve bunların sonuçları ile yaşamak hem kişi açısından hem de sosyoekonomik açıdan çok şey kaybettirecektir. Menopozla ilgili yapılan çalışmaların önemli nedenleri, kadınların yaşamlarının her döneminde sağlıklı yaşaması ve yaşam kalitesini arttırmaktır. Bütün bunlar gözönüne alındığında, menopozun genetik yönüyle ilgili çalışmaların daha çok yapılması bu konuya ışık tutacaktır.

Bu çalışmada, prematür menopoz olarak adlandırılan, kadınların yaşam evrelerinin oldukça önemli bir dönemini kapsayan menopoz dönemine erken girmesi ile COMT geni polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MENOPOZUN TARİHÇESİ

Menopozu yaşlılığın başlangıcı ya da hayatın sonbaharı olarak görmek artık gerilerde kalmıştır. Günümüzde menopoz, adetten kesilen kadının eskiden olduğu gibi menopozdan kaynaklanan sağlık sorunlarına alışmakla geçirdiği bir dönem değildir. Tıp, gün geçtikçe over fonksiyonlarını daha iyi tanımlamakta ve menopozun fizyolojik yönünü gün ışığına çıkartmaktadır (3).

Tıp tarihine bakıldığında, menopoz döneminde bulunan kadınların sayısının artması, menopoz fizyopatolojisi, tedavisi ve kanserle ilişkisi üzerindeki çalışmaların artmasına neden olmuştur.

Hipokrat, kadındaki menopoz semptomlarının (sıkıntı, baş ağrısı, çarpıntı, ateş basması, vs.) belli bir yaştan sonra onun doğum organının yer değiştirmesi sonucu kalbine ve kafasına yaptığı baskılar sonucu ortaya çıktığını ileri sürmüştür (2,3).

Bilimsel olarak tıp Rönesans'tan sonra gelişmeye başlamıştır. Bu devreden sonra ölümlerde otopsiler yapılabilmiş, insan organlarının özellikleri saptanmaya başlamıştır. Menopoz konusuna gelince, ancak 19. yüzyılda modern tıp açısından en çok Fransız tıp araştırmacılarının bu konuyu fizyolojik bir olay olarak nitelendirmeleri 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 (10).

Eldeki bilgilere göre ilk defa 1776 yılında İngiltere'de Fothergill "Medical Observations and Inquiries" adlı dergide, kadında yaşlanınca ortaya çıkan adetten kesilme konusunu ele almış ve hatta çözümünü değerlendirme yönünden tartışmaya açmıştır (2,10).

Fransa'da Gardanne (1816), menopozu çeşitli yönleriyle ele almış, bu konudaki görüşlerini bir kitapta toplamıştır (2). Bu araştırmacı, bir bakıma menstruasyonun kesilmesi anlamında "La Menespausie" deyimini ortaya atan ilk kişidir. Daha sonra da aslı Grekçe'den gelen bu iki kelime "men" ve "pause" (adet / ay kesilmesi), kadınların bu devrelerini ifade eden deyim olarak günümüze kadar gelmiştir. Diğer yandan menopozda olan değişikliklerin kadınlarca çeşitli devrelerde farklı hissedilmesi dolayısıyla bu devrelere Grekçe'den gelen başka bir kelime ile "klimakteriyum (merdiven)" adı verilmiştir. Ancak yine o devirlerdeki bilgilere göre Fransız araştırmacılar tarafından, klimakteriyumun başlamasının, kadının kritik bir yaşa girdiğinin kabulü anlamına gelmekteydi. Buna karşın İngiliz tıbbında ise kadının artık bir çeşit değişme çağına girdiğini ifade etmek için klimakteriyum teriminin kullanıldığını görmekteyiz. Bu düşünceleri o dönemdeki tıp kitaplarından anlamak mümkündür (2,3).

Negrier d'Angers, 1840 yılında overdeki folikül ile menstruasyon kanamasının ilişkisini gözlemiş ve yayınlamıştır (1).

Tilt 1857 yılında İngiltere'de ilk defa 500 klimakterik kadını incelemiş, bu kadınların sıkıntılarının ciddiyetini ortaya koyarak onların rahat etmeleri için sedatifler verilmesini önermiştir (2).

Fraenkel, Almanya'da 1903 yılında menopoz hakkında çok ciddi yayın yapan bir klinisyen araştırmacıdır. Perimenopoz ve menopozda over fonksiyonunun bozulması sonucu ortaya çıkan östrojen azalmasına bağlı olayları (ateş basması, çarpıntı, depresyon, vs.) tanımlamıştır (10).

Bu dönemden sonra menopoz konusu üzerindeki araştırmalar hızla devam etmiştir. Menopoz konusundaki ilk uluslararası kongre Fransa'da (Haziran 1976) La Grande Motte'de yapılmıştır (10).

Ülkemizde menopozun ciddi olarak değerlendirilmesi 1970'li yıllardan sonra olmuştur. Bu yıllara kadar, özellikle östrojenlerin endometrium ve memedeki olumsuz etkileri üzerinde durulmuş ve menopoz semptomlarını geçirmek üzere, östriol tedavi

amaçlı kullanılmıştır. 1985’li yıllardan sonra östrojen ile endometrium ve meme kanserleri ilişkilerine aydınlık getiren geniş hasta sayısına dayalı yayın ve araştırmalar, menopozda hormon replasman tedavisini yaygın hale getirmeye başlamıştır (3).

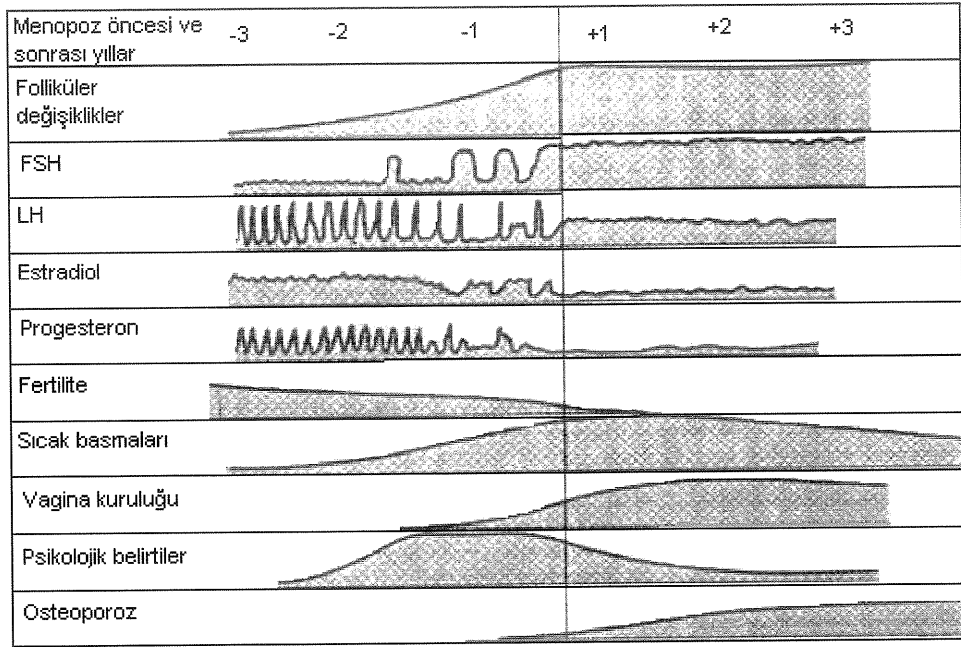
Günümüze gelindiğinde, özellikle menopozda hormon replasman tedavisi konusundaki çalışmaların hızla devam ettiğini görmekteyiz. Bugün menopozdaki modern yaklaşım ve tedavi görüşüne göre, menopoz olgusu sadece Kadın-Doğum kliniğine ait olmayıp, aynı zamanda Psikiyatri, Fizik Tedavi, Kardiyoloji, Genel Cerrahi, Biyokimya, Diyet ve Genetik bölümlerinin de ilgi alanına girmektedir. Olguyu yalnızca bir branşın değil, branşların değerlendirmesi gerektiği gündemdedir. Multidisipliner bir ekip organizasyonu ile bu dönemin en iyi şekilde geçirilmesinin sağlanması ve yaşam kalitesinin yükseltilmesi amaçlanmaktadır (11).

2.2. TANIM VE TERMİNOLOJİ

Menopoz, kadının adet kesilmesinden sonraki dönem için kullanılan bir terim olmakla beraber, bu dönemdeki en önemli olay kadının üreme yeteneğinin sonlanmasıdır. Menopoz, Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) bu konuda önerdiği ve yaygın olarak kullanılan tanıma göre “*ovaryum aktivitesinin yitilmesi sonucunda menstruasyonun kalıcı olarak sonlanmasıdır*” (1). Günümüzde menopozun, menstruasyonun sonlanmasıyla başladığı ya da son adet görülmesinden kısa bir süre önce ortaya çıktığı düşüncesi terkedilmiştir. Menopoz, belli bir anda gerçekleşmekle birlikte bu olaya kadar olan değişiklikler yıllar öncesinden başlamaktadır. Menopoz aslında retrospektif olarak tanımlanan bir kavramı vurgular. Eğer bu dönemdeki kadın bir yıl süreyle adet görmemişse, gördüğü son adete menopoz denilir ve kadın için “menopoza girmiş” ifadesi kullanılır. Bu andan sonraki döneme “postmenopozal devre”, önceki döneme de “premenopozal devre” denir (11).

Menopoz tanımı yaygın olarak kabul görmekte birlikte menopozun öncesi ve sonrası dönemlerinin tanımlanması ile ilgili karışıklık sürmektedir. *Perimenopoz* denilen geçiş evresinin ve aynı şekilde güncel tanımlama ile *klimakteriyum* evresinin sınırlarını tam olarak belirlemek olası değildir. Menopoz öncesi normal ovulasyon evrelerinden menstruasyonun sonlanmasına kadar geçen süre adet düzensizlikleri ile karakterizedir ve *perimenopozal geçiş yılları* olarak adlandırılır. WHO'nun tanımına göre perimenopoz "*menopoz öncesinde, yaklaşan menopoza ilişkin klinik, biyolojik ve endokrinolojik herhangi bir belirtinin başlamasından itibaren son menstrual periyodu izleyen bir yıllık süreyi içerisine alan dönemdir*". Klimakteriyum kavramı içerisinde, perimenopozal geçiş yılları, menopoz ve postmenopozal yıllar girmektedir. WHO, perimenopoz ve klimakteriyumu hemen hemen aynı anlamda kullanmaktadır (1).

Klimakteriyum, kadının tıpkı püberte gibi fizyolojik bir dönemidir. Bu dönemde reproduktif çağ bitmekte, overler fonksiyonlarını kaybetmekte ve kadın için doğurma yeteneğinin yitirildiği bir dönem başlamaktadır. Kadınlarda bu süreç, bir takım erken ve geç belirtilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Hormon düzeylerinin değişimi ve buna bağlı olarak gelişen belirtilerinin premenopozal ve postmenopozal dönemde dağılımı Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu dönem için çeşitli isimlendirmelere rastlamak mümkündür. Son yıllarda bu dönem için kullanılan deyimlerde bir kavram kargaşası olduğu görülmektedir. Genel olarak, östrojen metabolizmasındaki düşme sonucu semptomların başladığı andan, geçiş sürecinin bittiği ve semptomların kaybolduğu ana kadar olan dönem klimakteriyum olarak adlandırılmaktadır. Klimakteriyumu ise *seniliyum* (*yaşlılık*) ya da başka bir deyişle *geripoz* izler (2).



Şekil 2.1: Hormon düzeylerinin değişimi ve buna bağlı olarak gelişen belirtilerinin premenopozal ve postmenopozal dönemde dağılımı (2).

2.3. MENOPOZUN SOSYOLOJİK AÇIDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Menopoz, günümüzde kadınları karamsarlığa sürükleyen ya da tamamen kadere bir yaklaşımla razı olduğu bir durum olmaktan çıkmıştır. Ülkemizde ve dünyada beklenen yaşam ümidinin yıllar içinde giderek artması (70 yaş üzeri) farklı ırk ve coğrafi değişiklik gösterse bile 40-50 yaş civarında menopoz görüleceği göz önünde bulundurulacak olursa günümüz kadınının yaşam süresinin en az 1/3'ü menopoz sonrası döneme denk gelecek demektir (2,3).

Over fonksiyonları ve dolayısıyla seks steroidleri, özellikle östrojenlerin doku ve sistemler üzerindeki etkileri araştırıldıkça, bunların etkileşimleri ile yan etkileri daha ayrıntılı olarak öğrenilmektedir. Sonuçta menopoz sonrası dönem pek çok endokrinolojik, nörobiyolojik ve psikolojik değişimler doğurmaktadır (11).

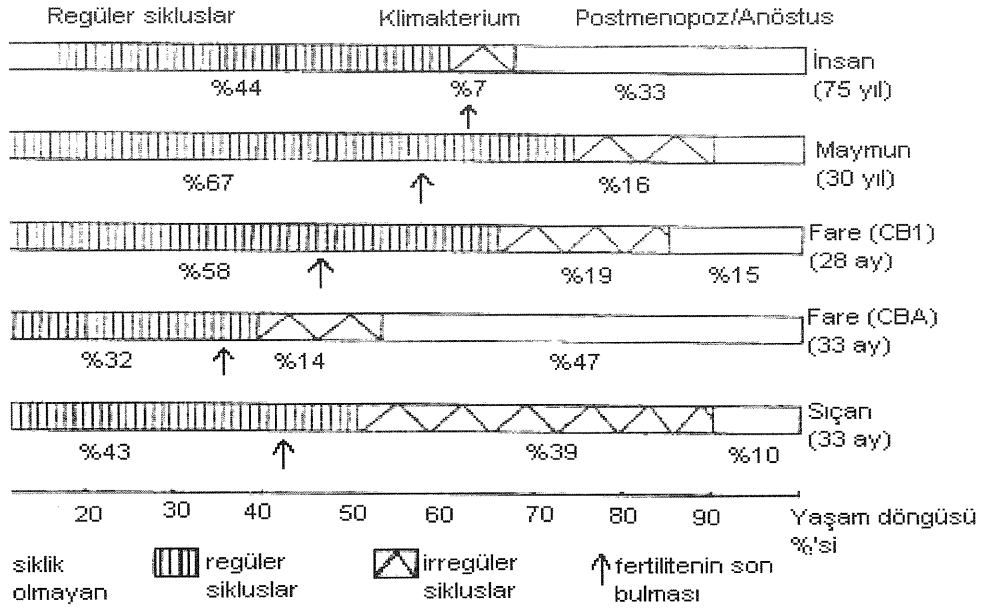
Menopoz sonrası dönemde kadınlar arasında sıkça sözü edilen psikosomatik ve psişik belirtiler aslında olayın yalnızca bir bölümüdür. Burada daha büyük sonuçlar doğuran değişiklikler, ürogenital sistem atrofileri, kemikte osteoporoz, kardiyovasküler ve psikolojik sistem değişiklikleri olarak görölmektedir. Bu nedenle menopoz sonrası dönemi ciddi bir hekim kontrolü altında geçirmeyen bir kadın önemli sorunlarla karşılaşılabilir (12).

