

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İDİYOPATİK PREMATÜR OVARYEN YETMEZLİKLİ
OLGULARDA FRAX PREMUTASYON TAŞIYICILIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. YASEMİN ANIL EYÜBOĞLU TANRIVERDİ

**DANIŞMAN
PROF.DR. C. NUR SEMERCİ**

DENİZLİ - 2016

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İDİYOPATİK PREMATÜR OVARYEN YETMEZLİKLİ
OLGULARDA FRAX PREMUTASYON TAŞIYICILIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ


DR. YASEMİN ANIL EYÜBOĞLU TANRIVERDİ


**DANIŞMAN
PROF.DR. C. NUR SEMERCİ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 24.03.2015 tarih ve 2015TPF005 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2016

Prof. Dr. C. Nur SEMERCİ danışmanlığında Dr. Yasemin Anıl EYÜBOĞLU TANRIVERDİ tarafından yapılan "İdiyopatik prematür ovaryen yetmezlikli olgularda FraX premütasyon taşıyıcılığının araştırılması" başlıklı tez çalışması 13/05/2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof. Dr. Gülseren Bağcı 

ÜYE Prof. Dr. Özge Güçlü 

ÜYE Prof. Dr. C. Nur Semerci 

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 24/05/2016



Prof. Dr. İlgez AKDOĞAN

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetiŐmemde önemli katkı sağlayan, tezin hazırlanma aşamasında gösterdiği ilgi, verdiği destek nedeniyle tez danıŐmanım sayın hocam Prof. C. Nur SEMERCİ'ye; asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Gülseren BAĞCI, Doç. Dr. Emre TEPELİ, Doç. Dr. Vildan CANER ve Yrd. Doç. Dr. G. Ozan ÇETİN'e; teze hastalarıyla katkıda bulunan sayın Doç. Dr. Aysun KARABULUT'a; hasta sayımızın tamamlanmasında katkıda bulunan sayın Prof.Dr.Fatma SILAN'a; tezin laboratuvar basamağında benden yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Ersan KALAY ve Yrd. Doç. Dr. Bayram TORAMAN'a; tezin istatistiksel analizinde verdiği yardım nedeniyle Hande ŐENOL'a; uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıŐmaktan mutluluk duyduğum tüm mesai arkadaşlarıma; bu günlere gelmemde büyük emeği geçen aileme ve beni büyük bir sabırla destekleyen, her zaman yanımda olan sevgili eŐime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLOLAR DİZİNİ.....	XI
ÖZET.....	XII
İNGİLİZCE ÖZET	XIV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
OVARYUMLARIN GELİŞİMİ VE FOLİKÜLOGENEZ	4
Ovaryumların Gelişimi	4
Folikülogenez.....	5
PREMATÜR OVARYEN YETMEZLİK	6
Tanım.....	6
Tanı.....	7
Prematür Ovaryen Yetmezliğin Nedenleri	9
<i>İatrojenik Nedenler</i>	11
<i>Otoimmün Hastalıklar</i>	12
<i>Enfeksiyon</i>	13
<i>Çevresel Toksinler</i>	14
<i>Genetik Nedenleri</i>	14
FMR1 GENİ	20
FMR1 Gen Yapısı.....	20
FMR1 Premutasyonu	22
FMR1 Full Mutasyonu	23

FraX Premutasyon Taşıyıcılığı ve İdiyopatik Prematür Ovaryen Yetmezlik.....	24
MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
Çalışma Grupları	25
Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	26
İzole Edilen DNA`ların Saflık Derecelerinin Değerlendirilmesi.....	26
Triplet Repeated Primer Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TP PCR)	27
direct Triplet Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu (dTP PCR)	30
İstatistiksel Analiz	32
BULGULAR	33
FMR1 Geni Moleküler Analizi.....	37
TP PCR Sonuçları	37
dTP PCR Sonuçları	43
TARTIŞMA.....	47
SONUÇLAR	54
KAYNAKLAR.....	56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMH	Anti Mülleryan Hormon
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CMV	Sitomegalovirüs
CYP17A1	Cytochrome P450, Family 17, Subfamily A, Polypeptide 1
CYP19A1	Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1
DACH2	Dachshund Homolog 2
DIAPH2	Diaphanous Homolog 2
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dTP PCR	Direct Triplet Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu
E2	Östradiol
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FAM	6-Carboxyfluorescein
FISH	Fluorescence In Situ Hybridisation
FMR1	Frajil X Mental Retardasyon 1
FMRP	Frajil X Mental Retardasyon Proteini
FOXL2	Forkhead Transcription Factor 2
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
FSHR	Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü
FXTAS	Frajil X Tremor Ataksi Sendromu
GALT	Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPC3	Glypikan 3

Gy	Gray
hnRNP	Heterojen Nükleer Ribonükleoprotein
HS6ST2	Heparan Sulfat 6-O Sulfotransferaz
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
INH α	İnhibin α
KT	Kemoterapi
LH	Luteinleştirici Hormon
LHR	Luteinleştirici Hormon Reseptörü
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NOBOX	Newborn Ovary Homeobox
OMI	Oosit Maturasyon İnhibitörü
PGH	Primordial Germ Hücre
POF	Premature Ovarian Failure
POF1B	Premature Ovarian Failure 1B
RT	Radyoterapi
SHOX	Short Stature Homeobox
SRY	Sex-determining Region Y
SSM	Slipped Strand Mispairing
TDF	Testis Determining Faktör
TDPF3	Transkripsiyon Faktör DP Family Member 3
TP PCR	Triplet Repeated Primer Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TSH	Tiroid Stimulan Hormon
USG	Ultrasonografi

USP9X Ubiquitin -Spesifik Proteaz , X Bağımlı

UTR Untranslated Region

XIST X Inactivation Specific Transcript

XPNPEP2 X-Prolyl Aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-Bound

ZFX Zinc Finger X



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: POF tanısının laboratuvar testleri ile doğrulanması için izlenen algoritm ...	8
Şekil 2: İnsan X kromozomuna ait idiogram.	17
Şekil 3 : FMR1 geni 5'UTR ve 1.eksonu.....	21
Şekil 4: FMR1 geni CGG dizi tekrarı görünümü	22
Şekil 5: TP PCR çalışma mekanizması ve analizi şeması	27
Şekil 6: K30, CGG tekrar sayısı: 22 ve 37 (Normal heterozigot).....	39
Şekil 7: H6, CGG tekrar sayısı: 29 (Normal homozigot)	39
Şekil 8: H17, CGG tekrar sayısı: 28 (Normal) ve 45 (Gri zon)	40
Şekil 9: H20, CGG tekrar sayısı: 38 (Normal) ve 51 (Gri zon)	40
Şekil 10: H32, CGG tekrar sayısı: 30 (Normal) ve 47 (Gri zon)	41
Şekil 11: K28, CGG tekrar sayısı 29 (Normal) ve 49 (Gri zon).....	41
Şekil 12: H30, CGG tekrar sayısı: 28 (Normal) ve 98 (premutasyon taşıyıcısı)	42
Şekil 13: CGG tekrar sayısı homozigot olarak 30 olan kontrol olgusu K1`in AGG analiz görüntüsü	44
Şekil 14: CGG tekrar sayısı allel 1`inde 29 (normal), allel 2`de 49 (gri zon) olan kontrol olgusu K28`in AGG analiz görüntüsü	44
Şekil 15: CGG tekrar sayısı allel 1`inde 28 (normal), allel 2`sinde 98 (premutasyon taşıyıcısı) olan H30`un AGG analiz görüntüsü	45

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: POF'un aşamaları	8
Tablo 2 : POF'un nedenleri.....	10
Tablo 3: Hasta grubunda çalışmaya dahil olma ve dışlanma kriterleri	25
Tablo 4: AmplideX™PCR Kit içeriği ve toplam hacimleri	28
Tablo 5: Bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği	28
Tablo 6: Thermal Cyler cihazında uygulanan basamaklar	29
Tablo 7: ABI 3130 Genetik Analiz cihazına yüklemek için tek örneklik hazırlanan karışım.....	29
Tablo 8: Homozigot bireylerin tekrar reaksiyonlarındaki thermal cyler koşulları	30
Tablo 9: FastFraX™FMR1 Sizing Kit içeriği ve toplam hacimleri	30
Tablo 10: Tek bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği.....	31
Tablo 11: Thermal Cyler cihazında uygulanan basamaklar	31
Tablo 12: ABI 3500 Genetik Analiz cihazına yüklemek için tek örneklik hazırlanan karışım.....	31
Tablo 13: Hasta grubuna ait bilgiler.....	33
Tablo 14: Hasta grubu spektrofotometri ölçümleri	35
Tablo 15: Kontrol grubu spektrofotometri ölçümleri	36
Tablo 16: Hasta grubundaki allellerin CGG tekrar sayıları ve hastaların FSH değerleri	37
Tablo 17: Kontrol grubundaki allellerin CGG tekrar sayıları	38
Tablo 18: Premutasyon taşıyıcısı saptanan olgu	42
Tablo 19: Gri zonda saptanan olgular	43
Tablo 20: CGG tekrar sayısı 35-54 arası saptanan olgular	43
Tablo 21: Premutasyon taşıyıcısı H30'un özellikleri	46
Tablo 22: Gri zondaki hastaların özellikleri	46
Tablo 23: Gri zondaki K28'in özellikleri	46

ÖZET

İdiyopatik prematür ovaryen yetmezlikli olgularda FraX premutasyon taşıyıcılığının araştırılması

Dr. Yasemin Anıl EYÜBOĞLU TANRIVERDİ

Prematür ovaryen yetmezlik (POF) kadınlarda 40 yaşından önce menstrüasyonun kesilmesi veya ovaryen foliküllerin erken tükenmesi olarak tanımlanan yüksek folikül stimüle edici hormon (FSH) ve düşük östrojen seviyelerinin eşlik ettiği klinik bir tablodur. Bu durum bazen erken menapoz olarak adlandırılrsa da POF`lu olgularda yüksek gonadotropin düzeylerine rağmen, aralıklı olarak östrojen üretimi ve ovulasyon gerçekleştiği için menapoz terimi yanıltıcı olabilmektedir. Günümüzde POF`un etiyojisi halen araştırılmakta olup pek çok neden bu durumdan sorumlu tutulmaktadır. Etiyojisinde çevresel faktörler, otoimmün hastalıklar, enfeksiyon, metabolik hastalık, iatrojenik ve genetik nedenler yer almaktadır. POF etiyojisinde rol oynayan genetik nedenler içinde pek çok aday gen bulunmakta olup bu durumla en sık ilişkilendirilen gen Frajil X Mental Retardasyon 1 (FMR1) genidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda FMR1 premutasyon taşıyıcılarında POF gelişme riskinin arttığı gösterilmiştir. FMR1 geninin 5'UTR (untranslated region)`ında polimorfik CGG tekrarları bulunmaktadır. CGG tekrar sayısına göre 5-44 CGG normal, 45-54 gri veya intermediate zon, 55-200 premutasyon ve >200 ise full mutasyon olarak sınıflandırılmaktadır. Premutasyon taşıyıcılarında artmış FMR1 mRNA transkripti overlere toksik etki göstererek hastalığın patofizyolojisini oluşturmaktadır. CGG tekrarları, aralarına dağılmış AGG dizileri ile bölünmektedir. AGG dizi sayısının maternal transmisyon sırasında ekspansiyonda rolü olduğu düşünülmektedir. POF etiyojisinde FraX premutasyon varlığının saptanması; ailede etkilenme olasılığı olan bireylerin araştırılması, Frajil X sendromu, erken over yetmezliğine bağlı oluşan hipoöstrojenizm ve ataksi açısından risk altında olan bireylerin kontrollerini sağlayacaktır. Ayrıca hipoöstrojenizm ile oluşabilecek kardiyovasküler hastalık, osteoporoz gibi risk artışı olan durumları hastaya anlatma ve yönlendirme için premutasyon taşıyıcılığının saptanması önemlidir. Bu çalışmada FMR1 CGG tekrar sayılarının POF`taki rolünü değerlendirmek amacıyla idiyopatik POF tanılı 55 olgu ile 55 kontrol olgusunun

CGG tekrar sayıları TP PCR metodu ile incelendi. Ayrıca CGG tekrar sayısı >45 saptanan hasta grubundan 4 kontrol grubundan 1 olgu olmak üzere toplam 5, ve CGG tekrar sayısı 5-44 arası olan 5 olgunun CGG tekrarlarını bölen AGG sayıları dTP PCR metodu ile incelendi. Hasta grubunda 1 olguda premütasyon taşıyıcılığı (98 CGG tekrarı) ve 3 olguda gri zon (sırasıyla 45-51-47 CGG tekrarı) saptanırken kontrol grubunda 1 olguda gri zon (49 CGG tekrarı) saptandı. Çalışmamızda POF ile CGG tekrar sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu durumu olgu sayımızın az olmasına bağlamaktayız. Ancak bir olguda saptadığımız premütasyon taşıyıcılığı klinik açıdan önemli ve anlamlı olarak değerlendirilmiştir. CGG tekrarını bölen AGG sayısı ise premütasyon taşıyıcısı olguda allel1-allel2 olacak şekilde 2-0 , gri zon saptanan olgularda (H17, H20, H32, K28) sırasıyla 2-1, 3-0, 2-2, 2-2 ve kontrol olgularında (K1, K2, K3, K4 ve H33) bakılan AGG sayısı sırasıyla 2-2,1-1, 2-2, 2-1 ve 2-1 bulunmuştur. Sonuç olarak FMR1 geni 5'UTR bölgesindeki CGG tekrar sayısının idiyopatik POF olgularında incelemeye değer oldukları ve daha fazla olgu ile araştırılmanın genişletilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: FMR1, FMRP, FraX, Premütasyon, Over

SUMMARY

Analysis of FraX premutation carriers in patients having idiopathic premature ovarian failure

Dr.Yasemin Anıl EYÜBOĞLU TANRIVERDİ

Premature ovarian failure (POF) is defined as early depletion of ovarian follicles or the cessation of menses with elevated follicle stimulating hormone (FSH) and low estrogen level before the age of 40. Although this condition is sometimes termed as early menopause, the term menopause may be misleading for cases with POF since estrogen production and ovulation take place intermittently despite high gonadotropin levels. Today, the etiology of POF is still investigated, with many factors being held responsible in its pathophysiology. Environmental factors, autoimmune disorders, infections, metabolic disorders, iatrogenic causes, and genetic factors play a role in its etiology. Many candidate genes have been associated with POF, among which the Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) gene is the most widely associated gene. Recent studies have indicated that the risk of developing POF increases in FMR1 premutation carriers. Polymorphic CGG repeats exist in 5'UTR (untranslated region) of the FMR1 gene. Based on the number of CGG repeats, 5-44 CGG repeats are categorized as normal; 45-54 repeats gray or intermediate zone; 55-200 repeats premutation; and >200 repeats full mutation. In premutation carriers, increased FMR1 mRNA transcript exerts a toxic effect on ovaries and is responsible for the pathophysiology of the disorder. CGG repeats are interrupted by interspersed AGG series. It is thought that the number of AGG series plays a role in the expansion during maternal transmission. Detecting the presence of FraX premutation the etiology of POF will allow the determination of at risk individuals for POF and within a family, Fragile X syndrome and also at risk individuals for hypoestrogenism and ataxia occurring secondary to premature ovarian failure. Furthermore, it is equally important to detect premutation carriers in order to inform them about increased risk of cardiovascular disorders or osteoporosis resulting from hypoestrogenism. In the present study the CGG repeat numbers of 55 cases with idiopathic POF and 55 control cases were determined with the TP PCR method to determine the role of the number of FMR1 CGG repeats in the pathophysiology of POF. In addition, the number of AGG interrupting CGG

repeats was determined with the dTP PCR method in five cases with >45 CGG repeats (4 from the patient group and 1 from the control group) and 5 cases with 5-44 CGG repeats. One case in the patient group was a premutation carrier (98 CGG repeats) and 3 cases were in the gray zone (45, 51, and 47 repeats, respectively), while 1 case in the control group was in the gray zone (49 CGG repeats). Our study did not reveal any significant correlation between POF and the number of CGG repeats. We attribute this finding to a small sample size. However, premutation detected in one case was regarded as clinically important and relevant. The number of AGG interrupting CGG repeats in allele1-allele2 was found 2-0 in premutation carrier; cases in gray zone (H17, H20, H32, K28) 2-1, 3-0, 2-2, 2-2 respectively; and 2-2,1-1, 2-2, 2-1, 2-1 in control cases (K1, K2, K3, K4 ve H33). In conclusion, we suggest that the number of CGG repeats at 5'UTR region of the FMR1 gene are worth for further investigation adequately sized studies.

Key Words: FMR1, FMRP, FraX, Premutation, Over

GİRİŞ

Prematür ovaryen yetmezlik (Premature Ovarian Failure : POF) erken over disfonksiyonu olup klinik olarak kadınlarda 40 yaşından önce over fonksiyonunun azalması ile gonadotropin düzeyinin artışı ve östrojen seviyesinin azalması ile karakterize klinik tablodur. Bu durum primer veya sekonder amenore şeklinde görülmekte olup, olgularda son 4 aylık süreçte serum gonadotropin düzeylerinde artma ve östrojen düzeyinde azalma olarak görülmektedir. Normal kromozom yapısına sahip kadınlarda insidansı 30 yaşın altındakilerde %0.1, 30-39 yaş arasındakilerde %0.4, 40 yaşında ise %1`dir (1).

Hastalarda oligomenore ya da amenore bulguları ortaya çıkmaktadır. POF`un önemli sonuçlarından biri infertilitedir. Bir çok hastada amenore görülse de bunların %50`sinde değişik derecelerde over fonksiyonu mevcut olup yaklaşık olarak %5-10`unda spontan gebelik oluşabilmektedir. Ayrıca POF`ta hipoöstrojenizme bağlı bulgular da ortaya çıkabilmektedir. Uzun dönem östrojen azlığına bağlı osteoporoz, kardiyovasküler hastalık ve nörokognitif hastalıklar görülebilmektedir (2).

POF`un etiyolojisi heterojen olup pek çok etken tanımlanmıştır. Hastalığın etiyolojisini rol oynayan faktörler foliküllerde azalmaya veya folikül gelişimini stimüle eden mekanizmalarda defekte yol açarak etki göstermektedir. Over disfonksiyonu çevresel faktörler, otoimmün hastalık (tiroidit, adrenal yetmezlik, tip 1 diyabet vb), enfeksiyon, metabolik hastalık (galaktozemi), iatrojenik (cerrahi, kemoterapi, radyoterapi) ve genetik (gonadal disgenezi, multiple malformasyon sendromları, X kromozom anomalileri, gen mutasyonları) nedenlere sekonder gelişebilmektedir. Fakat birçok olgunun etiyolojisi idiyopatik olup ileri tetkik ile araştırıldığında genetik nedenler önemli bir kısmını kapsamaktadır (1).

POF etiyolojisinde pek çok aday gen bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi FMR1 (Frajil X mental retardasyon 1) genidir. FMR1 geni Xq27.3 bölgesinde lokalize, 38 kb genomik dizi boyutundadır. 17 eksondan meydana gelmektedir ve FMRP (Frajil X Mental Retardasyon Proteini)`yi kodlamaktadır. Transkripti 4 kb`lık mRNA boyutunda olup ilk eksonun 5'UTR bölgesi stabil olmayan CGG tekrarları içermektedir (3). Tekrar uzunluğu kişilere göre farklılık göstermekte olup 5 - 44 tekrar sayısı normal olarak kabul edilmektedir. 45 – 54 intermedia - gri zon, 55 – 200 premutasyon ve >200 ise full mutasyon olarak değerlendirilmekte olup tekrar sayısı maternal kalıtımda artış gösterebilmektedir (4). Bu durumda sonraki kuşaklarda

tekrar sayısında artış olabilmektedir (3). FMR1 geni; full mutasyonunda Frajil X sendromu meydana gelirken premutasyon taşıyıcılığında prematür ovaryen yetmezlik ve Frajil X tremor/ataksi sendromu görülmektedir. Gendeki tekrar sayısına göre hastalık fenotipe yansımaktadır. FMR1 premutasyonu over disfonksiyonuna neden olmaktadır. Yapılan ekspresyon çalışmaları ile germinatif fetal over hücrelerinden FMRP'nin eksprese olduğu gösterilmiştir. Artmış ekspresyon oosit gelişimini etkileyerek, oosit sayısının azalmasına neden olmaktadır. FraX premutasyonu ile toksik fonksiyon kazanan RNA over folikül dinamiğini etkilemektedir (toksik etki). Bu da overlerde folikül atrezisine neden olarak over fonksiyonlarında erken dönemde yetmezliğe yol açabilmektedir (1).

POF'un insidansı sağlıklı bireylerde %0.1-1 iken FraX premutasyon taşıyıcılarında %20-28'dir. Kontrol grubuyla premutasyon taşıyıcıları karşılaştırıldığında ise POF 13 kat daha fazla görülmektedir. Bazı çalışmalar gri zondaki olgularda da prematür ovaryen yetmezlik için risk artışı olduğunu savunmaktadır (5). Conway ve ark. (1998) İngiltere'de prematür ovaryen yetmezlikli 132 olgu içinden etiyolojisi saptanamayan 106 olguda FraX premutasyonu çalışmış ve premutasyon varlığının 10 kat daha fazla risk oluşturduğunu saptamışlardır (6). Bussani ve ark. (2004) İtalya'da idiyopatik POF'lu 40 olgu ve 28 kişilik kontrol grubu ile yaptığı çalışmada hasta grubunun %7.5'unda (3 olguda) FraX premutasyon taşıyıcılığı saptamıştır (7). Ferrarini ve ark. (2013) İtalya'da 50 POF'lu olgu ve 150 kişilik kontrol grubu ile yaptığı çalışmada, hasta grubunun %8'inde (4 olguda) FraX premutasyonu ve %2'sinde (1 olguda) de gri zon saptamıştır (8). Ye ve arkadaşlarının (2014) Çin'de 117 sporadik POF'lu olgu ve 82 kişilik kontrol grubu ile yaptığı çalışmada 117 kişinin %0.8'inde (1 olguda) FraX premutasyon taşıyıcılığı saptamışlardır (3).

POF etiyolojisinde önemli genetik nedenlerden biri olan FraX premutasyon varlığının saptanması; ailede etkilenme olasılığı olan bireylerin araştırılması, Frajil X sendromu, erken menapoz ve ataksi açısından risk altında olan bireylerin kontrollerini sağlayacak olan genetik danışma verilmesini sağlayacaktır. Ayrıca erken menapozla oluşacak kardiyovasküler hastalık, osteoporoz gibi risk artışı olan durumları hastaya anlatma ve yönlendirme için premutasyon taşıyıcılığının saptanması önemlidir.

Bu proje kapsamında PAÜ Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümü tarafından tüm tetkikleri yapılarak İdiyopatik POF tanısı almış hastalarda FraX premütasyonu araştırılması amaçlanmıştır. Bu araştırma, idiyopatik POF'un etiyolojisini aydınlatmak için yapılan diğer genetik çalışmalara katkı sağlayacaktır.



