

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PREMATÜR OVARYAN YETMEZLİKLE
XPD VE XRCC1 DNA TAMİR GEN
POLİMORFİZMİNİN İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Çağdaş DOĞAN

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Önder ÇELİK

MALATYA - 2011

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PREMATÜR OVARYAN YETMEZLİKLE
XPD VE XRCC1 DNA TAMİR GEN
POLİMORFİZMİNİN İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Çağdaş DOĞAN

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM

ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Önder ÇELİK

MALATYA - 2011

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/165 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında hiçbir desteği esirgemeyen bölüm başkanımız ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Önder ÇELİK'e, bölümümüzün diğer tüm değerli öğretim üyelerine, katkılarından dolayı başta sayın Prof. Dr. Elif YEŐİLADA ve sayın Uzm. Bio. Gonca GÜLBAY olmak üzere Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD çalışanlarına, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi çalışanlarına, tez hastalarımın toplanmasında emeği geçen tüm asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili eşim Demet, oğlum Demirali ve aramıza katılacak olan kızım Duru Defne'ye sevgilerimle...

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Prematür Ovaryan Yetmezlik.....	3
2.2.Ovaryan Fizyoloji.....	37
2.3.Ovaryan Yaşlanma ve Oksidatif Stres.....	43
2.4.Oksidatif Stres ve DNA Hasarı.....	46
2.5.DNA Tamir Mekanizmaları.....	47
2.6.Oosite DNA Tamiri.....	52
2.7.DNA Tamir Geni Polimorfizmleri.....	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	56
3.1.Hasta Seçimi.....	56
3.2.DNA izolasyonu.....	57
3.3.Florasan Bazlı Erime Eğrisi Analizi ile Genotipleme.....	57
3.3.İstatistiksel Değerlendirme.....	58
4. BULGULAR.....	59
4.1.XPD-Lys751Gln.....	61
4.2.XRCC1-Arg194Trp.....	64
4.3.XRCC1-Arg399Gln.....	66
5. TARTIŞMA.....	69
5.1. XPD-Lys751Gln	73
5.2. XRCC1-Arg194Trp	75
5.3. XRCC1-Arg399Gln.....	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
ÖZET.....	79
SUMMARY.....	80
KAYNAKLAR.....	81

TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Tablolar :</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1 : Prematür ovaryan yetmezliğin nedenleri.....	7
Tablo 4.1a : POF grubunun birey bazında genotip dağılımı.....	60
Tablo 4.1b : Kontrol grubunun birey bazında genotip dağılımı.....	61
Tablo 4.2 : XPD-Lys751Gln için genotip ve allel dağılımı.....	62
Tablo 4.3 : XRCC1-Arg194Trp için genotip ve allel dağılımı.....	64
Tablo 4.4 : XRCC1-Arg399Gln için genotip ve allel dağılımı.....	67
<u>Şekiller :</u>	
Şekil 2.1 : Ovaryan folikül gelişimini kontrol eden sinyal yolakları.....	43
Şekil 2.2 : Baz eksizyon onarımı (BER) mekanizması.....	49
Şekil 2.3 : Nükleotid eksizyon onarımı (NER) mekanizması.....	51
Şekil 4.1 : XPD-Lys751Gln için genotip dağılım yüzdeleri.....	62
Şekil 4.2 : XPD-Lys751Gln için A (<i>Lys</i>) ve C (<i>Gln</i>) allel frekansları.....	63
Şekil 4.3 : XPD-Lys751Gln için bireylerin allel taşıma yüzdeleri.....	63
Şekil 4.4 : XRCC1-Arg194Trp için genotip dağılım yüzdeleri.....	65
Şekil 4.5 : XRCC1-Arg194Trp için C (<i>Arg</i>) ve T (<i>Trp</i>) allel frekansları.....	65
Şekil 4.6 : XRCC1-Arg194Trp için bireylerin allel taşıma yüzdeleri.....	66
Şekil 4.7 : XRCC1-Arg399Gln için genotip dağılım yüzdeleri.....	67
Şekil 4.8 : XRCC1-Arg399Gln için A (<i>Gln</i>) ve G (<i>Arg</i>) allel frekansları.....	68
Şekil 4.9 : XRCC1-Arg399Gln için bireylerin allel taşıma yüzdeleri.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMH	: Antimüllerian Hormon
BER	: Baz Eksizyon Onarımı
BMP15	: Bone Morphogenic Protein 15
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FMR1	: Fragile Site Mental Retardation 1
FOXL2	: Forkhead Transcription Factor Like 2
FOXO3a	: Forkhead Box O3a
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GDF9	: Growth Differentiation Factor 9
GH	: Granuloza Hücreleri
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
Gy	: Gray
IGF-1	: Insulin Like Growth Factor 1
IU	: İnternasyonal Ünite
KMD	: Kemik Mineral Dansitesi
KT	: Kemoterapi
NER	: Nükleotid Eksizyon Onarımı
POF	: Prematür Ovaryan Yetmezlik
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT	: Radyoterapi
SD	: Standart Deviasyon
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
TGF β	: Transforming Growth Factor Beta
XPD	: Xeroderma Pigmentozum Complementation Group D
XRCC1	: X-ray Cross Complementing Group 1

1. GİRİŞ

Prematür ovaryan yetmezlik (POF), 40 yaşından önce ovaryan fonksiyonların kesilmesi, yüksek gonadotropin ve düşük östrojen seviyeleri ile karakterize olan, heterojen bir klinik tablodur (1). POF, reproduktif çağıdaki kadınların yaklaşık 1%'ini etkilemektedir (2). Ancak POF insidansı etnik gruplar arasında oldukça farklılık göstermektedir.

Doğal menapozda ovaryan fonksiyonların geri dönüşsüz biçimde sona ermesi söz konusu iken POF'da hastaların %50'sinde ovaryan fonksiyonlar geçici olarak geri dönebilmekte ve buna bağlı olarak hastaların %5-10'unda spontan gebelik gözlemlenmektedir (3-5).

POF hastaları genellikle sekonder amenore ile doktora başvururlar. Ancak POF, primer amenore olarak da klinikte ortaya çıkabilir. Hastaların yaklaşık yarısı, amenore gelişmeden önce siklus düzensizliklerinin olduğu bir prodrom dönem tarifler. Ancak amenore, ovaryan yetmezliği maskeleyen bir gebeliğin ya da oral kontraseptif kullanımının sonlanması ardından akut olarak da başlayabilir (6).

POF'un kadın sağlığı üzerine yaptığı olumsuz etkilerden en göze çarpanı subfertilite olmakla birlikte, östrojen eksikliğine bağlı olarak uzun dönemde osteoporoz, kardiyovasküler hastalık riskinde artış, seksüel disfonksiyon gibi pek çok olumsuzluk ortaya çıkabilir. Bu nedenle POF'da hasta yönetimi çok yönlü olarak ve multidisipliner bir yaklaşımla ele alınmalıdır.

POF etiolojisinde bir takım genetik, otoimmün, metabolik, enfeksiyöz ve çevresel sebepler ortaya konulmuş olsa da hastaların büyük bölümünde tüm tanısal tetkiklere rağmen altta yatan neden ortaya çıkarılamamaktadır.

Patogeneizde ise öne sürülen mekanizmalar, başlangıç over rezervindeki azalma ve ovaryan foliküllerin atrezi hızındaki artmadır. İnsandaki genel yaşlanma ve reproduktif yaşlanma sürecinin oksidatif strese bağlı DNA hasarlarındaki birikim ve apoptozise dayanan aynı biyolojik sürecin birer parçası olduğu ileri sürülmektedir (7, 8). Yapılan çalışmalar reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerindeki artışın oosit kalitesini olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur. Artmış ROS seviyeleri, hem hücresel DNA'da (nDNA) hem de mitokondriyal DNA'da (mtDNA) nükleotid varyasyonlarına neden olmaktadır.

DNA'da oluşan bu mutasyonların etkin bir şekilde onarılması, hücrenin varlığını sürdürebilmesi için hayati önem taşır ve DNA onarım mekanizmalarının etkin bir biçimde çalışmasını gerektirir. DNA onarımında görev alan proteinleri kodlayan DNA tamir genlerindeki bazı polimorfizmler, bu proteinlerin yapısının değişmesine, etkinliğinin azalmasına ya da kaybolmasına neden olarak onarım sürecini bozabilir.

Biz bu çalışmada, XPD (Xeroderma Pigmentozum complementation group D) ve XRCC1 (X-ray cross complementing group 1) DNA tamir geni polimorfizmlerini POF ve kontrol grubunda inceleyerek, bu polimorfizmler ile POF arasında nedensel bir ilişki olup olmadığını ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prematür Ovaryan Yetmezlik (POF)

2.1.1. POF'un Tanımı

Prematür ovaryan yetmezlik (POF), hipergonadotropinemi ve östrojen eksikliğinin eşlik ettiği, 40 yaşından önce en az 4 ay süre ile menstrüasyon kanamalarının kesilmesi durumu olarak tariflenebilir. Tanıdaki 40 yaş sınırı, ortalama menapoz yaşının $>2SD$ (standart deviasyon) altını ifade etmektedir (2). Hipergonadotropik durum en az bir ay ara ile ölçülen iki FSH değerinin 40 IU/L ve üzerinde olduğunun gösterilmesi ile ortaya konulmalıdır.

Hipofiz ve adrenaller gibi over dışındaki diğer endokrin organların bozuklukları da anormal ovaryan fonksiyonlara neden olabilmektedir. Bu nedenle yaklaşık 70 yıl önce, Albright ve ark.'nın çalışmalarında prematür ovaryan yetmezliğin primer olarak ovaryan disfonksiyondan kaynaklandığı vurgulanmış ve 'primer ovaryan yetmezlik' terimini kullanılmıştır (9). Prematür ovaryan yetmezlik terimi ile eş anlamlı olarak Türkçe literatürde 'primer ovaryan yetmezlik' terimi de kullanılmaktadır.

Artmış serum FSH düzeyi ve amenore hem doğal menapoz hem de POF'da ortak olarak görülmektedir. Ancak POF, hastaların yaklaşık %50'sinde ovaryan fonksiyonların geçici olarak geri dönebilmesi ve hastaların %5-10'unda buna bağlı spontan gebelik görülebilmesi yönleri ile klinik olarak menapozdan ayrılır (3-5, 6, 10).

Bu nedenle 'prematür menapoz' ya da 'erken menapoz' terimleri klinik tabloyu tam olarak açıklamakta yetersiz kalmaktadır.

2.1.2. POF'un Epidemiyolojisi

Doğal menapoz yaşını ve toplumdaki POF sıklığını saptamak üzere pek çok çalışma yapılmış olmakla birlikte 1986 yılında Coulam ve ark. tarafından yaklaşık 1900 kadın üzerinde yapılan prevalans çalışması bu konudaki ilk kohort çalışmasıdır. Bu çalışmaya göre POF, 40 yaş altı kadınların 100'de birini, 30 yaş altı kadınların 1.000'de birini, 20 yaş altı kadınların ise 10.000'de birini etkilemektedir (2). Yıllık menapoz insidansı, 15-29 yaş grubunda 29/100.000 iken 30-39 yaş grubunda 76/100.000 olarak bildirilmiştir. Bu oran 40-44 yaş grubunda hızla artış göstererek 884/100.000'e çıkmaktadır (2). Günümüzde POF vakalarında artış olduğuna dair kanıta dayalı bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak çocuk ve genç kadınlardaki kanserlerin kür oranındaki iyileşmeler nedeniyle POF vakalarında artış olması muhtemel görülmektedir (11, 12). Farklı etnik gruplardaki POF prevalansını saptamak üzere, ABD'de yaşayan kadınlarda yürütülen geniş çaplı bir kohort çalışmasında POF prevalansı tüm ırklarda %1,1, Kafkas kadınlarda %1,0, Afro-amerikan kadınlarda %1,4, İspanyol kadınlarda %1,4, Çinli kadınlarda %0,5, Japon kadınlarda ise %0,1 olarak bildirilmiştir (13). Prevalansın etnik gruplar arasında bu derece farklılık göstermesi POF etiyojisinde genetik faktörlerin de etkili olduğuna işaret etmektedir.

2.1.3. Tanı

POF tanısı, hasta için oldukça yıkıcı olabilen kabullenilmesi zor bir tanıdır. Bu nedenle hastayı tanı konusunda bilgilendirirken hasta psikolojisini dikkate alan, iyi planlanmış hassas bir yaklaşım uygun olacaktır (14). Teşhisin hastaya aktarılma şekli hastanın hissedeceği ruhsal çöküntünün derecesini etkileyebilir. Son zamanlarda yapılan bir çalışma spontan POF tanısı alan hastaların %71'inin doktoru tarafından yapılan bilgilendirmeden tatmin olmadıklarını ortaya koymuştur (15). Hastaya tanı anlatılırken geçici remisyon ve spontan gebelik şansı gibi POF'u normal menapozdan ayıran farkların altı özellikle çizilmelidir.

POF tanı kriterleri henüz profesyonel bir organizasyon tarafından standardize edilmemiştir. Bu durum teşhiste gecikmeye ve hasta yönetiminde aksaklıklara neden

olmaktadır. Yapılan bir çalışma, sekonder amenore ile başvuran kadınların yarısından fazlasının tanıya yönelik laboratuvar tetkikleri başlatılıncaya kadar üç ya da daha fazla doktor tarafından değerlendirildiğini göstermiştir (16). Oysa, üç ay ve üzerinde menstrüasyon düzensizliği öyküsü olan hastalar, doktora ilk başvurdıklarında POF tanısı açısından uygun değerlendirme ve incelemeyi hak etmektedirler (17).

POF genelde daha önce düzenli olan menstrual siklularda 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. Menstrüasyon aralığı 90 gün ve üzerinde olan ya da yıllık siklus sayısı dokuzun altında olan her kadında tanıya yönelik inceleme başlatılmalıdır (18). Çünkü POF, primer amenore vakalarının %10-28, sekonder amenore vakalarının ise %4-18'inin altta yatan nedenidir (2, 19).

POF'un klasik tanımlamalarında, tanı kriteri olarak genelde dört ay ve üzerinde amenore öyküsü öngörülmektedir. Ancak bu hastalarda zaman zaman menstrual kanamaya neden olacak biçimde ovaryan fonksiyonlar geri dönebildiği için pratik uygulamada, amenore olmasa da menapozal FSH değerlerine eşlik eden dört ay ya da daha uzun süreli 'düzensiz menstrüasyon' (amenore, oligomenore, polimenore, metroraji) öyküsü de tanıda dikkate alınmalıdır. Vazomotor semptomlar (sıcak basması, gece terlemesi), uyku bozukluğu, vajinal kuruluk, disparoni tüm hastalarda görülmemekle birlikte östrojen eksikliğine bağlı ortaya çıkabilen semptomlardır (20).

Sekonder amenore ile başvuran hastalarda gebeliğin ekartasyonunun ardından uygulanacak tanısal yaklaşım minimum olarak serum FSH, LH, östradiol, TSH ve prolaktin düzeyi ölçümlerini içermelidir (14). Menapozal düzeyde FSH tespit edilen hastalarda hipogonadizmi konfirme etmek üzere 4-6 hafta sonra östrodiol ve FSH ölçümü tekrarlanmalıdır (21). Herhangi bir tanısal işlem yapılmaksızın amenoreyi strese bağlamak uygun bir klinik yaklaşım değildir (14).

Ovaryan fonksiyonları değerlendirmek için daha önce uygulanan progestin çekilme testi günümüzde önerilmemektedir. Progestin çekilme testi ile kanama görülen kadınların %50'si menapozal düzeyde FSH'ya sahiptir ve bu teste güvenerek yapılan hasta yönetimi tanıda gereksiz gecikmeye neden olabilmektedir (6).

Primer amenore ile başvuran POF hastalarının yaklaşık %50'sinde karyotip anomalisi saptanmaktadır. Ancak hastaların büyük bölümünü oluşturan sekonder amenore ile başvuran grubun ise ancak %13'ünde karyotip anomalisi tespit edilmektedir (10). Bu da POF hastalarının büyük çoğunluğunun karyotipi normal, '46,XX spontan POF' tanısı alacağı anlamına gelmektedir (22).

Bir sendromla ilişkili olmayan primer ovaryan yetmezlik durumunda, sebebi belirlemeye yönelik önerilen laboratuvar testleri karyotip analizi, fragil X mental retardasyon 1 geni (FMR1) premütasyon analizi ve adrenal antikor tayinini içermelidir. İzole spontan primer ovaryan yetmezliği olan 46,XX kadınların %2'sinde, ailevi spontan primer ovaryan yetmezliği olan 46,XX kadınların ise %14'ünde FMR1 premütasyonu saptanmıştır (23). Adrenal antikor testi primer ovaryan yetmezlikli hastaların %4'ünde pozitifdir. Bu hastalarda steroidojenik hücre otoimmünitesi vardır ve lenfositik otoimmün ooforit nedeniyle ovaryan yetmezlik gelişmektedir. Ovaryan biyopsi hasta yönetiminde ek avantaj sağlamamaktadır. Literatürde ovaryan biyopsi ile folikül olmadığı ortaya konan kadınlarda dahi gebelik vakaları bildirilmiştir (10).

2.1.4. POF Nedenleri

POF vakalarının büyük çoğunluğu idiopatikdir ve çoğu hastada yapılan tüm incelemelere rağmen altta yatan bir neden ortaya konulamaz (10). Etiyolojik araştırmalar ise daha çok, vakaların küçük bir kısmında altta yatan genetik, otoimmün, enfeksiyöz ve iatrojenik faktörleri ortaya çıkarmaya yöneliktir. Tablo 2.1'de POF nedenleri gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Prematür ovaryan yetmezliğin nedenleri (24).

I. X kromozomu kaynaklı nedenler

A. X kromozomundaki yapısal değişiklikler, mutasyonlar ya da bir X kromozomunun yokluğu

1. Turner sendromu belirtileri ile birlikte (45,X ya da mozaik)
2. Turner sendromu belirtileri olmaksızın
 - a. Prematür ovaryan yetmezlik1 (Xq26-q28) mutasyonu
 - b. Prematür ovaryan yetmezlik1 mutasyonu ve Frajil X premutasyonu (Xq27.3) birlikteliği
 - c. Prematür ovaryan yetmezlik 2A (Xq22) mutasyonu
 - d. Prematür ovaryan yetmezlik 2B (Xq21) mutasyonu
 - e. Prematür ovaryan yetmezlik 4 mutasyonu ve kemik morfogenetik proteini 15 (Xp11.2) mutasyonu birlikteliği

B. Trisomi X (mozaizm ile birlikte ya da birlikte olmaksızın)

II. 46 XY karyotip ile ilişkili mutasyonlar

A. Xp22.11-p21.2 mutasyonları (Swyer sendromu)

B. 5 cen mutasyonları

III. Otozomal nedenler

A. Reprodüktif açıdan önemli bazı enzimlerin mutasyonları

1. Galaktozemi (Galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz eksikliği) (9p13)
2. 17 alfa Hidroksilaz eksikliği (CPY17A1) (10q24.3)

B. Reprodüktif hormonları, etkilerini ve reseptörlerini değiştiren mutasyonlar

1. Luteinizan hormon (LH) ya da FSH mutasyonları ya da her ikisini birden inaktive eden mutasyonlar

(teorik olarak)

2. İnhibin mutasyonları (teorik olarak)
3. Reseptör mutasyonları
 - a. FSH reseptörü (2p21-p16)
 - b. LH/human koryonik gonadotropin reseptörü (2p21)
4. Hormon etki yollarındaki mutasyonlar

C. Diğer mutasyonlar

1. Blefarofimozis, pitozis, ve epikantus inversus, tip 1 (BPES) (P 3) (3q23)
2. Prematür ovaryan yetmezlik 5 (yenidoğan over homeobox) (7q35)
3. Otoimmün poliendokrin sendrom, tip 1 (Otoimmün poliendokrinopati-kandidiyazis-ektodermal distrofi) (otoimmün regülatör gen, AIRE) (21q22.3)
4. Ovaryan yetmezlikle birlikte beyaz cevher lökodistrofisi (translasyon başlama faktörü E1F2B' yi kodlayan genler) (14q24, Chr 12, 1p34.1, 3q27, 2p23.3)
5. Konjenital glikolizasyon bozuklukları, tip 1a (fosfomannomutaz-2' yi kodlayan genler, PMM2) (16p13.3-p13.2)

IV. Çevresel nedenler

A. Kemoterapötik ajanlar(özellikle alkilleyiciler)

B. İyonizan radyasyon

C. Viral enfeksiyonlar (kabakulak)

D. Cerrahi

V. İmmün nedenler

A. Diğer otoimmün hastalıklar ile birlikte

B. izole

C. Konjenital timik aplazi ile birlikte

VI. İdiyopatik nedenler

* Kromozomlardaki mutasyon bölgeleri parantezler içinde belirtilmiştir

2.1.4.1. Genetik Dışı Nedenler

Anlamalı derecede ovaryan hasara neden olduğu bilinen faktörlerin başında kemoterapi (KT) ve radyoterapi (RT) ajanları gelir. Çocukluk kanserlerinden sağ kalanların incelendiği bir kolu 1993'te diğer kolu 2007'de başlatılan geniş çaplı kohort çalışmasında, çocukluk döneminde uygulanan kanser tedavisinin hastalar üzerindeki uzun dönem etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, 18 yaşından sonra tedavi alan hastaların tedavi almayanlara göre POF riskinin 13 kat artmış olduğu; riskin tedavi alınan yaşa, RT dozuna ve alkilleyici ajan dozuna paralel olarak artış gösterdiği bildirilmiştir (25,11). Bu tip tedavi alan hastaların kendi yaş grupları ile karşılaştırıldıklarında, over biyopsilerinde daha az primordiyal foliküle ve ultrasonografik incelemelerinde daha az antral foliküle rastlanmıştır (26).