Dünya nüfusu ve daha önemlisi yaşlı nüfusu, geçen yüzyıldan başlayarak, hızlı bir şekilde artmıştır. 1900 yılında 1,7 milyar olan dünya nüfusu 2000 yılında 6,2 milyardır ve 2020 yılında ise 7,9 milyarı bulması beklenmektedir. Yaşlılar olarak nitelendirdiğimiz 65 yaş üzeri bireylerin sayısı ise 1950’de % 5.1 iken 2020 yılında 8.8 olması beklenmektedir ki bu ortalama 796 milyona kişiye eşdeğer olmaktadır (13).

Bu istatistiksel veriler, diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de menopoz sonrası dönemde yaşayan kadın nüfusunda artış olacağını göstermektedir (13).

2.4. MENOPOZ YAŞI

Menopoz yaşı konusunda dünyada çok sayıda araştırma yapılmıştır. Çeşitli hayvanlar ve insanda menopoz yaşının yaşam süresi ve menstruasyonla ilişkisi Şekil 2.2’de sunulmuştur. Bu konuda en doğru bilginin prospektif takiplere bağlı analizler sonucunda elde edilebileceği genel bir kanıdır. Menopoz için dünya genelinde kesin bir yaş ortaya konması oldukça güçtür (14). Gelişmiş ülkelerde yaşayan Avrupa orijinli beyaz kadınlarda ortalama menopoz yaşı 50 olarak bulunmuştur. Yine bu çalışmada Asyalı, Afrikalı ve Uzak Doğulu ırklarda ortalama menopoz yaşının 43-49 arasında olduğu anlaşılmaktadır (15). ABD kökenli çalışmalarda ortalama menopoz yaşı 50-52 olarak belirlenmiştir. Yine ABD’de ortalama kadın yaşam süresi 81 olarak saptanmıştır. Bu da yaklaşık olarak 30 yıllık bir sürede kadının postmenopozal evreyi yaşayacağını belirler (16).



Şekil 2.2: Çeşitli hayvanlar ve insanda menopoz yaşının yaşam süresi ve menstruasyonla ilişkisi (2).

Menopoz yaşının hangi olaylardan etkilendiği daima araştırma konusu olmuş ve olmaya devam etmektedir. Ortaya pek çok faktör atılmış olmasına rağmen söz konusu faktörlerin kesin olduğu konusunda bir görüş birliği yoktur. Bu faktörler şu şekilde sıralanabilir:

- Menarş yaşı erkense menopoz gecikir.
- Bekar kadınlar daha erken menopoza girer.
- Çalışan kadınlarda menopoz daha erken olur.
- Çok doğum yapmış kadınlarda menopoz geç oluşur.
- Yüksek sosyoekonomik durumda kadınlarda menopoz geç gelişir.
- Doğum kontrol haplarının kullanımı menopozu geciktirir.
- Sigara kullanımı menopoz yaşını düşürür.
- Yüksek rakımda yaşayan kadınlarda menopoz ortalama 1-2 yıl erken olur.
- Yaşam tarzı, eğitim düzeyi, spor yapma gibi durumların menopoz yaşını etkilemediği düşünülmektedir.
- Beslenme alışkanlıkları menopoz yaşında etkili olabilir.

- Ailede prematür menopoz öyküsü olması menopoz yaşını etkileyebilir.
- Bireyde menstruasyon siklusu ile ilgili genlerin genotiplerinin durumu menopozu etkileyebilir (13,14).

2.5. PREMATÜR MENOPOZ

Prematür menopoz, 40 yaşından genç kadınlarda amenore ile birlikte ortaya çıkan durumdur. 40 yaşından küçüklerde % 1, 30 yaşından küçük kadınlarda ise % 0.1 oranında rastlanmaktadır (17).

İlk tanımlandığında prematür menopozun geri dönüşünün söz konusu olmadığı sanılıyordu (15). Bir çalışmada follikül stimülan hormonun (FSH) 40 mIU/ml üzerine çıktığı olgularda overlerde primordial foliküllerin tükenmiş olduğu bildirilirken, diğer bir çalışmada hem FSH değerinin 40 mIU/ml'nin üzerinde olması, hem de "progesteron challenge" teste rağmen vaginal kanama görülmemesi durumu olayın süreklilik kazanması şeklinde sonuçlandırılıyordu (18, 19). Ancak, daha sonraki çalışmalarda, bu durumun her zaman geçerli olmadığı, prematür menopoz tanısı konmasından sonra gebelik gelişmesinin görülebileceği açıklanmıştır (15).

Rebar ve ark. (1982), daha önce prematür menopoz olduğu bildirilen 18 olgudan 9'unda folikül fonksiyonunun saptandığını bildirmişlerdir (20). Bu olgularda tek bir FSH ölçümünün 40 mIU/ml'nin üzerinde olmasıyla prematür menopoz tanısı konmuştu. Bu olgulardan 5'inde ovulasyon saptanarak tek bir FSH ölçümü yerine, 1 ay arayla en az iki FSH ölçümü ile tanı konmasının daha doğru olacağına karar verilmiştir (20). Yine olguların yaklaşık % 50'sinde folikül fonksiyonu olarak östradiol (E₂) değerinin 50 pg/ml üzerinde olduğu belirlenirken, % 20'sinde ise progesteron değerinin 3 ng/ml üzerinde olmasıyla ovulasyon tanısı konmaktaydı. Daha da ötesi, prematür menopoz tanısı konan olguların % 30-40'ında ultrason ile folikül görüntüsü saptandığı bildirilmiştir (18). Laparoskopi ile yapılan over biyopsilerinde folikül saptanmaması,

her zaman folikül fonksiyonunun, ovulasyon veya gebelik olasılığının ortadan kalkması anlamına gelmediği görülmüştür. Dolayısıyla prematür menopoz tanımı yerine over folikül tükenmesi anlamında kullanılan prematür over yetmezliği tanımının kullanılması daha yaygın hale gelmiştir (11).

2.5.1. Tanı

Prematür menopozda karakteristik bir menstrual patern yoktur. Hastalarda amenore aniden oluşabileceği gibi oligomenore veya disfonksiyonel kanamayı takiben de gelişebilir. Amenore ve önemli östrojen yetmezliği sonucu vaginal kuruluk ya da ateş basması gibi durumlar görülebilir. Olguların çoğunda prematür menopoz, düzenli adet görülen bir dönemin ardından gelir (2). Amenore genelde sekonder olup olgularda daha önce belli bir problem yoktur. Az sayıda olguda menarş görülse de ardından düzenli adet görülmez ve yıllar sonra prematür menopoz gelişir. Yine olguların % 4'ünde adet öyküsü saptanmamıştır (2,16).

Prematür menopoz olgularının % 10-15'i primer amenore ile birlikte dir. Primer amenore, puberte gecikmesiyle birlikte ise olguların % 40'ında kromozomal anomali saptanmaktadır. Bu tip vakalarda kromozomal anomali yoksa genellikle normal prepubertal gelişme vardır, sekonder seks karakterleri az gelişir ve bir kısmında ise menarş sırasında zayıf bir vaginal kanama görülür (2).

2.5.2. Prematür Menopozun Etiyolojisi ve Etkileyen Faktörler

Prematür menopoz olguları, etiyolojik olarak folikül tükenmesi ve folikül disfonksiyonu şeklinde iki farklı kategoriye ayrılır ve bunlar Çizelge 2.1'de listelenmiştir.

Çizelge 2.1: Prematür Menopozun Sınıflandırılması (3)

<p>A) Over Folikül Tükenmesi</p> <p>a) Başlangıçta eksik folikül sayısı</p> <ol style="list-style-type: none">1- Saf gonadal disgenezis2- Timüs aplazisi, hipoplazisi3- İdiyopatik <p>b) Hızlanmış folikül atrezisi</p> <ol style="list-style-type: none">1- X Kromozomuna bağlı (Turner Sendromu, X mozaizm, X delesyonu)2- Galaktozemi3- İatrojenik4- Viral Ajanlar5- Otoimmünite6- Oosite spesifik hücre regülasyon defekti7- İdiyopatik
<p>B) Over Folikül Disfonksiyonu</p> <p>a) Enzim defektleri</p> <ol style="list-style-type: none">1- 17-α hidroksilaz2- Desmolaz (17-20)3- Kolesterol desmolaz4- Galaktoz 1-fosfat üridiltransferaz <p>b) Otoimmünite</p>

2.6. PREMATÜR MENOPOZ VE KATEKOL-O-METİLTRANSFERAZ (COMT) GENİ

Katekol-O-Metiltransferaz (Catechol-O-methyltransferase; COMT), katekolamin ve katekolamin içeren ilaçların metabolizmasında rol oynayan bir enzimdir (4). Nöropsikiyatrik hastalıklar, şizofreni, bipolar efektif bozukluklar, Parkinson, obsesif, agresif ve antisosyal davranışlar gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan katekol içerikli ilaçların metabolizmasında da rol oynadığı bilinmektedir (21,22). Bu nedenle COMT geninin fonksiyonel polimorfizminin nörotransmitterlerle ilişkili olan hastalıkların tanı ve tedavisinde yol gösterici olması bakımından önemlidir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, ovaryum kanseri, meme kanseri ve menopozal durum ile COMT geninin fonksiyonel polimorfizmi arasındaki ilişkiler ortaya konmuştur (23,24,25,26). Böylelikle COMT gen polimorfizmi, sadece nörotransmitterlerle ilişkili olan

hastalıklarda değil, daha geniş bir yelpazede incelenmesi gereken bir gen olma özelliği kazanmıştır.

İlk olarak 1950'li yılların sonuna doğru, katekolaminleri ve diğer katekollerin O-metilasyonunu katalizleyen enzimler tanımlanmıştır. COMT, O-metilasyondan sorumludur ve 1958 yılında kısmen saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. COMT geninin iki isoformunun yapısı aydınlatılmış ve COMT polipeptidinin cDNA'sı klonlanmıştır (27). Günümüzde ise COMT geni ile ilgili çalışmalar hızlı ve daha geniş bir platformda devam etmektedir.

2.6.1. COMT Geni ve Proteinler

2.6.1.1. Bir COMT Geni ve İki Protein

COMT geninin yapısal organizasyonu, Lundström ve ark. (1995) tarafından yapılan çalışmalar sonucu tamamlanmıştır (27). COMT, insanda bulunan nörotransmitterlerden biri olup katekolaminleri ve katekolamin içeren ilaçları S-adenozil L-methionine (AdoMet) bağlı olarak metil konjugasyon yolu ile inaktif hale getiren bir enzimdir. Bu enzim, endojen maddelerin metabolizmasında önemli bir rol oynadığı gibi, hipertansiyon, astım ve Parkinson hastalığı gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan katekol içerikli ilaçların metabolizmasında da önemlidir (21,28).

COMT enzimi çeşitli memeli dokularında, karaciğer ve böbreklerde oldukça yüksek miktarlarda olmak üzere endometrium, meme ve eritrositlerde de önemli miktarlarda bulunur. Bu enzim membrana bağlı (*membrane-bound*, MB-COMT) ya da erimiş (*soluble*, S-COMT) formlarda bulunabilir. COMT'un hem erimiş formu (S-COMT) hem de membrana bağlı formu (MB-COMT) için tek bir gen vardır (27).

In situ hibridizasyon ve hücre hibrid tekniklerinin uygulamaları, insanda COMT geninin 22. kromozomda 22q11.2 bölgesinde lokalize olduğunu göstermektedir. İnsan COMT geni, başlangıçtaki ilk iki eksonu kodlanmayan 6 ekson içerir. COMT geninin ekspresyonu, exon 3 de lokalize olmuş iki farklı promoter (P1 ve P2) tarafından kontrol edilmektedir (27).

S-COMT ve MB-COMT polipeptidleri, Western Blot tekniği ile analiz edildiğinde, çeşitli rat ve insan dokularında S-COMT genellikle daha fazla bulunmaktadır. Bunun tersine MB-COMT sadece insan beyninde daha fazla bulunur, burada total COMT polipeptidinin % 70'i MB-COMT ve % 30'u S-COMT'dur ve 1,5 kb'lık transkriptin bifonksiyonel olduğu gösterilmiştir. İnsan COMT promoterinin çeşitli ekspresyon seviyeleri, bazı doku-spesifik transkripsiyon faktörlerince regüle edilir. Aslında insan COMT promoteri, farklı dokularda COMT geni ekspresyonunda değişkenliğe neden olabilen doku-spesifik transkripsiyon faktörleri için birkaç bağlama bölgesi içerir (27,29).

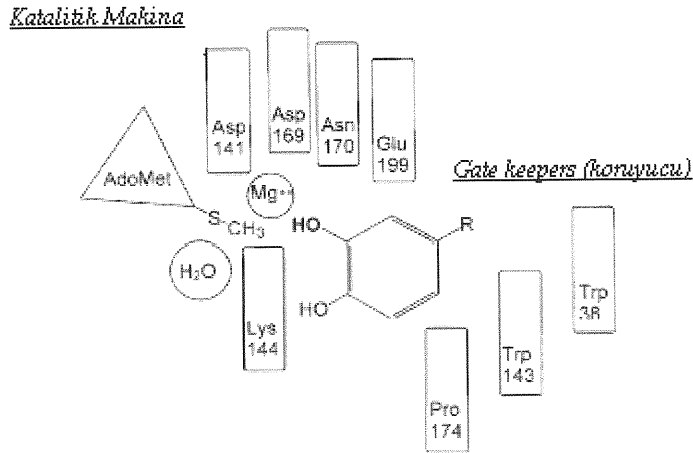
Rat ve insan S-COMT'unun her ikisi de 221 aminoasitten oluşur ve bunların molekül ağırlıkları sırasıyla, 24.8 ve 24.4 kilodaltondur. İnsan ve rat S-COMT'u, % 81 oranında özdeştir. Rat MB-COMT'u, ilave 43 aminoasit içerirken (29.6 kDa), insan MB-COMT'u ilave 50 aminoasit içerir (30.0 kDa). Bu ekstra aminoasitler, hidrofobik bir membran üzerinde fonksiyon görürler (27).

Bunun yanı sıra, S-COMT ve MB-COMT özdeş kinetik mekanizmalara sahip olmasına rağmen (Ca^{2+} inhibisyonu, Mg^{2+} gerektirmesi, optimum pH, S-COMT anti serumu tarafından tanınma), kesinlikle farklı enzimlerdir ve MB-COMT, S-COMT'un öncüsü değildir (27).

2.6.1.2. COMT'un Üç Boyutlu Yapısı

Rat S-COMT'u 1.7-2.0 Å çözünürlükte kristalize edilmiştir ve atomik yapıları detaylı olarak tanımlanmıştır (27).

COMT, β -tabakasının merkezine yerleşmiş 8 adet alfa-heliks yapısı içinde α/β tabakalı olarak tek bir bölgede oluşur. COMT'un aktif bölgesi, asıl katalitik bölge ile AdoMet bağlayıcı bölgeyi içerir. AdoMet bölgesinin bağlayıcı kısmı, birçok nükleotid bağlayıcı proteinin yaygın formunda gözlenen Rossman katlantılarıyla benzer yapıdadır. Bu karakteristik metil transferazların bazılarının kristal yapıları, AdoMet bağlayıcı bölge ile büyük oranda benzerlik gösterir. Birkaç aminoasitin oluşturduğu bu katalitik bölge, substrat, su ve Mg^{12} bağlanması ile O-metilasyonun katalizinde oldukça önemlidir (Şekil-2.3).



Şekil 2.3: COMT'un katalitik bölgesinin şematik gösterimi. Aminoasitler içerisinde "gatekeepers" olanlar ve katalitik aminoasitler gösterilmiştir. Özellikle Lys 144, genel bir katalitik baz olarak rol oynar. Metilenmiş hidroksilin aktivasyon bölgesi koyu renkle gösterilmiştir (27).