GENEL BİLGİLER

OVARYUMLARIN GELİŞİMİ VE FOLİKÜLOGENEZ

Ovaryumların Gelişimi

Gonadlar, fertilizasyondan yaklaşık 5 hafta sonra mezonefrozun medial ve ventral sınırları boyunca mezenkimden köken alan çölemik epitelin kalınlaşması sonucu oluşmaya başlamaktadır. Aynı zamanda embriyonik yaşamın 5-6. haftalarında yolk salk endodermden, gonadlara primordial germ hücre (PGH) göçü olmaya başlamakta ve göçleri süresince mitoz bölünmelerine devam etmektedirler (9). PGH'leri göç hareketlerini tamamlayıp gonadal kabartıya ulaştıklarında embriyo dişi karakterdeyse (XX) gonadal kabartının dış kısmına; erkek karakterdeyse (XY) iç kısmına yerleşirler. Göç ettikleri gonadal kabartıda embriyonun cinsine göre spermatogonia veya oogonialara farklılaşırlar (10). Cinsiyetin farklılanması, otozomal ve resesif etkili çok sayıda genin rol oynadığı bir süreçtir. Seksüel farklılaşma kısa kolunda (Yp11) SRY (Sex-determining Region Y) genini taşıyan Y kromozomu ile olmaktadır. Bu genin protein ürünü testis belirleyici faktördür (TDF: Testis Determining Faktör). TDF, cinsiyet organlarının belirlenmesini sağlar. Bu faktörün varlığında fetüsün cinsiyeti erkek fenotipinde, yokluğunda ise dişi fenotipinde olur (11).

Gestasyonun 12-15. haftalarında germ hücreleri mitoz ile oogonialara dönüşür (9). Oogonialar, ilk mayotik bölünmeye girip profaz evresinde durdukları dönemde primer oositlere dönüşürler. Gebeliğin ikinci yarısında başlayan hücre dejenerasyonu ile primer oositlerin büyük çoğunluğu atrezik hale gelir ve 7. ayda yüze yakın yerleşmiş, birkaçı dışında, çoğunluğu dejenere olur. Canlı kalan primer oositlerin tamamı, birinci mayoz bölünmeye girmiş ve her biri ayrı ayrı tek katlı yassı epitel hücreler ile çevrelenmiştir. Primer oosit, çevresindeki tek katlı yassı epitel hücreleriyle birlikte primordiyal folikül olarak adlandırılır (10, 11).

Doğumda, tüm primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz evresindedir. Ancak, bölünmenin metafaz ile devam etmesi gerekirken, primer oositler çekirdek kromatinin seyrek ve düzensiz bir yapılaşma gösterdiği birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten evresine girerler ve puberteye kadar dinlenme halinde kalırlar. Bu süre boyunca oositin olgunlaşması, folikül hücreleri tarafından salgılanan oosit olgunlaşmasını inhibe eden bir madde olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından baskılanır (10).

Folikülogenez

Folikülogenez, folikül olgunlaşması sürecidir. Ayrıca olgunlaşmamış oosit içeren somatik hücrelerin yoğun bir şekilde paketlenmesi olarak da tanımlanmaktadır (12, 13).

Doğumda ovaryumlardaki primer oositlerin sayısı, yaklaşık 700.000 ile 2.000.000 arasında değişmektedir. Puberteye kadar bu oositlerin büyük çoğunluğu atrezik hale gelir ve puberte başlangıcında bu sayı 400.000'e düşer. Bir kadının üreme periyodu içinde sadece 400-500 kadarı ovulasyonla atılır.

Pubertenin başlamasıyla, her menstrüel siklusta 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordiyal folikül olgunlaşmaya başlar. Birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten evresinde dinlenme halinde olan primer oosit büyümeye başlar; oositi çevreleyen yassı epitel hücreleri önce kübikleşir; bu durumdaki folikül, unilaminar primer folikül olarak adlandırılır. Daha sonra bu hücreler çoğalarak çok sıralı bir epitel tabakası oluşturur, çoğalan bu hücrelere granüloza hücreleri, oluşturdukları katmana ise granüloza hücre katmanı denir. Folikül artık bu haliyle multilaminar primer folikül olarak adlandırılır (10).

Granüloza hücreleri bazal lamina üzerine oturur. Etrafları teka folikül katmanı ile çevrelenmiştir (11). Folikül büyümeye devam ederken teka folikülünün hücreleri, içte salgı yapan hücrelerden oluşan teka interna ve dışta fibroblast benzeri hücreler içeren, bağ dokusundan oluşan, teka eksterna olmak üzere iki belirgin kata değişim göstermektedir (10).

Folikül, hipofizden salınan folikül stimüle edici hormon (FSH), büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) ile kalsiyum iyonlarının etkisine bağlı olarak büyür. Folikül büyüdükçe granüloza hücreleri arasındaki boşluklarda sıvı (likör folikülü) birikmeye başlar. Bu boşluklar birleşerek daha büyük boşlukları (antrum) oluşturur. Bu durumdaki foliküle sekonder folikül denir (14). Ovulasyona yakın evrede folikül giderek büyür ve olgun folikül olarak adlandırılan Graaf folikülü oluşur (11). İnsanlarda Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) artışının LH (Luteinleştirici Hormon) ve FSH seviyesini düzenlediği ve bu sayede folikülü ovulasyona götürdüğü bilinmektedir. Pubertede GnRH salınımının başlaması hipofizden FSH ve LH salınımını stimüle eder. Hipofiz hormonlarının etkisiyle ovaryumda 28-30 gün süren menstrüel döngü şekillenir. Her döngüde FSH etkisiyle 5-15 adet folikül gelişmeye başlasa da bunlardan ancak bir tanesi tam anlamıyla olgunluğa erişebilir. Diğerleri atrezik hale gelir. Hangi folikülün o ay büyüme evresine gireceği ve hangisinin dominant folikül olarak seçileceğini

belirleyen faktörler bilinmemektedir (15). Folikül olgunlaşması tamamlanırken primer oosit birinci mayoz bölünmesini tamamlayarak büyüklükleri farklı, ancak her biri 23 çift (2n DNA) kromozom içeren 2 yavru hücre oluşturur. Birinci mayoz bölünme ovulasyondan hemen önce tamamlanır. Bundan hemen sonra sekonder oosit DNA eşleşmesi olmadan II. mayoz bölünmeye girer. Oosit II'de bölünme mekiği oluşur. Kromozomlar ovulasyondan 3 saat önce metafaz plağında dizildiklerinde ovulasyon gerçekleşir ve oosit ovaryumdan dışarıya atılır. İkinci mayoz bölünme ancak oosit II, bir spermiumla döllenmesi zaman tamamlanır. Döllenme gerçekleşmez ise, ovulasyondan 24 saat sonra oosit dejenerer olur (11).

Folikülogenez, erkeklerde sürekli devam eden spermatogenezin aksine; overlerde var olan foliküllerin olgunlaşma aşamasında hormonal değişimleri cevaplamada yetersiz kaldığı durumda sonlanmaktadır. Foliküllerdeki bu azalma menapozun başlangıcı olarak kabul edilmektedir (16).

PREMATÜR OVARYEN YETMEZLİK

Tanım

Prematür ovaryen yetmezlik (POF), kadınlarda 40 yaşından önce gonadotropin yüksekliğine düşük östrojen seviyesinin eşlik ettiği erken ovaryen disfonksiyondur. Bu durum, primer veya sekonder amenore şeklinde görülebilmektedir. Olgularda en az 4 ay süreyle serum gonadotropin düzeylerinde artış ve östrojen düzeyinde düşüklük olması gerekmektedir (1). Tanıyı kesinleştirmek için en az bir ay arayla iki kez ölçülen FSH düzeyinin 40 IU/L'den yüksek olması gerekmektedir (17). Normal kromozom yapısına sahip kadınlarda insidansı 30 yaşının altındakilerde %0.1, 35 yaş civarında %0.4 ve 40 yaş civarında ise %1'dir (1).

POF'lu olgularda yüksek gonadotropin düzeylerine rağmen, aralıklı olarak östrojen üretimi ve ovulasyon olabilmektedir. Bu nedenle POF, erken doğal menapoz olarak değerlendirilmemelidir (18). Doğal menapoz, kadınlarda belli bir patolojik nedene bağlı olmaksızın 12 ay boyunca menstrüel sikluslarının kesintiye uğraması olarak tanımlanmaktadır. Menapoz; ovaryen foliküllerin tamamı veya tamamına yakınında azalmaya bağlı olarak yüksek FSH düzeyinin ve hipoöstrojeneminin sonucu olarak meydana gelmekte ve ortalama başlangıç yaşı 51.4'tür (19).

Tanı

POF tanısı, 40 yaşından önce kadınlarda irregüler menstrüel sıkluslara postmenapozal dönemde gözlenen FSH düzeyinin eşlik etmesi ile konulmaktadır. Ara ara ovaryen fonksiyon ve spontan menstrüasyon olabileceğinden tanı için amenore şart değildir. Bu durum hastaların doktora geç başvurmasına neden olmaktadır (18, 20).

POF genelde daha önce düzenli olan menstrüel sıkluslarda düzensizleşme ile kendini gösterir. Bir kız çocuğunun 15 yaşında iken halen adet görmemesi (primer amenore) ya da adet gören bir kadında adetlerin 4 ay veya daha uzun süre ile kesilmesi (sekonder amenore) teşhis açısından şüphe uyandırmalıdır. Bu tür şikayetleri olan bireylere tanıya yönelik inceleme yapılmalıdır (21). Çünkü POF, primer amenorede %10-28, sekonder amenorede ise %4-18'inin altında yatan sebebidir (22).

Sekonder amenore ile başvuran hastalarda ilk olarak gebelik dışlanmalıdır. Gebelik dışlandıktan sonra serum FSH, LH, TSH (Tiroid Stimulan Hormon), östradiol ve prolaktin düzeyi ölçümleri yapılmalıdır (23). Menapozal düzeyde FSH tespit edilen hastalarda ovaryen yetmezliği doğrulamak için 4-6 hafta sonra FSH ölçümü tekrarlanmalıdır (24). Şekil 1'de POF tanısının doğrulanması için izlenen algoritim gösterilmektedir.

<40 yaş + 3 ay süren amenore



Gebelik testi negatif



TSH, FSH,

Prolaktin, Östradiol



FSH > 40 IU/L,



1 ay sonra kontrol



FSH > 40 IU/L,



Prematür Ovaryen Yetmezlik

Şekil 1: POF tanısının laboratuvar testleri ile doğrulanması için izlenen algoritim (2).

POF kliniği zamanla oluşan bir hastalıktır. Bazı hastalarda kısa süreliğine ovaryen fonksiyonlar geri gelebilir. POF, ovaryen yetmezliğe bağlı 4 dönemden oluşur. Bu basamaklar kalıcı değildir ve bir sonraki aşamaya geçiş göstermektedir. Ovaryen yetmezliğin aşamaları gizli POF, biyokimyasal POF, aşikar POF ve son aşama olan POF`dur (25). POF`un aşamalarının özellikleri tablo 1`de gösterilmiştir.

Tablo 1: POF`un aşamaları (25)

	Normal	Gizli POF	Biyokimyasal POF	Aşikar POF	POF
Serum FSH Düzeyi	Normal	Normal	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Menstrüel Siklus	Düzenli	Düzenli	Düzenli	Düzensiz veya yok	Yok
Fertilite	Normal	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Yok

POF, genç kadınlar için kabullenmesi zor bir tanıdır. Bu durumdan kişinin hem fiziksel, hem de ruh sağlığı, cinsel hayatı, üreme kapasitesi ve sosyal yaşamı etkileneceğinden hasta tanı konusunda bilgilendirilirken hasta psikolojisini dikkate alan, iyi planlanmış hassas bir yaklaşım uygulanmalıdır (23, 26). Hastalarda kendi yaş grubundaki kontrollerle kıyaslandığında kardiyovasküler hastalık, felç, osteoporoz görülme riski artmıştır. Ayrıca seks hormonlarının eksikliği de ürojinekolojik sistemde negatif etkilere neden olacaktır (26). Hastaya tanı anlatılırken geçici remisyon ve spontan gebelik şansı gibi POF'u normal menapozdan ayıran özellikler üzerinde de durulmalıdır (27).

Prematür Ovaryen Yetmezliğin Nedenleri

POF'un etiolojisinde rol oynayan pek çok etken vardır. Bazı vakalarda durum genetik anomaliler, toksinlere maruziyet ve otoimmün hastalıklarla açıklansa da vakaların bir çoğunda ovaryen yetmezliğe yol açan durum saptanamamakta ve idiyopatik olarak sınıflandırılmaktadır (28). Tablo 2`de POF'un nedenleri gösterilmiştir (2, 29)

Tablo 2: POF'un nedenleri (2, 29)

- 1. İatrojenik**
 - a. Cerrahi
 - b. Kemoterapi
 - c. Radyoterapi
- 2. Otoimmün Hastalıklar**
 - a. Otoimmün polienodokrin sendrom
 - i. Hipotiroidi, adrenal yetmezlik, hipoparatiroidi ve tip 1 diyabetes mellitus
 - b. Kuru göz sendromu
 - c. Myastenia graves
 - d. Romatoid artrit
 - e. Sistemik lupus eritematozis
 - f. Konjenital timik aplazi
- 3. Enfeksiyon**
- 4. Çevresel toksinler**
- 5. POF'un genetik nedenleri**
 - a. X kromozomu yapısal ve sayısal anomalileri
 - i. Trizomi X
 - ii. Monozomi X
 - iii. İzokromozom X
 - iv. Otozomal ya da X kromozomu translokasyonları
 - b. 46,XX karyotip ile ilişkili durumlar
 - i. Gonadal disgenezi
 - ii. Serebellar ataksi ve gonadal disgenezi
 - iii. Gonadal disgenezi ve multiple malformasyon sendromları
 - c. Over gelişimi üzerinde etkili genler
 - i. GALT (Galaktozil 1-fosfat üridiltransferaz) geni (9p13)
 - ii. CYP17A1 geni (10q24.32)
 - iii. CYP19A1 geni (15q21.2)
 - iv. FSHR (Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü) ve LHR (Luteinleştirici Hormon Reseptörü) geni (2p16.3)
 - v. INHA (İnhibin alfa) geni (2q35)
 - vi. USP9X (Ubiquitin -spesifik proteaz 9, X bağımlı) geni (Xp11)
 - vii. ZFX (Zinc finger X) geni (Xp22.11)
 - viii. BMP (Bone morphogenetic protein) geni (Xp11.2)
 - ix. SHOX (Short stature homeobox) geni (Xp22)
 - x. XIST (X inactivation spesifik transcript) geni (Xq13)
 - xi. DIAPH2 (Diaphanous homolog 2) geni (Xq21.33)
 - xii. POF1B (Premature ovarian failure 1B) geni (Xq21)
 - xiii. XPNPEP2 (X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound) geni (Xq25)
 - xiv. FMR1 (Fragile site mental retardation 1) geni (Xq27.3)
 - d. Diğer
 - i. Blefarofimozis, pitozis ve epikantus inversus tip 1 (BPES) (FOXL2: Forkhead Transcription Factor 2) (3q23)
 - ii. Prematür ovaryen yetmezlik 5 (NOBOX: Newborn Ovary Homeobox) (7q35)
 - iii. Ovaryen yetmezlikle birlikte beyaz cevher lökodistrofisi (translasyon başlama faktörü E1F2B' yi kodlayan genler) (14q24, 12.kromozom, 1p34.1, 3q27, 2p23.3)
 - iv. Konjenital glikolizasyon bozuklukları, tip 1a (16p13.3-p13.2)

İatrojenik Nedenler

Neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan kemoterapi (KT) ve radyoterapi (RT) POF`a yol açan nedenlerden biridir. Her iki tedavi şekli de over fonksiyonlarında önemli derecede azalmaya yol açar. Foliküler atrezisinin oranı, overlerin kemoterapötik ajana veya radyasyona direkt maruziyet miktarına bağlıdır (2).

Kemoterapi ilaçlarının bir çoğu bölünen hücreler üzerinden etki gösterir. Dolayısıyla overlerde kemoterapötikler, bölünmeyen oositlerden ziyade granüloza ve teka hücrelerini etkiler. Bu ilaçların over fonksiyonundaki etki yelpazesi çok geniş olup overlerde herhangi bir etkiye neden olmamaktan kalıcı hipogonadizme kadar etkileri değişebilmektedir (30). Kemoterapi almış kadınların overlerinde, primordiyal folikül sayısı normal veya hafif azalmış olmakla beraber daha geniş matür foliküllerin sayısı önemli derecede azalmıştır. Bu durum, asıl etkinin foliküler gelişim üzerine olduğunu göstermiştir (31, 32). Tedavi sonrası ovaryen dokuya yapılan histolojik incelemede dokuda vasküler zarar, kortikal fibrozis ve folikül sayısında azalma saptanmıştır (2). Histolojik bulgularla uyumlu olacak şekilde klinikte, özellikle 40 yaşından küçük kadınlarda kemoterapi esnasında gonadotropin yüksekliğinin eşlik ettiği amenore gözlenmektedir. Kemoterapi kesildikten sonra hastalarda menstrüasyon ve bir kısmında da fertilitte, bir kaç aydan yıllara varan sürede tekrar geri kazanılabilir (33).

Ovaryen rezervi saptamak için Anti Mülleryan Hormon (AMH), inhibin ve FSH düzeyi ölçümü kullanılmaktadır. Kemoterapi esnasında AMH`un serum konsantrasyonu hızlıca azalmaktadır. Bu nedenle AMH seviyesinin ölçümü ovaryen toksisiteyi değerlendirmek için kullanılabilir (34, 35). KT öncesi hastalarda LH ve FSH sekresyonu GnRH agonisti ile süprese edilirse ovaryen hasar azaltılabilir. Bunun dışında oral kontraseptiflerin de az bir miktar koruyucu olduğu kaydedilmiştir (2).

Ovaryen doku, radyoterapiye kemoterapiden daha hassastır. Hızlı bölünen teka ve granüloza hücrelerinin tahribi ya da primordiyal foliküllerde radyoterapinin meydana getirdiği DNA hasarı atreziyi hızlandırarak foliküler havuzun hızla azalmasına neden olabilir (36). Puberte öncesinde uygulanan RT`ye bağlı POF gelişme riski ileriki yaşlarda uygulanana göre daha azdır (37). Genç kadınlarda

radyoterapiden sonra geçici amenore görülebilmekle beraber 6 ila 18 ay sonra yeni primer foliküller geliştigiinden bu durum düzelmektedir (38).

40 yaş üzeri bir kadında 600 rad (6Gy) ve üzeri dozda radyasyon kalıcı primer hipogonadizme neden olur (39). Hodgkin lenfomada pelvise direkt uygulanan radyasyon tedavisi ovaryen foliküllerde atrezi gelişimini hızlandırmaktadır (2). Yapılan bir çalışmada; Hodgkin lenfomalı kadınlara uygulanan pelvis ışınlaması ve kombine KT tedavisinde %0 ila 68 oranında ovaryen yetmezlik gelişme riskinin arttığı saptanmıştır (40).

RT alan hastaları ovaryen hasardan korumak için çeşitli yöntemler denenmiştir. Overlerin cerrahi olarak başka bir bölgeye naklinin (ovaryen transpozisyon) ve GnRH analoglarının kullanımının ovaryen fonksiyonlardaki kaybı azalttığı saptanmıştır (41, 42). Ovaryen transpozisyon yolu ile overleri RT sahasından uzaklaştırılan hastaların %60-100'ünde over fonksiyonlarının korunduğu gösterilmiştir (43). Kriyoprezervasyon ise diğer bir alternatiftir. Ancak uygulama protokollerindeki ve ekipmanlardaki tüm gelişmelere rağmen RT, kanser tedavisi alan hastalarda POF gelişimi açısından en önemli risk faktörü olmaya devam etmektedir(44).

Tüm pelvik cerrahilerin gerek ovaryen kan akımını bozarak gerekse pelvik bölgede inflamasyona neden olarak ovaryen hasarlanmaya yol açma potansiyeli vardır. Geçirilmiş tek taraflı ooferektomi öyküsünün erken menapoz riskini arttırdığı daha önceki çalışmalarda saptanmış (45) olup bu durum folikül sayısının azalması, ovaryen kan akımının bozulması ve pelvik inflamasyon gibi nedenlerle açıklanmaktadır (46). Ayrıca uterin arter embolizasyonu da overlerin kanlanmasını bozarak POF`a neden olabilmektedir (47). Overler korunarak histerektomi yapılmış hastaların ortalama menapoz yaşının (45.4±4.0) opere olmamış hastalarla (49.5±4.04) kıyaslandığında anlamlı ölçüde daha düşük olduğu saptanmıştır (48).

Otoimmün Hastalıklar

POF hastalarının %10-20'si otoimmün hastalık ile beraberdir (49). POF ile ilişkili olarak çok sayıda endokrin (tiroidit, adrenal hastalıklar, hipoparatiroidi, diabetes mellitus ve hipofizit) ve endokrin dışı (kronik kandidiyazis, idiyopatik trombositopenik purpura, vitiligo, alopesi, otoimmün hemolitik anemi, pernisiyöz anemi, sistemik lupus eritematozis, romatoid artrit, crohn hastalığı, sjögren sendromu, myasthenia gravis, primer biliyer siroz, kronik aktif hepatit) otoimmün tablo bildirilmiştir (50, 51). Endokrin otoimmün ovaryen yetmezlik Addison hastalığı

ile birlikte olabilmektedir. Bu duruma over ve adrenallere karşı oluşan otoantikörlerin benzerliğinin yol açtığı düşünülmektedir. Ancak otoimmün kaynaklı POF`ta çoğu zaman antiovaryen antikörler mevcuttur. Literatürde FSH reseptörü, LH reseptörü, zona pellüsida ve diğer bazı ovaryen antijenlere karşı oluşan ovaryen antikörler rapor edilmiştir (52). Vücuttaki doğal antikörler ile ovaryen antikörler çarpaz reaksiyon verebileceğinden, ovaryen antikör testlerinin üçte bir oranında yalancı pozitiflik oranı vardır (53). Ovaryen antikörleri değerlendirmek için farklı yöntemlerin bulunması ve antikör spesifitesinin olmamasından dolayı antikörlerin belirlenme oranı %7-69 gibi geniş bir aralıkta saptanmıştır (54). Bu nedenle POF hastalarında ovaryen antikör tespit edilmesi, etiolojide otoimmünitenin olduğunu hatırlatmalı ancak ovaryen antikörün varlığına göre de overlerdeki hasarın kesin otoimmün kaynaklı olduğunu düşündürmemelidir.

İdiyopatik POF hastalarının periferik kanlarında, aktive olmuş T lenfosit sayıları artmıştır (51). Graves hastalığı, insüline bağımlı diyabet, Addison hastalığı gibi diğer bazı otoimmün endokrinopatilerde de benzer durum vardır. Ancak yapılan çalışmalarda; postmenapozal kadınlarda aktive T lenfosit sayısının arttığı ve östrojen replasman tedavisi ile aktive T lenfositlerin sayısının azaldığı saptanmıştır. Dolayısıyla aktive T lenfosit sayısındaki artışın ovaryen yetmezliğin sebebi mi yoksa bir sonucu mu olduğu net değildir (54).