KT ilaçları içerisinde ovaryan hasara en sık neden olan grup, Hodgkin Hastalığı ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan alkilleyici ajanlardır (AA) (27, 28). AA, bazı kritik hücrel makromoleküllerle kovalent bağ oluşturabilen reaktif moleküllerdir. Tek reaktif grup taşıyan AA (monofonksiyonel alkilleyici ajanlar) siklofosamid gibi bifonksiyonel ajanlara göre POF ile daha az ilişkili olduğu bildirilmiştir (29,25). AA, DNA çift zincirinde kırıklar ve yeni çapraz bağlanmalar oluşturarak kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, bu ajanların doza bağımlı olarak aynı etkiyi fare overleri üzerinde de yaptığı gösterilmiştir (30). AA içeren KT protokolleri ile tedavi edilen 30 yaş altındaki hastalarda POF gelişme riskinin %5-25 olduğu bildirilmiştir (31). AA hücre proliferasyonundan bağımsız olarak sitotoksik etki gösterebildikleri için, hem oositleri hem de primordiyal foliküllerin pregranuloza hücrelerini hasarlayabilirler (32). Ancak antimetabolit türü ajanlar, yalnızca bölünen hücreler üzerinde etkili olduklarından ovaryan hasara daha az neden olurlar. Osteosarkom tedavisinde yüksek dozda kullanılan metotroksat, günümüzde ektopik gebelik tedavisinde de yaygın biçimde kullanılmaktadır. Metotroksatın overler üzerine etkisi hakkında yeterli veri olmamakla birlikte, henüz olumsuz bir etki bildirilmemiştir (33). Kemoterapi sırasında oosit kalitesinin korunması için eş zamanlı GnRH analogu başlanması şeklindeki yaklaşım bazı çalışmalarla ve meta-analizlerle desteklenmekle birlikte, bu yaklaşımın daha güçlü randomize çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir (18).

Foliküller radyasyona karşı da oldukça hassastır. Hızlı bölünen teka ve granuloza hücrelerinin tahribi ya da primordiyal foliküllerde meydana gelen DNA hasarı atreziyi hızlandırarak foliküler havuzun hızla azalmasına neden olabilir (19). Hastanın yaşı, RT'nin şekli ve dozu POF gelişimi için ana prognostik faktörlerdir (34). Puberte öncesinde uygulanan RT'ye bağlı POF gelişme riski, ileri yaşlarda uygulanana göre daha azdır (35). Direk olarak pelvisin hedef alınmadığı ve bölünmüş dozlarda verilen RT protokolleri POF açısından daha az risk taşımaktadır (36). Wallace ve ark.'nın çalışmasında insanda primordiyal foliküller için median letal doz <4Gy (Gray) olarak bildirilmiş; sonrasında aynı grup tarafından yeni matematiksel modeller kullanılarak bu değer <2Gy'ye çekilmiştir (37). RT alan hastaları ovaryan hasardan korumak için çeşitli yöntemler ileri sürülmüştür. Overlerin cerrahi olarak başka bir bölgeye naklinin (ovaryan transpozisyon) ve GnRH analoglarının kullanımının ovaryan fonksiyonlardaki kaybı azalttığı bildirilmiştir (38,39). Ovaryan transpozisyon yolu ile overleri RT sahasından uzaklaştırılan hastaların %60-100'ünde over fonksiyonlarının korunduğu gösterilmiştir (40). Kriyoprezervasyon ise diğer bir seçenektir. Ancak uygulama protokollerindeki ve ekipmanlardaki tüm gelişmelere rağmen RT kanser tedavisi alan hastalarda POF gelişimi açısından en önemli risk faktörü olmaya devam etmektedir (26).

Tüm pelvik cerrahilerin gerek ovaryan kan akımını bozarak gerekse pelvik bölgede inflamasyona neden olarak ovaryan hasarlanmaya yol açma potansiyeli vardır. Geçirilmiş tek taraflı ooferektomi öyküsünün erken menapoz riskini artırdığı bildirilmiştir (41). Bu durum, direk olarak folikül havuzundaki azalmadan kaynaklanabileceği gibi, ovaryan kan akımının azalması ve pelvik inflamasyon gibi indirek faktörlerin neden olduğu ovaryan hasardan da kaynaklanabilir. Busacca ve ark. bilateral endometriyoma nedeni ile opere edilen 126 hastayı retrospektif olarak incelemişler ve bilateral endometriyoma cerrahisine bağlı POF gelişme riskini %2.4 olarak bildirmişlerdir (42). Uterin arter embolizasyonunun da overlerin vasküler desteğini azaltarak POF'a neden olabileceği bildirilmiştir (43). Overler korunarak histerektomi yapılmış hastaların ortalama menapoz yaşının (45.4±4.0) opere olmamış kadınlara göre (49.5±4.04) anlamlı ölçüde daha düşük olduğu bildirilmiştir (44).

Çevre ve yaşam tarzının reproduktif yaşlanma üzerine etkisi hakkında henüz yeterince kanıt elde edilememekle birlikte bu alan pek çok çalışmaya temel

oluşturmuştur. Üzerinde en çok çalışılan çevresel toksin ise hiç şüphesiz sigaradır. Sigara dumanı polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitröz bileşikler, aromatik aminler, nikotin ve protein pirolizatların karışımından oluşmaktadır. Bunlardan esas olarak poliaromatik hidrokarbonların folikül gelişimi olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Sigara, primordiyal foliküllerde hasarlanmaya yol açarak, östrojenlerin hepatik metabolizmasını hızlandırarak ve hipotalamopituiter aks üzerine etki göstererek hormonal dengesizliğe de neden olmaktadır (45). Sigara ile POF arasında kesin bir bağlantı gösterilememiş olmakla birlikte, sigara içenlerin içmeyenlerden ortalama 1-4 yıl önce menapoza girdiği bildirilmiştir (26). Yapılan bir çalışmada, 8 hafta boyunca sigara dumanına maruz bırakılan farelerin primordiyal folikül sayısında ve over hacminde anlamlı ölçüde azalma olduğu saptanmıştır (46). Fareler üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise, intrauterin dönemde sigara dumanına maruz kalan dişi yavruların primordiyal folikül sayılarında azalma olduğu tespit edilmiştir (47). Ağır metaller, çözücüler, böcek ilaçları, plastikler ve endüstriyel kimyasallar ile yapılan çalışmalarda tutarlı sonuçlara ulaşılamamıştır (48). Ancak, vinilklohekzen ve onun diepoksit metabolitinin, farelerde ve sıçanlarda primordiyal ve primer foliküllerin selektif hasarına yol açarak POF'a neden olduğu bildirilmiştir (49,50). Toksisitesi 1940'lı yıllarda henüz bilinmeyen, elektronik sektöründe kullanılan 2-bromopropan adlı çözücüye maruz kalan 25 kadından 16'sının amenore şikayeti ile başvurması üzerine, yapılan inceleme ve hormon tetkikleri sonucu hastalara POF tanısı konulduğu bildirilmiştir (51).

Gonadların hastalık sürecine dahil olduğu bazı enfeksiyöz hastalıklar da POF' a neden olabilir. Kadınlarda, adölesan dönem sonrasında geçirilen kabakulak enfeksiyonunun overleri tutma eğiliminde olduğu ve kabakulak geçiren kadınların %3-7'sinde POF gelişebileceği bildirilmiştir (19). Bu hastaların çoğunda enfeksiyonun iyileşmesini takiben ovaryan fonksiyonlar geri dönmektedir (52). Malarya, varisella ve shigella enfeksiyonlarını takiben gelişen POF vakaları bildirilmekle birlikte, bu enfeksiyonlarla POF arasında bir neden-sonuç ilişkisi kurulamamıştır (53). Sitomegalovirüsün de immünsuprese hastalarda POF etkeni olabileceği bildirilmiştir (54).

POF'ta hastaların %10-20'sinde organa spesifik bir otoimmün hastalık tabloya eşlik eder (55). POF ile ilişkili olarak çok sayıda endokrin (tiroidit, adrenal hastalıklar,

hipoparatiroid, diabetes mellitus ve hipofizit) ve endokrin dışı (kronik kandidiyazis, idiopatik trombositopenik purpura, vitiligo, alopesi, otoimmün hemolitik anemi, pernisiyoz anemi, sistemik lupus eritematozis, romatoid artrit, Crohn hastalığı, Sjögren sendromu, myasthenia gravis, primer biliyer siroz, kronik aktif hepatit) otoimmün tablo rapor edilmiştir (56,57). Endokrin otoimmün ovaryan yetmezlik Addison hastalığına da eşlik edebilmektedir. Altta yatan mekanizmanın over ve adrenaller arasındaki otoimmün antikorların benzerliği olduğu düşünülmektedir. Ancak otoimmün kaynaklı POF'da, çoğu zaman anti-ovaryan antikorların varlığı söz konusudur. Literatürde FSH reseptörü, LH reseptörü, Zona Pelüsida ve diğer bazı ovaryan antijenlere karşı oluşan ovaryan antikorlar bildirilmiştir (58). Vücutta bulunan doğal antikorlar ile çapraz reaksiyon vermeleri nedeniyle ovaryan antikor testlerinin üçte bire yakın yalancı pozitiflik oranı vardır (59,60). POF hastalarında ovaryan antikorların bulunma sıklığı farklı değerlendirme yöntemleri bulunması ve antikor spesifitesinin olmamasından dolayı farklı çalışmalarda %7-69 gibi geniş bir aralıkta bildirilmiştir (61). Bu nedenle ovaryan antikor tespit edilmesi etiyolojide otoimmünitenin rol alabileceğini akla getirmeli; ancak POF'lu hastalarda ovaryan antikor tespit edilmesi overlerdeki hasarın otoimmün kaynaklı olduğunun kanıtı olarak görülmemelidir.

İdiopatik POF hastalarının, periferik kandaki aktive olmuş T hücre sayılarında artış olduğu bildirilmiştir (56). Benzer bulgular Graves hastalığı, insüline bağımlı diyabet, Addison hastalığı gibi diğer bazı otimmün endokrinopatilerde de rapor edilmiştir. Ancak postmenapozal kadınlarda aktive T hücre sayısında artış olduğu ve östrojen replasmanı ile aktive T hücre sayısının azaldığı gösterilmiştir. Dolayısıyla aktive T hücre sayısındaki artışın ovaryan yetmezliğin sebebi mi yoksa bir sonucu mu olduğu netlik kazanmamıştır (62).

Tirodin otoimmün hastalıkları, en sıklıkla da Hashimoto tiroditi tanı anında POF'lu hastaların %14-27'sinde mevcuttur (56,63). Bu nedenle hastaların tirotropin seviyeleri ve tiroid peroksidaz antikorları açısından incelenmesi yararlı görülmektedir (20). POF hastalarının %4'ünde adrenal antikor pozitifdir ve bu durumdaki hastaların %50'sinde adrenal yetmezlik gelişme riski vardır (64). Bu nedenle hastaların adrenal antikor açısından taranmaları önerilmektedir (48). Adrenal antikor saptanan hastalar yıllık olarak kortikotropin stimülasyon testi ile değerlendirilmelidir. Teorik olarak, bir kere adrenal antikor saptanmayan hastalarda sonrasında antikor testini tekrarlama

gerekliliği yoktur (20). Ancak her durumda, hastalar adrenal yetmezliğin semptomları konusunda mutlaka uyarılmalıdır.

Mekanizması bilinmemekle birlikte POF'da oküler yüzey hastalıklarının sıklığı artmıştır. Kuru göz sendromu insidansının POF hasta grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu bildirilmiştir(%20 vs. %3) (65). Tiroid ve adrenal kaynaklı otoimmün bozukluklar dışındaki otoimmün hastalıklar son derece nadir olduğundan, bu hastalıklar açısından rutin test yerine semptomla dayalı yaklaşımda bulunmak uygun görölmektedir (20).

2.1.4.2. Genetik Nedenler

2.1.4.2.1. POF Etiyolojisinde Genetik Nedenleri Düşündüren Bulgular

POF patogeneğinde bir takım genetik mekanizmaların rol aldığını düşündüren pek çok gözlem ve bulgu mevcuttur.

Turner sendromu olan ya da X kromozom anomalisi olan hastalarda izlenen ovaryan bozukluklar, X-bağlantılı genlerin ovaryan fonksiyonlar üzerinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmüştür. POF'lu ailelerde erkek birey sayısının kontrol grubuna göre az olması X kromozomuna dikkat çeken bir diğer bulgudur (41). Bu durum, erkekte tek bir X kromozomu olması nedeni ile X kromozomundaki her hangi bir problemde intrauterin yaşam şansının azalmasına bağlanabilir. Nitekim diğer bir çalışmada da POF hastalarının erkek kardeş sayısının kontrol grubuna göre daha az olduğunu bildirilmiştir (66).

İnsan ve hayvanda tek gen kusurlarına bağlı POF vakalarının bildirilmesi X-dışı genetik bölgelerin de POF etiolojisinde yer alabileceğine işaret etmiştir. Son yapılan genom-wide çalışmalarda 5,6,13,19 ve 20. kromozom üzerinde doğal menapoz yaşı ile anlamlı ilişki gösteren gen bölgelerinin tespit edildiği bildirilmiştir (67,68).

Bazı ailelerde farklı jenerasyonlarda çok sayıda POF vakasının görülmesi bir başka önemli gözlemdir. Yapılan çalışmalarda ailevi POF vakalarının oranı %4-%31 aralığında rapor edilmiştir (66). Bu farklılığın temelinde POF tanı kriterlerindeki ve aile öyküsünün sorgulanmasındaki farklılıkların yattığı düşünölmektedir. Klasik kriterlere göre, 40 yaşından önce POF tanısı almış normal karyotipli hastaların aileleri

incelendiğinde ailevi POF insidansı %12.7 olarak bildirilmiştir (3). Pek çok hasta henüz ailelerini kurmadan POF tanısı aldığı için, POF'un genetik analizini yapmakta geleneksel yöntemler çoğu zaman yetersiz kalmaktadır (55).

Aile ve ikiz çalışmalarından, menapoz yaşının belirlenmesinde genetik faktörlerin rol aldığına dair kanıtlar elde edilmiştir. Menapoza 45 yaşından önce girmiş kadınlarda, erken menapoza girmiş anne, kızkardeş, tyze ve anneanne öyküsü kontrol grubuna göre 4-9 kat daha sık görülmektedir (69). Ailede erken menapozun birden fazla aile bireyinde ve 40 yaşından önce görülmesi durumunda risk daha da artmaktadır. Ayrıca epidemiyolojik kanıtlar menapoz yaşının anneden kıza aktarılabilirliğini ortaya koymaktadır (41,70,71).

2.1.4.2.2. POF1 Bölgesi

POF'lu hastalarda X kromozomunun uzun kolunda gösterilen bazı küçük delesyonlar, bu bölgede (Xq26-qter) folikülogenezde rol alan gen lokuslarının olabileceği yönündeki ilk bulgular olmuşlardır (72). Daha sonra, farklı çalışmalarda da POF hastalarında Xq delesyonları tespit edilmesi bu görüşü desteklemiştir. Yapılan moleküler delesyon analizi ile POF1 olarak isimlendirilen bu bölge Xq26.2-q28 olacak şekilde daraltılmıştır (73). POF1 bölgesi yaklaşık 22 Mb büyüklüğündedir ve yerleşim itibari ile tamamı POF için aday gen olan 190 gen içermektedir. Bunlardan en bilinenleri Fragile Site Mental Retardation 1 (FMR1), Heparan Sulfat 6-O-Sulfotransferaz 2 (HS6ST2), Transkripsiyon Faktör DP Family member 3 (TDPF3) ve Glypikan 3 (GPC3)'tür (74).

2.1.4.2.3. POF2 Bölgesi

Xq13.3-q22'de lokalize olan diğer POF bölgesi (POF 2) ilk olarak babadan kaynaklanan 46,X,t(X;6)(q13.3-21;p12) translokasyonuna sahip bir hastada tariflenmiştir (75). Kırılma noktalarının haritalanması ile yapılan moleküler çalışmalarla bu bölgede POF için aday olan Diaphanous Homolog 2 (DIAPH2) ve Premature Ovarian Failure, 1B (POF1B) genleri belirlenmiştir. Drosophila Diaphanous geninin delesyonu meyve sineğinde spermatogenez ve oogenezi etkilemekte ve infertiliteye neden olmaktadır. Bu nedenle insan DIAPH2 geni hasarının POF'a neden olması kuvvetle muhtemeldir (76). Moleküler ve genetik mutasyon çalışmaları ile DACH2

geninin POF fenotipi ile ilişkisi gösterilmiş ancak POF1B ile ilgili bu ilişki gösterilememiştir (74).

2.1.4.2.4. Yapısal X Kromozomu Anomalileri

2.1.4.2.4.1. Turner Sendromu

Feriliteyi etkileyen yapısal X kromozomu anomalilerinden en bilineni Turner Sendromu'dur (TS). TS, 2000 canlı kız doğumdan birinde görülen, en sık kromozomal anomalilerden birisidir. TS'nin tüm kız fetusların %3'ünde görüldüğü, ancak yüksek embriyonal ölüm oranı nedeni ile etkilenen fetusların ancak %1'inin terme ulaştığı bildirilmiştir (77). Sitogenetik olarak, TS'de X kromozomu monozomisi, anormal X kromozomu, 45X hücre grubuna eşlik eden 46XX, 46XY veya farklı seks kromozomu dizilimleri görülebilmektedir. Fenotip ile sitogenetik yapı korelasyon göstermektedir. Saf 45X monozomisi en sık görülen ve en ciddi fenotipik bulgulara sahip olan formdur. TS olan hastaların yaklaşık üçte ikisinde normal X kromozomu maternal kaynaklıdır (77,78). X kromozomu monozomisi, paternal gamette ya da erken embriyonal bölünme aşamasında iken, mayoz sırasında seks kromatidlerinin ayrılmamasından kaynaklanmaktadır. Sonraki dönemlerde olan ayrılma kusuru, genellikle mozaisizm ile sonuçlanmaktadır. Mozaisizm görülen vakalar, daha hafif bir fenotipe sahiptir ve bu hastaların %40'ı gonadal yetmezlik gelişmeden önce spontan olarak puberteye girerler (79).

TS fenotipinde büyük oranda çeşitlilik gözlenmemektedir. Etkilenen bireylerde değişken bir spektrum içerisinde, kısa boy, gonadal disgenezi, bilişsel bozukluk, kardiyak ve renal anomalilere ek olarak yele boyun, düşük kulak, düşük saç çizgisi, yelken göğüs, cubitis valgus, ve diğer bazı fenotipik özellikler görülebilir. Fenotipteki bu geniş varyasyon hem karyotip anomalisindeki 45,X0'dan X kromozomu yapısal bozukluklarına kadar değişen genetik varyasyondan, hem de mozaisizmden kaynaklanmaktadır.

45,X hastalarda infertilite, mayotik profazda pakiten evresinden hemen önce meydana gelen oosit kaybından kaynaklanmaktadır. TS'li hastalarda foliküler atrezi hızı artmaktadır (80). Yani bu hastalar, prenatal dönemde artmış atreziye bağlı olarak doğum zamanına gelindiğinde neredeyse tüm foliküllerini kaybetmiş olarak doğarlar. Bunun

sonucu olarak primer amenore ve streak gonad gelişir. Bu nedenle, normal kadın fertilitesi ve over fonksiyonunun sağlanması için iki fonksiyonel X kromozomuna ihtiyaç olduğu ve erken ovaryan süreklilik için gerekli olan X genlerinin çift dozda eksprese edilmesi gerektiği öne sürülmüştür (81). Ovaryan yetmezliğin şiddeti mayotik ayrılma hatalarının miktarı ile korelasyon gösterdiğinden, TS'de görülen ovaryan yetmezliğin non-spesifik ayrılma hatalarından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (82). X kromozomunun kısa kolundaki delesyonların genellikle primer; uzun kolundaki delesyonların ise primer ya da sekonder amenoreye neden olduğu bildirilmiştir (83). Bu nedenle normal ovaryan fonksiyon ve fertilitate için X kromozomunun hem uzun hem de kısa kolunda önemli genler taşıdığı düşünülmektedir.

TS hastalarında, östrojen replasmana başlanması için optimum yaşın ne olduğu konusu tartışmalıdır. Geçmişte, epifizyal kapanma öncesi büyüme periyodunu uzatmak adına, pubertal indüksiyonun mümkün olabildiğince geciktirilmesi savunulmakta idi (84). Ancak aileler, pubertal gelişimin gecikmesinin çocuklarda neden olduğu psikolojik stres nedeniyle rahatsızlık duymaktaydı. Oysa yapılan bir çalışma, büyüme hormonu tedavisinin zamanında başlanması kaydıyla, TS'de pubertal indüksiyona 11-12 yaşlarında, çocuğun sonuçta ulaşacağı boyu olumsuz etkilemeksizin başlanabileceğini göstermiştir (85). Diğer bir kohort çalışmasında da, ortalama 12.7 yaşında pubertal indüksiyona başlanan hastaların ortalama 151.1 cm boya ulaşabildikleri bildirilmiştir (86).

Fertilitate konusunda aileler bilgilendirilirken, fertilitate arzusu olan çoğu hastanın oosit donasyonuna ihtiyaç duyduğu; ovaryan fonksiyon gözlenen az sayıdaki hastanın spontan gebe kalabileceği anlatılmalıdır. Gebe kalınması durumunda, bu hastalarda gebelik kaybı ve konjenital anomali riskinin artmasından dolayı, bu konuda da genetik danışmanlık verilmelidir. Ne şekilde gebe kalınırsa kalınsın, uterusun hipoplastik oluşu bu hasta grubunda gebelik kaybı riskinin artmasına neden olmaktadır (87).

