



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Çukurova bölgesi prematür menopoz hastalarında inhibin alfa (769 G→A) gen mutasyonunun araştırılması

Investigation of inhibin alpha (769 G→A) gene mutation in premature menopause patients in Çukurova region

Hülya Arıkan Ceylan¹

¹İzmir Demokrasi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İzmir, Turkey

Cukurova Medical Journal 2021;46(4):1581-1587

Abstract

Purpose: The aim of this study is to investigate the frequency of 769 G → A missense mutation in the inhibin (INH) α gene, which is thought to have a role in the formation of premature menopause due to the function in the negative feedback mechanism of Follicle Stimulating Hormone (FSH), in premature menopause patients in Çukurova region.

Materials and Methods: DNA was isolated from blood samples taken from 28 patients diagnosed with premature menopause (PM) and 9 healthy individuals as a control group, and 243 bp regions in the exon 2 of the inhibin α gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR), then the PCR products were digested with (Bbv I) endonuclease enzyme.

Results: The 769 G→A mutation in exon 2 of the INH-α gene was not detected in 28 PM patients and also in control group.

Conclusion: 769 G→A mutation in INH α gene may not be associated with PM in Çukurova region. However, further investigations into a larger number of patient groups from different ethnicities should be conducted to understand the role of INH α gene in the etiology of PM.

Keywords: Inhibin α gene, premature menopause, mutation, FSH.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, Folikül uyarıcı hormon (FSH) 'ın negatif geri bildirim mekanizmasındaki fonksiyonu nedeni ile prematür menopozun oluşumunda rolü olabileceği düşünülen inhibin (INH) alfa genindeki 769 G→A missense mutasyonunun Çukurova bölgesindeki prematür menopoz hastalarında görülme sıklığı araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Prematür Menopoz (PM) teşhisi konulan 28 hasta ve 9 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubundan alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı ve inhibin α geninin ekzon 2 bölgesinin içinde bulunan 243 baz çiftlik bölge polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edildi. PZR ile çoğaltılan bölgeler uygun Restriksiyon endonükleaz enzimi (Bbv I) kullanılarak kesildi.

Bulgular: INH α geninin ekzon 2 bölgesinde bulunan 769 G→A mutasyonu 28 PM hastasında ve ayrıca kontrol grubunda saptanmamıştır.

Sonuç: Sonuçlarımız Çukurova bölgesinde INH α genindeki 769 G→A mutasyonu ile PM arasında bir ilişki olmayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, PM etiyolojisinde INH α geninin rolünü anlayabilmek için farklı etnik kökenlerden daha fazla sayıda hasta grubu ile araştırma yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: İnhibin α geni, prematur menopoz, mutasyon, FSH

GİRİŞ

Menopoz, klimakterium içerisinde bir nokta olarak kabul edilen ve üzerinden ortalama bir yıl geçtikten sonra tanı konulabilen en son adet kanamasının özel

bir ismidir¹. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tanımına göre menopoz; ovaryum aktivitesinin yitilmesi sonucunda menstrüasyonun kalıcı olarak sonlanmasıdır². Menopoz yaşı 45 ila 60 yaşları arasında değişmekle birlikte ortalama yaşın 51 olduğu

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Hülya Arıkan Ceylan, İzmir Demokrasi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İzmir, Turkey E-mail: hülya.arikanceylan@idu.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 09.08.2021 Kabul tarihi/Accepted: 17.10.2021 Çevrimiçi yayın/Published online: 19.11.2021

bildirilmiştir. Menopoza girme yaşı toplumlar arasında değişkenlik göstermektedir. Ülkemize baktığımızda bu ortalamanın 48-51 yaş civarında olduğu görülmektedir³. Kadınların %1-2'si 60 yaşından sonra ve %1-2'si 40 yaşından önce menopoza girmektedir⁴. Over fonksiyonlarının 40 yaşından önce durması olarak tanımlanan bu durum Prematür Menopoz (PM) ya da Prematür over yetmezliği (POY) olarak adlandırılmaktadır⁵. Bir ay ara ile iki kez yapılan folikül stimüle edici hormon (FSH) ölçümünün menopozal seviyede (>40 IU/L) tespit edilmesi ve 6 ay ile daha uzun süreli amenore olması ile tanı konur ve hipergonadotropik hipogonadizm olarak da adlandırılır^{6,7}. PM osteoporoz, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalık riskini arttıran hipoöstrojenizm ve ayrıca infertiliteye neden olmaktadır⁸. POY etiyojisi heterojendir ve çoğunluğu idiyopatiktir. Nedenleri açısından multifaktöriyel olarak değerlendirilse de en önemli etken genetik faktörler olup, bununla birlikte çevresel faktörler de etkili olabilir⁹. PM olan hastaların %40'ının genetik kaynaklı olduğu bildirilmiştir^{10,11}.