AdoMet bağlandıktan sonra, COMT'a bağlanan Mg^{2+} , katekol substratının hidroksil gruplarını iyonize eder. Mg^{2+} , iki aspartik asit rezidüsü (Asp 141 ve Asp 169), bir asparajin rezidüsü (Asn 170), katekol hidroksilleri ve bir su (H_2O) molekülünün oluşturduğu sekizgen bir koordinasyona sahiptir. Bundan dolayı, Mg^{2+} iyonları katekol kısmının oryantasyonunu kontrol eder. Buna ek olarak "koruyucu" rezidüleri olan Trp 38, Trp 143 ve Pro 174, hidrofobik duvar oluştururlar. Ayrıca koruyucu rezidülerin uygun pozisyonda yerleşmeleri katekol halkasını koruyarak metilasyon reaksiyonunda substratın katılımıyla COMT'un seçiciliğini belirlerler (Şekil 2.3). Bunlar temel olarak, COMT substratlarının ve inhibitörlerinin bağlanmasına katkıda bulunurlar. Mg^{2+} , COMT için oldukça önemli olmasına rağmen, diğer tüm küçük molekülle metiltransferazlar Mg^{2+} iyonlarına bağımlı değildirler (27,30).

2.6.1.3. COMT ve Enzimolojik Olaylar

COMT kolaylıkla indüklenemez ya da baskılanamaz. Periferik dokularda COMT'un kapasitesi oldukça yüksektir. Bu nedenle genel periferik COMT inhibisyonu oldukça güçtür. Bazı özel durumlar COMT aktivitesini arttırabilir fakat çoğunlukla enzim aktivitesi iki katına çıktığı zaman en iyi etkiyi gösterir (31).

Hamileliğin ve progesteron muamelesinin, uterusu COMT aktivitesini indüklediği gözlenmiştir. Ratlarda östrojen etkisi sonucunda hepatic COMT aktivitesinde azalma meydana gelmiştir (27). Diğer yandan subkronik östrojen muamelesinin, COMT aktivitesini arttırdığı immünolojik olarak işaretlenmiş hamster böbreğinde gösterilmiştir. Aynı zamanda farklı cinsiyetlerdeki COMT aktivitesinde fark gözlenmiştir. Erkek bireylerin karaciğerinde COMT aktivitesi, bayanlara oranla % 30 daha fazladır. Ayrıca yaşlanma döneminde karaciğerdeki COMT aktivitesi, ergenlik dönemine göre on kat artmıştır (27,31).

2.6.1.4. COMT'un Genetik Polimorfizmi

İnsan dokularında COMT enzim aktivitesinin seviyesi, düşük (COMT-LL), orta (COMT-HL) ve yüksek (COMT-HH) olmak üzere trimodal bir dağılımla genetik polimorfizm gösterir (32). Pedigri çalışmalarının segresyon analizlerine göre bu polimorfizme, otozomal kodominant aleller sebep olur. Düşük COMT aktivitesi, 37°C'de bile enzim termolabitesi ile ilişkilidir. Son zamanlarda termolabitenin moleküler temelleri, baculovirus ekspresyon sistemi ile açığa çıkarılmıştır; yani S-COMT'da Met108 ile Val108'in substitüsyonu (ya da MB-COMT'da 158. aminoasitte), COMT geninin 158. kodonunda adeninin guanine transisyonundan kaynaklanır. 108/158. kodonda valin aminoasitinin bulunması, ısıya dayanıklı yüksek affiniteli COMT formunu (H), methionin bulunması durumu da ısıya dayanıksız düşük afiniteli COMT formunu (L) meydana getirmektedir. COMT polimorfizminde iki allel (Val108/158-H ve Met108/158-L) ve üç genotip (Val158/Val158-H/H Val158/Met158-H/L, Met158/Met158-L/L) tanımlanmıştır. COMT genindeki bu fonksiyonel polimorfizm, insan eritrositleri ile karaciğerinde COMT enzim aktivitesinde 3-4 kat farklılıklara yol açar. Plasenta ve HepG2 hepatoma hücreleri olmak üzere iki cDNA kaynağından elde edilen insan COMT gen dizisi, 1 bp'lik farklılık gösterir ve DNA dizisinde yeni *Nla III* (ya da izoşizomeri olan *Hsp 92II*) kesim bölgesi oluşturur. Bu aminoasit değişikliğinin, insan popülasyonunda yüksek (COMT Val/Val), orta (COMT Val/Met) ve düşük (COMT Met/Met) enzim aktivitesi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (27,32).

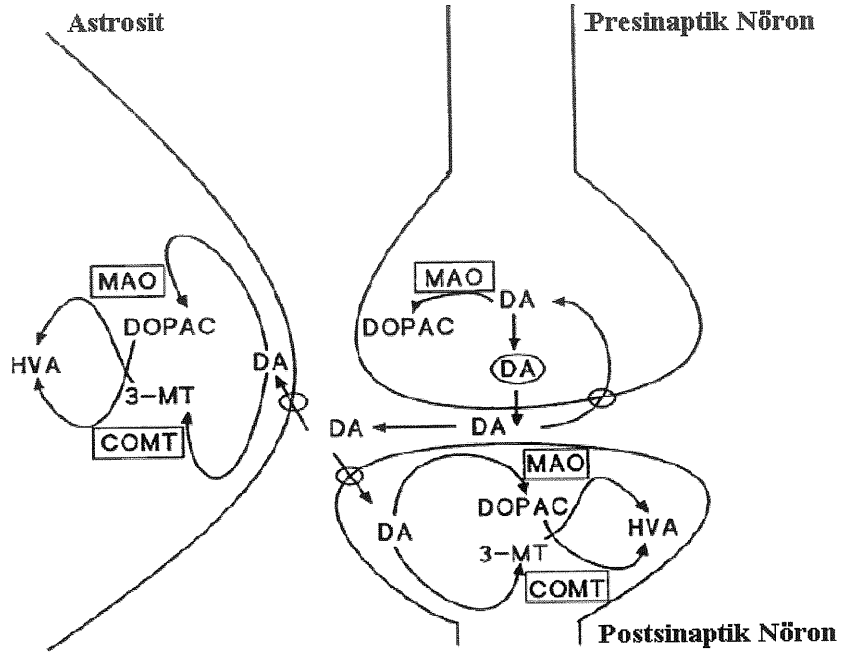
COMT geninde başka mutasyonlar da olmasına rağmen, buna düşük COMT aktivitesi ile düşük ısı stabilitesinin birlikte neden olduğu gözlenmektedir. Bunun nedeni, herhangi bir dokuya spesifik "splice varyantları" olmaksızın sadece bir COMT geni olmasıdır, bundan dolayı termostabilite değişiklikleri tüm dokularda COMT'un fonksiyonel değişimine yol açar ve kodon 108/158'de polimorfizmle sonuçlanır (27).

2.6.1.5. COMT'un Vücuttaki Dağılımı

COMT, omurgalı ve omurgasız tüm canlılarda bulunmaktadır. Memelilerde COMT, vücudun hemen tüm organlarında geniş bir dağılım gösterir. COMT, intrasellüler bir enzim olup daha önce belirtildiği gibi, omurgalılarda COMT proteini daha çok erimiş formda (S-COMT) bulunur. Bu proteinin çok az bir kısmı ise, granüllü endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzeyinde lokalize olan membrana bağlı (MB-COMT) formunda bulunmaktadır (27,33).

a) Beyinde COMT: COMT'un hücresel lokalizasyonu, çeşitli şekillerde çalışılmıştır. Çok sayıdaki lezyon çalışmaları ve immünohistokimyasal çalışmalar, presinaptik dopaminerjik nöronlarda COMT aktivitesinin dikkate değer olmadığını göstermiştir. Ancak, postsinaptik nöronlarda az bir aktivite göstermektedir ve asıl önemli aktivite glial hücrelerde gözlenmektedir (33).

İmmünoelektron mikroskopi çalışmaları COMT enziminin, postsinaptik nöronlarda, dendritik omurgada, astrositlerde ve kapiller duvarda bulunduğunu göstermiştir. Rat beyin hücresi primer hücre kültürlerinin immüno blotting analizleri, COMT'un her iki isoformunun da astrositler, oligodendrositler ve nöronlarda bulunduğunu göstermiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Dopamin metabolizması ile ilgili olarak COMT ve MAO'nun (monoamin oksidaz) lokalizasyonunun basitleştirilmiş şematik gösterimi. Presinaptik nöronlar substansia nigra'dan çıkar ve postsinaptik nöronlar, intrastriatal ya da striatal çıkış nöronlarıdır. Glial hücrelerde S-COMT, MB-COMT'a göre daha fazla miktarda bulunurken postsinaptik nöronlarda COMT'un her iki isoformu da eşit miktarlarda bulunmaktadır (34).

b) Diğer Dokularda COMT: COMT, incelenen tüm memeli dokularında bulunmaktadır. İnsanlarda ve ratlarda en yüksek COMT aktivitesi karaciğerde, daha sonra böbrek ve gastrointestinal sistemdedir. Bu bulgular, immünohistokimyasal yöntemlerle doğrulanmıştır ve submaksiller bezler ile dalakta da bulunduğu gösterilmiştir (27,34,35).

İnsanda pankreasta COMT immünoaktivitesi α hücrelerinde değil, β ve δ hücrelerinde bulunmuştur. Böbrekte COMT aktivitesi, aynı zamanda dopamin sentezleyen proksimal tübül epitelyal hücrelerde bulunmuştur. Dopamin, lokal bir hormon olarak rol oynar, diüretik ve natriüretik etkileri mevcuttur. Diğer yandan COMT-mRNA, proksimal tübüllerin epitelyal hücrelerinde, üreterde ve henle kulpunun yukarı çıkan kolunda görülmektedir ki bu bölgelerde, enzimin dopamin ve diğer katekollerin metabolizmasını düzenlediği düşünülmektedir (27).

Yüksek COMT aktivitesi, De Santi ve ark. (1998) tarafından insan akciğeri, Bryan-Lluka ve ark. (1995) tarafından ise rat akciğerinde tanımlanmıştır (4). COMT aynı zamanda gözde, retinal ganglion hücre tabakasında ve ciliar cisimde oldukça fazla miktarlarda bulunmaktadır.

COMT aktivitesi deride de keşfedilmiştir, epidermisdeki aktivite, dermise göre daha yüksektir. COMT, epinefrini metabolize edebilen keratositlerde de bulunmaktadır, aynı zamanda epidermal hücre popülasyonunun sadece % 3-5'ini oluşturan melanositlerde de bulunur. Vitiligo hastalarının epidermisi, sağlıklı kontrollerin epidermisine göre daha fazla COMT içermektedir (32).

Positron emisyon tomografi (PET) çalışmaları, farede kalp, akciğer, dalak, mide, bağırsaklar, karaciğer ve böbreklerde COMT aktivitesinin yüksek olduğunu göstermiştir, aynı zamanda bu çalışmalar babun (*Papio ursinus*) karaciğeri ve böbreğinde de yüksek COMT aktivitesi olduğunu doğrulamıştır (27,34). COMT aktivitesi, domuz ve maymunların spinal membranlarında da gösterilmiştir (35).

İnsan, hamster, kobay, tavşan, tavuk, köpek, maymun ve rat eritrositlerinde de bir miktar COMT aktivitesi mevcuttur. Bu aktivite, türden türe değişiklik gösterir, insanda oldukça düşük, ratlarda ise yüksektir. Eritrositlerde bulunan COMT, COMT inhibitör terapisi sırasında vücutta COMT inhibisyonunu gözlemek için uygun bir yol gösterir. İnsanlarda yapılan bazı çalışmalar göstermiştir ki, plazmada 3-O-metil-dopa (3-OMD) seviyesinin azalması ya da plazmada COMT inhibitörünün konsantrasyonu ile eritrosit COMT'un inhibisyonu arasında oldukça anlamlı bir korelasyon vardır. İnsan lenfositleri de önemli miktarlarda COMT içermesine rağmen bunun hemen hemen yarısı MB-COMT formundadır (36).

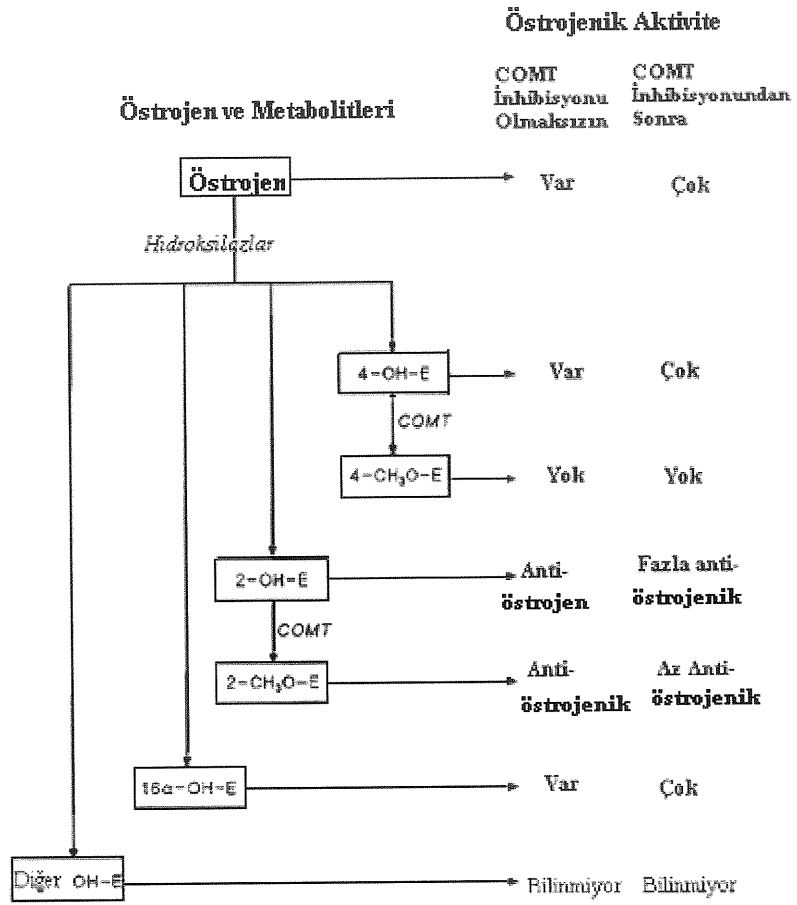
2.6.2. COMT'un Substratları

COMT'un fizyolojik substratları, L-Dopa, katekolaminler (dopamin, norepinefrin, epinefrin), bunların hidroksillenmiş metabolitleri, katekol östrojenler,

askorbik asit ve melanin dihidroksiindolik ara ürünlerini kapsar. Aynı zamanda, trifenoller ve substite katekoller, dobutamin, isoprenalin, rimiterol, α -metildopa, benserazide, karpidopa, dihidroksifenilserin, flavonoidler ve tetrahidroksisoquinolon'un dihidroksi derivatifleri gibi diyetle ilgili ve ilaç özelliği olan bazı maddeler de COMT substratlarıdır (4). COMT'un genel fonksiyonu, biyolojik olarak aktif ya da toksik katekolleri ve diğer bazı hidroksillenmiş metabolitleri (katekol östrojenler gibi) yok etmektir (8). Hamileliğin ilk trimesteri sırasında COMT, hidroksilazlar ile aril hidrokarbonlardan oluşan aktif hidroksillenmiş bileşiklere karşı, plasentayı ve gelişmiş embriyoyu korur. COMT aynı zamanda kan ve diğer dokular arasında ksenobiyotiklerin zararlı etkilerine karşı koruyucu bir enzimatik detoksik bariyer olarak rol oynar (örneğin; bağırsak mukozası ve beyinde) (4,8,27).