2.1.4.2.4.2. Trizomi X

İlk defa 1959 yılında, normal entellektüel kapasiteye sahip, sekonder amenore ile başvuran, 19 yaşında bir kadında tanımlanmış olan trizomi X, kadınlarda fazladan bir X kromozomu bulunması ile karakterize olan bir seks kromozomu anöploidisidir (88). Orjinalinde, 'süper dişi' olarak da isimlendirilen trizomi X'in, 1.000 canlı kız

doğumunun birinde görüldüğü, ama etkilenen bireylerin yalnız %10 kadarının tanı aldığı bildirilmiştir (89). Klinik tabloda, klinodaktili, pes planus, hipertelorizm, epikantal katlantı, artmış eklem fleksibilitesi gözlenebilir (90). Çoğu trizomi X vakasında major medikal problemler gözlenmemekle birlikte, en sık görülen problemler tek taraflı böbrek, renal displazi ya da ovaryan malformasyonlar gibi genitoüriner sistem anomalileridir (91). Trizomi X vakalarının çoğunda, puberte başlangıcı ve seksüel gelişim normal olmakla birlikte, bildirilen bazı ovaryan ve uterin disgenezi vakaları mevcuttur. Trizomi X ile POF birlikteliği, yaşları 19-40 arasında değişen pek çok vakada tarif edilmiştir (92). Yapılan bir çalışmada POF hastalarının %3'ünde trizomi X'e rastlandığı bildirilmiştir (93). Trizomi X'te direk olarak fertilité ile ilgili bir çalışma henüz yapılmamış olmakla birlikte pek çok başarılı gebelik bildirimleri mevcuttur. Bu nedenle POF ya da genitoüriner anomalilerle komplike olmadığı sürece, trizomi X'in fertilitéyi etkilemediği düşünülmektedir (90). Ancak bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.4.2.4.3. FMR1 (Fragile Site Mental Retardation 1) Premutasyonu

POF'un bilinen sebeplerinden de en sık olanı FMR1 premutasyonudur. Ailevi POF vakalarının %21'inin FMR1 premutasyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir (94). Xq27.3'de lokalize olan FMR1 geni, kalıtsal zeka geriliğinin en sık nedeni olan Fragile X sendromundan sorumludur. CGG trinükleotidi 5'UTR bölgesinde 200 tekrardan fazlasına ulaştığında (full mutasyon) Fragile X sendromu ortaya çıkar. Premutant allel ise 53-200 tekrar içerir ve sonraki jenerasyonda full mutasyona ilerleyebilir (95). 'Gri bölge' mutasyonu olarak bilinen 45-54 tekrarın genişleme olasılığı çok azdır. Premutasyon aralığında, üretilen mRNA miktarı CGG tekrarı sayısı ile orantılı olarak artar. Ancak premutant mRNA'nın translasyon etkinliği düşük olduğundan FMR proteini (FMRP) sentezi azalır (96). Tekrar sayısı 200'ün üzerine çıktığında ise promotor bölge hipermetile olur ve transkripsiyonun durmasına bağlı olarak FMRP sentezi durur.

FMR1 premutasyonuna sahip hastalarda POF gelişimi riski artmıştır. Premutant allele sahip kadınlarda, POF prevalansı %16 olarak bildirilmiştir (23). Sporadik POF'da premutasyon taşıyıcılığı % 0,8-7,5 iken, ailevi POF'da bu oran %13'lere kadar çıkmaktadır (97). Fragile X sendromlu ailelerdeki kadınlardan premutant allel taşıyanların % 13-15'inde POF gelişmektedir (98,99).

Premutasyon taşıyıcılığının hangi mekanizma ile POF'a neden olduğu tartışma konusudur. Over rezervini azalttığı ve atrezi hızını artırdığına dair hipotezler vardır (95). Ekspresyon çalışmaları, FMRP proteininin overdeki germinatif fetal hücrelerde yüksek seviyede eksprese edildiğini göstermiştir. Bu proteinin artan ekspresyonunun erken oosit gelişimini hızlandırarak başlangıç oosit havuzunun miktarını azaltabileceği üzerinde durulmaktadır. Alternatif görüş ise, mutant allel tarafından üretilen mRNA'nın foliküller üzerine toksik etkisi olabileceği 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 (100).

Premutasyon taşıyıcılarında POF dışında da ovaryan fonksiyon bozuklukları görülebilmektedir. Premutasyon taşıyıcılarında kontrol grubuna göre FSH değerlerinin daha yüksek olduğu ve kontrol grubuna göre 5 yaş daha erken menapoza girdiği gösterilmiştir (101).

CGG trinükleotid tekrar sayısı ile POF riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, riskin 80 tekrara kadar tekrar sayısındaki artışla birlikte arttığı (102), bu seviyeden sonra plato çizerek azaldığı (103) gösterilmiştir. Bu duruma yol açan mekanizma henüz bilinmemektedir.

Bunların dışında, 50 yaşın üzerindeki premutasyon taşıyıcılarında yüksek seviyedeki FMR1 mRNA'ya bağlı gelişen nörodejeneratif bir bozukluk olan, fragile X tremor ataksi sendromu (FXTAS) gelişebileceği bildirilmiştir (104).

FMR1 premutasyonu taşıyan kadınlara mutlaka genetik ve reproduktif danışmanlık verilmelidir. Günümüzde çocuk sahibi olma yaşı giderek ileri yaşlara ertelenme eğilimindedir. Bu nedenle, remutasyon taşıyıcılarına erken gelişebilecek bir ovaryan yetmezlik riski ve riskin hasta için öngörülen büyüklüğü ile ilgili bilgi verilmelidir. Aynı zamanda hastaya fragile X sendromlu bebeğe sahip olma riski hakkında da bilgi verilerek pre-implantasyon genetik tanının gerekliliği anlatılmalıdır.

2.1.4.2.5. POF ile İlişkili Diğer Genler

Homolog rekombinasyon yolu ile knock-out teknolojisinin geliştirilmesinin ardından 300'ün üzerinde reproduktif kusur gösteren fare modeli ve bunlarla ilişkili

olarak insanlarda patogeneizde rol alması muhtemel olan moleküler faktörler ortaya konulmuştur (105). Transjenik fare modelleri ile foliküler gelişimin değişik aşamaları ve kadın fertilitésinin hormonal düzenlenmesi ile ilgili genetik mekanizmaların temel taşları ortaya konulmuştur. Diğer memeli türlerinin reproduktif karakteristikleri ile ilgili çalışmalar POF ile ilgili çalışmalar için yeni ipuçları ortaya koymuştur. Bunların da ötesinde, daha yeni ve güçlü bir yaklaşım olan genetik bağlantı analizi teknikleri, POF ile ilgili genlerin ortaya konması ve haritalanmasında başarılı biçimde kullanılmaktadır (106)

2.1.4.2.5. 1. TGF β (Transforming Growth Factor β) Ligandları

2.1.4.2.5.1.1. BMP15 (Bone Morphogenic Protein 15)

POF'da oosit havuzunun hızlı şekilde azalmasına eşlik eden granuloza hücre kaybı görülüyor olması, oositlerde eksprese edilen ve granuloza hücre çoğalmasına neden olan genleri POF için kuvvetli aday genler arasına sokmaktadır. BMP15 ve GDF9 genleri ise tam olarak bu kriterleri karşılamaktadır (107).

Xp 11.2'de yer alan ve iki ekzondan oluşan BMP15, embriyonik gelişim ve doku oluşumu sırasında çeşitli hücrel süreçlerde rol alan büyük TGF β ailesinin bir üyesidir(108). Fare çalışmaları BMP15'in, oositlerde primer oosit aşamasından itibaren eksprese edildiğini ve foliküler maturasyon ve ovulasyon süreci boyunca yüksek seviyelerde kaldığını göstermiştir (95). BMP15, genel olarak gonadotropin bağımsız safhalardan itibaren folikül gelişiminin düzenlenmesi, granuloza hücrelerinin FSH'ya duyarlılığının düzenlenmesi ve ovulasyon kotasının belirlenmesinde rol oynamaktadır (109). Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler BMP15'in tek yumurta oluşturan türler (koyun ve insan) için, çoklu yumurta oluşturan türlere göre (fare) daha kritik bir önemi olduğunu göstermektedir (110, 111).

BMP15 geninin oogeneiz üzerine etkisi ilk olarak, primer amenore görülen, hipoplastik gonada sahip, normal karyotipli iki kız kardeş ile ilgili bir vaka çalışmasında ortaya konulmuştur (112). Bu tabloya, BMP15 geninin Tyr235Cys aminoasit değişimine neden olan, heterozigot bir varyantının yol açtığı bildirilmiştir. İki kardeş heterozigot olmasına rağmen ortaya çıkan strik gonad fenotipinin koyunlarda homozigot mutant BMP15 fenotipi ile uyumlu olması bu mutasyonun dominant negatif aktivitesi

olduğunu düşündürmektedir. POF hastalarında sonraki dönemlerde farklı bazı BMP15 mutasyonları da tariflenmiştir (113,114). Sonraki çalışmalarda bu mutasyonlardan POF hastalarında saptanıp kontrol gruplarında hiç saptanmayan iki tanesi detaylı olarak incelenmiştir. Bunun sonucunda, her iki mutasyonun da pro-protein bölgesi ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Dolayısı ile posttranslasyonel modifikasyon sonrası bu proteinlerin normal popülasyondaki kişilerle aynı olması beklenirken, mutasyonların bu modifikasyon sürecini bozarak olgun BMP15 proteini oluşumunu engellediği ortaya çıkmıştır (115).

2.1.4.2.5.1.2. GDF9 (Growth Differentiation Factor 9)

BMP15 dışında TGF β ailesinin diğer bir üyesi olan GDF9'un da folikülogenezin ilerleyişi üzerine önemli etkileri vardır. BMP15 geninin homoloğu olan GDF9 geni, 5. kromozomda yer alır (5q 23.3) ve iki ekzonu vardır. İnsanda GDF9'un over dokusu dışında uterus, hipofiz ve kemik iliğinde de eksprese edildiği gösterilmiştir (74). GDF9, prepro-protein şeklinde sentezlendikten sonra sinyal peptidi ayrılır. Oluşan GDF9 proproteini BMP15 ile homodimerler ve heterodimerler oluşturur (116). In-vitro şartlarda GDF9'un hyaluronan sentaz 2, sikloksijenaz 2 ve STAR proteinini indükleyerek kümülüs ekspansiyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (117). Bu etkileri GDF9'un POF için aday genlerden biri olarak kabul görmesine neden olmuştur (109).

Hayvan çalışmaları GDF9 fonksiyonunun çoklu yumurta üreten türler için daha kritik olduğunu ortaya koymuştur. Farelerde GDF9'un primordiyal folikül dışında folikülogenezin tüm aşamalarında eksprese edildiği gösterilmiştir (118). Dişi GDF9 knock-out fareler, sadece primordiyal ve primer folikül oluşturabildikleri için infertildirler. Folikülogenezin ileri aşamalarına geçilememesi, GDF9'un sekonder folikül oluşumu için anahtar bir gen olduğunu ortaya koymaktadır (119). LH salınımı öncesinde, kümülüs hücreleri glikoliz ve sterol biosentezi gibi metabolik olayların desteklenmesi için GDF9'a gereksinim duyar (120). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada GDF9'un preantral foliküller üzerine antiapoptotik etkisi olduğu, fosfoinositol 3-kinaz/Akt yolunu aktive ederek granuloza hücrelerinin de apoptozisine engel olduğunu gösterilmiştir (121). GDF9'un bu antiapoptotik etkisi sayesinde, antral aşamaya geçiş sırasında folikülün yaşam şansını artırdığı düşünülmektedir.

GDF9, teka hücre oluşumu ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde de anahtar role sahiptir. GDF9 yokluğunda teka hücre tabakası da oluşturulamaz. İmmatür sıçanlarda, intraperitoneal GDF9 enjeksiyonunun primordiyal ve primer foliküllerin preantral foliküllere dönüşümünü hızlandırdığı ve teka hücrelerine spesifik bir belirteç olan CYP17 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (122).

GDF9'un Smad bağımlı ve Smad bağımsız sinyal yolları üzerinden granuloza hücrelerinin mitotik aktivitesinin düzenlenmesinde de rol oynadığı bildirilmiştir (123). GDF9 knock-out farelerde ayrıca, Inhibin α ve Kit ligand gibi biyomoleküllerin regülasyonunun da bozulduğu gösterilmiştir (124).

Takebayashi ve ark.'nın POF'lu 15 Japon kadında yaptığı ilk mutasyon taramasında herhangi bir GDF9 mutasyonuna rastlanmamıştır (125). Sonrasında yapılan daha geniş çaplı mutasyon tarama çalışmalarında ise kontrol grubunda rastlanmayan, POF hasta grubunda ise %1,4 sıklığında görülen ve tamamı heterozigot olan bazı GDF9 mutasyonları tarif edilmiştir (113,114,126).

2.1.4.2.5.1.3. INHA (İnhibin Alfa)

İnhibinler, kadınlarda reproduktif siklusun en önemli düzenleyicilerindedir. FSH'ya yanıt olarak salınırlar ve hipofiz seviyesinde aktivinlerin etkisini azaltırlar. İnhibinin, α ve β olmak üzere iki alt birimi vardır ve bu alt birimler bağımsız genler tarafından kodlanır: INHA (2q33-qter), INH β A (7p15-p13) ve INH β B (2cen-q13) (127). İnhibin A ($\alpha\beta$ -A) ve inhibin B ($\alpha\beta$ -B), β alt birimindeki farklılıktan dolayı birbirinden ayrılan heterodimerik glikoproteinlerdir (106). İnhibin A ve inhibin B, menstrual siklusun farklı aşamalarında etkinlik gösterirler (95). İnhibin A'nın siklusun ortasında yükselmesi, onun preovulatuvar folikül tarafından üretilip sekrete edildiğini düşündürmektedir. İnhibin B ise foliküler fazın ortasında yükseliş göstermektedir (128). İnhibinin, hipofizer FSH salınımının negatif bir modülatörü olması ve parakrin olarak ovaryan fonksiyonları etkilemesi nedeni ile INHA, POF ile ilgili mutasyon çalışmaları için aday genlerden birisi olmuştur (109). INHA, 2. kromozomda yerleşmiştir ve iki ekzonu vardır. INHA knock-out farelerde biyoaktif inhibin dimerlerinin olmaması artmış FSH seviyeleri, infertilite ve erken yaşta görülen ve %100 geçiş gösteren seks kord stromal tümör oluşumu ile sonuçlanmaktadır (129). Yani, farelerde INHA in-vivo tümör supressor gen olarak çalışmaktadır. İnhibin ayrıca follistatin ekspresyonunun

düzenlenmesinde de rol oynar (130). Premenapozal hastalarda, menapoz semptomları henüz başlamadan önce ovaryan foliküllerin azalmasına bağlı olarak inhibin seviyeleri belirgin biçimde düşer. Bu nedenle inhibin folikül rezervini gösteren iyi bir serum belirteci olarak da işlev görür (131).

INHA ile POF arasındaki bağlantıya işaret eden ilk bulgu 46,XX,t(2;15)(q32.3;q13.3) translokasyonuna sahip bir POF hastasında, translokasyon kırılma noktasının INHA alt birimine denk gelmesi olmuştur. Bunun üzerine, bu INHA geninin mutasyonel taraması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmuştur POF hastalarının inhibin sekansında yapılan mutasyon taramasında ikinci ekzondaki gen sekansında bir polimorfizme rastlanmıştır. Belirlenen polimorfizmin, 43 POF hastasının 3 tanesinde görülürken 150 sağlıklı kontrol hastasının ancak birisinde görülmesi POF ile nedensel olarak ilişkilendirilmesine yol açmıştır (132). Bu bulgular İtalyan ve Hint populasyonunda yapılan daha geniş çaplı çalışmalarda desteklenirken, Kore populasyonunda ise söz konusu polimorfizm saptanamamıştır (74). İtalya'da yapılan bir çalışmada INHA p.A257T varyantı ile sporadik ve ailevi POF arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir (133). Ancak yakın zamanda İtalyan ve Alman hastalarla yapılan daha geniş bir kohort çalışmada bu varyantın sıklığının POF ve kontrol grubu arasında farklılık göstermediği bildirilmiştir (134).

Ayrıca, insanda inhibin β A ve β B alt birimlerinde yapılan mutasyon taramalarında herhangi bir varyasyona rastlanmamıştır (109).

2.1.4.2.5. 2. Gonadotropin Reseptörleri

2.1.4.2.5.2.1. FSHR (FSH Reseptörü)

FSH, LH ile birlikte, yetişkin yaşamı boyunca menapoza kadar seks steroid hormonlarının teka hücrelerinden salınımını kontrol eder. FSH reseptörü proteinini kodlayan FSHR geni, 2. Kromozomda bulunur (2p21-p16) ve 10 ekzonu vardır. FSH reseptörü 7 adet transmembran segment içerir (74).

FSHR mutasyonları, mutasyonun derecesine göre primer amenore, sekonder amenore ya da sekonder seks karakterlerinin gelişiminde bozukluk gibi değişik tablolara neden olabilir (135). FSHR geninde ortaya çıkarılan ilk varyant olan Ala189Val varyantının Fin populasyonunda normal karyotipli kadınlarda hipergonadotropik

ovaryan disgenezi gelişimi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (136). Bu varyasyon homozigot taşıyıcıların etkilendiği klasik resesif geçiş göstermektedir. In-vitro çalışmalar bu mutant reseptörün atipik katlanma gösterdiği ve bu nedenle plazma membranı yüzeyine ulaşamayarak FSH'ya total direnç gelişimine yol açtığını göstermiştir (137). Ala189Val varyantı sadece Fin toplumunda sıklıkla gözlenmektedir; Arjantin ve Brezilya populasyonlarında yapılan çalışmalarda bu varyantın POF ile ilişkisi gösterilememiştir (138, 139). FSHR'nin Phe591Ser varyantının artmış seks kord stromal tümör insidansı ile, Thr307Ala varyantının ise artmış dizigotik ikiz oranı ile ilişkili bulunması FSHR proteininin erken embriyogenez döneminde önemli birtakım sinyal yollarında da etkisinin olabileceğini düşündürmektedir (140).

Ghadami ve ark'nın 2010 yılındaki çalışmalarında, mutant FSHR geni taşıyan steril farelerde, FSHR geni eksprese eden adenovirüsün intraovaryan enjeksiyonu sonrası, FSH'ya yanıtın, ovaryan folikülogenezin ve östrojen üretiminin geri döndüğü gösterilmiştir (141). Bu yaklaşım, ovaryan yetmezlik için ileride mümkün olabileceği düşünülen gen tedavisinin ilk adımlarından birisidir.

2.1.4.2.5.2.2. LHR (LH Reseptörü)

Glikoprotein yapıda bir hormon olan LH, yapısal olarak iki 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 ovaryan folikülün luteinizasyonunu uyarır. Bu şekilde overlerde foliküler estrojen sentezi için substrat sağlayacak olan androjenlerin artışı uyarır (95). Anormal LH salınımı, anovulasyona, luteal faz yetmezliğine, erken oosit maturasyonuna bağlı menstrüasyon düzensizliklerine, tekrarlayan gebelik kayıplarına ve infertiliteye neden olabilir (142).

LHR geninin, her iki allelinin de inaktive olduğu varyantları 46,XX kadınlarda nadir POF nedenlerinden birisidir. Bu tip POF hastalarında tipik olarak LH seviyesi FSH seviyesinin üzerindedir. POF ile LHR geni ilişkisi ilk olarak Leydig hücre hipoplazisi görülen erkeklerde yapılan aile inceleme çalışmalarında POF hastalarının görülmesi ile ortaya çıkmıştır (143). Bu hastalarda oligomenore ya da sekonder amenoreye eşlik eden, ultrasonografide çok sayıda antral folikül görünümü vardır.

Ovaryan biyopside preovulatar aşamaya kadar tüm foliküler gelişim aşamaları görülürken tipik olarak ovulasyon gerçekleşmez (109).

LHR geninin sık görülen bir varyantı olan G102A varyantında; reseptörde 102. sıradaki serin yerine glisin geçmiştir. Bu şekilde hidrofobik özelliklerin artması LH konfirmasyonunu ve fonksiyonlarını değiştirerek menstrual düzensizliklere yol açabilmektedir (144).

2.1.4.2.5.3. Forkhead Transkripsiyon Faktörleri

Forkhead transkripsiyon faktörleri ailesinin memeli ve memeli olmayan türlerde yaygın olarak bulunan 100'ün üzerinde üyesi vardır. Forkhead proteinleri tüm ökoryatlarda bulunabilir ve vücut aksının, embriyonik dokunun gelişimine katkıda bulunur. Forkhead proteinlerinin SMAD proteinlerine bağlanarak TGF β süper ailesinin sinyallerine aracılık etmek gibi pek çok önemli fonksiyonları vardır (145). Forkhead proteinlerindeki bozuklukların çeşitli tümör oluşumları ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (146).

2.1.4.2.5.3.1. FOXL2 (Forkhead Transcription Factor Like 2)

FOXL2 geni, 3q23'de bulunur ve pek çok gelişimsel süreçte rol oynar. FOXL2, kraniyofasiyal bölge, hipofiz ve overlerde eksprese edilir. Gözkapağı gelişimi sırasında FOXL2'nin primordiyal mezenkimde yaygın olarak eksprese edildiği gösterilmiştir (147). Bu gende mutasyon olması otozomal dominant bir hastalık olan ve fenotipine zaman zaman POF'un da eşlik ettiği blefarofimozis-pitozis-epikantus inversus sendromu (BPES) ile sonuçlanır (95). BPES'in iki tipi vardır: BPES tip I'de dismorfik yüz görünümüne POF eşlik eder. BPES tip II'de ise horizontal çizgide kısalma, göz kapağında düşme ve epikantus inversus gibi yüz deformiteleri vardır; ancak tabloya POF eşlik etmez. BPES I'de FOXL2'deki non-sense mutasyonlar ve delesyonlar normalden daha kısa proteinlerin oluşumu ile sonuçlanırken; BPES II'de ise missense ve çerçeve kayma mutasyonları sonucu normalden daha büyük proteinlerin oluşumu söz konusudur (103). Yapılan başka bir çalışmada hastaların %5'inde FOXL2 mutasyonuna bağlı olarak, gözkapağı kusuru olmaksızın POF geliştiği gösterilmiştir (148). BPES'e neden olan, gen üzerinde yayılmış pek çok mutasyon vardır. Bu mutasyonların çoğunun

polialanin zincire ait olduğu gösterilmiştir (149). Ancak bu polialanin zincirin asıl rolü tam olarak bilinmemektedir.

FOXL2 knock-out kemirgenlerin overlerinde granuloza hücrelerinin diferansiasyonunun gerçekleşmediği, bunun da primordiyal foliküllerin erken aktivasyonu, foliküler atrezi ve tükenme ile sonuçlandığı gösterilmiştir (150). Önceki çalışmalarda da farelerde FOXL2 hasarının, granuloza hücrelerinin skuamoz yapıdan küboidal yapıya geçişinin bozulmasına bağlı foliküler gelişim bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (151). Bu nedenle FOXL2'nin granuloza hücrelerinin farklılaşması ve devamlılığı için gerekli olduğu düşünülmektedir.

2.1.4.2.5.3.2. FOXO3a (Forkhead Box O3a)

Forkhead gen ailesinin diğer bir üyesi olan FOXO3a geni 6q21'de lokalizedir ve overlerde eksprese edilir. Transkripsiyon düzenleyicisi olarak, diğer bazı genlerin çalışmasını başlatıp sonlandırabildikleri için yaşlanma, diyabet ve kanser gibi süreçleri kontrol ettikleri düşünülmektedir (95). FOXO gen ailesi hücre döngüsü, hücre ölümü ve DNA tamirinde kritik rol oynar.