Son yıllarda FSH sentez ve salgısını doğrudan etkileyen gonadotropinlerin etkilerini over içinde modifiye eden ve folikülogenezi düzenleyen iki önemli hormon tanımlanmıştır. Bunlar aktivin ve inhibin (INH) olup proteinlerin TGF- β süper ailesinden olan multifonksiyonel hormonlardır ve hemen hemen tam tersi biyolojik etkilere sahip olmakla birlikte birbirleriyle yakından ilişkisi olan iki protein kompleksidir. Glikoprotein yapıda gonadal bir hormon olan inhibin birbirlerine disülfid bağları ile bağlı iki peptitten oluşur. INH A(α - β A) ve INH B (α - β B) denilen iki tipi vardır. Bunlarda α ünitesi ortaktır, β ünitesi farklılık gösterir. Yalnızca β alt ünitesinin bir araya gelmesiyle aktivinler oluşur ve etkileri INH'nin tam tersidir. Aktivin, yumurta foliküllerinin gelişiminde rol oynayan FSH'nin hipofizden biyosentezini ve sekresyonunu arttırırken granüloza hücrelerinden progesteron salgısını baskılar, aynı zamanda aromataz aktivitesini arttırarak östrojen sentezini uyarırken FSH reseptörlerinin çoğalmasını da stimüle etmektedir. Bunun tersi bir etki yapan INH ise FSH'nin biyosentezini ve sekresyonunu inhibe ederken, teka hücrelerinden östrojen yapımı için öncü madde görevi gören androjen salgılatır¹². INH'nin temel fonksiyonu, hipofizden FSH salgılanmasını negatif geri bildirim mekanizması ile düzenlemektir. MacNaughton ve ark. (1992) 'larının yaptıkları çalışma neticesinde ileri sürdükleri görüşe göre, serum INH konsantrasyonunda bir azalma olduğu takdirde,

yumurta foliküllerinde de bir azalma görülür. Bundan dolayı INH salgılanmasındaki bir azalma, FSH miktarındaki artıştan sorumlu olduğu düşünülmektedir. FSH miktarındaki artış yumurta rezervinin azalmasına neden olmaktadır. Menopoza geçiş döneminde FSH salgılanmasındaki artışın folikül tükenme oranındaki artışla paralel oluşu, bu görüşün doğru olduğunu göstermektedir¹³. PM hastalarının hormon testleri de bu görüşü desteklemektedir. Pampfer ve Thomas (1989) tarafından yapılan bir çalışmada PM'li kadınlarda INH salgılanmasında bir azalma tespit edilmiştir. PM'li kadınlarla infertil kadınlar karşılaştırıldığında, PM'li kadınlarda yumurtlama zamanında INH seviyesinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca PM'li kadınlarda folikül safhasında ve luteal fazda INH konsantrasyonlarının daha düşük olduğu bildirilmiştir¹⁴. Sonuç olarak, INH genlerinin herhangi birindeki fonksiyonel bir mutasyonun, biyoaktif inhibin miktarında bir azalmaya neden olacağı öne sürülmektedir. Bu kayıp, hipofize uygulanan negatif geri bildirim mekanizmasını ortadan kaldırarak FSH konsantrasyonunda bir artışa neden olabilir, bu durumda foliküllerin erken tükenmesiyle ve dolayısıyla PM ile sonuçlanacaktır. Bundan dolayı INH geninin PM etiyojisinde etkin ve önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir⁹.