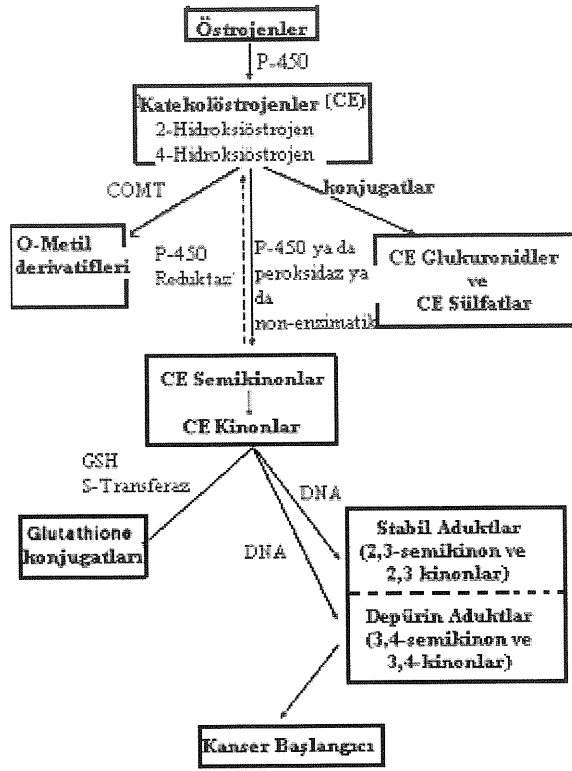
2.6.3. Östrojen Metabolizması ve COMT'un Rolü

COMT'un 2- ve 4-hidroksillenmiş östrojenlerin (katekol östrojenler) metabolizmasındaki rolü, Ball ve Knuppen (1980) ve yakın zamanda da Zhu ve Conney (1998) tarafından araştırılmıştır (27). Özellikle Şekil 2.5 ve 2.6'da COMT'un rolü ve metabolik yolları şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.5: Temel östrojen metabolitleri ve bunların östrojenik (ya da antiöstrojenik) aktivitelerinin şematik gösterimi. COMT'un bu metabolitler üzerindeki teorik etkileri ve östrojenik aktiviteleri belirtilmiştir. 2-OH-E: 2-OH-östrojen (katekol östrojen); 4-OH-E: 4-OH-östrojen; 2-CH₃O-E: 2-metoksiöstrojen; 4-CH₃O-E: 4-metoksiöstrojen; 16 α -OH-E: 16 α -hidroksi östrojen (27).

Katekol östrojenlerin ana metabolik yolları Şekil 2.6'da şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.6: Katekol östrojenlerin ana metabolik yollarının şematik gösterimi. CE: katekol östrojen; P-450: sitokrom P-450; GSH S-transferaz: glutatyon S-transferaz (27)

2.6.4. Menopozal Durumda COMT'un Rolü

Katekol östrojenler, östrojenin temel metabolitlerinden biridir. Yapılan epidemiyolojik ve hücre biyolojisi çalışmaları, östrojenin özellikle meme kanseri gelişimi ile ilgili olabileceğini göstermiştir. Meme kanseri için iyi bilinen risk faktörleri menarş yaşı, menopoz yaşı ve hormonal mekanizmadır. Yapılan son çalışmalar göstermiştir ki, östrojen metabolitleri DNA'yı bağlayabilir ve hasarı tetikler ve dolayısıyla östrojen, genetik değişikliğe ve tümör oluşumuna neden olur (37). COMT aktivitesinin azalması meme kanseri riskini arttırabilir. Ayrıca katekol östrojenlerin birikimi oksidatif DNA hasarına neden olabilir (6). Bunun yanısıra katekol östrojenler (CE), CE quinonlarını okside edebilir ve bunlar da depürinizasyon ile mutasyonlara yol açarak DNA hasarına neden olur. COMT, bir katekol yapısına sahip olan bileşiklerin

metabolizmasında oldukça önemli bir role sahip olan ve katekol östrojenlerinin inaktivasyonunu içeren enzimlerinden biridir (37).

COMT, askorbik asit ve bazı flavonoidleri içeren, kanser riskinin değişimini sağlayan bileşiklerden biri olarak rol oynar. Pre ve post menopozal kadınlarda meme kanseri riskinde COMT'un etkisi, eksojen ve endojen etkilerin her ikisini de kapsayan farklı etiyolojik olayları yansıtır (38,39,40).

Özet olarak; son birkaç yılda östrojenlerin etkileri üzerindeki araştırmalar, östrojenin metilasyonu nedeniyle DNA hasarı ve buna bağlı mutasyonları da içine alacak şekilde genişlemiştir (41,42). Bu tür mutasyonlar, kanser başlangıcı ve ilerlemesinde önemli roller oynamaktadır. COMT'un genel fonksiyonu, biyolojik olarak aktif ya da toksik katekoller ve diğer bazı hidroksillenmiş metabolitleri (katekol östrojenler) yok etmektir (37). COMT'un substratı olan bu katekol östrojenler eğer metabolize edilemezlerse, östrojen metabolizmasını bozarlar, oksidatif DNA hasarına ve lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Eğer COMT geni düşük aktiviteli formunda bulunursa (COMT/LL) yeterli aktivite gösteremediğinden dolayı katekol östrojenleri yeteri düzeyde inaktive edemeyecek ve bu durum östrojen metabolizmasında bozukluklara yol açacaktır. Bu düşük aktiviteli genotipin, meme, ovaryum, uterus kanser riskini arttırdığına ilişkin çalışmalar mevcuttur. Aynı şekilde pre- ve post-menopoz dönemlerinde de bu genotipin etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak, farklı bir bakış açısı olarak, düşük aktiviteli COMT genotipinin (LL), prematür menopozu tetiklemesi olasılığına ilişkin herhangi bir kayıtlı bilgiye rastlanmamıştır. Bu konu hakkında elde edilecek olumlu ya da olumsuz herhangi bir sonuç, yaşamın önemli bir kısmını kaplayan menopoz dönemine daha geniş bir bakış açısı getirecektir.

2.7. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (Polymerase Chain Reaction-PCR) TEKNİĞİ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR); spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. İlk kez 1985 yılında Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. PCR yöntemi, avantajları nedeniyle moleküler biyoloji, tıp, arkeoloji gibi değişik alanlarda uygulanabilen bir yöntem olmuştur. Aynı şekilde bu yöntem, saç teli ve sperm gibi değişik dokulardan elde edilen 1-2 hücre gibi çok az sayıdaki hücreden bile sonuç alma imkanı sağlamaktadır. Bunun yanı sıra, parafinlenmiş dokular, Guthrie kanları ya da hücre lizatları, amplifikasyon için kalıp oluşturmaktadır. 1 µg'dan daha az DNA materyalinden 1-2 saat gibi kısa bir süre içinde sonucun alınıp tanının konabilmesi, PCR yönteminin en avantajlı yönlerinden biridir (43).

Ayrıca günümüzde PCR tekniğini; allelik doku varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirmesi (babalık tayini gibi), tarımda sistematik ve evölüsyon çalışmaları (tohum saflık tayini, çeşitli canlı türlerinin tanısı) gibi alanlarda da kullanmak olası hale gelmiştir (43).

2.7.1. PCR'nin Temel Bileşenleri

PCR yöntemi kısaca bir gen ya da DNA bölgesinin, bu hedef bölgenin uç bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerler aracılığı ile bir dizi replikasyon (siklus, döngü) geçirerek çoğaltılması işlemidir (44). PCR'nin gerçekleşebilmesi için ortamda;

- *Kalıp DNA,*
- *Çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer,*
- *dNTP'ler (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),*
- *Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi,*
- *Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı gereklidir.*

A) Kalıp DNA

PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilebilirler (44).

B) Primerler

Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuarlardan ya da ticari olarak elde edilebilirler. Gen çoğaltılması dahil PCR'nın birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen komplementer olan primerlere gereksinim vardır. Genel olarak kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere komplementer olan primerler tasarlanır. Primer tasarımı yapmak için bilgisayar programları da geliştirilmiş olmakla birlikte, çoğu zaman araştırmacılar ilgilendikleri genleri ya da DNA parçalarını çoğaltmak için kendileri primer tasarımı yapmak durumundadır (44,45).

C) dNTP Karışımı

Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde (dNTP mix) ticari olarak sağlanır. Taq DNA

polimeraz, düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Ayrıca optimal dNTP konsantrasyonu, MgCl₂ konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılan ürünün boyuna ve PCR'ın döngü sayısına da bağlıdır. Yapılacak PCR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmelidir (44,45).

D) DNA Polimeraz Enzimleri

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe komplementer bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak, dNTP'lerden uzun polinükleotid zincirin sentezini katalizlerler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primer) ihtiyaç duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (45).

Termostabil enzimlerden en yaygın olarak kullanılanı, *Thermus aquaticus*'dan elde edilen **Taq DNA Polimeraz**'dır. Bunun dışında *Thermus aquaticus*'dan **Amplitaq**, *Thermus flavis*'den **Hot Tub** ve **Protase**, *Thermus termophilus*'dan **Tth**, *Pyrococcus furiosus*'dan **Pfu**, *Thermococcus litoralis*'den **Vent** gibi diğer termostabil enzimler de kullanılmaktadır. Taq DNA polimerazın bazı enzimatik özellikleri arasında optimum sıcaklıkta (70-80°C) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonunu yapması ve 5'→3' eksonükleaz aktivitesine sahip olması sayılabilir (45).

E) Tamponlar ve MgCl₂

PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur. Diğer enzimler için de benzeri tamponlar bulunmakta ve bunlar çoğunlukla satın alınan enzimle birlikte 10x konsantrasyonunda

sağlanabilmektedir. $MgCl_2$ 'ün reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonu değişebilmekle birlikte genellikle 0.5-5.0 mM'lık değerler arasında çalışılır. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikli DNA'nın T_m değerini (ift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına neden olan sıcaklık) arttırlar. Ayrıca primer-kalıp etkileşimini sağlarlar. Bu nedenle $MgCl_2$ 'ün PCR'ın özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum $MgCl_2$ konsantrasyonu olarak 1.0-1.5 mM'lık değerler tercih edilir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açar (45).

2.7.2. PCR'nin Evreleri

PCR reaksiyonunda 3 temel basamak vardır ve oğaltılmış ürün miktarı, teorik olarak bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır (43,44,45).

1. Denatürasyon Evresi: Bu evrede çoğaltılması istenen çift sarmal DNA; sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarını ayırmak üzere denatüre edilerek tek sarmal haline getirilir. DNA sarmallarının birbirinden ayrılması için uygulanabilecek fiziksel ve kimyasal yöntemler olmasına karşın 95-100°C'ye kadar ısıtmak en basit ve en etkin bir yöntem olarak uygulanmaktadır.

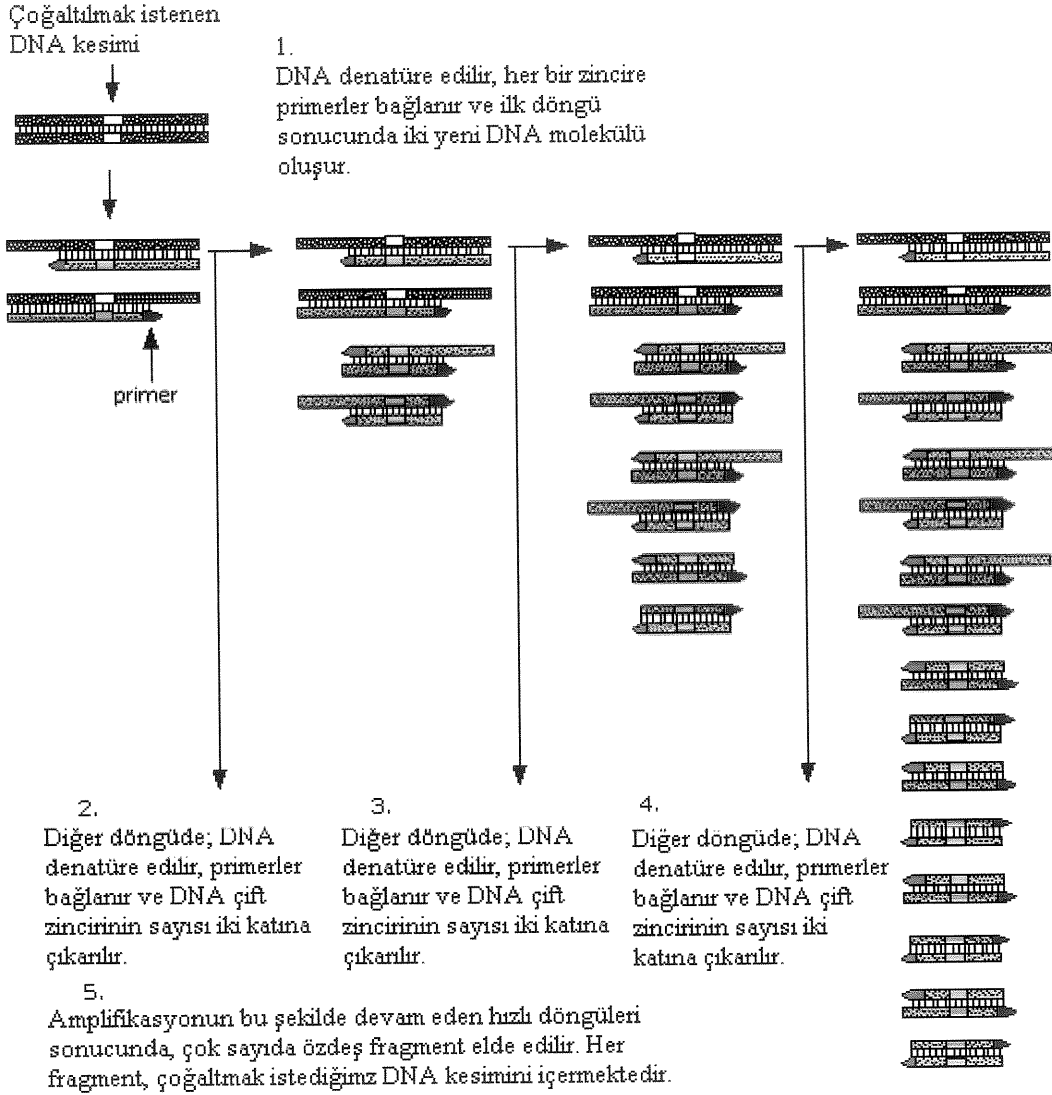
2. Primerlerin Bağlanması (annealing): Bu evrede primer adı verilen ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotid, ilk evrede elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan nükleotid dizisi ile hibridize olur (annealing yapar). Primerler, orijinal (hedef) DNA sarmalının amplifikasyonunu başlatmak amacıyla kullanılırlar. Bu nedenle primer (öncü) olarak adlandırılmışlardır. PCR uygulamalarında kullanılan primerler, minimum 17-19 nükleotidden oluşan oligomerlerdir. Genelde uygulamalarda 0.1-0.5 μM arası primer konsantrasyonları, optimal değerler olarak kabul edilir. Her bir primer, orijinal DNA sarmalının 3' veya 5' sarmalından birinin tamamlayıcısı ve çoğaltılacak olan DNA bölgesine özğüdür.