Hashimoto tiroiditi başta olmak üzere tiroidin otoimmün hastalıkları POF`lu hastaların %14-27`sinde tanı anında mevcuttur (51, 55). Bu nedenle hastaların tirotropin seviyeleri ve tiroid peroksidaz antikörleri açısından incelenmesi tanıda fayda sağlayacaktır (28). POF hastalarının % 4`ünde adrenal antikörler pozitif olup bu hastaların yarısında adrenal yetmezlik gelişmesi açısından risk vardır (56). Bu nedenle hastalar adrenal antikör açısından da taranmalıdır (57).

POF`ta oküler hastalıkların sıklığı artmıştır. POF hasta grubuyla kontrol grubu karşılaştırıldığında, hasta grubunda kuru göz sendromunun insidansının arttığı saptanmıştır (58). Tiroid ve adrenal kaynaklı otoimmün hastalıklar dışındaki diğer otoimmün hastalıklar nadir görüldüğü için bu hastalıklar açısından rutin test yerine semptomaya dayalı yaklaşımda bulunmak daha uygundur (28).

Enfeksiyon

Gonadları tutabilen bazı enfeksiyöz hastalıklar da POF`a neden olabilmektedir. Kadınlarda puberte sonrası geçirilen kabakulak enfeksiyonu overleri tutma eğiliminde olup kabakulak geçiren kadınların %3-7`sinde POF gelişebileceği

gösterilmiştir (36). Bu hastaların çoğunda enfeksiyon iyileştikten sonra ovaryen fonksiyonlar geri kazanılmaktadır (59). Varisella enfeksiyonu, POF vakalarının %3.5`undan sorumlu tutulurken (20), immunsuprese hastalarda sitomegalovirüs (CMV) (60) ve insan immun yetmezlik virüsü (HIV) ooforit etkeni olabilmektedir (2).

Çevresel Toksinler

Çevresel toksinler, sigara, alkol, yiyecekler ve strestir (20). Çevresel toksinler; GnRH`nun, hipotalamustan pulsatil salınımının baskılanmasına ve direkt oosit sayısının azalmasına neden olarak ovaryen disfonksiyona yol açarlar (61).

Menapoz yaşını etkileyen en önemli çevresel etken sigaradır. Sigara dumanının içeriğini polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitröz bileşikler, aromatik aminler ve nikotin oluşturmaktadır. Sigaranın içeriğindeki poliaromatik hidrokarbonların overlere toksik olduğu düşünülmektedir. Sigara, primordiyal foliküllerde hasarlanmaya neden olmaktadır. Ayrıca östrojenin karaciğerdeki metabolizmasını hızlandırarak ve hipotalamopituiter aks üzerine etki ederek hormonal dengesizliğe yol açmaktadır (62). Sigara ile POF arasında kesin bir bağlantı gösterilememiştir. Fakat sigara içenlerle içmeyenler kıyaslandığında, sigara içenlerin içmeyenlere göre 1-4 yıl daha erken menapoza girdiği bildirilmiştir (44). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, fareler 8 hafta sigara dumanına maruz bırakılmış ve daha sonra primordiyal folikül sayısına ve over hacmine bakılmıştır. Çalışmanın sonunda primordiyal folikül sayısında azalma ve over hacminde anlamlı ölçüde azalma olduğu saptanmıştır (63).

Genetik Nedenler

POF hastalarının genetik açıdan araştırılması sonucunda, X kromozomunun yapısal ve sayısal anomalileri ile birlikte hem X kromozomu üzerinde hem de otozomal kromozomlar üzerinde POF ile ilişkili pek çok gen belirlenmiştir (5). Genom boyu çalışmalarında otozomal kromozomlardan 5, 6, 13, 19 ve 20. kromozomlar üzerinde doğal menopoz yaşını etkileyen genlerin olduğu saptanmıştır (64, 65).

1) X Kromozomunun Sayısal ve Yapısal Anomalileri

X kromozomu, POF oluşumunda en önemli kromozomdur. X kromozomunun hem yapısal hem de sayısal anomalileri POF`a neden olmaktadır (5).

Monozomi X (Turner Sendromu : TS), ilk olarak 1938 yılında tanımlanmıştır (66). Turner sendromu, kadınlarda en sık görülen seks kromozom anomalisi olup

2500 canlı doğumda bir görülmektedir (67). Moleküler çalışmalar Turner sendromlu olgulardaki X kromozomu monozomisinin hastaların üçte ikisinde maternal, üçte birinde ise paternal kaynaklı olduğunu göstermiştir (68). Turner sendromlu olguların yarısından fazlasında periferik kan lenfositlerinden yapılan kültürlerde mozaik karyotip bulunmaktadır (69). X kromozomu monozomisi, paternal gamette ya da erken embriyonal bölünme aşamasında iken, mayoz sırasında seks kromatidlerinin ayrılmamasından kaynaklanmaktadır. Sonraki dönemlerde olan ayrılma kusuru, genellikle mozaisizme yol açmaktadır. Mozaik vakalarda fenotip daha hafif olup bu hastaların %40'ı gonadal yetmezlik gelişmeden önce spontan olarak puberteye girebilmektedirler (70).

Turner Sendromu kısa boy, yele boyun, düşük saç çizgisi, yelken göğüs, kubitus valgusa primer amenore, gonadal disgenezi, sekonder seks karakterlerinin geri kalması, bilişsel bozukluk, kardiyak ve renal anomalilerin eşlik etmesi ile karakterizedir. Turner Sendromlularda infertilite, mayotik profazda pakiten evresinden hemen önce başlayan oosit kaybından kaynaklanmaktadır (71). Bu da göstermektedir ki; normal kadın fertilitesi ve normal over fonksiyonları için iki adet fonksiyonel X kromozomuna gereksinim vardır. Ayrıca erken ovaryen süreklilik için X kromozomunun üzerindeki genlerin çift dozda eksprese edilmesi gerekmektedir (72).

X kromozomundaki izokromozom, ring kromozom veya terminal delesyon gibi yapısal anormallikler de Turner Sendromu fenotipine neden olabilmektedir (73). X kromozomun uzun kolunun izokromozomu en sık görülen X kromozomu yapısal anomalisidir. Normal bir hücre bölünmesinde sentromer longitudinal olarak bölünmektedir. İzokromozom Xq'da ise sentromer transvers düzlemde anormal şekilde bölünür ve aynı genleri içeren, aynı kromozom kollarının oluşturduğu bir kromozom oluşur (74).

Y kromozomu üzerindeki SRY geninin delesyonunda da nadiren Turner sendromu fenotipi meydana gelmektedir (75). Y kromozom mozaisizmi bulunan Turner sendromu olgularında (45,X/46,XY gibi) disgenetik gonadlardan gonadoblastom gelişme riski vardır (76).

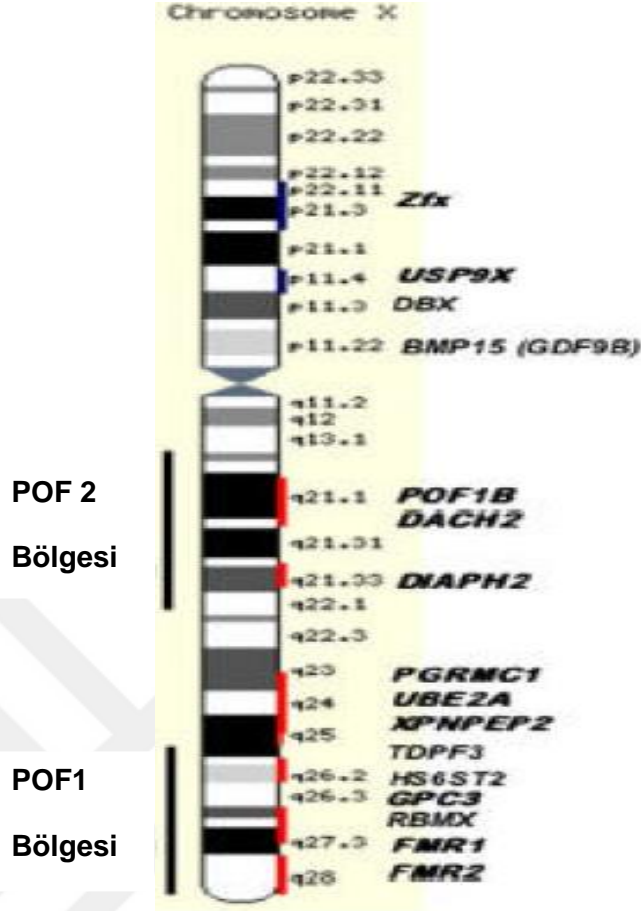
Trizomi X, kadınlarda fazladan X kromozomunun bulunmasıyla karakterize bir çeşit seks kromozom anöplidisi olup 1000 canlı kız doğumda 1 görülür. Olguların yalnızca %10'u tanı alır. Her ne kadar en sık görülen şekli 47,XXX karyotipi olsa da olguların %10'unda 46,XX/47,XXX; 47,XXX/48,XXXX veya 45,X'in eşlik ettiği 45,X/47,XXX; 45,X/46,XX/47,XXX gibi çeşitli mozaik karyotiplerle de görülebilir (77). Mozaik trizomi X olguları postzigotik ayrılmama veya postzigotik trizomiden kurtulma

mekanizması ile oluşabilmektedir (5). Klinik tabloda epikantal katlantı, hipertelorizm, yukarı doğru palpebral aralıklar, klinodaktili, pes planus, pektus ekskavatum, hipotoni ve artmış eklem fleksibilitesi gözlenmektedir (78). Hastaların çoğunda ciddi tıbbi problem görülmemekle birlikte bazılarında tek böbrek, renal displazi ve ovaryen malformasyon gibi genitoüriner anomaliler görülebilmektedir (79). Trizomi X vakalarının çoğunda puberte başlangıcı ve seksüel gelişim normaldir. Fakat literatürde ovaryen veya uterin disgenezisi olan trizomi X'li olgular da bildirilmiştir (77).

POF hastalarında yapılan çalışmalarda ise %3'ünde trizomi X saptanmıştır. POF saptanan trizomi X olgularının büyük bir kısmında otoimmün tiroid hastalıkları başta olmak üzere otoimmün hastalıklara yatkınlık da vardır (80). Trizomi X olgularında fertilité ile ilgili çalışma bulunmamakla beraber pek çok başarılı gebelik bildirimi vardır. Bu nedenle trizomi X olgularına POF ve genitoüriner anomaliler eşlik etmediği durumlarda fertilitenin etkilenmediği düşünülmektedir (78).

2) POF1 ve POF2 Bölgeleri

POF'lu hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda, X kromozomunun q kolunda POF için 2 major bölge saptanmış olup bu bölgeler POF1 (Xq26.2-q28) ve POF2 (Xq13.3-q22) olarak adlandırılmıştır (81). POF1 bölgesinin distal delesyonlarında 24-39 yaşlarında POF gelişirken (82), POF 2 bölgesini kapsayan delesyonlarda 16-21 yaş gibi daha erken yaşlarda POF gelişmektedir (83). Şekil 2'de bu bölgeler gösterilmiştir.



Şekil 2: İnsan X kromozomuna ait idiogram (81). Kromozomun sol tarafında POF1 ve POF2 bölgelerinin kromozomal lokasyonları gösterilmektedir. Sağ tarafta ise literatüre göre haritalanmış aday POF genleri yer almaktadır.

POF1 Bölgesi (Xq26.2-q28)

1980'li yıllarda POF'lu hastalarda yapılan bir çalışmada X kromozomunun q kolunda küçük bir delesyon belirlenmiştir. Buna bağlı olarak; Xq26-qter bölgesinde insan folikülogenezinde fonksiyonel genlerin olduğu saptanmıştır (81). POF hastalarında yapılan çalışmalarda Xq bölgesi FISH propları kullanılarak daraltılmış ve bu bölge POF1 bölgesi (Xq26.2-q28) olarak adlandırılmıştır (84). POF1 bölgesinin 22 Mb uzunluğunda olduğu ve dizi analizine göre hepsi POF için aday gen olabilecek 190 gen içerdiği belirlenmiştir. Bu bölgedeki POF etiyolojisinde rol oynayan en önemli gen Frajil X Mental Retardasyon 1 (FMR1)'dir. FMR1 dışındaki diğer önemli genler ise Heparan Sulfat 6-OSulfotransferaz 2 (HS6ST2), Transkripsiyon Faktör DP Family member 3 (TDPF3) ve Glypikan 3 (GPC3)'tür (81).

POF2 Bölgesi (Xq13.3-q22)

Xq13.3-q22'de lokalize olan diğer POF bölgesi olan POF2 bölgesi ilk olarak babadan kaynaklanan 46,X,t,(X;6)(q13.3-21;p12) translokasyonuna sahip bir hastada tariflenmiştir (83). Kırılma noktalarının haritalanması ile yapılan moleküler çalışmalarda POF2 bölgesindeki aday genler belirlenmiş olup bu genler; Diaphanous Homolog 2 (DIAPH2), Dachshund Homolog 2 (DACH2) ve Premature Ovarian Failure 1B (POF1B)'dir. DIAPH2 genindeki değişiklikler, meyve sineğinde spermatogenez ve oogenezi etkileyerek infertiliteye yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenle DIAPH2 geninde oluşacak herhangi bir değişikliğin insanlarda da POF'a neden olacağı düşünülmektedir. Diğer iki genden POF1B'in erken ovaryen gelişimden, DACH2'nin ise foliküler farklılaşma sürecinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Mutasyon analiz çalışmaları ile DACH2 geni ile POF fenotipi arasında ilişki gösterilmiş fakat POF1B ile henüz bir ilişki gösterilememiştir (81).

3) Over Gelişimi Üzerinde Etkili Diğer Genler

Enzim eksiklikleri östrojen sentez bozukluklarına ve ergenlikte gelişim bozukluklarına neden olarak, primer amenore ve ovaryum yetmezliğine sebep olabilmektedir (85). CYP19A1 geni tarafından eksprese edilen aromataz enzimi, androjenlerin östrojene dönüşümünü katalizlemekte ve eksikliğinde kadınlarda klitoral hipertrofi ve primer amenore gözlenmektedir (86). 17 α -hidroksilaz/17,20 desmolaz enzim eksikliği ise CYP17A1 gen mutasyonu sonucu meydana gelmektedir. Bu enzim eksikliğine bağlı olarak da pregnenolon 17 α hidroksipregnenolona dönüştürülemez. Kortizol, androstenedion, testosteron ve östrojen üretilemez. Bu durum 46,XX karyotipindeki kadınlarda dış genital organların gelişimini etkilemezken pubertede sekonder seks karakterlerinin gelişiminin geri kalmasına neden olur. Hastalık 10q24-25 bölgesinde lokalize olan CYP17A1 genindeki otozomal resesif mutasyon sonucu oluşmaktadır (87).

POF etiolojisindeki en önemli enzim eksikliklerinden diğeri galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (GALT) enziminin eksikliğidir. Bu durum galaktozemi klinik tablosuna neden olur. Nadir görülen otozomal resesif geçişli bir bozukluk olup, 9p13 bölgesinde lokalize olan GALT genindeki mutasyon sonucu gerçekleşir (88). Hastalarda galaktoz ve metabolitlerinin vücutta birikmesi sonucunda hepatoselüler, oküler, renal ve nörolojik hasarlar gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda, biriken galaktoz ve metabolitlerinin toksik etki yaparak overde hasar yaptığı gösterilmiştir

(89). Hastaların over biyopsilerinde primordiyal foliküllerin bulunduğu ancak foliküler büyüme ve gelişmede anormallikler olduğu saptanmıştır (90). Galaktozeminin diğer bir etkisi de gonadotropinlerin glikolizasyonunun etkilenerek biyolojik aktivasyonlarının azalmasıdır. FSH`un reseptörüne afinitesi yeterli düzeyde olsa da adenilat siklaz aktivasyonlarının yetersiz kaldığı bildirilmiştir (91). 47 galaktozemili kadın hastanın katıldığı bir çalışmada, kadınların %81`inde POF geliştiği saptanmış ve bu kadınların yaklaşık %83`ünün sekonder amenore şikayeti ile başvurduğu bildirilmiştir (92).

Puberteden menapozu kadar seks steroidlerinin teka hücrelerinden salınımını FSH ve LH kontrol eder. FSHR (Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü) geni 2p16.3 bölgesinde lokalizedir ve 10 eksondan oluşmaktadır. FSH reseptörü 7 adet transmembran segment içermekte olup erkek ve kadın reproduktif siklusunda en önemli hormonlardan biri olan FSH`ı bağlar (81). FSHR genindeki mutasyonlar sonucu, reseptörün fizyolojik fonksiyonu bozulmakta ve mutasyon çeşidine göre primer amenore, sekonder amenore ya da sekonder seks karakterlerinin gelişiminde bozukluk gibi klinik tablolara yol açmaktadır (93).

Luteinleştirici hormon glikoprotein yapıdadır. Yapısal olarak; α ve hormon spesifik β alt birimi olmak üzere 2 farklı alt birimden oluşan bir heterodimerdir. LH`nın, korpus luteumdan progesteron salınımının devam ettirilmesi, steroidogenezin uyarımı ve oosit maturasyonu aşamalarında önemli fonksiyonları vardır. LH ayrıca ovulasyonu ve ovaryen folikülün luteinizasyonunu uyarır (1). Anormal LH salınımı, anovulasyona, luteal faz yetmezliğine, erken oosit maturasyonuna bağlı menstrüasyon düzensizliklerine, polikistik over sendromuna, tekrarlayan gebelik kayıplarına ve infertiliteye neden olabilmektedir (94). POF`da etkili diğer bir gen olan LHR genidir. LHR geni ve POF arasındaki ilişki, Leydig hücre hipoplazisi görülen erkeklerde yapılan aile inceleme çalışmalarında POF hastalarının saptanmasıyla ortaya çıkmıştır (95). Bu hastalarda oligomenore ya da sekonder amenoreye ultrasonografide çok sayıda antral folikül görünümü eşlik eder. Over biyopsisinde preovuluar aşamaya kadar tüm foliküler gelişim aşamaları görülürken tipik olarak ovulasyon gerçekleşmez (96).

Kadınlarda reproduktif siklusun en önemli düzenleyicilerinden biri inhibinlerdir. İnhibinler bir adet α alt birimi ve β A ile β B olmak üzere 2 adet β alt biriminden meydana gelmektedir. β alt biriminin içerdiği proteine göre İnhibin α veya İnhibin β olarak adlandırılmaktadır. İnhibin α ve inhibin β , menstrüel siklusun farklı aşamalarında etkilidir (1). İnhibin α , siklusün ortasında yükselir. Bu nedenle inhibin

α 'nın preovulatar folikül tarafından üretilip sekrete edildiği düşünülmektedir. İnhibin β ise foliküler fazın ortasında yükselmektedir (97). İnhibinler, hipofizer FSH sekresyonunu azaltan granüloza hücrelerince üretilir (98). Hormonal fonksiyonunun yanı sıra inhibinler büyüme ile diferansiyasyon faktörü (99) ve folistatin ekspresyonunun düzenleyicisi olarak da işlev görmektedir (100). Premenapozal kadınlarda, menapoz bulguları belirmeden önce inhibin düzeylerinde azalma olduğu saptanmıştır. Bu durumun premenapozal dönemde over foliküllerindeki azalmaya bağlı olduğu belirlenmiş ve serum inhibin seviyesinin over folikül kapasitesini göstermek için ideal bir marker olduğu gösterilmiştir (101). İnhibin α (INH α) geni 2q33-qter bölgesinde lokalize olup 2 eksondan meydana gelmektedir. POF hastalarında INH α geni sekanslandığında ikinci eksonda bir polimorfizm saptanmış olup bu polimorfizm ile INH α geninin eksprese ettiği proteinde p.A257T değişimi olmaktadır. Bu polimorfizm 43 POF hastasının %6.9'unda (3 olguda) görülürken 150 sağlıklı kontrol hastasının ancak birisinde görülmesi POF ile ilişkilendirilmesini sağlamıştır (102). Daha sonra İtalya ve Hindistan'da yapılan çalışmalarda bu bulgular desteklenirken Kore popülasyonunda böyle bir polimorfizm saptanmamıştır (81). İtalya'da yapılan bir çalışmada INH α p.A257T değişimi ile sporadik ve ailevi POF arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir (103). Ancak yapılan geniş bir kohort çalışmasında bu varyantın sıklığının POF hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık göstermediği belirtilmiştir (104).

FMR1 GENİ

FMR1 Gen Yapısı

FMR1 geni Xq27.3 bölgesinde lokalize, 38 kb genomik dizi boyutundadır. 17 eksondan meydana gelmektedir ve transkripti yaklaşık olarak 4 kb'lık mRNA boyutundadır (3). Bu genin eksprese ettiği protein ürünü Frajil X Mental Retardasyon Proteini (FMRP) (105) olup terminal eksonların alternatif kırılmasıyla FMR1 protein izoformları oluşmaktadır (106). FMRP birçok dokuda görülürken, en çok nöronlarda ve testiste eksprese olmaktadır. Hücre içerisinde sitoplazmada bulunan FMRP heterojen nükleer ribonükleoproteinler (hnRNP) olarak bilinen RNA - bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir. FMRP hedef mRNA'ların transportu (nükleustan sitoplazmaya, sitoplazmadan dendritlere ve postsinaptik protein sentez bölgelerine) ve translasyonunun düzenlenmesinden sorumludur (107).