Shelling ve ark. (2000) 'nın yaptıkları çalışmada, PM'li hastalarda iki inhibin varyantı tespit edilmiştir; INH β A geninde 1032 C \rightarrow T geçişi ve INH α geninde 769 G \rightarrow A geçişi. INH α varyantının PM'nin etiyojisinde daha etkili olduğu bildirilmiştir⁹. Bu varyantın PM ile önemli ölçüde ilişkisinin olması, Marozzi ve ark. (2002) 'nın tarafından yapılan çalışma ile de desteklenmiştir¹⁵. INH α geni 2. kromozom üzerinde q33-q36 bölgesinde lokalize olmuştur ve INH A(α - β A) ve INH B (α - β B) kompleksinin α alt ünitesini kodlamaktadır. INH α geninin ekzon 2 bölgesinde bulunan 769. pozisyonda bulunan guanin adenine dönüşmektedir (769 G \rightarrow A). 257. kodona tekabül eden bu mutasyon neticesinde alanin aminoasiti treonin aminoasitine dönüşmektedir^{9,12}. İnhibin genindeki bir varyasyon, inhibinin seviye ve biyoaktivitesinin FSH'ı etkileyip yumurtalık foliküllerinin erken tükenmesine neden olabilecek düzeyde düşmesinden sorumlu olabilir. Dolayısıyla bu varyasyonun tespiti PM'nin erken teşhisinde bir duyarlılık faktörü ya da genetik marker olarak kullanılabilir. PM, etiyojisi açısından heterojen olması nedeniyle tanı konulması zordur, bu yüzden yumurtalık fonksiyonunu etkileyen tüm genleri tanımlamak ve hastalığın moleküler temelini anlamak

erken teşhis için çok önemlidir. PM'ye neden olabilecek önemli genetik faktörlerden biri olduğu düşünülen ve aday gen olarak belirlenen INH α genindeki 769. G→A missense mutasyonu farklı popülasyonlarda çalışılmış ve bazı popülasyonlarda tespit edilirken bazılarında bu varyasyona rastlanmamıştır. Bu mutasyonun FSH düzeylerini artırmadaki rolüne rağmen, literatürdeki popülasyonlar arası farklılıklar nedeniyle PM'deki rolü kesinlik kazanmamıştır¹².

Literatürde Çukurova bölgesinde bu mutasyonla ilgili daha önceden yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı INH α genindeki 769. G→A missense mutasyonunun inhibin biyoaktivitesinde bir azalmaya neden olarak, hipofizinin FSH salgılanması üzerindeki baskısını ortadan kaldırdığı böylece PM gelişimine katkıda bulunduğu hipotezini Çukurova Bölgesindeki PM tanısı konmuş hasta popülasyonunda doğrulamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklem

Bu çalışmaya Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı'nda PM klinik tanısı konmuş 28 hasta ve 9 sağlıklı kadın kontrol grubu olarak dahil edildi. Çalışmamıza kadınlar endokrinoloji veya jinekoloji kliniklerinde muayene edilen, 40 yaş altı en az 6 aylık adet görmeme ve bir ay ara ile ölçülen iki serum FSH düzeyi 40 mIU/mL'nin üzerinde olan PM tanısı almış onam formunu doldurmuş gönüllü bireyler dahil edildi. Pelvik cerrahi, kemoterapi, otoimmün hastalıkları ve anormal kromozom öyküsü olan kadınlar çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya katılan kadınlardan rutin kontrollerinde alınan kan (2-3cc) kan EDTA'lı tüplere konarak laboratuvara getirildi, DNA izolasyonları yapıldıktan sonra analiz gününe kadar -20°C'de saklandı. Analizler Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında yapıldı. Çalışmaya, etik kurulundan onay alındıktan ve katılımcılardan onam alındıktan sonra başlandı (Çukurova Üniversitesi 10.02.2004 tarihli 2014/2-3 sayılı Etik Kurul Raporu).

DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PM teşhisi konulmuş hastalardan EDTA'lı tüplere alınmış olan kan örneklerinden Miller ve ark. (1988) 'nın tuzla çöktürme (salting out) yöntemi modifiye

edilerek DNA izolasyonu yapıldı, örnekler -20°C 'de PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere muhafaza edildi^{16,17}. INH α geninin ekzon 2 bölgesinin içinde bulunan 243 bç'lik bölgeyi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifiye etmek için bu bölgeye uygun olan primerler Shelling ve ark. (2000) 'nın çalışmaları referans alınarak belirlendi. Çalışmada kullanılan primer çiftleri: Reverse (5' AGCCACAACCACCATGACAGTAG 3'), Forward (5' GGCCCACTCGGACCAGAC 3')⁹. PZR karışımı; Reverse Primer 1µl, Forward Primer 1µl, dNTP karışımı 0,4µl, MgCl₂ 3µl, Taq DNA polimeraz 0,06µl, Genomik DNA 0,5µl, PZR Tamponu 5µl, Su (distile) 39,04 µl olmak üzere toplam 50µl'ye tamamlandı. Hazırlanan karışım: 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 94°C'de 45 sn denatürasyon, 62°C'de 45 sn yapışma, 72°C'de 45 sn sentez olmak üzere toplam 30 döngü yapıldı ve son döngüyü takiben 72°C'de 5 dakika tutularak PZR işlemi sonlandırıldı. PZR sonunda 243 bç'lik PZR ürünlerinin belirlenmesi için %2'lük agaroz jel elektroforezi yapıldı. Jel etidyum bromür ile boyandı ve UV ışığı altında görüntülendi^{18,19}.

