



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KROMOZOMAL OLMAYAN PREMATURE  
OVARYEN YETMEZLİĞİNDE BMP15, INHA ve  
FOXO3 GENLERİNDEKİ MUTASYON SIKLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA**

**Mustafa AŞÇI**

**Samsun**

**Mart-2015**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KROMOZOMAL OLMAYAN PREMATURE  
OVARYEN YETMEZLİĞİNDE BMP15, INHA ve  
FOXO3 GENLERİNDEKİ MUTASYON SIKLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA**

**Mustafa AŞÇI**

**Prof.Dr. Nurten KARA**

**Samsun**

**Mart-2015**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mustafa AŞÇI tarafından Prof. Dr. Nurten KARA Danışmanlığında hazırlanan Kromozomal olmayan premature ovaryen yetmezliğinde BMP15, INHA ve FOXO3a genlerindeki mutasyon sıklığının araştırılması başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 16/03/2015 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

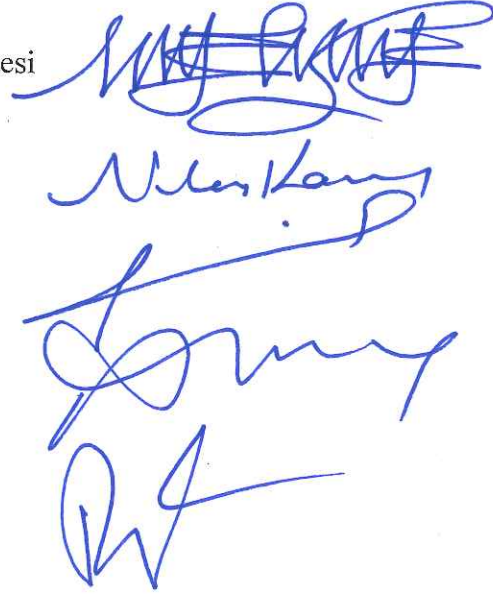
Başkan : Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nurten KARA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ömer ATEŞ, Gazi Osman Paşa Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ, Celal Bayar Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Davut GÜVEN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / .... / .....

**Doç. Dr. Aydın HİM**  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji ve Genetik alanı ile ilgili edindiğim bilgilerin birçoğunu bana öğreten ve tez çalışmalarım sırasında büyük bir özveri ile her türlü destek ve yardımı sağlayan tez danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sitogenetik Bilim Dalı Başkanı, Hocam Sayın Prof. Dr. Nurten KARA'ya, çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Tıbbi Genetik Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet Elbistan ve Sayın Öğr. Gör. Dr. Şengül Tural'a, tez çalışmalarım sırasında büyük bir özveriyle araştırılacak hasta grubunun oluşturulmasını sağlayan Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. İdris Koçak ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Davut Güven'e, çalışmalarım sırasında gösterdikleri sabır ve desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

\*Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından PYO.TIP.1904.12.031 nolu proje ile desteklenmiştir.

Mustafa AŞÇI

## ÖZET

### KROMOZOMAL OLMAYAN PREMATURE OVARYEN YETMEZLİĞİNDE *BMP15*, *INHA* VE *FOXO3* GENLERİNDEKİ MUTASYON SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** Prematüre ovaryen yetmezliği (POY) 40 yaşından önce gözlenen ve toplumdaki sıklığı %1 olan bir düzensizliktir. POY, multifaktöriyel özellikte olan bir infertilite nedenidir. Çalışmada amacımız, *INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* gen mutasyonları ile prematüre ovaryen yetmezlik arasındaki ilişkiyi incelemektir.

**Materyal ve Metot:** Bu çalışma, 60 POY hastası ve 60 sağlıklı fertil olan kontrol grubu kadın üzerinde gerçekleştirildi. Kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra *INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* genleri için elde edilen PCR ürünlerine, DNA dizi analizi yapılarak mutasyon taraması yapıldı.

**Bulgular:** *BMP15* geni ekzon 1'in DNA dizi analizinde, hasta grubunun yaklaşık %1,7'sinde 308A>G (rs41308602) homozigot missense varyasyon, %1,7'sinde insersiyon G homozigot yeni missense mutasyonun yanı sıra bir hastada %1,7 28C>G heterozigot missense ve 62A>G heterozigot missense durumda iki yeni mutasyon saptanmıştır. Kontrol grubunun yaklaşık %1,7'sinde 46T>C heterozigot missense mutasyon gözlenmiştir. *INHA* geni ekzon 2 için, hasta grubunun %3,3'ünde 769G>A rs (12720062) heterozigot missense varyasyonu, %1,7'sinde 973G>A ve 920G>A iki yeni heterozigot missense mutasyon gözlenmiştir. Kontrol grubunun %1,7'sinde ise 971G>A heterozigot yeni bir missense mutasyon gözlenmiştir. *FOXO3* geni ekzon 1 için hasta grubunda %1,7 345C>G ve kontrol grubunda, 343C>T heterozigot iki yeni missense mutasyonun yanı sıra hasta grubunda %18,3 kontrol grubunda ise %10 sıklıkta c.159C>T (rs11757217) sessiz varyasyon saptanmıştır.

**Sonuç:** Her üç gende saptanan varyasyon ve missense mutasyonların fonksiyonel olduğu ancak istatistiksel olarak POY ile ilişkisinin olmadığı saptanmıştır (p>0.05).

*INHA*, *BMP15*, *FOXO3* genleri için incelenen popülasyon sayısı artırıldığında, daha belirleyici sonuçlar elde edilebileceği kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** *BMP15*, *FOXO3*, *INHA* gen mutasyonları, Premature Ovaryen Yetmezlik

Mustafa AŞCI, Doktora Tezi

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ-SAMSUN

Mart-2015

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF *BMP15*, *INH* AND *FOXO3* MUTATION FREQUENCY IN THE GENES OF THE NON-CHROMOSOMAL PREMATURE OVARIAN FAILURE

**Aim:** Premature ovarian failure (POF) is a disorder that observed before the age of 40, and the frequency is %1 in the community. POY is a cause of infertility which has a multifactorial feature. Our aim in this study; analysis the relationship between *INHA*, *BMP15* and *FOXO3* gene mutations and premature ovarian failure.

**Materials and Methods :** This study was performed on 60 POY patients and 60 healthy women. After DNA isolation from blood samples, PCR products obtained for *INHA*, *BMP15* and *FOXO3* gene was performed mutation screening.

**Results:** *BMP15* gene exon 1 of the DNA sequence analysis, approximately 1.7% of patients 308A>G (rs41308602) were homozygous missense variation, 1.7% insertion G homozygotes in a patient as a new missense mutation as 1.7% 28C>G heterozygous missense and 62A>G heterozygous missense mutations in two new cases were detected. Approximately 1.7% of the control group 46T>C heterozygous missense mutations were observed. For *INH* gene exon 2 in 3.3% of patients 769G>A rs (12720062) heterozygous missense variation, 1.7% two new of 973G>A and 920G>A heterozygous missense mutations were observed. In 1.7% of the control group a new of 971G>A heterozygous missense mutations were observed. In *FOXO3* gene exon 1.7% in the patient group for 1 345C>G and the control group, 343C>T heterozygotes two new missense mutations as well as the group of patients 18.3% in the control group in the frequency of 10% c.159C>T (rs11757217) silent variation were determined.

**Conclusion:** Each of the three identified missense variation in genes and the functional mutations, but it has no relation with POY statistically ( $p>0.05$ ). Increasing the number of the population studied for *INHA*, *BMP15* and *FOXO3* genes, we believe that we can obtain more decisive results.

**Keywords:** *BMP15*, *FOXO3*, *INHA* gene mutations, Premature Ovarian Failure

Mustafa AŞCI, Ph.D.Thesis

ONDOKUZ MAYIS UNIVERSITY-SAMSUN

March-2015

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>A</b>	Alanin
<b>A</b>	Adenin
<b>aa.</b>	aminoasit
<b>AFC</b>	Antral Folikül Sayımı
<b>AIRE</b>	Otoimmün Regülatör Gen
<b>AMH</b>	Anti-Mullerian Hormon
<b>APS</b>	Otoimmün Poliglandüler Sendrom
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>bFGF</b>	Bazik Fibroblast Growth Factor
<b>bHLH</b>	basic-helix-loop-helix
<b>BMP</b>	Bone Morfogenetic Protein
<b>BPES</b>	Blefarofimozis-Pitozis-Epikantus Inversus Sendrom
<b>C</b>	Sitozin
<b>CMV</b>	Citomegalovirüs
<b>CR</b>	Caloric Restriction
<b>D</b>	Aspartik asit
<b>Da</b>	Dalton
<b>DmsO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>E</b>	Estradiol
<b>Edta</b>	Etilendiamin tetra asetik asit
<b>EGF</b>	Epitelial Growth Factor
<b>ELİSA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

<b>EPECED</b>	Otoimmün poliendokrinopati-candidiazis-ekdodermal distrofi
<b>ETBr</b>	Etidyum bromid
<b>FIGLA</b>	Factor in the germline alpha
<b>FMRI</b>	Fragile X Mental Reterdation1
<b>FSHR</b>	Follicle Stimulating Hormone Reseptor
<b>FSH</b>	Follicle Stimulating Hormone
<b>FOXO</b>	Forkhead box
<b>G</b>	Guanin
<b>GADD45</b>	The Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 protein
<b>GALT</b>	Galaktoz 1-fosfat uridil transferaz
<b>Gal 1-P</b>	Galaktoz 1-fosfat
<b>GDF9</b>	Growth differentiation factor 9
<b>Glu</b>	Glutamik asit
<b>Gja4</b>	Connexin 37
<b>Gja1</b>	Connexin43
<b>Gn</b>	Gonadotropinlerin
<b>GnRH</b>	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
<b>H</b>	Histidin
<b>HRT</b>	Hormon replasman tedavisi
<b>K</b>	Lizin
<b>kDA</b>	KiloDalton
<b>INHA</b>	İnhibin A
<b>INHB</b>	İnhibin B
<b>L-Leu</b>	Lösin



<b>LH</b>	Luteinize Edici Hormon
<b>M</b>	Metiyonin
<b>MAP kinaz</b>	Mitojen-aktivated protein kinaz
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin complex
<b>N</b>	Asparajin
<b>NaCl</b>	Sodyum klorid
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>Nobox</b>	Newborn Ovary Homeobox
<b>OMI</b>	Oosit Maturasyonunu Engelleyici Faktör
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>Phe</b>	Fenilalanin
<b>PGH</b>	Primordial Germ Hücreleri
<b>pi-3</b>	Phosphatidylinositol-3-kinases
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin Homolog
<b>POY</b>	Prematüre ovaryen yetersizlik
<b>pro</b>	Prolin
<b>R</b>	Arjinin
<b>RPM</b>	Revolution per minute
<b>S</b>	Serin
<b>SIRT1</b>	Silent Information Regulator
<b>SHBG</b>	Seks hormon bağlayıcı globulin
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphisms

<b>SOD2</b>	Süperoksit Dismutaz 2
<b>Stra8</b>	Stimulated by retinoic acid gene 8
<b>Thr</b>	Treonin
<b>T</b>	Timin
<b>TBE</b>	Tris-Borik asit EDTA solüsyonu
<b>Tsc-1</b>	Tumor suppressor tuberous sclerosis complex 1
<b>USG</b>	Ultrasonagrafi
<b>UTR</b>	Transle edilmeyen bölge
<b>V</b>	Valin
<b>Zp</b>	Zona Pellucida

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>VI</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>X</b>
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENELBİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Premature Ovaryen Yetmezliğin Tanımı ve Epidemiyolojisi.....	3
2.2. Non Kromozomal, İatrojenik olmayan POY.....	3
2.3. Etiyoloji.....	4
2.3.1. Gonadal gelişim defekti.....	4
2.3.2. Klinik Tablo.....	5
2.3.3. Menopoz ve Fizyolojisi.....	7
2.3.4. Menstrüel Siklusda Nöroendokrin Kontrolü.....	7
2.3.5. Foliküler Faz.....	8
2.3.6. Oogenezis.....	10
2.3.7. Folikülogenezis.....	11
2.4. Primordial Foliküler Gelişimin Genetik Düzenleyicileri.....	13
2.4.1. Folikül Dönüşümü İnhibitörleri.....	14
2.4.2. Primer Folikül Dönüşümü Aktivatörleri.....	14
2.4.3. Anti-Müllerian Hormon.....	16
2.5. Genetik Etkenler.....	17

2.5.1. İnhibin Alfa Geni ve İnhibin Proteini.....	17
2.5.2. Kemik Morfogenetik Protein 15 (Bone Morphogenetic Protein 15: <i>BMP15</i> ).....	20
2.5.3. BMP15 Geni.....	20
2.5.4. FOXO3 Geni ve Forkhead Box ( <i>FOX</i> )Transkripsiyon Faktörleri.....	22
2.6. Sendromik ve Kromozomal Premature Ovaryen Yetmezliği.....	25
2.6.1. Frajil X Premutasyonu.....	25
2.6.2. Turner's Sendromu.....	26
2.6.3. X Kromozomunun Kritik Bölgesi.....	26
2.7. Otozomal Kromozomal Anomaliler.....	27
2.7.1. FSH Reseptör Bozukluğu.....	27
2.7.2. Perrault's sendromu.....	27
2.7.3. Blefarofimozis-pitozis-epikantus inversus sendrom (BPES).....	27
2.7.4. Otoimmün poliendokrinopati-candidiazis-ekdodermal distrofi (EPECED).....	28
2.8. Edinsel Nedenler.....	28
2.8.1. Çevresel Toksinler ve Enfeksiyonlar.....	28
2.8.2. Sigara kullanımı.....	28
2.8.3. Reprodüktif özellikler.....	29
2.8.4. Depresyon.....	29
2.8.5. Antropometri.....	29
2.8.6. Radyoterapi.....	29
2.8.7. Kemoterapi.....	30
2.8.8. Otoimmünite.....	30

2.8.8.1. Otoimmün Hastalıklarla Birliktelik.....	30
2.8.8.2. Lenfositik Ooforit.....	31
2.8.8.3. Over Antijenlerine Karşı Oluşan Otoantikolar.....	31
2.8.8.4. Metabolik Nedenler (hemokromatosiz ve galaktozemi).....	31
2.8.8.5. Rezistan Over sendromu.....	32
2.9. Tetkik ve Değerlendirme.....	33
2.10. Tedavi ve Prognoz.....	34
<b>3. MATERYAL METOD.....</b>	<b>36</b>
3.1. Araştırma Grubu ve Biyolojik Örnekler.....	36
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
3.3. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler.....	37
3.4. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması.....	38
3.5. DNA İzolasyon Hazır Kit (Norgen Kit #46300).....	38
3.6. DNA Miktarının Tayini.....	39
3.7. PCR Reaksiyonunun Hazırlanması.....	40
3.8. <i>İNHA</i> Geni.....	41
3.9. <i>BMP15</i> Geni.....	44
3.10. <i>FOXO3</i> Geni.....	45
3.11. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	48
3.12. Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	48
3.13. İstatistiksel değerlendirme.....	48
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>49</b>

4.1. Çalışma grubu ile ilgili demografik karakterlerin değerlendirilmesi.....	49
4.2. BMP15 Geni.....	49
4.3. INHA Geni.....	51
4.4. FOXO3 Geni.....	53
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>58</b>
5.1. BMP15 Geni.....	59
5.2. İnhibin Geni.....	63
5.3. FOXO3 Geni.....	66
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>68</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>70</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>93</b>

## 1. GİRİŞ

Prematüre Ovaryen Yetmezliği (POY), 40 yaşından önce amenoreye neden olan hipoöstrojenizm ve yüksek gonadotropin değerleri ile karakterize olan bir durumdur. POY genel olarak kadınların %1'inde görülür ve hastalar primer veya sekonder amenore olarak karşımıza çıkabilir. POY prevalansı coğrafik bölgelere ve etnik gruplara göre %0,1 ile %1,4 arasında değişiklik göstermektedir (Woad ve ark., 2006; Wang ve ark., 2010). POY tanısı alan birçok kadın gerçek menopozdan farklı olarak yıllarca aralıklı bir şekilde over fonksiyonu gösterebilir. Beklenen yaşam süresinin uzaması ile menopozda geçirilen zaman dilimi artışı kaçınılmazdır. Kadınlar normal olarak yaşamlarının 1/3'ünü menopoz döneminde geçirmektedirler. Erken menopoza giren kadınlarda ise menopoz süresi hayatlarının yaklaşık 1/2'sine denk gelmektedir. Yaşamın büyük bir kısmını etkilemesinden dolayı erken menopoz, kadınlar için oldukça önemli bir dönemdir. POY hastaları için bu sürenin daha uzun olması sebebiyle seksüel hormon eksikliğinin etkileri de artacaktır. Ayrıca genç yaşlarda menopoza girilmesinin kişi üzerinde negatif psikolojik etkileri olmaktadır. Bu hastaların çoğunda üremenin tamamlanmaması da buna etki eder. Hastalarda genç yaşta hormon eksikliğine bağlı olarak; seksüel yaşam, ürogenital sistem, kardiyovasküler sistem ve iskelet sistemi ile ilgili problemler ortaya çıkmaktadır (Arıkan ve ark., 2005).

Prematüre ovaryen yetmezliği multifaktöriyel bir düzensizliktir. Etkileri kesin olmamakla birlikte oluşum nedenleri şu şekilde sıralanabilir; menarş yaşı, çevresel toksinler ve enfeksiyonlar, radyoterapi, kemoterapi, otoimmünite, sosyoekonomik durum, sigara ve alkol kullanımı, doğum kontrol haplarının kullanımı, beslenme alışkanlıkları ve genetik faktörlerdir. Prematüre ovaryen yetmezliğe neden olan bu faktörlerin belirlenmesi, bu bireylerin menopoz dönemini en hafif şekilde geçirmelerine ve prematür menopoz gerçekleşmeden önce risk tayini yapılabilmesine olanak verecektir (Min ve ark., 2012; Watkins ve ark., 2006).

Son yıllarda over içinde folikülogenezi düzenleyen ve modifiye eden önemli hormonlar tanımlanmıştır. Kadınlarda over granülosa hücrelerinden, erkeklerde sertoli hücrelerinden salgılanan inhibinin, yumurta foliküllerinin gelişiminde rol oynayan folikül uyarıcı hormon (FSH)'un, negatif feed back mekanizmasındaki fonksiyonu nedeni ile prematüre ovaryen yetmezliğinden sorumlu olabileceği

düşünülmektedir (Corre ve ark., 2009). Herhangi bir inhibin geninde meydana gelebilecek bir mutasyon, biyoaktif inhibinlerin miktarında bir azalmaya neden olur. Bu durum da hipofize uygulanan negatif feed back mekanizmasının ortadan kalkmasına ve FSH konsantrasyonunun artışına neden olur. Bunun sonucunda foliküllerin erken tükenmesi olayı gerçekleşir. Bir çok dokuda farklı seviyelerde salgılanan forkhead box O3 (*FOXO3*) proteini, *FOXO3* geninin aktivitesindeki değişim diğer post translasyonel modifikasyonları içeren (asetilasyon, metilasyon) olayları etkilemektedir.

*FOXO3* proteinleri, hücre ölümünden sorumlu genlerin upregülasyonu ile apoptozisi hedef alarak ya da antiapoptotik proteinlerin downregülasyonunu sağlayarak etkili olur (Donlon ve ark., 2012). Overlerden sentezlenen Bone Morphogenetic Protein 15 (*BMP15*) proteini, oosit ve gelişmiş foliküllerin içinde bulunan parakrin sinyal molekülünü içerir. *BMP15* proteini homodimer bir yapı olarak ya da Growth Differentiation Factor 9 (*GDF9*) ile heterodimer bir yapı oluşturarak oositlerin olgunlaştırılması ve foliküllerin gelişmesini sağlar (Otsuka ve ark., 2011). İdiyopatik POY'da primordial foliküllerin hızla tükenmesinin mekanizması ya da mekanizmalarının belirlenmesi çok önemlidir. Normal fizyolojik bozukluklarda, primordial foliküllerin azalmasında önemli etkilere sahiptir. Bu bozuklukların birincisi oositlerin apoptozisi diğeri ise ilk folikül olarak bilinen primordial foliküllerin aktivasyonudur.

Çalışmamızda Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniğinde prematüre ovaryen yetmezlik tanısı alan hasta ve sağlıklı kontrol grubu kadınlardan alınan kan örneklerinden DNA izolasyonunu takiben Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve DNA dizi analizi tekniklerini kullanarak *INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* genlerine ait birer ekzonlarındaki mutasyonların tesbiti ve POY ile olan ilişkisi incelenecektir.



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Premature Ovaryen Yetmezliğin Tanımı ve Epidemiyolojisi**

Prematüre over yetmezliği (POY), 40 yaşından önce amenore, hipoöstrojenizm ve yüksek gonadotropin seviyesi ile seyreden bir durumdur ( O'Herlihy ve ark., 1980). Bu düzensizlik tıp tarihine ilk olarak 1942 yılında Fuller Albright tarafından "Primer Ovaryen Yetmezlik" adı ile tanıtılmıştır (Cooper ve ark., 2011). POY için üç tanısal kıstas mevcuttur; 4 aydan uzun süren amenore, en az bir ay ara ile iki sefer 40mIU/ml'den fazla saptanan serum FSH seviyesi ve 40 yaşının altında olunması POY için en önemli belirteçlerdir ( Lebovic ve Naz, 2004). POY, genç bir kadın için yüzleşmesi ve kabul etmesi çok zor bir durumdur. Bu zor durum fiziksel ve ruh sağlığını, üreme kapasitesini, cinsel hayatını ve sosyal yaşamını önemli derecede etkilemektedir. Kardiyovasküler hastalıklar, felç ve osteoporoz gibi belirli hastalıklar POY'lu hastalar için kendi yaş grubundaki kontrollere göre daha fazla risk bulundurmaktadır. Ayrıca, cinsiyet hormonlarının eksikliği de ürojinekolojik sistemde olumsuz negatif etkiler oluşturmaktadır.

POY insidansı, bölgesel ve etnik köken farklılığına bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Hispaniklerde %1.4, Kafkas ırkında %1, Çin %0.5 ve %0.1 Japon, Afrika ve Amerika'da %1.4 oranında görülmektedir (Luborsky ve ark., 2003). Genel popülasyondaki insidansı %0,3 ile %1,1 arasında değişmektedir (Luborsky ve ark., 2002). Primer amenoreli grupta POY prevalansı %10-18, sekonder amenoreli grupta % 4-18'dir (O'Herlihy ve ark., 1980). POY insidansı yaşa bağlı olarak da değişkenlik gösterir. 40 yaşın altında görülme sıklığı ortalama 1:100 iken, 20'li yaşlarda 1:10000, 30'lu yaşlarda 1:1000 sıklıkta görülür (Coulam ve ark., 1986).

### **2.2. Kromozomal ve İatrojenik Olmayan POY**

POY, rezistan over sendromu ve ovaryen foliküllerin erken atrezisi ile birbiri üzerine çakışan heterojen bir gruptur (Speroff ve ark., 2005). Açıklanamayan yaygın ovaryen folikül atrezisi sonucunda gelişen POY vakalarında, overlerde çok az miktarda folikül kalmış olabilir fakat kalan foliküller, hipofizer folikül uyarıcı hormon (FSH) üzerinde negatif feedback oluşturmaya yetecek kadar estradiol (E) ve inhibin üretmezler (Davis ve ark., 1996). Primer veya sekonder amenore ile birlikte tekrarlayan biyokimyasal testlerde, sürekli gonadotropin yüksekliği ile birlikte düşük estradiol

seviyeleri ile karakterizedir (Conway ve Goswami, 2005). Adolesan populusyonda görülen POY vakalarının bir çoğunda radyoterapi, kemoterapi öyküsü veya kromozom anomalisi (Turner Sendromu gibi) olduğu için spontan POY insidansı kesin olarak belirlenememiştir. Erişkin kadınlarda POY, düzenli menstruel siklusları takiben sekonder amenore ile karşımıza çıkmaktadır. Aksine, adolesan POY olgularının yaklaşık %50'sinde primer amenore ile tanıya gidilmektedir (Melissa ve ark., 2008).

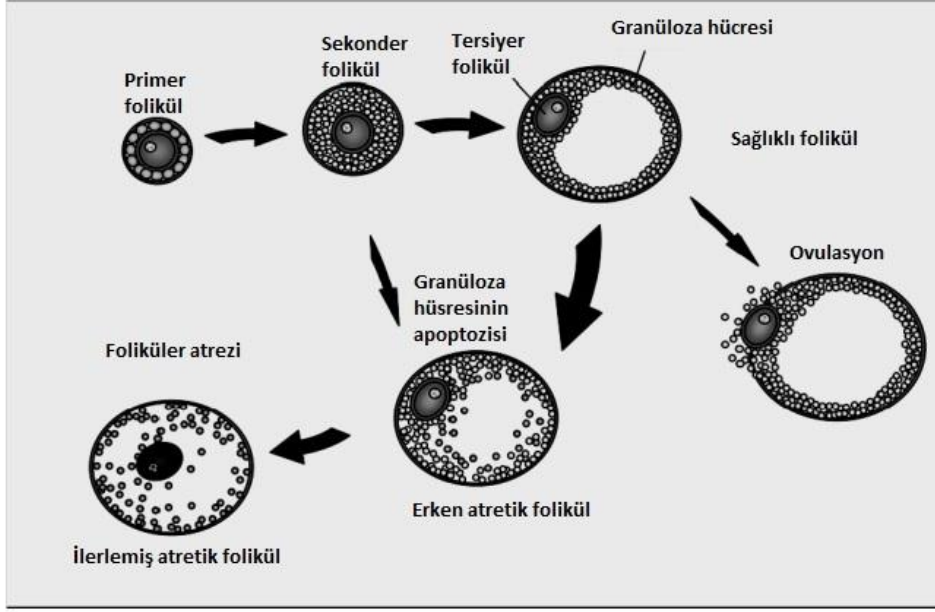
Over rezervi ve fertilitenin prediksyonunda plazma FSH, E ve İnhibin B seviyeleri, düşük sensitivite ve spesifiteye sahiptirler ( Massin ve ark., 2004). Ovaryen folikül varlığının belirteci olarak, serum Anti-Mullerian Hormon (AMH) seviyesi daha kesin bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Durlinger ve ark., 2002). AMH doğumla birlikte serumda bulunabilen, puberteye kadar artış gösterip, ovaryen yaşlanmayla birlikte gittikçe azalan bir belirteç olup AMH, yaşla negatif korelasyon gösterirken, antral folikül sayımı (AFC) ile pozitif korelasyon göstermektedir. Son dönemlerde serum AMH düzeyi, ovaryen folikül varlığının ve ovaryen yaşlanmanın belirteci olarak yüksek sensitiviteli bir marker olarak gösterilmektedir ( Van Rooij ve ark., 2011).

### **2.3. Etyoloji**

#### **2.3.1 Gonadal gelişim defekti**

Gonadal gelişim basamağında (Şekil 1) meydana gelen hasarlar ve gonadların disfonksiyonuna sebep olan faktörler POY etyolojisinde önemli derecede etkilidir. Bu basamaklarda meydana gelebilecek değişimler şu şekilde sıralanabilir.

- a. Normal granuloza hücre tabakasının gelişimindeki hasarlar.
- b. Mayoz bölünmenin profaz safhasında duraksaması sonucu oogonyum aşamasından primer folikül basamağına geçememesi.
- c. Primordial germ hücrelerin daha az kısmının ürogenital bayıra migrasyonu.
- d. Primordial germ hücrelerinin mitoz bölünme ile çoğalması durumundaki hasarlar.
- e. Germ hücrelerinin in utero hasara uğraması.
- f. Primordial germ hücrelerinin ürogenital bayıra (ridge) migrasyonunun hiç olmaması.
- g. Primer foliküllerin fetal FSH'a yanıtız olması (Colin ve ark. 2004).



Şekil 1. Folikül gelişim ve atrezisi (Chun ve ark.,1994' düzenlenmiştir).

### 2.3.2. Klinik Tablo

POY'lu kadınlar, doğal menopoz sürecini izleyen kadınlardan çok daha uzun süre östrojen eksikliğine maruz kalmaktadır. Bu yetersizliğin sonucunda POY'lu kadınlarda, osteoporoz ve kardiyovasküler hastalık riski anlamlı derecede artmış durumdadır (Anasti ve ark., 1998). İnme, koroner arter hastalığı ve periferik vasküler hastalık bu genç kadınlardaki temel ölüm sebeplerinin başında gelmektedir (Colditz ve ark., 1987). Menopoz, ortalama 51 yaşında görülen, ovaryen foliküllerin tükenmesi sonucunda ortaya çıkan doğal bir süreçtir (Kalantaridou ve ark., 2005). Foliküllerin çok erken bir dönemde tükenmesi veya folikül disfonksiyonu sonucunda meydana gelen ovaryen yetmezlik, heterojen bir tablodur (Kalantaridou ve Nelson, 2000). Etyolojide çok farklı etkenlerden şüphelenilse de, POY etyolojisi sıklıkla belirlenemez. Bu grupta en sık, karyotip analizi olarak normal, spontan POY olguları karşımıza çıkar.

POY, erken doğal menopoz olarak düşünülmemelidir. Çünkü bu kadınlarda, yüksek gonadotropin düzeylerine rağmen, aralıklı olarak östrojen üretimi ve ovulasyon olmaktadır (Nelson ve ark., 1994). Erken başlangıçlı over yetmezliğinde, gecikmiş puberta ve primer amenore ile karşımıza çıkar. Sekonder seks karakterleri gelişmemiş bir kız çocuğunda, 14 yaşından sonra veya gelişimi ve sekonder seks karakterleri normal olan bir kız çocuğunda 16 yaşından sonra henüz menarşın başlamaması primer

amenore olarak tanımlanır. Düzenli adet gören bir kadında, 6 ay veya ardışık olarak üç siklus süresi kadar zaman geçmiş bir kadında amenore görülmesi sekonder amenoredir (Speroff ve ark., 2005). Primer amenore ile karşımıza çıkan hasta grubunda östrojen yetersizliğine bağlı ortaya çıkan semptomlar; gece terlemeleri, sıcak basması, vaginal kuruluk, dispareni beklenmez. Çünkü bu semptomların görülmesi için önce, puberta sonrası yüksek östrojene maruz kalmak ve ardından östrojen yetersizliğinin olması gerekmektedir. Primer amenoreli grupta sitogenetik analize (Tablo 1) kesinlikle ihtiyaç vardır. Sekonder amenoreli grupta, X kromozomuna ait mikro delesyon veya translokasyonlar ortalama % 10 oranında görülür ( Davis ve ark., 2000).