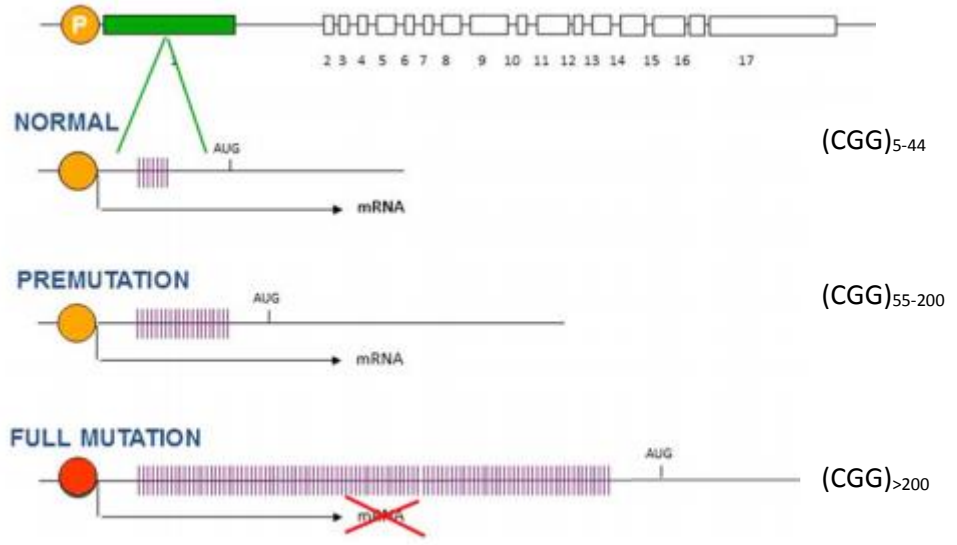
FMR1 geninin ilk eksonunun 5'UTR bölgesi, stabil olmayan CGG tekrarları içermektedir (3). CGG tekrarları CpG adasının 250 bp gerisindedir. CGG tekrarları

arasında AGG trinükleotid tekrarları bulunmakta (108) ve bu tekrarlar diziyi sağlamlaştırarak replikasyon sırasında kaymayı önlemektedir (109) (Şekil 3). Bu bölgedeki tekrar sayısı polimorfiktir. Bu durum araya giren AGG dizilerinin sayısı ve pozisyonuna bağlıdır (108). 5 - 44 CGG trinükleotid tekrar sayısı normal olarak kabul edilmektedir (4). Normal populasyonda AGG sayısını belirlemek amacıyla FRAXA içindeki haplotip markırları karşılaştırılarak yapılan dizi analizi çalışmasında yaklaşık her 10 CGG tekrarından sonra araya 1-3 kez AGG dizilerinin girdiği ve (CGG)₁₀ AGG(CGG)₉ AGG(CGG)₉ dizisinin olduğu saptanmıştır (108). Normal olarak; tekrar bölgesi ebeveynen çocuğuna geçtiğinde stabildir (110, 111). Yapılan araştırmalarda; araya giren AGG dizilerindeki kaybın CGG tekrar sayısında artışa neden olduğu gösterilmiş ve genin ebeveynen çocuğa geçerken, tekrar bölgesinin stabilitesini kaybederek genişlediği saptanmıştır (112).

```
gcctcagtcaggcgctcagctccgtttcggttcacttccggtggagggccgcctctgagcgggccc  
gggcccagcggcgagcgcgggcgggcggtgacggagggccgctgccagggGGCGTG  
CGGCAGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGAGGC  
GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGGGCCTCGAGCGCCC  
GCAGCCCACCTCTCGGGGGCGGGCTCCCGGCGCTAGCAGGGCTG  
AAGAGAAGATGGAGGAGCTGGTGGTGGAAAGTGCGGGGCTCCAAT  
GGCGCTTTCTACAAG
```

Şekil 3 : FMR1 geni 5'UTR ve 1.eksonu
(http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/X/html/FMR1_1.html) (113).

Üçlü tekrar uzunluğundaki değişimin büyük bir kısmı 3' uçta olmaktadır. Bu durum 84 kişilik bir grupta FMR1 geni 5'UTR bölgesindeki AGG dizilerinin dağılımı analiz edilerek saptanmıştır. Allellerin çoğunda iki AGG vardır ve en uzun kesiksiz CGG tekrar alanları daima 3' uçta bulunmaktadır. Tekrar uzunluğundaki varyasyon uçlarda görülür. Bu allellerde araya giren bir veya iki AGG trinükleotidin kaybolduğu belirlenmiştir. AGG trinükleotidlerindeki eksiklik, normal tekrar sayısı olan allellerde kararsızlığa neden olmaktadır (114, 115). 33 ve daha az kesintisiz CGG tekrarı stabilitesini korurken 34'ten fazla kesintisiz tekrarlar insitabilite meydana gelmektedir (114). 45 – 54 CGG tekrarı intermedia - gri zon, 55 – 200 premutasyon ve >200 ise tam mutasyon olarak değerlendirilmektedir (4) (Şekil 4).



Şekil 4: FMR1 geni CGG dizi tekrarı görünümü (1, 4).

CGG tekrar dizisi artışına neyin sebep olduğuna yönelik pek çok faktör öne sürülmüştür. Bunlar arasında en çok kabul göreni tekrar dizileri boyunca kromatidlerin yanlış eşleşmelerine bağlı olarak mitoz ve mayoz sırasında genetik materyalin eşit olmayan yer değiştirmesi ve gen konversiyon olaylarıdır. DNA replikasyonu sırasında, DNA polimeraz GC zengin bölgeleri amplifiye ederken zorlanmaktadır. Slipped strand mispairing (SSM) (kaymış zincir eşleşmesi) normal allelin instabilitesine neden olmaktadır. Bu kayma Okazaki fragmanlarında meydana gelmektedir. Tekrar dizisi ne kadar uzun ise stabilite o kadar azdır. Tekrar dizisinin artışı stabil olmamakla beraber tekrar dizisinin uzunluğu ile ilişkilidir. CGG tekrar sayısı arttıkça premutasyonun tam mutasyona dönüşme riski de artmaktadır. İnstabiliteyi etkileyen diğer bir durum da CGG tekrarları arasına giren AGG üçlü dizileridir. AGG dizilerinin sayısı ve pozisyonu instabiliteyi etkilemektedir. Bu dizilerin yokluğu instabilitenin arttığını ve CGG tekrar sayısının artışına yatkınlık olduğunu göstermektedir (116).

FMR1 Premutasyonu

FMR1 genindeki CGG trinükleotid tekrar sayısının 55-200 arasında olması premutasyon taşıyıcılığı olarak adlandırılmaktadır (4). Premutasyonlar normal tekrar sayısının üzerinde, ancak frajilite oluşturacak düzeyde olmayan CGG tekrarlarıdır. Premutasyonlar stabil değildir. CGG tekrar sayısı arttıkça premutasyonun tam mutasyona dönüşme riski artar. Premutasyon alleli anneden çocuğa geçiş sırasında tam mutasyona dönüşebilir, babadan geçişte tam mutasyona dönüşüm bildirilmemiştir (117).

Premutasyon taşıyıcılarında CpG adaları metile olmadığından FMR1 RNA ve FMRP proteini üretilebilmektedir; bu nedenle bu kişilerde full mutasyonda görülen Frajil X sendromu gelişmemektedir. Genel popülasyonda premutasyon alellerinin prevalansı kadınlarda 1/259 iken, erkeklerde 1/813 olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda premutasyon ile ilişkili fenotiplerin tanımlanması premutasyon taşıyıcılarının asemptomatik olmadığını göstermektedir. Frajil X premutasyon taşıyıcılarında FMRP ekspresyonu azalmasına rağmen mRNA düzeyleri çok yüksektir. Azalmış translasyon oranına karşılık transkripsiyonel aktivitede artış gözlenmektedir. Transkripsiyonel aktivite artışı, fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olan RNA fonksiyon kazanımı mutasyonları sonucudur (117). Premutasyon taşıyıcısı kadınlarda POF gözlenebilirken, 55 yaşının üzerindeki premutasyon taşıyıcılarında nörodegeneratif bir hastalık olan Frajil X tremor ataksi sendromu (FXTAS) gözlenebilmektedir (118). FXTAS`ın moleküler mekanizması olarak fonksiyon kazanımına yol açan mutasyondan söz edilebilir. Artmış FMR1 transkript miktarı hücrel proteinlerin birikimine ve inklüzyonların oluşumuna sebep olmaktadır (117).

FMR1 Full Mutasyonu

FMR1 genindeki CGG trinükleotid tekrar sayısının 200`den fazla olması full mutasyon olarak adlandırılmaktadır (4). Bu durum Frajil X sendromu diğer adıyla Martin - Bell sendromu klinik tablosuna neden olmaktadır (119). Frajil X sendromu kalıtsal zeka geriliğinin en sık nedeni olup mental retardasyon, makroorşidizm ve tipik yüz bulguları ile karakterizedir (1).

200`ün üstündeki CGG tekrar sayısı FMR1 geninin promotorundaki deoksisitozin rezidülerinin artmış metilasyonu ile birlikte olup bu artmış metilasyon FMR1 transkripsiyonunu azaltır veya baskılar ve sonuçta FMRP eksikliği ortaya çıkar (117).

FMR1 geni metilasyonu, iki mekanizma ile gen aktivasyonunu engellemektedir: 1) Transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını önler, 2) Kromatin kondenzasyonunun uyarılmasını sağlayarak transkripsiyon düzeneğinin bağlanmasını önler. Yapılan çalışmalarda FMR1 geninin hem CGG tekrarlarının hem CpG adacıklarının hipermetilasyonu ile transkripsiyonun baskılandığı gösterilmiştir. Metilasyon ve bunu takiben genin inaktivasyonu, fertilizasyondan sonra meydana gelmektedir (107).

FraX Premutasyon Taşıyıcılığı ve İdiyopatik Prematür Ovaryen Yetmezlik

1990`ların başında FMR1 premutasyon taşıyıcılarında POF insidansının arttığı saptanmıştır (120, 121). Premutant allele sahip kadınlarda, POF prevalansı %20 olarak belirlenmiştir (122). Sporadik POF`da premutasyon taşıyıcılığı % 0.8-7.5 iken, ailevi POF`da bu oran %13'lere kadar çıkmaktadır (123).

FMR1 premutasyon taşıyıcılarında hangi mekanizma ile POF oluştuğu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu hastalarda over rezervinin azaldığı ve atrezi hızının arttığı öne sürülmüştür (1). FMR1 premutasyon taşıyıcılığında, CGG tekrar sayısının artmasıyla birlikte FMR1 mRNA düzeyinde artış ve FMRP ekspresyonunda azalma gözlenmektedir. Artmış FMR1 mRNA düzeyi uzun dönemde overlere toksik etki gösterebilmektedir. Ayrıca fetal dönemde oosit fonksiyonunda görev aldığı düşünülen FMRP`nin ekspresyonunun azalmasıyla, FMRP`nin etkileşim halinde olduğu oosit gelişiminde görevli diğer genlerin ekspresyonu değişmekte, bu genlerde haployetmezliğe neden olarak bu durum oosit kaybı ile sonuçlanmaktadır (118). Başka bir görüşte ise; mutant allel tarafından üretilen mRNA`nın foliküller üzerine toksik olduğu yönündedir. Yüksek miktarda mRNA fonksiyon kazanırken, mRNA bağlayan proteinlerden bir ya da birkaçının tükenmesine yol açarak diğer hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve foliküllerde atreziye neden olabileceği ileri sürülmüştür (124).

Premutasyon taşıyıcılarında POF dışında da ovaryen fonksiyon bozuklukları görülebilmektedir. Premutasyon taşıyıcılarıyla kontrol grubu karşılaştırıldığında; premutasyon taşıyıcılarında foliküler faz süresinin daha kısa olduğu, serum östradiol seviyeleri arasında anlamlı fark bulunmasa da foliküler faz ortasında FSH değerlerinin daha yüksek olduğu, foliküler fazda inhibin B, luteal fazda ise inhibin A ve progesteron konsantrasyonlarının daha düşük olduğu (125) ve 5 yaş daha erken menapoz girildiği saptanmıştır (126).

POF ile CGG tekrar sayısı arasındaki ilişkiyi inceleyen Allen ve ark. (2007) çalışmalarında, riskin en fazla 80-100 tekrarda olduğunu 55-79 ve >100 tekrarda riskin daha az olduğunu göstermişlerdir (124). Ayrıca Yrigollen ve arkadaşları (2014) CGG tekrarlarını bölen AGG dizilerinin sayısının maternal transmisyon sırasında premutasyonun full mutasyona genişlemesinde önemli olduğunu vurgulamışlardır (127).

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma Grupları

Bu projede Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından tüm tetkikleri yapılarak idiopatik prematür ovaryen yetmezlik tanısı ile takip edilen ve fizik incelemeleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde yapılan tablo 3`te özetlenmiş olan kriterleri sağlayan 55 hasta ve 55 kontrol olgusu çalışmaya dahil edildi. Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Komisyonu tarafından 27.07.2014 tarih ve 10 sayılı kurul kararı ile onaylanmış olup Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından desteklenmiştir. Çalışmaya dahil olan tüm bireylere bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatıldı ve tüm bireylerden 1 adet K3 EDTA'lı tüpe (VACUETTE®) toplam 2 ml periferik kan örneği alındı. Kan örnekleri hasta ve kontrol grupları için ayrı ayrı kodlanarak DNA izolasyonu yapılincaya kadar -20°C' de saklandı. Çalışmaya dahil olma ve dışlama kriterleri tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3: Hasta grubunda çalışmaya dahil olma ve dışlanma kriterleri

Dahil olma kriterleri	Dışlanma kriterleri
1. 40 yaşından önce menstrüel siklusun kesintiye uğraması ve en az 4 ay sürmesi	1. 40 yaşından önce menstrüel siklüs problemi olmamak
2. FSH \geq 14mIU/ml saptanması	2. FSH <14mIU/ml saptanması
3. Otoimmün hastalık öyküsünün olmaması	3. Otoimmün hastalık öyküsü varlığı
4. Metabolik hastalık (galaktozemi vs.) öyküsünün olmaması	4. Metabolik hastalık (Galaktozemi vs) öyküsünün varlığı
5. Geçirilmiş over cerrahisi öyküsünün olmaması, kemoterapi – radyoterapi almamış olmak	5. Geçirilmiş pelvik cerrahi öyküsü, kemoterapi – radyoterapi öyküsü
6. Kromozom analizi sonucunun 46,XX olması	6. Kromozomal anomali bulunması

Kontrol grubu olarak; 45 yaşından sonra menapoza girmiş ve herhangi bir yardımcı üreme tekniği kullanmadan çocuk sahibi olmuş 55 birey çalışmaya dahil edildi.

Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonları ticari kit (Quickgene DNA Whole Blood Kit S, Fujifilm) kullanılarak otomatize nükleik asit izolasyon cihazında (Fujifilm Nucleic Acid Isolation System, Quickgene-810, Fujifilm) gerçekleştirildi. DNA izolasyonu için uygulanan basamaklar, aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

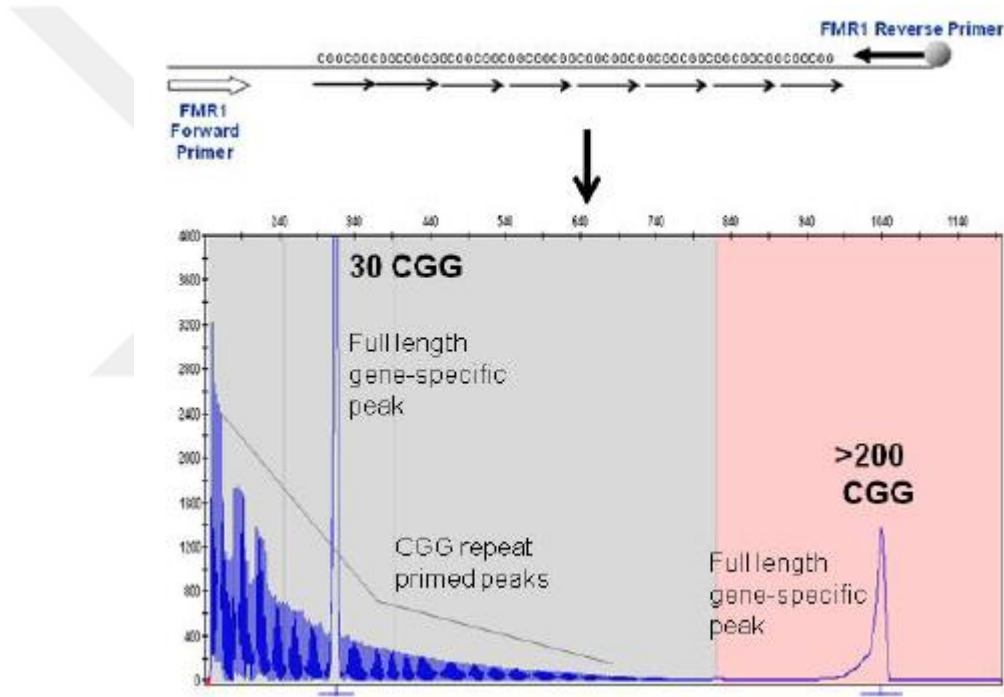
1. EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden 200 µl periferik kan örneği alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı.
2. 200 µl kan örneklerine, 250 µl lizis tamponu (Lysis Buffer; LDB) ve 30 µl Proteaz (EDB) eklenerek, maksimum hızda 10-15 sn vortekslendi (pulse-vorteks). Örnekler 56 °C'de 2 dk inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası örneklere 250 µl >%99 etanol eklenerek maksimum hızda 10-15 sn vortekslendi (pulse vorteks). Kısa bir santrifüj işlemi yapıldı.
4. Otomatize genomik materyal izolasyon cihazının kartuşuna filtreli tüpler yerleştirilerek lizatlar bu tüplere aktarıldı ve "DNA WHOLE BLOOD" modu seçilerek süzme işlemi yapıldı
5. Filtreli tüplere 750 µl kitle sağlanan Wash Buffer ilave edildi ve tekrar süzme işlemi yapıldı. Bu işlem 2 kez daha tekrarlandı.
6. Kartuş, DNA izolasyonunda kullanılmak üzere cihaza önceden yerleştirilen ependorfların üzerine aktarıldı.
7. Filtreli tüplere 200 µl elüsyon bufferı eklenerek süzme işlemi başlatıldı. Böylece filtrede bulunan DNA`ların ependorflara aktarılması sağlandı.
8. Filtreli tüpler atılıp, DNA içeren süzüntü ependorf tüpü içinde saklandı.

İzole Edilen DNA`ların Saflık Derecelerinin Değerlendirilmesi

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık tayini Thermo Scientific Nanodrop 2000c spektrofotometre cihazında yapıldı. Ölçümü yapılan DNA örnekleri çalışma yapılıncaya kadar + 4°C'de buzdolabında saklandı.

Triplet Repeated Primer Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TP PCR)

FMR1 geni, 5'UTR bölgesindeki polimorfik CGG tekrarlarını çoğaltmak ve tekrar sayılarının tespiti için Asuragen AmplideX™ FMR1 PCR Kiti kullanıldı. Kit içerisinde sağlanan primerler ile FMR1 geni 5'UTR bölgesindeki polimorfik CGG tekrarlarını içeren DNA dizisi hem kontrol hem de hasta grubunda çoğaltıldı. Her bir örnek için kullanılan primerler forward, reverse ve CGG primeri olup forward ve reverse primeri CGG tekrarlı bölgeyi çoğaltırken CGG primeri tekrar bölgesine çeşitli yerlerden hibridize olarak analiz esnasında merdiven görüntüsünün oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 5).



Şekil 5: TP PCR çalışma mekanizması ve analizi şeması (128).

Kit içeriği ve toplam hacimleri tablo 4`te gösterilmiştir.

Tablo 4: AmplideX™ PCR Kit içeriği ve toplam hacimleri

Kimyasallar	Toplam Hacim
FMR1 F,R FAM-Primerleri	50 µl
FMR1 CGG Primer	50 µl
GC-Rich Amp Buffer	1.2 ml
GC-Rich Polimeraz Miks	5 µl
ROX 1000 Size Ladder	200 µl
Diluent	1.0 ml

F:Forward, R:Revers, FAM: 6-Carboxyfluorescein

Asuragen AmplideX™ FMR1 PCR Kiti ABI 3130 Genetik Analiz cihazına uygun olduğundan DNA izolasyonundan sonraki deney aşamaları Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamıza dahil olan 55 hasta ve 55 kontrolün DNA'ları, konsantrasyonları $d_1 \times V_1 = d_2 \times V_2$ (d:yoğunluk, V:hacim) formülü kullanılarak 10-15ng/µl olacak şekilde steril distile su ile sulandırıldı. Toplam 110 örnek için TP PCR reaksiyonları aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

FMR1 geninin çoğaltılacak bölümü için toplam hacim 7.5 µl olacak şekilde TP PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Tek bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği Tablo 5'te gösterilmiştir. Bu karışımdaki içerikler örnek sayısı ile çarpılarak PCR için gerekli miktar hazırlandı.

Tablo 5: Bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği

Kimyasallar	Reaksiyon Hacmi
GC-Rich Amp Buffer	5.725 µl
FMR1 F,R FAM-Primerleri	0.25 µl
FMR1 CGG Primer	0.25 µl
Diluent	0.25 µl
GC-Rich Polimeraz Miks	0.025 µl
DNA	1 µl
TOPLAM	7.5 µl

TP PCR reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra örnekler Thermal Cycler cihazına yerleştirildi ve Tablo 6'daki basamaklar izlendi.

Tablo 6: Thermal Cycler cihazında uygulanan basamaklar

İşlem	Isı	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	95°C	5dk	1
Denaturasyon	97°C	35sn	10
Primer Bağlanma	62°C	35sn	
Uzama	68°C	4dk	
Denaturasyon	97°C	35sn	20
Primer Bağlanma	62°C	35sn	
Uzama	68°C	4dk + 20sn/döngü**	
Final Uzama	72°C	10dk	1
Sonuçlanma	4°C	∞	1

*Her döngüde uzama süresi 20sn artacak

4sa 33dk süren Thermal Cycle aşamasından sonra ürünler cihazdan çıkartıldı.

ABI 3130 Genetik Analiz cihazına yüklenmesi için Tablo 7`deki karışım hazırlandı.

Tablo 7: ABI 3130 Genetik Analiz cihazına yüklemek için tek örneklik hazırlanan karışım

Kimyasallar	Toplam Hacim
Formamid	11 µl
ROX 1000 Size Ladder	1 µl
PCR ürünü	1 µl
TOPLAM	13 µl

Bu karışımdaki içerikler örnek sayısı ile çarpılarak tüplere aktarıldı. Bir kaç kere örnekler pipetaj yapıldı. Karışım Thermal cycler cihazında 95°C`de 2dk denature edildi. Buz üstüne alınan örnekler daha sonra kapiller elektroforez için "Sample Plate"e aktarıldı ve 4 kapillerli ABI 3130 Genetik Analiz cihazına yüklendi.

ABI 3130 Genetik Analiz cihazında kapillerle gelen ürün miktarını artırmak için kit protokolünde belirtildiği gibi injeksiyon 2.5 kV, 20 sn ve "run zamanı" 2400 sn olarak ayarlandı.

Fragment boyutlarının analizi GeneMapper 4.0 yazılım programı kullanılarak yapıldı. Saptanan piklerdeki tekrar sayıları;

$CGG_n = (\text{pik uzunluğu} - c_o) / m_o$ formülü kullanılarak hesaplandı (ABI 3130 Genetik Analiz cihazı için; $c_o = 229.4$, $m_o = 2.965$).

Homozigot saptanan hastalarda allel dropout olasılığını dışlamak için DNA konsantrasyonu 5ng/ µl yapılarak örnekler tekrar çalışıldı ve Thermal cycler koşulları aşağıdaki gibi düzenlendi (Tablo 8). Diğer basamaklar benzer şekilde uygulandı.

Tablo 8: Homozigot bireylerin tekrar reaksiyonlarındaki thermal cycler koşulları

İşlem	Isı	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	95°C	5dk	1
Denaturasyon	97°C	35sn	12
Primer Bağlanma	62°C	35sn	
Uzama	68°C	4dk	
Denaturasyon	97°C	35sn	25
Primer Bağlanma	62°C	35sn	
Uzama	68°C	4dk + 20sn/döngü*	
Final Uzama	72°C	10dk	1
Sonuçlanma	4°C	∞	1

*Her döngüde uzama süresi 20sn artacak

dTP PCR (direct Triplet Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Hasta grubunda premütasyon taşıyıcısı saptanan 1 olgu, gri zon saptanan 3 olgu, kontrol grubunda gri zon saptanan 1 olgu ve CGG tekrar sayısı <45 olan 5 olguya CGG tekrarları arasına dağılmış AGG sayılarının tespiti için İntron Sağlık Ürünleri İth.İhr.Tic.Ltd.Ştd`den hizmet alımı yapılmıştır.