Restriksiyon endonukleaz (RE) enzimi ile PZR ürünlerinin kesilmesi

PCR ile çoğaltılan bölgeler Bse XI (BbvI) RE enzimi kullanılarak 5' G C A G C (N)₈ 3' 3' C G T C G (N)₁₂ 5' kesim noktalarından kesildi. Kesim işlemi için RE tamponu 1X (2,5 µl), RE 1U/µl (0,5 µl), PZR ürünü 10 µl ve son hacimi 25 µl olacak şekilde distile su ile reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı 37°C 'de 2-3 saat inkübe edildi. Kesim işleminden sonra örnekler %10'luk poliakrilamid jelde yürütülerek elde edilen bantlara göre sonuçlar yorumlandı. INH alfa geninin mutasyon beklenen ekzon 2 bölgesini içine alan 243 bç'lik bölge PZR ile çoğaltılıp Bbv I enzimi ile kesildiğinde 3 parça oluşur. Bunlar 85bç, 25bç ve 134bç lik parçalardır. 769 G→A varyantın varlığında enzim tanıma bölgesi CGTCG (n)₁₂ ortadan kalkacağı için sadece 85 ve 159 olmak üzere 2 parça oluşur. Heterozigot mutant olduğunda ise dört parçanın görülmesi beklenir. 25 bç'lik parça küçük olduğu için jelde görüntülenemedi.

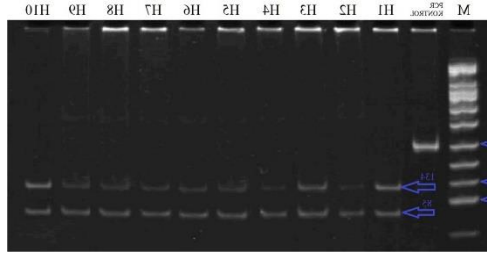
İstatistiksel analiz

Çalışmamız belirleyici olduğu için tek parametre saptanmış olup verilerin değerlendirilmesinde

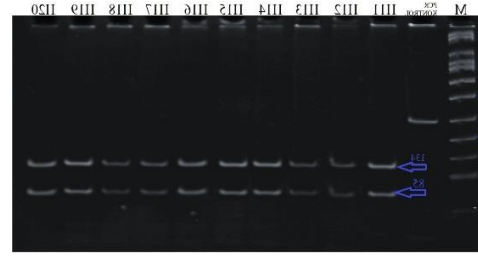
tanımlayıcı istatistiksel yöntem olarak sayı (n), yüzde (%) değerleri kullanılmıştır.

BULGULAR

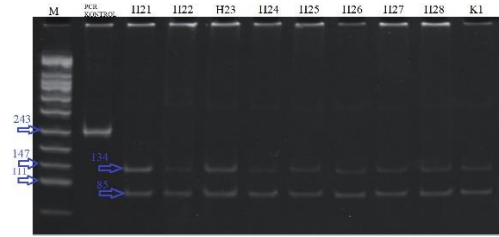
Çalışmamıza katılan 28 kişilik hasta grubunun yaş aralığı 20 ile 40 arasında ve menopoza girme yaş ortalaması 32.17 yıl olarak belirlenirken, 9 kişilik kontrol grubunun yaş aralığının 45-53 yıl arasında olduğu ve normal menstürel sikluslarının devam ettiği kaydedildi. Hasta ve kontrol gruplarına ait kan örneklerinden izole edilmiş DNA örneklerinde, hipofiz bezinden FSH salgılanmasını düzenleyen bir glikoprotein olan INH'nin alfa alt ünitelerini kodlayan INH α genindeki 769. nükleotiddeki guaninin adenine dönüşmesi sonucu meydana gelen missense bir mutasyon tarandı. PZR ürünlerinin Bbv I enzimi ile kesiminden sonra elde edilen kesim ürünlerine ait poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 1.1, 1.2, 1.3, 1.4'de verildi. Bbv I enzimi ile yapılan kesim sonrasında hastaların ve kontrol grubunun hiçbirinde 769 G→A mutasyonuna rastlanılmadı (Tablo 1).