POY, tanısı almış bir kişide genetik bir hastalık yada izole bir hastalık, fiziksel veya ruhsal hastalıklarla birlikte olmasına göre farklılık gösterir ve kişinin hayatını önemli bir şekilde etkilemektedir. POY teşhisi alan genç bir kadında, otoimmün hastalıkların bulunması, anamnezde aile öyküsünün olması, kalıtsal sendromlara ait stigmaların izlenmesi klinisyen için faydalıdır. Aile soyağacının belirlenmesi, etkilenmemiş bir erkek birey tarafından kalıtılmış POY olgusunda, ailedeki risk altındaki diğer kadınların ortaya konmasını sağlar (Colin ve ark., 2004).

**Tablo 1:** 115 POY'lu hastalarda klinik bulgular (Davutoğlu ve ark., 2008).

	Primer amenore	Sekonder amenore
Karyotip anomalisi	%56	%13
Y kromozomu	%10	-
Östrojen eksiklik semptomları	%22	%85
Teshis sonrası ovulasyon	-	%24

En sık hipotiroidizm ile birlikte görülen ovaryen yetmezliğin, %10-30 oranında otoimmün hastalıklar ile birlikteliği bulunmaktadır. Hastalar incelenirken; diabet, hipotiroidi, Addison's hastalığı, artrit ve inflamatuvar barsak hastalıkları dikkate alınmalıdır. POY tanısıyla izlenen bu hastalarda da otoimmün hastalıkların sonradan ortaya çıkabileceği unutulmamalıdır. Siklik menstrasyon periyotlarının kaybı, bu kişilerde kendilerini doğurgan ve sağlıklı bir kadın olarak hissetmelerini önemli ölçüde

engeller. Biyolojik ritimlerinin bozulması nedeniyle bu durum kendilerini sağlıklı hissetmelerine sebep olmaktadır. POY bireysel bir sorun olmayıp, aileleri, mevcut ve başlayabilecek ilişkileri etkileyebilecek bir durumdur (Graziottin ve Basson, 2004).

### **2.3.3. Menopoz ve Fizyolojisi:**

Normal embriyonel gelişim döneminde, endodermal kökenli yaklaşık 1000-2000 primordial germ hücresi gebeliğin 5-6. haftalarında, yolk salk'tan genital bayıra (ridge) ameboid hareketlerle göç ederek burada mitotik bölünme ile birlikte sayılarını artırmaya başlarlar. Gebeliğin 20. haftasında, germ hücrelerinin maksimum sayısı kabul edilen, 6-8 milyon değerine ulaştığında mitotik aktivite sonlanır. Bu dönemden sonra primordial germ hücreleri atreziye uğrar. Germ hücrelerinde meydana gelen bu azalma bifazik şekildedir. En hızlı azalma gebeliğin 20. haftasından doğuma kadarki dönemde izlenir. Doğumda toplam oosit sayısı 1-2 milyon iken, pubertada oosit sayısı 400.000 civarındadır. Kadının reproduktif yaşamı boyunca, 400-500 kadar germ hücresi ovüle olur. İkinci hızlı azalma ortalama 37-38'li yaşlarda görülür. Bu dönemi germ hücre sayısının kritik değeri olarak kabul edilen sayının 25.000'lere ulaştığı dönemdir. Bu dönemden itibaren FSH artarken, menstruel sikluslar kısaltmaya başlar ki bu durum oositlerin tükenme zamanıyla yerleşen menopoz tablosuna kadar sürer. Menopozu belirleyen kritik oosit sayısı 1000 civarındadır ( İnceboz, 2005).

Menopozdan sonraki dönemde overde foliküllerin tükenmesiyle birlikte, Luteinize Edici Hormon (LH) yaklaşık 3 kat, FSH'da 10-20 katlık artış görülür. Bu artış süreci menopozu takip eden 1-3 yıl içerisinde maksimum seviyeye ulaşırken, daha sonra yavaş ve kademeli olarak bir azalma görülür. FSH ve LH artış ovaryen yetersizliğinin bir sonucudur. FSH değerinin LH'dan daha yüksek olmasının nedeni LH için yarılanma ömrünün daha kısa olması (LH yarılanma süresi 20 dakika, FSH yarılanma süresi 3-4 saat) ve LH için inhibin gibi negatif feedback yapacak spesifik bir peptidin bulunmamasıdır (Arıkan ve ark., 2005).

### **2.3.4. Menstrüel Siklusda Nöroendokrin Kontrolü**

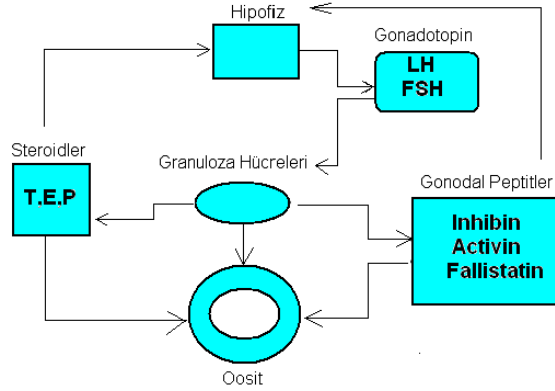
Menstrüel siklus düzenli periyotlar ile görülen vajinal kanamalarla karakterizedir. Menstrüel siklusun düzenlenmesi hipotalamus, hipofiz ve over arasındaki koordinasyona ve buna bağlı olarak hedef organ endometriumda meydana

gelen değişimlere bağlıdır. Menstrüel siklus; foliküler ve luteal faz olmak üzere iki bölüme ayrılır (Arıkan ve ark., 2005).

### 2.3.5. Foliküler Faz

Daha önceki siklusun sonunda artmaya başlayan serum FSH seviyesi ve foliküler fazının ilk beş gününde yükselmeye devam eder. Gelişmeye başlayan ve 1-2 mm. çapına ulaşmış olan 3 ila 30 antral folikülün gelişimlerinin devamı FSH'ın yükselmesine paralel olarak devam eder. Bu grup folikülden bir tanesi büyümesine devam edecektir diğerleri ise atreziye uğrayacaktır.

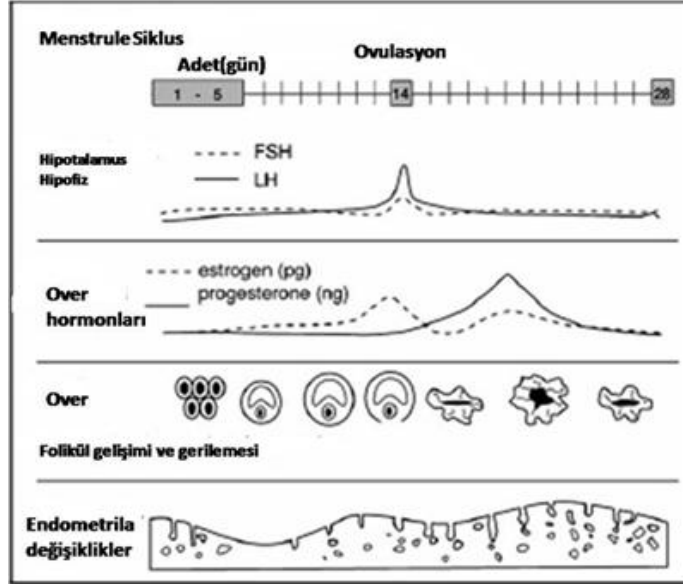
FSH, foliküldeki granuloza hücrelerinden inhibin ve aktivin sekresyonunu sağlar (Şekil 2). İnhibin hipofiz bezinden FSH sentez ve salgısını direkt inhibe eder ve teka hücrelerinden LH'ya bağlı androjen salgısını artırır. FSH'a bağlı östrojen ve inhibin salgısını güçlendirir. Granuloza hücrelerinden progesteron salgısını baskılar. Aktivin aromataz aktivitesini artırarak östrojen sentezini uyarırken FSH reseptörlerinin çoğalmasını da uyarır. İnhibin, teka hücrelerinden androjen salgılatır bu da östrojen yapımı için öncü madde görevi görür. Artan östrojen ve inhibin negatif feed-back ile FSH'ı baskılar ve sonuçta siklusun 5-7. günlerinde düşmeye başlar.



Şekil 2. Foliküler fazın oluş mekanizması (Arıkan ve ark., 2005).

FSH reseptörü (FSHR) bakımından en zengin olan folikül, baskınlık kazanıp gelişirken diğerleri geriler. Dolaşımdaki FSH, foliküler fazın ikinci yarısında düşerken bazal LH'da yavaş yavaş yükselir. FSH ve östrojen sinerjistik olarak granuloza hücrelerinde LH reseptörlerinin oluşumunu indüklerler. Östrojen gonadotropin

salgısının en güçlü inhibitörü iken 200-300pg/ml düzeylerinde 50 saat kadar kalması sonucu hipofize pozitif feed-back etki yapar ve LH'nin ani yükselmesine sebep olur (Speroff ve ark. 1999). Menstrual döngü esnasında FSH, LH ve östrojen hormonlarının düzeyleri ve meydana gelen diğer olayların şeması Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3. Normal menstrual siklusta görülen başlıca değişiklikler  
(<http://www.antiaging.org.tr/eski2/pg013.html>.2014)

İnhibinin temel görevi, hipofizden FSH salgılanmasını negatif feedback mekanizması ile düzenlemektir. MacNaughton ve arkadaşlarının 1992 yılında yaptıkları çalışmada, serum inhibin konsantrasyonunda azalma olduğunda, yumurta foliküllerinde de azalma olduğunu belirlemişlerdir. İnhibin salgılanmasında meydana gelen bu eksiklik, FSH miktarındaki artıştan sorumludur. FSH miktarındaki artış yumurta rezervinin azalmasına sebep olur. Menopoza geçiş döneminde FSH salgılanmasındaki artışın folikül tükenme oranındaki artışla paralel oluşu, bu görüşün doğru olduğunu göstermektedir (MacNaughton ve ark., 1992).

Sonuç olarak, inhibin geninde meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon, aktif olan inhibinlerin miktarında yetersizliğe sebep olacaktır. Böyle bir durumda, hipofize uygulanan negatif feed back mekanizmasının ortadan kalkmasına ve FSH konsantrasyonunun artmasına neden olacaktır. Bu durumun sonucunda da foliküllerin

erken tükenmesi olayı gerçekleşecektir. Bu mekanizmanın da prematüre menopoza neden olduğu düşünülmektedir (Mason ve ark., 1987; Vale ve ark., 1990).

### **2.3.6. Oogenezis**

Gametogenezis, özelleşmiş üreme hücreleri olan gametlerin oluşum ve gelişme sürecidir. Gametler primordiyal germ hücrelerinden gelişir. Primordiyal germ hücreleri ilk olarak intrauterin 3. haftanın sonunda yolk kesesi duvarının allantoise yakın olan kısmında görülür. 3. haftanın sonu 4. haftanın başlarında primordiyal germ hücreleri ameboid hareketlerle gelişmekte olan barsak dorsal mezenterinden geçerek gelişmekte olan ilkel gonadlara göç eder. Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaşamaz ise dejenere olur ve yok olurlar. Aynı şekilde gonadların da ileri gelişimi için primordiyal germ hücrelerinin gonadlara ulaşmış olması gerekmektedir.

Primordiyal germ hücreleri gelişmekte olan gonadlara ulaşır ulaşmaz oogoniumlara farklılaşırlar. Bu sırada mitoz bölünme ile hızla çoğalarak oogoniumların sayıları artar. Oogenezisi prenatal maturasyon ve postnatal maturasyon olmak üzere iki evrede inceleyebiliriz. İntrauterin 4. aydan sonra oogoniumlardan primer oositler oluşmaya başlar. Bu arada yüzeyel germinal epitelinin proliferasyonu ve invaginasyonları sonucu oluşan foliküler hücreler de oogonia ve primer oosit kümelerini sarmaya başlar. İntrauterin 7. aydan sonra artık hiç oogonia kalmaz ve her primer oosit ayrı olarak folikül hücrelerince sarılır. Bu yapı artık primordiyal folikül olarak adlandırılır. Primer oositlerin ileri gelişimi folikül hücrelerince salgılanan oosit maturasyonunu engelleyici faktör (OMI) aracılığı ile puberteye kadar engellenir ve I. mayozun profazında (diploten evresinde) duraklar. Oluşan primordiyal foliküllerin bir kısmı atrezi ile kaybolur ve primordiyal folikül sayısı doğuma kadar bir miktar azalır.

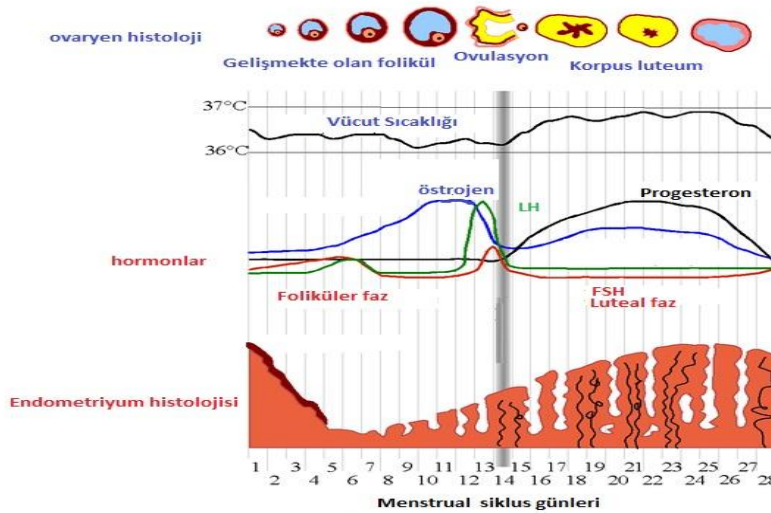
Yenidoğanın over korteksinde 700.000-2.000.000 civarında primordiyal follikül bulunur. Devam eden atreziler sebebiyle sayı puberteye kadar 400.000'e kadar düşer. Puberte ile birlikte hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle her menstruel siklus başında 5-15 folikül gelişmeye başlar ancak tek nadiren de daha fazlası ovulasyon aşamasına kadar ilerleyebilir. Dominant folikül dışındaki gelişmeye başlayan diğer foliküller atreziye uğrar. Bu şekilde folikül sayısı menapoza kadar gittikçe azalır. Over korteksinde hiç folikül kalmadığı zaman menapoz gerçekleşir. Puberteden menapoz dönemine kadar ancak 400-500 folikül ovule olabilecek şansa sahip olur (Motta ve



ark.,1997; Anwar ve Moussa, 2002; Sadler, 2005; Carlson, 2009; Kuyucu ve Tap, 2009; Schoenwolf, 2009).

### 2.3.7. Folikülogenezis

Gelişen foliküllerden bir tanesi dominant foliküldür, bu folikül ovulasyon aşamasına kadar ulaşabilir. Ovulasyondan sonra geçici glanduler yapıdaki korpus luteumu oluşturur. Antral boşluk kısmı önce kanla dolar, daha sonra bağ dokusu yapısını alır. Granüloza hücreleri kollabe olarak kıvrımlı bir hal alır ve granüloza lutein hücrelerini meydana getirir. Teka interna hücreleri de teka lutein hücrelerini oluşturur. Ovulasyona kadar gelişemeyen diğer foliküller dejenere olur ve bağ doku yapısındaki korpus atretikumu oluşturur (Şekil 4). Korpus luteum gebelik oluşmaz ise serum seviyesi düşen gonadotropinlerin (Gn), esasen de luteinizan hormonun, sonucunda geriler ve korpus albicansı oluşturur (Motta ve ark.1997; Sadler 2005; Carlson 2009; Schoenwolf 2009).

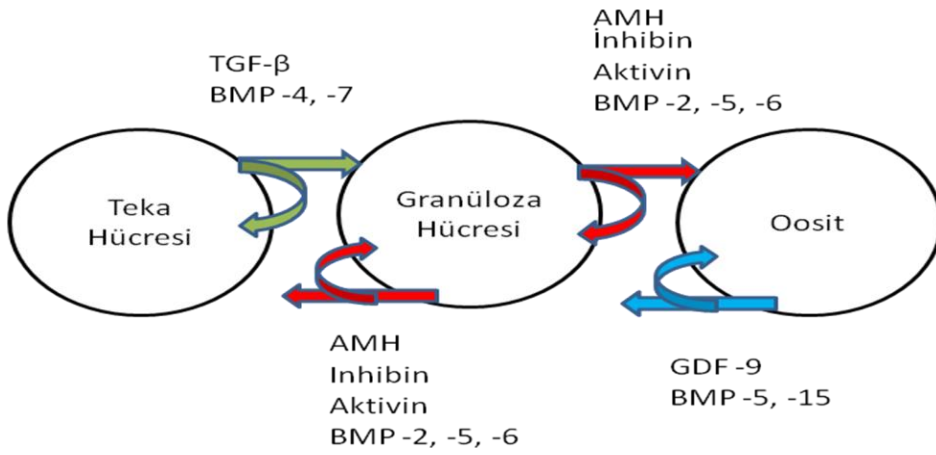


Şekil 4. Foliküler ve Luteal fazda meydana gelen hormonal değişimler.

([http://www.sharinginhealth.ca/biology/menstrual\\_cycle.html](http://www.sharinginhealth.ca/biology/menstrual_cycle.html).2014' düzenlenmiştir)

Folikül gelişiminde puberteden sonra hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofizden salgılanan FSH ve LH ayrıca overde sentezlenen otokrin ve parakrin etkili lokal büyüme faktörleri (Growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morfogenetic protein 6 (BMP6), bone morfogenetic protein 7 (BMP7),

bone morfojenetik protein 15 (*BMP15*), c-Kit, Epitelial Growth Factor (EGF), bazic Fibroblast Growth Factor (bFGF) ve AMH rol alır. Bunlar oosit, granuloza hücreleri ve teka hücrelerinde sentezlenip salınabilir. AMH gelişmekte olan foliküllerin granuloza hücrelerinde sentezlenip (şekil 5) parakrin etki göstererek diğer foliküllerin gelişimini inhibe etmesi ve dominant folikülün belirlenmesi açısından diğer faktörlerden ayrı bir yere sahiptir (Fortune, 2003; Webb ve ark., 2004; Knight ve Glister, 2006 Picton ve ark., 2008).



şekil 5. Folikül gelişiminde etkili olan lokal büyüme faktörleri (Kuyucu ve Tap, 2009 düzenlenmiştir).

Bir kadının üreme yeteneğinin ne zamana kadar süreceğini overlerindeki primordial foliküllerin sayısı belirler. Primordial folikülleri sessiz (dorman) fazda tutan inhibitör sinyallerin yanında büyümelerini aktive eden faktörlerde bulunmaktadır. Bu faktörler foliküllerin gonadotropinlere olan cevaplarının modifikasyonu ve luteinizasyonun inhibisyonu gibi fonksiyonları da üstlenmektedirler. Başlangıçta sayıları yüz kadar olan germ hücreleri gebeliğın ortasında milyonlara ulaşıp ardından atreziye bağlı olarak menopozda rezerv tükeninceye kadar harcanarak yok olmaktadır. Primordial germ hücreleri (PGH) oositlerin en temel başlangıç öncüleri (progenitor) olan PGH ekstraembriyonik ektoderme komşu proksimal epiblasttan ekstraembriyonik ektodermal orijinli *BMP4* and *8b* ile ekstraembriyonik endodermal kaynaklı *BMP2* sinyali ile gelişmektedir (Ying ve Zhao, 2001; Ohinata ve ark., 2009; Öktem ve Urman, 2012 ). *BMP4*'e yanıt olarak epiblast, germ hücre özellikleri kazanmaktadır. Göç eden PGH'leri overe ulaşınca ismi oogonia olur. Oogonia PGH'e göre daha hızlı mitotik

aktivite gösterir ve mayoza girmeden çeşitli defalar mitoz bölünme geçirirler. Aslında oogoniyaların mitotik aktivitesi over rezervinin ne kadar olacağını belirler. Pre-mayotik DNA sentezinin başlaması ile oogoniyal dönem biter oosit dönemi başlar. Oluşan oositlere primer oositler denir. Mayoza giriş 8 ile 13 haftalar arasında olup ilk folikül oluşumunun izlendiği 16. haftadan çok öncedir. Stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8 geni) bu aşamada çok önemlidir. Bu genin inaktivasyonunda farede premayotik DNA replikasyonu, mayotik kromozom kondensasyonu, kohezin, sinaps ve rekombinasyon olmamaktadır (Baltus ve ark., 2006; Öktem ve Urman, 2012).

#### **2.4. Primordial Foliküler Gelişimin Genetik Düzenleyicileri**

Factor in the germline alpha (FIGLA) primordial folikül gelişimi için gerekli ilk transkripsiyon faktörüdür. Stem cell faktörle beraber PGH'lerin primordial foliküle dönüşümünde rol alırlar. FIGLA “basic-helix-loop-helix” (bHLH) transkripsiyon faktörünü uyararak zona pellusida oluşum genleri olan zona pellucida'nın (Zp1, Zp2 ve Zp3) ekspresyonunu sağlar. bHLH, Sohlh1 ve 2-/- olgular homeobox protein 8 DNA binding protein (Pou5f1:Oct4) ve newborn ovary homeobox (Nobox) ve figla gibi transkripsiyon faktörlerini eksprese edemezler. Sonuç olarak postnatal oosit kaybıyla karakterize sterilite kliniği ortaya çıkar. *FOXO3* gen mutasyonu olan olgularda ise “Premature primordial foliküler gelişim” tablosu ortaya çıkar ve olgular klinik olarak prematür ovaryen yetmezliğe giderler. Benzer şekilde Phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) gen hasarı oluşturulan serilerde *FOXO3* gen delesyonuna benzer bir klinik tablo gösterirler. *PTEN* genin sadece over dokusundaki mutasyonu foliküler gelişim defektine yol açarken yaygın *PTEN* mutasyonları granüloza hücreli tümör oluşumuna yol açar. Granüloza hücre proliferasyonu ve metabolizmasından sorumlu olan *FOXO1* gen defekti olan olgularda steroid sentezi yapılamamakta ve kolesterol biyosentez basamakları için gerekli enzimatik yollar aktive olamamaktadır. İntrauterin dönemde lethal mutasyonlu, *FOXO1* adult dönemde FSH, IGF1 ve insülin metabolizması üzerinden foliküler gelişimin bozulmasına ve infertiliteye yol açar. Bu bulgu diabetik infertil olguların yönetiminde önem arz etmektedir (Öktem ve Urman, 2012).

#### **2.4.1. Primer Folikül Dönüşümü İnhibitörleri**

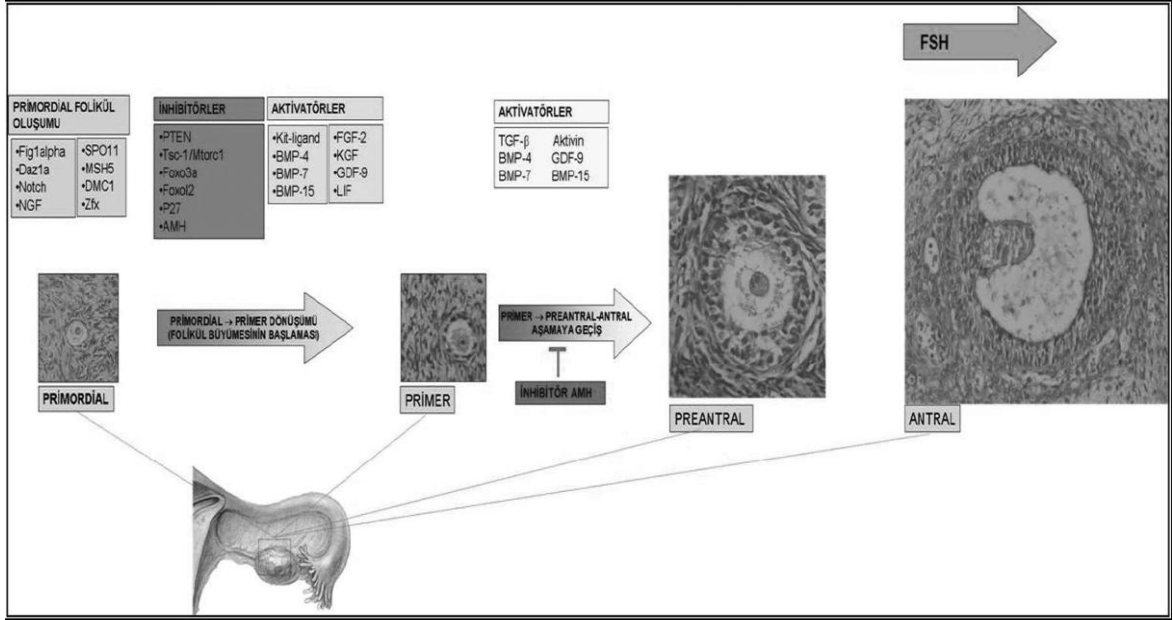
Son zamanlarda yapılan genetik açıdan modifiye edilmiş fare çalışmalarında, primordial folikülleri sessiz fazda kalmasını sağlayan bazı inhibitör sinyaller olduğunu göstermiştir. Bu inhibitör moleküllerden bazılarının fonksiyonunun kaybolması primordial foliküllerin aktive olmasına neden olmaktadır. Tümör suppressor tuberous sclerosis complex 1 (Tsc-1), *FOXO3*, *PTEN*, p27 and Foxl2 inhibitör sinyallerinden sorumludurlar. Bu moleküllerin eksikliği prematür ve geri dönüşümsüz primordial folikül aktivasyonuna neden olmaktadır (Adhikari ve ark., 2010; Rajareddy ve Reddy, 2012).

Bunun sonucunda ise folikül havuzu erkenden tükenerek prematür over yetmezliği tablosu gelişmektedir. AMH, TGF- $\beta$  ailesinin bir üyesi olup büyümekte olan foliküllerin granuloza hücrelerinden salgılanmaktadır. AMH geni olmayan farede primordial foliküllerden primer folikül gelişimi hızlanmaktadır. Bu da AMH'nin primordial primer geçişini inhibe ettiği görüşünü desteklemektedir (Durlinger ve ark., 1999; 2002). Dimerik bir hormon olarak gelişmekte olan preantral ve antral foliküllerde (Visser ve Themmen, 2005) salınan AMH dişi fetusta ilk olarak 36. gebelik haftasında tespit edilebilmektedir (Rajpert-De Meyts ve ark., 1999). En yüksek değerine pubertede ulaşır ve menopoza sonrası kanda ölçümü yapılamaz (Hudson ve ark., 1990; de Vet ve ark., 2002). AMH, son zamanlarda over rezervinin bir belirteci olarak ortaya çıkmıştır. Siklus içi ve siklusa düzeyleri çok az değişiklik gösterebilmesi AMH'ı over rezervinin iyi bir belirteci yapmaktadır. Antral folikül sayısı ve yardımcı üreme tekniklerinde elde edilen oosit sayısı ile de kan AMH düzeyi korelasyon göstermektedir (Van Rooij ve ark., 2002 ; Ebner ve ark., 2006 ).

#### **2.4.2. Primer Folikül Dönüşümü Aktivatörleri**

Primordial foliküllerin aktive olarak büyümeye başlamasında rol alan bazı aktivatör sinyaller mevcuttur. Primordial foliküllerin primer foliküllere aktive olmaları sürekli ve fetal hayatta başlayıp menopoza kadar devam eden uzun bir dönemdir (Öktem ve Oktay, 2008). Bu aktivasyonda TGF- $\beta$  ailesinin bazı üyeleri rol almaktadır (Şekil 6). *BMP*, *BMP-4* ve *BMP-7* (Lee ve ark., 2001; Otsuka ve ark., 2001), *GDF-9* bu olayda rol oynamaktadır. *GDF-9* geni olmayan fare infertil olup primer aşamadan ileri

folikül gelişimi izlenmezken (Dong ve ark., 1996; Carabatsos ve ark., 1998) *GDF-9* 'un invitro primordial primer geçişinde etkileri tartışmalıdır.



Şekil 6. Folikül gelişiminde görev alan hormonlar ve faktörler ( Öktem ve Urman, 2012).