FOXO3a knock-out fareler sterildirler. FOXO3a knock-out farelerde ovaryan foliküllerin erkenden ve geniş çapta aktive olduğu gösterilmiştir. Bu durum oosit ölümüne ve foliküllerin erken tükenmesine yol açmaktadır (152).

FOXO3a knock-out fare modellerindeki ovaryan fenotipin POF ile uyumlu olduğu gösterildiğinden FOXO3a POF için bir aday gen olmuştur. Yapılan mutasyon tarama çalışmalarında kontrol grubunda izlenmeyen POF vakalarında ise %2,2 oranında gözlenen iki genetik varyasyona rastlanmıştır (153). Ancak POF ile FOXO3a ilişkisinin netlik kazanması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.1.4.2.6. Genetik Nedenlere Yaklaşım

Fassnacht ve ark.'nın çalışmalarında bir POF hastasında altta yatan genetik temeli ortaya çıkarmak için uygulanması gereken klinik yaklaşım planı detaylı biçimde anlatılmıştır (74). Buna göre, ilk aşamada klinik alt grupları ayırt etmek üzere ayrıntılı bir öykü alınır (1. adım). Ardından, genetik anomaliyi ortaya çıkarmak üzere kromozom

analizi (karyotipleme) yapılır (2. Adım). Son olarak, folikülogenezde rol oynayan anahtar genlerin lökositler ve over dokusundaki ekspresyonu değerlendirilir (3.adım).

2.1.4.2.6.1. Klinik Değerlendirme ve Öykü

Bu aşamada genetik nedenli POF hastaları diğer POF hastalarından ayrılmaya çalışılır. Bu amaçla amenore tarifleyen her hastadan ayrıntılı bir genel ve jinekolojik öykü alınır. Hastanın aile öyküsü POF ile ilişkili olabilecek otoimmün ve metabolik hastalıklar açısından sorgulanır (74).

İatrojenik sebepler hastanın jinekolojik ve onkolojik hastalık öyküsü ve tedavi öyküsü sorgulanarak dışlanır. Gonadları etkileyebilecek KT ya da RT öyküsü iatrojenik POF'u düşündürür. Enfeksiyöz ve toksik ajanlara maruziyet öyküsü de sorgulanır. Bu sorulardan birisine pozitif cevap veren hastalar, genetik dışı nedenlerden kaynaklanan POF'un major grubunu oluşturur (74).

POF hastasının jinekolojik incelemesi uterusun ve overlerin morfolojisinin ultrasonografik olarak ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesinden sonra tamamlanabilir. Ayrıca FSH, LH, E2 ve inhibin düzeyleri değerlendirilerek hipergonadotropik tablo ortaya konulmalıdır.

2.1.4.2.6.2. Karyotip Analizi

POF hastasında, altta yatan bir genetik neden olduğunu kesin olarak söyleyebilmek, kromozom yapısının analizi ile mümkün olabilir (karyotipleme). Karyotipleme ile genetik nedenli POF'un ilk major alt grubu olan 45,XO karyotipli Turner sendromu olan hastalar açığa çıkarılır. POF ile ilişkili major kromozom anomalileri, kırılma noktaları POF1 ve POF2 bölgelerine denk gelen, X kromozomundaki otozomal translokasyonlardır (74).

2.1.4.2.6.3. POF Aday Gen Ekspresyonlarının Analizi

POF aday genlerinin lökositlerdeki RNA ekspresyon analizleri folikülogenezde rol oynayan genlerdeki kusurların tespiti için önemli bir tanısal yoldur. Ekspresyon çalışmasının lökositlerde yapılması hastaya direk olarak over biyopsisi yapma gerekliliğini ortadan kaldırır. Lökosit çalışmasında bir genin ekspresyonunun bozuk

olduğu ortaya konulduğu durumda hastaların ovaryan biyopsiye karşı daha az direnç göstermeleri muhtemeldir. Sonrasında, over biyopsisi yapılarak lökositte gözlemlenen ekspresyon kusuru over dokusunda konfirme edilebilir. Ancak overlerde eksprese edilen tüm aday genlerin lökositlerde ölçülebilir seviyede eksprese edilmemesi bu yöntem açısından bir kısıtlılık oluşturmaktadır (74).

Sporadik spontan POF vakalarında genetik nedeni ortaya koymaya yönelik yaklaşımın neleri içermesi gerektiğine dair etik, legal ya da maliyet/yarar hesabına dayalı bir analiz yapılmamıştır. Bu hastaların POF genetiği ile ilgili çalışma yapan araştırma gruplarına yönlendirilmesi bir çözüm olabilir. Bunun yanında ailevi POF etiyolojisinde yer alan FSHR, FOXL2, INHA, BMP15 gibi nadir mutasyonlar için rutin olarak tarama yapmak günümüz klinik yaklaşımında endike değildir (22).

2.1.5. POF Kliniği

Ovaryan yetmezliğin gelişimi, ooferektomi, RT ya da KT'den kaynaklanmadığı sürece yıllar sürebilir. Yaklaşmakta olan ovaryan yetmezliğin spesifik bir belirteci tariflenmemiştir. Süreç genelde subfertilite ile başlar; bu döneme gizli ovaryan yetmezlik de denir. Daha sonra FSH düzeyinin arttığı biyokimyasal yetmezlik de denilen sürece girilir. Sonraki aşamada menstrüasyon kanamaları azalır ya da kaybolur ve vazomotor semptomlar ortaya çıkabilir (154). Hastaların yaklaşık yarısında adetler tamamen kesilmeden önce doğal menapozda olduğu gibi oligomenore, polimenore ya da disfonksiyonel uterin kanamaların olduğu bir prodrom dönem görülmektedir. Ancak pek çok hastada gonadal yetmezliği gizleyen bir gebeliğin ya da hormonal kontrasepsiyonu bırakmanın ardından hızlı biçimde amenore gelişebilir (20).

Vakaların çoğunda ovaryan yetmezlik normal puberteyi takiben sekonder amenore şeklinde ortaya çıkar (155). Çarpıntı, sıcak basması, gece terlemesi, vajinal kuruluk gibi östrojen eksikliğine bağlı bulgular bu grup hastalarda primer amenore grubuna göre çok daha sık görülür.

Çoğu primer ovaryan yetmezlik vakası sporadik olmakla birlikte vakaların %10-15'inde pozitif aile öyküsü vardır (156). Bu nedenle hastalar aile öyküsü ve otoimmün polyglandular sendroma işaret edebilecek semptomlar (hipotiroidizm, hipoparatiroidizm, adrenal yetmezlik) açısından sorgulanmalıdır. Aile öyküsünde

Fragile X sendromu, zihinsel engel, demans, tremor, ataksi ya da Parkinson hastalığına benzer şikayetlerin olması FMR1 geni premütasyonu olabileceğine işaret eder. Fizik muayenede hipopigmentasyon ve vitiligo olması otoimmün adrenal yetmezliği; kısa boy, yele boyun, yüksek damak gibi bulgular ise Turner sendromunu akla getirmelidir (20).

POF hastaları, klinikte multidisipliner bir yaklaşımla ele alınmalıdır. Hastaların karşı karşıya kaldıkları psikolojik gerilim, hastalığın doğal sonucu olan infertilite ve hormonal yetmezliğe bağlı uzun dönemde ortaya çıkabilecek sağlık sorunları açısından hastalar dikkatlice yönetilmelidir. Hasta yönetiminin normal menapoz kliniğinden bağımsız bir birimde yapılmasının, zaman ve personel yeterliliğini sağlamak açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

2.1.6. POF'un Uzun Dönemde Ortaya Çıkan Sonuçları

POF'un uzun dönem etkilerini inceleyen az sayıda randomize kontrollü çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmaların çoğu gözlemseldir ve ağırlıklı olarak cerrahi menapoz hastalarında yapılmıştır. Ancak uzun dönem etkiler POF'un etiyolojisine göre farklılık gösterebilmektedir. Örneğin cerrahi POF hastalarında östrojen ve androjenlerde ani bir kesilme söz konusu iken idiopatik POF hastalarında östrojen seviyelerinde yıllar süren bir dalgalanma görülmekte ve overler androjen öncüllerini üretmeye devam etmektedirler (157).

2.1.6.1. Yaşam Beklentisi

Yaklaşık 20.000 kadını içeren büyük, prospektif bir kohort çalışmada 40 yaşından önce ve 50-54 yaşları arasında menapoza girmiş kadınlar karşılaştırılmış, tüm nedenlere bağlı mortalitenin 40 yaş altı menapoz grubunda anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve bu grupta beklenen yaşam süresinin geç menapoza giren gruba göre 2 yıl daha kısa olduğu bildirilmiştir (158). 'The Mayo Clinic Cohort Study of Oophorectomy and Aging' çalışmasında 45 yaşından önce oofektomi yapılan kadınlarda mortalite kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (159). Mortalitedeki artış 45 yaşına kadar HRT almayan hastalarla sınırlı olduğundan, östrojenin mortalite üzerine olumlu etkisi olabileceği bildirilmiştir.

2.1.6.2. Kardiyovasküler Hastalık Riski

Aynı yaş grubu erkeklerle karşılaştırıldığında, premenapozal kadınlarda kardiyovasküler hastalığa bağlı ölüm riski daha düşüktür. Bu risk farkı uzun zamandır endojen östrojen faktörü ile açıklanmaktadır. Erken menapozun kardiyovasküler hastalığa bağlı mortalite riski ile ilişkisi yıllar önce ortaya konmuştur. Kırk yaşından önce menapoza giren hastalarla 49-55 yaş arasında menapoza giren hastalar karşılaştırıldıklarında erken menapoz grubunda kardiyovasküler hastalığa bağlı mortalite riskinde %80 artış olduğu bildirilmiştir (160). Aynı çalışmada 45 yaşından önce oofektomi yapılan ve HRT kullanmayan hastalarda kardiyovasküler hastalığa bağlı mortalite riskinin anlamlı biçimde yükseldiği ve östrojen replasmanının riski azaltabileceği bildirilmiştir. POF'da endotel fonksiyonlarının ateroskleroza zemin hazırlayacak biçimde bozulduğu gösterilmiştir (161). Azalan endojen östrojenin, lipid profilini olumsuz etkilediği (trigliseridlerde artma, HDL kolesterolde azalma) bildirilmiştir (162). Erken yaşta ve fizyolojik yaşta menapoza giren 12.000 doğal menapozlu kadınla yapılan kohort çalışmada erken menapoza giren grupta kardiyovasküler mortalitenin anlamlı biçimde arttığı gösterilmiştir (163). Çok sayıda farklı gözlemsel çalışmada postmenapozal kadınlarda östrojen replasmanının kardiyovasküler hastalık riskini %35-50 oranında azalttığı bildirilmiştir (164,165). Östrojen replasmanının POF hastalarında endotel fonksiyonlarını yeniden olumlu yönde değiştirdiği bildirilmiştir (161). Ancak endotel fonksiyonlarındaki bu olumlu değişimin kardiyovasküler mortalite riskine ne şekilde yansıdığı henüz ortaya konmamıştır. 'Women's Ischaemia Syndrome Evaluation (WISE)' çalışmasından elde edilen yeni somnuçlar düşük östrodiol seviyesinin premenapozal kadınlarda da artmış kardiyovasküler hastalığa bağlı mortalite riski ile birliktelik gösterdiğini ortaya koymaktadır (166).

2.1.6.3. Osteoporoz

Östrojenin, kemiğin 'remodelling' sürecinde önemli bir yeri vardır. Östrojen eksikliği, osteoblast/osteoklast aktivitesi dengesinde osteoklastlar lehine bir bozulmaya ve trabeküler kemiğin progresif kaybına neden olmaktadır (167,168). POF'lu hastaların kontrollerle karşılaştırıldığında kemik yoğunluğunun anlamlı biçimde daha düşük olduğu ve bunun da artmış kırık riski ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (169). Amarante ve ark.'nın 2011 yılında yaptığı 32 POF hastasını içeren çalışmalarında aynı

yaş grubu ile karşılaştırıldıklarında, POF hastalarında osteoporoz sıklığının ve şiddetinin hem premenapozal hem de fizyolojik yaşta menapoza girmiş postmenapozal hastalardan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (170). Aynı çalışmada, yüksek vücut kitle indeksinin normal menapozda olduğu gibi POF hastalarında da osteoporozla karşı koruyucu olduğu ortaya konulmuştur.

Menapoza bağlı en hızlı kemik kaybı, menapozun ilk 5 yılında meydana gelir ve kayıp hızı daha sonra plato çizme eğilimindedir. Osteoporoz riski menapoz yaşına bağlı olarak da değişmektedir. Bu nedenle, maksimum kemik dansitesine ulaşmadan (geç yirmili yaşlarda ulaşıldığı düşünülmektedir) menapoza girmiş olan POF hastalarında osteoporoz riski ve şiddeti daha büyüktür (171).

Erken menapoz hastalarında, en az üç yıl devam edilmesi kaydıyla, östrojen replasmanının kırık riskini azalttığı gösterilmiştir (172). Hormon replasmanı dışında hastalar ağırlığa dayalı egzersiz, kalsiyumdan zengin diyet konusunda bilinçlendirilmeli, kalsiyum ve vitamin D ile desteklenmelidir. POF hastalarına spesifik kalsiyum ve vitamin D desteğinin şekline yönelik bir yaklaşım bulunmamakla birlikte North American Menopause Society tarafından perimenapozal ve postmenapozal hastalar için önerilen günlük 1200 mg elemental kalsiyum alımı ve yeterli vitamin D düzeyinin (serum 25-hydroxyvitamin D seviyesinin 30 ng/ml ve üzerinde) korunması hususları POF hasta grubunda da hedef alınmalıdır (173). Güneşe yeterince maruz kalmayan hastaların günlük en az 800-1000 IU vitamin D3 ile desteklenmeleri önerilmektedir (174). Bisfosfonatlar, raloksifen ve strontium gibi hormon dışı tedavilerin faydasına yönelik henüz kanıt bulunmamaktadır. Bisfosfonatlar, iskelette uzun süreli yarı ömürleri olduğu için ve fetus üzerine etkileri kesin olarak bilinmediği için gebeliğin olabileceği durumlarda verilmemelidirler (175).

2.1.6.4. Bilişsel Fonksiyonlar

Östrojenin bilişsel fonksiyonlar üzerine olumlu etkileri olduğunu ortaya koyan çok sayıda çalışma vardır (176,177). Östrojenin bilişsel fonksiyonlar üzerine yaptığı nörobiyolojik etkileri değerlendirmek üzere, östrojen-nörotransmitter etkileşimlerini gösteren, fonksiyonel görüntüleme yöntemlerini de kullanan bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu tür bir çalışmada, östrojenin kolinerjik ve seratonerjik sistemlerle etkileşime geçerek, hipokampus ve ön kortikal beyin fonksiyonları üzerine etki gösterdiği ortaya

konulmuştur (178). Gorenstein ve ark.'nın 2011 yılındaki, sağlıklı postmenapozal kadınlarda östrojen replasmanının bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisini inceleyen çalışmalarında ise östrojen replasmanının asemptomatik postmenapozal kadınlarda işitsel hafıza üzerine olumlu etkisi gösterilememiştir (179).

'The Mayo Clinic Cohort Study of Oophorectomy and Aging' çalışmasında premenapozal yaşlarda oofektomi yapılan hastalarda bilişsel bozuklukların ortaya çıkma riski incelenmiştir. Çalışmada menapoz öncesi oofektomi yapılan hastalarda kontrol grubuna göre bilişsel bozukluk ve demans riskinin arttığı ve risk artışının erken yaşta oofektomi yapılan hastalarda daha fazla olduğu bildirilmiştir (180). Ayrıca bu çalışmada 50 yaşına kadar devam edilmesi durumunda östrojen replasmanının bilişsel fonksiyonlar üzerine koruyucu etkisinin olduğu da bildirilmiştir. Kırk yaş altı hasta grubunda ve spontan POF grubunda ise henüz yeterli çalışma yapılmamıştır.

2.1.6.5. Ruh sağlığı

Fizyolojik yaşta meydana gelen menapoz, kadınlar tarafından çoğu zaman gelişimin beklenen ve doğal bir sonucu olarak algılanabilir. Çünkü doğal menapoz, pek çok kadın için planladıkları reproduktif hedeflere ulaştıkları bir zamanda meydana gelmektedir. Ancak POF, tam da kadınların çocuk sahibi olma planları yaptıkları periyotta ortaya çıkan bir tablo olduğundan hasta psikolojisini etkilemesi kaçınılmaz olmaktadır.

İnfertilite kliniğine başvuran çiftler üzerinde yapılan bir çalışmada, infertil kadınların öfke, endişe ve depresyon skorlarının toplum ortalamasına göre daha yüksek olduğu, erkek partnerde skorların kadın partnerdeki kadar yüksek olmamakla birlikte yine toplum ortalamasının üzerinde olduğu gösterilmiştir (181). Diğer bir çalışmada, medikal tedavi gerektiren depresyon görülme sıklığı 46 yaşından sonra menapoza girmiş hasta grubunda %6 iken POF grubunda %14 olarak bildirilmiştir (182).

POF teşhisinin hasta psikolojisi üzerine çok önemli etkileri olmakla birlikte, hasta yönetiminde bu husus çoğunlukla ihmal edilebilmektedir. Artmış anksiyete, depresyon, somatizasyon ve psikolojik distres; azalmış total iyilik hali ve kendine güven gibi psikolojik durumlar POF hastalarında sıklıkla ve uzun süre görülebilmektedir (183). Çalışmalarda, hem östrojen replasmanı alan hem de almayan grupta yüksek

seviyede psikolojik bozukluklar tespit edilmesi psikolojik desteğin hasta yönetiminin önemli bir parçası olmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

2.1.6.6. Cinsel Sağlık

Seksüel disfonksiyon, seksüel cevap döngüsünün (arzu, uyarım, orgazm ve gevşeme) bir ya da daha fazla aşamasında olumsuzlukların olması ya da cinsel ilişki sırasında sürekli veya tekrarlayan ağrı oluşması olarak tanımlanmaktadır (184).

POF hastalarında cinsel mutluluğun azaldığı; azalmış uyarım, azalmış cinsel ilişki ve artmış ağrı hissine bağlı cinsel tatminin azaldığı gösterilmiştir (183). Daha genç yaşta tanı alan hastalarda psikoseksüel bozukluklar daha fazla görülmektedir (185). POF'da östrojen eksikliğinin yanı sıra ovaryan korteks atrofisine bağlı olarak androjen kaybı da gelişmektedir (186). Yapılan çalışmalarda normal cinsel fonksiyon için gerekli olan androjen sentezinin POF hastalarında anlamlı biçimde düştüğü gösterilmiştir (187,188). POF hastalarında seksüel disfonksiyona yaklaşımda, hastaya yeterli östrojen ve androjen replasmanının yanında cinsel danışmanlık desteği de verilmelidir.

2.1.7. POF'da Tedavi ve Hasta Yönetimi

2.1.7.1. Hormonal Tedavi

POF hastalarında hormonal tedavi hastanın yaşı, cinsel maturasyonunun derecesi, amenorenin süresi, amenorenin primer mi sekonder mi olduğu ve hormonal tedavi için risk oluşturacak faktörlerin varlığı gibi unsurlar açısından optimize edilmelidir. Hormonal tedavideki temel amaçlar pubertal gelişimin sağlanması, östrojen eksikliğine bağlı semptomların giderilmesi ve POF'a bağlı oluşacak uzun dönem sekellerin minimize edilmesidir. Hastanın yaşı ile birlikte hormonal tedavi ihtiyacının ve tedavinin risk/yarar oranının değişebileceği de dikkate alınmalıdır (189).

Primer amenore ile ortaya çıkan POF kliniği, sekonder seks karakterlerinin olmaması ve düşük KMD (kemik mineral dansitesi) ile karakterizedir. Gecikmiş puberte için önerilen hormonal tedavi şemaları birbirinden oldukça farklıdır. Pubertede gecikme görülen hastalarda tedaviye ne zaman başlanacağı tartışmalı bir konudur. Ancak eğer hasta ve ailesi psikolojik olarak hazırsa tedaviye 12-13 yaşlarında başlanması hasta ve yaşlıları arasındaki pubertal gelişim farklılıklarını azaltmak için faydalıdır. Tedavinin

ana hatları düşük dozdan başlanıp (25 mcg transdermal östrodiol-17 β ya da 0.3 mg oral konjuge östrojen) kademeli olarak yükseltilen östrojen tedavisi, eş zamanlı olarak sekonder seks karakterlerinin gelişiminin gözlenmesi ve sonraki aşamada endometriumu korumak aynı zamanda da düzenli çekilme kanamalarını sağlamak için siklik progesteronun eklenmesinden oluşmaktadır (190). Progesteron tedavisine, östrojene başlanmasının ardından 6 ay içerisinde, kırılma kanaması gerçekleştiğinde başlanmalı ve ayda en az 12 gün verilmelidir (191).

Pubertal gelişimini tamamlamış, sekonder amenore ile başvuran hastalara kardiyovasküler hastalık riskini azaltmak, vazomotor semptomları kontrol altına almak için standart hormonal tedavi başlanır.

Etiyolojiye bağlı olarak bir grup POF hastasında ovaryan fonksiyonlarda geri dönüş olabilmektedir. Hormon replasman tedavisi alan hastalarda ovaryan fonksiyonların yeniden test edilebilmesi için 3-4 haftalık ilaçsız dönem yeterli olmaktadır (14).

İatrojenik olmayan POF hastalarında henüz amenore gelişmeden önce de ovaryan fonksiyonlardaki azalmaya paralel olarak kemik yoğunluğunda azalma başlamaktadır. Bu nedenle amenore geliştiğinde çoğu zaman KMD'de de düşüş tespit edilebilmektedir (190). Hastaların %50'sinde tanıyı takip eden ilk 18 ay içerisinde anlamlı derecede düşük KMD tespit edilir ve üçte ikisi kalça kırığı için risk oluşturacak derecede düşük KMD değerlerine sahiptir (192). POF tanısının konulması pek çok hastada yıllar alabildiğinden hormonal tedavi başlandığında çoğunlukla anlamlı derecede osteoporoz gerçekleşmiş durumdadır. Primer amenore ile gelen hastalarda KMD değerleri tedaviye rağmen sağlıklı popülasyondaki tepe değerlerine ulaşamayabilmektedir (189).