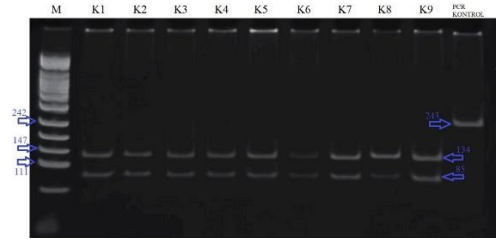
Şekil 1.1. Çalışmada kullanılan ilk 10 (1-10) hastaya ait PZR ürünlerinin Bbv I enzimi ile kesimi. M:100bç DNA ladder.



Şekil 1.2. Çalışmada kullanılan 10 (11-20) hastaya ait PZR ürünlerinin Bbv I enzimi ile kesimi. M:100bç DNA ladder.



Şekil 1.3. Çalışmada kullanılan son 8 (21-28) hastaya ait PZR ürünlerinin Bbv I enzimi ile kesimi. M:100bç DNA ladder.



Şekil 1. 4. Çalışmada kullanılan 9 kişilik kontrol grubuna ait PZR ürünlerinin Bbv I enzimi ile kesimi. M:100bç DNA ladder.

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarında mutasyon görülme oranı.

Bireyler	769. G→A mutasyon
PM Hasta Sayısı (n=28)	0*/28+ (0%)
Normal Fertil Kontrol Sayısı (n=9)	0*/9+ (0%)

* 769. G→A mutasyonu tespit edilen örnek sayısı

+ Toplam örnek sayısı

TARTIŞMA

PM 40 yaşın altındaki kadınlarda yumurtalıkların fonksiyonunu yitirmesi ile karakterize olan yaygın bir durumdur, aynı zamanda popülasyonda gebeliği geciktirme eğiliminin artması nedeniyle artan bir

endişe kaynağıdır. PM'nin en belirgin sonucu; fertilitenin yok olması ve hipo-östrojenizmdir. PM'nin nedenleri olarak, X kromozom defektleri gösterilse de gerçek anlamda nedenleri bilinmemektedir²⁰. Overden salgılanıp doğrudan hipofize ulaşan inhibin, kadınlarda folikül

olgunlaşmasını sağlayan FSH'ın negatif geri bildirim kontrolündeki rolü sebebiyle PM'nin etiyolojisi için potansiyel bir adaydır⁹. Üremenin yaşlandığının göstergesi olan FSH seviyesindeki artıştan, INH A ve INH B 'deki azalmanın sorumlu olabileceği düşünülmektedir^{21,22,23}. POF hastalarının hormonları üzerine yapılan çalışmalarda INH 'in, hastalığın mekanizmasıyla ilgili olduğu, hem PM'li hastalarda hem de doğal menopoz sürecindeki kişilerde salgılanmasında bir kusur olduğu bildirilmiştir¹⁴. Aynı zamanda Petraglia ve ark (1998)'ları PM'li hastaların ve menopoz sonrası süreçte olan kişilerin serum INH A (α - β A) ve INH B (α - β B) seviyelerinin benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir²⁴. Dolayısıyla, inhibin genlerinden herhangi birinde meydana gelebilecek fonksiyonel bir mutasyonun biyoaktif inhibin miktarında bir azalmaya neden olabileceği ve bu azalmanın sonucu hipofizdeki negatif geri bildirim mekanizmasının ortadan kalkarak, foliküllerin erken tükenmesine yol açan FSH konsantrasyonundaki artışa neden olacağı ve bu durumda PM 'ye neden olduğu düşünülmektedir^{9,25}.