Primerlerin bağlanması aşamasında deney ortamının ısısı 40-60°C'ye düşürülür. Primer eşleşmesi ve bağlanması için gereken ısı ve süre, amplifikasyon primerlerinin konsantrasyon ve uzunluğuna bağlıdır. Eşleşmenin sonuç verdiği deney ortamı ısısı 55-72°C olduğunda 0.2 µM primer konsantrasyonunda eşleşme için birkaç saniyelik süre yeterlidir.

3. Primerlerin Uzatılması (extension) ve Amplifikasyonu: Annealing tamamlandıktan sonra primer hibridleştiği zaman tek sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil özelliği olan **Taq Polimeraz** enzimi kullanılır. Bu enzim, DNA sentezi için daha yüksek optimum ısıya (T_{opt}) sahiptir. DNA kalıbının yapısına bağlı olmak üzere Taq polimeraz enzimi, enzim molekülü başına, saniyede 150 nükleotide yaklaşan spesifik aktivite ile 75-80°C arasında optimum ısıya sahiptir. Nükleotidleri, orijinal DNA sarmalına komplementer olacak biçimde primere ekler ve uzatır. Oluşan yeni DNA sarmalları bir sonraki döngüde primerler için kalıp olarak rol oynarlar. Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75°C'lerde ısı uygulanır. 72°C'de nükleotid eşleşme hızı; tampon, pH, tuz konsantrasyonu ve DNA kalıbının yapısına bağlı olarak saniyede 35-100 nükleotid olarak gerçekleşir. 72°C'de bir dakikalık uzama süresi, 2 kb uzunluğundaki bir amplifikasyon için yeterli kabul edilir (45).

PCR uygulamalarında üç evre bir döngü olarak kabul edilir, bir döngü 3-5 dakika sürer ve 20-40 kez tekrarlanır. Bir döngü sonunda sentezlenen ürün, öncekinin iki katı kadardır. Döngü sayısı "n" olarak kabul edilirse "2n", çoğaltılmış DNA materyali miktarını verir. Yaklaşık 2-3 saat süren 20 döngülük bir reaksiyon sonunda 1 048 576, 30 döngü sonunda ise 270 000 000 amplifikasyon ürünü elde edilir (Şekil 2.7).

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)



Şekil 2.7: PCR Yöntemi. Tekrarlanan döngüler sonucu orijinal DNA dizisi 1.000.000 kattan daha fazla çoğaltılmış olur (43).

PCR ile çoğaltılan DNA fragmentlerini inceleyebilmek için uygun bir restriksiyon enzimi ile (RFLP) kesilir. Oluşan DNA fragmentleri jel elektrofrezinde yürütülerek birbirinden ayrılır. Sonra bu fragmentler **ethidium bromid** ile boyanarak incelenir. Ultraviyole ışığı altında doğrudan yapılan incelemelerde siyah zemin üzerinde beyaz polimorfik bantlar gözlenir (43).

2.8. RESTRIKSİYON ENZİMİ PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ TEKNİĞİ (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM, RFLP)

İnsan genomu boyunca (özellikle kodlayıcı olmayan bölgelerde), her 200 nükleotidde 1 dizi farklılığı görülür. Bu özel bölgelerdeki nükleotid değişiklikleri, DNA üzerinde hastalığa neden olmayan suskun nükleotid değişimleridir ve “*polimorfizm*” olarak tanımlanırlar. Bu nükleotid değişiklikleri, tek bir nükleotid çiftinde değişiklik veya bir ya da birden fazla nükleotid çiftinin çıkarılması (delesyon) veya araya girmesi (insersiyon) şeklinde görülebilir. Bu durum, bir restriksiyon enziminin (restriksiyon endonükleaz) kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası oluşmasına neden olabilir. Bu şekilde oluşan bir restriksiyon bölgesi, bir kromozomda bulunur fakat diğer kromozomda bulunmazsa, bu iki kromozom, restriksiyon parçalarının jele (elektroforez) aktarılan profillerinin analizi ile birbirinden ayırt edilebilir (43).

İlk restriksiyon endonükleaz (restriction endonuclease) enziminin keşfi 1970 yılında W.Arber, H.Smith ve D.Nathans tarafından gerçekleştirilmiştir. DNA analizi çalışmalarının hızla gelişmesi, kalıtsal yapıdaki hem baz çiftlerinin özel yapısını hem de DNA'daki komplementer mekanizmayı ortaya koymuş ve DNA molekülünü istenilen yerden kesme özelliğine sahip bakteriyel enzimlerin bulunmasını sağlamıştır. Endonükleazların uzun süre nükleotid dizisine aldırış etmeden rasgele olarak DNA molekülünü kestikleri düşünülmüştür fakat daha sonra prokaryotik organizmalarda spesifik nükleotid dizilerini tanıma bölgelerinden kesen yeni endonükleazlar bulununca bu fikirden vazgeçilmiş ve bu tür enzimlere genel ad olarak *restriksiyon enzimleri* (restriction enzymes) adı verilmiştir. Bu enzimler için böyle bir tanımlama yapılmasının diğer bir nedeni de, aktivitelerinin sadece yabancı DNA ile sınırlı kalmasıdır. Restriksiyon endonükleaz enzimleri (RE), hücreye yabancı bir DNA molekülünün girmesini onu parçalayarak önlemesine karşın hücrenin kendi DNA'sına dokunmazlar (43).

Bakterilerin büyük bölümü, bir veya birkaç türde RE sentezler. Bakterilerin sentezlediği RE'lerin esas görevleri, dışarıdan bakteriye giren ve bazı özel gen veya markerları taşıyan genetik materyalleri ayırıştırarak mutasyonlara engel olmak ve türlerin stabilitesini korumaktır, yani bakterilerde doğal olarak çok miktarda bulunan RE'ler bakterilerin bir çeşit savunma mekanizması olarak görev yaparlar. Bakteriler kendi DNA'larını ise kesilmekten metile ederek korurlar (45).

Restriksiyon enzimleri ile oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar, *restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri (restriction fragment length polymorphisms-RFLPs)* olarak adlandırılırlar. İlk RFLP, beta globin gen kümesinde kullanılmıştır. Kistik fibrozis geni ilk kez sadece RFLP kullanılarak klonlanan genidir. Bu ilk RFLP tanımı, Kan ve Dozy (1978) tarafından yayınlanmıştır. Beta globin geninin yakınında, *HpaI* enzimi ile bir kesim noktası ortaya çıktığını göstermişlerdir. Bu, RFLP'nin klinikteki ilk uygulamasıdır (43,45).

RFLP'ler oldukça yaygındır, insan genomunda binlercesi tanımlanmıştır ve bunların birçoğu her bir kromozoma özgü olarak bulunmuştur. Her bir kromozoma özgül bölgelerde haritalandıkları için, genetik hastalıkların bir ailede nesilden nesile geçişini takip etmek amacıyla belirleyici (marker) olarak kullanılabilirler.

RFLP analizinin temeli, anne ve babanın iki ayrı alleli taşıyan iki kromozomun birbirinden ayırt edilmesine ve aile içinde daha önceden bulunan hasta bir çocuk yardımı ile hangi kromozomun riskli olduğunun, yani hangi kromozomun mutasyona uğramış alleli taşıdığını saptamasına dayanır. Eğer bir birey RFLP için heterozigot ise, o birey bilgilendirici (informatif) olarak tanımlanır. Böylece bu kromozomların nesilden nesile geçmelerini incelemek mümkün hale gelir. RFLP analizinde iki kromozom birbirinden, gen içinde ya da gen yakınında bulunan bir DNA polimorfizminin bulunması (+) ya da bulunmaması (-) ile ayrılır. Analizin kesinliği kullanılan polimorfik işaretin hastalık loküsüne yakınlığı ile doğrudan ilişkilidir. Hastalık loküsüne mümkün olduğunca yakın, gen içi işaretlerin kullanımı tanının kesinliğini % 99'a kadar artırır. Kullanılan genetik işaret ve hastalık loküsü birbirine ne kadar yakınsa rekombinasyon olasılığı o kadar düşüktür ki bu da RFLP analizi için bir avantajdır (43,44,45).

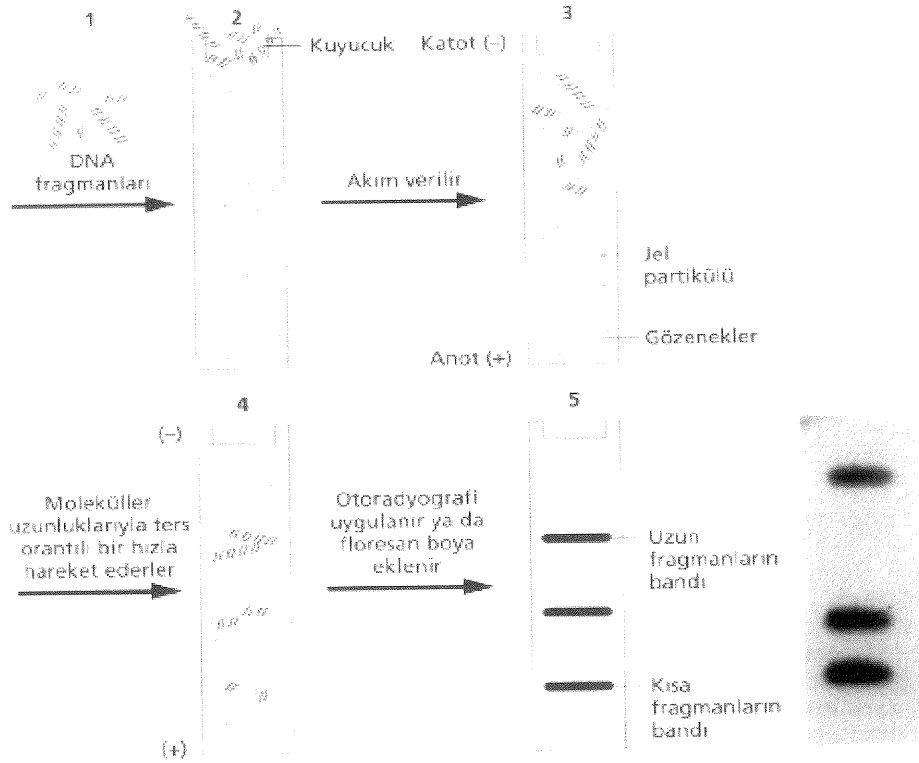
2.9. ELEKTROFOREZ TEKNİKLERİ

Sulu bir çözelti içinde, süspansiyeye yada çözülmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine *elektroforez* denir (43).

Nükleik asit, polisakkarit ve protein gibi biyolojik makromoleküller değişik çözeltiler içerisinde partikül büyüklüğüne bağlı olarak dağılıma özelliğine sahiptirler. Bu olay tamamıyla moleküllerin elektriksel yükü ile ilgili bir davranıştır. Bu nedenle asidik, bazik ve nötral ortamlarda davranış farklılığı ortaya çıkar. Herhangi bir partikülün sahip olduğu net elektriksel yük öncelikle ortamın sahip olduğu hidrojen (H) iyon konsantrasyonu ile saptanır. Bu da iyonlar ya da diğer makro moleküllerin birbirleri ile etkileşime girmesi ile veya farklılaşması ile ortaya çıkartılabilir. Moleküller sahip oldukları elektriksel yük nedeni ile bir elektriksel alan içerisine bırakılırsa ya anoda yada katoda hareket ederler. Bu hareket sahip oldukları elektriksel yükün ters yönünde gerçekleşen bir davranıştır. Yani molekülün dış yüzeyinde pozitif “+” yük varsa molekül katoda doğru, negatif “-” yük varsa molekül anoda doğru hareket eder. Proteinler izoelektrik noktalarının üzerindeki pH değerlerinde negatif (-) yüklüdürler anoda doğru göç ederler; izoelektrik noktalarının altındaki pH değerlerinde ise pozitif (+) yüklüdürler ve katoda doğru göç ederler. Bu olay belirli bir yük dağılımı olan tampon içerisinde gerçekleştiğinden ve olaylarda elektrik kullanıldığından *elektroforez* adı verilmektedir. Elektroforezler uygulama alanları ve ayırma ortamları bakımından birbirlerinden farklıdır. Ayırma ortamı olarak genellikle kağıt, selüloz asetat, nişasta, agar, agaroz ve poliakrilamid kullanılır (43,44).

Uygulama alanları ise çeşitli serum proteinleri, zar proteinleri, sitoplazmik proteinler, enzimler ve nükleik asit gibi makro moleküllerdir. Son yıllarda polisakkarit ve yağların elektroforez teknikleri kullanılarak moleküller büyüklüklerine göre analizleri yapılmaya başlanmıştır. Nişasta elektroforezi hemen hemen sadece enzim analizi için yapılır. Agar ve agaroz elektroforezi, ağırlıklı olarak nükleik asit ve protein analizi için yapılır. Kağıt ve nitroselüloz elektroforezi protein analizi için yapılır.

Poliakrilamid jeller ise çoğunlukla proteinler ve nükleik asitler için yapılır (Şekil 2.8) (43).



Şekil 2.8: Farklı boylarda DNA parçaları içeren karışımdan, bu DNA parçalarının elektroforetik ayırımının şematik gösterimi (43).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, vaka grubu olarak, T.C. Sağlık Bakanlığı Mersin Devlet Hastanesi ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran, laboratuvar testleriyle uzman hekimler tarafından prematür menopoz (40 yaş ve altı) tanısı konmuş olan 37 bireyden alınan EDTA'lı kan örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca, normal yaş sınırları içerisinde menopoza girmiş (45-55 yaş arası) 38 bayandan alınan kan örnekleri de kontrol amacıyla kullanılmıştır. Cerrahi müdahale sonucu prematür menopoza girmiş olan bireyler çalışma kapsamına alınmamıştır.

Gönüllü bireylerden, uygun bilgilendirme işleminden sonra, 10 ml EDTA'lı (%2) kan örnekleri alındı. Alınan örneklerden DNA'nın izolasyonu, modifiye tuz çöktürme yöntemine göre yapıldı.

COMT geni (acc.no: Z26491) 1947. pozisyonundaki G→A değişimine bağlı olarak meydana gelen polimorfizm, *Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi* (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism; PCR-RFLP) yöntemi ile belirlendi. Sonuçlar, UV ışık kullanılarak bir görüntüleme sistemi ile (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France) değerlendirildi. Buna göre genotipler: 114, 36 ve 35 bp'lik sonuçlar COMT-HH genotipi; 96, 36, 35 ve 18 bp'lik sonuçlar COMT-LL genotipi ve 114, 96, 36, 35 ve 18 bp'lik sonuçlar COMT-HL genotipi olarak değerlendirildi. Elde edilen gen sıklıklarının istatistiksel analizi, logistik regresyon testi ile yapıldı.