Sekonder amenore ile başvuran POF hastalarında hormonal tedaviye düşük doz östrojen ile başlanması hasta uyumunu artırmaktadır. Doz, altı ay içerisinde idame dozuna yükseltilebilir. Histerektomize olmayan kadınlarda yeterli progesteron desteği endometriyal hiperplazi ve kanserden korumak için gereklidir. Hastalara hormonal tedavinin kontraseptif bir metot olmadığı ve gebelik riskinin var olduğu anlatılmalıdır. Gebelik isteği olmayan hastalara oral kontraseptif kullanımı alternatif olarak sunulabilir.

Kemik yoğunluğunun oluşumu ve sürdürülebilmesi için androjenler de gereklidirler (193). Androjenler etkilerini direk olarak osteoblastlardaki androjen reseptörü üzerinden ya da indirek yoldan östrojene aromatize olarak gösterirler. POF hastalarında endojen androjen seviyeleri düşük olduğu için androjen desteği kemik gelişimi ve korunmasını olumlu yönde etkilemektedir (190).

Androjen eksikliğinin düşük libido, genital uyarımda azalma, orgazm problemi, genel iyilik halindeki azalma ve motivasyon güçlüğü gibi problemlerin önemli bir nedeni olduğu düşünülmektedir (185). Seksüel uyarılabilirliğin tekrar sağlanması östrojen, testesteron veya dehidroepiandrosteronun birlikte kullanımı ile başarılı biçimde sağlanabilir. Testesteron dozunun uygun şekilde ayarlanması ile normal kas kitlesinin korunması istenmeyen metabolik etkilere ve virilizasyona sebep olmaksızın sağlanabilir. POF hastaları doğal olarak daha uzun sürecek bir hormon replasman tedavisine ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenle hormon replasman tedavisindeki son gelişmeler ışığında uzun süreli replasmanın faydalarını ve potansiyel risklerini değerlendirebilmek için hastaların tedavinin etkileri açısından yakın biçimde izlenmesi gerekmektedir (189).

2.1.7.2. Dehidroepiandrosteron (DHEA)

Reprodüktif tıpdaki en tartışmalı konulardan birisi de azalmış ovaryan fonksiyonların farmakolojik olarak tekrar iyileştirilmesinin gerçekten mümkün olup olmadığıdır. Dünyadaki IVF merkezlerinin yaklaşık üçte biri tarafından kullanılan dehidroepiandrosteron (DHEA) desteğinin neden daha yaygın olarak uygulanmadığı sorusunun cevabı bu tartışmada yatmaktadır (194).

DHEA, foliküler sıvıdaki testosteronun %48'i için prehormon olarak görev yapmaktadır (195). DHEA tedavisi verilen farelerin preantral ve erken antral foliküllerinde IGF-1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (196). DHEA'nın ovulasyon indüksiyonuna olan etkilerinin IGF-1 artışı üzerinden gerçekleştiği ileri sürülmüştür (197).

DHEA desteğinin oosit ve embriyo kalitesini iyileştirerek gebelik şansını artırdığına dair çalışmalar mevcuttur (198). DHEA desteğinin anöploidi ve buna bağlı düşük oranlarını da azalttığı gösterilmiştir (199). DHEA kullanımını takiben çok düşük

over rezervine sahip olan 30 hastada gebelik elde edildiğini bildiren bir vaka serisi yayınlanmıştır (200).

DHEA'nın IVF siklus başarısı üzerine etkisini inceleyen 25 hastalık bir vaka kontrol çalışmasında IVF siklusu öncesi yaklaşık 16 hafta DHEA kullandırılan grupta fertilize oosit sayısı, 3.gün embriyo sayısı, transfer edilen embriyo sayısı ve oosit başına embriyo skorunun anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir (201).

Mamas ve ark. tarafından DHEA kullandırılan 5 POF hastasının klinik sonuçları yayınlanmıştır. Bu hastalardan, 9 aylık amenore öyküsü ve FSH değeri 102 mIU/ml olan hastaya ovum donasyonu önerilmiş ve öncesinde endometriyal kalınlığı sağlamak için DHEA başlanmıştır. İlginç bir biçimde, yaklaşık 2 aylık tedavinin ardından hastanın mensleri geri döndüğü ve üçüncü ayda hastanın doğal yoldan gebe kalarak sağlıklı biçimde doğum yaptığı bildirilmiştir. Diğer 4 hasta, 3-6 ay boyunca DHEA kullanmış, hastaların FSH değerlerinde anlamlı azalma kaydedilmiştir. Bu hastaların da üçünün doğal yolla, bir tanesinde ise intrauterin tuboperitoneal inseminasyon yolu ile gebe kalabildiği bildirilmiştir (202).

İleri derecede bozulmuş oosit kalitesinin farmakolojik olarak geri döndürülemeyeceği kabul edilmektedir. DHEA'nın oosit gelişimine olan etkisinin direk oosit üzerine değil, indirek bir etki olduğu ve bu etkinin foliküler maturasyonun erken aşamalarında gerçekleştiği düşünülmektedir (194).

Teorik olarak, oositler gelişim için uyarılmadığı sürece yaşlanma sürecine girmezler. Yani uyarılmayan oositler kalitelerini korur. Sadece seçilen ve maturasyon sürecine giren oositler kötü ovaryan çevrenin etkisi ile kalitelerini kaybetme riski altındadırlar. Yaşlanan ovaryan çevre konsepti içerisinde değerlendirildiğinde DHEA'nın etkileri daha mantıksal bir çerçeveye oturmaktadır (194). Çünkü sağlıklı bireylerde dahi yaşla birlikte DHEA düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (203).

DHEA tedavisi ile ilgili bildirilen olumlu sonuçlar, az sayıdaki vaka kontrol çalışmaları ve vaka serilerinden gelmektedir. Bu nedenle yüksek hasta sayılarına sahip, randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.1.7.3. Fertilitenin Sağlanması

Spontan gebelik ihtimalinin %5-10 oranında da olsa bulunması POF hastaları için bir şans olmakla birlikte bu oranı artırmak ve ovaryan fonksiyonları düzeltmek için henüz kesin bir tedavi geliştirilememiştir. Bu durum karşısında, kimi hastalar evlat edinme, kimileri reproduktif tekniklerden yararlanma, kimileri de düşük de olsa spontan gebelik şanslarını deneme yoluna başvurumaktadırlar. Ovaryan fonksiyonlardaki geri dönüşler geçici ve öngörülemez olduğu için cinsel birlikteliğin zamanlanması konsepsiyon oranlarını artırmakta faydasızdır. Gebelik istemi olan hastalara haftada 2-3 kez cinsel birliktelik önerilmelidir (22).

Eldeki veriler POF'ta FSH düzeylerinin etinilöstrodiol ve GnRH analogları ile baskılanmasının ardından düşük doz gonadotropin ile ovulasyon sağlanmasının gebelik elde edimi için uygun yöntem olduğunu göstermektedir (204). Ancak FSH baskılanmasının folikül gelişimi şansını artırdığına dair yeterince güçlü, prospektif çalışmalar yoktur (18). POF hastalarında otoimmün bozuklukların varlığı immüsupresif tedavilerin ovaryan fonksiyonları iyileştirebileceği yönünde bir düşünce oluşmasına yol açmıştır. GnRH analogu ve gonadotropin kombinasyonuna dekzametazon eklenen grupta eklenmeyen gruba göre ovulasyon oranlarında artış olduğu bildirilmiştir. Ancak bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (4).

POF hastalarında, evlat edinme ve oosit donasyonu hastaya önerilebilecek yöntemlerdir. Evlat edinme seçeneği pek çok hasta tarafından ilk planda kolay kabul görmemektedir. Buna alternatif olan oosit donasyonu seçeneği için ise pek çok ülkede dini ya da yasal engeller mevcuttur. Ayrıca bazı çalışmalarda oosit donasyonu ile gebe kalan kadınlarda gebeliğe bağlı hipertansif hastalık ve ilk trimester kanaması riskinin arttığı bildirilmiştir (18). Ovum donasyonu ile ilgili diğer bir durum da ovum donasyonu ile gebelik oranlarının genç ve yaşlı hastalar için benzer olmasıdır(205). Bu nedenle donasyon için acele etmenin tıbbi bir endikasyonu yoktur.

Kriyoprezervasyon tekniklerindeki gelişmeler kanser tedavisi nedeni ile POF gelişme riski olan kadınlarda fertilitte korunması için umut verici olmuştur. Kanser tedavisi öncesinde ovaryan doku saklanmasına olan ilgi hızla artmakla beraber ovaryan dokunun ootransplantasyonu ile literatürde elde edilmiş sadece 6 sağlıklı doğum bildirilmiştir (18). Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, alınan dondurulmuş

dokularda greftleme sonrası hipoksi ve foliküler büyümenin hiperaktivasyonu nedeni ile primordiyal foliküllerde hızlı bir kayıp gerçekleştiğini göstermektedir. Boş folikül ve anormal oosit oranlarındaki artışa bağlı olarak ototransplantasyon yapılan hastalarda embriyo transfer oranları da düşük olmaktadır (18).

Postpubertal hastalarda kanser tedavisi öncesi ovaryan doku saklamaya diğer bir alternatif, ovaryan stimülasyon sonrası oosit ve embriyo saklanmasıdır. Oosit, embriyo ve over dokusunda yavaş planlanmış dondurma yerini artık vitrifikasyon yöntemine bırakmaktadır. Ancak bu yöntemde de oosit nitrojen ile direk temas halinde olduğu için bakteriyel, fungal ya da viral kontaminasyonun söz konusu olabileceği bildirilmiştir (18). In-vitro folikül gelişimi ve oosit maturasyonu konusunda henüz az bir ilerleme kaydedilebilmiştir. Bu yöntem, oositler luteal fazda toplandığı için ovaryan stimülasyonu gereksiz kılmaktadır ve kemoterapi gereken ancak ovaryan stimülasyon için vakti olmayan hastalar için özellikle uygundur.

Heterolog over transplantasyonu fertilité korunması için diğer bir seçenek olmakla birlikte ikiz eşinden yapılmadığı sürece ömür boyu immünsupresyon gerektirmesi bu yöntemin dezavantajıdır (18).

2.1.7.4. Kontrasepsiyon

POF'da spontan gebelik ihtimali olduğundan, istenmeyen gebeliklerin önüne geçmek için uygun korunma yöntemlerine ihtiyaç vardır. Standart oral kontraseptifler bu amaçla zaman zaman reçete edilse de bunlar fizyolojik replasman için gerekli olandan daha fazla miktarda sentetik steroid hormon içerdiklerinden ideal seçim değildirler (206). Ayrıca yedi günlük ilaçsız dönem POF hastalarında gereksizdir ve bu boşluk semptomlarında geri dönüşlere neden olabilir. Etinilöstrodiolün FSH düzeylerini konjuge östrojenden daha iyi baskıladığını gösteren kanıtlar olmakla birlikte konjuge östrojenlerin kardiyovasküler risk parametreleri üzerine etkisi daha güçlüdür (207). Ancak düşük doz oral kontraseptifler osteoporozun önlenmesinde daha az etkili olabilir ve POF hastaları için kontraseptif metot olarak güvenilirliği şüphelidir (206). Henüz yeterli destekleyici veri olmamakla birlikte, kontrasepsiyon istemi olan hastalara levonorgestrel intrauterin sistemler önerilebilir (14).

2.2. Ovaryan Fizyoloji

2.2.1. Primordiyal Folikül Oluşumu

Embriyogenez sırasında primordiyal germ hücreleri genital çukıntıya göç ederler. BMP'ler primordiyal germ hücrelerin epiblasttan farklılaşmasında kritik rol oynar. Genital çukıntıya ulaşan germ hücreleri oogonia olarak adlandırılırlar ve germ hücre havuzunu oluşturmak üzere çoğalırlar. Mitotik fazda germ hücreleri somatik hücrelerle çevrelenmiş olarak kümeler ve kistler oluşturacak şekilde çoğalırlar. Bu hücre grupları birbirlerine hücreler arası köprülerle bağlıdır ve senkronize biçimde mitoz girerler. Kistler daha sonra kendilerini çevredeki diğer hücrelerden ayıran bir bazal membranla çevrelenir. İnsanlarda oositlerin mayozun diploten aşamasında duraklaması fetal gelişimin 2.-7.'nci ayları arasında değişir.

Bağımsız primordiyal foliküllerin oluşumu kemirgenlerde doğum sonrası 2-4 gün içerisinde, insanda ise doğumdan hemen önce gerçekleşir. Doğumdan önce oluşan primordiyal foliküllerin bazıları oluşur oluşmaz gelişme aşamasına girer. Folikül oluşumu pregranuloza hücrelerinin yeniden düzenlenmesi, bazal membranın tek bir gamet içerecek şekilde parsiyal olarak yıkılıp yeniden oluşturulması süreçlerini içerir (208). Folikül oluşumu ilerledikçe uygunsuz olarak oluşmuş olan foliküllerin yıkımı gerçekleşir. Yeterli granuloza hücre desteği alamayan foliküllerin kaybı ile gamet kaybı daha da artar. Öyle ki, fetal insan overinde embriyonel hayatta yaklaşık 6 milyon olan oosit sayısı doğumda 1 milyona gerilemektedir (209). Germ hücre sinsityalarının oluşumundaki bozukluklar, birden fazla oosit içeren poliovular foliküllerin oluşumuna neden olabilir. Poliovular foliküllere birtakım TGF β ailesi mutasyonları gösteren (örn: INHA), granuloza hücreleri aktivin üretmeyen (210) ve oositlerinde BMP15 eksprese etmeyen (110) farelerde de rastlanmaktadır. İnsanda, poliovular foliküller doğumda görülebilmekle birlikte erişkinde nadir olarak görülürler (211). Oosit kaybının uygun folikül oluşumu için gerekli bir süreç olduğu ve oositlerin apoptozis yolu ile elimine edildikleri düşünülmektedir. Farelerde apoptozis ile ilgili genlerin ekspresyonundaki farklılıkların, folikül havuzunun miktarını etkilediğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Ancak memelilerde folikül oluşum basamaklarının aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (26).

2.2.2. Primordiyal Folikülün Aktivasyonu

Bir primordiyal folikül, mayozun profaz I aşamasında duraklamış bir oosit ve onu çevreleyen tek katlı yassı pregranuloza hücrelerinden oluşur. Primordiyal foliküller oluşuktan sonra primer folikülleri oluşturmak üzere özel olarak aktive edilmedikleri sürece yıllar boyu sessiz kalırlar. Bazı primordiyal foliküller dekadlar boyu sessiz beklerken bazılarının neden erken dönemde büyüme fazına girdiği bilinmezliğini korumaktadır. Ancak ilk olarak 1979 yılında Peters ve ark.'nın, büyüme fazına giren folikül sayısının toplam folikül rezervi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışması büyüyen foliküller, bekleyen foliküller ve ovaryan stroma arasında bazı sinyal yollarının olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (212). Primordiyal foliküldeki gelişim bir kez başlatıldığında, doğal eliminasyon süreci ya ovulasyona ya da atreziye gitme yolunda ilerler. Primordiyal folikül sayısı alt limite (yaklaşık 1000 folikül) ulaştığında ise ovaryan fonksiyonlar durur ve menapoz gerçekleşir (213).

Primordiyal folikülden primer foliküle geçilirken granuloza hücrelerinde yassıdan küboide doğru şekil değişikliği meydana gelir. Eş zamanlı olarak oosit çapında da artış olur. Primordiyal folikül uyarımı, ekstraovaryan hormonlardan bağımsız olması yönü ile folikülogenezin diğer aşamalarından farklıdır. In-vitro kültüre edilen over dokusunda da primordiyal folikül gelişimi spontan olarak başlayabilmektedir (214). Bu önemli özellik nedeniyle neonatal ovaryan kültürler, primordiyal folikül aktivasyonunda rol oynayan sinyal yollarının araştırılması için yaygın biçimde kullanılabilir (26).

Primordiyal folikülden primer foliküle geçişte rol aldığı düşünülen büyüme faktörü, hormon ve sitokinlerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu faktörler tarafından kullanılan moleküler sinyal yolları henüz tam olarak anlaşılabilir değildir. Primordiyal folikülden primer foliküle geçişi aktive ettiği bilinen faktörler KIT ligand (KITLG), basic platelet-derived growth factor (PDGFB), leukemia inhibitory factor (LIF), fibroblast growth factor 7/ keratinocyte growth factor (FGF7), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), BMP4 ve BMP7, insulin ve nötrofinlerdir (BDNF ve NGF). İnhibitör faktörler ise antimüllerian hormon (AMH), aktivin A ve stromal-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 4 (SDF-1/CXCL4)'dır. Ancak bu faktörlerin pek çoğu tek başına primordiyal folikül gelişiminin başlamasını aktive ya da

inhibe edememektedir. Bu nedenle aktivasyon sürecinin, inhibitör unsurların ve hızlandırıcı unsurların hassas bir dengesi yoluyla düzenlendiği düşünülmektedir (26).

2.2.3. Preantral Folikül Gelişimi

Foliküler aktivasyon gerçekleşmesi, folikül içerisinde bir grup değişimleri tetiklemektedir. Granuloza hücreleri (GH) küboid hale gelir ve daha hızlı bölünmeye başlar. GH oositin çevresini saran glikoprotein bir katman olan zona pelusidayı oluşturmak üzere protein üretmeye ve sekrete etmeye başlarlar. Oositlerin büyüme ve gelişimi, onlara destek sağlayan GH'nin artış ve farklılaşmasına sıkı biçimde bağlıdır. Oositten salınan GDF9 ve BMP15 gibi sinyaller oosit ile direk temas etmeyen GH'nin bölünmesini ve hayatta kalımını sağlar. KITLG membrana bağlı formdan sekrete edilen bir protein formuna dönüşür. Bilinmeyen bir mekanizma ile teka hücreleri farklılaşır (26).

Antral kavite oluşuncaya kadar FSH ve LH foliküler gelişim için gerekli değildir. Postnatal 4. günde, in-vitro ortamda, FSH ve LH olmaksızın primordiyal ve primer foliküllerden sekonder folikül geliştiği gösterilmiştir (215,216). Bağımsız kültür ortamlarında folikül gelişiminin aktivin A, keratinocyte growth factor ve fibroblast growth factor 7 (FGF7), KITLG, GDF9, GH ve IGF1 tarafından hızlandırıldığı gösterilmiştir. AMH ise folikül gelişimini inhibe etmektedir (26).

2.2.4. Transkripsiyon Faktörleri ve Erken Folikül Gelişimi

Folikülogenezin erken basamaklarının gerçekleşebilmesi için, ekspresyonu insanda germ hücre ya da oositlerle sınırlı olan birtakım transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç vardır. Bu faktörlerden ilk ortaya konulan FIGLA'dır (factor in the germline α). Figla^{-/-} fareler, primordiyal folikül oluşturamadıkları için sterildir. Figla geni zona pelusida genlerinin ekspresyonunu düzenleyen bHLH (basic helix-loop-helix) adlı transkripsiyon faktörünü kodlar (217). bHLH'yi kodlayan diğer genler Sohlh1 ve Sohlh2 genleridir. Bu genlerden herhangi birisi defektif olan dişi farelerde de postnatal oosit kaybına bağlı sterilitte görülür. Hem Sohlh1^{-/-}, hem de Sohlh2^{-/-} olan farelerde diğer bazı transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin de ovaryan ekspresyonunda azalma gözlenir. Bu genler, lim homeobox protein 8 (Lhx8), POU-type homeodomain-containing DNA-binding protein (Pou5f1; aynı zamanda Oct4 olarak bilinir), newborn

ovary homeobox (Nobox) ve Figla'dır. Nobox delesyonu yine postnatal oosit kaybı ve steriliteye neden olmaktadır ve bu gen ürününün direk olarak GDF9 ve Pou5f1'un ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir. Bu transkripsiyonel ağın, oosit gelişiminin kontrolünde ne şekilde etkileştikleri bilinmemekle birlikte, fare çalışmalarından edinilen kanıtlar bu transkripsiyon faktörlerinin herhangi birisinde ekspresyon bozukluğu olan kadınlarda POF gelişebileceğini göstermektedir (218).

FOXL2'yi kodlayan genlerin hasarlanması farelerde ve insanlarda folikül gelişim anomalilerine ve POF'a neden olmaktadır (103,151). *Foxl2* geni, gonadal gelişimin erken aşamalarında eksprese edilmekte ve gonadın over yönünde gelişimini desteklemektedir. *Foxl2* ekspresyonu olmayan overlerde Nr0b1 ve Wnt4 gen ekspresyonları artarken; Nr5a2, aromataz, Fst ve ApoA1 gen ekspresyonları azalmaktadır. Folikül gelişiminin ileriki aşamalarında görev alan ve FOXL2 tarafından aktivitesi düzenlenen diğer genler inhibin β B, Nr5a2, Srebf1, Ppargc1a, Cyp11a1 ve Star genleridir. Buradan, FOXL2'nin ovaryan embriyonel gelişimin yanı sıra postnatal dönemde overde somatik hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması için gerekli metabolik süreçlerde önemli rolü olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca, FOXL2'nin 402C→G missense mutasyonunun, ovaryan granuloza hücreli tümör gelişimi ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (218).

Forkhead box transcription factor family'nin diğer üyeleri de ovaryan fonksiyonlar üzerine etkilidir. Farelerde Foxo3 geninin tahribi, uygunsuz oosit aktivasyonuna, primordiyal foliküllerin büyüme havuzuna erken girmesine ve neticesinde POF'a neden olmaktadır. *Foxo3*'ün oositlerdeki artan ekspresyonu ise gelişen folikül sayısında azalmaya yol açmaktadır. PTEN, PI3K'nın negatif düzenleyicisi olduğu için PTEN'in uzaklaştırılması PI3K aktivitesinin artmasına ve AKT ve FOXO3'ün fosforilasyonuna neden olur. *Pten* geninin hasarı, *Foxo3*^{-/-} fare ile aynı fenotipin oluşumuna yol açar. Foliküller erken aktive olur ve oosit havuzu hızlı bir şekilde tüketilir. FOXO3'ün oosit aktivasyonunu baskımlarken kullandığı mekanizmalar ve hedef aldığı yapılar netlik kazanmamıştır. İnsanlarda henüz gösterilmemiş olmakla birlikte, FOXO3 geni mutasyonları nedeni açıklanamayan bazı POF vakalarının altta yatan nedeni olabilir (218).