İntron Sağlık Ürünleri İth.İhr.Tic.Ltd.Ştd. FastFraX™FMR1 Sizing Kitini kullanarak veri analizi yapmıştır. Kit içeriği ve toplam hacimleri tablo 9`da gösterilmiştir.

Tablo 9: FastFraX™FMR1 Sizing Kit içeriği ve toplam hacimleri

Kimyasallar	Reaksiyon Hacmi
Sizing Primer Mix	50 µl
Sizing PCR Mix A	125 µl
Sizing PCR Mix B	375 µl
Taq Polimeraz	50 µl
Taq Plus	50 µl

Reaksiyon için gerekli DNA hacmi reaksiyonda toplamda 100ng olacak şekilde $m_1 : V_1 = m_2 : V_2$ (m:kütle) formülü kullanılarak hesaplandı. Toplam 10 örnek için dTP PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

FMR1 geninin çoğaltılacak bölümü için toplam hacim 15 µl olacak şekilde dTP PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Tek bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği Tablo 10`da gösterilmiştir. Bu karışımdaki içerikler örnek sayısı ile çarpılarak PCR için gerekli miktar hazırlandı.

Tablo 10: Tek bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği

Kimyasallar	Reaksiyon Hacmi
Sizing Primer Mix	1 µl
Sizing PCR Mix A	2.5 µl
Sizing PCR Mix B	7.5 µl
Taq	1 µl
Taq Plus	1 µl
DNA (100ng)	x µl
Su	2-x
TOPLAM	15 µl

dTP PCR reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra örnekler Thermal Cycler cihazına yerleştirildi ve Tablo 11`deki basamaklar izlendi.

Tablo 11: Thermal Cycler cihazında uygulanan basamaklar

İşlem	Isı	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	95°C	15dk	1
Denaturasyon	99°C	45sn	40
Primer Bağlanma	55°C	45sn	
Uzama	70°C	8dk + 15sn/döngü*	
Final Uzama	72°C	10dk	1
Sonuçlanma	11°C	∞	1

*Her döngüde uzama süresi 15sn artacak

Thermal Cycle aşamasından sonra ürünler cihazdan çıkartıldı. ABI 3500 Genetik Analiz cihazına yüklenmesi için Tablo 12`deki karışım hazırlandı.

Tablo 12: ABI 3500 Genetik Analiz cihazına yüklemek için tek örneklik hazırlanan karışım

Kimyasallar	Toplam Hacim
Formamid	9 µl
MapMarker 1000-ROX	0.5 µl
PCR ürünü	4 µl
TOPLAM	13.5 µl

Bu karışımdaki içerikler örnek sayısı ile çarpılarak tüplere aktarıldı. Bir kaç kere örnekler pipetaj yapıldı. Karışım Thermal cycler cihazında 95°C`de 5dk denature edildi. Buz üstüne alınan örnekler daha sonra kapiller elektroforez için "Sample Plate"e aktarıldı ve 8 kapillerli ABI 3500 Genetik Analiz cihazına yüklendi.

Verilerin analizi GeneMapper yazılım programı kullanılarak yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Ki-kare analizi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızın hasta grubunu Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümünde idiyopatik prematür ovaryen yetmezlik tanısı ile takip edilen, POF tanısını ortalama 30.6 yaşında (18-40yaş) almış 55 kadın hasta oluşturmaktadır. Kontrol grubunu ise normal yollardan gebe kalmış, 45 yaşından sonra menapoz girdiği bilinen 55 olgu oluşturmaktadır. Olgular Tablo 3'te belirttiğimiz çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterlerine göre belirlendi. POF grubundaki hastaların ortalama FSH değeri 51.3 ± 4.5 mIU/mL (12-155 mIU/mL), LH değeri 30.1 ± 2.9 mIU/mL (4.3-89.2 mIU/mL) ve ortalama östradiol değeri 35.2 ± 4.9 ng/mL (5-146.7 ng/mL) idi. Hasta grubunun bilgileri Tablo 13'te gösterilmektedir.

Tablo 13: Hasta grubuna ait bilgiler

Hasta No	Menapoz yaşı	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	E2 (ng/mL)	Akraba : Menapoz yaşı
H1	37	25.50	10.10	77.60	-
H2	32	89.65	47.56	10.25	AA:38, A:40
H3	37	43.41	18.79	11.58	A:38
H4	39	26.35	13.36	22.40	A:40
H5	28	19.10	12.90	11.80	A:46
H6	39	78.12	57.45	12.84	A:37
H7	25	73.28	41.48	26.40	-
H8	38	43.41	17.00	11.33	A:54
H9	29	16.32	10.82	21.28	A:34, T:30
H10	37	25.78	12.62	5.75	-
H11	33	15.34	4.34	119.00	A:34, K:34
H12	36	41.12	39.54	81.44	A:35
H13	35	62.45	9.25	24.76	A:47
H14	33	32.40	5.81	<20.0	A:35, AA:30
H15	35	19.35	10.22	54.22	-
H16	30	17.88	15.74	10.70	A:42, T:42
H17	38	25.48	12.75	68.52	-
H18	31	44.10	23.23	9.32	A:46
H19	36	19.45	15.75	72.58	-

A:Anne, AA:Anneanne, T:Teyze, K:Kardeş

(Tablo 13`ün devamı)

H20	23	25.32	17.08	26.50	-
H21	36	124.90	89.25	128.00	-
H22	19	56.89	45.73	65.03	A:28, AA:40
H23	32	14.50	11.07	49.68	A:34
H24	27	26.19	11.55	49.68	A:40
H25	37	29.54	13.23	87.52	-
H26	24	106.00	45.28	13.87	A:43
H27	22	58.69	32.56	12.85	-
H28	25	45.89	37.42	10.01	A:45
H29	39	36.85	11.16	24.15	A:51
H30	28	41.46	28.69	24.02	A:52
H31	39	32.97	20.89	146.70	-
H32	30	53.78	37.09	7.20	T:40
H33	19	116.37	30.15	<10	-
H34	26	83.24	48.25	13.35	-
H35	27	81.50	39.74	5.00	A:49
H36	30	77.62	41.26	5.00	-
H37	18	155.20	77.64	5.00	-
H38	22	50.45	13.46	38.97	A:42
H39	29	35.55	22.21	71.67	A:40, T:39
H40	21	75.45	59.65	45.68	-
H41	40	12.00	78.00	16.00	A:39
H42	22	139.40	82.46	5.00	A:47
H43	39	98.45	65.32	28.80	A:46
H44	22	14.27	11.57	25.88	A:>45
H45	35	46.33	43.83	114.70	A:40
H46	28	20.71	12.65	16.58	-
H47	28	58.56	45.74	64.13	-
H48	34	105.70	57.87	8.27	A:50
H49	34	53.54	19.61	5.00	A:>55
H50	23	23.50	5.23	17.41	-
H51	25	50.43	34.79	8.83	-
H52	39	17.66	8.82	105.70	A:42
H53	27	40.15	21.59	8.80	-
H54	36	42.38	28.09	10.78	-
H55	31	54.29	32.17	5.00	-

A:Anne, AA:Anneanne, T:Teyze, K:Kardeş

Olgulara ait periferik kan örneklerinden yapılan DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'nın konsantrasyonu 'Thermo Scientific Nanodrop 2000c spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş olup sonuçlar Tablo 14`te gösterilmiştir.

Tablo 14: Hasta grubu spektrofotometri ölçümleri

Hasta no	Konsantrasyon ng/μl	A ⁰ _{260/280}	A ⁰ _{260/230}
H1	28	1.77	0.87
H2	64	1.86	0.70
H3	22	1.95	0.85
H4	44	1.68	0.80
H5	13	1.76	0.95
H6	7	2.1	1.18
H7	25	1.75	0.95
H8	15	1.75	0.88
H9	59	1.99	0.83
H10	75	1.97	0.86
H11	19	1.87	0.95
H12	14	2.17	1.73
H13	27	1.78	0.79
H14	66	1.76	1.50
H15	9	2.16	1.36
H16	12	2.03	1.95
H17	18	1.84	1.44
H18	81	1.92	1.79
H19	50	1.60	0.80
H20	11	1.70	1.27
H21	12	1.64	1.19
H22	18	1.89	1.54
H23	10	1.96	0.88
H24	21	1.65	1.43
H25	62	2.20	1.43
H26	18	1.80	0.95
H27	20	1.89	0.88
H28	15	1.91	1.30

Hasta no	Konsantrasyon ng/μl	A ⁰ _{260/280}	A ⁰ _{260/230}
H29	24	1.81	1.28
H30	48	1.89	1.49
H31	39	1.86	0.94
H32	42	1.89	1.22
H33	19	1.85	1.19
H34	30	1.82	1.22
H35	25	1.86	2.20
H36	32	1.86	1.75
H37	23	1.87	1.99
H38	18	1.93	0.55
H39	17	1.87	1.30
H40	15	1.94	1.43
H41	20	1.99	1.23
H42	14	2.06	1.73
H43	17	1.97	1.61
H44	31	1.93	1.65
H45	32	1.84	1.44
H46	28	2.00	0.96
H47	30	1.90	1.96
H48	35	1.92	2.44
H49	35	2.04	1.65
H50	31	1.94	1.23
H51	10	1.80	2.24
H52	17	2.01	1.76
H53	42	1.89	1.55
H54	38	1.80	1.54
H55	32	1.94	1.68

Tablo 15: Kontrol grubu spektrofotometri ölçümleri

Kontrol no	Konsantrasyon ng/µl	A ⁰ _{260/280}	A ⁰ _{260/230}
K1	38	1.92	0.77
K2	40	1.98	0.80
K3	23	1.95	0.83
K4	28	1.93	0.80
K5	11	2.11	1.82
K6	22	1.97	1.52
K7	13	2.06	1.65
K8	29	2.03	1.57
K9	34	1.89	0.98
K10	56	1.91	1.75
K11	32	1.91	0.96
K12	46	1.83	1.03
K13	44	1.95	1.32
K14	29	1.80	1.45
K15	28	1.89	0.96
K16	29	1.92	1.65
K17	15	1.94	1.04
K18	39	1.90	1.83
K19	39	1.90	1.54
K20	31	1.85	1.21
K21	25	1.76	1.54
K22	23	1.86	0.86
K23	28	1.89	0.78
K24	38	1.89	1.52
K25	20	1.90	0.73
K26	30	1.90	0.95
K27	31	1.89	0.88
K28	17	1.93	1.58

Kontrol no	Konsantrasyon ng/µl	A ⁰ _{260/280}	A ⁰ _{260/230}
K29	17	1.97	1.37
K30	26	1.93	1.29
K31	30	1.81	1.44
K32	10	1.95	1.12
K33	15	1.92	0.98
K34	15	1.98	1.45
K35	25	1.86	1.45
K36	30	1.88	1.73
K37	32	1.87	1.89
K38	12	2.01	0.95
K39	21	1.89	1.42
K40	21	1.99	1.32
K41	37	1.84	0.89
K42	18	1.84	1.26
K43	19	1.88	1.52
K44	34	1.85	1.55
K45	26	1.84	1.34
K46	29	1.83	1.75
K47	26	1.78	1.47
K48	32	1.89	0.86
K49	38	1.88	1.67
K50	36	1.82	1.49
K51	24	1.88	2.01
K52	24	1.74	1.35
K53	29	1.82	1.63
K54	30	1.70	1.63
K55	23	1.78	1.52

FMR1 Geni Moleküler Analizi

TP PCR Sonuçları

Çalışmamıza katılan idiyopatik POF olgularına ve kontrol grubuna ait CGG tekrar sayıları tablo 16 ve tablo 17`de gösterilmiştir.

Tablo 16: Hasta grubundaki allellerin CGG tekrar sayıları ve hastaların FSH değerleri

Hasta No	Allel1	Allel2	FSH (mIU/mL)
H1	29	41	25.50
H2	29	29	89.65
H3	29	30	43.41
H4	20	28	26.35
H5	29	41	19.10
H6	29	29	78.12
H7	26	30	73.28
H8	29	29	43.41
H9	32	37	16.32
H10	22	29	25.78
H11	22	29	15.34
H12	28	30	41.12
H13	28	29	62.45
H14	28	31	32.40
H15	29	37	19.35
H16	26	36	17.88
H17	28	45	25.48
H18	22	31	44.10
H19	23	28	19.45
H20	38	51	25.32
H21	28	29	124.90
H22	29	30	56.89
H23	20	29	14.50
H24	28	29	26.19
H25	29	29	29.54
H26	29	32	106.00
H27	22	29	58.69
H28	29	40	45.89

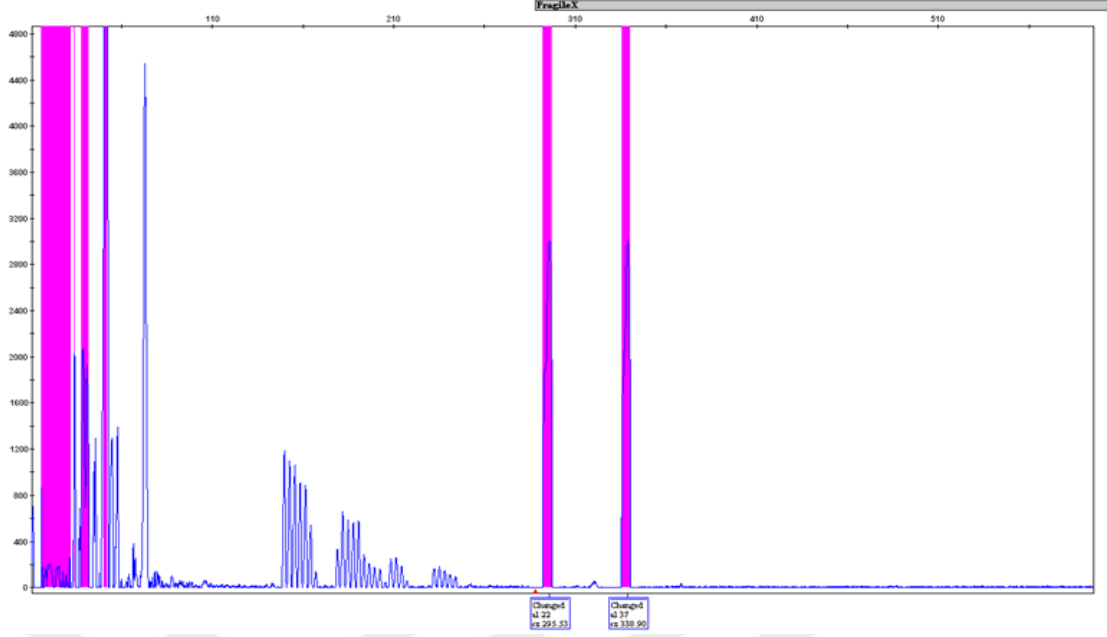
Hasta No	Allel1	Allel2	FSH (mIU/mL)
H29	28	29	36.85
H30	28	98	41.46
H31	28	43	32.97
H32	30	47	53.78
H33	32	44	116.37
H34	28	29	83.24
H35	29	44	81.50
H36	28	38	77.62
H37	28	29	155.20
H38	19	29	50.45
H39	29	30	35.55
H40	28	31	75.45
H41	28	29	12.00
H42	20	29	139.40
H43	28	29	98.45
H44	24	26	14.27
H45	29	29	46.33
H46	33	40	20.71
H47	28	29	58.56
H48	21	28	105.70
H49	27	29	53.54
H50	23	23	23.50
H51	29	29	50.43
H52	29	33	17.66
H53	28	29	40.15
H54	29	29	42.38
H55	22	29	54.29

Tablo 17: Kontrol grubundaki allellerin CGG tekrar sayıları

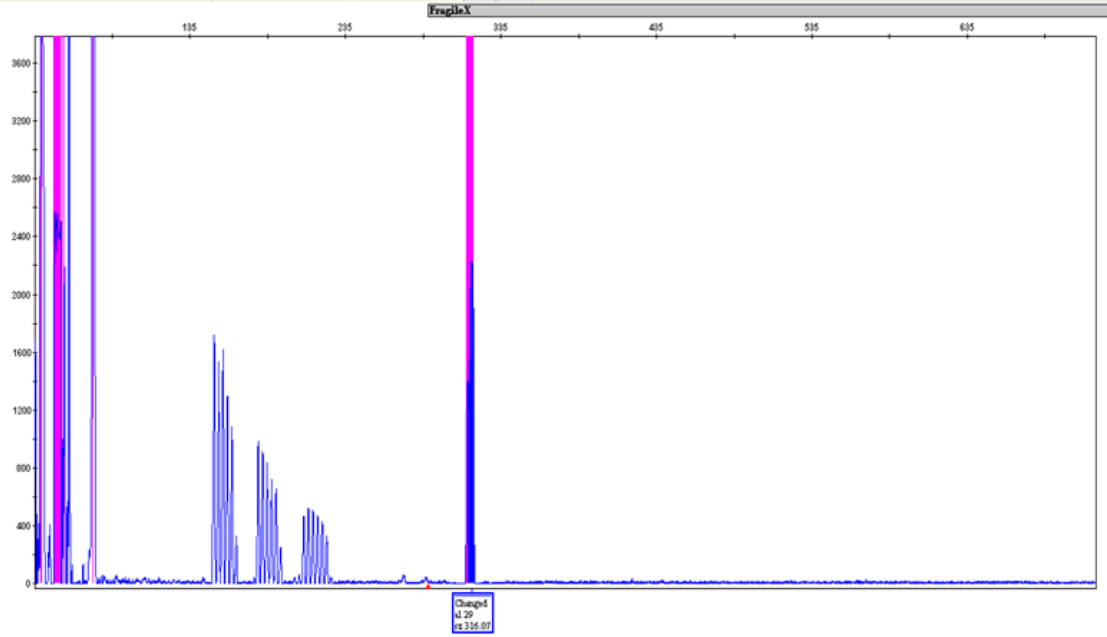
Kontrol No	Allel 1	Allel 2
K1	29	29
K2	36	37
K3	29	38
K4	28	32
K5	22	29
K6	22	28
K7	22	29
K8	28	30
K9	29	36
K10	28	32
K11	28	32
K12	28	40
K13	22	23
K14	22	23
K15	22	29
K16	28	29
K17	28	28
K18	20	32
K19	28	28
K20	28	30
K21	28	29
K22	29	29
K23	19	29
K24	23	40
K25	28	31
K26	29	31
K27	27	29
K28	29	49

Kontrol No	Allel 1	Allel 2
K29	27	29
K30	22	37
K31	29	29
K32	28	40
K33	29	29
K34	28	38
K35	20	31
K36	29	41
K37	28	29
K38	29	29
K39	29	30
K40	18	29
K41	22	38
K42	31	31
K43	23	28
K44	29	29
K45	28	30
K46	20	20
K47	28	28
K48	29	31
K49	23	30
K50	28	29
K51	19	29
K52	29	42
K53	29	42
K54	22	29
K55	19	35

FMR1 geni CGG tekrarlarının çalışma grubundan elde edilen TP PCR görüntüleri örnekleri şekil 6 ve 7`deki gibidir.



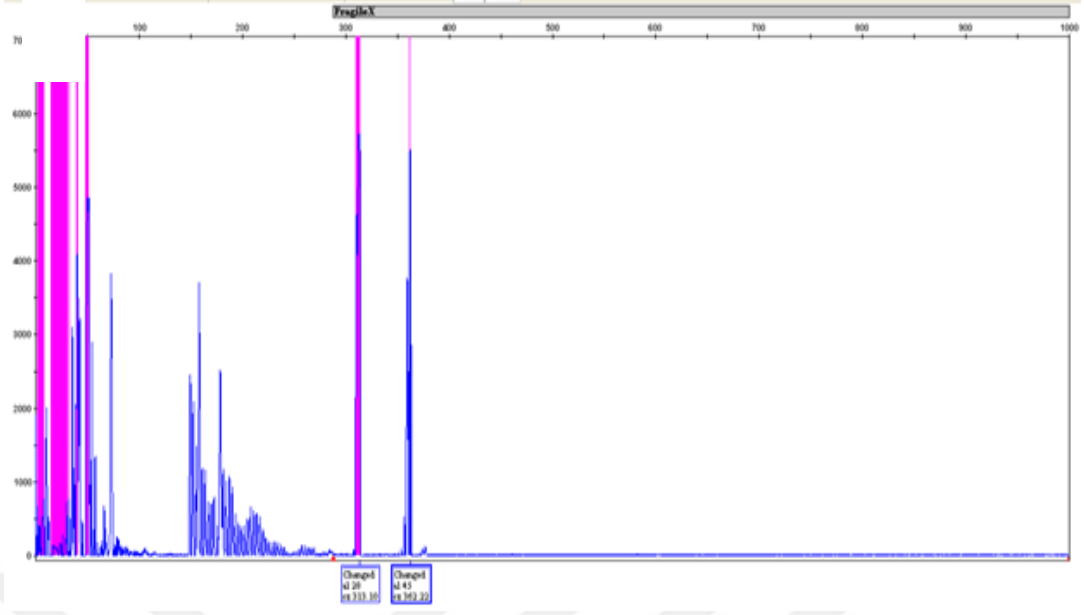
Şekil 6: K30, CGG tekrar sayısı: 22 ve 37 (Normal heterozigot)



29

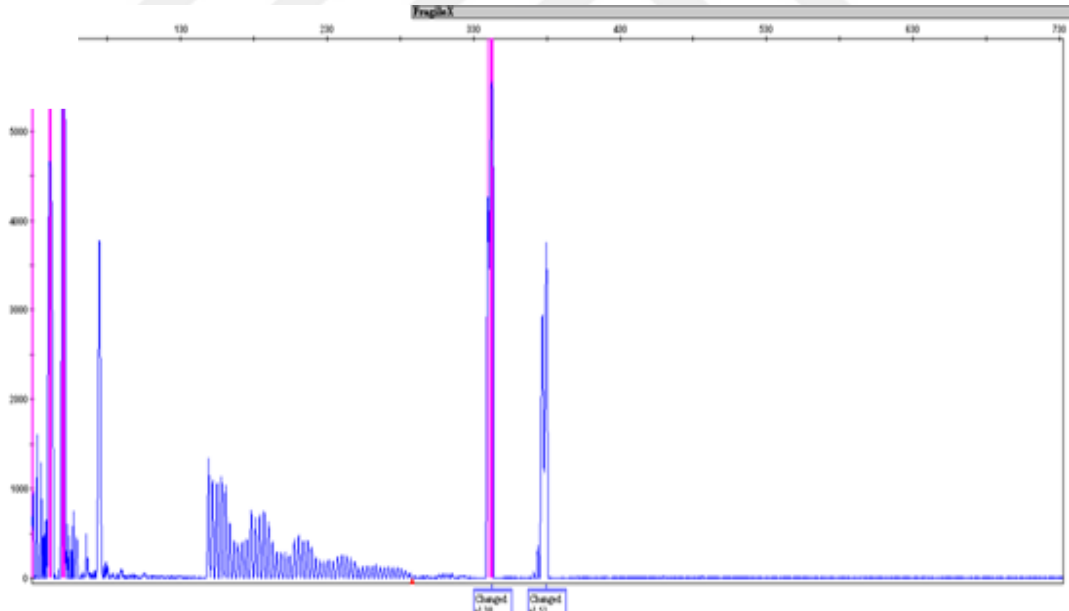
Şekil 7: H6, CGG tekrar sayısı: 29 (Normal homozigot)

Çalışmamızda FMR1 geni ekzon 1 5' UTR bölgesinde CGG tekrar sayıları incelendiğinde hasta grubunda H17, H20, H32 ve K28`de gri zon; hasta grubunda H30`da ise premutasyon taşıyıcılığı tespit edildi. Olguların analiz görüntüleri ve CGG tekrar sayıları Şekil 8, 9, 10, 11 ve 12`de gösterilmiştir.