TGF-β üyelerinin etkileri açısından türler arasında da farklar olduğu belirtilmelidir. Örneğin, oosit kaynaklı *BMP-6* and *BMP-15* (*GDF-9B*) genleri olmayan farede normal folikül gelişimi ve fertilité izlenirken (Solloway ve ark., 1998; Yan ve ark., 2001) *BMP-15* mutasyonu insan ve koyunda prematür over yetmezliği ile karakterizedir (Galloway ve ark., 2000; Di Pasquale ve ark., 2004). FSH'nın preantral folikül gelişimine olan tartışmalı etkilerine karşın bu dönemde folikül büyümesinin lokal olarak üretilen bazı faktörler vasıtası ile olduğu artık çok iyi bilinen bir gerçektir. Yine TGF-β ailesinin üyelerinden ve granülosa hücrelerinden salınan aktivinler, teka hücrelerinden salınan *BMP-4* ve *BMP-7*, oosit kaynaklı *GDF-9* ve *BMP-15* preantral ve antral folikül gelişiminde rol oynamaktadır. Preantral-antral aşamaya folikül büyümesini indükleyen bir başka ajan *BMP-15*'dir. Oosit kaynaklı bu büyüme faktörü FSH'dan bağımsız olarak granülosa hücrelerinin proliferasyonundan sorumludur (Otsuka ve ark. 2000). Gonadotropin bağımlılığının olmadığı erken folikül büyümesi döneminde folikül büyümesini *BMP-15* sağlayabilmektedir. *BMP-15* ilginç olarak FSH reseptör ekspresyonunu inhibe edebilmektedir (Otsuka ve ark., 2000) ve follistatin

*BMP-15*'in bu etkilerini antagonize etmektedir. Follistatin ekspresyonu ise en fazla dominant folikülde mevcuttur dolayısıyla follistatin dominant folikül seçimi esnasında folikülde yeterince FSH reseptörünün bulunmasını sağlamaktadır (Otsuka ve ark., 2001; Öktem ve Urman, 2012)

### **2.4.3. Anti-Müllerian Hormon (AMH)**

Anti-Müllerian Hormon (AMH); aktivinleri, inhibinleri, büyüme ve farklılaşma proteinleri, *BMP*'leri kapsayan TGF $\beta$  süper ailesinin üyelerindendir. Bu üyeler mezanşimal epitelyal etkileşimlerde, ekstra sellüler matris üretiminde, hücre büyümesinde ve doku yeniden yapılanmasında önemli görevlere sahiptirler. Puberte ve menstruel siklusların başlamasından sonra serum AMH seviyeleri giderek azalır ve menopoza yakın süreçte kaybolur. Primordiyal folikül havuzundan primer foliküller olgunlaşma sürecini başlatan AMH sadece overlerden salınır. Folikül ovulasyon için seçildiğinde AMH salınımı durur. Folikül atretik olduğunda AMH ekspresyonu kaybolur. AMH'nun overde folikül gelişimine etkileri çalışılmış; AMH'nun primordiyal folikül alımını inhibe ettiği, böylece overdeki folikül havuzunun erken tükenmesini engellediği ve büyük preantral ve küçük antral foliküllerin FSH duyarlılığını azalttığı, böylece büyümeye devam ederek preovulatuvar evreye ulaşabilecek büyük preantral ve küçük antral folikül sayısını kontrol edebildiği bulunmuştur.

Oosit kalitesi dışında, overlerde kalan primordiyal folikül sayısında over rezervi için önemli bir parametredir. Aynı zamanda, büyüyen foliküllerin sayısı alındıkları primordiyal folikül deposunun büyüklüğü ile uyumlu görünse de, kadınlarda ki primordiyal folikül deposunun büyüklüğünü direkt olarak ölçmek zordur. Bundan dolayı, primordiyal folikül havuzundan büyüme havuzuna geçiş yapan tüm folikülleri yansıtan bir belirteç, over rezervinin nicel olarak iyi bir indirekt belirteci olabilir. AMH, büyüyen foliküller tarafından üretildiği için AMH'nun over rezervinin belirteci olabileceği düşünülür (Gruij ve ark., 2003; Hazout ve ark., 2004; Fıçıcıoğlu ve ark., 2006; La Marca ve ark., 2006). AMH, toplanan oositler ile antral folikül sayısı arasında ilişki olduğu bulunmuş, bundan dolayı serum AMH seviyelerinin antral folikül havuzunun göstergesi olabileceği düşünülmüştür. Bu durum ayrıca kontrollü ovaryen stimülasyon sonrasında toplanması beklenen oosit sayısı ile ilişkili bir belirteçtir. Erken foliküler faz AMH seviyeleri intrauterin dönemde üretilmeye başlanan folikül

havuzundan kaynaklanmaktadır ve bu üretim over rezervinin gonadotropin bağımlı belirteçlerinden bağımsızdır. AMH'ı halen kullanılan serum belirteçleri ve ultrason kullanımı ile elde edilmesi mümkün olmayan bir perspektif sağlamada önemli kılar (Fıçıoğlu ve ark., 2006). Artan yaşla birlikte AMH'daki azalma yaşla ilişkili diğer değişkenlerden daha erken ortaya çıkmaktadır. Bu da serum AMH seviyelerinin ovaryen yaşlanma ve menopozal geçiş için en iyi belirteç olabileceğini gösterir (Durdağ ve Berker, 2008).

## 2.5. Genetik Etkenler:

Ailede, POY'dan etkilenmiş iki veya daha fazla bireyin olması, genetik temeli (Tablo 2) olan ovaryen yetmezlik vakalarını düşündürmektedir (Aittomaki, 1990). Dikkatli bir şekilde alınan aile öyküsünün incelenmesi sonucu familial POY prevelansının %19 olduğu bildirilmiştir (Davis ve ark., 2000). İdyopatik familial POY olgularının, X'e bağlı dominant, otozomal dominant ve otozomal resesif kalıtım şekilleri vardır (Van Kasteren ve ark., 1999).

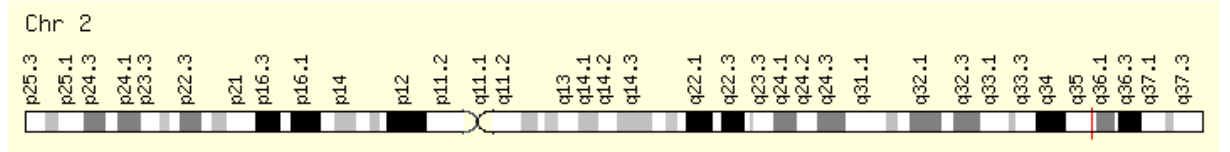
**Tablo 2.** POY ile ilişkili genetik bozukluklar (Persani ve ark., 2010).

Varyasyon	POY insidans	Gen bölgesi	OMIM
Turner sendromu	%4-5	-	-
Fragile X sendromu	%3-15	Xq27.3	309550
DIAPH2(translokasyon)	?	Xq21.33	300511-300108
BMP15 varyasyon	%1.5	Xp11.2	300511-300247
PGRMC1 varyasyon	?	Xq22-q24	300435
Galaktozemi	Nadir	9p13	230400-606999
FSH/LH direnci	<%1	2p21-p16, 2p21	136435-238320
INHA varyasyon	?	2q33-q36	147380
GDF9 varyasyonları	%1-4	5q31.1	601918
NOBOX varyasyonları	%0-1	7q35	611548-610934

### 2.5.1. İnhibin Alfa Geni ve İnhibin Proteini

İnhibin  $\alpha$  geni 2. kromozomun q33-q36 bölgesinde (NM\_002191) yer almakta olup (Şekil 7), 2 ekzonlu ve 366 aminoasitten (Şekil 8) oluşan proteini 39669 Da ağırlığındadır (Carcamo ve ark., 1994). Olgunlaşmış bir inhibin 31-32 kDa'luk heterodimerik bir glikoproteindir. Bunun 18 kDa'luk  $\alpha$ -subünitesi, 14 kDa'luk  $\beta$ -subünitesine disülfid bağlarla bağlıdır (Santaro ve ark., 1999). İnhibin A, TGF-  $\beta$  süper ailesindedir. Polipeptid bir hormondur,  $\alpha$  ve  $\beta$  alt grupları vardır.  $\beta$  alt grup inhibin A

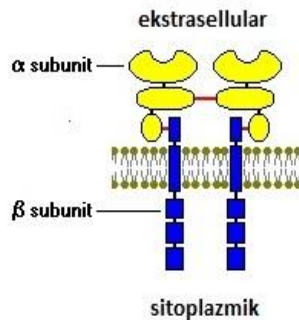
( $\alpha$ -  $\beta$  A) ve B ( $\alpha$  -  $\beta$  A) olarak ayrılmaktadır (Şekil 9). Aktif şekilleri bu iki formdur. Beta subünitin homodimeri aktivin glukoproteindir ve inhibinin fonksiyonuna zıt çalışır. İnhibin subüniti 3 ayrı gen tarafından kodlanmıştır.  $INH\alpha$ ,  $INH\beta A$  ve  $INH\beta B$  olup sırasıyla 2q33-qter, 2cen-q13 ve 7p15-p14 bölgelerinde lokalizedir. İnhibin, overin granüloza hücrelerinde, testisin sertoli hücrelerinde, beyin, hipofiz, kemik iliği, plasenta, adrenaller ve böbreklerden sentezlenir. Bu peptidler vücudun birçok dokusunda bulunmaktadır.



**Şekil 7.** 2 nolu kromozom  
(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=INHA.2014>)

MVLHLLFLLLTPQGGHSCQ GLELARELVL AKVRALFLDA LGPPAVTREG GDPGVRRLLPR  
 RHALGGFTHR GSEPEEEEDV SQAILFPATD ASCEDKSAAR GLAQEAEEGL FRYMFRPSQH  
 TRSRQV TSAQ LWFHTGLDRQ GTAASNSSEP LLGLLALSPG GPVAVPMSLG HAPPHWAVLH  
 LATSALSLLT HPVLVLLRC PLCTCSARPE ATPFLVAHTR TRPPSGGERA RRSTPLMSWP  
 WSPSALRLLQ RPPEEPAAHA NCHRVALNISFQELGWERWI VYPPSFIFHY CHGGCGLHIP  
 PNLSLPVPGA PPTPAQPYSL LPGAQCCAA LPGTMRPLHV RTTSDGGYSF KYETVPLL  
 QHCACI

**Şekil 8.** İnhibin alfa aminoasit dizisi  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/124126893?repo=rt=fasta.2014>)



**Şekil 9.** İnhibin proteinin yapısı.  
(<http://www.bio.davidson.edu/people/midorcas/animalphysiology/Callahan/index.htm.2014>  
düzenlenmiştir)



Folikülogenezin devamı aşamasında, hipotalamik hipofizer ovaryen sistem gibi foliküler mikro çevredeki otokrin ve parakrin düzenleyici mekanizmaların da rolü bilinmektedir. Oosit ve granuloza hücrelerinden salınan düzenleyici faktörlerin çoğu TGF süper ailesine aittir ve 35 üyesi olan bu aile içinde, aktivin/inhibin, *BMP* ve *GDF* alt grupları yer alır (Mason ve Hayflick., 1985). *INHA* kadınlarda over granuloza hücrelerinden, erkekte testis sertoli hücrelerinden salgılanmaktadır. Kadınlarda hem *INHA* ve hem de *INHB* yapılmaktadır. *INHA* erkeklerde ölçülemez düzeydedir. Kadınlarda ise puberteye kadar ölçülemez düzeyde olup, pubertede bir pik yapmakta ve ondan sonra da menstruel sıklusa uygun düzeyine ulaşmaktadır (Matzuk ve ark., 1992). Gonadotropin salınımının kontrolünde hipotalamustan salgılanan GnRH, gonadlardan salgılanan seks hormonları ve inhibin, aktivin, follistatin ve benzeri peptidlerin otokrin, parakrin modülasyonla etkileşimi rol oynar (Franks., 1995). Aktivin FSH salınımını arttırıcı etkide bulunurken, inhibin FSH salınımını baskılar. İnhibin ile yapısal bağı olmayan follistatin, aktivine bağlanıp FSH salınımını inhibe eder (Biol, 2006). Granuloza hücreleri FSH'a yanıt olarak bir çok peptid sentezi yapmakta, bunu foliküler sıvı ve overin venoz kan akımına salgılamaktadır (Marshall ve Christine., 1999). Menstruel siklusun belirli dönemlerinde *INHA* veya *INHB* yüksek düzeylere ulaşır ve FSH'ı inhibe ederler. İki adet beta subüniti disulfid bağı ile birleşerek FSH'ın salınımını aktive eden aktivin meydana gelir (Mason ve Hayflick., 1985). Serbest alfa unitlerinin herhangi biyolojik aktivitesi yoktur. İnhibin ve aktivin overlerde hücrel büyüme baskılayarak tümör supresör proteinler sınıfında yer alabilir. Yapılan çalışmada inhibin üretmeyen farelerde normal seksüel farklılaşma ve gelişim olduktan sonra yüksek oranda gonadal stromal tümör gelişimine duyarlı olduğu gözlenmiştir. Tümörün gelişiminde inhibin yetmezliğine bağlı FSH'ın yüksek olmasına sebep olabileceği belirtilmiştir (Taylor ve Adams., 1996).

İnhibinlerin rolü, gametogenezin düzenlenmesidir. Bu düzenlemede hipofizden salgılanan FSH ile negatif bir feed-back ilişkisi vardır. İnhibinlerin ayrıca gonadlarda lokal olarak folikül büyümesi ve oosit maturasyonunu etkilediği bilinmektedir. İnhibin, FSH'ı negatif feedback mekanizması ile kontrol ederek ovaryen folikülogenezin tamamlanmasını sağlar. Pre-menopozal kadınlarda, henüz menopoz semptomları ortaya çıkmadan, serum inhibin düzeyleri artmaya başlar. Overde azalmış folikül kapasitesini

yansıtan inhibin, bu nedenle iyi bir belirteçtir. İnhibin genlerindeki herhangi fonksiyonel mutasyonlar biyoaktif inhibinin miktarında ki azalmasına neden olacağı önerilmektedir. Bu azalma, foliküllerin azalmasına, hipofize negatif feed-back'i ortadan kaldırarak FSH'un konsantrasyonunu artırması POY'un bir kanıtı olacaktır.

### 2.5.2. Kemik Morfogenetik Protein 15 (*BMP15*)

Oositte sekrete olan parakrin faktörler, over folikülünün erken dönem gelişim aşamasında ve antral folikülün morfojenik gelişiminde çok önemli görevleri vardır. X kromozomu üzerinde bulunan, *BMP15* geni tarafından eksprese edilen ve oositlerde üretilen *BMP15* proteini, *GDF-9* ile ileri derecede homoloji (%52) gösterir. Primer folikül içinde bulunan oosit tarafından eksprese olan *BMP15*, granüloza hücre proliferasyonunu stimüle ederken ayrıca selektif olarak FSH tarafından indüklenmiş progesteron üretimini inhibe eder. *BMP15* bakımından yoksun dişi farelerde ovulatuvar defektlere bağlı olarak azalmış fetus boyutları azalmış doğurganlık vardır. *Bmp15*<sup>-/-</sup>, *Gdf9*<sup>+/-</sup> veya *Bmp15*<sup>-/-</sup>, *Gdf9*<sup>-/-</sup> çift mutantlı fareleri muayene ve karakterize ederken *BMP15* ve *GDF-9* proteinlerinin over fonksiyonlarında sinerjik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. *BMP15*'i eksik fareler ovulasyon ve folikülogezisin geç dönemlerinde açık defektlerle birlikte subfertilidir. *GDF-9* ve *BMP15*'in koyunlarda ovulatuvar fonksiyon kaybı gibi kesin bir rolü vardır ki molekül immunizasyon yoluyla ya da genetik eksiklik yoluyla over yetmezliğine yol açar (Carabatsos ve ark., 1998; Otsuka ve ark., 2000; Çelik ve Yıldırım, 2008).

### 2.5.3. *BMP15* Geni

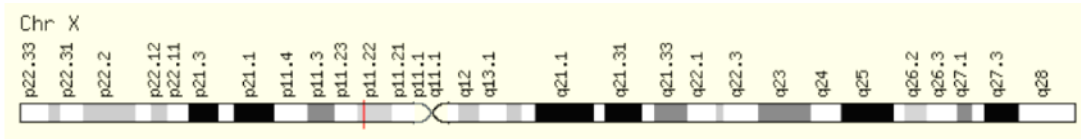
*BMP15* proteini, *BMP15* adlı gen tarafından kodlanmaktadır. *BMP15* geni 2 ekzon içeren bir gendir. İlk ekson 17 aa. sinyal peptidi kodlar ve propeptid bölgenin ilk kısmını oluşturur. İkinci ekzon 125 aa. (Şekil 10) içeren olgun domain propeptid bölgesinin geri kalan kısmı kodlayan bölgesidir. *BMP15* geni X kromozomunun kısa kolundaki Xp11.22 bölgesine lokalize olmuştur (Şekil 11). *BMP15* proteini TGF- $\beta$  süper ailesinin bir üyesidir ve oosit ve gelişmiş foliküllerin içinde bulunan parakrin sinyal molekülünü içerir. Bu protein TGF- $\beta$  süper ailesinin bir üyesidir. Bu protein homodimer bir yapı olarak ya da *GDF9* ile heterodimer bir yapı oluşturarak oositlerin olgunlaştırılması ve foliküllerin gelişmesini sağlar.

İnsanda *BMP15*'in promotor bölgesinde çeşitli heterozigot nonkonservatif yer değiştirmeler idiyopatik hipergonodotropik ovaryen yetmezlik ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda *GDF9* mRNA ve proteini hem insan overinde primer foliküllerin oositlerinde bol miktarda bulunur hemde *GDF9* transkriptleri folikogenezin erken dönemlerinde transle edilmiştir. İnsan *GDF9B* düşük seviyelerdeki gonadlarda özellikle eksprese olur. *GDF9* mRNA'sı ekspresyonu foliküler gelişim boyunca insan oositlerinde *GDF9*'dan önce olmaktadır. Bu sonuçlar *GDF9* ve *GDF9B*'nin overlerde folikülogenezin düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir. İn situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal analizler foliküler gelişim boyunca oositlerde *BMP15*'in ekspresyonunu seçici olarak artırdığı belirlenmiştir. Fonksiyonel analizlerde *BMP15*'e ilave olarak DNA sentezini ve proliferasyonu artırdığı, FSH'u etkilemediği görülmüştür (Carabatsos ve ark., 1998; Otsuka ve ark., 2000).

"MVLLSILRILFLCELVLFMHRAQMAEGGQSSIALLAEAPTLPLIEELLEESPGEQPRKPRLLGHS  
 LRYMLELYRRSADSHGHPRENRTIGATMVRLVKPLTVARPHRGTWHIQILGFPLRPNRGLYQLV  
 RATVVYRHHLQLTRFNLSCHVEPWVQKNPTNHFPSSEGDSSKPSLMSNAWKEMDITQLVQQR  
 WNNKGHRILRLRFMCQQKDSGGELWHGTSSLDIAFLLLFNDTHKSIRKAKFLPRGMEEFMERE  
 LLRRTRQADGISA EVTASSSKHSGPENNQCSLHFQISFRQLGWDHWIAPPFYTPNYCKGTCLRV  
 LRDGLNSPNHAIQNLINQLVDQSVPRPSCVPYKYVPISVLMIEANGSILYKEYEGMIAESCTCR"

**Şekil 10.** BMP15 Geni amino asit dizisi.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/109659014?report=fasta.2014>)

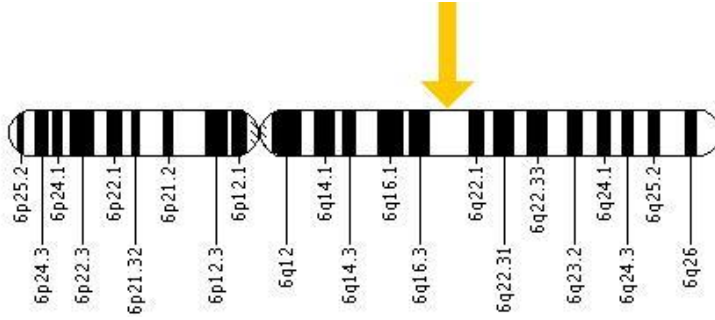


**Şekil11.** BMP15 geni Xp11.22

(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BMP15&search=f734a4b0037e2b5f96e5ba b03c835d56.2014>)

#### 2.5.4. FOXO3 Geni ve Forkhead Box (FOX)Transkripsiyon Faktörleri

İlk etkilenen ve canlı kalan primordial foliküllerin gelişimindeki bozukluklar premature ovaryen yetmezliğin temel patolojisidir. İdiyopatik POY'da primordial foliküllerin hızla tükenmesinin mekanizması yada mekanizmalarının belirlenmesi çok önemlidir. Normal fizyolojik defektler de primordial foliküllerin azalmasına major etkilere sahiptir. Bu defektlerden birincisi oositlerin apoptozisi diğeri ise ilk folikül olarak bilinen primordial foliküllerin aktivasyonudur. FOXO ailesi üyeleri (FOXO1 FOXO6, FOXO3) transkripsiyon faktörü olarak görev yaparlar. FOXO3 forkhead ailesinin O subgrubunda bulunur. 6q21 (Şekil 12) lokusunda kodlanır. Hücre büyümesi, gelişmesi ve sağ kalımında çok önemli rolleri vardır. Birçok FOXO (Şekil 13) proteini embriyonik gelişimde de önemli rol oynar (Calnan ve ark., 2008; Maiese ve ark., 2008; Huang ve ark., 2009; Ho KK ve ark., 2009).



Şekil 12. FOXO3 geni ve lokalizasyonu ( <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/FOXO3.2014>)

Forkhead box proteinleri (Şekil 13); hücre büyümesi, gelişimi, çoğalması, apoptozis ve hücre sağ kalımında etkili olan genlerin ekspresyonunu kontrol eden transripsiyon faktörüdür. (Fu ve Tindall, 2008).

```
"MAEELDKPLAVDVIDIDPDFEPQKRPRSCTWPLRPESNSGKAEPSDVGIPEEEVDENGTDACASGDITGASKPASVTEGDPSSAAALPAIETNASANDKDIYGSPGSSQHALAACSDSSINGLIPQQPRKSSARRNAWGNYSYADLITQAIESSPEKRLTLAQIYDWMVRNVYPYFKDKGDSNSSAGWKN SIRHNL SLHSRFVRVQNEGTGKSSWWMVNP DGGKGGKAPRRRAVSM DNSNKLKISARGRAAKKKAALQASQDGSSESSSSLSKWTGSPTSRS SDELD AWTDFRSRTNSNASTLSGRLSPILANLEVDEVPDDD SPLSPMLYSSPSSMSPSTGLTELPRLADLAGTMNLNDGLSDNLMDDLLDNISLTASQSPGHDESGANLQGSVPVTFSCSGSSLAIPSGSYGTNSLFSPPSVTGLRQSPMQTIQENKQATFSCGSLFSESLQLDLLSESSSRSDVLLTQSDPLMSQASASVSSQNARRILLRNDPMMSNQAGPAGQAGLKKASPSGWRMNCVPSESSEDYQSLMKQLQSPFRSTSMQLNSSDLLAGLNGSVTSAQSVSQDRFSSDLLEAFSGSFDICDMDIITRNDLMDAEGLELSFDLSHLISSQANLTSGSFRTKRTSSQSWVPG"
```

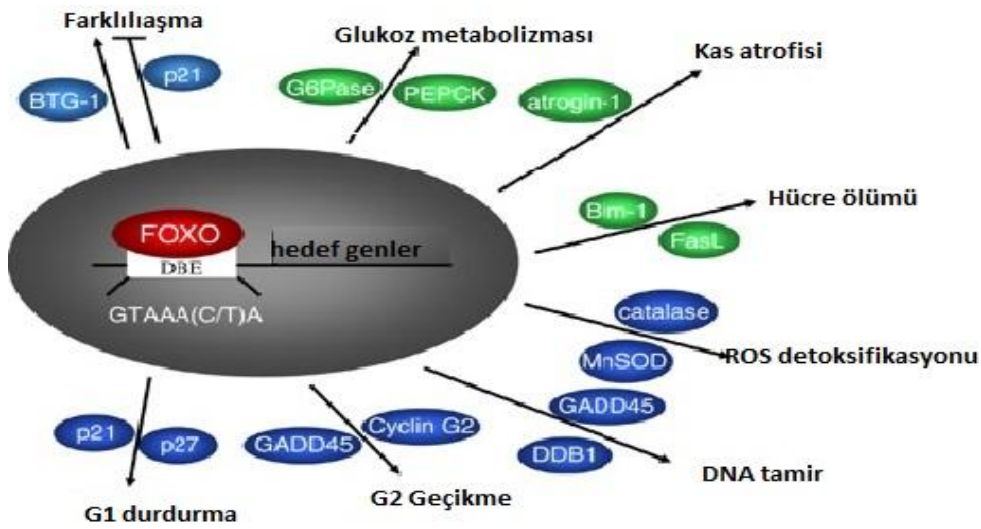
Şekil 13. FOXO3 geni aminoasit dizisi  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/42519916?report=fasta.2014>)

FOXO proteinlerinin esas belirleyici özelliği 80-100 aminoasitten meydana gelen “winged helix” diye adlandırılan hedef genlerin DNA'larına bağlanabilen forkhead box bölgesidir (Huang ve ark., 2007). Bu bölge sayesinde hedef genlerin aktivitesini değiştirebilir. O subgrubu üyeleri (*FOXO1*, *FOXO4*, *FOXO3*) apoptosiz (A126), hücre siklus kontrolü (A87), metabolizma, hücre proliferasyonu, immün sistem, oksidatif streslere karşı tolerans ve sağ kalımı regüle ederler (Huang ve ark., 2007; Calnan ve ark., 2008; Maiese ve ark., 2008; Ho KK ve ark., 2009). *FOXO3* farklı dokularda değişik derecelerde eksprese edilir. Farelerde karaciğerde yüksek düzeyde olmak üzere beyin, kalp, böbrek, daha az miktarda over ve testiste tespit edilmiştir (Arden., 2009). İnsan vücudunda geniş bir dağılımı olduğu düşünülmekte ve birçok farklı hücre tipinde tespit edilmiştir. Tümör hücrelerinde üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Hücre siklus kontrolü, apoptosiz ve sağ kalım etkilerine ek olarak temel olarak antiproliferatif ve proapoptotiktir. *FOXO3* diğer *FOX* proteinleri gibi metilasyon, fosforilasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon gibi postranslasyonel modifikasyonlarla regüle edilir (Obsil ve Obsilova., 2008). En önemli kontrol mekanizması phosphatidylinositol-3-kinases (PI3 kinaz)/AKT sinyal yoludur (Boudewijn ve ark., 2003). Bu yolak *FOXO3* aktivitesini fosforile ederek inhibe eder. Asetilasyon yolu ile kontrol Sirtuin 1(SIRT 1) aktivitesi ile gerçekleşir. SIRT1, *FOXO3* üzerine etkisini The Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 protein (GADD45) gibi sağkalım genlerini aktive ederek ve apoptotik genleri baskılayarak gerçekleştirir (Brunet ve ark., 1999; Yamagata ve ark., 2008; Bertoli ve ark., 2009). Sağkalım sinyallerinin eksikliğinde defosforile olan *FOXO3* proteini çekirdeğe taşınır ve hedef genlere bağlanarak hücre siklusunun arresti ve apoptosizi indükler. Bu nedenle bir tümör süpresör gen gibi aktiviteye sahiptir (You H ve ark., 2006; Dansen ve ark., 2008; Dansen ve Burgering, 2011). *FOXO3* tercihen hedef genlerin promotor bölgelerinde yer alan FHRE (daf-16 bağlanma bölgesi olarak da bilinir) bölgesine bağlanarak etki gösterir.

*FOXO3* geniş bir gen grubunun ekspresyonunu kontrol eder (Şekil 14). Aktivitesi büyük oranda antiproliferatif etkilidir. Hedef moleküllerinin çoğunluğu apoptosizden sorumlu genlerdir ( *FASL6*, *BCL2L11*, *TRAIL*, *PUMA*) (You ve ark., 2006). Hücre siklus ve apoptosiz kontrolü için p53'e doğrudan bağlanır, apoptosiz ve hücre siklus düzenlenmesinde ortak fonksiyonları vardır (Wang ve ark., 2008). Hücre çoğalma ve

gelişiminden sorumlu olan Mitojen-aktivated protein kinazı (MAP kinaz) inhibe eder (Lehtinen ve ark., 2006). FOXO3 hücrede biriken reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesinde etkili olan Catalaz 8, Süperoksit Dismutaz 2 (SOD2), Sestrin 3 (redox enzim) ve PINK'i (PTEN bağımlı protein kinaz 1: hücreleri strese bağımlı mitokondrial disfonksiyondan korur) aktive eder (Essers ve ark., 2004; Lehtinen ve ark., 2006).

FOXO proteinlerinin embriyonik gelişimde önemli fonksiyonları vardır. İmmün modülatör fonksiyonları mevcuttur (Peng, 2008). FOXO3 Glukoz 6 fosfataz ve IGFBP 1'in üretimini düzenleyerek metabolik olaylarda da görev alır (Onuma ve ark., 2006). FOXO3 östrojen reseptör alfa ve betaya bağlanarak östrojen aracılı transkripsiyonu inhibe eder (Zhao ve ark., 2008). Progesteron ve androjen reseptörlerine de aynı şekilde bağlanır.



**Şekil 14.** FOXO hedef genleri ve fonksiyonları (www.cellsignaling.com). FOXO transkripsiyon faktörleri bölünen hücrelerdeki (mavi) ve mitoz sonrası hücrelerdeki (yeşil), pek çok değişik hedef genlerin transkripsiyonunu teşvik eder. Bu tabloda hedef genlerin bir kısmı yer almaktadır. BTG-1, B-cell translocation gene 1; p21, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; p27, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; MnSOD, manganese superoxide dismutase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; FasL, Fas ligand; GADD45, growth arrest and DNA damage-inducible protein 45; DDB1, damage-specific DNA-binding protein 1; DBE, DAF-16 family member-binding element (Gök ve ark.2011).

Son yapılan güncel çalışmalardan olan Na Wang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmanın sonucunda High-fat (HF) dietli ratlarda ovaryen folikül gelişimi

hızlanmakta ve silent information regulator (SIRT1) sinyallerinin süpresyonu ve aktive mammalian target of rapamycin complex (mTOR) folikül oranını azalmaktadır. Böylece POY'a neden olmakta ve Caloric Restriction (CR'lerde) promordial foliküllerin aktivasyonunu baskılamakta ve foliküler gelişim kaybına neden olmaktadır. Fare oositlerinde TSC2 ve TSC1'in delesyonu premature ovaryen yetmezliğe ve promordial foliküllerin aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır.

*FOXO3* SIRT'in önemli substratı ve *FOXO3* *-/-* farelerde POY ve primordial foliküllerde overaktivasyona neden olmaktadır (Wang Na ve ark., 2014). *FOXO3* aktivasyonu mitokondriyal DNA kopya sayılarını azaltmaktadır. Mitokondriyal protein ekspresyonunu, enerji kompleksleri, mitokondriyal enerji komplekslerini ve diğer aktivitelerini azaltmaktadır. Transgenik farelerde connexin 37 (*Gja4*) ve connexin43 (*Gja1*) ekspresyonunu da azaltır ve foliküllerde gap junciton haberleşmeler ve parakrin uyarı meydana gelmesinde önemli role sahiptir (Laissue ve ark., 2008). *FOXO3**-/-* dişi farelerde *FOXO3* transkripsiyonel aktivasyonunun kaybı sekonder infertilite, foliküler havuzun erken tükenmesi, oosit ölümleriyle sonuçlanmıştır (Castrillon ve ark., 2003; Hosoka ve ark., 2004).