Oosite eksprese edilen FOXO3'ün aksine FOXO1 insanlarda ve farelerde, gelişen foliküllerdeki granuloza hücrelerinde eksprese edilir. FOXO1 mutasyonu,

granuloza hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve metabolizması ile ilgili bazı genlerin ekspresyonunu etkileyebilmektedir (218).

2.2.5. Folikül Gelişimi ve Farklılaşmasında Yeni Mekanizmalar

2.2.5.1. FSH Sinyal Yolakları

Folikül gelişiminin erken aşamalarının çoğu FSH ve LH etkisinden bağımsız olsalar da FSH, granuloza hücre farklılaşması ve granuloza hücrelerinin foliküler gelişimi desteklemesi için gereklidir. FSH, adenilil siklaz dışında bazı farklı sinyal yolaklarını da etkilemektedir. Bunlar PI3K, RAS ve glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β)'dir. PI3K, AKT'nin fosforile olarak aktiflenmesine neden olur. Aktive olan AKT ise FOXO1'i fosforile ederek inaktif hale getirir. Granuloza hücrelerinde Pten ekspresyonunun hasarlanması PI3K'nın aktivasyonuna, bu da FOXO1'in fosforile olarak inaktif olmasına neden olur. Sonuçta granuloza hücrelerin büyümesi hızlanır. FOXO1, granuloza hücrelerinde yüksek miktarda eksprese olsa da PTEN protein seviyeleri son derece düşüktür. Bu nedenle PTEN dışında ya da PTEN ile birlikte başka faktörlerin de granuloza hücrelerinde PI3K yolağını kontrol ediyor olması muhtemeldir. Bunu destekleyen bir başka bulgu da Pten'in fare overlerinin somatik hücrelerindeki hasarının oositlerdeki hasarından daha farklı sonuçlara neden olmasıdır. Ayrıca, Pten genindeki mutasyonlar diğer dokularda tümör oluşumuna yol açarken granuloza hücrelerindeki Pten hasarı granuloza hücreli tümör oluşumuna yol açmamaktadır (218).

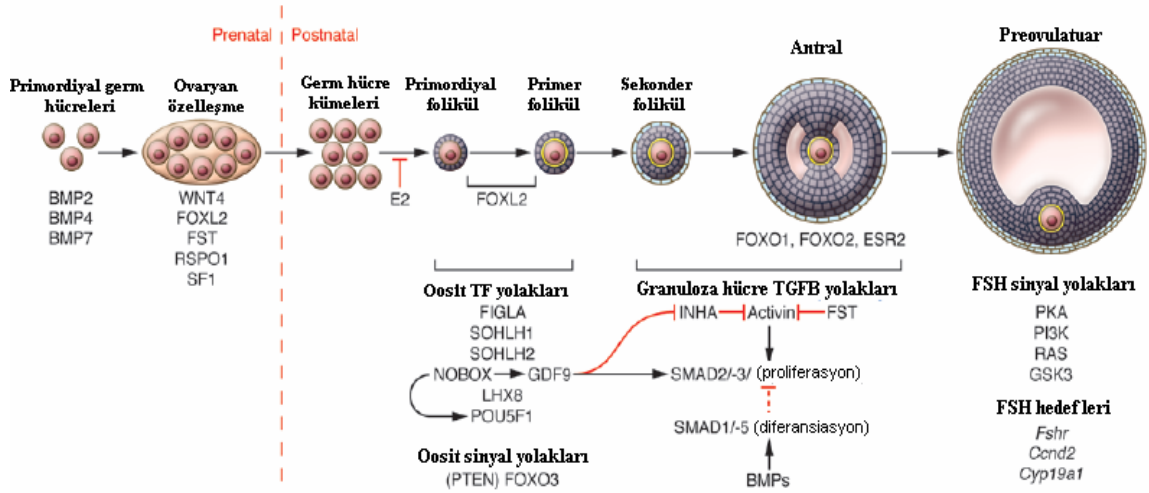
Foliküler gelişimin ileriki aşamalarında, aktivinler ve östrodiol FSH'nın etkilerine aracılık eder (219,220). Farelerde, aktivinlerin SMAD2/3 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerini aktive ederek, FSH tarafından indüklenen bazı genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. FSH, hücre siklusu düzenleyicisi olan CCND2'yi ve steroid enzim aromatazını kodlayan genleri indükler. Primer olarak östrojen reseptör β (ERS2) üzerinden etki eden östrodiol, fosfodiesteraz 1C aktivitesini baskılayarak FSH tarafından indüklenen cAMP seviyelerini artırır. Aktivinler granuloza hücre proliferasyonunu uyarır ve FSH etkisini artırır. Bu nedenle inhibin ile karşılanmadığı durumlarda aktivinler granuloza hücreli tümör büyümesini hızlandırırlar (218).

2.2.5.2 TGF β Ailesi

TGF β ailesinin reproduktif sistem üzerine geniş çaplı etkileri vardır. TG- β ailesi üyelerindeki bozukluklar fare modellerinde POF benzeri tablolara neden olmuştur.

Folistatin, TGF β ailesinin bağlandığı ekstrasellüler bir bağlanma proteindir. Folistatin, aktivine bağlanarak onun biyoyararlanımını azaltır. Folistatinin aşırı eksprese edildiği farelerde overlerin küçük olduğu ve yaş ilerledikçe bu farelerde infertilite geliştiği gözlemlenmiştir. Diğer taraftan folistatin geninin granuloza hücrelerine spesifik olarak inaktive edilmesi, folikül sayısında azalma, fertilizasyon bozuklukları, yüksek gonadotropin seviyeleri ve sonuç olarak infertiliteye neden olmaktadır. Bu fenotipin, POF fenotipi ile ileri derecede benzerlik göstermesi aktivin biyoaktivitesinin sıkı bir şekilde düzenlenmesinin, normal ovaryan fonksiyonların devamı için ne derece önemli olduğunu göstermektedir (221).

SMAD transkripsiyon faktörleri, TGF β ailesinin sinyal yollarında yer alan önemli hücre içi mediatörlerdir. Smad2 ve Smad4 granuloza hücre stoplazmalarında eksprese edilir. Smad3 ise granuloza hücre nükleusu, teka hücre nükleusu ve oositte eksprese edilir. Smad 3, ovaryan folikül gelişimi ve Bax, Bcl-2 gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir (222). SMAD4, TGF β ailesinin tüm üyelerinin sinyal yollarının düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu nedenle Smad4 geni mutasyonları, folikülogenezin pek çok basamağında duraklamaya ve infertiliteye neden olmaktadır. Smad4 knock-out farelerin overlerinde steroidogenez, ovulasyon ve kümülüs hücre defektleri izlenmekte; nihayetinde bu farelerde POF gelişmektedir (218). Şekil2.1’de folikül gelişimini kontrol eden sinyal yolları şematize edilmiştir.



Şekil 2.1: Farelerde ovaryan folikül gelişimini kontrol eden sinyal yolları (218).

2.3. Ovaryan Yaşlanma ve Oksidatif Stres

Etkin doğum kontrol yöntemlerinin 1960'lerden sonra ortaya çıkması ile özellikle batı toplumlarında aile başına düşen çocuk sayısı hızla azalmıştır (223). Bu şekilde kadınlar, eğitimlerini artırma ve iş gücüne etkin bir biçimde katılma olanağı bulmuşlardır. Bununla birlikte iş gücüne katılan kadınların çocuk sahibi olmayı ertelemesi nedeniyle, ilk çocuğu doğurma yaşlarında hızlı bir yükselme olmuştur (224).

Aylık fekundite (implante olmuş embriyo elde edimi) ovaryan yaşlanma sürecine bağlı olarak 30 yaşından sonra hızla düşmeye başlar (225). Amerika'da 1960'lerden günümüze total fertilité oranı kadın başına 2 çocuk azalmıştır (226). Gebe kalmanın ertelenmesinden dolayı her yıl artan oranda çift yardımcı üreme tekniklerine başvurmaktadır.

Reprodüktif yaşlanma sürecinde ovaryan korteksdeki oositlerin hem sayısında hem kalitesinde kademeli bir azalma meydana gelir. Fetal gelişimin 4. ayında overlerde granuloza hücreleri ile çevrili yaklaşık 6-7 milyon oosit bulunur. Hızlı bir apoptozis süreci sonucu doğumda sayıları sadece 1-2 milyona düşer (227). Doğumdan sonra hızlı kayıp süreci yavaşlar. Menarşa gelindiğinde overlerde yaklaşık 400.000 primordiyal folikül kalmıştır. Reprodüktif yaşlarda, 37 yaşından sonra tekrar hızlanana kadar sabit olarak aylık yaklaşık 1000 folikül kaybı gerçekleşir. Menapozda ise folikül sayısı 1000'in altına inmiştir (228).

Folikül sayısındaki azalmaya paralel bir süreç olarak, kalan oositlerin kalitesinde de azalma meydana gelir. Buna duruma, mayotik ayrılmama ve DNA hasarlarının zaman içinde oositte birikimi neden olmaktadır. Patoloji verilerine dayanan çalışmalarda folikül sayısının 25.000'in altına düştüğünde folikül kayıp hızının neredeyse ikiye katlandığı, buna da klinikte fertilitede hızlı bir düşüşün eşlik ettiği gösterilmiştir (209, 229). Bu gözleme dayanılarak, folikül sayısının 25.000 seviyesine düşmesinden menapoza kadarki sürenin sabit ve yaklaşık 13 yıl olduğunu öne süren 'fiks interval hipotezi' ortaya atılmıştır. Bu da, 40 yaşından önce menapoza giren kadınlarda subfertilitenin 30 yaşından önce ortaya çıkabileceği anlamına gelmektedir (209).

İnsan, diğer hayvan türlerine kıyasla subfertil bir türdür. Ortalama fekundite %20'dir ve yaşla birlikte düştüğü de göz önünde bulundurulursa bu değer gebelik deneyen pek çok çift için gebelik elde ediminin uzun aylar alabileceği anlamına gelmektedir (230). Subfertil (bir yılın sonunda canlı gebelik elde edemeyen) çiftlerin oranı, 20'li yaşlarda %4 iken; kadının 35 yaşından büyük olduğu durumda %10-20'dir. Folikül sayısında belirgin düşme olmasına rağmen siklus düzeni uzun süre korunurken aylık fekundite belirgin biçimde düşmeye devam etmektedir. Genelde folikül havuzundaki azalmanın kadın tarafından hissedilmesi siklus düzensizlikleri başladığında olur. Doğal fekunditenin sifıra yaklaştığı yaşlara kadar menstrüasyonların düzenli kalması kadının ovaryan yaşlanma sürecine kayıtsız kalmasına neden olmaktadır (224).

Artan ROS seviyelerine bağlı olarak oluşan hücrel hasarların birikimi insan sağlığı ile ilgili pek çok konuda olduğu gibi ovaryan yaşlanma sürecinde de etiyolojide suçlanan unsurların başında gelmektedir (7). ROS oosit maturasyonu sırasında steroidogenez, korpus luteum fonksiyonu, fertilizasyon, embriyo gelişimi ve gebeliğe kadar tüm reproduktif süreçlerde bir modulator olarak rol almaktadır (231). Yapılan çalışmalarda oosit, granuloza hücresi ve foliküler sıvıda, folikülogenezin tüm aşamalarında ROS ve major antioksidan enzimlerin ölçümü yapılmıştır (232,233). Hem insan çalışmalarında, hem de hayvan modellemelerinde primordiyal ve periovuluar foliküllerde yaşa bağlı olarak oksidatif stresde artış olduğu bildirilmiştir (234).

Yaşlı farelerin matür oositlerinde glutathion ve glutathion S transferaz seviyelerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (235). Yaşlı farelerde oral antioksidan

desteğinin yaşa bağlı oosit kalitesindeki düşüşü tolere etmekte etkili olduğu gösterilmiştir (236). Ancak, genç farelerde bu tedavi fertilitiyi olumsuz yönde etkilemiştir (237). Genç fare oositlerinde oluşturulan oksidatif stresin yaşlanma etkisine benzer biçimde mitokondriyal ATP üretimini azaltarak kromozomal iş stabilitesini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (238).

Oksidatif stresin endometriozis, polikistik over sendromu gibi bazı jinekolojik hastalıkların patogeneğinde rol oynadığını bildiren bazı çalışmalar vardır (239,231). Yapılan bir çalışmada ROS üretimindeki artışın ooforit ve POF oluşumu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (240). Oosit kalitesi ile foliküler sıvıdaki ROS seviyesi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Attaran ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, yüksek ROS seviyesinin IVF başarısını artırdığını bildirilirken diğer bir çalışmalarında foliküler sıvıdaki yüksek ROS seviyesinin oositin fertilizasyon potansiyelini azalttığı bildirilmiştir (241,242). Foliküler sıvıda ROS ihmal edilebilir düzeyde bulunmaktadır ve üretiminin hücresel süreçlere bağlı olarak özellikle de granuloza hücre proliferasyonu ile ilişkili olarak arttığı düşünülmektedir. Bazı yayınlarda belirtilen, yüksek ROS seviyelerinin artmış IVF başarısı ile ilişkisinin altında yatan muhtemel nedeni budur (234).

Artmış ROS seviyeleri, hem nDNA hem de mtDNA'da nükleotid varyasyonlarına neden olabilir. Spermatozoa ile kıyaslandığında, dişi germ hücresi ovarian kortekste, hipoksik koşullarda gelişmektedir ve suprafizyolojik ROS düzeyleri bu gelişimi olumsuz yönde etkilemektedir (239). Oositlerde diğer hücrelere kıyasla daha yüksek sayıda mtDNA kopyası bulundurur. Suprafizyolojik ROS düzeylerinin neden olduğu mitokondriyal DNA hasarı, ATP'nin hızla tükenmesine ve ROS seviyelerinin Ozawa etkisi ile daha da artmasına neden olabilir (243).

Kadınlarda ortalama menapoz yaşı asırlardır sabit kalma eğilimindedir. Menapoz yaşı, minor çevresel faktörler tarafından 1-2 yıl değiştirilebilmekle beraber asıl olarak genetik faktörlerin sıkı denetiminde tutulmaktadır. Günümüzde insan yaşam süresinin de genetik olarak belirlendiği kabul edilmektedir (244). Buna göre insanın genel yaşlanma ve reproduktif yaşlanma sürecinin oksidatif stres birikimine bağlı DNA hasarı ve apoptozise dayanan aynı biyolojik sürecin birer parçası olduğu ileri sürülmektedir. (7,8)

2.4. Oksidatif Stres ve DNA Hasarı

2.4.1. Oksidatif Stres Nedir?

Organizmada oksidan ajanların oluşumu ve ortadan kaldırılması bir uyum içerisinde gerçekleşir. Bu duruma oksidatif denge denir. Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile antioksidan sistemler arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres meydana gelir. Normal şartlarda hücreler oksidatif hasara karşı kendilerini bir takım enzimatik ve non-enzimatik mekanizmalar ile koruyabilirler.

Organizmada biyolojik fonksiyonlar için gerekli olan enerji, elektron taşıma zinciri vasıtası ile mitokondrilerde üretilir. Metabolik işleyiş içerisinde bu enerji sistemi, enerjinin yanı sıra hücresel hasara yol açabilecek reaktif oksijen türlerinin de oluşumuna katkıda bulunur.

Reaktif oksijen türleri (ROS) iyonize radyasyon ya da ultraviyole (UV) radyasyon nedeniyle de oluşabilir. Bunun yanında, ekzojen olarak marus kalınan bazı kimyasallar da hücrede redoks tepkimeleri sonrası oksijene aktarılarak süperoksit oluşumuna yol açabilirler. Sonuçta kaynağı ne olursa olsun ROS, DNA gibi hücresel biyomoleküller ile etkileşerek ciddi sonuçlar doğurabilecek modifikasyonlara sebep olabilir.

2.4.2. Oksidatif DNA Hasarı

Reaktif oksijen türleri (ROS), biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olan radikal ve non-radikal moleküllerin genel adıdır. Serbest radikaller, bir ya da daha fazla serbest elektron içeren, bu nedenle lipid, protein ya da DNA gibi biyomoleküllerin oksidasyonuna neden olabilen yapılardır (245). Radikal olmayan türler de bu tip reaksiyonlara aracılık edebilir. Pek çok molekül oksijen varlığında okside olur ve bu reaksiyonlardan süperoksit radikali açığa çıkar.

Serbest radikallerin oluşumundaki artış ya da ortadan kaldırılmasındaki aksaklıklar oksidatif strese artışa ve DNA hasarına neden olur. Reaktif oksijen türleri geçici ve kalıcı türden DNA hasarına neden olabilirler. Ancak süperoksit, nitrik oksit ve hidrojen peroksit, DNA ve RNA bazları ile önemli ölçüde etkileşime girmezler. Ancak hidroksil radikali DNA ile karşılaştığında şeker ve bazlar ile hızlı biçimde etkileşime

girer ve farklı DNA katımlarının oluşumuna yol açar (246). Hidroksil radikali, DNA bazlarının çift bağlarına eklenerek ve tiaminin metil grubu ya da 2-deoksiribozun C-H bağlarından hidrojen atomunu çıkararak DNA ile etkileşebilir. Hidroksilin C5-C6 çift bağlarına katılması, indirgeyici C5-OH ve yükseltgeyici C6-OH radikallerinin oluşumuna yol açmaktadır. Tiyaminden hidrojen atomu çıkarılmasıyla da allyl radikali oluşur. Bu ve benzer şekillerde oluşan modifiye baz ve şekerler DNA çapraz bağlarında da farklılaşmalara neden olurlar.

Oksidatif strese bağlı oluşan DNA lezyonlarının giderilmesi, mutagenезin ve sitotoksitenin önlenmesi açısından son derece önemlidir. Oksidatif DNA hasarları çok sayıda ve üst üste binen bazı onarım süreçlerine tabi tutulur. Belirli bir tamir sürecindeki bozukluklar o sürece spesifik lezyonların giderilememesine ve hasarın kalıcı olmasına neden olur.

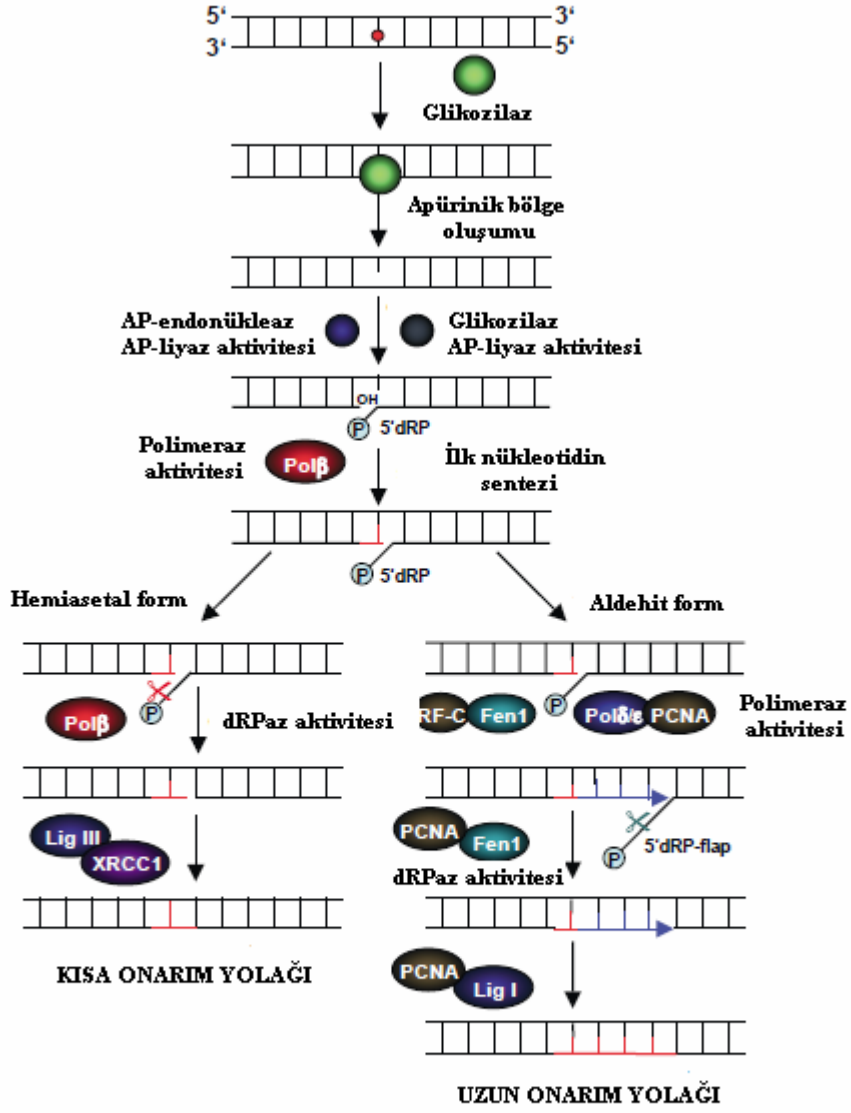
2.5. DNA Tamir Mekanizmaları

Herbir insan hücresinde günlük olarak yaklaşık 10.000 spontan oksidatif hasar meydana gelir. Eğer hücre bunları onaramazsa hücre ölümü, mutasyonlar ya da malign transformasyon ortaya çıkabilir. Genomu korumak için son derece etkin DNA tamir sistemleri vardır. Bu sistemler onardıkları lezyon tipine göre farklı süreçlere ayrılırlar. Tamir enzimlerinde bulunan ve etkinliğinin azalmasına yol açacak bir polimorfizm hücrenin, bu enzimin görev aldığı hasar türüne karşı duyarlanmasına yol açacaktır. Bu çalışmada polimorfizmleri araştırılan DNA tamir genleri, baz eksizyon onarımı (BER) ve nükleotid eksizyon onarımı (NER) mekanizmalarında görev almaktadırlar.