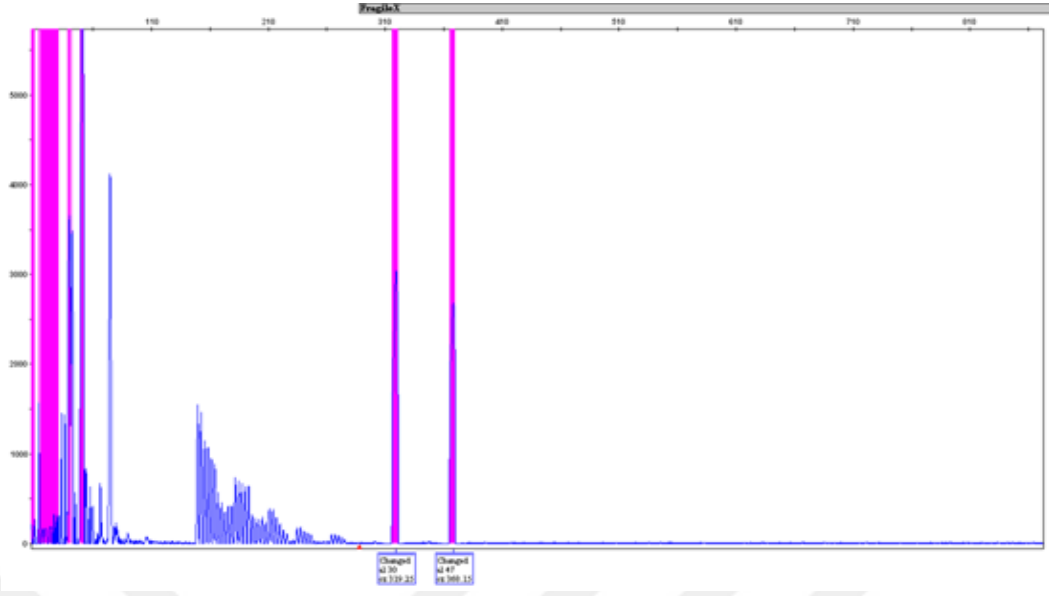
28 45

Şekil 8: H17, CGG tekrar sayısı: 28 (Normal) ve 45 (Gri zon)

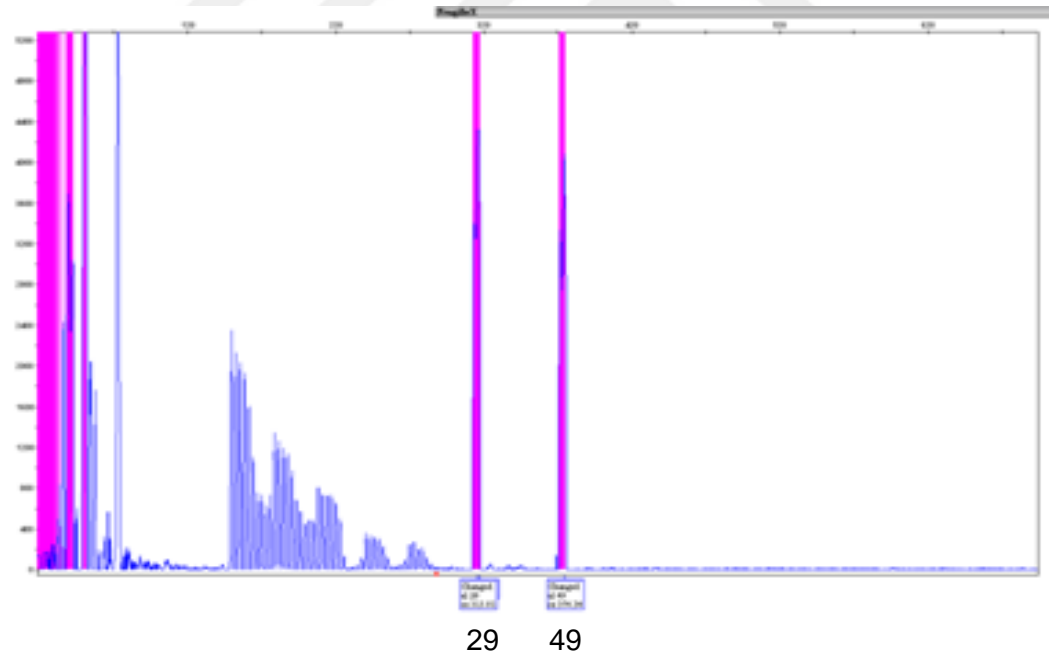


38 51

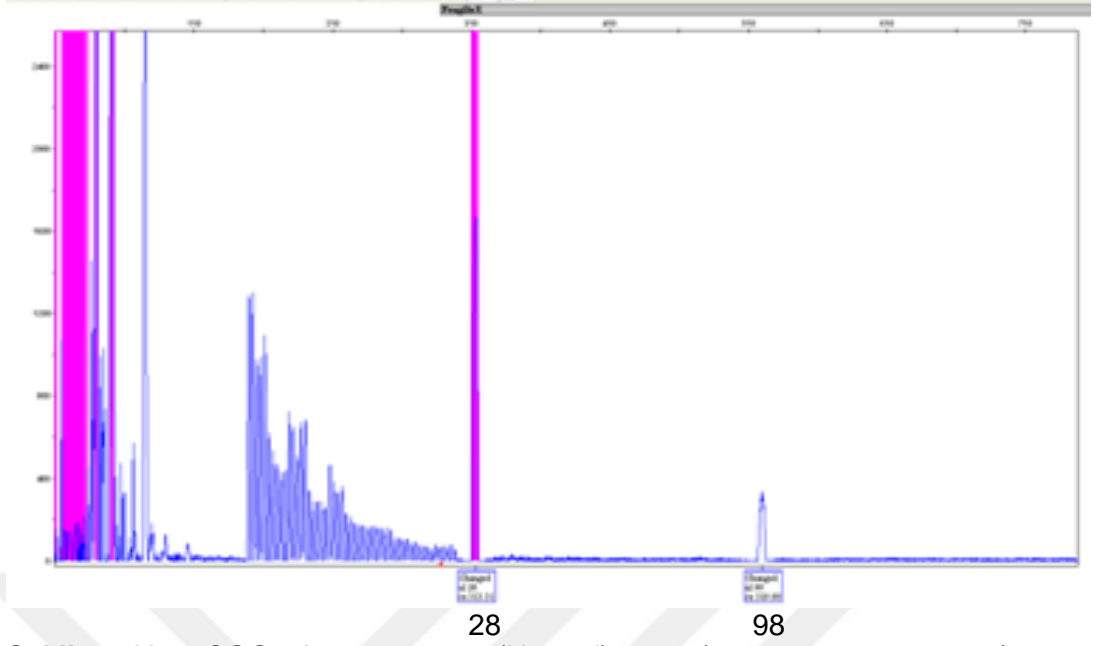
Şekil 9: H20, CGG tekrar sayısı: 38 (Normal) ve 51 (Gri zon)



30 47
Şekil 10: H32, CGG tekrar sayısı: 30 (Normal) ve 47 (Gri zon)



29 49
Şekil 11: K28, CGG tekrar sayısı 29 (Normal) ve 49 (Gri zon)



Şekil 12: H30, CGG tekrar sayısı: 28 (Normal) ve 98 (premutasyon taşıyıcısı)

Hasta grubunda allel 1 minimum 19, maksimum 38, allel 2 minimum 23, maksimum 98; kontrol grubunda ise allel 1 minimum 18, maksimum 36 ve allel 2 minimum 20, maksimum 49 saptandı. Hasta ve kontrol grubundaki allel 1 ve allel 2'deki CGG tekrar sayısı artışı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (allel 1 için p değeri 0.161, allel 2 için p değeri 0.821).

Hem hasta hem de kontrol grubunda FMR1 geninde allel 1 ve allel 2'de CGG tekrar sayısı >200 olan olgu saptanmadı. Hasta grubunda 1 olguda (%1.8) CGG tekrar sayısı 55-200 arasında (premutasyon taşıyıcısı) saptanırken kontrol grubunda premutasyon taşıyıcısı hiç saptanmadı. CGG tekrar sayısı 45-54 arası (gri zon) olan olgular ise hasta grubunda %5.45 iken, kontrol grubunda %1.8 olarak belirlendi.

Tablo 18: Premutasyon taşıyıcısı saptanan olgu

	Toplam	CGG Tekrar Sayısı 55 - 200 Olanlar	%
Hasta Grubu	55	1	1.8
Kontrol Grubu	55	0	0

Tablo 19: Gri zonda saptanan olgular

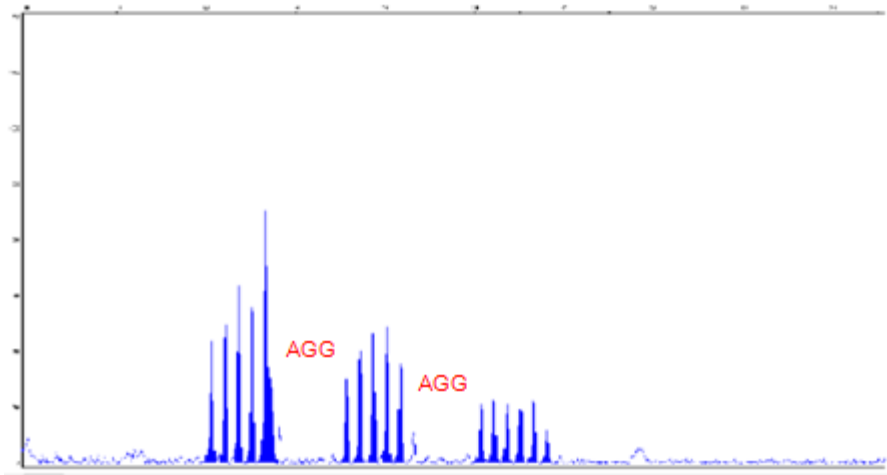
	Toplam	CGG Tekrar Sayısı 45-54 Olanlar	%
Hasta Grubu	55	3	5.45
Kontrol Grubu	55	1	1.8

Tablo 20: CGG tekrar sayısı 35-54 arası saptanan olgular

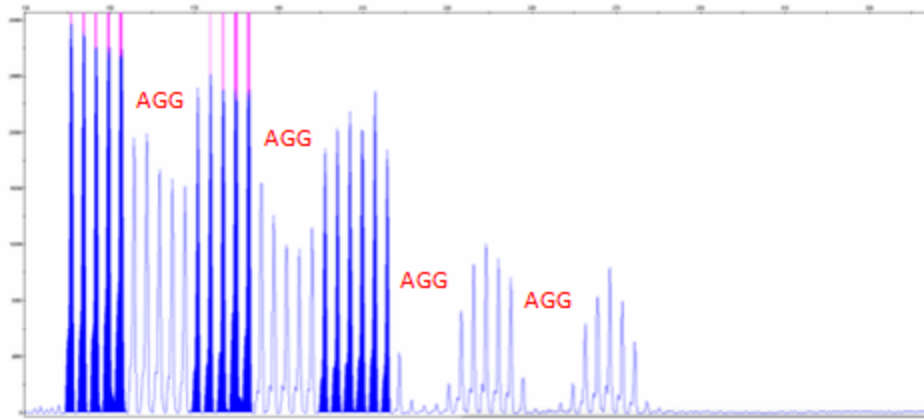
	Toplam	CGG Tekrar Sayısı 35-54 Olanlar	%	p değeri
Hasta Grubu	55	14	25.45	1
Kontrol Grubu	55	14	25.45	

dTP PCR Sonuçları

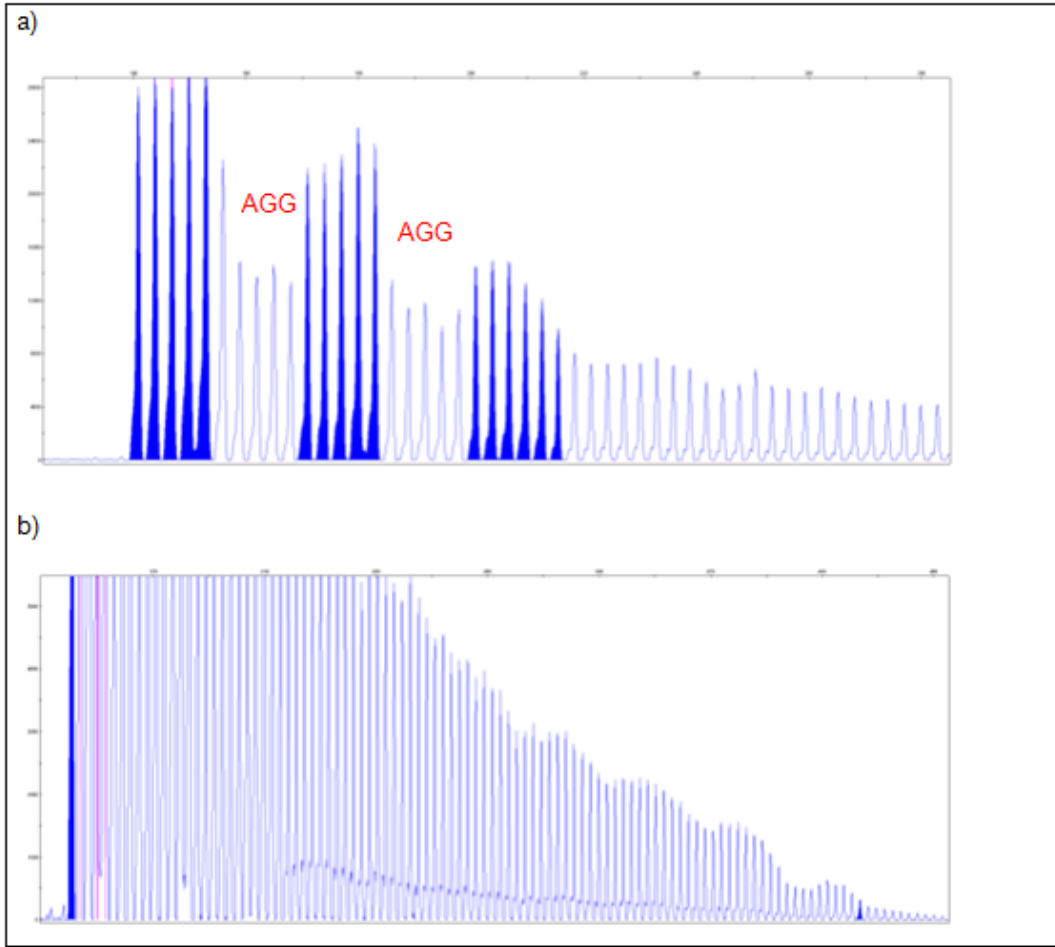
Çalışmamızda CGG tekrarları arasına dağılmış AGG dizileri incelendiğinde H17, H20, H30, H32 ve K28`in AGG sayıları allel1-allel2 olacak şekilde sırasıyla 2-1, 3-0, 2-0, 2-2, 2-2 saptanırken CGG tekrar sayısı <45 olan K1, K2, K3, K4 ve H33`ün ise CGG tekrarlarını bölen AGG sayıları sırasıyla 2-2, 1-1, 2-2, 2-1 ve 2-1 olarak saptandı. Homozigot <45 CGG sayısı olan K1`in, gri zonda saptanan K28`in ve premutasyon taşıyıcısı H30`un analiz görüntüleri ve AGG dizi sayıları Şekil 13, 14 ve 15`te gösterilmiştir.



Şekil 13: CGG tekrar sayısı homozigot olarak 30 olan kontrol olgusu K1`in AGG analiz görüntüsü. Her iki allelde de CGG tekrarlarını bölen 2 AGG dizisi bulunmaktadır (10 CGG+AGG+10 CGG+AGG+10 CGG).



Şekil 14: CGG tekrar sayısı allel 1`inde 29 (normal), allel 2`de 49 (gri zon) olan kontrol olgusu K28`in AGG analiz görüntüsü. K28`in allel 1`inde 2 AGG (9 CGG+AGG+10 CGG+AGG+10 CGG) ve allel 2`sinde de 2 AGG (30 CGG+AGG+10 CGG+ AGG+ 9 CGG) bulunmaktadır.



Şekil 15: CGG tekrar sayısı allel 1`inde 28 (normal), allel 2`sinde 98 (premutasyon taşıyıcısı) olan H30`un AGG analiz görüntüsü. a) H30`un allel 1`nde 2 AGG (9 CGG+AGG+9 CGG+AGG+10 CGG) bulunmaktadır. b) H30`un AGG analiz görüntüsünün devamı. Olgu H30'un premutasyon olan allelinde (allel 2) CGG tekrarlarının AGG dizisi ile bölünmediği görülmektedir.

Premutasyon taşıyıcılığı saptadığımız **H30**, 34 yaşında olup allellerinde CGG tekrar sayısı 28 ve 98 iken allel1-allel2`de AGG sayısı sırasıyla 2-0 saptandı. Tarafımıza başvurduğunda FSH:41.46 mIU/mL, LH: 28.69 mIU/mL ve östradiol: 24.02 ng/mL idi (Tablo 21).

Gri zonda saptadığımız olgular:

H17`nin 38 yaşında menstrüel sıklusları kesintiye uğramış olup TP PCR sonucunda CGG tekrar sayısı 28 ve 45 iken allel1-allel2`de AGG sayısı sırasıyla 2-1 saptandı. Olgunun laboratuvar tetkiklerinde FSH: 25.48 mIU/mL, LH:12.75 mIU/mL, E2: 68.52 ng/mL idi.

H20, 23 yaşında menapoza girmiş olup CGG tekrar sayıları 38 ve 51 iken allel1-allel2`de AGG sayısı sırasıyla 3-0 saptandı. Laboratuvar tetkiklerinde FSH: 25.32 mIU/mL, LH: 17.08 mIU/mL, E2: 26.50 ng/mL idi.

H32 ise 30 yaşındayken şikayetleri başlamış ve CGG tekrar sayıları 30 ve 47 iken allel1-allel2`de AGG sayısı sırasıyla 2-2 saptandı. Laboratuvar tetkiklerinde FSH: 53.78 mIU/mL, LH: 37.09 mIU/mL, E2: 7.20 ng/mL olarak saptandı (Tablo 22).

K28 46 yaşında olup halen menstrüel sikluları devam etmektedir. Olgunun CGG sayıları 29 ve 49 sapranırken AGG sayıları allel1-allel2 olacak şekilde 2-2 saptandı. Laboratuvar tetkiklerinde FSH: 9.52 mIU/mL, LH: 6.27 mIU/mL ve E2: 31.25 ng/mL olarak saptandı (Tablo 23).

Tablo 21: Premutasyon taşıyıcısı H30`un özellikleri

Hasta No	Allel 1 / AGG	Allel 2 / AGG	Menapoz yaşı	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	E2 (ng/mL)
H30	28 / 2	98 / 0	28	41.46	28.69	24.02

Tablo 22: Gri zondaki hastaların özellikleri

Hasta No	Allel 1 / AGG	Allel 2 / AGG	Menapoz yaşı	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	E2 (ng/mL)
H17	28 / 2	45 / 1	38	25.48	12.75	68.52
H20	38 / 3	51 / 0	23	25.32	17.08	26.50
H32	30 / 2	47 / 2	30	53.78	37.09	7.20

Tablo 23: Gri zondaki K28`in özellikleri

Kontrol No	Allel 1 / AGG	Allel 2 / AGG	Menapoz yaşı	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	E2 (ng/mL)
K28	29 / 2	49 / 2	46 yaşında halen adet görmekte	9.52	6.27	31.25

TARTIŞMA

Günümüzde prematür ovaryen yetmezliğin etiolojisinde rol oynayabilecek faktörler halen araştırılmakta olup pek çok POF'lu olgu idiyopatik olarak sınıflandırılmaktadır (54). POF ile ilişkili olabilecek pek çok aday gen arasında FMR1 geni bu durumla en sık ilişkilendirilen genlerden biridir. FMR1 premutasyon taşıyıcılığında, CGG tekrar sayısının artmasıyla birlikte FMR1 mRNA düzeyinde artış ve FMRP ekspresyonunda azalma gözlenmektedir. Artmış FMR1 mRNA düzeyi uzun dönemde overlere toksik etki gösterebilmektedir. Ayrıca fetal dönemde oosit fonksiyonunda görev aldığı düşünülen FMRP'nin ekspresyonunun azalmasıyla, FMRP'nin etkileşim halinde olduğu oosit gelişiminde görevli diğer genlerin ekspresyonu değişmekte, bu genlerde haployetmezliğe neden olarak bu durum oosit kaybı ile sonuçlanmaktadır (118).

FMR1 premutasyon taşıyıcılarında POF görülme sıklığı normal popülasyona göre 13 kat daha yüksektir ve bu olgular taşıyıcı olmayanlarla kıyaslandığında menapoza 5 yıl daha erken girmektedir (124). Çalışmamızda, idiyopatik POF tanısı almış 55 olgunun ve sağlıklı 55 kontrolün FMR1 geni 5'UTR bölgesindeki CGG tekrar sayıları TP PCR metodu ile incelenerek hasta grubunda 1 olguda premutasyon taşıyıcılığı, 3 olguda gri zon ve kontrol grubunda da bir olguda gri zon saptandı.

Literatürde idiyopatik POF tanısı almış olgularda FMR1 5'UTR bölgesinin değişik teknikler kullanılarak incelendiği ve bu bölgedeki CGG tekrar sayısının gelecek nesillerde özellikle full mutasyona dönüşme ihtimali nedeniyle bir çok araştırma yapıldığı gözlenmiştir (120, 121, 129, 130). Barasoain ve ark. (2013) over fonksiyonları azalmış 41 olgu ve fertilitate problemi olmayan 32 kontrol ile yaptıkları çalışmada hasta grubundan 2 olguda (%4.8) premutasyon taşıyıcılığı saptamışlardır (131). Çin'de 117 POF olgusu ve 82 kontrol ile yapılan başka bir çalışmada hasta grubunda sadece 1 olguda (%0.8) premutasyon taşıyıcılığı saptanmıştır (3). Bizim çalışmamızda ise 55 hasta olgusundan 1 tanesinde (%1.8) premutasyon taşıyıcılığı saptanırken kontrol grubunda premutasyon taşıyıcılığı hiç saptanmamıştır. POF hastalarına yönelik yapılan çalışmalarda premutasyon taşıyıcılığı saptama yüzdesi genellikle düşüktür ancak premutasyon taşıyıcılığı klinik açıdan anlamlıdır.