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

- Termal Cykler (Techne Genius Progene, Cambridge, UK)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC 135-90)
- Elektroforez Tankı (Midicell EC-350)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Santrifüj (Elektromag)
- Mikrodalga Fırın (Alaska)
- Derin Dondurucu (Arçelik-2031 D)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Hassas Terazî (AND)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)
- Vorteks (VELP)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)
- Sodyum Klorür (Riedel-de Haen)
- EDTA (Sigma E-5134)
- Sodyum Perklorat (Sigma S-3546)
- Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma L-5750)
- Trizma Base (Sigma T-6066)
- Borik Asit (Carlo Erba 302177)
- Ethidium Bromid (Sigma E-1510)
- Orange G (Sigma O-3756)

- Gliserol (Merck 4091)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Agarose (LE Prona Basica 051342PR)
- PCR Kiti (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- Taq DNA Polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- Primerler
Forward 5'-GGA GCT GGG GGC CTA CTG TG-3'
Reverse 5'-GCC CTT TTT CCA GGT CTG ACA-3'
- Hsp 92II Enzim Seti (Promega, Madison, WI, USA)
- 100 bp marker (100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas Vilnius, Lithuania)

3.3. KULLANILAN TAMPON ÇÖZELTİLER

3.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar

Nüklei Lizis Buffer

- 10 mM Tris-HCl
- 400 mM NaCl
- 2 mM Na₂ EDTA
- 1lt distile suda çözünür, otoklavda steril edilir ve +4 °C`de saklanır.

5M Sodyum Perklorat Solüsyonu

- 5 M Sodyum perklorat çözeltisi hazırlanır.

% 10 SDS Solüsyonu

- 10 g SDS 100 ml distile suda çözünür.

6M NaCl Solüsyonu

- 6 M NaCl çözeltisi hazırlanır.

TE Buffer

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM Na₂ EDTA
- 250 ml distile suda çözünür ve +4 °C'de saklanır.

3.3.2. PCR-RFLP İçin Kullanılan Kimyasallar

- PCR Kiti (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- Taq DNA Polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- Primerler (Lundström ve ark.tarafından 1991 yılında rapor edilmiş olan insan COMT geni dizisine göre dizayn edilmiş primerler kullanılmıştır. Primer dizisi aşağıda belirtilmiştir)

Forward 5'-GGA GCT GGG GGC CTA CTG TG-3'

Reverse 5'-GCC CTT TTT CCA GGT CTG ACA-3'

- Hsp 92II Enzim Seti (Promega, Madison, WI, USA)

3.3.3. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

10X TBE (Tris–Borat–EDTA) Buffer

- Tris Base (54 g)
- Borik Asit (27,4 g)
- 1 mM Na₂ EDTA (2,72 g)
- Distile su ile 1lt'ye tamamlanır.

Yürütme Tamponu

- 1X TBE Buffer
- Ethidium Bromide (0.5 µg/ml)
- Elektroforez tankının işaretli seviyesine kadar 1X TBE buffer konulur ve 0.5 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde ethidium bromide eklenerek elektrolit çözeltisi hazırlanır.

% 3,5 Agarose Jel Solüsyonu

- 1X TBE Buffer (140 ml)
- Agarose Basica LE Prona (4,9 g)
- Ethidium Bromide (0.5 µg/ml)

% 2 Agarose Jel Solüsyonu

- 1X TBE Buffer (140 ml)
- Agarose Basica LE Prona (2,8 g)
- Ethidium Bromide (0.5 µg/ml)

Orange G Solüsyonu

- 1 mM Na₂ EDTA (2,232 g)
- Orange G (200 mg)
- Gliserol (60 ml)
- Distile Su (40 ml)

3.4. DNA İZOLASYONU

İnsan genomik DNA'sının ekstraksiyon, izolasyon ve pürifikasyonuna ilişkin çok çeşitli protokoller geliştirilmiştir. Yaygın olarak standart, makro ve mikro yöntem olmak üzere başlıca 3 yöntem kullanılmaktadır. Bu çalışmada, insan sağlığı açısından zararsız ve diğer yöntemlere göre maliyeti düşük bir makro yöntem olan *Modifiye Konsantre Tuz Solüsyonu ile Çöktürme Yöntemi* kullanıldı. Yöntemin esası, lökositlerin hücre ve çekirdekteki protein yapılarının bozularak parçalanması, yoğun bir tuz çözeltisi ile ortamdaki protein kalıntılarının çöktürülmesi ve üstte kalan sıvı kısımda bulunan genomik DNA'nın etil alkol yardımı ile yoğunlaşması sağlanarak ortamdan izole edilmesidir (44,45).

Bu yöntemde, lökositlerde bulunan DNA'nın elde edilmesi amacıyla 10 ml kan alındı. İçinde 1 ml % 2'lik EDTA çözeltisi bulunan 15 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine konuldu ve üzerine soğuk steril distile su eklendi. Karışım 2-3 dk. hızlı olarak aşağı yukarı karıştırıldı. 10 dakika 2000 rpm'de oda ısısında santrifüj edildi. Supernatant atılıp peletin üzerine soğuk su ilave edilip karıştırıldı. Tekrar 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi ve supernatant atıldı. Bu yıkama işlemi dört sefer tekrarlandı. Son yıkamadan sonra supernatant atıldı ve pelet üzerine 3 ml nüklei lizis buffer eklendi. Karışım 2-3 dk. hızlı olarak aşağı yukarı karıştırıldı. 200 µl % 10 SDS ve 500 µl 5 M Sodyum Perklorat eklendi. Tüp aşağı yukarı alt üst edildi ve bir gece 37°C'de etüvde inkübasyona bırakıldı.

İkinci gün, her bir tüpe 2 ml 6 M NaCl çözeltisinden ilave edilip, hızlıca yaklaşık 20 defa aşağı yukarı karıştırıldı. Oda ısısında 10 dk bekletildi ve 15 dk 3500 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant temiz bir tüpe alındı ve mevcut hacmin iki katı oranında, +4°C ısıda tutulan etanol (% 99) eklendi. Tüpler, DNA iplikçikleri yoğunlaşmaya kadar dikkatli olarak alt üst edildi. Yoğunlaşan DNA iplikçikleri otomatik pipet ucuyla, çekmeden uca sarılarak alındı ve 500 µl TE içeren eppendorf tüplerine konuldu. DNA'nın çözülmesi için tüpler, oda ısısında 24 saat bekletildi. Her bir bireye ait elde elden DNA örnekleri +4°C ısıda saklandı.

3.5. MOLEKÜLER ANALİZİ

3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği (PCR)

PCR, tek bir molckül DNA'yı dahi çoğaltabileceğinden, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu kontaminasyon, daha önceki PCR reaksiyonu, eksojen DNA veya diğer hücrel materyallerden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, kullanılan sarf malzemeleri ve solüsyonların steril olmasına dikkat edildi. Ayrıca PCR reaksiyonunda, ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNAase ve RNAase enzimlerinden arındırılmış steril 0,5 ml'lik eppendorf tüpleri (Thin-Walled PCR Tubes Axygen) kullanıldı.

COMT geninin 1947. pozisyonundaki polimorfizm, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemiyle belirlendi. PCR işlemi için bu polimorfizmi içeren 185 baz çiftlik (bp) bölge, 5'-GGA GCT GGG GGC CTA CTG TG-3' (forward) ve 5'-GCC CTT TTT CCA GGT CTG ACA-3' (reverse) primerleri kullanılarak çoğaltıldı (32).

PCR ortamı her bir örnek için; 20-100 ng genomik DNA, 100 µm dNTP mix, 20 pmol primerlerin her birinden, 1 mM MgCl₂, 1 mM 1x PCR buffer ve 1U Taq polymerase olacak şekilde 25 µl'lik reaksiyon hacminde hazırlandı (dNTP mix, 1x PCR buffer ve MgCl₂, hazır karışımlar şeklinde, kullanılan PCR kitinin içerisinde mevcuttu). Amplifikasyon, otomatik bir thermal cycler kullanılarak gerçekleştirildi. PCR koşulları şu şekilde sağlandı:

94 °C	3 dakika.....	1 Döngü.....	(İlk Denatürasyon)
94 °C	1 dakika		(Denatürasyon)
60 °C	1 dakika.....	35 Döngü	(Primer Bağlanma – Annealing)
72 °C	1 dakika.....		(Sentez – Extension)
72 °C	7 dakika.....	1 Döngü.....	(Son Sentez – Final Extension)

PCR Ürünleri RFLP ve elektroforez işlemlerinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı (32).

3.5.2. Elektroforez Tekniği

Her bir birey için, PCR işlemi sonrasında COMT geninin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için agaroz-jel elektroforez işlemi uygulandı. Bu işlem sonrasında 185 hp'lik tek bir bant gözlenmesi bekleniyordu. Bunun için % 2'lik agaroz jel hazırlandı. Düşük erime sıcaklığı sahip (55–60 °C) ve moleküler biyolojik çalışmalar için uygun nitelikte agaroz (Agarose Basica LE, Prona) kullanıldı. 2,8 g agaroz, 140 ml 1X TBE çözeltisi içerisinde ve mikrodalga fırın yardımıyla şeffaf bir görünüm elde edinceye kadar eritildi. Boyar madde olarak, 0.5 µg/ml ethidium bromide kullanıldı.

Hazırlanan agaroz, TBE ve ethidium bromide karışımı, jel taraklarını eritmeyecek ısıya düşmesini sağlamak için, manyetik karıştırıcıda uygun ısıya düşene kadar karıştırıldı. Jel kalıbına döküldü ve jel tarakları yerleştirilerek katılaştırıldı.

beklendi. Jel tamamen katılaştıktan sonra (oda ısısında yaklaşık 2-3 saat) jele gömülü taraklar çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı, yerleştirilen jelin üst kısmı tamamen örtülünceye kadar yürütme tamponu ile dolduruldu.

PCR örneklerinin 10 µl'si RFLP işlemi için temiz bir eppendorf tüpüne alınarak oda ısısında saklandı. Yürütülecek olan örnekler ise 10 µl Orange G boyası ile boyanarak santrifüjlendi. Orange G boyası gliserol içerdiğinden dolayı, kuyucuklara yükleme sırasında örneklerin yoğunlaşarak dibe çökmesini sağlamaktadır ve bu şekilde örneklerin taşmasını engellediğinden dolayı tercih edilmiştir. Aynı zamanda örneklerin yürütülmesi sırasında gözle görülebildiği için DNA bantlarının jel üzerindeki yaklaşık konumunu da vermektedir. Santrifüjlenerek iyice karışması sağlanan örneklerin her biri otomatik pipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi.

Elde edilen bandın istediğimiz bant olup olmadığını tespit etmek amacıyla 100 bp'lik marker kullanıldı. Örnekler 100 voltluk akım uygulanarak 20-30 dakika yürütüldü.

Ethidium bromide ile boyanmış olan DNA molekülleri ultraviyole (UV) ışık altında 312 nm dalga boyunda fluoresan yansıma gösterirler. Elde edilen DNA bantları jel görüntüleme sistemi yardımıyla gözlemlendi. Gözlenen bantların moleküler uzunluğu, marker ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi (± 10 bp). Elde edilen görüntü diskete kaydedilerek saklandı.

3.5.3. Restriksiyon Enzimi Parça Uzunluk Polimorfizmi Tekniği (RFLP)

RFLP için ayrılmış PCR ürünü örnekleri, kesim işlemi için *Hsp 92II* enzimi ile muamele edildi. Bunun için, her bir örneğe 5U *Hsp 92II* enzimi eklenerek 37 °C'de 5-7 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda örnekler, yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış % 3.5'lük agaroz jelde ve aynı elektroforez koşullarında 45-55 dakika kadar yürütüldü.

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm değerlendirmelerde 100 bp'lik marker kullanıldı. Gözlenen bantların moleküler uzunlukları, marker ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi (± 10 bp). Örnekler, UV ışık altında jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek değerlendirildi.

Genotiplendirme; 114, 36 ve 35 bp'lik bantların gözleendiği bireyler COMT-HH genotipi, 96, 35, 36 ve 18 bp'lik bantlar COMT-LL genotipi ve 114, 96, 36, 35, ve 18 bp'lik bantları gösteren bireyler ise COMT-HL genotipi olarak değerlendirildi. Ancak 18 bp'lik bantlar çok küçük olması nedeniyle, elektroforez işlemi sırasında akıp gittiğinden dolayı gözlenemedi. Bununla birlikte bu fragmentin gözlenmemesi, genotip tanımlaması için kritik olmadığından dolayı bu durum yanlış değerlendirmeye neden olmamıştır (32).

3.7. İstatistiksel Analiz

Vaka ve kontrol gruplarının istatistiksel analizi için; yaş, menarş yaşı, menopoz yaşı, ailedeki menopoz öyküsü ve COMT genotipi değerleri kullanıldı. Cerrahi operasyon sonucu prematür menopoza girmiş olan bireyler çalışma kapsamına alınmadı.

OR ve % 95 güven aralığında, prematür menopoz ve normal menopoz durumu ile COMT genotipi arasındaki ilişki değerlendirilerek, logistik regresyon kullanılarak hesaplandı (Statistical Package for Social Sciences, SPSS, version 10.0). Sonuçlardan elde edilen p değerleri iki yönlü olarak değerlendirildi. P değerinin 0.05'den az olması, istatistiksel olarak anlamlı şekilde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışma, gönüllü, akraba olmayan ve prematür menopoza girmiş (≤ 40) 37 birey ile normal yaşta menopoza girmiş (≥ 45) 38 bireyi kapsamakta olup, çalışma popülasyonunun özellikleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

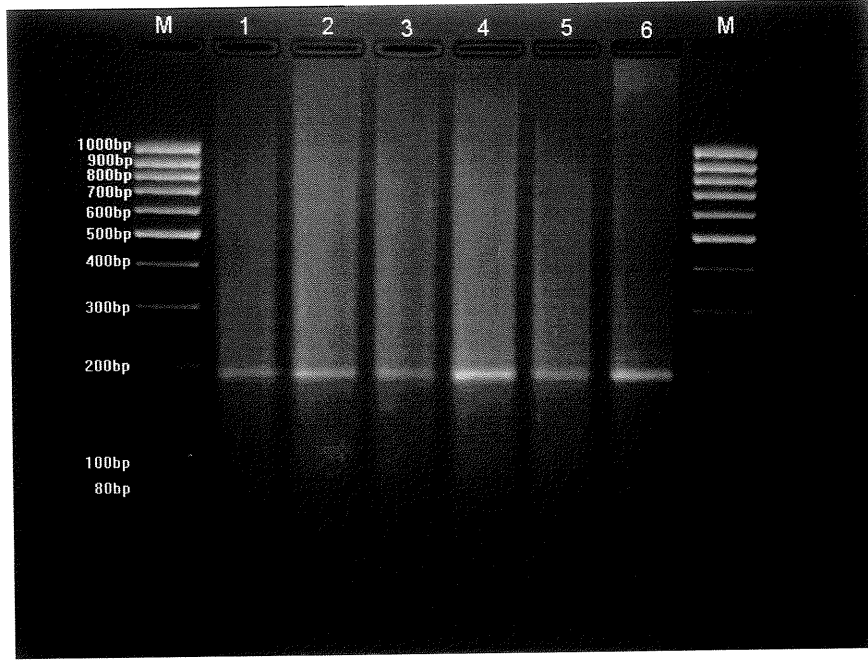
Çizelge 4.2: Çalışma Popülasyonunun Özellikleri

	Prematür Menopoz	Menopoz
Menarş Yaşı	13.56 \pm 1.8	13.57 \pm 1.5
Menopoz Yaşı	35.75 \pm 2.9	48.81 \pm 3.1

Her bir birey için RFLP kesiminden önce, doğru genin amplifiye olup olmadığını anlamak için elektroforez yapıldı. Bazı bireylere ait sonuçlar Şekil 4.9 da gösterilmiştir.