## **2.6. Sendromik ve Kromozomal Premature Ovaryen Yetmezliği**

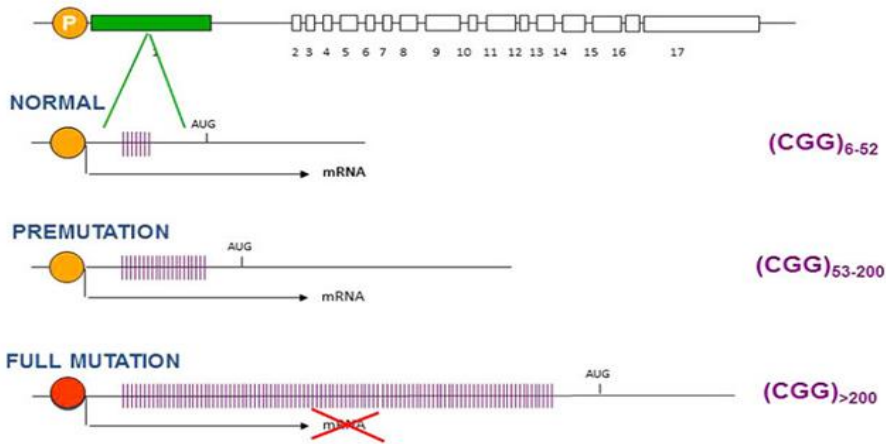
### **2.6.1. Frajil X Sendromu**

Fragile X Mental Retardation1 (*FMRI*) geni, Xq27.3 bölgesinde yer alan bir gendir. Hastalık genin birinci ekzonunda, artmış tekrarlayan üçlü nükleotid dizilerinin meydana gelmesiyle ortaya çıkan klinik bir tablodur (Bates ve ark., 1990). Frajil X sendromu, tekrarlayan üçlü nükleotid dizilerinin sayısının ikiyüzü geçmesiyle meydana gelir (Şekil 15). *FMRI* geninde transkripsiyon meydana gelemez ve sonuçta *FMRI* proteini sentezlenemez (Jacobs, 1991). Normal bireylerde *FMRI* gen bölgesinde 60'dan daha az sayıda tekrar dizisi bulunmaktadır. Frajil X premutasyonu, tekrar dizilerinin sayısının 60 ile 200 arasında olduğu zaman meydana gelen ve *FMRI* proteinin de eksprese edildiği bir tablodur (Devys ve ark., 1993). Premutasyon taşıyıcısı kişilerde doğum anında overlerde beklenenden daha az oosit vardır (Conway ve ark., 1997). Premutasyon taşıyıcılarında POY gelişme riski normal populasyona oranla 320 kat fazladır. *FMRI* premutasyonlu kadınların yaklaşık %15'inde POY görülür. Prememutasyon prevelansı, ailese POY vakalarında %15 ve aile öyküsü olmayan

sporadik POY vakalarında %1-7 arasındadır (Wittenberger ve ark., 2007). Heterozigot frajil X taşıyıcılarında da POY tespit edilmiştir (İpek ve ark., 2004).

### 2.6.2. Turner's Sendromu

POY'a sebep olan ve en sık görülen kromozom anomalisi X kromozomunun eksikliğidir (Pasquino ve ark., 1998). Ovaryumların farklılaşması için tek bir X kromozomu yeterlidir (Zinn ve ark., 1999). Fakat 45, X Turner Sendrom'lu bireylerde olduğu gibi, iki tam X kromozomu olmayan durumlarda, ovaryen foliküller doğumla birlikte dejenere olurlar. İkinci X kromozomu, over fonksiyonunun devamını sağlamaktadır (Simpson ve Rajkovic., 1999). İkinci X kromozomunun eksikliği her zaman ovaryen disjenezi, primer veya nadiren sekonder amenoreye neden olur.



**Şekil 15.** *FMRI* alellerindeki üçlü tekrar sayısının değişkenliği sağlıklı ("normal"), premutasyon ("premutation") ve tam mutasyon ("full mutation") olan bireylerde gösterilmiştir (Cordts ve ark.2011).

### 2.6.3. X Kromozomunun Kritik Bölgesi

X kromozomunun kısa (p) kolunda meydana gelen delesyonlar, primer amenoreye neden olurken; X kromozomunun uzun (q) kolundaki delesyonlar ise primer veya sekonder ovaryen yetmezliğe neden olabilirler (Sybert ve ark., 2004). Xq13-26, normal over fonksiyonların sürdürülmesi için kritik bir bölgedir. Xq21.3-Xq27'deki (POY1 geni) delesyonlar; Xq13.3-q21.1'deki (POY 2 geni) translokasyonlar üreme kapasitesini değişik derecelerde azaltarak overyan disjenezi ile POY arasındaki iki



spektrum arasında bir klinik tabloya yol açarlar (Powell ve ark., 1994). Genellikle X kromozomundaki kırıkların Xq13 ve Xq26 arasında yer aldığı gösterilmiştir. X otozom kromozomları arasındaki dengeli translokasyonlar ve delesyonların Xq13'den Xq27'ye kadar olan bölgede meydana geldiğini tespit etmişlerdir ( Rizzolio ve ark., 2006).

## **2.7. Otozomal Kromozomal Anomaliler**

### **2.7.1. FSH Reseptör Bozukluğu**

POY vakasındaki ilk mutasyon FSHR geninde inaktivasyona neden olan nokta mutasyonu olup, otozomal resesif özelliktedir ve İlk kez Finlandiyada tanımlanmıştır (Aittomaki ve ark., 1995). İkinci kromozomun kısa (p) kolunda meydana gelen mutasyon sonucunda valin aminoasiti yerine alanin aminoasiti sentezlenir.

Bu mutasyona sahip bireylerde, overler hipoplazik veya sıklıkla histolojik olarak daha az miktarda primordial folikül içermektedir. Fakat tamamıyla ovaryen disgenezi ve streak over görünümüne hiç rastlanmamaktadır. FSHR mutasyonu olan bireylerde normal puberteyi takip eden yıllar içerisinde, sekonder amenore meydana gelir (Aittomaki ve ark., 1996).

### **2.7.2. Perrault's sendromu**

Gonadal disgenezi, konjenital sağırılık, kısa boy ile karakterize olan otozomal resesif geçişli bir sendromdur. Sendroma özgün gen defekti henüz tanımlanmamıştır (Laml ve ark., 2002).

### **2.7.3. Blefarofimozis-pitozis-epikantus inversus sendrom (BPES)**

Otozomal dominant geçişli bu sendromda ilgili olan gen 3. kromozom üzerinde tanımlanmıştır. Etkilenen bireylerde tipik yüz görünümü ile karakterizedir (Panidis ve ark., 1994). İki alt tipi vardır: Tip 1, sadece dişi bireyleri etkilerken, infertilite tüm etkilenen bireylerde görülür. Tip 2 ise sadece tipik yüz görünümün izlendiği formdur (Zlotogora ve ark., 1983).

#### **2.7.4. Otoimmün Poliendokrinopati-Candidiasis-Ekdodermal-Distrofi (Epedced)**

Otozomal resesif kalıtıma sahip olan bu distrofide, 21. kromozomda (21q22.3) yer alan otoimmün regülatör gende (AIRE) meydana gelen mutasyonlar hastalıktan (Epedced) sorumludur. Bu klinik tabloda:

- Endokrin glandların otoimmün hasar,
- Kronik superfisyel candidiasis,
- Ektodermal distrofi izlenir (Nagamine ve ark., 1997).

Kız çocuklarının %60'ında 12 yaşından sonra hipogonadizm görülürken, yarısında ovaryen atrofiye bağlı pubertal gelişim hiç görülmez (Perheentupa, 1996). Otozomal resesif geçiş gösteren hastalığın prevalansı 1/9000-1/80000 arasında değişmektedir (Yıldırım ve ark., 2013).

### **2.8. Edinsel Nedenler**

#### **2.8.1. Çevresel Toksinler ve Enfeksiyonlar**

Çevresel toksinlere bağlı ovaryen disfonksiyon, GnRH, hipotalamustan pulsatil salınımının baskılanması yada direkt oosit sayısını azaltmasıyla meydana gelir (Vermulen, 1993). Çevresel ajanlar arasında alkol, sigara, besinler, stres ve viral enfeksiyonlar sayılabilir. Varicella enfeksiyonu, POY vakalarının %3.5'dan sorumlu tutulurken (Rebar, 1996) POY'a neden olarak ispatlanmış en iyi ajan kabakulaktır (Grassa, 1976). İmmün baskılanmış hastalarda Citomegalovirüs (CMV) ooforit etkeni olabilir (Familiari ve ark., 2000).

#### **2.8.2. Sigara kullanımı**

Sigara, menopoza yaşını etkileyen çevresel etkidir (Brambilla ve Mckinlay, 1989). Genelde sigara içen kadınlar doğal menopoza, içmeyenlere göre 1-1.5 yıl daha önce girerler. Sigaranın ovaryen germ hücrelerine toksik olabilecek polisiklik hidrokarbonlar içerdiğini belirtilmiştir. Alkaloid bileşenlerinden olan nikotin ve anabasin, östrojen sentezini engelleyerek östrojen seviyesini düşürebilmektedir. Sigara dumanı bileşenleri, granulosa hücre aromatazı ve östrojen sentezindeki diğer anahtar enzimleri inhibe edebilmektedir. Sigara içimi ile doğal menopoza yaşı arasında ilişki

gösterilmesine rağmen, sigara kullanım yoğunluğu ve süresi ile ilgili bağlantı kesin olarak belirtilmemiştir (Bromberger ve ark., 1997).

### **2.8.3. Reprodüktif özellikler**

Menarş yaşı, menstruel siklus uzunluğu, oral kontraseptif kullanımı, parite ve yaşam boyu ovuluar siklusların temel belirleyicileridir. Bir çalışmada, erken menarşın erken menopoz ile bağlantılı bulunurken (Cramer ve Xu, 1996) diğerlerinde bağlantı bulunmamıştır (Besen ve ark., 1994). Kısa siklus uzunlukları, doğal menopoz yaşını 1-2 yıl kısaltabilmektedir. Bazı çalışmalar nulliparaların erken doğal menopoz yaşı riskine sahip olduklarını göstermiştir (Davutoğlu ve ark., 2008).

### **2.8.4. Depresyon**

Depresyon ve antidepresan tedavisinin erken menopozla ilişkili olabileceğini öne süren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca depresyon, over fonksiyonlarının erken kaybının bir markırı olarak da kabul edilmektedir (Harlow ve ark., 1995).

### **2.8.5. Antropometri**

Obez kadınlarda endojen östrojen yüksek, seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) değerleri düşüktür. Böylece foliküler büyüme sabit olarak uyarılıp, daha hızlı bir folikül tüketimine yol açabilir. Artan vücut kitle endeksi ve doğal menopoz yaşı arasındaki ilişki ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar net sonuç vermemiştir (Willett ve ark.,1983).

### **2.8.6. Radyoterapi**

Radyasyon ile ilişkilendirilen over hasarı, bireyin yaşına ve maruz kalınan radyasyon dozuna ve süresine bağlı olarak değişir (Tablo 3). Erken foliküler gelişim döneminde maksimum oosit hasarı oluşur (Ogilvy-Stuart ve Shalet, 1983). Prepubertal dönemdeki overler, irradyasyona kısmen dirençlidir. 40 yaş ve üzerindeki bir kadında, 600 rad ve üzeri radyasyon %90 olasılıkla overyan yetmezliğe sebep olur (Taylor ve ark., 1996).

**Tablo 3.** Doza bağı sterilite riski (Davutoğlu ve ark., 2008)

Over dozu	Sterilizasyon etkisi
60 rad	etki yok
150 rad	40 yas uzerinde biraz risk
250-500 rad	15-40 yas: %60 sterilizasyon
500-800 rad	15-40 yas: %60-70 sterilizasyon
800 rad uzeri	%100 kalıcı sterilizasyon

### **2.8.7. Kemoterapi**

Kemoteropatik ajanlar, teka hücreleri ve matür foliküllerdeki proliferen olan granülosa hücreleri gibi hızlı çoğalan hücreler üzerine etkilerini daha fazla göstermektedir (Gradishar ve Schilsky, 1989). Radyoterapi de olduğu gibi, hasta yaşı doz ve süresi, tedavide kullanılan ajanın türü, over hasarının gelişiminde önemli rol oynarlar. Prepubertal dönemde overler, göreceli olarak alkilleyici ajanların etkilerine dirençlidirler. 40 yaş öncesi bir kadında ovaryen yetersizlik gelişme olasılığı, daha yaşlı bir kadına göre oldukça düşüktür (Chapman ve Sutcliffe, 1981). Hormonal ajanlarla over fonksiyonlarının baskılanmasının, kemoterapi sırasında over rezervini koruduğu gösterilememiştir (Ataya ve ark., 1995).

### **2.8.8. Otoimmünite**

Otoimmün etioloji 3 şekilde incelenmektedir :

#### **2.8.8.1. Otoimmün Hastalıklarla Birliktelik**

Çok sayıda otoimmün hastalık POY ile birliktelik göstermektedir. En yaygın olanı %27 insidans ile hipotiroidizmdir, %2,5 ile diabetes mellitus ve yine %2,5 ile Addison hastalığı takip eder. Addison hastalarının yaklaşık %10'unda POY görülmektedir ve POY hastalarının %10'unda da adrenal bezlere karşı otoimmünite belirtilmiştir. POY hastalarının yaklaşık %3'ünde otoimmün poliglandüler sendrom (APS) tip I veya II görülmektedir (Lebovic ve Naz, 2004).

### **2.8.8.2. Lenfositik Ooforit**

Literatürde 215 POY'lu over biyopsi materyali incelemesi sonucunda, histolojik ooforit insidansı %11 olarak bildirilmiştir (Hoek ve ark., 1997). Ooforit, primer olarak makrofajların, T lenfositlerinin, naturel killer hücrelerinin plazma hücrelerinin ve çeşitli B lenfositlerinin hücrel infiltrasyonu olarak belirtilmiştir (Sedmak ve ark., 1987). Granuloza hücreleri üzerindeki sınıf 2 Major histocompatibility complex (MHC molekülüleri), lenfositlerin akımını uyaran muhtemel tetikleyicisi olarak düşünülmektedir (Hill ve ark., 1990).

### **2.8.8.3. Over Antijenlerine Karşı Oluşan Otoantikolar**

POY hastalarında antiovaryen antikor insidansı çok farklı (%0-67) değişimler göstermektedir. Klinik önemlerini ve fonksiyonlarını yorumlamak oldukça zordur. Çünkü, çok farklı Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELİSA) testleri mevcuttur. Antiovaryen antikorlar geçici olarak görülebilir ve antikor değerleri ile hastalığın ciddiyeti arasında zayıf bir ilişki mevcuttur. IgG tipindeki steroid hücre antikorları, overin hilar, granuloza ve teka hücrelerine bağlı olarak bulunmuştur. Ancak, bu antikorlar izole POY'dan ziyade Addison hastalarında bulunmaktadır. Addison hastalarının steroid hücre antikor taşıyanlarının %42,8'inde 10-15 yıl içinde POY geliştiği bildirilmiştir (Lebovic ve Naz, 2004).

### **2.8.8.4. Metabolik Nedenler (hemokromatosiz ve galaktozemi)**

Metabolik etkenlere bağlı olan POY genel olarak primer hastalığın gonadlara direkt etkilerinden dolayı meydana gelmektedir. Örneğin, kan transfüzyonları nedeniyle Talasemi Majordeki demir birikimi veya hemokromatosiz. Demir birikimi genel olarak hipofizer yetersizlik ile bağlantılıdır. Fakat, yüksek gonadotropinlerle seyreden primer over yetersizliği de nadir bir durum değildir (Eden, 1993). Hipergonadotropik hipogonadizm, anormal galaktoz metabolizması ile birlikte bildirilmiştir.

Klinik olarak heterojen bir tablo gösteren galaktozemi, otozomal resesif kalıtım gösterir. Galaktoz 1-fosfat uridil transferaz'ın (GALT) tam veya kısmi yokluğu sonucunda ortaya çıkar. Bu bireylerde plazmada fazla miktarda galaktoz 1-fosfat (Gal 1-P) birikir (Sardharwalla ve Wraith, 1987). Gal 1-P ve galaktitol gibi ana toksik maddelerin dokularda birikmesi patogeneze sorumlu olsa da ovaryen yetmezliğe

sebebe olan mekanizma kesin olarak açıklanamamaktadır (Fraser ve ark., 1986). Prenatal ve postnatal dönemde overlerde Gall-P birikmesi ve gonadotropinlerdeki karbonhidrat metabolizmasında, enzim defektine bağılı olarak ortaya çıkan hasarlar ovaryen yetmezliğe sebebe olmaktadır (Gitzelmann ve Steinman, 1984). Yapılan deneysel çalışmalarda, yüksek maternal galaktoz düzeylerinin, primordiyal germ hücrelerinin gonadal bayıra (ridge) migrasyonunu inhibe ederek başlangıçtaki oogonyum sayısını azalttığını ve ovaryen yetmezliğe sebebe olduğunu göstermiştir (Chen ve ark., 1981).

#### **2.8.8.5. Rezistan Over sendromu**

Gecikmiş puberta ile karşımıza gelen bu klinik tabloda, ovaryen foliküller gonadotropin uyarısına cevap vermezler. Gonadotropin yokluğu veya reseptör hasarı, postreseptör sinyal defekti patogeneizde ilişkilendirilmektedir (Talbert ve ark., 1984). Over biyopsisi ve laparotomi yapılarak, overde folikül varlığının gösterilmesi ve histolojik olarak otoimmün durumlarda görülen lenfositik infiltrasyonun olmayışı tanıyı destekler. Biyopsi veya ultrasonagrafi (USG) ile primordiyal foliküler aktivitenin belirlenmesi ovulatuvar kapasiteyi belirlemez. Biyopside primordiyal folikülleri olmayan kadınlarda bile spontan gebelikler bildirilmiştir (O'Herlihy ve ark., 1980). Bir çalışmada USG'de folikül izlenmeyen hastaların hiçbirinde, over biyopsisinde de histolojik olarak folikül belirlenememiştir. Tam tersine USG'de folikül izlenen, normal boyutta overlere sahip hastaların %56'sında biyopsi ile folikül görülememiştir (Massin ve ark., 2008).

Primordiyal foliküller tesbit edildiğinde, olası geri dönen over fonksiyonlarını belirlemek için, gebelik istemi olan kadınların 6 ayda bir gonadotropin seviyelerine bakmak uygun olacaktır. Nadir de olsa, POY teşhisinin ardından bazı kadınlar normal over fonksiyonlarını tekrar kazanıp spontan remisyona girerler. Bu iyileşmenin mekanizması tam olarak belirlenememiştir. POY gelişen kadınların bir kısmında, tanı sonrasında spontan gebelik oluştuğu gözlenmiştir (O'Herlihy ve ark., 1980). Bir çalışmada POY ve sekonder amenoreesi olan kadınlarda aralıklı olarak over fonksiyonlarının devam ettiği gösterilmiş olup, ovulasyon oranı %24, gebelik oranı da %8 olarak bildirilmiştir (Rebar ve Connolly, 1996). Serum LH seviyesi düşük, üriner östrojen seviyesi daha yüksek olanlarda spontan ovulasyon ihtimali artmıştır (O'Herlihy ve ark., 1980). Yapılan çalışmaların bir kısmında, östrojen replasman tedavisi alan POY olgularında gebelik şansının daha yüksek olduğu bildirilse de (Nelson ve ark., 2001)

aksini gösteren çalışmalar da vardır (Surrey ve Cedars, 1989). Farklı çalışmalar, östrojen replasmanı yapılan ve amenore süresi 3 aydan daha kısa olan olgularda ovulasyon oranının östrojen replasmanı yapılmayanlara oranla anlamlı olarak farklı olduğunu bildirmiş olsalar bile yine benzer şekilde gebelik oranları arasında fark gösterilememiştir (Taylor ve ark., 1996). POY tanısı alan kadınlara asla kesin infertil oldukları söylenmemelidir. Bu popülasyonun yaşam boyu gebe kalma şansı % 10-15'tir (O'Herlihy ve ark., 1980). FSH/ LH oranı 1'den küçük, östrojen değeri 50 pg/ml'den yüksek ise, ovulasyon indüksiyonu düşünülebilir. Egzojen gonadotropin uygulaması öncesi GnRH agonistlerinin verilir yüksek gonadotropinleri normal sınırlara getirmenin her hangi bir avantajı gösterilememiştir (Speroff ve ark., 2005; Davutoğlu, 2008).

## 2.9. Tetkik ve Değerlendirme

POY olgularında inhibin düzeyleri ölçülemeyecek kadar düşüktür. Aktivin A inhibinin tersine FSH sentez ve sekresyonunu stimüle eder. Fertil kadınlarda menstrual siklus boyunca değişiklikler görülür. Ancak postmenopozal kadınlarda bu değişiklikler gözlenmez (Burger ve ark., 1995). Karyotip analiz, 30 yaş altındaki bütün vakalara yapılmalıdır. Primer amenore ön tanılı bir hastada yaklaşık %50 olasılıkla kromozom anomalisi beklenirken, sekonder amenore olgularında bu oran %10 kadardır (Davis ve ark., 2000). POY tanısı almış kişilerde, kız çocukları ve kız kardeşleri de benzer kromozom anomalisinden etkilenmiş olabileceği için bu kişilere de genetik danışma tavsiye edilmelidir. Ailesel POY olgularının %10-20 kadarında Frajil X premütasyonu sorumlu tutulduğu için, aile öyküsü de olan POY vakalarında bu mutasyon araştırılmalıdır. Ovaryen otoantikörler POY olgularının çok az bir grubunda saptanmaktadır. Ovaryen otoantikör tarama sonucundaki bilgiler, klinik olarak ve hasta yönetiminde belirleyici olmadığı için günümüzde değerini kaybetmiştir (Speroff ve ark., 2005). Ultrasonografik olarak overlerin incelenmesiyle, over morfolojisi ve varsa foliküler aktivite bilgileri elde edilmelidir. Genelde ultrasonda normalden daha küçük overler belirlenir. Primer amenoreli gonadal disgenezili vakalarda ultrasonda streak over görüntüsü vardır. Hipoplastik over izlenen (0.20 ml-0.30 ml) ovaryen yetmezlikli olgularda laparoskopi ve over biyopsisi yapılarak overlerde primer foliküller belirlenebilmiştir (Peccoz ve Pernani, 2006). Spontan POY vakalarının %31'inde overde 3 mm.'den büyük kistik intraovaryen yapılar gözükmektedir. Bazı durumlarda antral

foliküllere benzeyen daha büyük foliküllerin olduğu belirlenmiştir ( Nelson ve ark., 1994). Nelson ve arkadaşları, antral folikül izledikleri 6 POY hastasında, bu foliküllerden biyopsi örneği almışlar ve histolojik değerlendirmede foliküllerin tamamının luteinize graafian folikülü olduğunu göstermişlerdir. POY vakalarında, sonografide antral folikül olarak gördükleri bir folikülün %61 olasılıkla luteinize olmuş bir Graafian folikülü olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Spontan POY olgularında yapılan karyotip analizlerinde normal olan vakalarda, aralıklı olarak over fonksiyonlarının geri döndüğü ve ovulasyonun olduğu bilinmektedir. Bu hastaların, dolaşımdaki östrojen düzeyleri ile overlerindeki foliküllerin büyüklükleri arasındaki ilişki zayıftır.

## **2.10. Tedavi ve Prognoz**

POY tanısı, genç bir kadın için oldukça üzücü ve yıkıcı bir durumdur. Bu süreçte duygusal destek almak için bir psikolog ile iletişim halinde olmakta hasta için yarar sağlayacaktır. Özenli, daha hassas ve empatik bir yaklaşımla hastalık ve ilerleyen süreçler hakkında yeterli ve detaylı bilgiler hastalara aktarılmalıdır. Aynı zamanda hastalarda görülen özgüven eksikliği, depresif duygu durum hali yalnızca östrojen eksikliğine bağlı değildir ( Colin ve ark., 2004). Uzunca bir zaman hormon tedavisi alan bu hastaların tedaviye uyumunu sağlamak için, östrojen eksikliğinin etkileri hakkında yeterli şekilde bilgilendirmekte fayda olacaktır. POY'lu olgular akut dönemde, irritabilite, sıcak basmaları, vaginal kuruluk, gece terlemeleri ve konsantrasyon güçlüğü gibi şikayetler ile semptomatik haldedirler. Erken menopoza giren bayanlarda, tromboz ve meme kanseri görülme sıklığı azalır. Fakat daha da önemlisi, yaşamlarının uzun bir döneminde östrojen eksikliğine maruz kalan bu kişiler osteoporoz ve kardiyovasküler hastalık riskine karşı aday hale gelirler (Colin ve ark., 2004). Sex steroidlerindeki yetersizliğe bağlı olarak erken dönemde başlayan endotelial disfonksiyon, kardiyovasküler hastalık riskindeki artışın temel etkenidir. POY izlenen kadınlarda yaşa bağlı kardiyovasküler mortalite riski iki kat artmış durumdadır (Snowdon ve ark., 1989). POY hastalarının tedavisinin temeli hormon replasman tedavisidir. Replasman tedavisi, akut dönemde meydana gelen östrojen eksikliği semptomlarını yok ettiği gibi, uzun dönemde hastaları kardiyovasküler hastalık ve osteoporoz riskine karşı da korur. Siklik hormon tedavisi uygulanan POY vakalarında, tedaviden 6 ay sonra endotel fonksiyonlarının düzeldiği belirlenmiştir (Kalantaridou ve ark., 2004). POY olgularında,



aralıklı olarak over fonksiyonlarının tekrar başlamasına bağlı olarak ovulasyon ve gebelik meydana gelse de infertilite bu vakalar için en önemli sorunların başında gelmektedir. Bu yüzden, hiç bir zaman infertil oldukları söylenmemeli, düşük olasılık olsada spontan gebelik ihtimaline karşın bilgi verilmelidir. POY'lu bir hasta gebe kaldığında bu sürecin normal bir kadından farklı geçmeyeceği konusunda bilgi verilmelidir (Goosin ve ark., 1993).

POY tanılı bireylerde, over fonksiyonlarının tekrar geri kazanılma olasılığı ile tedavi yöntemi arasında ilişkinin varlığı bir çok araştırmada ortaya konulmaya çalışılmıştır. Surrey ve arkadaşlarının FSH düzeylerinin, siklik konjuge östrojen/MPA, siklik etinil estradiol/MPA ve GnRH'a ile süpresyonu sonrası ovulasyon oranının plasebo kontrollü grup ile benzer olduğu belirtilmiştir (Surrey ve Cedars, 1989). Van Kasteren ve arkadaşlarının yaptıkları plasebo kontrollü çalışmada 9 mg/gün dexametazon ile bir hafta immune süpresyon yaptıkları grup ile kontrol grubu arasında ovulasyon ve gebelik oranları arasında fark saptamamışlardır (Van Kasteren ve ark., 1999). Taylor ve arkadaşlarının E replasman tedavisinin, over fonksiyonlarının ve ovulasyonun geri kazanımında rolünü incelediği plasebo kontrollü çalışmada iki grup arasında fark olmadığını göstermişlerdir (Taylor ve ark., 1996). Anasti ve arkadaşlarının kombine estradiol/MPA (endokrin süpresyon) ve Danazol (endokrin ve immune süpresyon) ile hipofizer süpresyon sonrası ovaryen fonksiyonların aynı biçimde olduğunu belirtmişlerdir (Anasti ve ark., 1994).

Son zamanlarda; ergenlik döneminde sık görülen hematolojik maligniteler ve genç erişkin dönemde meme kanseri ve diğer bir çok malign hastalıkların tedavisinde olumlu gelişmeler olmaktadır. Bu hastalar için over dokusunu ve oosit dondurularak saklanması umut edilse de şimdilik rutin klinik bir uygulamaya başlama aşamasında değildir. Günümüzde, kontrollü ovaryen hiperstimulasyon için zaman tanıyabilen kanser hastaları için, embriyo dondurma işlemi bu hastaların fertilitésinin korunmasında tek seçenektir (Oktay ve ark., 2003).

Günümüzde, POY teşhisi almış kişilerde uygulanan hormon tedavisinin süresi, dozu ve riskleri konusunda kesin bilgiler olmamakla birlikte uygulanacak hormon tedavisinin süresi ile ilgili bir kısıtlama yoktur (Speroff ve ark., 2005).

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. Araştırma Grubu ve Biyolojik Örnekler**

Bu araştırma kromozomal ve sendromik olmayan prematüre ovaryen yetmezliğe sahip hastalarda *BMP15*, *INHA*, *FOXO3* genlerindeki mutasyon sıklığının belirlenmesi amacıyla 2012-2013 yılları arasında, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalından gönderilen toplam 60 POY hasta (23 yaş-40 yaş) ve 60 sağlıklı fertil (42 yaş-71 yaş) olan kontrol grubu üzerinde gerçekleştirildi. Araştırmaya katılan hasta ve kontrol grubu bireyler yapılacak işlemlerle ilgili olarak bilgilendirildi ve hazırlanan onay formları imzalatıldı. Çalışma grubundan alınan kan örnekleri DNA izolasyonu için Etilendiamin tetraasetik asitli (EDTA) tüplere (2-3 cc.) alınarak ve moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere laboratuvarımıza gönderildi. Laboratuvarımıza gönderilen toplam 120 kan örneğinin DNA'ları izole edildi ve nanodrop ile miktar ve saflık dereceleri belirlendi. DNA örnekleri üzerinde her üç gen için farklı PCR protokolleri hazırlandı. Bu protokollere göre gen bölgeleri çoğaltıldı. Her üç gen için elde edilen PCR ürünleri DNA dizi analizi için ilgili merkeze (BM Yazılım Danis. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. Bornova-İZMİR) uygun koşullarda gönderildi. İlgili şirket tarafından teslim alınan örnekler, DNA dizi analizi işlemi yapıp, sonuçları daha sonra tarafımıza gönderildi.