Literatürdeki çalışmalar hem gizli hem de aşikar POF ile sadece premutasyon taşıyıcılığının değil aynı zamanda gri zonun da ilişkili olduğunu göstermektedir.

Chen ve arkadaşları (2003) FMR1 promoterinde değişik sayılarda CGG tekrarı olan insan hücre hatlarına lusiferaz reporter plazmitini transfer etmiş ve protein ekspresyonunu kantitatif olarak değerlendirmişlerdir. Hem premutant hem de gri zon sınırlarında olan hücrelerde FMR1 mRNA transkriptinin arttığını, FMRP ekspresyonunun ise azaldığını göstermişlerdir (132). Gri zondaki alleller daha düşük olasılıkla genişlemekte ancak daha sonraki nesillerde Frajil X sendromuna neden olabilmektedir. Daha önce yapılmış çalışmalara göre; gri zondaki alleller tipik olarak en az üç nesil sonra full mutasyona genişlemektedir (133-135). Son yıllarda Murray ve arkadaşları (2013) ise 46 yaşından önce menapoza girmiş 2000`den fazla kadın üzerinde yaptığı araştırmada; gri zonun ne erken menapoza ne de POF`a neden olduğunu bildirmişlerdir (136). Çalışmamızda hasta grubundan 3 olgu (%5.45) gri zonda bulunmaktadır. Hasta grubundaki gri zon yüzdesi düşük olmasına rağmen klinik olarak olgular POF olduğundan, olguların klinik olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Kontrol grubunda ise 1 olguda gri zon saptanmıştır (Tablo 19). Literatürde bu konu hakkında çeşitli görüşler olması nedeniyle daha fazla sayıda hasta ve kontrol grubunu kapsayan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Pastore ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2012) 35-44 CGG tekrar sayısını yüksek normal kabul etmişlerdir. Over reverzi azalmış yüksek normal CGG tekrar sayısına sahip 62 infertil kadınla kontrol grubunu karşılaştırmış ve hasta grubunda 35-44 CGG tekrar sayısının prevalansını %14.5, kontrollerde ise %3.9 bularak bu durumu hem klinik hem de istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır (p: 0.02) (137). Farklı çalışmalarda CGG tekrar sayısı yüksek normal ve gri zon aralığında bulunan kadınlarda over rezervinin azaldığı gösterilmiştir (137-139). 316 hastanın katıldığı başka bir çalışmada, >34 CGG tekrar sayısında her 5 CGG tekrar sayısı artışında over rezervinin azalma riskinin %50 arttığı belirtilmiştir (139). Bennet ve arkadaşları 366 POF ve 1389 kontrol olgusuyla yaptıkları çalışmada; 35-54 CGG tekrarı ile POF arasında bir ilişki saptamamışlardır (140). Bizim çalışmamızda da CGG tekrarı 35-54 aralığında olan olgu sayısı hem kontrol hem de hasta grubunda %25.45 (14`er olgu) oranında saptanmış olup istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p değeri 1).

Menstrüel sıklüsta FSH düzeyinin en yüksek olduğu zaman erken foliküller faz (3.5-12.5 mIU/mL) olup, bu hormon düzeyi üreme yaşının değerlendirilebildiği ilk işarettir (141). Murray ve arkadaşlarının (1999) halen adet gören premutasyon taşıyıcısı 19 olgu, full mutasyona sahip 9 olgu ve 23 kontrol olgusuyla yaptıkları

çalışmada premutasyon taşıyıcılarının full mutasyonlu olgular ve kontrollerle karşılaştırılmasında FSH düzeylerini anlamlı olarak daha yüksek saptamış fakat östradiol düzeyleri arasında bir ilişki bulamamışlardır. Östradiol seviyelerinde fark bulamamasını östradiolün overlerden salınmasına ve olgularda halen ovulasyonun olmasına bağlamışlardır (142). Sullivan ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada ise premutasyon taşıyıcıları ve kontrol olguları yaş grupları oluşturularak karşılaştırılmıştır. Buna göre; yaş gruplarındaki premutasyon taşıyıcıları FSH düzeyleri tüm yaş gruplarındaki kontrollerle karşılaştırıldığında anlamsız saptanmış ancak olguların yaşları 30-39 olarak sınırlandırıldığında premutasyon taşıyıcılarında anlamlı olarak yüksek (FSH \geq 40 IU/L) belirlenmiştir (141). Buna benzer şekilde Hundscheid ve arkadaşları (2001) çalışmalarında 30`lu yaşlarındaki premutasyon taşıyıcısı kadınlarda FSH düzeyini anlamlı olarak yüksek bulmuş ve FSH yüksekliği bulunan premutasyon taşıyıcısı kadınlarda menstrüel sıklular devam etse de spontan gebelik oluşma ihtimalinin düşük olduğunu belirtmişlerdir (143). Çalışmamızdaki hasta grubunda ortalama FSH: 51.3 \pm 4.5 mIU/mL değerindedir. Çalışmamızda saptadığımız premutasyon taşıyıcısı H30`un FSH değeri 41.46 mIU/mL (postmenapozal FSH: 25.8 - 134.8 mIU/mL) olup postmenapozal dönem ile uyumludur. Gri zonda saptadığımız olgularda ise H17`nin FSH değeri 25.48 mIU/mL, H20`nin 25.32 mIU/mL ve H32`nin 53.78 mIU/mL idi. Gri zondaki hasta 17 ve 20`nin FSH düzeyleri postmenapozal düzeyin altında, hasta 32`nin FSH değerleri ise postmenapozal düzeydedir. Premutasyon taşıyıcılarında FSH düzeylerinin premutasyon taşıyıcısı olmayanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmesine karşılık premutasyon taşıyıcılığı saptadığımız olgumuzun FSH düzeyi, premutasyon taşıyıcısı olmayan hasta grubumuzun FSH düzeyi ortalamasından daha düşük bulunmuştur.

FMR1 geni 5'UTR bölgesinde CGG tekrarlarını bölen AGG dizi sayısı CGG tekrarlarının maternal stabilitesi açısından önemlidir. Yapılan çalışmalar; AGG kesintilerinin az olmasının, maternal transmisyonadaki instabiliteyi artırarak full mutasyona dönüşmedeki riski arttırdığını göstermiştir. Genellikle 5-50 CGG tekrarı olan allellerin arasında iki veya daha fazla AGG tekrarı bulunmakta iken premutasyon taşıyan allellerin çoğunda en fazla bir AGG bulunmaktadır (3). Çalışmamızda 2. allelinde 98 CGG tekrarı bulunan premutasyon taşıyıcısı H30`da CGG tekrarları arasında hiç AGG dizisi bulunmaması ve gri zon saptanan H17, H20'deki AGG sayıları (sırasıyla 2-1, 3-0) literatürdeki bu bilgi ile uyumluluk göstermektedir. Gri zondaki diğer olgular olan H32 ve K28'deki AGG sayıları ise

sırası ile 2-2 ve 2-2'dir. Yrigollen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 60-80 CGG tekrar sayısı aralığında olan premutasyon taşıyıcılarında AGG sayısının bilinmesinin olguların üreme zamanı kararlarını etkileyebileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar full mutasyona dönüşen AGG kesintisi olmayan en küçük CGG tekrar sayılı alleli de 56 olarak saptamışlardır (127).

Premutasyon taşıyıcısı kadınların sadece %20'sinde POF kliniği meydana gelmektedir. Premutasyon taşıyıcısı olanlarda POF'un inkomplet penetransını açıklayan 4 faktör bulunmaktadır: İnkomplet penetransın CGG tekrar sayısı, skewed X inaktivasyonu, sigara ve etkili diğer genlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (122). Allen ve arkadaşları CGG tekrar sayısı ve ovaryen yetmezlik arasında orantısız olmayan bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Premutasyon taşıyıcıları ile yaptıkları çalışmada; CGG tekrar sayısı ile ovaryen yetmezlik arasındaki ilişkiyi belirlemek için premutant CGG tekrarları düşük tekrar sayısı: 59-79; orta tekrar sayısı: 80-100 ve yüksek tekrar sayısı: >100 olmak üzere 3 grupta sınıflandırmışlardır. Buna göre, ovaryen disfonksiyonu en fazla ~80-100 CGG tekrar sayısı olan olgularda gözlemiş olup non linear bir ilişki olduğunu öne sürmüşlerdir. Over yetmezliği ile tekrar sayısı arasındaki non linear ilişkinin; FMRP'nin etkisiz translasyonunda 100'den fazla tekrarı olan allellerde sınırlı olduğu şeklinde açıklamışlardır. Tekrar sayısı 100'den düşük olduğunda artmış mRNA seviyesi FMRP düzeyini artırarak FMRP'nin süprese ettiği transkriptlerde haployetmezliğe neden olmaktadır. Ayrıca orta CGG tekrar sayısına (80-100) sahip bireylerde daha erken yaşlarda ovaryen yetmezliğin başladığını göstermişlerdir (124). Çalışmamızdaki premutasyon taşıyıcısı H30'un premutant allelinde 98 CGG tekrarı bulunmakta ve Allen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki sınıflamaya göre POF için en riskli grup olan orta tekrar sayılı grupta yer almakta olup menapoza girme yaşı ise 28 yaştır. Bir olgudaki bu bulgularımız Allen ve arkadaşlarının çalışma sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

Diğer bir faktör olan X inaktivasyonunun ise FMR1 ilişkili POF'un penetransında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Yapılmış pek çok çalışmada premutasyon taşıyıcılarında rastgele X inaktivasyonunun olduğu ve skewed X inaktivasyonunun olmadığı gösterilmiştir (141, 144). Bordega ve arkadaşları premutasyon taşıyıcılarındaki rastgele X inaktivasyonu ile ilgili olarak over dokusundaki X inaktivasyonu oranıyla kan hücrelerindeki oranın benzer olup olmadığının araştırılması gerektiğini vurgulamışlardır (145). Farklı bir görüş olarak

ise; her iki X kromozomunun aktif olduğu gelişim basamakları sırasında premutasyonun toksik etkisine bağlı olarak POF oluştuğunu ileri sürmüşlerdir (124, 146). Çalışmamızda X inaktivasyonu çalışması yapılmamıştır.

POF'ta inkomplet penetranstaki diğer bir faktör olan sigara, menapoz yaşını etkileyen önemli ajanlardan biri olup FMR1 premutasyon taşıyıcılığıyla aynı etkiyi gösterdiği ileri sürülmektedir (124). Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal madde bulunmaktadır. Neal ve arkadaşları IVF planlanan aktif sigara içen 19 olgu, pasif içici 7 olgu ile sigaraya maruz kalmayan 10 olguyu karşılaştırmışlardır. Toplamda 36 olgunun ovaryen folikül sıvıları incelenmiş ve sigara dumanında bulunan benzo[a]piren ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbon düzeyleri ölçülmüş; aktif sigara içenlerde benzo[a]piren düzeyleri önemli derecede yüksek bulunurken diğer polisiklik aromatik hidrokarbon düzeylerinde bir farklılık saptanmamıştır. Benzo[a]piren düzeyindeki bu yüksekliğin primordiyal oositlerin yıkımını artırarak toksik etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (147). Allen ve arkadaşları çalışmalarında hem premutasyon taşıyıcı olanlarda hem de premutasyon taşıyıcısı olmayan sigara içicilerinde menapoz yaşının küçüldüğünü saptamışlardır (124). Çalışmamızdaki premutasyon taşıyıcısı olgumuz günde 7 adet sigara tükettiğini bildirmiştir. Literatürde sigara miktarı hakkında bilgi verilmemektedir. Bu nedenle olgumuzdaki sigaranın etkisini bilmemekteyiz. Sigara maruziyetinin etkisinin değerlendirilmesi açısından kontrollü daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

CGG tekrar sayısı 80-100 olan FMR1 premutasyon taşıyıcısı kadınların fertilitte süreleri önemli derecede kısalmaktadır. Premutasyon taşıyıcısı olgumuzda (H30: 98 CGG tekrar sayısı) gebelik istemi olmasına rağmen hiç gebelik oluşmaması literatürdeki bu bilgi ile örtüşmektedir. CGG sayısındaki artış sadece fertilitteyi değil aynı zamanda over fonksiyonlarının azalmasına bağlı erken yaşlarda hipoöstrojenizm ile ilişkili hastalıkların riskinin de artmasına neden olmakta olup buna bağlı olarak daha erken başlangıçlı osteoporoz ve kırık riskini oluşturan düşük kemik yoğunluğu, endotel fonksiyonunun bozulmasına sekonder koroner kalp hastalığı gibi kardiyovasküler mortalite riski artmaktadır (122). Olgumuzun E2 düzeyi 24.02 ng/mL olup postmenapozal dönemle (postmenapozal E2: 5 - 54.7 ng/mL) uyumlu idi. Olguda hipoöstrojenizme bağlı bulgular henüz gelişmemiş olup takibi önerilmiştir.

Östrojen aynı zamanda nöron koruyucu bir hormon olup beyin fonksiyonlarında da önemlidir. Bu nedenle yaşla beraber östrojen düzeyinde

meydana gelen değişiklikler kognitif fonksiyonun azalmasına ve Alzheimer hastalığı riskinde artışa neden olabilmektedir. Ayrıca premutasyon taşıyıcılarında erken östrojen eksikliğinin de kısmi etkisiyle riski artan diğer bir hastalık da nörodejeneratif bir hastalık olan FXTAS (Frajil X Tremor Ataksi Sendromu)'tır (122). FXTAS, 55 yaş sonrası ortaya çıkan yönetsel işlev bozukluğu, tremor, ataksi ve nöropati ile karakterize bir hastalıktır (118). İkinci bir X kromozomunun koruyucu etkisi olmadığından FXTAS'ın bulguları erkek premutasyon taşıyıcılarında daha sık gözlenmekte olup premutasyon taşıyıcısı kadınların ise küçük bir kısmında görülmektedir (148). Çalışmamızdaki premutasyon taşıyıcısı olgumuz 34 yaşında olup nörolojik semptomlar bulunmamaktadır.

Coffey ve arkadaşları (2008) 146 premutasyon taşıyıcısı olgu ve 69 kontrol olgusunu tiroid hastalıkları açısından karşılaştırmış ve hasta grubunda tiroid hastalıkları riskinin arttığını saptamışlardır. Bu durumdan mRNA toksisitesinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. mRNA toksisitesi direkt hipotalamik hipofizer aks üzerine ve belki otoimmün mekanizma ile tiroid üzerine etki edebilmekte veya tiroid hücrelerinde apoptozu arttırabilmektedir. Ayrıca tiroid disfonksiyonu premutasyon taşıyıcılarındaki nörolojik bulgulara da sebep olabilmektedir. Hipotiroidizm kognitif bozukluk, anksiyete ve depresyon gibi psikolojik bulguların nedenleri arasındadır. Bu nedenle premutasyon taşıyıcılarında tiroid hastalıklarını saptayıp tedavi etmek önemlidir (149). Çalışmamızda saptadığımız premutasyon taşıyıcısı olgunun tiroid fonksiyon testleri normal olarak saptanmış olup olgunun tiroid USG'sinde sağ alt polde solid izo-hipoekoik tek nodülü bulunmaktadır.

Ayrıca POF'lu kadınlarda normal over fonksiyonu olan kadınlara göre psikolojik sorunlar daha sık görülmektedir. Bu durumun hipoöstrojenizmin kognitif sonuçlarından olabildiği düşünülmektedir (122). Premutasyon taşıyıcısı olan 199 olgunun psikiyatrik durumunu değerlendiren bir çalışmada; bu olguların depresyon, anksiyete ve dikkat problemi yönünden daha sık tanı aldıkları veya tedavi oldukları saptanmıştır (148). Bizim çalışmamızdaki premutasyon taşıyıcısı olan olgunun şu ana kadar herhangi bir psikiyatrik sorunu bulunmamaktadır.

Yrigollen ve arkadaşlarının FMR1 geninin 5'UTR bölgesindeki CGG tekrar sayısının maternal transmisyon sırasındaki stabilitesi üzerine yaptığı çalışmada, anne yaşının önemli olduğunu saptamışlar ve anne yaşındaki artışın transmisyon sırasında full mutasyona genişleme olasılığının arttığını ileri sürmüşlerdir. Örneğin; 20 yaşındaki bir annede ekspansiyon olasılığı %56 iken 30 yaşındaki bir annede

%85 olarak hesaplanmıştır (127). Ayrıca maternal kalıtılan alleller genişleme ihtimaline sahip olduğundan klinik olarak daha önemlidir. Paternal kalıtılan premutant allellerin ise genişleme riski çok azdır (150). Çalışmamızda premutasyon taşıyıcısı saptadığımız olgunun anne menapoz yaşı 50 idi. Hastanın ebeveynleri kan vermeyi kabul etmediğinden bu konuda genetik analizleri yapılamamıştır.

Tüm POF olgularının %4-30'u ailesel olup bu durumun genetik yatkınlık sonucu olduğunu göstermektedir (151). Ailevi POF'da premutasyon taşıyıcılığı oranı %13'lere kadar çıkmaktadır (123). Çalışmamızda olgularımızın 32 tanesinin akrabalarının menapoz yaşı öğrenilebilmiştir. 32 olgunun 15 tanesinin (%46.8) akrabalarında POF öyküsü mevcut olup akraba grubunu anne, kardeş, teyze ve anneanne oluşturmakta idi. Saptadığımız oranın literatürle karşılaştırıldığında yüksek olması, kalan 23 olgunun akrabalarındaki menapoz yaşı hakkında bilgi edinilememesine bağlamaktayız.

SONUÇLAR

1. Hasta ve kontrol grubu FMR1 5'UTR bölgesi CGG tekrar sayısı açısından incelendiğinde hasta grubunda 1 premutasyon taşıyıcısı saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubunda premutasyon taşıyıcılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamış olsa da premutasyon taşıyıcılığının saptanmasının hastanın takibi ve aile taraması açısından klinik önemi bulunmaktadır
2. Hasta ve kontrol grubu FMR1 5'UTR bölgesi CGG tekrar sayısı açısından incelendiğinde hasta grubunda 3 gri zon (45-54) saptanırken kontrol grubunda sadece 1 olguda gri zon saptanmıştır. Gri zondaki tekrar sayısının üç kuşak sonra full mutasyona dönüşme riski olması açısından klinik olarak önemi bulunmaktadır.
3. Hasta ve kontrol grubu arasında CGG tekrar sayısı 35 ile 54 arası olan olgular açısından istatistiksel fark saptanmamıştır.
4. Premutasyon taşıyıcılarında FSH düzeylerinin premutasyon taşıyıcısı olmayanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmesine karşılık premutasyon taşıyıcılığı saptadığımız olgumuzun FSH düzeyi, premutasyon taşıyıcısı olmayan hasta grubumuzun FSH düzeyi ortalamasından daha düşük bulunmuştur.
5. Premutasyon taşıyıcısı saptadığımız olgumuzda CGG tekrar sayısı 98 olup literatüre göre en çok etkilenen grupta (80-100 CGG tekrarı) yer almaktadır. Olgumuzda gebelik hiç gerçekleşmemiştir.
6. Premutasyon taşıyıcısı saptadığımız olgumuzda hipoöstrojenizme bağlı bulguların ortaya çıkmaması yaşının genç (34 yaş) olmasına bağlanmış olup olguya ilgili branşlarda takip önerilmiştir.
7. CGG tekrarları arasına dağılmış AGG dizisi özellikle CGG tekrar sayısı 80-100 aralığında olan bireylerde maternal transmisyon sırasında ekspansiyon riski taşıdığından önemlidir. Bu tez çalışmasında 2. allelinde 98 CGG tekrarı bulunan premutasyon taşıyıcısı H30'da CGG tekrarları arasında hiç AGG dizisi bulunmamıştır. Gri zon saptanan H17, H20'nin allel 2'lerinde AGG sayılarının (sırasıyla 2-1, 3-0) azaldığı saptanmıştır.
8. POF etiolojisinde FMR1 premutasyon taşıyıcılığı olan hastaların başka taşıyıcı olabilecek akrabaları FMR1 geni açısından taranmalıdır. Ayrıca; bu olgulara -gebe kalma olasılıkları az olsa da- gebe kaldıkları takdirde Frajil X

sendromlu çocuk sahibi olabilecekleri hakkında genetik danışma verilmesi önemlidir.

Sonuç olarak; Türk toplumundaki idiyopatik POF olgularında premutasyon taşıyıcılığı sıklığı düşük olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızdaki hasta ve kontrol grubu sayısının düşük olmasını etken olarak görmekteyiz. Dolayısıyla daha geniş hasta ve kontrol grubu ile yapılan çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Ancak bir olguda da olsa premutasyon taşıyıcılığının saptanması hastanın yönlendirilmesi ve genetik danışma verilme açısından klinik önem taşımaktadır.



KAYNAKLAR

- 1.Cordts EB, Christofolini DM, dos Santos AA, Bianco B, Barbosa CP. Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. Archives of gynecology and obstetrics. 2011;283(3):635-43.
- 2.Cox L, Liu JH. Primary ovarian insufficiency: an update. International journal of women's health. 2013;6:235-43.
- 3.Ye Y, Lan X, Cong J, Li N, Wu Y, Zhang M, et al. Analysis of CGG repeats in FMR1 in Chinese women with idiopathic premature ovarian failure. Reproductive biomedicine online. 2014;29(3):382-7.
- 4.Saul RA, Tarleton JC. FMR1-related disorders. 2012.
- 5.Pouresmaeili F, Fazeli Z. Premature ovarian failure: a critical condition in the reproductive potential with various genetic causes. int J Fertil steril. 2014;8(1):1-12.
- 6.Conway GS, Payne NN, Webb J, Murray A, Jacobs PA. Fragile X premutation screening in women with premature ovarian failure. Human Reproduction. 1998;13(5):1184-7.
- 7.Bussani C, Papi L, Sestini R, Baldinotti F, Bucciantini S, Bruni V, et al. Premature ovarian failure and fragile X premutation: a study on 45 women. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2004;112(2):189-91.
- 8.Ferrarini E, Russo L, Fruzzetti F, Agretti P, De Marco G, Dimida A, et al. Clinical characteristics and genetic analysis in women with premature ovarian insufficiency. Maturitas. 2013;74(1):61-7.
- 9.Clement P. Histology of the Ovary. Histology for Pathologists Stephen E, Stenberg S, editors. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997;2. 929-59 p.
- 10.Sadler TW. Langman's medical embryology. 11th ed. Philadelphia Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2010.