Bu gendeki polimorfizmi saptamak için, her bir örneğe RFLP ile kesim uygulandı. Vaka grubu (37 birey) ve kontrol grubu (38 birey) olmak üzere toplam 75 bireyin COMT genindeki fonksiyonel polimorfizmi belirlemek için: COMT geninin 108/158. kodonundaki G \rightarrow A değişimi, Valin \rightarrow Methionin değişimine bağlı olarak belirlenen H ve L allellerinin oluşturduğu genotipleme yapıldı.

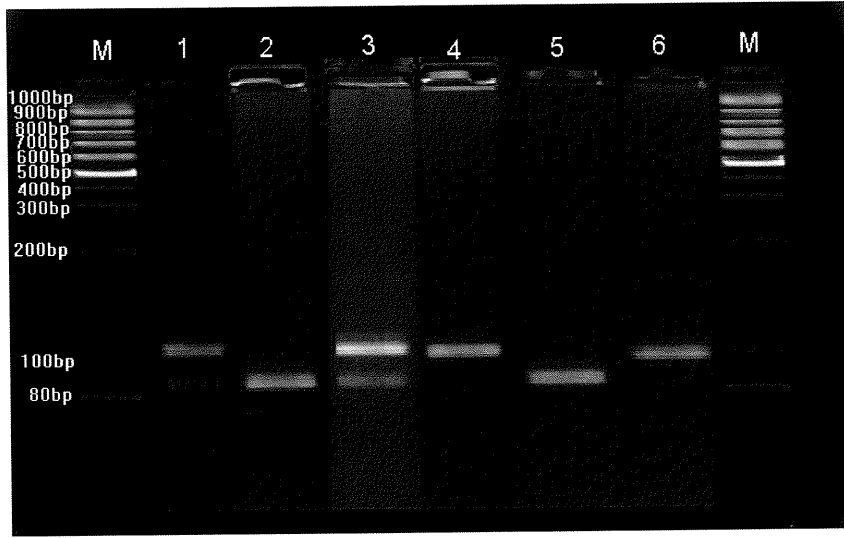
114, 36, ve 35 bp fragment gözlenen bireyler yüksek aktiviteli COMT-HH genotipi göstermekteydi. 96, 35, 36 ve 18 bp'lik fragmentlerin gözlendiği bireyler düşük aktiviteli COMT-LL ve 114, 96, 36, 35 ve 18 bp'lik fragmentlerin gözlendiği bireyler ise orta enzim aktivitesini gösteren COMT-HL genotipine sahipti.



Şekil 4.9: PCR sonrasında 185bp'lik COMT geni fragmentlerinin agaroz jel (% 2) elektroforezindeki görünümü. 100 bp Marker (M) ve bireyler de numaralı (1-6) olarak gösterilmiştir. Elde edilen fragmentlerin, marker temel alınarak değerlendirildiğinde yaklaşık olarak 185 bp olduğu gözlenmektedir ve bu da doğru geni amplifiye ettiğimizi ifade etmektedir.

Buna göre premenopozlu 37 bireyden, 5 bireyin H/H (% 13.5), 25 bireyin H/L (% 67.6) ve 7 bireyin L/L (% 18.9) genotipinde olduğu saptandı. Menopoz grubunda ise toplam 38 bireyden 6 bireyin H/H (% 15.8), 28 bireyin H/L (% 73.7) ve 4 bireyin ise L/L (% 10.5) genotipinde olduğu saptandı (Çizelge 4.3). COMT genotiplerinin tek başına premenopozu tetikleme durumu, istatistiksel anlamlılık sınırlarında değildi ($p>0.05$).

Bazı bireylerin, bu polimorfizme ait elde edilen RFLP sonrası elektroforez örnekleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10: COMT geni PCR ürününün, Hsp 92II restriksiyon enzimi ile kesiminden elde edilen sonuçlar (% 3,5'luk agaroz jel elektroforezi). 100 bp Marker (M) ve bireyler de numaralı (1-6) olarak gösterilmiştir. 1 ve 3 no.lu bireyler COMT-HL (114 ve 96bp); 2 ve 5 no.lu bireyler COMT-LL (96bp); 4 ve 6 no.lu bireyler ise COMT-HH (114bp) genotipi göstermektedir. 36, 35 ve 18bp'lik fragmentler çok küçük olduğundan dolayı, elektroforez sırasında jelden akmıştır.

Eldedilen verilere göre, toplam çalışılan 75 bireyden % 14.7'si COMT geninin yüksek aktiviteli (HH) formuna sahipti, aynı şekilde düşük aktiviteli formu olan LL genotipine ise aynı oranda (% 14.7) birey sahipti. Orta aktiviteli formu olan HL genotipine ise % 70.7 oranında bireyin sahip olduğu saptandı.

Çizelge 4.3: Prematür menopoz ve menopoz gruplarında COMT genotip sıklıkları.

n-Örnek Sayısı

COMT Genotipi	Klinik Tanı		P Değeri	Toplam <i>n</i> (%)
	Menopoz	Prematür Menopoz		
HH <i>n</i> (%)	6 (15.8)	5 (13.5)	0.595	11 (14.7)
HL <i>n</i> (%)	28 (73.7)	25 (67.6)	0.395	53 (70.7)
LL <i>n</i> (%)	4 (10.5)	7 (18.9)	0.326	11 (14.7)

Prematür menoz ve menoz gruplarında COMT allel sıklıkları Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Buna göre, prematür menozlu bireylerin % 46.6'sında H alleli (Val 158) saptanırken, % 52'sinde L alleli saptandı. Menoz grubunda ise H allel sıklığı % 53.3 iken, L alleli % 48 oranında saptandı. H alleli için OR, 0.949 (0.861-2.628) ve L alleli için OR, 0.621 (0.133-1.952) olarak bulunmuştur ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu olduğu görülmüştür (H alleli için $p=0.4760$ ve L alleli için $p=0.1281$).

Çizelge 4.4: Prematür menoz ve menoz gruplarında COMT allel sıklıkları
n=Örnek Sayısı N=Allel Sayısı

COMT Alleli	Prematür Menoz (n=37) N(%)	Menoz (n=38) N(%)	P Değeri	OR (% 95 CI)
H (Val 158)	35 (46.6)	40 (53.3)	0.4760	0.949 (0.861-2.628)
L (Met 158)	39 (52)	36 (48)	0.1281	0.621 (0.133-1.952)

Bunun yanı sıra bireylerin ailedeki menoz öyküsü ile prematür menoz ilişkisi de göz önünde bulundurulmuştur (Çizelge 4.5). Ailelerinde daha önce prematür menoz öyküsü bulunan bireylerde de bu durumun görülmesi, istatistiksel anlamlılık sınırlarında saptandı ($p=0,005$).

Çizelge 4.5: Prematür menoz ve menoz gruplarında aile öyküsünün gösterimi.
n=Örnek Sayısı

Aile Öyküsü	Klinik Tanı		P Değeri	Toplam n (%)
	Menoz	Prematür Menoz		
Var n (%)	4 (10.5)	15 (40.5)	0.005	19 (25.3)
Yok n (%)	34 (89.5)	22 (59.5)	0.112	56 (74.7)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, COMT genotiplerinin, prematür menopoza üzerine etkilerini incelemek amaçlandı. Vaka grubu, uzman hekim tarafından prematür menopoza tanısı konmuş olan 37 bireyden oluşmaktaydı. Kontrol grubu ise literatür bilgilerine göre normal kabul edilen yaş sınırlarında menopoza giren 38 bireyi kapsamaktaydı.

Elde edilen veriler sonucunda, prematür menopoza grubundaki 37 bireyin % 13.5'inin COMT H/H, % 67.6'sının COMT H/L ve % 18.9'unun COMT L/L genotipinde olduğu saptandı. Menopoza grubunda ise toplam 38 bireyden %15.8'inin COMT H/H, % 73.7'sinin COMT H/L ve % 10.5'inin ise COMT L/L genotipinde olduğu saptandı. Çalışılan iki grup arasında COMT genotipleri açısından, istatistiksel anlamlılık sınırlarında bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Yapılan araştırmalar sonucunda bu gende bazı etnik farklılıkların olduğu bildirilmiştir ve farklı populasyonlarda COMT allellerinin sıklığının değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Örnek olarak; düşük COMT aktiviteli allelin sıklığı Kenyalılarda, Kafkaslara ya da Güney-Batı Asyalı bireylere göre daha düşüktür (4).

Bu çalışma sonucundaki verilere göre, prematür menopoza bireylerin % 46.6'sında H alleli saptanırken, % 52'sinde L alleli saptandı. Menopoza grubundaki bireylerin ise % 53.3'ünde H alleli, % 48'inde ise L alleli saptandı (H alleli için $p=0.4760$ ve L alleli için $p=0.1281$). Elde edilen bu bulgular, Türk populasyonunda saptanan allel sıklıklarının Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu olduğu görülmüştür (46).

Bunun yanı sıra bireylerin ailedeki menopoza öyküsü ile prematür menopoza ilişkisi de göz önünde bulundurulmuştur ve ailelerinde daha önce prematür menopoza öyküsü bulunan bireylerde de bu durumun görülmesi, istatistiksel anlamlılık sınırlarında saptanmıştır ($p=0,005$). Aile öyküsü ve prematür menopoza ilişkisine yönelik kesin bir

bilgi bulunmamasına karşın özellikle meme ve ovaryum kanserleri açısından ailesel yatkınlık olduğu, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (5,6,24,25,40,47,52,53,54). Aynı şekilde farklı etnik gruplarda ve menstruasyon siklusunu etkileyen diğer genlerle yapılacak geniş kapsamlı çalışmalar, bu konudaki bilgilere daha net bir yorum getirmeyi sağlayacaktır.

Prematür menopoz, temel olarak östrojen yetmezliği sonucunda meydana gelen bir olaydır (15,19). Östrojen metabolizmasında meydana gelebilecek herhangi bir aksaklık, östrojen seviyesini etkileyecek ve belki de bireyin menopoza erken girmesine neden olacaktır.

Östrojen metabolizması sonucu açığa çıkan temel metabolitlerden biri, toksik etkileri olan katekol östrojenlerdir (25,42). Katekol östrojenler, fenolik hidroksil gruplarının metilasyonu ile inaktive edilirler. Metilasyon olayı ile inaktivasyon, COMT tarafından katalize edilmektedir. Eğer bu metilasyon olayı gerçekleşmezse, katekol östrojenler ortamda birikecekler ve bu da oksidatif DNA hasarına neden olacaktır (47,48,49). Bu nedenle östrojen metabolizmasında COMT, oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle düşük aktiviteli COMT genotipine sahip bireylerde, bu enzim yeteri derecede aktivite gösteremeyecektir. Bu durum da enzimin etkinliğini azaltarak, görevini tam olarak yerine getirememesine neden olacaktır. Yani, metilasyon olayı ile inaktivasyon yeteri düzeyde olmayacak ve ortamda katekol östrojenler birikerek hasarlara neden olacaktır.

Bu çalışmada, prematür menopozda COMT gen polimorfizminin çalışılmasının nedeni, COMT'un östrojen metabolizmasında rol oynamasıdır. Son yıllarda bu gendeki polimorfizmin, östrojen metabolizmasını etkilemesinden dolayı, özellikle meme ve ovaryum kanserleri ile ilgisi üzerindeki çalışmaların sayısı artmıştır (24,25,49,50,51). Ancak menopozal durumu etkilemesine ilişkin olumlu ya da olumsuz herhangi bir bilgiye rastlanamamıştır.

Düşük aktiviteli COMT alleli, özellikle menopozal semptomlar gösteren sağlıklı kontrollere göre meme kanserli hastalarda daha sık bulunmuştur (51,52,53,54). Bununla birlikte Kuzey Carolina’da invaziv meme kanserli hastalarda (654 meme kanserli hasta ve 652 kontrol) yapılan geniş kapsamlı vaka-kontrol çalışmaları, meme kanseri ile COMT genotipleri arasında herhangi bir ilişki olmadığını göstermektedir (52). Goodman JE ve ark. (2000) yapılan bir çalışmada ise ovaryum kanser riski ve COMT genotipi üzerinde durulmuş ancak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (24). Thompson PA ve ark. (1998) yaptıkları bir diğer çalışmada menopozal durum ve meme kanseri riski ile COMT polimorfizmini çalışmış (281 meme kanserli hasta ve 289 sağlıklı kontrol), bu polimorfizmin pre- ve postmenopozal kadınlar arasında meme kanseri riskiyle ilişkili olduğu saptanmıştır. Ancak aynı çalışmada, pre- ve portmenopozal kadınlar birlikte değerlendirildiğinde COMT genotipleri ile meme kanseri riski arasında ilişki olmadığı rapor edilmiştir (53).

COMT aktivitesinde mevcut olan bu polimorfizmin kesin olarak üç hastalıkla ilişkisi olduğu saptanmıştır. İlk olarak, “obsesif kompulsif bozukluk” durumunda düşük aktiviteli COMT allelinin sorumlu olabileceği görülmüştür (55). İkinci olarak düşük aktiviteli alelin, şizofren ve agresiflik ile ilişkili olduğu saptanmıştır (56,57,58,59,60). Üçüncü olarak, Velo-cardio-facial sendromunda, kromozomun 22q11 bölgesinde (COMT genini de içeren bölge) delesyon vardır, aynı zamanda farklı davranışlar gösteren taşıyıcılarda, şizofrenlerde gözlenen semptomların bazıları ortaya çıkmaktadır (61). Bununla birlikte, genellikle şizofreni ve COMT alleli arasında ilişki olmadığına ya da çok zayıf bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır (36,56,59).

Son zamanlarda yapılan geniş kapsamlı çalışmalarda, düşük aktiviteli COMT alleli ve geç-başlangıçlı alkolizm arasında açık bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (62,63).

Parkinson hastalığı ile COMT allelinin ilişkisi de kapsamlı olarak çalışılmıştır fakat yapılan çalışmalarda kesin bir ilişki saptanamamıştır. Bununla birlikte düşük COMT aktiviteli allele sahip bazı Japonlu bireylerde Parkinson hastalığı için artan bir risk mevcut olduğu saptanmıştır (21,22).

Görüldüğü üzere, COMT genotiplerinin çok çeşitli hastalıklarla ilişkisi konusunda yapılan çalışmalarda çeşitli çelişkiler mevcuttur ve bu durum henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (64,65,66,67,68,69). Bir çalışmada özellikle östrojen metabolizması ile ilişkili hastalıklarda düşük aktiviteli COMT genotipinin sorumlu olduğu rapor edilirken, diğer bir çalışmada ise bu genle bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir (6,35).

Biz de yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda, düşük aktiviteli COMT genotipinin prematür menopoza durumunu tetiklemesini bekliyorduk. Ancak elde edilen veriler analiz edildiğinde, COMT genindeki polimorfizmin, prematür menopozla ilişkisinin istatistiksel anlamlılık sınırlarında olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

Menopozun multifaktöriyel bir olay olması nedeniyle sadece COMT geninin menopoz olayını etkilemesini beklemek mümkün değildir. Ancak östrojen metabolizmasında etkili olması muhtemel diğer genlerle yapılacak kombine bir çalışma (örneğin östrojen reseptör genleri), çok daha anlamlı sonuçlar elde edilmesine neden olabilir. Bunun yanı sıra, örnek sayısının artırılarak çalışmanın daha kapsamlı hale getirilmesi ve bu gende görülen etnik farklılıklardan dolayı farklı etnik gruplarda çalışmanın tekrarlanması da sonuçları etkileyebilir. Bu nedenlerden dolayı daha detaylı çalışmalar gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Menopoz, kadın hayatının oldukça önemli bir kısmını kapsayan fizyolojik bir olaydır. Menopozla ilgili yapılan çalışmalarda, kadınların yaşamlarının her döneminde sağlıklı yaşayıp yaşam kalitesini arttırmak önem kazanmıştır. Bütün bunlar gözönüne alındığında, özellikle son yıllarda olayın genetik yönüyle ilgili çalışmaların yoğunlaştığı görülmektedir.