INH α , diğer TGF- β ailesi üyeleri gibi, 7 korunumlu sisteme sahiptir. Fakat, INH α geninin birinci sisteminin upstreaminde bulunan aminoterminal bölgesi ile TGF- β süper ailesinin diğer üyelerinden farklılık gösterir. Bu bölgenin reseptör bağlanma bölgesinde olduğu düşünülmektedir¹⁰. INH α genindeki 769 G→A mutasyonu sonucu 257. kodondaki alaninin treonine dönüşümü korunumlu olmayan bir yer değiştirmedir ve fonksiyonel grubun yan zincirine bir alifatik hidroksil grubun eklenmesi ile sonuçlanır. Bununla birlikte, 257. kodonda meydana gelen aminoasit varyasyonunun fonksiyonel önemi henüz bilinmemektedir. İnsan ile birçok hayvan INH α gen dizisi arasında %80 oranında homoloji gözlenmektedir²⁶. Bu türlerin INH α proteinlerinin aminoasit dizileri karşılaştırıldığında, mutasyonun tespit edildiği 257. kodondaki alanin aminoasitinin bulunduğu bölgenin, bu türlerde yüksek korunumlu olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgi doğrultusunda, 257. kodondaki alaninin protein fonksiyonu üzerinde önemli bir rolü olduğunu düşünebiliriz. Bir mutasyonun işlevsel bir etkiye sebep olup olmadığından emin olabilmek için proteinin yapısal fonksiyonu analiz edilmelidir. Protein yapısının analizi sonucunda, bu kodonun reseptör bağlanma bölgesinde olduğu düşünülmektedir. Alaninin Treonine dönüşmesi son olgunlaşmış peptidin reseptör bağlanma bölgesinde meydana geldiği düşünülmektedir. Bu mutasyonun, INH'nin reseptöre bağlanma afinitesini bozarak,

sinyal iletim yolunun aktive edilmesinde ve FSH seviyesinin negatif feedback yolu ile dereğüle edilmesinde yetersiz kalmasına neden olabileceği düşünülmektedir^{9,10}.

INH α genindeki G769A varyasyonu ilk olarak Yeni Zellanda 'da rapor edilmiştir. Bu çalışmada 43 PM hastasında 3, 150 kişilik kontrol grubunda ise 1 kişide tespit edilmiştir⁹. İtalya 'da yapılan bir çalışmada 157 hastanın 7'sinde¹⁵, Hindistan'da 80 hastanın 9'unda bu varyasyon tespit edilmiştir²⁷. Hint popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada da INH α 1 769 G→A mutasyonunun hasta grubundaki kadınlarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek görüldüğü, ancak kontrol grubundan iki kişide de tespit edildiği bildirilmiştir²⁸. Bununla birlikte, INH α 1 genindeki varyasyon İranlı hastaların %16,7 'sinde tespit edilmiştir²⁹. Yapılan bu çalışmalar sonucunda; tespit edilen bu mutasyonla PM arasında bir korelasyon olduğu düşünülmüş ve bu korelasyon sayesinde de PM'nin erken teşhisinin mümkün olabileceği ileri sürülmüştür^{20,27}. Öte yandan, 611 kişiden oluşan İtalyan ve Alman hasta grubuyla birlikte 1.084 kişiden oluşan kontrol grubunu içerecek şekilde çalışma genişletilmiş, ancak önceki araştırmalardan daha büyük bir grupla çalışıldığı halde mutasyon görülme oranında bir fark gözlenmemiştir³⁰. Bu sonucu destekleyen, Kore 'de 84 hasta ve 100 kontrolle yapılan çalışmada¹⁰ ve Auckland'da 43 hasta ile yapılan çalışmada da bu varyasyona rastlanmamıştır³¹. Bu konuda en son çalışma Pakistan 'da 50 kişilik hasta ve 50 kişilik kontrol grubuyla yapılmış, hasta grubundan 1, kontrol grubundan 769 G→A varyasyonunu heterozigot olarak taşıdığı tespit edilmiştir³².

Çalışmamızda Çukurova Bölgesinde yaşayan 28 PM'li hasta ve 9 sağlıklı kontrolden elde edilen DNA'lar INH α geninin ekzon 2 bölgesinde bulunduğu bildirilen 769 G→A mutasyonu açısından taranmıştır fakat bu varyasyona hiçbir hasta ve kontrolde rastlanmamıştır. PM'nin erken teşhisinde rol alabileceği düşünülen 769 G→A mutasyonu farklı popülasyonlarda taranmış³³ve yapılan araştırmalar sonucunda bu gende bazı etnik farklılıkların olduğu bildirilmiştir³⁴. Bu varyantın PM ile olan ilişkisini belirleyebilmek için, etnik olarak eşleştirilmiş kontrollere sahip PM hastalarıyla daha ileri ve genişletilmiş popülasyonlarda çalışmalar yapılmalıdır. Bbv I kesim enziminin kullanıldığı analize dayanan bir genetik test, önemli bir erken teşhis aracı olabilir. Yumurtalık yetmezliği gelişmeden önce bu mutasyonun saptanması, taşıyıcıların üreme