#### **3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edilen firmalar aşağıda verilmiştir.

Magnezyum Klorür ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (Merck)

HCl (Merck)

EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (Merck)

Sodyum klorid (NaCl) (Merck)

Saf etanol (Riedel-de Haen)

Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)

Taq DNA Polimeraz (Fermentas)

Primerler (ThermoScientific)

dNTP Mix (Fermentas)

DNA İzolasyon Kiti (blood) (Norgen)

UltraPure™ Agaroz (Prona)  
DNA Ladder (Fermentas)  
6X Loading Dye Solution (Sigma)  
Borik Asit (Sigma)  
Etidyum bromid(ETBr) (Sigma)  
Dimetil sülfoksit(Dmsö) (Sigma)

### **3.3. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler**

Aşağıda verilen ve bu çalışmada kullanılan cihazlar ve teknik malzemeler, araştırmanın yapıldığı yer olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunmaktadır.

Otoklav (Nüve)  
Bidistile su cihazı (Nüve)  
Soğutmalı santrifüj (Nüve)  
Santrifüj (Sigma 3-15)  
Mikrosantrifüj (Hettich)  
Hassas terazi (Mettler AJ 100)  
Isıtıcı (Hotplate)  
pH metre (Hanna)  
Etüv (Dedeoğlu)  
Otomatik pipetler (Ependorf, Socorex, Rainin)  
Yatay elektroforez tankı ve güç kaynağı (Scie-Plas)  
Spektrofotometre (Jenway Genova Nano)  
UV transillumunator (Viber Laurmat)  
UV görüntü analiz sistemi (Biolab)  
Buzdolabı (Arçelik)  
Derin dondurucu (Ariston)  
Dijital Isı Bloğu (VWR Digital Hetblock)

Thermal Cycler (Applied Biosystems GeneAmp 9700 PCR System)

Lamin Air (Holten HV2436)

Vorteks (Clifton Cyclone)

Vorteks (Boeco)

Vorteks (Nüve NM 110)

### **3.4. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması**

**10XTBE:** 108 gr. Tris, 55 gr. Borik asit, 40 ml. EDTA 0.5M pH: 8 karıştırılıp toplam hacim 1000 ml. olacak şekilde bidistile su ile tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

**1XTBE:** 100 ml 10XTBE solüsyonu üzerine 900 ml. bidistile su eklenir. Oda ısısında saklanır.

**EDTA 0.5M pH 8,0:** 18,6 gr. disodyum EDTA, 80 ml. bidistile su içinde çözünür. Solüsyona 2 gr. NaOH tableti atılarak eritilir, pH 8,0'e ulaşıncaya bidistile su ile 100 ml.'ye tamamlanır. Otoklavda steril edilir ve +4°C'de saklanır.

**Tris 500mM pH 7,5:** 6,1 gr. Tris üzerine 95 ml. bidistile su eklenip iyice çalkalandıktan sonra yaklaşık 3.25 ml. konsantre HCl ilave edilip pH 7,5'a ulaşıncaya bidistile su ile 100 ml.'ye tamamlanır. Otoklavda steril edilir ve +4°C'de saklanır.

**Tris 500mM pH 8,0:** 6,1 gr. Tris üzerine 95 ml. bidistile su eklenip iyice çalkalandıktan sonra yaklaşık 0.42 ml. konsantre HCl ilave edilip pH 8,0'e ulaşıncaya bidistile su ile 100 ml.'ye tamamlanır. Otoklavda steril edilir ve +4°C'de saklanır.

**%70 Etil alkol:** 70 ml. % 99,5 etil alkol alınır ve üzerine 30 ml bidistile su eklenir.

**Ethidium bromid solüsyonu (10 mg/ml):** 1 gr. ethidium bromid, 10 ml. distile su içinde çözünür. Işık almayan bir şişe içinde +4°C'de saklanır. Çalışma solüsyonu, hazırlanan stok solüsyonundan konsantrasyon 0,5 mg/ml. olacak şekilde hazırlanır 0°C'de saklanır.

### **3.5. DNA İzolasyon Hazır Kit (Norgen Kit #46300)**

#### **1-Örneklerin hazırlanması**

##### **Protokol**

200µl Kan örnekleri için;

1- Mikrosantrifüj tüpüne 12 µl. Proteinaz K ilave edildi.

2-200µl. kan örneği ilave edildi.

3-600 µl. lizis solüsyonu ilave edilir,10 sn. düşük tempoda vortekslendi.

4-55C'de 10 dk. İnkübasyona bırakıldı.

5- Eğer örneklerde çökelme oluyorsa 14.000 RPM'de 2 dk. santrifüj yapıldı.

6-160 µl. izopropanol ilave edilir (dikkatli), 10 sn. düşük tempoda vortekslendi.

## **2-Örneklerin kolona bağlanması**

1-Kolon tüplerine, 650 µl. açık renkli süpernatant 1 dk. 8000RPM'da santrifüj edildi.

2- Kolon ve toplama tüpü tekrar birleştirildi.

3- 1.ve 2. adımlar tekrarlandı.

4- Lizatlar toplama tüplerinden çıkartıldı.

## **3-Kolon yıkama**

1- Lizatların üzerine 500 µl yıkama solüsyonu ilave edildi. 1 dk. 8000RPM'da santrifüj edildi. Toplama tüpü ile spin kolon yeniden birleştirildi. Eğer yıkama solüsyonu tam geçmemiş ise bir süre beklendi.

2-Yıkama kolunu 2.kez 500 µl. yıkama solüsyonu ilave edildi. 1 dk. 8000RPM'da santrifüj edildi.

3-Tam kuruma olması için 14.000 RPM'da 2dk. santrifüj edildi ve toplama tüpünden çıkartıldı.

## **4-DNA Elüsyon**

1-Kolon tüpünün içine 1.7ml. elüsyon tüp yerleştirildi.

2-Kolona elüsyon tamponun 200 µl. İlave edildi.

3- 1 dk. 8000RPM'da santrifüj edildi.

4- Eğer elüsyon işlemi tam olmadıysa 1. ve 2. kısım tekrarlandı ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne toplandı ikinci elüsyon yapıldığında ürünlerin verimi arttı.

## **5-DNA'nın saklanması**

Elde edilen DNA örnekleri -20C'de saklandı.

### **3.6. DNA Miktarının Tayini**

İzole edilen DNA, nanodrop cihazı ile 2µl DNA örneği üzerinden ölçüldü. DNA konsantrasyonu uygun olan örnekler daha sonra çalışılmak üzere -20°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

### 3.7. PCR Reaksiyonunun Hazırlanması

Çalışmamızda farklı 3 gen ile çalışılacağından 3 farklı PCR protokolü hazırlanmıştır.

PCR reaksiyonu hazırlanırken kullanılan bileşenler aşağıda verilmiştir.

- Primerler
- Termostabil DNA polimeraz (Taq Polimeraz)
- dNTP mix
- MgCl<sub>2</sub>
- Reaksiyon tamponu
- Kalıp DNA
- Buffer

PCR reaksiyonları hazırlanmadan önce kullanılacak olan reaksiyon bileşenlerinin stokları günlük kullanımlar şeklinde hazırlanarak kontaminasyon riskini önlemek amacı ile steril ependorf tüplerine belirli hacimlerde paylaştırıldı. Örneklerimiz için optimum amplifikasyon koşullarının belirlenmesi için bazı denemeler gerçekleştirildi. Bu denemeler esnasında farklı tampon bileşimi, dNTP ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları, termal cyclus denatürasyon sıcaklıkları değişimleri denenerek en uygun şartlar sağlandı. Her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu.

PCR reaksiyonunun hazırlanmasında sırasıyla şu basamaklar izlendi:

- Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar ve çözeltiler -20°C'den alınıp oda ısısında çözdürüldü.
- %70'lik alkolle temizlenmiş laminar flow kabin içinde, üzerlerine örnek kodu yazılarak 200µl.'lik PCR tüpleri hazırlandı.
- Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vortekslendi, daha sonra tüpün duvarındaki tüm damlaları toplamak amacıyla kısa bir süre santrifüj edildi.
- Reaksiyon hacmini tamamlamak için steril bidistile su içeren bir ampül kullanıldı.
- PCR mix hazırlamak için 200 µl.'lik bir PCR tüpüne daha önce hesaplanan miktarlarda bidistile su, 10X tampon, MgCl<sub>2</sub>, primerler, dNTP mix eklendi.
- Kodlanmış her bir PCR tüpüne PCR reaksiyon karışımı eşit olarak dağıtıldı.
- Daha sonra önceden hesaplanan miktarda DNA eklendi.
- Böylece tüplerin her birine tüm PCR bileşenleri (DNA, 10 X tampon, MgCl<sub>2</sub>, primerler, dNTP'ler, buffer, bidistile su ) eklenmiş oldu.

- Tüpler önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Tüpler önceden programlanmış thermal cycler'a yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

Başlangıç denatürasyonu ve 1. siklusda denatürasyondan hemen sonraki hot start uygulaması 75°C'de yapılarak her bir örneğin içine 1.25 ünite Taq polimeraz eklendi ve amplifikasyona devam edildi.

Cihaz programlanan siklus sayısını tamamladıktan sonra PCR amplifikasyon ürününün elde edilip edilmediğini görmek amacıyla ürünler öncelikle %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

*INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* gen bölgeleri için elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde sırasıyla 243bç., 477bç. ve 747bç. uzunluğunda olması beklenen fragmanı belirlemeye olanak verecek bir markır ile beraber yürütüldü. Jel görüntüleme cihazında jel görüntülerinin fotoğrafları çekilip bilgisayar ortamına aktarıldı. PCR ürünleri daha sonra mutasyon analizi için Sanger'in dideoksi zincir sonlandırma yöntemi kullanılarak otomatik dizi analizi cihazında (ABI 3130) dizilendi. Gene scan programı kullanılarak analiz edildi.

### 3.8 *INHA* Geni

*INHA* geni ekzon 2 bölgesini içeren 243 bç'lik bölge, Shelling ve ark. (2000) tarafından kullanılan primerler ve uygulanan PCR protokolüne göre yapılmıştır (Tablo 4 ve 5).

*INHA* geni primerleri:

5'-GGCCCACTCGGACCAGAC-3' (forward)

Sequence: from 220439795 to 220439814

5'-AGCCCAACAACCATGACAGTAG-3' (reverse)

Sequence: from 220440014 to 220440037

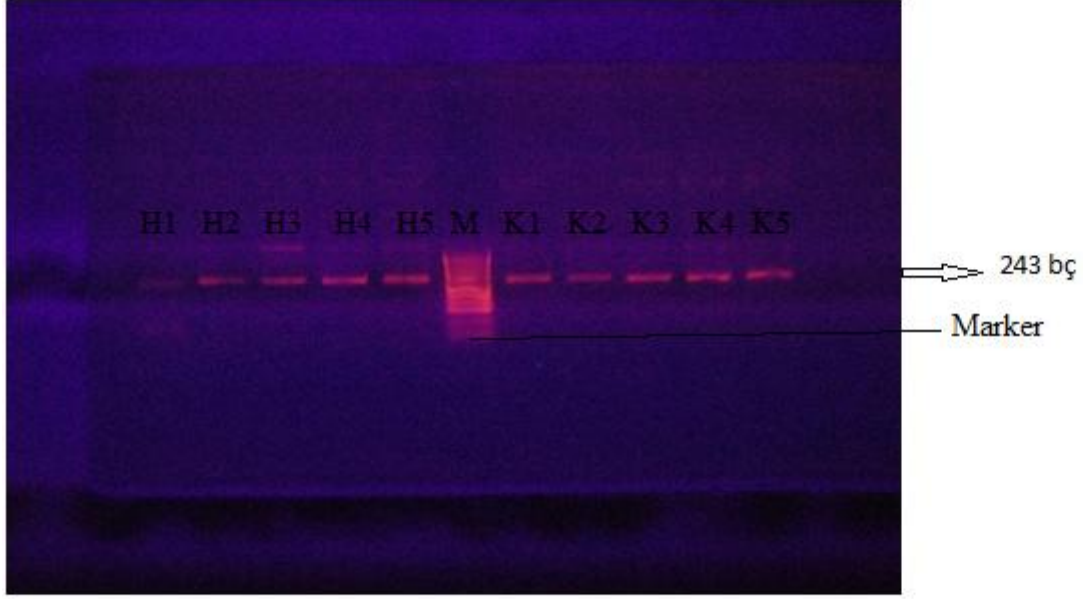
**Tablo 4.** *INHA* geni PCR bileşenleri

<b>Reaksiyon bileşenleri</b>	<b>Stok Konsantrasyonları</b>	<b>Alınan Miktar</b>
Primer inha(R)	100pmol/μl.	0.25μl.
Primer inha (F)	100pmol/μl.	0.25μl.
dNTP karışımı	40mM.	0,1μl.
MgCl <sub>2</sub>	25mM.	2μl.
Taq DNA polimeraz	1,25U/2μl.	2μl.
Genomik DNA	100ng/5μl.	5μl.
PCR Tamponu	10XPCR buffer	2.5μl.
Su (distile)	12.9	12.9μl.
		25μl

**Tablo 5.** İnhibin alfa geni PCR termal cycler programı

<b>Başlangıç denatürasyon</b>	<b>Denatürasyon-Annealing-Extension</b>			<b>Final Extension</b>	<b>Saklama</b>
95°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
120 sn.	120sn.	60 sn.	60 sn.	120 sn.	∞





**Şekil 16.** *INHA* geni ekzon1 PCR ürünü (243bç) jel görüntüsü. pUC19 DNA7MspI (HpaII) (Fermantas)

TTCCACACCGGGCTGGACAGGCAGGGCACAGCAGCCTCCAATAGCTCTGAGCCCCTGCTAGGCCTGCTGG  
 CACTGTCACCGGGAGGACCCGTGGCTGTGCCATGTCTTTGGGCCATGCTCCCCCTCACTGGGCCGTGCT  
 GCACCTGGCCACCTCTGCTCTCTCTCTGCTGACCCACCCCGTCCTGGTGCTGCTGCTGCGCTGTCCCCTC  
 TGTACCTGCTCAGCCCGGCCTGAGGCCACGCCCTTCTGGTGGCCACACTCGGACCAGACCACCCAGTG  
 GAGGGGAGAGAGCCCAGCCTCAACTCCCCTGATGTCCTGGCCTTGGTCTCCCTCTGCTCTGCGCCTGCT  
 GCAGAGGCCTCCGGAGGAACCGGCTGCCATGCCAACTGCCACAGAGTAGCACTGAACATCTCCTTCCAG  
 GAGCTGGGCTGGGAACGGTGGATCGTGTACCCTCCCAGTTTCATCTTCCACTACTGTCATGGTGGTTGTG  
 GGCTGCACATCCCACCAAACCTGTCCCTTCCAGTCCCTGGGGCTCCCCCTACCCAGCCCAGCCCTACTC

**Şekil 17:** *INHA* geni nükleotid dizisi ve bu gene ait bölgeyi çoğaltmada kullandığımız primerin gen üzerindeki bağlanma bölgesi.

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC\\_000002.12?report=fasta&from=219572232&to=219575713](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_000002.12?report=fasta&from=219572232&to=219575713))

### 3.9. *BMP15* Geni

*BMP15* geni ekzon 1 bölgesini içeren 477 bç'lik (Şekil18) dizi Dixit ve ark. (2006) tarafından kullanılan primerler ve uygulanan PCR protokolüne göre yapılmıştır (Tablo 6 ve 7).

*BMP15* geni primer dizileri;

5' –AGTGACGTCCCTTGGGCTTG-3' (forward)

Sequence: from 50653728 to 50653747

5' –CAAAGCCTGACAGTAAACCC-3' (reverse)

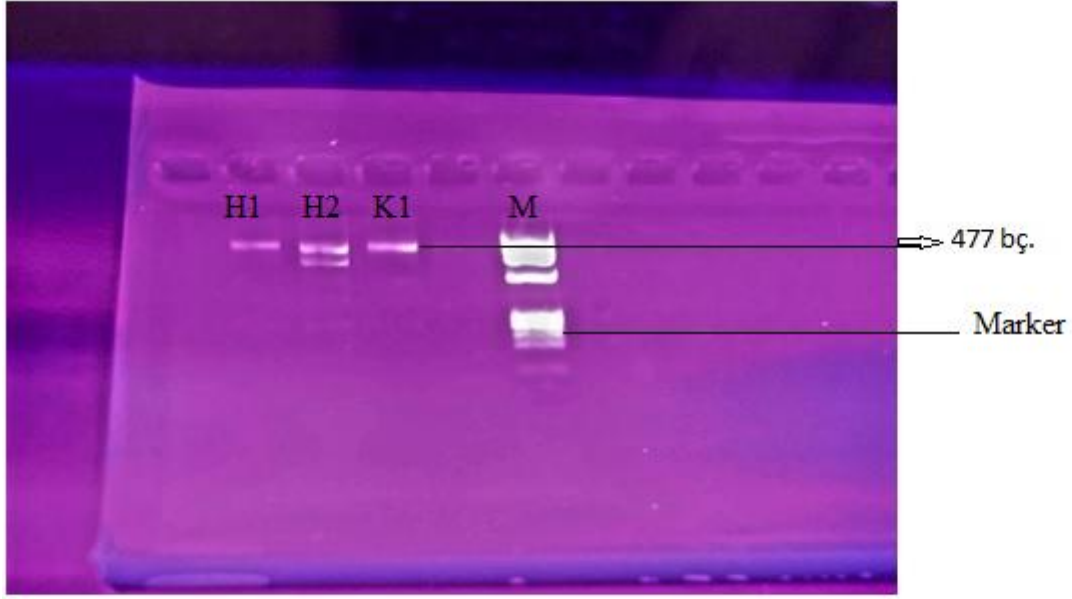
Sequence: from 50654185 to 50654205

**Tablo 6.** *BMP15* geni için PCR bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Stok Konsantrasyonları	Alınan Miktar
Primer inha(R)	100pmol/µl.	0.25µl.
Primer inha (F)	100pmol/µl.	0.25µl.
dNTP karışımı	40mM.	0,1µl.
MgCl <sub>2</sub>	25mM.	1.5µl.
Taq DNA polimeraz	5U/µl.	2µl.
Genomik DNA	100ng/5µl.	5µl.
PCR Tamponu	10XPCR buffer	2.5µl.
Su (distile)	11.25.	11.25µl.
DMSO	%5 DMSO	1.25µl.
Toplam		25µl.

**Tablo 7.** *BMP15* geni için PCR termal cyler programı

Başlangıç denatürasyonu	Denatürasyon-Annealing-Extension			Final Extension	Saklama
	35 döngü				
95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
300sn.	60sn.	60 sn.	60 sn.	420 sn.	∞



**Şekil 18:** *BMP15* geni Ekzon 1 (477 bç) PCR ürününe ait jel görüntüsü. pUC19 DNA7MspI (HpaII) (Fermantas)

```

AGGAGGCCTCTGGCCCTTTAAGGATGGATTAAGGGACTACTTTTAAGGCTGTAGGG
GCAAGTAGGATCAGGCTGCTTTTTTTCATTCTAGTGGATAAGTTAAGGAAGTGGGTCCTGAAATGGACCT
CTCCTTTTAAGTTACCTGAGCCTCTCAATAGGTACTATCTTGTTCCTCAGCCCGGAGAGCGGGAGGGGCA
TGCTGCCTTGTCCACCTTCTGTTTCTGTTTCTTTTGATGCAAAGAGGCCAAGTTATGAGGCAACTTTGG
TCCAGGAGATCCTCTTAGAGAAAGCAACATAGGGCCTGCCTGCCTTTCTTTTTCTTGCCCCATCCTTGGT
TGTGGAGCCAGGATGCAGTTATCTGCATGAAAGGAAATGGTCAGAGTGACGTCCTTGGGCTTGTGTTGG
GGCCTGTTGTTGAACACTAAGCCTTTCAAGATGGTCCTCCTCAGTATTCTTAGAATTCTTTTTCTTTGTG
AACTCGTGCTTTTCATGGAACACAGGGCCCAAATGGCAGAAGGAGGGCAGTCCTCTATTGCCCTTCTGGC
TGAGGCCCTACTTTGCCCTGATTGAGGAGCTGCTAGAAGAATCCCCTGGCGAACAGCCAAGGAAGCCC

```

**Şekil 19:** *BMP15* geni nükleotid dizisi ve bu gene ait bölgeyi çoğaltmada kullandığımız primerin gen üzerindeki bağlanma bölgesi.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/74273659?report=fasta>

### 3.10. *FOXO3* Geni

*FOXO3* geni ekzon 1 bölgesini içeren 747 bç'lik dizi (Şekil 20), Fallahian ve ark. (2009) tarafından kullanılan primerler ve uygulanan PCR protokolüne göre yapılmıştır (Tablo 8 ve 9).

*FOXO3* Geni primer dizisi;

Foxo3-E1-Forward-GAGAGGAGAGCGCGAGAG

Sequence: from 108882365 to 108882382

Foxo3-E1-Reverse-ACTCCGACGAATCCGAGAC

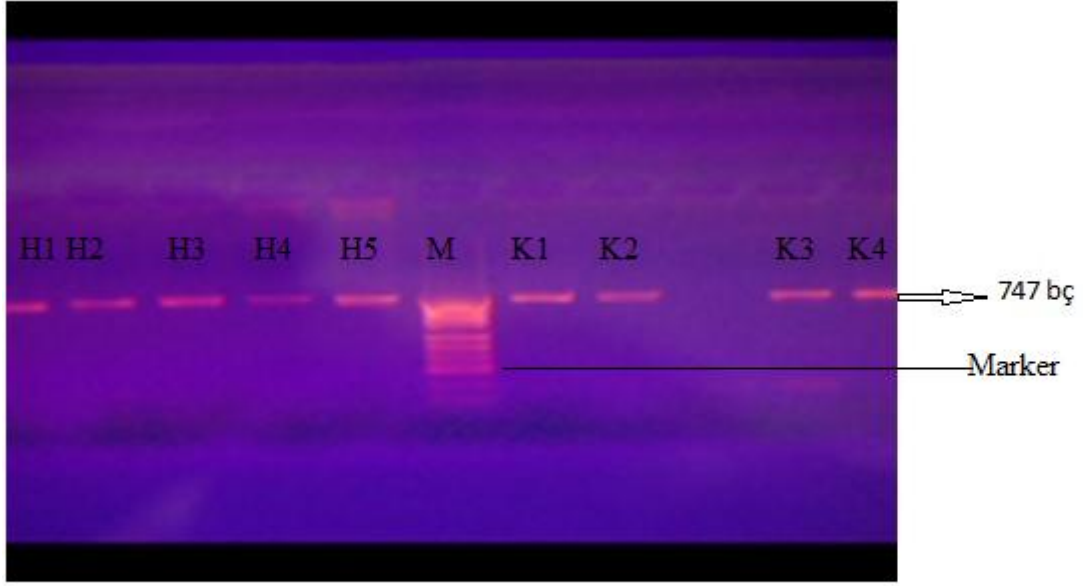
Sequence: from 108883094 to 108883112

**Tablo 8.** *FOXO3* geni PCR bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Stok Konsantrasyonları	Alınan Miktar
Primer foxo3(R)	100pmol/μl.	0.25μl.
Primer foxo3 (F)	100pmol/μl.	0.25μl.
dNTP karışımı	40mM.	0,1μl.
MgCl <sub>2</sub>	25mM.	1.5μl.
Taq DNA polimeraz	1,25U/2μl.	2μl.
Genomik DNA	100ng/5μl.	2.5μl.
PCR Tamponu	10XPCR buffer	2.5μl.
Su (distile)	13.75	13.75μl.
DMSO	%5 DMSO	1.25μl.
Toplam		25μl

**Tablo 9.** *FOXO3* geni PCR termal cycler programı

Başlangıç denatürasyonu	Denatürasyon-Annealing-Extension			Final Extension	Saklama
	35 döngü				
95°C	95°C	55.4°C	72°C	72°C	4°C
6 dk.	30sn.	30 sn.	120 sn.	7dk.	∞



**Şekil 20:** *FOXO3* geni ekzon 1 (747 bç.) PCR ürünü jel görüntüsü. Gene Ruler 100bp (Fermantas)

GAGGACTCGCCGAGGACGGGGCTCCGGCCCCGGGATAACCAACTCTCCTTCTCTCTTCTTTGGTGCTTCCC  
 CAGGCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGGAGCCGGAGCCTTCGCGGGCGTCCACGTCCCTCCCCCGCTGCACCCCCG  
 CCCC GGCGC **GAGAGGAGAGCGGAGAG**CCCCAGCCGCGGGCGGGCGGGCGGCGAAGATGGCAGAGGCACC  
 GGCTTCCCCGGCCCCGCTCTCTCCGCTCGAAGTGGAGCTGGACCCGGAGTTCGAGCCCCAGAGCCGTCCG  
 CGATCCTGTACGTGGCCCCGTCAAAGGCCGGAGCTCCAAGCGAGCCCTGCCAAGCCCTCGGGGGAGACGG  
 CCGCCGACTCCATGATCCCCGAGGAGGAGGACGATGAAGACGACGAGGACGGCGGGGGACGGGGCCGGCTC  
 GGCCATGGCGATCGGCGGGCGGGCGGGAGCGGCACGCTGGGCTCCGGGCTGCTCCTTGAGGACTCGGCC  
 CGGGTGCTGGCACCCGGAGGGCAAGACCCCGGTCTGGGCCAGCCACCGCGGGCGGGCGGGCTGAGCGGGG  
 GTACACAGGCGCTGCTGCAGCCTCAGCAACCCTGCCACCGCCGAGCCGGGGGCGGGCTGGGGGCTCCGG  
 GCAGCCGAGGAAATGTTTCGTCGCGGGCGGAACGCCTGGGGAAACCTGTCCTACGCGGACCTGATCACCCGC  
 GCCATCGAGAGCTCCCCGGACAAACGGCTCACTCTGTCCCAGATCTACGAGTGGATGGTGCGTTGCGTG

**Şekil 21:** *FOXO3* geni nükleotid dizisi ve bu gene ait bölgeyi çoğaltmada kullandığımız primerin gen üzerindeki bağlanma bölgesi.

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000006.12?report=fasta&from=108559823&to=108684769](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000006.12?report=fasta&from=108559823&to=108684769))

### **3.11. Agaroz Jelin Hazırlanması**

PCR ürünlerinin tayini için %2' lik ve %3'lük nu-mikropor agaroz jel hazırlandı. Bunlar için sırasıyla 2gr. ve 3 gr. nu-micropor agaroz tartıldı. Farklı erlen mayere alınan bu agarozların üzerine 100ml. 1XTBE eklenip mikro dalga fırında çözüne kadar kaynatıldı. Soğumaya bırakılan jelin sıcaklığı 85°C'ye ulaşınca üzerine 100µl. EtBr eklendi ve jel çalkalanıp tarağı önceden yerleştirilmiş olan jel kabına aktarıldı. Bir saat beklendikten sonra taraklar çıkarılıp jelde oluşan kuyulara PCR ürünleri yüklendi.

### **3.12. Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

Her bir gen için amplifiye olan PCR ürünleri 5µl, ve 1µl 6X jele yükleme boyası (6x loading dye) ile karıştırarak kuyucuklara yüklendi. Her gen bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin beklenen bant uzunlukları, boyları bilinen moleküler belirteç ile kontrol edildi. *INHA* ve *BMP15* genleri için pUC19 DNA7MspI (HpaII) (Fermantas), *FOXO3* için Gene Ruler 100bp (Fermantas) moleküler weight markırı kullanıldı.

### **3.13. İstatistiksel değerlendirme**

Hasta ve kontrol grubuna ait veriler SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Genotip ve allel frekansı için OpenEpi (versiyon 3.03) epidemiyolojik istatistik programı kullanılarak Ki kare analizi yapılarak P değeri ve (Dean ve ark., 2014) olasılık oranları (OR) hesaplandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma grubunun demografik özellikleri

Bu çalışmada, kromozomal olmayan premature ovaryen yetmezliğine sahip olan 60 hasta ve 60 sağlıklı fertil kadın kontrol grubu olmak üzere toplam 120 kadında *INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* genlerinin birer ekzonunda, mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir. Hasta grubunda 40 yaş altı serum estradiol seviyeleri düşük ( $E < 10 \text{mU/mL.}$ ) FSH seviyeleri ise ( $\text{FSH} > 40 \text{mU/mL.}$ ) yüksek postmenopozal seviyelerdeydi ve premature ovaryen yetmezlik tanısı almış 60 vakada yaş ortalaması  $34.8 (\pm 3.4)$ , en düşük yaş 23, en yüksek 40, kontrol grubunda ise 40 yaş üstü normal mens döngüsüne devam eden ve normal menopoza girmiş olan 60 kadında, yaş ortalaması  $52.2 (\pm 7.88)$ , en düşük 42, en yüksek 71'dir.