Prematür menopoz ise, 40 yaşından genç kadınlarda ortaya çıkan bir durumdur ve multifaktöriyel bir olaydır. Bu durumu etkileyen faktörlerin belirlenmesi, yaşam kalitesinin yükseltilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır. Yapılan bu çalışmada, prematür menopozu etkilemesi muhtemel genetik faktörlerden biri olan, COMT gen polimorfizmi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre bu gendeki polimorfizmin, prematür menopoz ile ilişkili olmadığı saptanmıştır. Prematür menopoz multifaktöriyel bir olay olduğu için bir genin, tek başına bu olayı etkilemesi beklenemez. Ayrıca, örnek sayısının artırılması, daha anlamlı sonuçlar elde edilmesine neden olabilecektir. Bunun yanı sıra COMT genotipindeki polimorfizmin etnik farklılıklar göstermesinden dolayı, farklı popülasyonlarda aynı çalışmanın tekrarlanması da birçok açıdan yararlı olacaktır.

Sonuç olarak, prematür menopozu etkileme olasılığı olan diğer risk faktörleri ve genlerle yapılacak olan kombine, geniş kapsamlı bir çalışma, istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar verebilir. Böylelikle bayanların yaşamlarının çok önemli bir kısmını kapsayan bu dönemini, her açıdan en verimli şekilde geçirmeleri sağlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. World Health Organisation. Technical Report Series: Research on the Menopause. WHO. Geneva, 1981.
2. Atasü T. *Menopoz-Tedavisi ve Kanser*. 1.Baskı, Nobel Tıp Kitapları, 2001:1-33.
3. Hassa H. *Klinikte Menopoz "Değerlendirme ve Yönetim"*. 1.Baskı, Organon Yayınları, 1996:5-32.
4. Reenilä I. Catechol-O-Methyltransferase Activity: Assay, Distribution and Pharmacological Modification. Academic Dissertation, University of Helsinki Institute of Biomedicine Department of Pharmacology and Toxicology, Helsinki, Finland, 1999.
5. Dunning A, Healey C, Pharoah P, Teare M, Ponder B, Easton D. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1999;8:843-854.
6. Huang C, Chern H, Chang K, Cheng C, Hsu S, Shen C. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: A multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Research*, 1999;59:4870-4875.
7. Lavigne J, Helzlsouer K, Huang H, Strickland P, Bell D, Semlin O, Watson M, Hoffman S, Comstock G, Yager J. An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer. *Cancer Research*, 1997;57:5493-5497.
8. Mitrunen K. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. Academic Dissertation, University of Helsinki Faculty of Science Division of Biochemistry Department of Biosciences, Finland, 2001.
9. Paria B, Lim H, Wang X, Liehr J, Das S K, Dey S K. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology*, 1998;139(17):5235-5246.
10. Atasü T, Sahmay S. *Jinekoloji*. 2 Baskı, Universal Yayıncılık, Nobel Yayınevi, 2001:87-125.
11. Hurd WW. *Menopause*. 20th Edition, Baltimore: Williams-Wilkins, 1998:139-171.
12. Speroff L. *The Menopause: A signal for ten future*. 2nd Edition, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 1999:12-28.
13. T.C. Sağlık Bakanlığı. Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü, Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması. Ankara, 2001.

14. **Speroff L, Glass R, Kase N.** *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6th Edition, Lippincott Williams&Wilkins, 1999:186-205.
15. **Singer D, Hunter M.** The experience of premature menopause: a thematic discourse analysis. *Journal of Reproductive and Infant Psychology*, 1999; 17(1):63-80.
16. **Gambrell RD.** The menopause. *Invest. Radiol*, 1986; 21:369-372.
17. **Saver MV, Paulson RJ, Lobo RA.** Reversing natural decline in human fertility. *JAMA*, 1992; 268:1275-1280.
18. **Maxon WS, Wentz AC.** The gonadotropin resistant ovary syndrome. *Semin Reprod Endocrinol*, 1983;1:147-155.
19. **Aiman J, Smentek C.** Premature ovarian failure. *Obstet Gynecol*, 1985;66(1):9-14.
20. **Rebar RW, Erickson GF, Yen SS.** Idiopathic premature ovarian failure: Clinical and endocrine characteristics. *Fertil Steril*, 1982;37(1):35-41
21. **Syvänen A, Tilgmann C, Rinne J, Ulmanen I.** Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase (COMT): correlation of genotype with individual variation of S-COMT activity and comparison of the allele frequencies in the normal population and Parkinsonian patient in Finland. *Pharmacogenetics*, 1997; 7:65-67.
22. **Tai C, Wu R.** Catechol-O-Methyltransferase and Parkinson's Disease. *Acta Med. Okayama*, 2002; 56:1-6.
23. **Lin H, Pizer E, Morin P.** A Frequent deletion polymorphism on chromosome 22q13 identified by representational difference analysis of ovarian cancer. *Genomics*, 2000;69:391-394.
24. **Goodman J, Lavigne JA, Hengstler JG, Tanner B, Helzlsouer KJ, Yager JD.** Catechol-O-methyltransferase polymorphism is not associated with ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2000;9:1373-1376.
25. **Goodman M, McDuffie K, Kolonel LN, Terada K, Donlon T, Wilkens L, Guo C, Marchand L.** Case-control study of ovarian cancer and polymorphisms in genes involved in catecholestrogen formation and metabolism. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2001;10:209-216.
26. **Lower E, Blau R, Gazder P, Tummala R.** The risk of premature menopause induced by chemotherapy for early breast cancer. *Journal of Women's Health&Gender-Based Medicine*, 1999;8(7):949-954.
27. **Männistö PT, Kaakkola S.** Catechol-O-Methyltransferase (COMT): Biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficiency of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological Reviews*, 1999;51(4):593-628.

28. **Rotondo A, Mazzanti C, Dell'Osso L, Rucci P, Sullivan P, Bouanani S, Gonnelli C, Goldman D, Cassano G.** Catechol-O-methyltransferase, serotonin transporter, and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms in bipolar disorder patients with and without comorbid panic disorder. *Am.J.Psychiatry*, **2002**;159:23-29.
29. **Malhotra AK, Kestler LJ, Mazzanti C, Bates JA, Goldberg T, Goldman D.** A Functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition. *Am.J.Psychiatry*, **2002**;159:652-654.
30. **Bertocci B, Miggiano V, DaPrada M, Dembic Zo, Lahm HW, Malherbe P.** Human catechol-O-methyltransferase: Cloning and expression of the membrane-associated form. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**;88:1416-1420.
31. **Zhu BT, Liehr J.** Inhibition of Catechol-O-methyltransferase-catalyzed o-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by quercetin. *The Journal of Biological Chemistry*, **1996**;271:1357-1363.
32. **Tursen U, Kaya TI, Erdal ME, Dericci E, Gunduz O, Ikizoglu Guliz.** Association between catechol- O-methyltransferase polymorphism and vitiligo. *Arch Dermatol Res*, **2002**;294(3):143-146.
33. **Williams RW, Dubnau J, Enoch MA, Flaherty L, Sluyter F, Gannon KS, Maxson SC, Riedl C, Williams KD, Holmes A, Bolivar VJ, Crusio WE.** Hot topics in behavioral and neural genetics. *Genes, Brain and Behavior*, **2002**;1:117-130.
34. **David C, Szumlanski C, DeVry C, Park-Hah J, Clarke S, Weinshilboum RM, Aswad D.** Human erythrocyte protein L-isoaspartyl methyltransferase: heritability of basal activity and genetic polymorphism for thermal stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1997**;346(2):277-286.
35. **Lavigne JA, Goodman JE, Fonong T, Odwin S, He P, Roberts DW, Yager JD.** The effects of Catechol-O-Methyltransferase inhibition on östrojen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer Research*, **2001**;61:7488-7494.
36. **Chen CH, Lee Y, Chung M, Wei F, Koong F, Hwu H, Hsiao K.** Association study of NlaIII and MspI genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and susceptibility to schizophrenia. *Society of Biological Psychiatry*, **1997**;41:985-987.
37. **Cavaliere EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, Johansson SL, Patil KD, Gross ML, Gooden MJ, Ramanathan R, Cerny RL, Rogan EG.** Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**;94:10937-10942.
38. **Han K, Choi J, Moon I, Yoon H, Han I, Min H, Kim Y, Choi Y.** Non-association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and bone turnover in Korean pre-, peri-, and postmenopausal women. *Osteoporos Int*, **1999**;9:290-295
39. **Lucotte G, Mercier G, Burckel A.** The vitamin D receptor *FokI* start codon polymorphism and bone mineral density in osteoporotic postmenopausal French women. *Clin Genet*, **1999**;56:221-224.

40. Goodman JE, Lavigne J, Wu K, Helzlsouer K, Strickland P, Selhub J, Yager JD. COMT genotype, micronutrients in the folate metabolic pathway and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 2001;22:1661-1665.
41. Hanna I, Dawling S, Roodi N, Guengerich P, Parl F. Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) Pharmacogenetics: Association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Research*, 2000;60:3440-3444.
42. Crée C, Ball P, Seidlitz B, VanKranenburg G, Geurten P, Keizer H. Plasma 2-hydroxycatecholesterol responses to acute submaximal and maximal exercise in untrained women. *The American Physiological Society*, 1997;61:7567-7571.
43. Klug WS, Cummings MR. Genetik Kavramlar. Editör:Öner C. Altıncı Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık, 2002, 449-531.
44. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 1.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapları, 1999: 19-68.
45. Akar N. Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş. 1.Baskı, Ankara: A.Ü.Tıp Fakültesi Bilimsel Yayınlar Serisi, 2000: 95-135.
46. Kocabas NA, Karakaya AE, Cholerton S, Sardas S. Catechol-O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphism in a Turkish population. *Arch Toxicol*, 2001;75(7):407-9.
47. Williams A, Philips D. Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Research*, 2000;60:4667-4677.
48. Massart F, Reginster JY, Brandi ML. Genetics of menopause-associated diseases. *Maturitas*, 2001;40:103-111.
49. Mitrinen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma V, Benhamou S, Kang D, Vainio H, Uusitupa M, Hirvonen A. Polymorphic catechol-o-methyltransferase gene and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2001;10:635-640.
50. Millikan RC, Pittman G, Tse CKJ, Duell E, Newman B, Savitz DA, Moorman PG, Boissy R, Bell D. Catechol-O-methyltransferase and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 1998;19:1943-1947.
51. Coughlin S, Piper M. Genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999;8(11):1023-1032.
52. Hamajima N, Matsuo K, Tajima K, Mizutani M, Iwata H, Iwase T, Miura S, Oya H, Obata Y. Limited association between a catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and breast cancer risk in Japan. *Int J Clin Oncol*, 2001;6:13-18.
53. Thompson P, Shields P, Freudenheim J, Stone A, Vena J, Marshall R, Graham S, Laughlin R, Nemoto T, Kadlubar F, Ambrosone C. Genetic polymorphism in catechol-O-methyltransferase, menopausal status, and breast cancer risk. *Cancer Research*, 1998;58:2107-2110.

54. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Nakashima H, Omae K, Watanabe M, Hibi T, Kitajima M. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to genotypes of catechol-O-methyltransferase. *Cancer Lett*, 2000;150:23-31.
55. Karyiorgou M, Altemus M, Galke B, Goldman D, Murphy D, Ott J, Gogos J. Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1997;94:4572-4575.
56. Liou YJ, Tsai SJ, Hong CJ, Wang YC, Lai IC. Association analysis of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenic patients in Taiwan. *Neuropsychobiology*, 2001;43:11-14.
57. Egan M, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberger DR. Effect of COMT Val^{108/158} Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *PNAS*, 2001; 98(12):6917-6922
58. Lachman HM, Nolan KA, Mohr P, Saito T, Volavka J. Association between catechol-O-methyltransferase genotype and violence in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am.J.Psychiatry*, 1998;155:835-837.
59. Chen CH, Lee YR, Chung MY, Wei FC, Kong FJ, Shaw CK, Yeh JI, Hsiao KJ. Systematic mutation analysis of the catechol-O-methyltransferase gene as a candidate gene for Schizophrenia. *Am.J. Psychiatry*, 1999;156:1273-1275.
60. Strous R, Bark N, Parsia S, Volavka J, Lachman H. Analysis of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association with aggressive and antisocial behavior. *Psychiatry Research*, 1997;69:71-77.
61. Lachman H, Morrow B, Shprintzen R, Veit S, Parsia S, Faedda G, Goldberg R, Kucherlapati R, Papolos D. Association of codon 108/158 Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism with the psychiatric manifestations of Velo-Cardio-Facial syndrome. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*, 1996;67:468-472.
62. Nakamura A, Inada T, Kitao Y, Katayama Y. Association between catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and severe alcoholic withdrawal symptoms in male Japanese alcoholics. *Addiction Biology*, 2001;6:233-238.
63. Wang T, Franke P, Neidt H, Cichon S, Knapp M, Lichtermann D, Maier W, Propping P, Nöthen MM. Association study of the low-activity allele of catechol-O-methyltransferase and alcoholism using a family-based approach. *Molecular Psychiatry*, 2001;6:109-111.
64. Vandenberg D, Rodriguez LA, Miller I, Uhl GR, Lachman HM. High-activity catechol-O-methyltransferase allele is more prevalent in polysubstance abusers. *American Journal of Medical Genetics*, 1997;74:439-442.

65. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski C, Weinshilboum RM. Human Catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*, 1996;6:243-250.
66. Hernan MA, Checkoway H, O'Brien R, Costa-Mallen P, Colditz GA, Hunter JA, Kelsey KT, Ascherio A. MAOB intron 13 and COMT codon 158 polymorphisms, cigarette smoking, and the risk of PD. *Neurology*, 2002;58:1381-1387.
67. Wu RM, Cheng CW, Chen KH, Lu SL, Shan DE, Ho YF, Chern HD. The COMT L allele modifies the association between MAOB polymorphism and PD in Taiwanese. *Neurology*, 2001;56:375-382.
68. Saito S, Iida A, Sekine A, Miura Y, Sakamoto T, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S, Nakamura Y. Identification of 197 genetic variations in six human methyltransferase genes in the Japanese population. *J Hum Genet*, 2001;46:529-537.
69. Zheng W, Xie DW, Jin F, Cheng JR, Dai Q, Wen WQ, Shu XO, Gao YT. Genetic polymorphism of cytochrome p450-1b1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2000;9:147-150.

ÖZGEÇMİŞ

17 Ağustos 1978 yılında İzmir’de doğdu. İlkokulu Kastamonu’da, Ortaokul ve Liseyi Mersin’de tamamladı. 1994-1998 yılları arasında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Lisans eğitimini tamamladı. 2000 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi kadrosu ile Yüksek Lisans eğitimine başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.