seçenekleriyle ilgili daha bilinçli karar vermelerine olanak sağlayabilir. Erken teşhis, yumurtalık yetmezliğinin başlamasını geciktirebilecek olan uygun hormon replasman tedavilerinin alınmasına ve doğurganlık için gerekli tedavilerin uygulanabilmesi için fırsat sağlayabilir. Çalışmanın örneklem toplama sürecinde Ç.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalında PM teşhisi konan ve araştırmaya dahil olma kriterlerine uygunluk sağlayan hasta sayısının az olması çalışmamızı kısıtlamaktadır. Daha fazla hasta sayısı, farklı popülasyonlarda bu çalışmanın yürütülmesi, elde edilecek sonuçların $INH\alpha$ 769 G>A mutasyonunun prematür menopozun etiolojisindeki yerini belirlemek açısından daha anlamlı olacaktır. Öte yandan, Çukurova Bölgesinde bu mutasyonun araştırıldığı ilk çalışma olması açısından literatüre önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Menopoz multifaktöriyel bir durumdur ve bu nedenle sadece $INH\alpha$ geninin incelenmesiyle sonuca gidilemeyeceğini düşünmekteyiz. Daha anlamlı bir sonuca ulaşmak için menopozun oluş mekanizmasındaki diğer genlerle de kombine çalışmaların yapılması ve bu çalışmalara farklı etnik kökenlerden, çok sayıda hastanın katılımı uygun olacaktır.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasanımı: HAC; Veri toplama: HAC; Veri analizi ve yorumlama: HAC; Yazı taslağı: HAC; İçeriğin eleştirel incelenmesi: HAC; Son onay ve sorumluluk: HAC; Teknik ve malzeme desteği: -; Süpervizyon: HAC; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Etik Onay: Bu çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 10.02.2004 tarih ve 3/2 sayılı kararı ile etik onay alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: TF2003YL9).

Yazarın Notu: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Prof. Dr. Ali Matur ve Prof. Dr. Turan Çetin'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Author Contributions: Concept/Design : HAC; Data acquisition: HAC; Data analysis and interpretation: HAC; Drafting manuscript: HAC; Critical revision of manuscript: HAC; Final approval and accountability: HAC; Technical or material support: -; Supervision: HAC; Securing funding (if available): n/a.

Ethical Approval: For this study, ethical approval was obtained from the Ethics Committee of Çukurova University Faculty of Medicine with the decision No. 3/2 dated 10.02.2004.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Çukurova University Scientific Research Projects Coordinatorship (Project number: TF2003YL9).

Acknowledgement: I thank Prof. Dr. Ali Matur and Prof. Dr. Turan Çetin from Çukurova University, Faculty of Medicine

KAYNAKLAR

1. Vanwesenbeeck I, Vennix P ve Wiel H. 'Menopausal symptoms' associations with menopausal status and psycho social factors. J Psychosom Obstet Gynaecol.