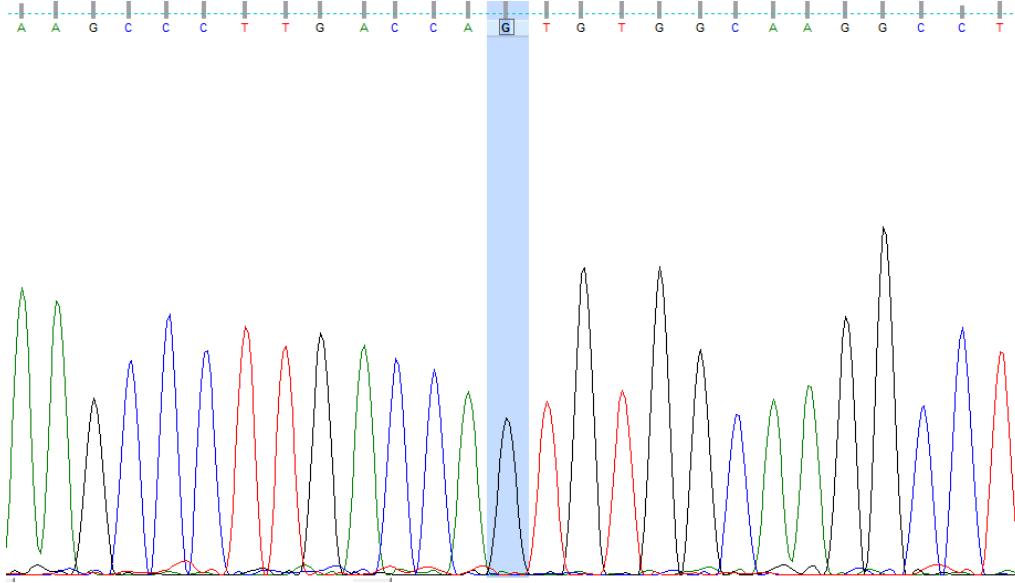
### 4.2. *BMP15* GENİ

*BMP15*'te gözlenen varyantların sıklığı hasta grubunda (%6,7) kontrol grubuna (%1,7) göre yaklaşık 4 kat daha fazladır. Hasta grubunda gözlenen varyantlar tek tek incelendiğinde fonksiyonel olduğu ancak istatistiksel olarak POY ile ilişkili olmadığı saptanmıştır ( $p > 0.05$ ). *BMP15* geni ekzon 1'in dizi analizinde hasta grubunun yaklaşık %1,7'sinde 308A>G (rs41308602) homozigot missense varyasyon sonucunda 103.aa pozisyonunda Asparajin (N)> Serin (S) aa. değişimi meydana gelmiştir. Çalışmamızda *BMP15* geninin dizi analizi sonucunda missense yeni mutasyonlar bulunmuştur. Bunlar; hasta grubunun %1,7'sinde insersiyon G homozigot mutasyonu sonucunda 25.aa pozisyonundaki metiyonin (M) aa. Aspartik asit (D) aa. dönüşmüştür.

Bunun yanı sıra bir hastada iki adet yeni missense mutasyon bulunmuştur. İlki 28C>G heterozigot missense mutasyonu olup 10. aa. pozisyonunda Lösin (L)>V değişimi, ikinci mutasyon ise 62A>G heterozigot missense mutasyonudur ve 21.aa pozisyonunda Histidin (H)>Arjinin (R) değişimi meydana gelmiştir. Kontrol grubunun %1,7'sinde 46T>C heterozigot missense mutasyon sonucunda 16. aa. pozisyonunda Valin (V) aminoasiti (aa.) Alanin (A) aminoasitine dönüşmüştür. *BMP15* geni ekzon 1'de gözlenen missense varyasyon ve yeni mutasyonların fonksiyonel olduğu ancak istatistiksel olarak POY ile ilişkisinin olmadığı saptanmıştır ( $p > 0.05$ ) (Tablo 10, Şekil 22 ve Şekil 23).

**Tablo 10 :** BMP15 geni ekzon 1 dizi analizi sonuçları.

Örnek adı	Nükleotid Pozisyonu	Nükleotid değişimi	Amino asit Pozisyonu	Amino asit değişimi	Heterozigot/ Homozigot	SNP
<b>K40</b>	46	T->C	16	V-> A	Heterozigot	
<b>H14</b>	82	İnsersiyon : G	25	M->D	Homozigot	
<b>H18</b>	28	C->G	10	L-> V	Heterozigot	
	62	A->G	21	H-> R	Heterozigot	
<b>H51</b>	308	A->G	103	N-> S	Homozigot	rs41308602



**Şekil 22:** BMP15 genine ait sekans sonucu. H51 308A>G homozigot p.N103S (rs41308602)



H11 GC GTTCAGCTGACTCGCATG66CACCCTAGAGAGAACCGCACCATTG66GCCACCATTGGTGAGGCTGGTGARGCCCTTGACCAGTGTGGCAAGGCCTCACAGAGGTGAGTTGTTATGCCCCATACTGCC  
H51 GC GTTCAGCTGACTCGCATG66CACCCTAGAGAGAACCGCACCATTG66GCCACCATTGGTGAGGCTGGTGARGCCCTTGACCAGTGTGGCAAGGCCTCACAGAGGTGAGTTGTTATGCCCCATACTGCC

H17 C66GGGTCCG--TCGTGACACTAGCCTTTAA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
k14 G66GGGTCTGTGCACATAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
k24 G66GGGTCTGTGCACATAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
H15 C66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT

H20 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
H14 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
H19 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT

H12 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
k40 TTTG66GGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
k60 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT

k46 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
H18 C66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
H21 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT

k58 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
H32 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
H50 G66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
H34 C66GGGTCCGCTTTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT  
H1 GTGACTAAGGCTTTCA-GATGGTCCCTCCAGTATTCCTTAGAATTCCTTTTCTTTGTGAACTCGTGCTTTTCATGGAAACACAGGGCCCAA-ATGGCAGAGGAGGGCAGTCTCT

H11 GC GTTCAGCTGACTCGCATG66CACCCTAGAGAGAACCGCACCATTG66GCCACCATTGGTGAGGCTGGTGARGCCCTTGACCAGTGTGGCAAGGCCTCACAGAGGTGAGTTGTTATGCCCCATACTGCC  
H51 GC GTTCAGCTGACTCGCATG66CACCCTAGAGAGAACCGCACCATTG66GCCACCATTGGTGAGGCTGGTGARGCCCTTGACCAGTGTGGCAAGGCCTCACAGAGGTGAGTTGTTATGCCCCATACTGCC  
H33 GC GTTCAGCTGACTCGCATG66CACCCTAGAGAGAACCGCACCATTG66GCCACCATTGGTGAGGCTGGTGARGCCCTTGACCAGTGTGGCAAGGCCTCACAGAGGTGAGTTGTTATGCCCCATACTGCC

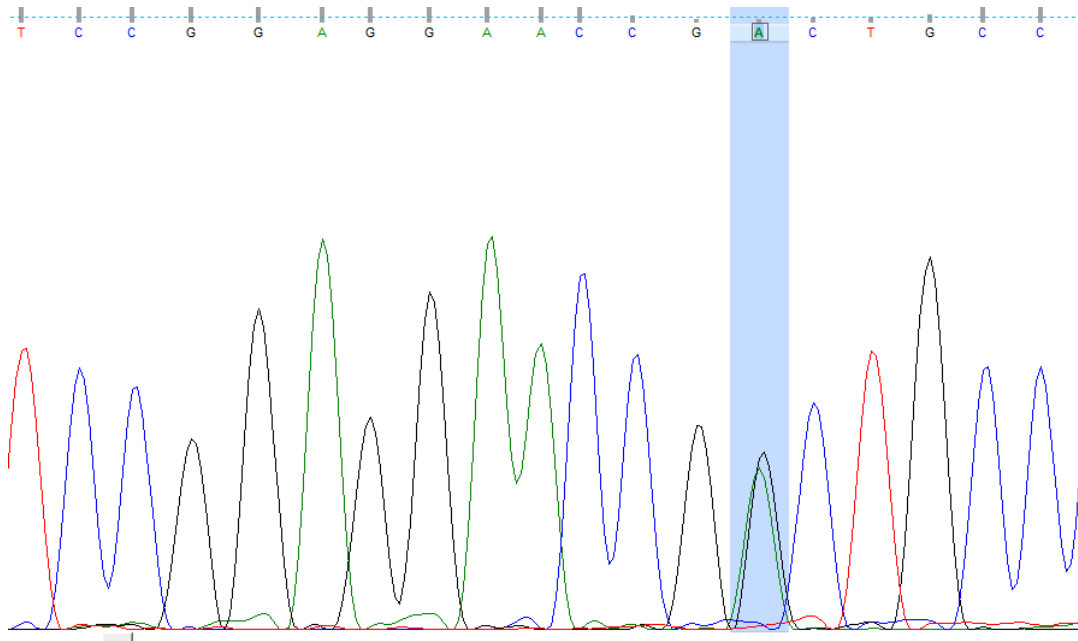
Şekil 23. *BMP15* geni dizi analizi sonuçları.

### 4.3. *INHA* Geni

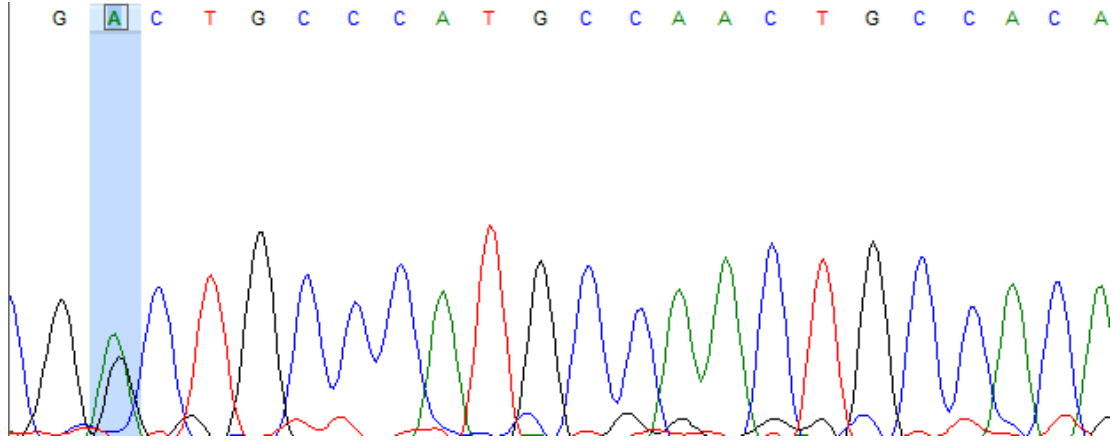
*INHA* geninine ekzon 2'ye ait PCR ürünlerinin dizi analizinde (Tablo 11); hasta grubunda %3.3 769G>A (rs12720062) heterozigot missense varyasyonu sonucunda 257. sıradaki alanin'in (A), treonin (T) amino asitine değiştiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra dizi analizinde üç yeni missense mutasyon tespit edilmiştir. Bunlardan birincisi yaklaşık %1,7 973G>A heterozigot missense mutasyondur ve 265. sıradaki valin (V), lösin (L) aminoasitine değişmiştir. İkincisi % 1,7 920G>A heterozigot missense mutasyondur ve 47. sıradaki arjinin (R), histidin (H) amino asitine değişmiştir, Üçüncüsü ise bir kontrol örneğinde yaklaşık %1,7 971G>A heterozigot missense mutasyonudur ve 264. sıradaki arjinin (R), lizin (K) amino asitine değişmiştir (Tablo 11, Şekil 24, 25 ve Şekil 26). *INHA* geni ekzon 2'de gözlenen missense varyasyon ve yeni mutasyonların fonksiyonel olduğu ancak istatistiksel olarak POY ile ilişkisinin olmadığı saptanmıştır (p>0.05).

**Tablo 11.** *INHA* geni dizi analizi sonuçları

Örnek adı	Nükleotid Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Amino asit Pozisyonu	Amino asit Değişimi	Heterozigot/ Homozigot	SNP
H58	920	G->A	247	R->H	Heterozigot	
H39	912	G->A	257	A->T	Heterozigot	rs12720062
H29	912	G->A	257	A->T	Heterozigot	rs12720062
H26	973	G->A	265	V->L	Heterozigot	
K19	971	G->A	264	R->K	Heterozigot	



**Şekil 24.** *INHA* Geni ekzon 2 dizi analiz sonucu.H39 912G>A p.A257T (rs 12720062)



Şekil 25. *INHA* geni ekzon dizi analizi sonucu. H29 912G>A p.A257T (rs12720062)

k17 GGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k19 CTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k18 TCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG

H11 GGTGAGGGCAA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H39 GC6GCTAGGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k41 TGGTTGTGGCTATAGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H24 GGTGGTTGTGGCTATAGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k45 GGTGGTTGTGGCTATAGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
K58 GGTGGTTGTGGCTATAGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H2 GGTGGTTGTGGCTATAGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H47 TGGTTGTGGCTA-AGACTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
K56 GGTGGTTGTGGCTA-AGACTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H29 CAGGTGGTTGTGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H26 GCTGATGTCCT-AGACTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k40 CGGCTGAGGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H51 GGTGAGGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k42 GGTGGTTGTGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H36 AGGTGGTTGTGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k51 TGGTTGAGGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k47 CGGTTGAGGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H40 TGGTTGAGGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H16 GGTGGTTGAGGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k44 AGGCGTTGTGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k38 CGTTGTGGCTATAGTGTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
H15 TTGCGTTGTGGCTATAGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
k36 TTGTTGAGGGCTA-AGACTTGGTCTCC-ATCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG  
K57 GGTGAGGGCTA-AGCCTTGGTCTCC-CTCTGCTCTG-CGCCTGCTGCAGAGGCCCTCCGGAGGAAACC6GCTGCCATGCCAAGTCCACAGAGTACACTGAACTATCTCTCCAGGAGCTGG

Şekil 26. *INHA* geni dizi analizi sonuçları.

#### 4.4. *FOXO3* Geni

*FOXO3* geni için ekzon 1'in PCR ürünlerinin dizi analizi sonucunda üç farklı mutasyon bulunmuştur. Bunlardan ikisi yeni missense mutasyondur. Yeni mutasyonlardan biri hasta grubunda yaklaşık %1,7 345C>G heterozigot missense mutasyon olup 14. sıradaki glutamik asit (Glu), prolin (pro) amino asitine değişmiştir.

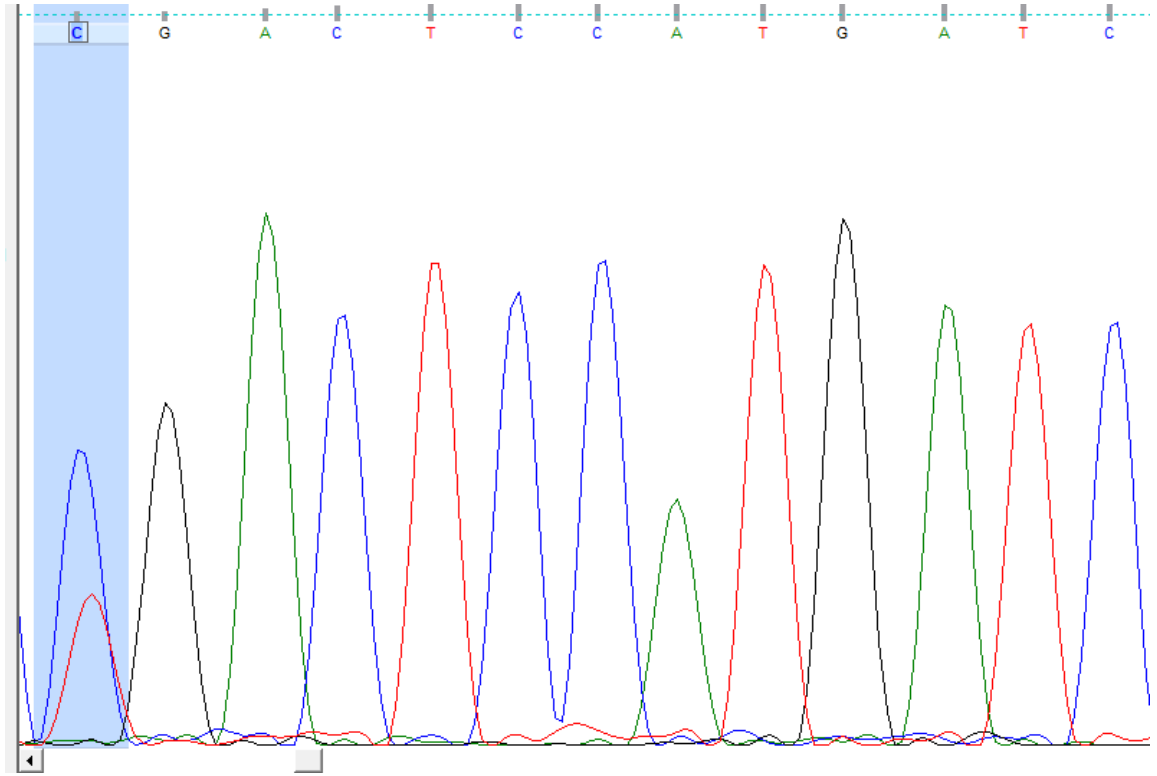
İkincisi kontrol grubundan bir örnekte %1,7 343C>T heterozigot missense mutasyon olup 14. sıradaki lösin (Leu) fenilalanine (Phe) değişmiştir. En sık gözlenen üçüncü varyasyon ise 463C>T (rs11757217) sessiz varyasyondur ve sinonim bir aminoasit değişimine (A>A) neden olmuştur. Sessiz varyasyon hasta grubunun %18,3'ünde kontrol grubunun ise %10'unda gözlenmiştir (Tablo 12, Şekil 27 ve Şekil 28, 29). *FOXO3* geni ekzon 1'de gözlenen missense varyasyon ve yeni mutasyonların fonksiyonel olduğu ancak istatistiksel olarak POY ile ilişkisinin olmadığı saptanmıştır (p>0.05).

**Tablo 12.** *FOXO3* geni ekzon 1 dizi analizi sonuçları.

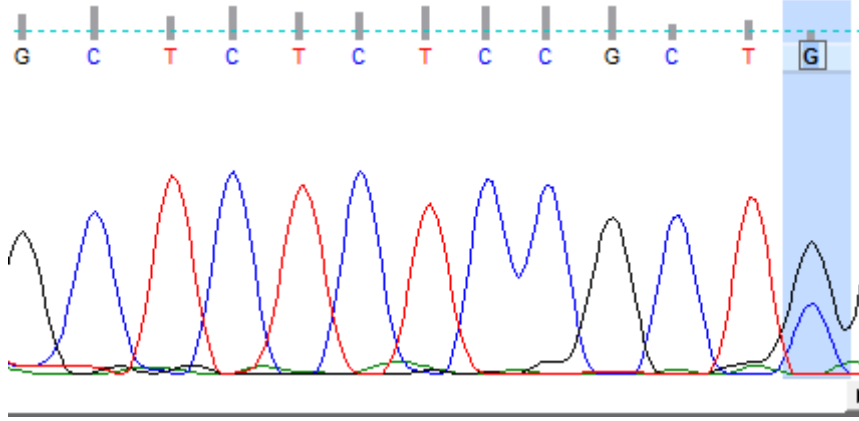
Örnek adı	Nükleotid mRNA	Nükleotid değişimi	Amino asit Pozisyonu	Amino asit değişimi	Heterozigot/H omozigot	SNP
H12	345	C/G	14	Glu/Pro	Heterozigot	
K6	343	C/T	14	Leu/Phe	Heterozigot	
K3	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217
H44	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Homozigot	rs11757217
K36	463	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217
H53	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217
H5	463	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217
K28	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217
K9	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Homozigot	rs11757217
H20	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Homozigot	rs11757217
H28	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Homozigot	rs11757217
H59	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Homozigot	rs11757217
H51	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217

H29	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217
H36	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Homozigot	rs11757217
H42	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Homozigot	rs11757217
K21	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217
K56	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217
H56	463 c.159C>T	C/T	53	A/A	Heterozigot	rs11757217

(Tablo 12'nin devamı)



Şekil 27. FOXO3 geni dizi analizine ait nükleotid pikleri. K21 c.159C>T p.A53A (rs 11757217)



Şekil 28. FOXO3 geni analizine ait nükleotid pikleri. H12 345C>G p.Glu14Pro

H42 CCCGGC-CC CGCT-CTCTC CGCTCGAAGT GGAGCTGGAC CCGGAGTTCG AGCCCCAGAG  
H12 CCCGGC-CC CGCT-CTCTC CGCTGGAAGT GGAGCTGGAC CCGGAGTTCG AGCCCCAGAG  
K21 CGCCGGC-CC CGCT-CTCTC CGCTCGAAGT GGAGCTGGAC CCGGAGTTCG AGCCCCAGAG  
K6 AGCCCTCGGG GGAGACGGCC GCCGACTCCA TGATCCCCGA GGAGGAGGAC GATGAAGACG  
K46 AGCCCTCGGG GGAGACGGCC GCCGACTCCA TGATCCCCGA GGTGGAGGAC GATGAAGACG  
H47 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
H50 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
H28 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
H59 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
H51 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
H29 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
H36 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
H42 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
H12 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
K57 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
H53 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
K21 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
K45 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
K56 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
K14 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
H8 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
K6 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
K46 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
H54 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
H56 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC

Şekil 29. FOXO3 geni dizi analizi sonuçları.

H20 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
H5 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
K9 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGTGGCTGGG GGCTCCGGGC  
K15 TGCTGCAGCC TCAGCAACCG CTGCCACCGC CGCAGCCGGG GGC GGCTGGG GGCTCCGGGC  
K21 AGCCCTCGGG GGAGACGGCC GCCGACTCCA TGATCCCCGA GGAGGAGGAC GATGAAGACG  
K57 AGCCCTCGGG GGAGACGGCC GCCGACTCCA TGATCCCCGA GGAGGAGGAC GATGAAGACG  
H53 AGCCCTCGGG GGAGACGGCC GCTGACTCCA TGATCCCCGA GGAGGAGGAC GATGAAGACG  
K14 AGCCCTCGGG GGAGACGGCC GCCGACTCCA TGATCCCCGA GGAGGAGGAC GATGAAGACG  
H8 CCGGC-CC CGCT-CTCTC CGCTCGAAGT GGAGCTGGAC T-GGAGTTCG AGCCCCAGAG  
K6 GGGGC-CC CGCTGCTCTC CGTTCGAAGT GGAGCTGGAC CCGGAGTTCG AGCCCCAGAG

(Şekil 29'un devamı)

## 5. TARTIŞMA

Prematüre ovaryen yetmezliği genel olarak toplumda %1 sıklıkta gözlenen bir düzensizliktir ve günümüzde ilerleyen hamilelik yaşına bağlı olarak daha da yaygınlaşmaktadır. Hormonal kontraseptiklerin kullanılması POY'u sıklıkla gizler ve bu durum kontraseptiklerin kullanımını bırakıp çocuk sahibi oluncaya kadar devam eder. İdiyopatik POY'un önlenmesi için etkenlerin tam olarak belirlenememesi, etyolojisinin çok derinlerde yatması, POY'un teşhisini sıklıkla geciktirmektedir. Toplumda sık gözlenen gen varyantları, %1'den fazla ise polimorfizm olarak tanımlanır. Ancak aa. değişikliğine neden olan nadir polimorfizmler düşük sıklıktadır. Bunun yanı sıra, aa. değişimi yapmayan nadir polimorfizmler sessiz mutasyonlar olup bunlar mRNA'da splicing değişimi yapmadıkça zararsızdır (Watkins ve ark., 2006).

*INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* genlerinin POY gelişimindeki rolleri dikkate alındığında, bu genlerin POY çalışmaları için potansiyel aday genlerden olduğu ileri sürülmektedir. *INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* genlerinin mutasyonları ile POY arasındaki ilişkiyi incelemek için farklı populasyon ve etnik gruplarda çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda birçok benzerlik ve farklıklar bulunmuştur (Suzumori ve ark., 2007; Adhikari ve Liu, 2009; Shelling, 2010; Pouresmaeili ve Fazeli, 2014).

Çalışmamızda *INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* genlerinin birer ekzonunda mutasyon taraması yapmak amacıyla 60 POY'lu ve 60 sağlıklı fertil kadın kontrol olmak üzere toplam 120 kişi incelenmiştir. Hasta grubunda 40 yaş altı ve premature ovaryen yetmezlik tanısı almış 60 vakada, kontrol grubunda ise 40 yaş üstü normal mens döngüsüne devam eden ve normal menopoza girmiş bireyler araştırmaya dahil edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 33,5 (en düşük yaş 23, en yüksek 39), kontrollerin yaş ortalaması ise 52,3'tür (en düşük 42, en yüksek 71). Araştırmaya katılan tüm bireylerin yaş ortalaması 43,7'dir. İncelenen örnek sayısı, yaş, yüksek FSH (FSH>40mU/mL.) ve düşük östrojen (E<10mU/mL.) gibi demografik özellikler diğer çalışmalar ile uygunluk göstermektedir (Fassnacht ve ark., 2006, Zhang ve ark., 2006; Persani ve ark., 2009; Tiotiu ve ark., 2010; Usman ve ark., 2012; Rabet ve ark., 2012; Ferrarini ve ark., 2013).



### 5.1. *BMP15* Geni

POY büyük ölçüde heterojen bir hastalıktır ve etyolojisinin açıklanması oldukça zordur. *BMP15*'in önemi fertilizasyonu düzenlenmesidir (Golloway ve ark., 2000). Son yıllarda *BMP15*'in memeli dişi üremesinde anahtar role sahip olduğu belirtilmiştir (Shimsaki ve ark., 2004; Knight ve Glister, 2006). Overler içindeki oositlerden sentezlenen *BMP15*, foliküllerin gelişmesi ve büyümesinde rol alır (Otsuka ve ark., 2000). Yapılan çalışmaların sonuçları *BMP15* genindeki mutasyonların sendromik olmayan POY ile ilişkili olduğunu göstermektedir ( Di Pasquale ve ark., 2004; 2006; Laissue ve ark., 2006; Dixit ve ark., 2006; Veitia ve ark., 2009). Benzer şekilde bizim çalışma grubumuzda da *BMP15* mutasyonları sendromik ve kromozomal olmayan POY'lu hastalarda gözlenmiştir.

*BMP15*'de gözlenen varyantlarının genel populasyondaki oranı %1.5-%12'dir. (Dipasquale ve ark., 2004; Dixit ve ark., 2006; Laissue ve ark., 2006; Rossetti ve ark., 2009; Wang ve ark., 2010). Sağlıklı kontrol grubumuzda *BMP15* varyant oranı %1,7 olup genel populasyondaki oran aralığındadır. Bununla birlikte Persani ve arkadaşları farklı etnik gruplar arasında yapmış oldukları bir çalışmada *BMP15* varyantlarının oranının 0-%12 arasında değişmekte olduğunu gözlemişlerdir. *BMP15* geni üzerinde farklı populasyon (Asya, Çin, Hint, Kuzey Afrika ve USA) ve etnik gruplarda yapılan çalışmalarda sağlıklı kontrol ve POY vakalarında gözlenen varyantların frekanslarında farklılıklar gözlenmiştir (Dipasquale ve ark., 2004; Dixit ve ark., 2006; Laissue ve ark., 2006; Rossetti ve ark., 2009; Persani ve ark., 2010). Di pasquale ve arkadaşları, ovaryen disgenezli primer amenoreye sahip yüksek gonadotropik ovaryen yetmezlik ile karakterize iki kız kardeşte *BMP15* geninin ilk mutasyonunu (p.Y235C) rapor etmiştir.

Çalışmamızda POY vakalarında *BMP15*'te gözlenen varyantların sıklığı (%6,7) kontrol grubuna (%1,7) göre yaklaşık 4 kat daha fazladır. Dixit ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir başka çalışmada 133 POY vakasının 13 tanesinde (%9,77) ve 197 kontrol vakasının 10 tanesinde (%5,07) bu varyasyonu belirlemişlerdir (Dixit ve ark., 2006). *BMP15* varyantları bakımından POY vakasının kontrol vakasına göre 1,9 kat fazla belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise bu oran 3 kat fazladır.

Kuzey Afrika, Kafkas ve Hint populasyonlarında POY'un fenotipi *BMP15* geniyle ilişkilendirilmiştir. Buna karşın *BMP15* mutasyonları POY'lu 15 Japon, 38 Yeni Zellandalı, 92 Çinli POY vakalarında belirlenememiştir (Persani ve ark., 2009). Son

zamanlarda Kafkas ırkında yapılan bir çalışmada POY vakalarında *FMRI* premütasyon taşıyıcılarından sonra *BMP15* heterozigot varyasyonlar 2. sıklıkta yer almaktadır. Bu bulgular *BMP15* varyasyonlarının POY'un kompleks patogeneğinde rol aldığını göstermektedir (Rossetti ve ark., 2004). Buna bağlı olarak *BMP15* varyantlarının POY'un genetik orjininin desteklenmesinde ve premature ovaryen yaşlanmasına yatkınlığın artmasında en yüksek frekansa sahip olduğu öne sürülmektedir (Persani ve ark., 2010).