11. Moore K, Persaud T. İnsan Embriyolojisi (Çev.). 6. ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2002. 225-55 p.
12. Zuckerman S. The number of oocytes in the mature ovary. Recent Progress in Hormone Research. 1951;6:63-109.
13. Zuckerman S, Baker T. The development of the ovary and the process of oogenesis. In The Ovary. Zuckerman S, Weir BJ, editors. New York: Academic Press; 1977.
14. Gürsoy E, Ergin K. Dişi Üreme Sistemi Atlası: Nobel Tıp Kitabevleri 2007.
15. Bükülmez O, Arici A. Over fizyolojisi. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ankara: Güneş Kitabevi; 1996. 1129-45 p.
16. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular Depletion During the Menopausal Transition: Evidence for Accelerated Loss and Ultimate Exhaustion*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1987;65(6):1231-7.
17. Shamilova NN, Marchenko LA, Dolgushina NV, Zaletaev DV, Sukhikh GT. The role of genetic and autoimmune factors in premature ovarian failure. Journal of assisted reproduction and genetics. 2013;30(5):617-22.
18. Nelson LM, Anasti JN, Kimzey LM, Defensor RA, Lipetz KJ, White BJ, et al. Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1994;79(5):1470-5.
19. Van Kasteren Y, Schoemaker J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. Human reproduction update. 1999;5(5):483-92.
20. Rebar RW, Connolly HV. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. Obstetrical & Gynecological Survey. 1990;45(11):763-4.

21.De Vos M, Devroey P, Fauser BC. Primary ovarian insufficiency. *The Lancet*. 2010;376(9744):911-21.

22.Coulam CB, Adamson SC, ANNEGERS JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstetrics & Gynecology*. 1986;67(4):604-6.

23.Panay N, Kalu E. Management of premature ovarian failure. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2009;23(1):129-40.

24.Nippita T, Baber R. Premature ovarian failure: a review. *Climacteric*. 2007;10(1):11-22.

25.Welt CK. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clinical endocrinology*. 2008;68(4):499-509.

26.Luborsky J, Meyer P, Sowers M, Gold E, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition*. *Human Reproduction*. 2003;18(1):199-206.

27.Alzubaidi NH, Chapin HL, Vanderhoof VH, Calis KA, Nelson LM. Meeting the needs of young women with secondary amenorrhea and spontaneous premature ovarian failure. *Obstetrics & Gynecology*. 2002;99(5, Part 1):720-5.

28.Nelson LM. Primary ovarian insufficiency. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(6):606-14.

29.Çelik Ö. Yardımcı üreme teknikleri temel klinik ve embriyolojik uygulamalar. Adana: Nobel Kitabevi; 2011.

30.Byrne J, Lewis S, Halamek L, Connelly RR, Mulvihill JJ. Childhood cancer survivors' knowledge of their diagnosis and treatment. *Annals of internal medicine*. 1989;110(5):400-3.

31.Nicosia SV, Matus-Ridley M, Meadows AT. Gonadal effects of cancer therapy in girls. *Cancer*. 1985;55(10):2364-72.

32. Warne G, Fairley K, Hobbs JB, Martin F. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. *New England Journal of Medicine*. 1973;289(22):1159-62.
33. Siris ES, Leventhal BG, Vaitukaitis JL. Effects of childhood leukemia and chemotherapy on puberty and reproductive function in girls. *New England Journal of Medicine*. 1976;294(21):1143-6.
34. Anderson RA, Cameron DA. Pretreatment serum anti-müllerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(5):1336-43.
35. Dunlop CE, Anderson RA. Uses of anti-Müllerian hormone (AMH) measurement before and after cancer treatment in women. *Maturitas*. 2015;80(3):245-50.
36. Anasti JN. Premature ovarian failure: an update. *Fertility and sterility*. 1998;70(1):1-15.
37. Wallace WHB, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *The lancet oncology*. 2005;6(4):209-18.
38. Raymond J, Izembart M, Marliac V, Dagousset F, Merceron R, Vulpillat M, et al. Temporary ovarian failure in thyroid cancer patients after thyroid remnant ablation with radioactive iodine. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1989;69(1):186-90.
39. Ash P. The influence of radiation on fertility in man. *The British journal of radiology*. 1980;53(628):271-8.
40. Stillman RJ, Schinfeld JS, Schiff I, Gelber RD, Greenberger J, Larson M, et al. Ovarian failure in long-term survivors of childhood malignancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1981;139(1):62-6.
41. Davis VJ. Female gamete preservation. *Cancer*. 2006;107(S7):1690-4.

42. Stroud JS, Mutch D, Rader J, Powell M, Thaker PH, Grigsby PW. Effects of cancer treatment on ovarian function. *Fertility and sterility*. 2009;92(2):417-27.
43. Morice P, Juncker L, Rey A, El-Hassan J, Haie-Meder C, Castaigne D. Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fertility and sterility*. 2000;74(4):743-8.
44. Mark-Kappeler CJ, Hoyer PB, Devine PJ. Xenobiotic effects on ovarian preantral follicles. *Biology of reproduction*. 2011;85(5):871-83.
45. Cramer DW, Xu H, Harlow BL. Does "incessant" ovulation increase risk for early menopause? *American journal of obstetrics and gynecology*. 1995;172(2):568-73.
46. Busacca M, Riparini J, Somigliana E, Oggioni G, Izzo S, Vignali M, et al. Postsurgical ovarian failure after laparoscopic excision of bilateral endometriomas. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2006;195(2):421-5.
47. Hascalik S, Celik O, Sarac K, Hascalik M. Transient ovarian failure: a rare complication of uterine fibroid embolization. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2010.
48. Siddle N, Sarrel P, Whitehead M. The effect of hysterectomy on the age at ovarian failure: identification of a subgroup of women with premature loss of ovarian function and literature review. *Fertility and sterility*. 1987;47(1):94-100.
49. Shelling AN. Premature ovarian failure. *Reproduction*. 2010;140(5):633-41.
50. Doldi N, Belvisi L, Bassan M, Fusi F, Ferrari A. Premature ovarian failure: steroid synthesis and autoimmunity. *Gynecological Endocrinology*. 2009.
51. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage H. Premature Ovarian Failure and Ovarian Autoimmunity 1. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):107-34.
52. Khole V. Does ovarian autoimmunity play a role in the pathophysiology of premature ovarian insufficiency? *Journal of mid-life health*. 2010;1(1):9.

53. Novosad JA, Kalantaridou SN, Tong Z-B, Nelson LM. Ovarian antibodies as detected by indirect immunofluorescence are unreliable in the diagnosis of autoimmune premature ovarian failure: a controlled evaluation. *BMC women's health*. 2003;3(1):2.
54. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Human reproduction update*. 2005;11(4):391-410.
55. Kim TJ, Anasti JN, Flack MR, Kimzey LM, Defensor RA, Nelson LM. Routine endocrine screening for patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Obstetrics & Gynecology*. 1997;89(5, Part 1):777-9.
56. Bakalov V, Vanderhoof V, Bondy C, Nelson L. Adrenal antibodies detect asymptomatic auto-immune adrenal insufficiency in young women with spontaneous premature ovarian failure. *Human Reproduction*. 2002;17(8):2096-100.
57. Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertility and sterility*. 1998;70(4):613-22.
58. Smith JA, Vitale S, Reed GF, Grieshaber SA, Goodman LA, Vanderhoof VH, et al. Dry eye signs and symptoms in women with premature ovarian failure. *Archives of Ophthalmology*. 2004;122(2):151-6.
59. Morrison J, Givens J, Wiser W, Fish S. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertility and sterility*. 1975;26(7):655-9.
60. Familiari U, Larocca L, Tamburrini E, Antinori A, Ortona L, Capelli A. Premenopausal cytomegalovirus oophoritis in a patient with AIDS. *Aids*. 1991;5(4):458.
61. Vermeulen A. Environment, human reproduction, menopause, and andropause. *Environmental health perspectives*. 1993;101(Suppl 2):91.

- 62.Chang SH, Kim C-S, Lee K-S, Kim H, Yim SV, Lim YJ, et al. Premenopausal factors influencing premature ovarian failure and early menopause. *Maturitas*. 2007;58(1):19-30.
- 63.Tuttle AM, Stämpfli M, Foster WG. Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. *Human reproduction*. 2009;24(6):1452-9.
- 64.He C, Kraft P, Chen C, Buring JE, Paré G, Hankinson SE, et al. Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause. *Nature genetics*. 2009;41(6):724-8.
- 65.Perry JR, Stolk L, Franceschini N, Lunetta KL, Zhai G, McArdle PF, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche. *Nature genetics*. 2009;41(6):648-50.
- 66.Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus 1. *Endocrinology*. 1938;23(5):566-74.
- 67.Bondy CA. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(1):10-25.
- 68.Mathur A, Stekol L, Schatz D, MacLaren N, Scott M, Lippe B. The parental origin of the single X chromosome in Turner syndrome: lack of correlation with parental age or clinical phenotype. *American journal of human genetics*. 1991;48(4):682.
- 69.Ferguson-Smith MA. Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. *Journal of medical genetics*. 1965;2(2):142.
- 70.Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I, Segni M, Municchi G. Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82(6):1810-3.

71. Modi D, Sane S, Bhartiya D. Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. *Molecular Human Reproduction*. 2003;9(4):219-25.
72. Sato K, Uehara S, Hashiyada M, Nabeshima H, Sugawara Ji, Terada Y, et al. Genetic significance of skewed X-chromosome inactivation in premature ovarian failure. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2004;130(3):240-4.
73. Wooten N, Bakalov VK, Hill S, Bondy CA. Reduced abdominal adiposity and improved glucose tolerance in growth hormone-treated girls with Turner syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(6):2109-14.
74. Simpson JL. Gonadal dysgenesis and abnormalities of the human sex chromosomes: current status of phenotypic-karyotypic correlations. *Birth defects original article series*. 1975;11(4):23.
75. dos Santos AP, Andrade JGR, Piveta CSC, de Paulo J, Guerra-Junior G, de Mello MP, et al. Screening of Y chromosome microdeletions in 46, XY partial gonadal dysgenesis and in patients with a 45, X/46, XY karyotype or its variants. *BMC medical genetics*. 2013;14(1):1.
76. Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW, Müller J. Occurrence of Gonadoblastoma in Females with Turner Syndrome and Y Chromosome Material: A Population Study 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(9):3199-202.
77. Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. A review of trisomy X (47, XXX). *Orphanet journal of rare diseases*. 2010;5(1):8.
78. Linden MG, Bender BG, Harmon RJ, Mrazek DA, Robinson A. 47, XXX: what is the prognosis? *Pediatrics*. 1988;82(4):619-30.
79. Lin HJ, Ndiforchu F, Patell S. Exstrophy of the cloaca in a 47, XXX child: Review of genitourinary malformations in triple-X patients. *American journal of medical genetics*. 1993;45(6):761-3.

80. Goswami R, Goswami D, Kabra M, Gupta N, Dubey S, Dadhwal V. Prevalence of the triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders. *Fertility and sterility*. 2003;80(4):1052-4.

81. Fassnacht W, Mempel A, Strowitzki T, Vogt P. Premature ovarian failure (POF) syndrome: towards the molecular clinical analysis of its genetic complexity. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(12):1397-410.

82. Tharapel A, Anderson K, Simpson J, Martens P, Wilroy Jr RS, Llerena Jr J, et al. Deletion (X)(q26.1-->q28) in a proband and her mother: molecular characterization and phenotypic-karyotypic deductions. *American journal of human genetics*. 1993;52(3):463.

83. Powell CM, Taggart RT, Drumheller TC, Wangsa D, Qian C, Nelson LM, et al. Molecular and cytogenetic studies of an X; autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *American journal of medical genetics*. 1994;52(1):19-26.

84. Marozzi A, Manfredini E, Tibiletti M, Furlan D, Villa N, Vegetti W, et al. Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected by premature ovarian failure. *Human genetics*. 2000;107(4):304-11.

85. Yanase T, Sanders D, Shibata A, Matsui N, Simpson ER, Waterman MR. Combined 17 α -Hydroxylase/17, 20-Lyase Deficiency due to a 7-Basepair Duplication in the N-Terminal Region of the Cytochrome P45017 α (CYP17) Gene*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1990;70(5):1325-9.

86. Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, Lippuner K, Jaeger P, Harada H. Aromatase Deficiency in a Female Who Is Compound Heterozygote for Two New Point Mutations in the P450arom Gene: Impact of Estrogens on Hypergonadotropic Hypogonadism, Multicystic Ovaries, and Bone Densitometry in Childhood 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82(6):1739-45.

87. Yanase T. 17α -Hydroxylase/ $17, 20$ -lyase defects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1995;53(1):153-7.
88. Laml T, Preyer O, Umek W, Hengstschläger M, Hanzal E. Genetic disorders in premature ovarian failure. *Human Reproduction Update*. 2002;8(5):483-91.
89. Chen Y-T, Mattison DR, Feigenbaum L, Fukui H, Schulman JD. Reduction in oocyte number following prenatal exposure to a diet high in galactose. *Science*. 1981;214(4525):1145-7.
90. Levy HL, Driscoll SG, Porensky RS, Wender DF. Ovarian failure in galactosemia. *The New England journal of medicine*. 1984;310(1):50.
91. Prestoz L, Couto A, Shin Y, Petry K. Altered follicle stimulating hormone isoforms in female galactosaemia patients. *European journal of pediatrics*. 1997;156(2):116-20.
92. Waggoner D, Buist N, Donnell G. Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. *Journal of inherited metabolic disease*. 1990;13(6):802-18.
93. Aittomäki K, Herva R, Stenman U-H, Juntunen K, Ylöstalo P, Hovatta O, et al. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996;81(10):3722-6.
94. Risma KA, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J, Nilson JH. Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(5):1322-6.
95. Latronico AC, Chai Y, Arnhold IJ, Liu X, Mendonca BB, Segaloff DL. A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Molecular Endocrinology*. 1998;12(3):442-50.

96. Persani L, Rossetti R, Cacciatore C. Genes involved in human premature ovarian failure. *Journal of molecular endocrinology*. 2010;45(5):257-79.
97. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger F, Mather J, et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996;81(4):1401-5.
98. Halvorson L, DeCherney A. Inhibin, activin, and follistatin in reproductive medicine. *Fertility and sterility*. 1996;65(3):459-69.
99. Findlay J, Drummond A, Dyson M, Baillie A, Robertson D, Ethier J-F. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor- β superfamily. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;191(1):35-43.
100. Prendergast KA, Burger LL, Aylor KW, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC. Pituitary follistatin gene expression in female rats: evidence that inhibin regulates transcription. *Biology of reproduction*. 2004;70(2):364-70.
101. Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Progress in Hormone Research*. 2001;57:257-75.
102. Shelling AN, Burton KA, Chand AL, van Ee CC, France JT, Farquhar CM, et al. Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. *Human Reproduction*. 2000;15(12):2644-9.
103. Marozzi A, Porta C, Vegetti W, Crosignani P, Tibiletti M, Dalpra L, et al. Mutation analysis of the inhibin alpha gene in a cohort of Italian women affected by ovarian failure. *Human Reproduction*. 2002;17(7):1741-5.
104. Corre T, Schuettler J, Bione S, Marozzi A, Persani L, Rossetti R, et al. A large-scale association study to assess the impact of known variants of the human INHA gene on premature ovarian failure. *Human reproduction*. 2009;24(8):2023-8.
105. Lim JH, Booker AB, Fallon JR. Regulating fragile X gene transcription in the brain and beyond. *Journal of cellular physiology*. 2005;205(2):170-5.

- 106.O'Donnell WT, Warren ST. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. Annual review of neuroscience. 2002;25(1):315-38.
- 107.Harris SW, Hessler D, Goodlin-Jones B, Ferranti J, Bacalman S, Barbato I, et al. Autism profiles of males with fragile X syndrome. American Journal on Mental Retardation. 2008;113(6):427-38.
- 108.Eichler EE, Macpherson JN, Murray A, Jacobs PA, Chakravarti A, Nelson DL. Haplotype and interspersed analysis of the FMR1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome. Human molecular genetics. 1996;5(3):319-30.
- 109.Zhong N, Yang W, Dobkin C, Brown WT. Fragile X gene instability: anchoring AGGs and linked microsatellites. American journal of human genetics. 1995;57(2):351.
- 110.Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. Fine structure of the human FMR1 gene. Human molecular genetics. 1993;2(8):1147-53.
- 111.Fu Y-H, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell. 1991;67(6):1047-58.
- 112.Shimizu M, Gellibolian R, Oostra BA, Wells RD. Cloning, characterization and properties of plasmids containing CGG triplet repeats from the FMR-1 gene. Journal of molecular biology. 1996;258(4):614-26.
- 113.Genatlas. http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/X/html/FMR1_1.html. Erişim tarihi: 28.09.2015
- 114.Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. Nature genetics. 1994;8(1):88-94.

115. Warren ST, Ashley Jr CT. Triplet repeat expansion mutations: the example of fragile X syndrome. *Annual review of neuroscience*. 1995;18(1):77-99.
116. Bardoni B, Mandel J-L. Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Current opinion in genetics & development*. 2002;12(3):284-93.
117. Loesch DZ, Bui QM, Dissanayake C, Clifford S, Gould E, Bulhak-Paterson D, et al. Molecular and cognitive predictors of the continuum of autistic behaviours in fragile X. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2007;31(3):315-26.
118. Tosh D, Rao KL, Rani HS, Deenadayal DA, Murty U, Grover P. Association between fragile X premutation and premature ovarian failure: a case-control study and meta-analysis. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2014;289(6):1255-62.
119. Abitbol M, Menini C, Delezoide A-L, Rhyner T, Vekemans M, Mallet J. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nature genetics*. 1993;4(2):147-53.
120. Cronister A, Schreiner R, Wittenberger M, Amiri K, Harris K, Hagerman RJ. Heterozygous fragile X female: historical, physical, cognitive, and cytogenetic features. *American journal of medical genetics*. 1991;38(2-3):269-74.
121. Schwartz C, Dean J, Howard-Peebles P, Bugge M, Mikkelsen M, Tommerup N, et al. Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study. *American journal of medical genetics*. 1994;51(4):400-2.
122. Allen EG, Grus WE, Narayan S, Espinel W, Sherman SL. Approaches to identify genetic variants that influence the risk for onset of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI): a preliminary study. *Frontiers in genetics*. 2014;5.
123. Persani L, Rossetti R, Cacciatore C, Bonomi M. Primary ovarian insufficiency: X chromosome defects and autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2009;33(1):35-41.

124. Allen E, Sullivan A, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein M, et al. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Human reproduction*. 2007;22(8):2142-52.
125. Welt C, Smith P, Taylor A. Evidence of early ovarian aging in fragile X premutation carriers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(9):4569-74.
126. Toniolo D. X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Current opinion in genetics & development*. 2006;16(3):293-300.
127. Yrigollen CM, Martorell L, Durbin-Johnson B, Naudo M, Genoves J, Murgia A, et al. AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. *Journal of neurodevelopmental disorders*. 2014;6(1):1.
128. AmplideX™ FMR1 PCR Kit Instructions for Use. In: Asuragen, Inc., editors. 2012.
129. Partington M, Moore D, Turner G. Confirmation of early menopause in fragile X carriers. *American journal of medical genetics*. 1996;64(2):370-2.
130. Vianna-Morgante AM, Costa SS, Pares AS, Verreschi IT. FRAXA premutation associated with premature ovarian failure. *American journal of medical genetics*. 1996;64(2):373-5.
131. Barasoain M, Barrenetxea G, Huerta I, Téllez M, Carrillo A, Pérez C, et al. Study of FMR1 gene association with ovarian dysfunction in a sample from the Basque Country. *Gene*. 2013;521(1):145-9.
132. Chen L-S, Tassone F, Sahota P, Hagerman PJ. The (CGG) n repeat element within the 5' untranslated region of the FMR1 message provides both positive and negative cis effects on in vivo translation of a downstream reporter. *Human molecular genetics*. 2003;12(23):3067-74.

133. Fernandez-Carvajal I, Walichiewicz P, Xiaosen X, Pan R, Hagerman PJ, Tassone F. Screening for expanded alleles of the FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2009;11(4):324-9.
134. Terracciano A, Pomponi MG, Marino GME, Chiurazzi P, Rinaldi MM, Dobosz M, et al. Expansion to full mutation of a FMR1 intermediate allele over two generations. *European journal of human genetics*. 2004;12(4):333-6.
135. Zuniga A, Juan J, Mila M, Guerrero A. Expansion of an intermediate allele of the FMR1 gene in only two generations. *Clinical genetics*. 2005;68(5):471-3.
136. Murray A, Schoemaker MJ, Bennett CE, Ennis S, Macpherson JN, Jones M, et al. Population-based estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations in women with early menopause and primary ovarian insufficiency. *Genetics in Medicine*. 2013;16(1):19-24.
137. Pastore LM, Young SL, Baker VL, Karns LB, Williams CD, Silverman LM. Elevated prevalence of 35-44 FMR1 trinucleotide repeats in women with diminished ovarian reserve. *Reproductive Sciences*. 2012;19(11):1226-31.
138. Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP. FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Human genetics*. 2005;117(4):376-82.
139. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. A pilot study of premature ovarian senescence: I. Correlation of triple CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Müllerian hormone. *Fertility and sterility*. 2009;91(5):1700-6.
140. Bennett CE, Conway GS, Macpherson JN, Jacobs PA, Murray A. Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. *Human Reproduction*. 2010;25(5):1335-8.

141. Sullivan A, Marcus M, Epstein M, Allen E, Anido A, Paquin J, et al. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Human Reproduction*. 2005;20(2):402-12.
142. Murray A, Webb J, MacSwiney F, Shipley EL, Morton NE, Conway GS. Serum concentrations of follicle stimulating hormone may predict premature ovarian failure in FRAXA premutation women. *Human Reproduction*. 1999;14(5):1217-8.
143. Hundscheid RD, Braat DD, Kiemenev LA, Smits AP, Thomas CM. Increased serum FSH in female fragile X premutation carriers with either regular menstrual cycles or on oral contraceptives. *Human Reproduction*. 2001;16(3):457-62.
144. Murray A, Ennis S, MacSwiney F, Webb J, Morton NE. Reproductive and menstrual history of females with fragile X expansions. *European journal of human genetics: EJHG*. 2000;8(4):247.
145. Bodega B, Bione S, Dalpra L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W, et al. Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Human Reproduction*. 2006;21(4):952-7.
146. Spath MA, Nillesen WN, Smits A, Feuth TB, Braat DD, van Kessel AG, et al. X chromosome inactivation does not define the development of premature ovarian failure in fragile X premutation carriers. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010;152(2):387-93.
147. Neal MS, Zhu J, Foster WG. Quantification of benzo [a] pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers. *Reproductive Toxicology*. 2008;25(1):100-6.
148. Hall D, Todorova-Koteva K, Pandya S, Bernard B, Ouyang B, Walsh M, et al. Neurological and endocrine phenotypes of fragile X carrier women. *Clinical genetics*. 2016;89(1):60-7.

149.Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, et al. Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. American Journal of Medical Genetics Part A. 2008;146(8):1009-16.

150.Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, et al. The FMR1 premutation and reproduction. Fertility and sterility. 2007;87(3):456-65.

151.Pu D, Xing Y, Gao Y, Gu L, Wu J. Gene variation and premature ovarian failure: a meta-analysis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2014;182:226-37.