- 2001;22:149-58.
2. Oskay Ü. Menopoz ve cinsellik. 2.Uluslararası 9. Ulusal Hemşirelik Kongresi, Kadın ve erkek cinsel sağlık kursu. 9 Eylül 2003.
3. Selam B, Topçuglu M. Menopozda hormon replasman tedavisi kullanımı ile ilgili tartışmalar ve güncel yaklaşım. Düzce Tıp Fak Derg. 2004;3:38-43.
4. Coulam B, Adamson C, Anngers F. Incidence of premature ovarian failure. Obstet Gynecol. 1989;67:604-6.
5. Nelson LM. Primary ovarian insufficiency. N Engl J Med. 2009;360:606-14.
6. Primer over yetersizliği (POY) veya prematür over yetmezliği <https://www.tjodistanbul.com/egitim/istanbul-kliniklerinden/infertilite/primer-over-yetersizligi-poy-veya-prematur-over-yetmezligi>. Accessed Dec 14 2020.
7. Rebar RW, Connolly HV. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. Obstet Gynecol Surv. 1990;45:763-4.
8. Persani L, Rossetti R, Cacciato C. Genes involved in human premature ovarian failure. J Mol Endocrinol., 2010;45:257-279.
9. Shelling A, Burton K, Chand A, Van Ee C, France J, Farquhar C et al. Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. Hum Reprod. 2000;15:2644-9.
10. Jeong H, Cho S, Kim H, Lee S, Cho J, Choi D et al. G769A variation of inhibin alpha gene in Korean women with premature ovarian failure, Yonsei Med J. 2004;45:479-482.
11. Okeke TC, Anyaehie UB, Ezenyeaku CC. Premature menopause. Ann Med Health Sci Res. 2013;3:90-5.
12. Chand AL, Harrison CA, Shelling AN. Inhibin and premature ovarian failure, Hum Reprod. 2010;16:39-50.
13. MacNaughton, J, Banah M, McCloud P, Hee J, Burger H. Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. Clin. Endocrinol (Oxf). 1992;36:339-345.
14. Pampfer S, Thomas K. Clinical value of inhibin in women. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 1989;8:279-287.
15. Marozzi A, Porta C, Vegetti W, Crosignani P, Tibiletti M, Dalpra L et al. Mutation analysis of the inhibin alpha gene in cohort of Italian women affected by ovarian failure. Hum Reprod. 2002;7:1741-5.
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out DNA extraction from paraffin procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16:12-15.
17. Öner C Genetik Kavramlar. Ankara, Palme Yayıncılık. 2002;449-531.
18. Erlich HA. PCR Technology: Principles And Applications for DNA amplification 2. Edition, New York: W.H. Freeman, 1992.

19. PAH protocols. http://www.geneticahumana.lt/MOLGET_pages/PAH-protocols. Accessed Dec 1 2020.
20. Anasti N. Premature ovarian failure – an update. *Fertil Steril*. 1998;70:1-15.
21. Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:2742–45.
22. Reame NE, Wyman TL, Phillips DJ, de Kretser DM, Padmanabhan V. Net increase in stimulatory input resulting from a decrease in inhibin B and an increase in activin A may contribute in part to the rise in follicular phase follicle-stimulating hormone of aging cycling women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:3302–7.
23. Santoro N, Adel T, Skurnick JH. Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women. *Fertil Steril*. 1999;71:658–62.
24. Petraglia F, Hartmann B, Luisi S, Florio P, Kirchengast S, Santuz M et al. Low levels of serum inhibin A and inhibin B in women with hypergonadotropic amenorrhea and evidence of high levels of activin A in women with hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril*. 1998;70:907–12.
25. Shelling, A.N. Premature ovarian failure. *Reprod*. 2010;140:633-41.
26. Sundblad V, Chiauzzi VA, Andreone L, Campo S, Charreau EH, Dain L. Controversial role of inhibin alpha-subunit gene in the aetiology of premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2006;21:1154-60.
27. Dixit H, Deendayal M, Singh L. Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure. *Human Reprod*. 2000;19:1760-64.
28. Prakash GJ, Kanth VVR, Shelling AN, Rozat R, Sujatha. Mutational analysis of inhibin alpha gene revealed three novel variations in Indian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2010;94:90-8.
29. Fallahian M, Pouresmaeili F, Azizi F, Zali MR, Samani EM, Kharaziha P. Existence of inhibin α -subunit gene mutation in a population of Iranian women with premature ovarian failure. *Int J Endocrinol Metab*. 2009;2:67-71.
30. Corre T, Schuettler J, Bione S, Marozzi A, Persani L, Rossetti R et al. A large-scale association to study the impact of known variants of the human INHA gene on premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2009;24:2023-28.
31. Makanji Y, Zhu J, Mishra R, Holmquist C, Wong WPS, Schwartz NB et al. Inhibin at 90: From discovery to clinical application, a historical review. *Endocr Rev*. 2014;35:747–94.
32. Fatima S, Usman Z, Mehmood S, Khaliq S. Genetic analysis of inhibin alpha (769g>a) mutation in patients with premature ovarian failure in a local population. *Biomedica*. 2021;37:17-23.
33. Basile S, Noti G, Salvati L, Giovanni Artini P, Mangiavillano B, Pinelli S. Factors leading to primary ovarian insufficiency: a literature overview. *Gynecol Reprod Endocrinol*. 2021;2:85-92.
34. Al-Sabbagh JS, Razzaq AM. Mutations and variants analysis of inhibin gene subunits in women with premature ovarian failure. *UTsci*. 2020;7:2.