2.5.1. Baz Eksizyon Onarımı (BER)

Oksidatif süreçler sonucunda olduğu gibi tek bir DNA bazında meydana gelen hasarlar BER ile onarılır. BER'de ilk basamak, spesifik DNA glikozilazlar tarafından hasarlı veya yanlış bazların fark edilmesi ve uzaklaştırılmasıdır. Bu işlem sonucunda bir apürinik/apirimidinik bölge oluşur (AP). AP bölgesi, spontan olarak oluşabileceği gibi radyasyon ve kimyasallara maruziyet sonucu da oluşabilir. Bifonksiyonel glikozilazlar denilen bazı glikozilazların eş zamanlı apürinik/apiridinik liyaz aktivitesi vardır ve bunlar abazik rezidünün eksizyonu ile tek bir nükleotid boşluğu oluştururlar. Monofonksiyonel DNA glikozilazların ise liyaz aktivitesi yoktur. Onarım bu tür bir

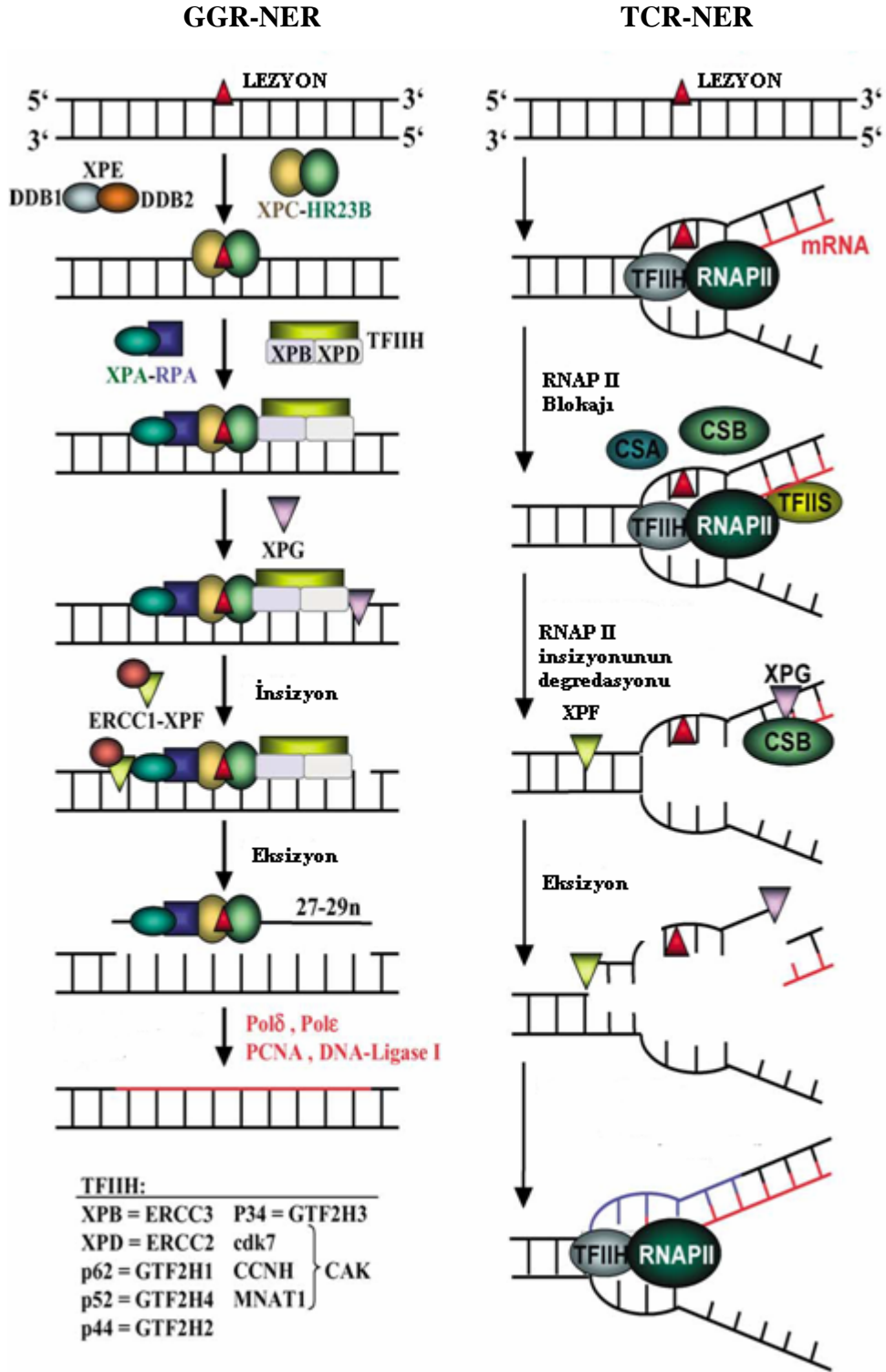
enzimle başlatıldığında sağlam apürinik/apiridinik tarafın 5' ucundaki fosfodiester bağları apürinik/apiridinik endonükleaz (APEX1) tarafından yıkılır (247). Fosfodiester bağlarının yıkımından sonra, BER süreci iki farklı alt yolda ilerleyebilir. Kısa yolda, lezyon bölgesine tek bir baz yerleştirilir. Uzun yolda ise, 2-7 nükleotid içeren oligonükleotidin yeniden sentezi yapılır. Boşluk, DNA polimeraz ve ligazlar tarafından doldurulur (248). BER süreci ayrıca XRCC1-PARP (PolyADP-riboz polimeraz) kompleksinin tek zincir kırıklarına bağlanması ile de başlatılabilir. BER proteinleri olmayan knock-out farelerin, embriyonal dönemde ölüyor olması bu onarım sürecinin ne denli önemli olduğunu göstermektedir (247).



Şekil 2.2: Baz eksizyon onarımı (BER) mekanizması (249).

2.5.2. Nükleotid Eksizyon Onarımı (NER)

NER mekanizması UV'ye bağlı pirimidin dimerleri gibi DNA çift sarmalını bozan pek çok türden hasarın tamirinde görev alır. DNA hasarının tespitinin ardından protein kompleksi hasarlı bölgeye bağlanır. Bunu hasarlı DNA kısmını içeren 24-32 rezidüden oluşan oligonükleotidin eksizyonu ve degradasyonu (uzaklaştırılması) izler. Son olarak oluşan boşluk DNA polimerazlarla doldurulur ve ligate edilir (250). NER süreci iki alt yoldan oluşur. Global genom onarımında (GGR-NER), DNA yapısını bozan lezyonlar açısından tüm genom taranır. Transkripsiyona bağlı onarım (TCR-NER) yolağı ise, RNA polimeraz II tarafından DNA lezyonu tanındığında aktive olur. Bu tip onarımda, genin transkripsiyona uğrayan zinciri transkripsiyona uğramayana göre daha aktif şekilde onarılır. TCR-NER, RNA polimeraz aktivitesini ve sonuçta transkripsiyonel aktiviteyi bozacak DNA lezyonlarının hızlıca onarılmasına odaklanmıştır (251).



Şekil 2.3: Nükleotid eksizyon onarımı (NER) mekanizması (249).

2.6. Oositte DNA Tamiri

Hücre siklusunda çok uzun süre bekleme halinde kalan bir hücrenin, DNA hasarlarını giderecek mekanizmalarının olmaması elbette şaşırtıcı olurdu (252). Nitekim, oositlerin DNA tamiri yapılabildiğini gösteren, in-vivo ve in-vitro çalışmalardan elde edilen pek çok direk ve indirek kanıt vardır.

Drosophila melanogaster overinde, yüksek doz X ışını (2 Gy) öncesinde düşük doz (0,02 Gy) X ışını verilmesinin, adaptif bir mekanizma ile DNA tamirini uyardığı gösterilmiştir (253). Farelerde yapılan benzer bir çalışmada bu kez, bir grup fareye 4 Gy radyasyondan 5 saat önce 0.02 Gy (alıştırıcı doz) radyasyon verilmiş, diğer gruba ise düşük doz verilmeden sadece 4 Gy radyasyon verilmiştir. Yüksek derecede radyosensitif olan matür oositlerde, öncesinde düşük doz ile uyarılan grupta kromozom hasarının sadece 4 Gy radyasyon verilen gruba göre daha az olduğu gösterilmiştir (254). Bu durum alıştırıcı düşük doz radyasyonun, DNA tamir enzimlerinin üretimini uyarmasına bağlanmış ve oositteki DNA tamirinin indirek bir kanıtı olarak kabul edilmiştir. Oositteki DNA tamirinin direk kanıtları, *Xenopus* over ekstraktında enzimatik tamirin gerçekleştiğinin gösterilmesi ile elde edilmiştir. Memelilerde ise fare oositlerinde, UV radyasyon sonrası yeni DNA sentezi başladığı gösterilmiştir (255). Sonrasında bir derleme çalışmasında, memeli oosit ve embriyolarında UV ve ilaç kullanımı sonrasında DNA sentezinde beklenmeyen bir artış görüldüğü ile ilgili yayınlar derlenmiştir (256). Mayotik maturasyon aşamasında ise oositlerdeki eksizyon onarım kapasitesinin bilinmeyen bir mekanizma ile azaldığı bildirilmiştir (257).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, mikroarray yöntemi ile fare oositlerinde DNA hasarına sekonder olarak DNA tamirinde rol alan genlerin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (258). Daha yeni bir çalışmada ise, insan oositlerinde reaktif oksijen radikallerine bağlı DNA hasarı sonrasında DNA tamir genlerinin ekspresyon profilleri incelenmiştir (259). Çalışmada oositlerde, serbest oksijen radikallerine maruziyet sonrası DNA tamirini düzenleyen mRNA düzeyleri ölçülmüştür. Bu çalışma ile oksidize olmuş bazların tanınması ve tamiri için gerekli DNA tamir mekanizmalarının oositlerde son derece aktif bir şekilde var olduğu ortaya konulmuştur. Diğer bir çalışmada, Rhesus maymununda DNA hasarını tanınması ve onarımında görevli 48 farklı mRNA'nın ekspresyon paternleri incelenmiştir. Mismatch onarım (MMR) ile ilişkili tüm mRNA'ların oosit ve embriyolarda eksprese olduğu; incelenen mRNA'lardan sadece

MLH1 mRNA'nın oosit matürasyonu sırasında ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (260). Ayrıca BER enzimlerini kodlayan mRNA'ların çoğunun, NER enzimlerini kodlayan mRNA'lardan da incelenen üç tanesinden tamamının eksprese olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak, memeli oositlerinin spontan ya da dış faktörlere maruziyete bağlı gelişen çeşitli tipteki DNA hasarlarını onarabildiğine ilişkin elde edilmiş çok sayıda bulgu vardır. Bu tamir kapasitesinin, oositin gelişim aşamasına göre değişim gösterdiği bilinmekle birlikte bu değişimin mekanizması ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (257).

2.7. DNA Tamir Geni Polimorfizmleri

2.7.1. Polimorfizm Nedir?

Polimorfizm, genetik bir kodun baz diziliminde olan varyasyonlara denir. Genel kural olarak kalıtsal bir varyasyonun polimorfizm olarak adlandırılabilmesi için allel frekansının genel populasyonda %1'den daha sık görülmesi gerekir. Daha az sıklıkta görülenler ise germline mutasyon olarak adlandırılır. Mutasyonlar, çoğu zaman ciddi hastalıklarla bağlantılı iken polimorfizmler genelde değildir. Polimorfizm ve genetik mutasyonlar canlının her hücresinde bulunan genetik kodda mevcuttur. Genetik kodda kalıtsal olmayan ve sonradan edinilen değişiklikler de meydana gelir. Bunlara somatik mutasyon denir ve sadece etkilenmiş olan dokuda bulunurlar. Bu nedenle somatik mutasyonlar mutant hücredeki klonal büyüme ile çoğalabilirler fakat sonraki nesillere aktarılmazlar.

Genetik polimorfizmlere insan genomunda sıkça rastlanır. En sık rastlanan polimorfizm tipi tek nükleotid polimorfizmidir (SNP). SNP'ler yaklaşık 300 baz çiftinde bir görülürler ve insan populasyonunda 10 milyon SNP olduğu düşünülmektedir. Özellikle ekzonlarda bulunan SNP'ler, aminoasit değişikliğine neden olarak bazı genlerin protein ürünlerinde farklılaşmaya yol açabilirler.

Polimorfizmlerin prevalansı, etnik gruplara göre büyük ölçüde farklılık gösterebilir. Bir polimorfizm için en sık görülen allel 'vahşi tip' allel olarak isimlendirilir. Vahşi tip allel, en sık görülen, diğer bir deyişle 'normal' allel olarak

kabul edilir; ancak populasyonlar arasındaki farklılıklardan dolayı bu durum her zaman geçerli değildir.

2.7.2. Polimorfizmin Önemi

Yeryüzündeki hayat ve evrim nadir olarak ortaya çıkan, ancak taşıyıcısına varlığını sürdürme ya da üremeye ilişkin avantaj sağlayan genetik varyasyonlar üzerine kurulmuştur. Bu varyasyonlar, gelecek nesillere aktarılarak onların da mevcut çevre koşullarında yaşama şanslarını artırır. Polimorfizm de bu varyasyonlardan biridir. Muhtemelen toplumdaki pek çok polimorfizmin ya çok az etkisi vardır ya da tamamen etkisizdir. Ancak bazı polimorfizimler ise, özel koşullarda avantaj sağlamaları nedeni ile yayılmaktadır.

DNA bağlanma bölgesi, enzimin substrat bağlanma bölgesi gibi protein fonksiyonlarının önem kazandığı kritik yerlerde aminoasit değişikliğine neden olan polimorfizmler kodlanan proteinin aktivitesini etkileyebilir. Özellikle de, yeni aminoasit orijinalinden üç boyutlu olarak ya da elektrik yükü olarak farklı ise bu durum kodlanan proteinin afinitesini, yapısını ve fonksiyonunu önemli ölçüde değiştirebilir (261). Örneğin DNA tamir genlerindeki bir polimorfizme bağlı oluşan DNA tamirindeki aksaklık, kalıcı hasara bağlı mutant DNA bazı oluşma riskini artırarak hücre ölümü ya da karsinogenik değişime neden olabilir (262).

2.7.3. Polimorfizmleri Araştırılan DNA Tamir Genleri

DNA hasarının onarımı, mutasyonların genomdan uzaklaştırılmasını ve mutajenik transformasyonun önlenmesini sağlar. DNA tamir genlerindeki fonksiyonel polimorfizmler toplumdaki bireylerin DNA tamir kapasiteleri arasındaki farklılığın sorumlusu olabilirler. Bu çalışmada birisi BER, diğeri NER mekanizmasında önemli roller üstlenen X-ray cross complementing group 1 (XRCC1) ve Xeroderma Pigmentosum complementation group D (XPD) genlerine ait toplam üç polimorfizm bölgesi incelenmiştir.

XRCC1 (X-ray cross complementing group 1) proteini genetik stabilite ve embriyonel sağ kalım açısından önemlidir. DNA tek zincir kırıkları ve endojen ve ekzojen oksidanlardan kaynaklanan baz hasarlarının onarılmasında görev alır. XRCC1, BER mekanizmasının koordinasyonunda görev alır ve en az üç farklı enzim ile

etkileşime girer: poly-ADP-riboz polimeraz (PARP), DNA ligaz III, ve DNA polimeraz B. XRCC1'in tamir kapasitesini etkileme potansiyeli olan, kodlanan bölgede yer alan üç polimorfizm bölgesi tariflenmiştir: Ekzon 6'da Arg194Tr, ekzon 10'da Arg399Gln ve ekzon 9'da Arg280His (263). Bu çalışmada, XRCC1'in bu üç polimorfizminden ilk ikisi araştırılmıştır. Her üç polimorfizm de aminoasit değişikliğine sebep olmaktadır. Arg399Gln polimorfizm bölgesi, XRCC1'in DNA zincir kırıklarını denetleyen PARP enzimi ile bağlanma bölgesine denk gelmesi nedeni ile DNA tamiri yönünden ayrı bir öneme sahiptir (264).

XPD (Xeroderma Pigmentozum complementation group D) geni, NER mekanizmasında görev alan bir DNA tamir genidir ve 19.kromozomun uzun kolunun 13.2 bölgesinde bulunur. Büyüklüğü 54,3 kb olup ve 23 ekzondan oluşur (265). Transkripsiyon ve onarım süreçleri TFIIH kompleksi yolu ile birbiri ile bağlantılı olarak çalışır. XPD proteini, transkripsiyonun başlatılmasında ve DNA onarımında NER mekanizmasında görev alan TFIIH bazal transkripsiyon faktörünün bir alt birimidir. XPD proteini, ATP bağımlı helikaz aktivitesi sayesinde transkripsiyon ve DNA onarımı sırasında DNA sarmalını 5'→3' yönünde açar (266). Bu nedenle, XPD genindeki hasarlar ve mutasyonlar DNA tamirini bozmanın yanı sıra transkripsiyonun da bozulmasına neden olur. XPD geninde, 199. kodonda (Ile-Met) 312. kodonda (Asp-Asn) ve bu çalışmada araştırılan 751. kodonda (Lys-Gln) polimorfizmleri tariflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Çalışmaya, 25 POF hastası ve 25 kontrol olmak üzere toplam 50 kadın dahil edildi.

Hasta grubuna dahil edilme kriterleri:

1. Sekonder amenoreli hastalar için; 40 yaş altında olup en az 6 ay boyunca adet görmemiş olmak ve en az 1 ay ara ile bakılan iki serum örneğinde FSH \geq 40mIU/ml olması
2. Primer amenoreli hastalar için; en az 1 ay ara ile bakılan iki serum örneğinde FSH \geq 40mIU/ml olması ve karyotip analizinin normal (46,XX) olması
3. Geçirilmiş kanser tedavisi (KT veya RT) öyküsü olmaması
4. Geçirilmiş ovaryan cerrahi öyküsü olmaması
5. Metabolik veya otoimmün hastalık öyküsü olmaması, olarak belirlendi.

Hasta ve kontrol grubundaki kadınların ayrıntılı olarak jinekolojik hastalık ve aile öyküsü alınmış, muayeneleri ve jinekolojik ultrasonografileri rutin olarak yapılmıştır. Hastaların yaş, menarş yaşı, menapoz yaşı, amenore süreleri, medeni durumu, ailede erken menapoz öyküsü (anne ve kız kardeş), gebelik öyküsü bilgileri kayıt altına alınmıştır.

Bu çalışma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'na başvurularak gerekli onay alınmış (protokol no:2011/107) ve çalışmada kullanılan kitlerin maliyeti İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından karşılanmıştır (protokol no:2011/165).

Çalışmaya katılan tüm hastalara çalışma hakkında bilgi verilmiş ve hem sözlü hem de yazılı olarak aydınlatılmış onamları alınmıştır.

3.2 DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen bireylerden bir adet EDTA'lı tüpe 2 ml kan alındı. DNA izolasyon kiti (High Pure PCR Template Preparation kit, Roche Diagnostic, Germany) kullanılarak periferik kandaki lökositlerden DNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen DNA -20 C'de saklandı.

3.3 Florasan Bazlı Erime Eğrisi Analizi ile Genotipleme

Polimorfizmlerin tespiti bir LightCycler-System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile floresan işaretli hibridizasyon problemleri kullanılarak erime eğrisi analizi ile yapıldı.

Reaksiyon karışımı;

H ₂ O	10.8 µl
FastStartDNA Master	2.0 µl
Reagent mix	1.0 µl,
MgCl ₂ (25 µM)	1.2 µl
Genomik DNA	5 µl

içercek şekilde toplam 20 µl hacminde hazırlandı ve kapillerlere aktarıldı.

PCR programı;

95 °C’de 10 dk

95 °C’de 10 sn

60 °C’de 10 sn 45 döngü

72 °C’de 15 sn

Erime eğrisi analizi 95 °C’de 20 sn başlangıç denatürasyonu, 40 °C’de 20 sn takip, ardından 85 °C’ye kadar 0.2 °C/sn hızında yavaş ısıtma ve sürekli floresan tespiti şeklinde gerçekleştirildi. Floresan/sıcaklık negatif türevinin sıcaklığa göre çizilmesiyle erime eğrileri, erime tepelerine dönüştürüldü. Herbir amplifikasyon setinde DNA kalıbı yerine su bulunan, bunun dışında tüm ajanları içeren negatif bir kontrol bulunmakta idi. Erime eğrileri iki ayrı uzman tarafından değerlendirildi. Genotiplendirme, LightSNiP (TIB-MolBiol, Berlin, Germany) tiplendirme ölçüm kiti kullanılarak, LightCycler 2.0 Real-Time polimeraz zincir reaksiyon (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) sisteminde uygun koşullar optimize edilerek yapıldı.

3.4 İstatistiksel Değerlendirme

Tüm veriler Statistical Package for Social Science Software (SPSS, Inc, IL, USA) 11.0 paket programına girilerek kodlandı. POF ve kontrol grubuna ait genotip ve allel dağılımlarının karşılaştırılmasında ki-kare testi, Fisher kesinlik testi ve çok gözlü ki-kare testi kullanıldı. İki gruba ait ortalamalar arasındaki farkın karşılaştırılmasında parametrik veriler için Student’s t-test, non-parametrik veriler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızın hasta grubuna İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D Polikliniği'ne başvuran ve prematür ovaryan yetmezlik tanısı konulan 25 hasta dahil edildi. Hastalardan 3 tanesi primer amenore diğer 22'si ise sekonder amenore öyküsüne sahipti. Kontrol grubuna ise fizyolojik olarak doğal yaş aralığında menapoza girmiş, ortalama menopoz yaşı 48 ± 4.6 (43-54) olan 5 kadın ve reproduktif çağda, düzenli menstruasyon öyküsü olan ve hormonal kontraseptif yöntem kullanmayan 20 kadın olmak üzere toplam 25 kadın dahil edildi. POF grubundaki hastaların ortalama yaşı 27.8 ± 6.8 (17-39), kontrol grubunun ortalama yaşı 36.6 ± 11.3 (21-64) olarak tespit edildi. POF grubundaki hastaların ortalama FSH değeri 65.6 ± 27.4 (146.1-42.1) idi. Kontrol grubundaki, düzenli adet gören bireylerin yaş ortalaması 32.1 ± 7.5 (21-48), ortalama FSH değeri 7.6 ± 2.2 (2.6-6.9) olarak tespit edildi. POF grubundaki otuz yaşın altındaki hastalara yapılan karyotip analizi sonuçlarının $46,XX$ ile uyumlu olduğu görüldü.

XPD-Lys751Gln, XRCC1-Arg194Trp ve XRCC1-Arg399Gln polimorfizm bölgeleri için POF ve kontrol grubunun birey bazında genotipleri Tablo 4.1a ve Tablo 4.1b'de verilmiştir.