*BMP15* ve *GDF9* genlerindeki missense mutasyonlar, proteinlerin eksikliği, kısmi fonksiyon kaybı veya tamamen kaybı, biyoaktivite kaybı, defektif sekresyon ve protein kararlılığında bozulma gibi etkilere yol açar (Di pasquale ark., 2004). Missense mutasyonlar abnormal dimerik ürünler ve tamamlanmamış monomerlerin sekresyonuyla sonuçlanır ve reseptöre bağlanmaya engel olarak normal protein fonksiyonların antogonize ederek bu etkiyi gösterir (Otsuka ve ark., 2011). *BMP15* geninin sekans analizinde ekzon 1'deki G308A'nın (rs41308602) heterozigot missense en yaygın allel olduğu ve 103. aa. pozisyonunda Asparajin (N) Serin (S) aa.'ine değişimine neden olduğu saptanmıştır (Laissue ve ark., 2006). Çalışmamızda sağlıklı kontrollerden farklı olarak bir hastada % 1,7 308A>G homozigot missense mutasyon (%1,7) gözlenmiştir. Ayrıca *BMP15* geni ekzon 1'de şimdiye kadar gözlenen mutasyonlardan farklı olarak bir hastada % 1,7 homozigot insersiyon G missense mutasyonu sonucunda *BMP15*'in propeptid kısmında 25. aa. pozisyonunda metiyonin (M) aspartik aside (D); diğer bir hastada 28C>G heterozigot mutasyon sonucunda *BMP15*'in sinyal peptid kısmında 10. aa. pozisyonunda Lösinin (L) Valine (V) değişimi, ikinci mutasyon ise 62A>G heterozigot değişimi sonucunda *BMP15*'in propeptid kısmında 21.aa pozisyonunda histidin (H) arjinine (R) değişimi olmak üzere iki farklı mutasyon saptanmıştır. Kontrol grubunda 46T>C heterozigot mutasyon sonucunda *BMP15*'in sinyal peptid kısmında 16. aa. pozisyonunda valin (V) alanine (A) dönüşmüştür. Toplumda POY'lu ve 46,XX karyotipine sahip olanların %4.2'sinde *BMP15* geninde missense varyantlar gözlenmiştir (Ferrarini ve ark., 2013). Laissue ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *BMP15* geni ekzon 1'de G308A heterozigot transisyonu, hastaların %99'nda ve kontrollerin de %99'da aynı varyasyonu belirlemişlerdir. Dixit ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada POY ile ilişkilendirilen c.-9C>G, c.308A>G ve 852 C>T olmak üzere 3 farklı varyasyon bulmuşlardır. Fakat Peng ve arkadaşlarının, Çinli POY vakalarında

yaptığı çalışmada bu varyasyonlar tespit edilmemiştir (Peng ve ark., 2007). Tiotiu ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada 50 POY'lu hastanın 7'sinde (%14) ve 214 kontrol vakasının 25'inde (%11,7) 308A>G varyasyonu belirlemiş olup bu varyasyon POY vakalarında kontrollere göre %1,19 kat fazladır (Tiotiu ve ark., 2010). POY vakalarında elde ettiğimiz 308A>G varyasyonunun kontrollere göre %1,67 kat daha fazla olması Tiotiu ve arkadaşlarının bulgularına benzerlik göstermektedir. Usman ve arkadaşları (2013) yaptığı bir başka çalışmada 42 POY hastasında *BMP15* geninin kodlanan bölgesinde farklı dizi varyasyonları bulmuş olup bu varyasyonlar arasında en sık görüleni %4,7 308A>G'dir ve bizim bulduğumuzdan yaklaşık 2,8 kat fazladır. Bu değişim etnik grup ve çalışılan örnek sayılarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Laisue ve arkadaşları yaptığı çalışmada hasta ve kontrollerde aynı oranda 308A>G mutasyonu saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi yapılan birçok çalışmada ekzon 1'deki sekans analizlerinde rs41308602 SNP (308A>G) ile birlikte farklı yeni mutasyonlar tespit etmişlerdir (Di Pasquale ve ark., 2004; Moron ve ark., 2007; Zhangve ark., 2007; Ledigve ark., 2008; Laisue ve ark., 2008; Demars ve ark., 2013; Persani ve ark., 2014). Rana Al-ajoury ve arkadaşlarının (2014) 65 Suriye kökenli POY hastası ve 100 sağlıklı kontrolde yaptıkları çalışmada *BMP15* ekzon 1'de 308A>G missense mutasyonu belirlemişlerdir. Çalışılan hasta grubu sayısı ve bulunan mutasyon oranı bizim çalışmamızın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Aşırı ovaryen stimülasyon sendromlu hastalarda yapılan bir çalışmada *BMP15* geninin ekzon1 ve çevresinde 4 tane yaygın rs41308602, rs3810682, rs3897937, rs1268730 SNP'ler belirlenmiştir. Bunlardan bizim de bulduğumuz rs41308602 N103S varyantı heterozigot olarak %27,3 oranında olup bu varyantın istatistiksel olarak elde edilen sonuçlar doğrultusunda aşırı ovaryen stimülasyon ile ilişkisi olduğu öne sürülmüştür (Moron ve ark., 2006).

Zhao ve arkadaşlarının (2008) spontan dizigotik ikizleri olan 933 kadın ve 1512 sağlıklı kontrol grubu üzerinde yaptıkları çalışmada, *BMP15* geni varyant analizinde *BMP15* geni ekzon 1'de protein dizisinde değişikliğe neden olan varyasyonlar c.181 C>T p.Arg61Trp, c.182G>A p.Arg61Glu, c.202C>T,p.Arg68Trp, c.226 C>T p.Arg76Cys, c.227G>A p.Arg76His bizim çalışmamızda da gözlenen varyantlardan farklıdır. Bulgularımızın farklı oluşunun birinci nedeni POY'lu vakalar üzerinde çalışmış olmamız ikincisi ise bölgesel farklılık olabilir.

Tiotiu ve arkadaşları 50 POY ve 214 sağlıklı kontrolde yaptıkları çalışmada hastaların 7'sinde ve kontrollerin 25'inde N103S varyasyonu ile birlikte birçok yeni mutasyon bulmuşlardır (Tiotiu ve ark., 2010). Dixit (2006) ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada ekzon 1 'de c.181C>T, c.182G>A, c.226C>T, c.227G>A, ve c.308A>G 5 yeni varyantı 5 hastada saptamışlar kontrollerde ise saptanmamıştır. Di pasquale ve arkadaşları (2006) yapmış oldukları bir başka çalışmada 7 hastanın birinde c.202C>T, 5 hastada c.538G>A, bir hastada c.704A>G *BMP15* yeni varyantlarını bulmuşlardır. Tiotiu ve arkadaşları (2010) yaptığı bir çalışmada 2 hasta ve 2 kontrolde *BMP15* ekzon 1'de 308A>G ve bir hastada 242A>G ve 595G>A varyasyonu saptamışlardır. Liu ve arkadaşları (2010) 216 POY ve 200 kontrolde yaptıkları çalışmada *BMP15* geni ekzon 1'de bir hastada A308G ve 4 hastada farklı yeni mutasyon (c.C34G, c.G109C, c.C169G, c.G288C) bulmuşlardır. Kontrol grubunda ise bu mutasyonların hiçbiri gözlenmemiştir.

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde hasta grubunda bulunan mutasyonlar kontrol grubunda gözlenmemiştir (İnsersiyon G, C28G, A62G, A308G). *BMP15* ekzon 1'de bulduğumuz missense varyasyon ve mutasyonların aa. değişikliğine neden olduğu ancak istatistiksel olarak POY ile ilişkili olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ). İnsan, koyun, sığır, domuz ve farelerde *BMP15* geni homoloji göstermektedir (Demars ve ark., 2013). Farelerde yapılan çalışmalarda biyolojik olarak *BMP15*'in eksikliği (Hashimoto ve ark. 2005) ve biyolojik olarak aktif olan *BMP15*'in aşırı ekspresyonunun ovaryen rezervin erken tükenmesine neden olduğu gözlenmiştir (McMahon ve ark., 2008). *BMP15* geni üzerinde çalıştığımız ekzon 1, *BMP15* proteinin sinyal ve propeptid kısmını kodlamaktadır. Kemirgen ve sığırlarda yapılan hücresel (cov434) çalışmalarda sinyal ve propeptid kısmındaki aa. substutisyonları *BMP15* proteinin wild-type ile karşılaştırıldığında proteinin aktivitesinin ve ekspresyonunun azalmasına yol açtığı öne sürülmüştür (Al-Musawi ve ark., 2013).

Over biyopsisinde foliküllerin yetersizliği ile birlikte streak over ve primer amenoreesi olan Batı Hintli bir hastada *BMP15*'in propeptid kısmındaki L148P varyantı belirlenmiştir (Laissue ve ark., 2006; Tiotiu ve ark., 2010). Benzer şekilde hasta grubumuzda *BMP15* geni ekzon 1'deki aa. değişimine neden olan mutasyonların kemirgen ve sığırlarda olduğu gibi *BMP15* proteinin aktivitesinin ve ekspresyonunun azalmasına yol açabilir ve POY'a neden olabilir.

## 5.2. İNHİBİN Geni

İnhibin, ovaryen fonksiyonların düzenlenmesinde rol alır. İnhibin geninin yanı sıra diğer genlerin POY'a olan etkileri, yaşam biçimi, bölgesel ve etnik köken gibi faktörlerde önemlidir (Corre ve ark., 2009). *INHA* mutasyonu POY'un erken başlangıcı ile ilişkilendirilmiştir (Shelling ve ark., 2000). İnsan inhibin alfa geni at, sığır, domuz, koyun, fare ve rat dizilerinde %80 homoloji gösterir (Yamanochive ark., 1995). Nadir görülen bir mutasyon olan Ala257Thr 3 farklı popülasyonda POY ile ilişkilendirilmiştir. POY'un etyolojisinde anahtar role sahip olan bu mutasyon 3'UTR 'deki varyantlar; mRNA stabilitesini ve gen ekspresyonu ve translasyonun verimliliğini etkileyerek POY'a neden olabileceği düşünülmektedir (Chen ve ark., 2006; Corre ve ark., 2009; Chand ve ark., 2010; Mark ve ark., 2014).

Bu türlerin *INHA* proteininin aminoasit dizileri karşılaştırıldığında 257. kodondaki alanin aa. at, domuz, sığır, koyun ve tavuklarda korunduğu fakat ratlarda serin içerdiği belirlenmiştir. Bu bilgiler bize 257. kodonda alanin aa.'in protein fonksiyonunda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Ovaryen fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan hormonlar veya reseptörleri kodlayan genlerdeki SNP varyasyonları POY yada premature ovaryen yaşlanmasından sorumlu olabilir (Hoogendoorn ve ark., 2003). *INHA* kodon 257 (rs12720062) polimorfizminde, AA alleli tüm popülasyonda nadir olarak bulunmaktadır. 257. kodondaki varyant aa.'in fonksiyonel önemi henüz tam olarak bilinmemekle beraber bazı varsayımlar bulunmaktadır. Birçok çalışmada 769G>A varyantı ve Ala257Thr nonkonservatif aminoasit değişimi foliküler gelişimde önemli olduğu vurgulanmıştır (Marozzi ve ark., 2002). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda polimorfizm etkilerinin fertilitite oranlarına olan etkisi üzerine odaklanılmıştır (Silva ve ark., 2014). Alaninin treonine dönüşümü, olgun peptidin resöptöre bağlanma bölgesinde değişim meydana getirir. Bu missense Ala257Thr değişimi reseptör sinyal transdüksiyon yolağında aktivasyonda yetersizlikle sonuçlanır ve inhibinin bağlanmasında bozulmalara neden olur. Diğer bir ifade ile inhibinin resöptöre bağlanmasını engelleyerek negatif feedback ile FSH seviyesinde ve sinyal yollarındaki değişim ile sonuçlanmaktadır (Richardson ve ark., 1987; Welt ve ark., 2009). Bu missense varyasyonun fonksiyonel etkisi için bir başka alternatif hipotez ise glikolizasyon değişimi yada motor proteinin bölünmesi ve dimer oluşumunun önlenmesi olarak belirtilmiştir. *INHA* genindeki gen mutasyonları biyoaktif inhibin

seviyesinin azalmasına ve sürekli olarak FSH seviyesinin artmasına ve foliküllerin hızlı tükenmesine neden olur (Shelling ve ark., 2000; Dixit ve ark., 2004; Jeong ve ark., 2004; Chand ve ark., 2010).

POY'a neden olan *INHA* varyantlarının sıklığı tam olarak belirlenmiş değildir. (Shelling ve ark., 2000; Marozzi ve ark., 2002; Dixit ve ark., 2006; Corre ve ark., 2009; Persani ve ark., 2010). Populasyon çalışmalarında etnik kökene bağlı *INHA* varyasyon oranı %0-11 arasında değişmektedir. Çalışmamızda hasta grubunda mutasyon oranı yaklaşık %6,7 iken kontrol grubunda mutasyon oranı yaklaşık %1,7 olarak hesaplanmıştır. Hasta grubumuzda mutasyon oranı kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat fazladır. Hasta grubunda mutasyon oranı (%6,7) genel populasyonda etnik kökene bağlı mutasyon oranı (%0-11) aralığındadır. Yapılan bir çalışmada *INHA* varyantlarının sıklığı İtalyan populasyonunda %4-5'tir, oysaki Alman, Kore (Jeong ve ark., 2004) ve Arjantin populasyonlarında bu varyasyon ile POY arasında bir ilişki tespit edilememiştir (Sundblad ve ark., 2006). Bizim sonuçlarımız (%6,7) ile Jeong ve arkadaşlarının (2004) sonuçlarından (%4-5) biraz yüksektir. Bunun nedeni incelenen örnek sayısı ve bölgesel farklılığa bağlı olabilir. Bölgesel ve etnik olarak farklı populasyonlarda inhibin alfa gen polimorfizmlerinin POY riskini önemli derecede etkilediği gösterilmiştir. Shelling (2000), Marozzi (2002) ve Dixit (2004) yapmış oldukları çalışmalarda G769A varyantı 9/80 hintli POY vakasında, 7/157 İtalyan POY vakasında belirlenirken 0/84 Koreli POY vakasında ve 0/43 Yeni Zellanda'lı POY vakasında saptanmamıştır (Shelling ve ark., 2000; Hanevik ve ark., 2011; Pouresmaeili ve Fazeli, 2013). *INHA* genindeki A257T varyasyonu ilk olarak Yeni Zellanda'da rapor edilmiştir. Bu çalışmada 43 POY hastasının sadece üçünde A257T varyasyonu tespit edilmiştir (Shelling ve ark., 2000). 150 kişilik kontrol grubunda sadece bir kişi de aynı varyasyon A257T rapor edilmiştir (Anasti ve ark., 1998; Marozzi ve ark., 2002). Fallahian ve arkadaşlarının (2009) İranlı 24 POY hastası ve 24 kontrolde yaptığı bir çalışmada, G769A nükleotid değişiminin 4 hastada gözlenmiş olup kontrol grubunda ise gözlenmemiştir.

Çalışmamızda hasta grubunda A257T varyasyonu 2 hastada (%3,34) saptanmış ancak kontrol grubunda ise bu varyasyon bulunmamıştır. Hasta grubunda belirlenen bu oran Shelling ve Marozzi'nin belirlemiş oldukları varyasyon oranı (0-%4-5) aralığında yer almaktadır (Shelling ve ark., 2000; Marozzi ve ark., 2002). *INHA* gen

polimorfizmlerinin belirli etnik populasyonlarda (Hindistan, İtalya, Almanya, İran) yapılan çalışmalarda farklılık gösterdiği bulunmuştur (Pouresmaeili ve Fazeli, 2013). Çalışmamızda hasta grubundaki *INHA* genindeki mutasyon oranımız kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat fazla olup daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Pouresmaeili ve Fazeli, 2013; Mark ve ark., 2014).

Shelling ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 43 POY'lu hastanın yaklaşık %7'sinde 769G>A varyantı bulunmuştur (Shelling ve ark., 2000). Corre ve arkadaşları birbirinden bağımsız olan İtalyan ve Alman POY'lu 611 hasta ve 1084 kontrolde iki promotor bölge ve bir kodlanan bölgeyi (769G>A) incelemişler ve promotor bölgenin allelik frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı, kodlanan bölgedeki 769G>A varyantının kontrol grubunda daha sık olduğunu gözlemişlerdir (Corre ve ark., 2009). Bu çalışmada önceki çalışmalardan çok daha fazla örnek incelenmiştir ve kodlayan bölgedeki 769G>A varyantının ovaryen fonksiyonun kaybına karşın koruyucu etkisi olduğu öne sürülmüştür. Çalıştığımız örnek sayısı Corre ve arkadaşlarının çalıştığı örnek sayısından çok daha az ve hasta grubunda kontrollere göre 769G>A varyasyonun yüzde dağılımlarının fazla olmasına rağmen POY ile varyasyon arasında benzer şekilde istatistiksel olarak bir ilişki bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). POY etyolojisi ile ilgili yapılan bir çalışmada POY ve *INHA* geni arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Fakat inhibinin ekspresyonunun azalması ve *INHA* geni polimorfizmleri arasındaki ilişki kesin olarak belirlenememiştir (Cordts ve ark., 2011).

Çalışmamızda hasta grubunda iki kontrol grubunda ise birbirinden farklı üç yeni mutasyon bulunmuştur; hasta grubundan birinde 920G>A heterozigot missense mutasyonu (%1,67) ile 247 aa. pozisyonunda R(arjinin) aminoasiti H (histidin) aminoasitine değişimi, diğerinde ise 973G>A heterozigot mutasyon (%1,67) ile 265 aa. pozisyonunda V (valin) aa. L (lösin) aa. değişimi meydana gelmiştir. Kontrol grubunda ise bir kişide 971G>A heterozigot missense mutasyon (%1,67) ile 264 aa. pozisyonunda R (arjinin) > K (lizin) aa. değişimine neden olduğu belirlenmiştir. Bu değişimler yeni mutasyon olarak değerlendirilmiştir.

Shelling (2000), Marozzi (2002) ve Dixit (2005, 2006) primer ve sekonder amenoreli hastalarda yapmış oldukları çalışmalarda 769G>A mutasyonunu saptamışlardır. Yapılan bir diğer çalışmada 129C>T *INHA* gen SNP'leri POY ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Marozzi ve ark., 2002). Aynı zamanda Dixit ve arkadaşları (2004)

yapmış oldukları çalışmada sekonder amenoreli hastalarda bizim bulgularımızdan farklı olarak 275G>A, 525C>A, primer amenoreli vakalarda ise 545C>A mutasyonlarını bulmuşlardır (Laissue ve ark., 2008). Rah ve arkadaşlarının (2014) yaptığı diğer bir çalışmada Koreli POY'lu kadınlarda *INHA* geninde 16C>T ve 124A>G varyasyonlarını bulmuşlar ve POY için risk oluşturabileceğini öne sürmüşlerdir.

Çalışmamızda *INHA* geninde hasta grubunda R247H ve V265L, kontrol grubunda ise R264K yeni mutasyonların fonksiyonel olduğu ancak istatistiksel olarak incelendiğinde POY ile aralarında bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). POY ve inhibin alfa subunitindeki genetik varyasyonları arasındaki ilişkilerin anlaşılması için daha geniş populasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

### 5.3. *FOXO3* GENİ

*FOXO3* proteini, overler tarafından sentezlenir ve overlerin gelişmesi ve fonksiyonunda görev yapar. *FOXO3* proteininde aminoasit yer değişimleri proteinin konformasyonunda değişimler meydana getirebilir ve bu değişimler fonksiyonel bozulmalara neden olabilir (Timmer ve Reindollar, 2003). *FOXO3* mutasyonu bakımından heterozigot tek forkhead transkripsiyon faktör allelinin mutasyonu, fonksiyon kaybına bunun sonucunda bir çok kalıtsal hastalıklara neden olabilir (Watkins ve ark., 2006). *FOXO3* geninde polimorfizmler yada mutasyonların varlığı menarşdan önce primordial folikülün tükenmesi sonucu POY oluşumuna etki edebilir (Timmer ve Reindollar, 2003). Dişi transgenik farelerde sürekli aktif olan *FOXO3* foliküler ve oosit gelişimine hasar vererek anovulasyona neden olduğu öne sürülmektedir (Liu ve ark., 2007).

Bizim çalışmamızda *FOXO3* geni ekzon 1'in dizi analizinde en sık gözlenen varyasyon 463C>T, c.159C>T (rs11757217) sessiz varyasyonu olup hasta grubunda %18,3 kontrol grubunda ise %10 sıklıkta gözlenmiştir. Bunun yanı sıra hasta grubunda %1,7 345C>G heterozigot Glu14Pro missense ve kontrol grubunda %1,7 343C>T heterozigot Leu14Phe missense mutasyon olmak üzere iki yeni mutasyon saptanmıştır. Yeni missense mutasyonların fonksiyonel olduğu ancak istatistiksel olarak POY ile ilişkisinin olmadığı gözlenmiştir ( $p>0.05$ ). Gallardo ve arkadaşları POY'lu 93 İtalyan, 164 Kuzey Amerikalı, 25 Fransız, 10 Alman, 10 Güney Koreli ile birlikte 22 Kuzey Amerikalı normal kontrol üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada *FOXO3* gen ekzon 1



bölgesinde çalışmamızda gözlediğimiz aynı mutasyonu c.159C>T (rs 11757217) tespit etmişler ancak buldukları diğer üç yeni, c.280C>T p.L94P, c.281T>C sessiz mutasyon ve c.419C>T p.A140V missense mutasyonu bizim bulduğumuz yeni mutasyonlardan farklıdır (Gallardo ve ark., 2008).

Watkins ve arkadaşlarının 120 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada 19 hastada *FOXO3* geni ekzon1'de bizim bulduğumuz aynı c.159C>T p.A53A sessiz mutasyonun yanı sıra, 5 hastada yeni c.419C>T A140V missense mutasyonu bulmuşlardır (Watkins ve ark., 2006). Çinli 114 POY vakası üzerinde yapılan bir çalışmada *FOXO3* geninde mutasyon çalışması yapılmış ve 5 tane yeni missense mutasyon c.71C>A (p.Pro24His), c.140C>T (p.Pro47Leu), c.184G>A (p.Asp62Asn), c.1652C>T (p.Ser551Phe), c.1697C>G (p.Gly566Ala) bulunmuş ve 100 kontrol grubunda bu mutasyonların hiç biri bulunmamıştır. Bu missense mutasyonlar genin korunmuş bölgesinde yer almaktadır. Bu nedenle bu mutasyonların primordial folikül aktivasyonuna ve abnormal oosit apoptozisine neden olabileceği ve overlerde erken folikül tükenmesine yol açabileceği öne sürülmüştür (Wang ve ark., 2010). *FOXO3* geni, knock-out farelerde POY fenotipleri oluşturulmuş ve ovaryen foliküllerin erken tükenmesine neden olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2010). Farelerde transkripsiyon faktör *FOXO3* primordial folikül aktivasyonu için potansiyel baskılayıcısı ve önemli bir düzenleyicisidir (Gallardo ve ark., 2008).

*FOXO3* genindeki belirlenen değişimlerinin POY'un etyolojisinde ortak bir mekanizma olmadığı, başka diğer varyasyonlar ile etkileşimlerinin olabileceği, genetik mekanizmalarda çok farklı yolların varlığı ve bu yollarda farklı genlerin rol alabileceği de düşünülmektedir (Andrew ark., 2005; Watkins ve ark., 2006; Vinci ve ark., 2008).

Çalışmamızda *FOXO3* geni ekzon1'de bulduğumuz amino asit değişimlerine neden olan yeni mutasyonların, potansiyel olarak zararlı olabileceği düşüncesindeyiz. Bunun yanı sıra *BMP15*, *INHA* ve *FOXO3* genleri ile ilgili populasyon çalışmaları genişletildiğinde daha kesin sonuçlar elde edilebileceği kanaatindeyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tamamı Orta Karadeniz Bölgesinden alınan, POY'lu hasta ve sağlıklı kontroller ile yapılan bu çalışmada, POY'a neden olan genetik faktörlerden olduğu düşünülen *INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* genlerine ait birer ekzon bölgesine dizi analizi yapılmıştır.

*INHA* geni ekzon 1'de gözlenen varyantların dağılımları hasta grubunda %6,7 ve kontrol grubunda %1,7'dir. Hasta grubundan 2 hastada p.A257T (rs12720062) heterozigot missense, bir hastada p.R247H heterozigot missense, bir hastada ise p.V265L heterozigot missense mutasyonun yanı sıra kontrol grubundan bir kişide ise p.R264K heterozigot missense mutasyonu gözlenmiştir.

*BMP15* geni ekzon 1'de gözlenen varyantların hasta grubunda %6,7 ve kontrol grubuna %1,7'dir. Hasta grubunda üç kişide dört ayrı missense mutasyon gözlenmiştir. Bunlar hasta grubunda 308A>G p.N103S bir homozigot missense, bir kişide 28C>G p.L10V ve 69A>G p.H21R iki ayrı heterozigot missense ve p.M25D değişimine neden olan bir insersiyon G mutasyonları gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise hasta grubunda gözlenen mutasyonların olmadığı sadece bir kişide p.V16A değişimine neden 46T>C heterozigot missense mutasyon gözlenmiştir.

*FOXO3* geni ekzon 1 için hasta grubunda %1,7 345C>G ve kontrol grubunda, 343C>T heterozigot iki yeni missense mutasyonun yanı sıra hasta grubunda %18.3 kontrol grubunda ise %10 sıklıkta c.159C>T (rs11757217) sessiz varyasyon saptanmıştır.

*INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* genlerinde saptanan missense varyasyon ve mutasyonların fonksiyonel olduğu ancak istatistiksel olarak POY ile ilişkisinin olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ).

*INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* gen mutasyonlarının POY'a olan etkilerinin belirlenmesi için farklı popülasyonlarda genişletilmiş çalışmalara ihtiyaç vardır. Gelecek çalışmalarda POY'un genetik temelini açıklanması için hastaların bir çoğunun takibi, ovaryen folikülün oluşumu ve gelişimini içeren moleküler mekanizmaların açıklanması için sistemli çalışılmalıdır.

*INHA*, *BMP15* ve *FOXO3* genlerindeki mutasyon analizleri POY'un etyolojisindeki rolünün ortaya konulmasında önemli olup POY'un erken teşhisi ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi için yol gösterici olacaktır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, gen polimorfizmleri kadar kopya sayısı

varyasyonlarının da POY'un etyolojisinde etkili olabileceği ve bu alanda yapılan çalışmaların genişletilmesiyle POY'un genetik mekanizması hakkında daha açıklayıcı sonuçlar elde edilebilecektir.

Ovaryen yetmezliğe neden olan mutasyonların erken dönemde bilinmesi üreme tedavileri için son derece önemlidir. Bunun yanı sıra POY gibi ovaryen hastalıkların etyolojisinde yeni bir paradigma belirlenmiştir. Çeşitli evresel toksin maddelerin fetal gonadal gelişim suresince epigenetik mekanizmalara etki yaparak ovaryen hastalıklara yatkınlığı artırmaktadır. POY da genetik etkenlerin yanı sıra epigenetik etkenlerin de rolü olduğu göz önüne alınarak epigenetik çalışmaların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev.* 2009.30(5).438-64
- Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen, Cooney AJ, et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet.* 2010; 19: 397- 410.
- Andrew AS, Nelson HH, Kelsey KT, Moore JH, Meng AC, Casella DP, Tosteson Tor D, Schned AR, Karagas MR. Concordance of Multiple Analytical Approaches Demonstrates a Complex Relationship Between DNA Repair Gene SNPs, Smoking, and Bladder Cancer Susceptibility. *Carcinogenesis Advance Access published.* *Carcinogenesis.* 2005-00754.
- Aittomaki K, Lucerna JLD, Pakarinen P. et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotrophic ovarian failure. *Cell* 1995; 82,959-968.
- Aittomaki K, Herva UH, Juntunen K, et al. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81,3722-3726.
- Aittomaki K. The genetics of XX gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet.* 1990;54,844-851.
- Al-Musawi SL, Walton KL, Heath D, Simpson CM, Harrison CA, Species differences in the expression and activity of bone morphogenetic protein 15. *Endocrinology* 154:2013.888-889.
- Anasti JN, Kimzey LM, et al. A controlled study for the treatment of karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 1994; 62,726-730.
- Anasti JN. et al. Bone loss in young women with karyotypically normal spontaneous POF. *Obstet Gynecol.* 1998; 91, 12–15.

Anwar A, Moussa MD. In vitro maturation of oocytes. OBGYN. Jan:2002.net Advertisement.

Arden KC. FOXO animal models reveal a variety of diverse roles for FOXO transcription factors. Oncogene. 2009, 27(16):2345-50.

Arıkan H. Çukurova bölgesindeki prematür menopoz hastalarında inhibin alfa gen mutasyonunun parça uzunluk polimorfizmi ile saptanması. Çukurova Üniversitesi. Adana. Yüksek Lisans Tezi.2005.14-17.

Atasü T, Menopoz Tedavisi ve Kanser. 1. Baskı. Nobel Tıp Kitapları, 2001: 1-33.

Ataya K, Rao LV, Lawrence E, Kimmel R. Luteinizing hormone releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. Biol Reprod. 1995;52:365-572.

Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, et al. In germ cells of mouse embryonic ovaries the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. Nat Genet. 2006; 38: 1430- 4.

Bates A, Howard PJ, Distal long arm deletions of the X chromosome and ovarian failure. J Med Genet. 1990;27,722-723.

Bertoli C, Copetti T, Lam EW, Demarchi F, Schneider C. Calpain small-1 modulates Akt/Foxo3a signaling and apoptosis through PP2A. Oncogene.2009.28(5):721-33.

Beşen M A, Oskay Ü Y. Yaşlı Kadınlarda Jinekolojik Sorunlar ve Bakım Yaklaşımları.Derleme. Mersin Üniv. Sağ Bilim Derg.2013.6(1).

Bırol F. Endometrial Hiperpazili Hastalarda İnhibin A ve B nin Önemi ve Prognozu Belirlemedeki Yeri, Sağlık Bakanlığı, İstanbul, Uzmanlık Tezi, 2006.18-22.

Boudewijn M, Burgering T. and René HM, Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty J Leukoc Biol. 2003;73:689-701.

- Brambilla DJ, Mckinlay SM. A prospective study of factors affecting age at menopause. *J Clin Epidemiol.* 1989;42,1031-1039.
- Bromberger JT, Matthews KA, Kuller LH, Wing RR, Neilahn EN, Plantinga P. Prospective study of the determinants of age at menopause. *J Epidemiol* 1997; 145:124-33.
- Brunet A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. 1999. *Cell* 96(6).
- Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, et al. The endocrinology of the menopausal transition: a cross-sectional study of a population-based sample. *J Clin Endocrinol Metab.*1995;80:3537-45.
- Calnan DR, et al. The FoxO code. *Oncogene.* 2008. 27(16).
- Cameron M, Grover S, Moore P, Jayasinghe Y. *Pediatr Adolesc Gynecol* (2008) 21:3-8.
- Carlson BM. *Human Embryology And Develop Biolgy.* Fourth Edition. 2009. Chapter 1.
- Carcamo J, et al. *Mol Cell Biol.* 1994;14:3810.
- Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM and Albertini DF, Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor 9 deficient mice. *Dev Biol.* 1998;204;373-384.
- Castrillon DH, Mailo L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor FOXO3A. *Science* 2003;301:215-8.
- Chand LA, Ponnampalam PA, Harris ES, Winship MI, Shelling NA. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2006. Vol.86, No 4.

- Chand LA, Harrison CA and Shelling NA. Inhibin and premature ovarian failure. Human Reprod Update. Vol.16, No.1.2010 pp. 39–50.
- Chen YT, Mattison DR, Feigenbaum L, Fukui H. and Schulman JD. Reduction in oocyte number following prenatal exposure to a diet high in galactose. Science. 1981; 214,1145-1147.
- Chen YW, Manson EJ. Premature ovarian failure in cancer survivors new insights, looming concern. Journal of the national cancer institute. 2006.Vol 98.No:13
- Chapman RM, Sutcliffe SB. Protection of ovarian function by oral contraceptive use in women receiving chemotherapy for Hodgkin's disease. Blood 1981;58,849-851.
- Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafri A, Hsueh AT, Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin like growth factor. Endocrinology 1994; 135: 1845-1853.
- Colin J, Gerard S, Balen H, Creighton M. Paediatric and adolescent Gynaecology. 2004 UK at the University Press. Cambridge.
- Colditz GA. et al. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. N. Engl. J Med.1987;316,1105–1110.
- Conway GS, Hettiarachchi S. Murray A. et al. Fragile X premutations in familial premature ovarian failure. Lancet. 1997;346,309-310.
- Conway S, Goswami D. Premature ovarian failure. Hum Reprod Update. 2005;11:391.
- Cooper AR. et.al. The time is now for a new approach to Premature Ovarian failure. Fertil and Steril. 2011.95.1890-1897.
- Cordts EB, Christofolini DM, Dos Santos AA, Bianco B, Barbosa CP. Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. Arch Gynecol Obstet. 2011; 283(3): 635-43.

- Corre T, Schuettler J, Bione S, Marozzi A, Persani L, Rossetti R, Torricelli F, Giotti I, Vogt P. and Toniolo D. A large-scale association study to assess the impact of known variants of the human INHA gene on premature ovarian failure. *Human Reprod.* 2009. Vol.24,No8 pp.2023-2028.
- Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.*1986, 67: 604-606.
- Cramer DW, Xu H. Predicting age at menopause. *Maturitas* 1996;23:319-26.
- Çelik Ö, Yıldırım A. Folikülogenezisin Moleküler Temelleri. 2008.
- Dansen TB et al. Unravelling the tumor suppressive functions of FOXO proteins. *Trends* 2008 *Cell Biol.* 18(9).
- Dansen TB, Burgering BM. Unravelling the tumor suppressive functions of FOXO proteins. *Trends Cell Biol.* 2011.18 (9):421-9.
- Davutoğlu E, Prematür Over Yetersizliği Saptanmış Karyotipi Normal (46 XX) Olgularda Androjen Düzeyleri, Östrojen Replasman Tedavisinin Androjen Düzeylerine, Kemik Yıkım Ürünü Olan Kollagen Tip 1 Çapraz Bağlı N Telopektit (NTX) Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul. 2008. 21-29.
- Davis CJ, Davison RM, Payne NN, et al. Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect. *Hum Reprod.* 2000;15,2418-2422.
- Davis SR. Premature ovarian failure. *Maturitas* 1996;23;1-8.
- Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version. [www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com), updated 2014/09/22, accessed 2014/12/25.
- Devys D, Lutz Y, Rouyer N. The FMR-1 protein is cytoplasmic most abundant in neurons and appears in carriers of a fragile X premutation *Nat Genet.* 1993;4,335-340.



- Demars J, Fabre S, Sarry J, Rosetti R, Gilbert H. et al. Genome-Wide Association Studies Identify Two Novel BMP15 Mutations Responsible for an Atypical Hyperproliferative Phenotype in Sheep. *Plos Genet* 9(4).2013: e1003482.doi10.1371/journal.pgen.1003482
- Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, and Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *J Hum Genet.* 2004; 75: 106- 11.
- Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M, Wasniewska M, Cole T, Beck-Peccoz P, Nelson LM. and Persani L. Identification of New Variants of Human BMP15 Gene in a Large Cohort of Women with Premature Ovarian Failure. *J Clin Endocrinol Metab.*2006. 91(5):1976 –1979
- Dixit H, Rao KL, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L. missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet* .2006.119:408-415.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N. and Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531- 5.
- Donlon AT, Curb DJ, He Q, Grove SJ, Masaki HK, Rodriguez B, Elliott A, Willcox CD and Willcox JB. FOXO3 Gene Variants and Human Aging: Coding Variants May Not Be Key Players. *Journal of Gerontology.* 2012.doi:10.1093/geron/gls067.
- Durdağ DG, Berker B. Over Rezervinin Değerlendirilmesi. 2008
- Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P, Karels B, Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology.* 2002. 143,1076–1084.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, De Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA. et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 1999; 140: 5789-96.

- Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier Lechner E. and Tews G. Basal level of anti-Mullerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod.* 2006; 21: 2022- 6.
- Eden JA. Menopause before 40 premature but not always permanent. *Obstet Gynecol.* 1993;33:201-3.
- Essers MA. et al. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. 2004. *EMBO J* 23(24).
- Fallahian M, Pouresmaeili F, Azizi F, Zali MR, Samani EM, Kharaziha P. Existence of Inhibin  $\alpha$ -Subunit Gene Mutation in a Population of Iranian Women with Premature Ovarian Failure. *J Endocrinol* 2009;2: 67-71.
- Familiari U, Larocca LM, Tamburrini E. et al. Premenopausal cytomegalovirus oophoritis in a patient with AIDS. 2000. *AIDS* 4,458-459.
- Fassnacht W, Mempel A, Strowitzki T. and Vogt. Premature Ovarian Failure (POF) Syndrome: Towards the Molecular Clinical Analysis of its Genetic Complexity. *Current Medicinal Chemistry.* 2006,13, 1397-1410.
- Ferrarini E, Russoa L, Fruzzetti F, Agretti P, De Marcoa G, Dimidaa A, Gianetti E, Simoncini T, Simi P, Baldinotti F, Benelli E, Pucci E, Pincheraa A, Vitti P, Tonacchera M. Clinical characteristics and genetic analysis in women with premature ovarian insufficiency. *Maturitas* 74 (2013) 61–67.
- Fiçicioğlu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormoneas an indicator of ovarian reserve. *Fertil and Steril.* 2006;85:592-6.
- Fortune JE. The Early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003. 135–163.
- Franks S. Polycystic ovarian syndrome. Review. *Eur J Med Res.*1995;333:853-86.

- Fraser IS, Greco S, Robertson DM. Resistant ovary syndrome and premature ovarian failure in young women with galactosaemia. *Clin Reprod Fertil* 1986;4,133-138.
- Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*, 2008. 27(16):2312-9.
- Gallardo TD, John GB, Bradshaw K, Welt C, ReijoPera R, Vogt HP, Touraine P, Bione S, Toniolo D, Nelson LM, Zinn AR and Castrillon HD. Sequence variation at the human FOXO3 locus: A study of premature ovarian failure and primary amenorrhea. *Hum Reprod*. 2008 January; 23(1): 216–221.
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS. et al. Mutations in an oocyte derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*. 2000; 25: 279- 83.
- Gitzelmann R, Steinman B. Galactosaemia:how does long term treatment change the outcome? *Enzyme* 1984; 32, 37-46.
- Goosin VV, Carella MJ, Rovner DR. Pregnancy in a patient with premature ovarian failure. *J Med*. 1993;24:393-402.
- Gök FS. Endometrial Hiperplaziler ve Tip1 Endometriyum Kanserlerinde FOXO3a Ekspresyonunun Klinik Patolojik Değişkenlerle Değerlendirilmesi. Başkent Üniversitesi, Ankara. Uzmanlık Tezi, 2011.No.28-29.
- Gradishar WJ, Schilsky RL. Ovarian function following radiation and chemotherapy for cancer. *Semin Oncol*. 1989; 16,425-436.
- Grassa E. Parotiti epodemiche pluricomplicate. *G Mal Infett Parasit*.1976; 26,184-187.
- Graziottin A, Basson R. Sexual dysfunction in women with premature menopause. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*, 2003.vol 111, no:6, pp.766-77.
- Grujij TJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP. Antimülleri an hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;211:85-90.

- Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. *Reproductive Bio Medicine*. 2011. Online 23,97-104.
- Harlow BL, Cramer DW, McGurk KM. The association of medically treated depression and age at natural menopause. *J Epidemiol*. 1995;141:1170-6
- Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S. Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102 (15): 5426–5431.
- Hazout A, Bouc H, Seifer DB, Aussagep JA, Cohen B. Serum anti-müllerian hormone/müllerian inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle stimulating hormone, inhibin B or estradiol. *Fertil Steril* 2004; 82:1323-9.
- Hill JA, Welch WR, Faris HM, Anderson DJ. Induction of classII major histocompatibility complex antigen expression in human granulosa cells by interferon gamma: a potential mechanism contributing to autoimmune ovarian failure. *J Obstet Gynecol*. 1990;162:534-40.
- Ho KK. et al. Many forks in the path: cycling with FoxO. *Oncogene*. 2009. 27(16).
- Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev*. 1997;18:107-34.
- Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR, et al. Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum Mol Genet*. 2003;12(18):2249-54.
- Hosaka T, Biggs WH, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK. et al. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:2975-80.
- Huang H, et al. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*. 2009. 120. Pt 15.

- Hudson PL, Dougas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB. et al. An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. *Clin Endocrinol* 1990; 70: 16- 22.
- İnceboz U. Klinik Pratikte Yaşlanan Over. *Uzmanlık Sonrası Eğitim ve Güncel Gelişmeler Dergisi*. 2005;2:15-20.
- Jacobs PA. Frajil X syndrome. *J Med Genet*. 1991; 28,809-810.
- Jeong HJ, Cho SW, Kim HA. et al. G769A variation of inhibin alpha-gene in Korean women with premature ovarian failure. *Yonsei Med J*. 2004;45:479-482.
- Kalantaridou SN. and Nelson LM. Premature ovarian failure is not a premature menopause. *Ann N Y Acad Sci*.2000; 900, 393–402
- Kalantaridou SN. et al. Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89, 3907–3913.
- Kalantaridou SN. et al. Hormone therapy in women. In *Pharmacotherapy:A Pathophysiologic Approach* (6th edn) 2005.pp. 1493–1513.
- Kalantaridou SN, Nelson LM. Premature ovarian failure is not premature menopause. *Ann N Y Acad Sci* 2000;900:393-402.
- Kalantaridou SN, et al. Treatment of autoimmune premature ovarian failure. *Hum Reprod*.14(7).1999.1777-1782.
- Kajihara T, Marius JM, Fusi L, Takano M, Feroze-Zaidi F. et al. Differential Expression of FOXO1 and FOXO3a Confers Resistance to Oxidative Cell Death upon Endometrial Decidualization. 2006.
- Kajihara T, Jones M, Fusi L, Takano M, Feroze-Zaidi F, Pirianov G, Mehmet H, Ishihara O, Higham JM, Lam EW, Brosens JJ. Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization. *Mol Endocrinol*. 2006 Oct; 20(10):2444-55.

- Knight PG. and Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reprod.* 2006. 132 191–206.
- Kuyucu Y, Tap Ö. Oosit Olgunlaşma Süreci ve Düzenleyici Faktörler. *Arşiv* 2009; 18: 227.
- Laissue P, Christin Maitre S, Touraine P, Kuttan F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, Dewailly D, Reyss AC, Jeffery L, Bachelot A, Massin N, Fellous M, Veitia AR. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol.* 2006. 154 739-744.
- Laissue P, Vinci G, Veitia AR, Fellous M. Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol.* 282.2008,101-111.
- Laml T, Preyer O, Umek W, Hengstschlager M, Hanzal E. *Hum Reprod.* 2002, Vol.8, No:4, pp. 483-491.
- Lamarca A, Volpe A. Anti-müllerian hormone (AmH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64:603-10.
- Lebovic DI, Naz R. Premature ovarian failure: Think “autoimmune disorder”. *Sexuality, Reprod Fertil Dev.* 2004;2(4):230-3.
- Ledig S, Albrecht R, Gabriele H, Bernd H, Peter W. BMP15 mutations in XX gonadal dysgenesis and premature ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198:84.e1-84- e5.
- Lee WS, Otsuka F, Moore RK. and Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod.* 2001; 65: 994- 9.
- Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villén J, Becker EB, DiBacco S, de la Iglesia N, Gygi S, Blackwell TK, Bonni A. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell.* 125(5):2006.987-1001.

- Liu L, Rajareddy S, Reddy P, Du C, Jagarlamudi K, Shen Y, Gunnarsson D, Selstam G, Boman K, Liu K. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development*. 134, 2007.199–209.
- Luborsky L, Meyer P, Sowers MF, Gold EB. and Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod*. Vol.18, No.1 pp. 199±206, 2002.
- Luborsky L, Meyer P, Sowers MF, et al. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod*. 2003;18:199-206
- MacNaughton J, Banah M, McCloud P. et al. Age related changes in Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. *Clin Endocrinol*. 1992: 36: 339-345.
- Maiese K, et al. Out FOXOing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FoxO proteins.2008.14(5).
- Mark PP, Barry IG, and Katherine AM. Genetic variation in the inhibin pathway and risk of testicular germ cell tumors. *Cancer Res*. 2008,68(8):3043-3048.
- Marshall JC, Christine AE. Neuroendocrinn Aspects of Polycystic Ovary Sydrom. *Endocrinol and Metab Clin North Am*. 1999;28:295-32.
- Marozzi A, Porta C, Vegetti W, Crosignani PG, Tibiletti MG, Dalprà L, Ginelli E. Mutation analysis of the inhibin alpha gene in a cohort of Italian women affected by ovarian failure. *Hum Reprod*. 2002;17:1741–1745.
- Mason AJ, Hayflick JS. Complementary DNA suquences of ovarian follikuler fluid inhibin show precursor structure. *Nature*. 1985;18:659-663.
- Mason J, Burger H, Kretser D, Findlay J, Igarashi M. Human Inhibin and Activin: Structure and Recombinant Expression in Mammalian Cells. In: *Inhibin: Non-Steroidal Regulation of Follicle-Stimulating Hormone Secretion*. New York, Raven Press, 1987: 42-719.

- Massin N, Eduri GM, Bachelot A, Misrahi M, Kuttenn F, Touraine P. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol*. 2008. 282:95-100.
- Massin N, Gougeon A, Meduri G, Thibaud E, Laborde K, et al. Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2004;19, 2555–2560.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Bradley A. Alfa- inhibin is atumor suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature*. 1992;360:313-31.
- McMahon EH, Hashimoto O, Pamela LM and Shimasaki S. Oocyte Spesefic Overexpsression of Mouse Bone Morphogenetic Protein-15 Leads to Acclerated Folliculogenesis and Early onset of acyclicity in Transgenic Mice. *Endocrinology*. 2008. 149(6): 2807–2815.
- McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O. and Juengel JL. Oocyte expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol*. 2005.234,57-66.
- Min J, YiQi Y, HeFeng H. An update on primary ovarian insufficiency. *Sci China Life Sci*. 2012,55:677-686.
- Melissa C, Sonia G, Paddy M, Yasmin J. *Pediatr Adolesc Gynecol*. 2008. 21 :3-8.
- Motta PM, Makebe S. and Notta SA. The ultrastructure of human reproduction. 1. the natural history of the female germ cell: Origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update*. 1997. Vol. 3, No. 3 pp. 281–295.
- Moore RK and Shimasaki S. Molecula biology and phssiological role of the oocyte factor, BMP15. *Mol Cell Endocrinol*. 2005.234,67-73.
- Moore RK, Otsuka F. and Shimasaki S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling granulosa cells. *J Bio Chem*. 2003.278,304-310.



- Moron FJ, Mendoza N, Quereda F, Vazquez F, Ramirez -Lorca R, Velasco J, Gallo JL, Salinas A, Martinez-Astorquiza T, Sanchez-Borego R. et al. Pyrosequencing technology for automede detection of the BMP15 A180T variant in Spanish postmenopausal women. *Clin Chem*. 2007.S3:1162-1164.
- Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nature Genet*. 1997;17,393-398.
- Nelson LM, Kimzey LM, White BJ. Gonadotropin suppression for the treatment of karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure: a controlled trial. *Fertil Steril*. 2001. 5750-55.
- Nelson LM. et al. Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin. Endocrinol Metab*. 1994;79, 1470–1475.
- Obsil T, Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*. 2008. 27(16):2263-75.
- Ogilvy-Stuart AL, Shalet SM. Effect of radiation on the human reproductive system. *Environ Health Perspect*. 1983;101,109-116.
- O’Herlihy C, Pepperell RJ, Evans JH. The significance of FSH elevation in young women with disorders of ovulation. *BR Med J* 1980;281:1447-1450.
- Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T. and Saitou M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*. 2009; 137: 571- 84. (1-3).
- Oktay K, Büyük E, Davis O, et al. Fertility preservation in breast cancer patients:in vitro fertilization and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifen. *Hum Reprod*. 2003;18:90-5.
- Oktem O. ve Urman B. Reprodüktif Yaşam Siklusu: Folikülogenez ve Menstruasyon. 2012.

- Oktem O and Oktay K, The ovary: anatomy and function throughout human life. Ann NY Acad Sci. 2008. 1127: 1- 9.
- Onuma H, Vander Kooi BT, Boustead JN, Oeser JK, O'Brien RM. Correlation between FOXO1a (FKHR) and Foxo3a (FKHRL1) binding and the inhibition of basal glucose-6- phosphatase catalytic subunit gene transcription by insulin. Mol Endocrinol. 2006. 20(11): 2831-47.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF and Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15:identification of target cells and biological functions. J Biol Chem. 2000;275:39523-39528.
- Otsuka F, Moore RK, Iemura S, Ueno N. and Shimasaki S. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 289: 961- 6.
- Otsuka F, McTavish JK. and Shimasaki S. Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. Mol Reprod Dev. 2011.78:9-21.
- Pampfer S, Thomas K. Clinical value of inhibin in women. J Gynecol Obstet Biol Reprod. Paris. 1989: 18: 279-287.
- Panidis D, Rousso D, Vavilis D, Skiadopulos S. and Kalogeropoulos A. Familial blepharophimosis with ovarian dysfunction. Hum Reprod. 1994;9,2034-2037.
- Pasquino A, Passeri F, Pucarelli I, et al. Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 82,1810-1813.
- Peccoz P, Pernani L. Premature ovarian failure. Orphanet Journal of Rare Diseases 2006,1:9.
- Peng SL. Foxo in the immune system. Oncogene. 2008. 27(16):2337-44.
- Peng Z, Shi HY, Wnah LC. and Chen ZJ. Sequence variants in exon of the BMP-15 gene in Chinese patients with premature ovarian failure. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl. 2007;86:585-589.

Persani L, Rosetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C. and Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update*. 2014;20(6):869-83.

Persani L, Rossetti R, Caciatore C, Bonomi M. Primary ovarian insufficiency: X Chromosome defects and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2009;33:35-41.

Persani L, Rossetti R, Caciatore C. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol*. 2010;45:257-279.

Perheentupa J. Autoimmun Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ecdodermal Dystrophy (APECED). *Horm Metab Res*. 1996;28:353-356.

Picton HM, Haris SE, Muruvi W. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 2008. 136 703–715.

Pouresmaeili F. and Fazeli Z. Premature Ovarian Failure: A Critical Condition in The Reproductive Potential with Various Genetic Causes. *Int J Fertil Steril*. 2014 Apr-Jun; 8(1): 1–12.

Powell CM, Taggart RT, Drumbheller TC, et al. Molecular and cytogenetic studies of an X: autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *Am J Med Genet*. 1994;52:19-26.

Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, Tang W. et al. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia. *J Turk Soc Obstet Gynecol*. 2012; 9: 1- 24.

Rajpert-De ME, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate R. and Skakkebaek NE, Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 3836.

Rabert MN, Rebecca M, Helbling S, Kaech A, Zhang H. and Geyer de C. The CC-allele of the PvuII polymorphic variant in intron 1 of the alpha-estrogen receptor

gene is significantly more prevalent among infertile women at risk of premature ovarian aging. *Fertil and Steril*. October 2012. Vol.98. No.4.

Rah H, Jeon Joo Y, Ko Jae Jung, Kim HJ, Kim RY, Cha CS, Choi Y, Lee SW, Kim KN. Association of inhibin alfa gene promoter polymorphisms with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women. *Maturitas*. 77.2014,163-167.

Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition:evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin. Endocrinol Metab*. 1987;65:1231-7.

Rebar RW, Connolly HV. Clinical features of young women with hypergonadotrophic amenorrhoea. *Fertil Steril*. 1996;53,804-810.

Rizzolio F, Pramparo T, Sala C, Zuffardi O, Santis LD, Rabbottini E. et al. Epigenetic analysis of the critical region I for premature ovarian failure: demonstration of a highly heterochromatic domain on the long arm of the mammalian X chromosome. *J Med Genet*. 2009;46(9):585–592

Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, Nelson ML, Beck- Peccoz P. and Persani L. BMP15 mutations associated with primary Ovarian Insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat*. 2009.804-810.

Rossetti F, Rizzolio F, Pramparo T, Sala C, Bione S, Bernardi F, Goegan M, Zuffardi O, Toniolo D. A susceptibility gene for premature ovarian failure (POF) maps to proximal Xq28. *Eur J Hum Genet*. 12:2004. 829-834.

Sadler TW. *Langman Medikal Embriyoloji*. Dokuzuncu Baskıdan Çeviri. 2005. Bölüm 1. 3.

Santoro N, Adel T. and Skurnick H. Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women. *Fertil Steril*. 1999: 71: 658-662.

Sardharwalla IB, Wraith JE. Galactosaemia. *Nutr Health*. 1987; 5,175-188.

Schoenwolf C, Bleyl B, Brauer R, et al. Larsen's Human Embryology. Fourth Edition. 2009. Chapter 1.

Sedmak DD, Hart WR, Tubbs RR. Autoimmune ooforit: A histopatologic study of involved ovaries with immunologic characterization of the mononuclear cell infiltrate. *Int J Gynecol Pathol*. 1987;6:73-81.

Shelling NA, Burton AK, Chand LA, Van Ee CC, France TJ, Farquhar MC, Milsom RS, Love RD, Gersak K, Aittomaki K. and Winship MI. Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2000. vol. 15.no 12 pp.2644-2649.

Shelling AN. Premature ovarian failure. *Reproduction*. 2010 Nov;140(5):633-41.

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F. and Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mamalian reproduction. *Endocr Rev*. 2004.25,72-101.

Silva CA, Yamakami LYS, Aikawa NE, Araujo DB, Carvalho JF, Bonfá E. Autoimmune primary ovarian insufficiency. *Autoimmunity*. AUTREV-01488;2014. No of Pages 4.

Simpson JL. and Rajkovic A. Ovarian differentiation and gonadal failure. *Am J Med Genet*.1999; 89,186-200.

Snowdon DA. et al. Is early natural menopause a biologic marker of health and aging? *Am J Public Health*. 1989;79, 709-714

Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL, and Robertson EJ. Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet*. 1998; 22: 321- 39. 58.

Speroff L, Kenemans P, Burger HG. Practical guidelines for postmenopausal hormone therapy. *Maturitas*. 2005.02.006.

Speroff L, Glass R, Kase N. *Clin Gynecol Endocrinol and Infertility*. 6th Edition, Lippincott Williams and Wilkins. 1999: 186-205.

- Sundblad V, Chiauzzi VA, Andreone L, Campo S, Charreau EH, Dain L. Controversial role of inhibin alpha-subunit gene in the aetiology of premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2006;21(5):1154–1160.
- Surrey ES, Cedars MI. The effect of gonadotropin suppression on the induction of ovulation in premature ovarian failure patient. *Fertil Steril.* 1989; 52:36-41.
- Suzumori N, Stephanie A, Pangas AS. and Rajkovic A. Candidate Genes for Premature Ovarian Failure. *Curr Med Chem.* 2007. 14, 353-357.
- Sybert VP, McCauley EN. *Engl J Med.* 2004.351,1227
- Talbert LM, Raj MHG, Hammond MG, Greer T. Endocrine and immunologic studies in a patient with resistant ovary syndrome. *Fertil Steril.*1984. 42:741.
- Taylor AE, Adams JM, et al. A randomized controlled trial of estradiol replacement therapy in women with hypergonadotropic amenorrhoea. *J Clin Endocrinol.* 1996 ;81,3615-3621.
- Timmerck LS, Reindollar RH. Contemporary issues in primary amenorrhea. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 30(2):2003.287-302.
- Tiotiu D, Mercadal AB, Impert R, Verbist J, Demeestere I, De Leener A, Englert Y, Vassart G, Costagliola S, and Delbaere A. Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2010. Vol.25, No.6 pp. 1581-1587.
- Usman Z, Fatima S, Ali A, Mehmood S, Khaliq S. Sequence analysis of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) Gene in patients of Premature Ovarian Failure. *Int Conf App Mol Biol Med.* 2013. pp141.
- Vale W, Sporn M, Roberts A. The Inhibin/Activin Family of Hormones and Growth Factors In. *Peptide Growth Factors and their Receptors.* Berlin, Springer- Verlag. 1990: 211-248.

- Van Kasteren YM, Hundscheid RDL, Smits FPM. et al. Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Hum Reprod.* 1999;14,2455-2459.
- Van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril.* 2011.83, 979–987.
- Van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2002; 17: 3065- 71.
- Veitia R. Dominant negative factors in health and disease. *J Pathol.* 218.2009,409-418.
- Vermulen A. Environment human reproduction menopause and andropause *Environ. Health Perspect.* 1993;101,91-100 .
- Vet De A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP. and Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 2002; 77: 357- 62.
- Vinci G, Christin-Maitre S, Pasquier M, Bouchard P, Fel-lous M, Veitia RA. FOXO3a variants in patients with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 2008; 68(3):495–497.
- Visser JA. and Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005; 234: 81- 6.
- Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, Mukai H, Kasuya Y, Fukamizu A. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol Cell.* 2008. 32(2):221-31.
- Yan C, Wang P, DeMayo J, De Mayo FJ, Elvin JA, Carino C. et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol.* 2001; 15: 854- 66.

- Yamanochi K, Yoshida S, Hasegawa T, et al. Molecular cloning of DNA for inhibin alpha subunit from equine ovary. *J Vet Med Sci.*57.1995.905-909.
- You H. et al. Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by Foxo3a. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006.103(24).
- Yıldırım Y, Şener S, Botsalı MS, Tosun G. Apeced sendromu. Olgu bildirim. *Acta Odontol Turc.* 2013;30(2):90-2.
- Ying Y. and Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol.* 2001; 232: 484- 92.
- Wang F. et al. Biochemical and structural characterization of an intramolecular interaction in Foxo3a and its binding with p53. *J Mol Biol.* 2008. 384(3).
- Wang B, Mu Y, Ni F, Zhou S, Wang J, Cao Y, Ma X. Analysis of FOXO3 mutation in 114 Chinese women with premature ovarian failure. *Reprod Bio Med Online.* 2010.20.499-503.
- Wang Na, Luo LL, Xu JJ, Xu MY, Zhang XM, Zhou XL, Liu WJ, Fu YC. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. *Metabolism Clinical Experimental.* 63.2012.94-103.
- Watkins WJ, Umbers AJ, Woad KJ, Harris SE. Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* November 2006. Vol. 86, No 5, 1518-1521.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, et al. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci.* 2004. 82:E63-74.
- Welt CK. Primary ovarian insufficiency a more accurate terms premature ovarian failure. *Clin Endocrinol.* 2009,68:449-509.
- Willett W, Stampfer MJ, Bain C, et al. Cigarette smoking, relative weight, and menopause. *Am J Epidemiol.* 1983;117:651-8.



Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, et. al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril*. 2007;87:456-465.

Woad KJ. et al. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2006. 46(3):242-4.

Zhang P, Shi YH, Wang LC, Chen ZJ. Sequence variants in exons of the *bmp15* gene in Chinese patients with premature ovarian failure. *Acta Obstet Gynecol Scand* 86:2007.585-587.

Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powel DR. et al. *Foxo1* regulates multiple metabolic pathways in the liver. effects on gluconeogenic, glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*. 281:2006.10105-10107.

Zhao ZZ, Painter NJ, Palmer SJ, Webb MP, Hayward KN, Whiteman CD, Boomsma ID, Martin GN, Duffy LD. and Montgomery WG. Variation in bone morphogenetic protein 15 is not associated with spontaneous human dizygotic twinning. *Hum Reprod*. 2008.pp1-8.

Zinn AR, Tonk VS, Chen Z, et. al. Evidence for a turner syndrome locus or loci at Xp113-p221. *Am J Hum Genet*. 1999; 63,1757-1766.

Zlotogora J, Sagi M. and Cohen T. The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome:delineation of two types. *Am J Hum Genet*. 1983;35,1020-27

Zou Y, Tsai WB, Cheng CJ, Hsu C, Chung YM, Li PC, Lin SH, Hu MC. Forkhead box transcription factor *Foxo3a* suppresses estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 2008. 10(1):R21.

[http://www.sharinginhealth.ca/biology/menstrual\\_cycle.html](http://www.sharinginhealth.ca/biology/menstrual_cycle.html).2014

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=INHA>.2014

<http://www.bio.davidson.edu/people/midorcas/animalphysiology/Callahan/index.htm>.20

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/109659014?report=fasta>.2014

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BMP15&search=f734a4b0037e2b5f96e5bab03c835d56>.2014

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/42519916?report=fasta>.2014

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/FOXO3>.2014

<http://www.antiaging.org.tr/eski2/pg013.html>.2014

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000002.12?report=fasta&from=219572232&to=219575713](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000002.12?report=fasta&from=219572232&to=219575713))

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/74273659?report=fasta>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000006.12?report=fasta&from=108559823&to=108684769](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000006.12?report=fasta&from=108559823&to=108684769))

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mustafa AŞÇI

Doğum Yeri: Sivas

Doğum Tarihi: 10.10.1979

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu :

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Tıbbi Biyoloji Doktora 2009-

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Tıbbi Biyoloji 2002-2005

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Fakültesi -Biyoloji 1997-2001

Çalıştığı Kurum:

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.  
2009-

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. 2002-2008

E-posta: mustafaasci55@hotmail.com