Tablo 4.1a: XPD-Lys751Gln, XRCC1-Arg194Trp ve XRCC1-Arg399Gln polimorfizm bölgeleri için POF grubunun birey bazında genotip dağılımı

POF	XPD Lys751Gln	XRCC1 Arg194Trp	XRCC1 Arg399Gln
1	AC	CT	GA
2	AC	CC	GA
3	AC	CC	GG
4	AA	CC	GG
5	AA	CT	GG
6	AA	CT	GG
7	AA	CC	GG
8	AC	CT	GG
9	AC	CC	GA
10	AA	CT	GG
11	AC	CC	GG
12	AC	CC	GA
13	AC	CC	GA
14	AA	CC	GA
15	AA	CC	GA
16	AA	CC	GA
17	AC	CT	GA
18	AC	CT	GA
19	AA	CC	GA
20	AA	CC	GG
21	AA	CC	GA
22	AA	CC	GA
23	AC	CT	GG
24	AC	CC	GA
25	AA	CT	GA

Tablo 4.1b: XPD-Lys751Gln, XRCC1-Arg194Trp ve XRCC1-Arg399Gln polimorfizm bölgeleri için kontrol grubunun birey bazında genotip dağılımı

KONTROL	XPD Lys751Gln	XRCC1 Arg194Trp	XRCC1 Arg399Gln
1	AC	CC	GA
2	AC	CC	GA
3	AA	CT	GA
4	AC	CC	GA
5	AC	CC	GA
6	AC	CC	GA
7	AA	CC	AA
8	AC	CC	GA
9	AC	CC	AA
10	AC	CC	GG
11	AC	CC	GG
12	AC	CC	GA
13	AC	CC	GA
14	AC	CT	GG
15	CC	CC	GG
16	AA	CC	GG
17	AC	CT	GG
18	AC	CT	GG
19	AC	CC	GA
20	AC	CC	GA
21	AC	CC	GG
22	AA	CT	GA
23	AA	CC	GG
24	AC	CC	GG
25	AA	CC	GG

4.1.XPD-Lys751Gln

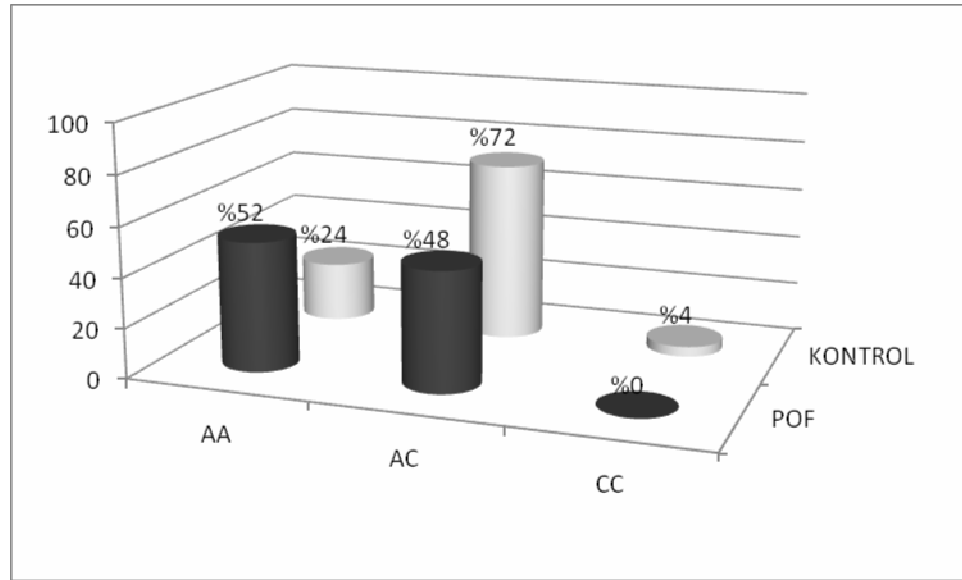
XPD geninin Lys751Gln polimorfizm bölgesinin POF ve kontrol grubu için genotip ve allel dağılımı Tablo 4.2’de verilmiştir. Buna göre, Lys/Lys genotipi POF grubunda %52, kontrol grubunda %12; Lys/Gln genotipi POF grubunda %48, kontrol grubunda %40; Gln/Gln genotipi POF grubunda görülmezken, kontrol grubunda %48 oranında görüldü. Lys allel frekansı POF grubunda %76, kontrol grubunda %60; Gln allel frekansı POF grubunda %24; kontrol grubunda %40 olarak belirlendi. Bireylerin Lys alleli taşıma yüzdeleri POF grubundakiler için %100, kontrol grubundakiler için %96

idi. Gln alleli taşıma açısından bakıldığında, POF grubundakilerin %48'inin, kontrol grubundakilerin ise %76'sının Gln alleli taşıdığı görüldü.

Tablo 4.2: XPD-Lys751Gln için genotip ve allel dağılımı.

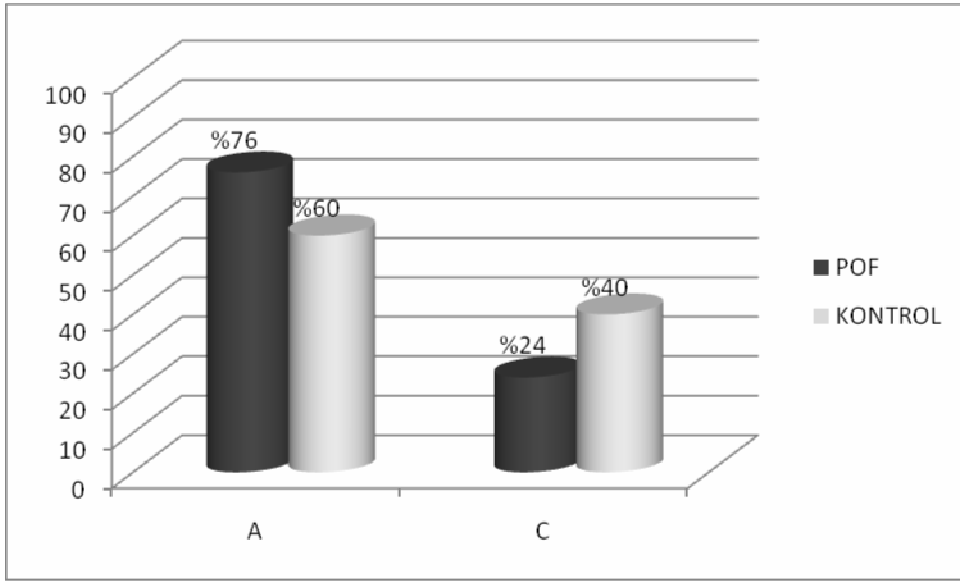
	POF (N)	%	KONTROL (N)	%	P
XPD 751					
AA	13	52	3	12	P=0.092
AC	12	48	10	40	
CC	0	0	12	48	
ALLEL FREKANSI					
A (<i>Lys</i>) ALLEL	38	76	30	60	P=0.086
C (<i>Gln</i>) ALLEL	12	24	20	40	
ALLEL TAŞIMA					
AA+AC	25	100	24	96	P=1.000
CC+AC	12	48	19	76	P=0.041

Şekil 4.2'de şematize edilen genotip dağılımları açısından POF ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (P=0.092).



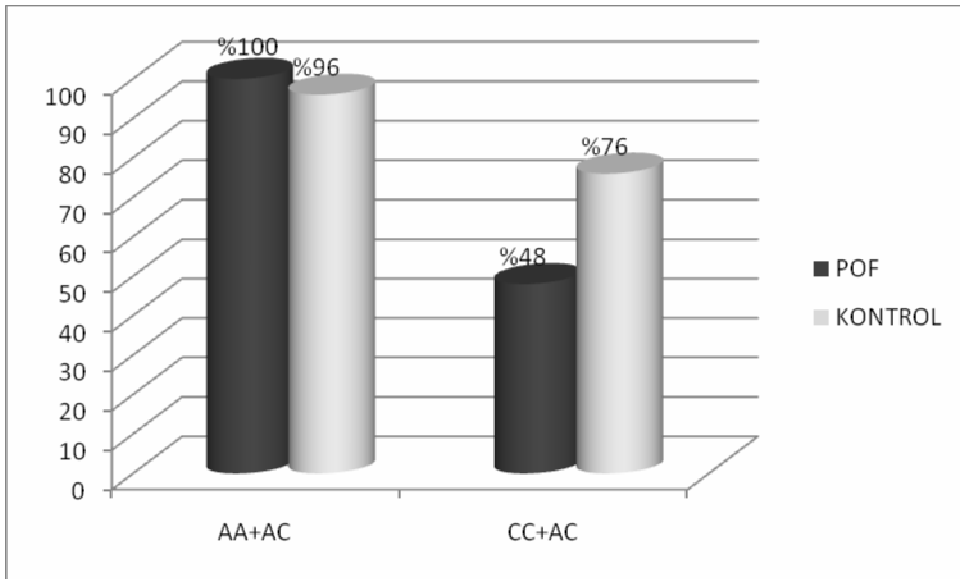
Şekil 4.1: XPD-Lys751Gln için POF ve kontrol gruplarında genotip dağılım yüzdeleri

POF ve kontrol gruplarında, toplam allellerin içerisinde sırası ile A (*Lys*) ve C (*Gln*) allellerinin oranları Şekil 4.2'de gösterilmiştir. POF ve kontrol grubu arasında allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P=0.086).



Şekil 4.2: XPD-Lys751Gln için A (*Lys*) ve C (*Gln*) allel frekansları

Şekil 4.3’de POF ve kontrol gruplarındaki bireylerin sırası ile, homozigot ya da heterozigot olsun, A (*Lys*) alleli ve C (*Gln*) alleli taşıma yüzdeleri gösterilmiştir. A (*Lys*) alleli taşıma açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=1.000$). POF grubunda C (*Gln*) alleli taşıma yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P=0.041$).



Şekil4.3: POF ve kontrol gruplarındaki bireylerin A (*Lys*) ve C (*Gln*) allellerini bulurdurma yüzdeleri

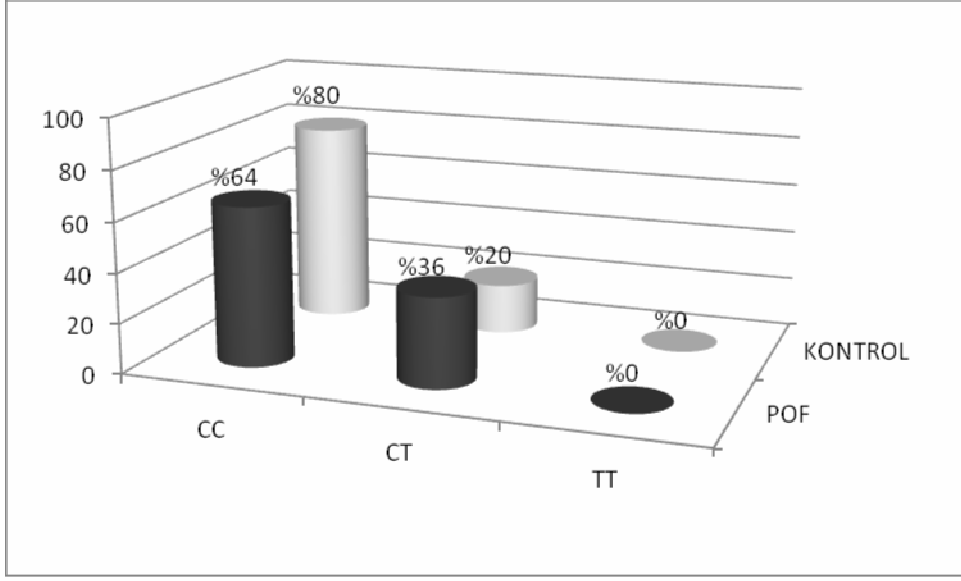
4.2. XRCC1-Arg194Trp

XRCC1 geninin Arg194Trp polimorfizm bölgesinin POF ve kontrol grubu için genotip ve allel dağılımı Tablo 4.3’de verilmiştir. Buna göre, Arg/Arg genotipi POF grubunda %64, kontrol grubunda %80; Arg/Trp genotipi POF grubunda %36, kontrol grubunda %20 oranında görüldü. Trp/Trp genotipine ise ne POF ne de kontrol grubunda rastlanmadı. Arg allel frekansı POF grubunda %82, kontrol grubunda %90; Trp allel frekansı POF grubunda %18; kontrol grubunda %10 olarak belirlendi. Hem POF hem de kontrol grubundaki bireylerin tamamı Arg alleli taşımakta idi. Trp alleli taşıma açısından bakıldığında, POF grubundakilerin %36’sının, kontrol grubundakilerin ise %20’sinin Trp alleli bulundurduğu görüldü.

Tablo 4.3: XRCC1-Arg194Trp için genotip ve allel dağılımı.

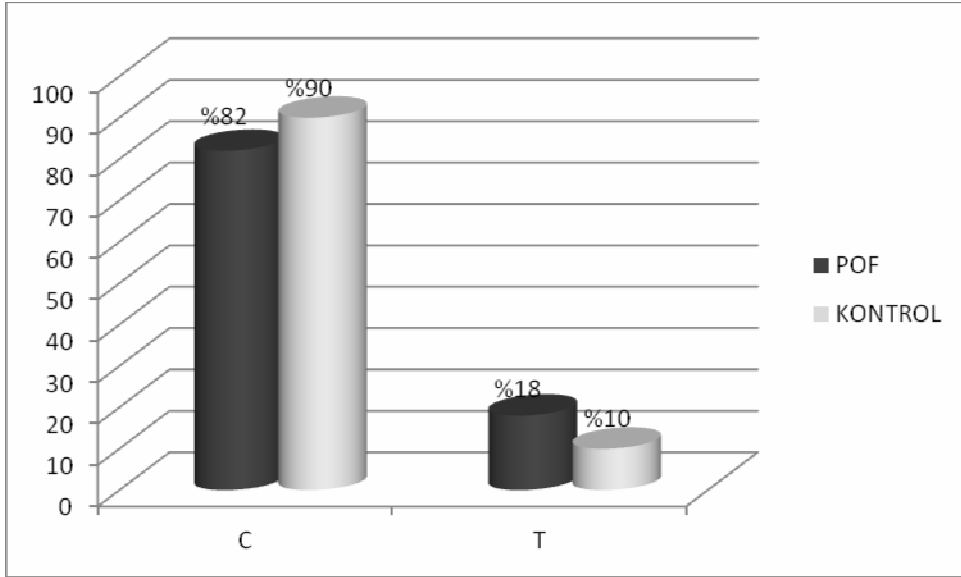
	POF (N)	%	KONTROL (N)	%	P
XRCC1 194					
CC	16	64	20	80	P=0.208
CT	9	36	5	20	
TT	0	0	0	0	
ALLEL FREKANSI					
C (<i>Arg</i>)ALLEL	41	82	45	90	P=0.249
T (<i>Trp</i>)ALLEL	9	18	5	10	
ALLEL TAŞIMA					
CC+CT	25	100	25	100	
TT+CT	9	36	5	20	P=0.208

Şekil 4.4’de şematize edilen genotip dağılımları açısından POF ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (P=0.208).



Şekil4.4: XRCC1-Arg194Trp için POF ve kontrol gruplarında genotip dağılım yüzdeleri

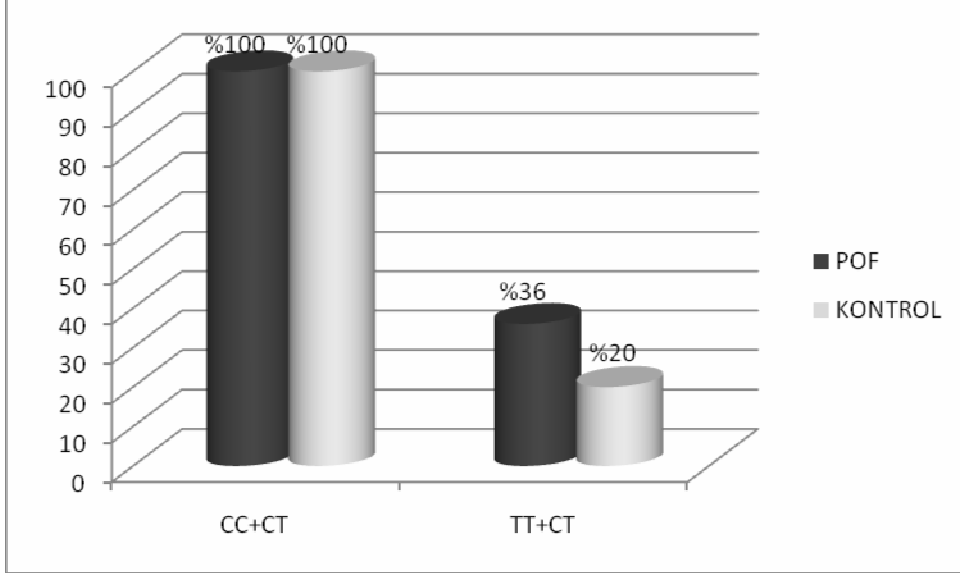
POF ve kontrol gruplarında, toplam allellerin içerisinde sırası ile C (*Arg*) ve T (*Trp*) allellerinin oranları Şekil 4.5’de gösterilmiştir. POF ve kontrol grubu arasında allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=0.249$).



Şekil4.5: XRCC1-Arg194Trp için C (*Arg*) ve T (*Trp*) allel frekansları

Şekil 4.6’da POF ve kontrol gruplarındaki bireylerin sırası ile, homozigot ya da heterozigot olsun, C (*Arg*) alleli ve T (*Trp*) alleli taşıma yüzdeleri gösterilmiştir. A

(Lys) alleli taşıma açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. C (Gln) alleli taşıma açısından da POF ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (P=0.204).



Şekil 4.6: POF ve kontrol gruplarındaki bireylerin C (*Arg*) ve T (*Trp*) allellerini bulurdurma yüzdeleri

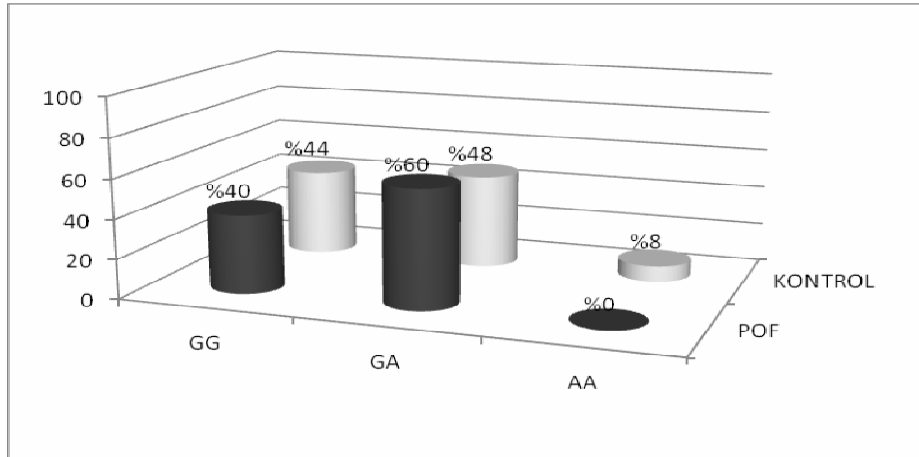
4.3. XRCC1-Arg399Gln

XRCC1 geninin Arg399Lys polimorfizm bölgesinin POF ve kontrol grubu için genotip ve allel dağılımı Tablo 4.2’de verilmiştir. Buna göre, Gln/Gln genotipi POF grubunda görülmezken, kontrol grubunda %8 oranında görüldü. Arg/Gln genotipi POF grubunda %60, kontrol grubunda %48; Arg/Arg genotipi POF grubunda %40, kontrol grubunda %44 oranında görüldü. Gln allel frekansı POF grubunda %30, kontrol grubunda %32; Arg allel frekansı POF grubunda %70; kontrol grubunda %68 olarak belirlendi. Bireylerin Gln alleli taşıma yüzdeleri POF grubundakiler için %60, kontrol grubundakiler için %56 idi. Arg alleli taşıma açısından bakıldığında, POF grubundakilerin tamamının, kontrol grubundakilerin ise %92’sinin Arg alleli taşıdığı görüldü.

Tablo4.4: XRCC1-Arg399Gln için genotip ve allel dağılımı

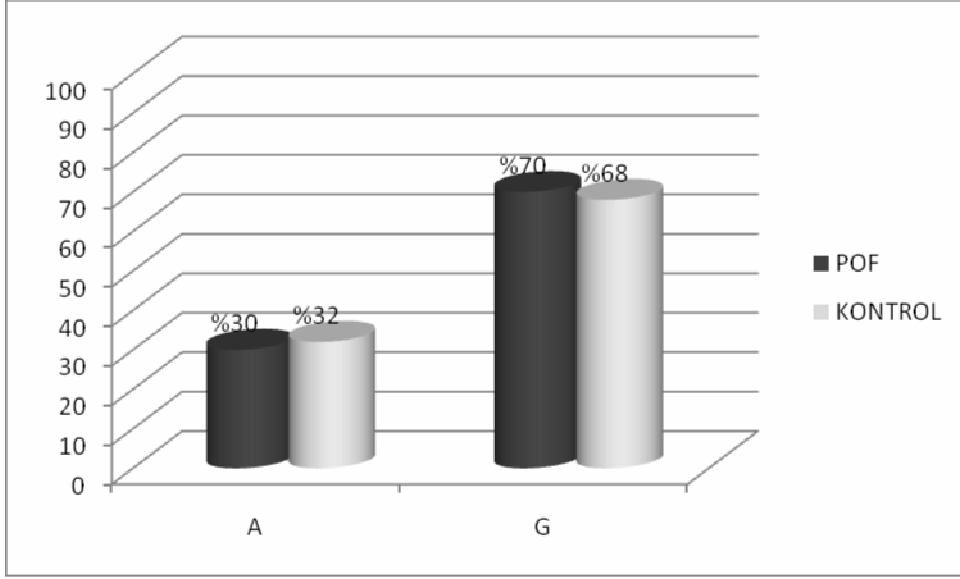
	POF (N)	%	KONTROL (N)	%	P
XRCC1 399					
AA	0	0	2	8	P=0.304
GA	15	60	12	48	
GG	10	40	11	44	
ALLEL FREKANSI					
A (<i>Gln</i>)ALLEL	15	30	16	32	P=0.829
G (<i>Arg</i>)ALLEL	35	70	34	68	
ALLEL TAŞIMA					
AA+GA	15	60	14	56	P=0.774
GG+GA	25	100	23	92	P=0.490

Şekil 4.7’de şematize edilen genotip dağılımı açısından POF ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (P=0.304).



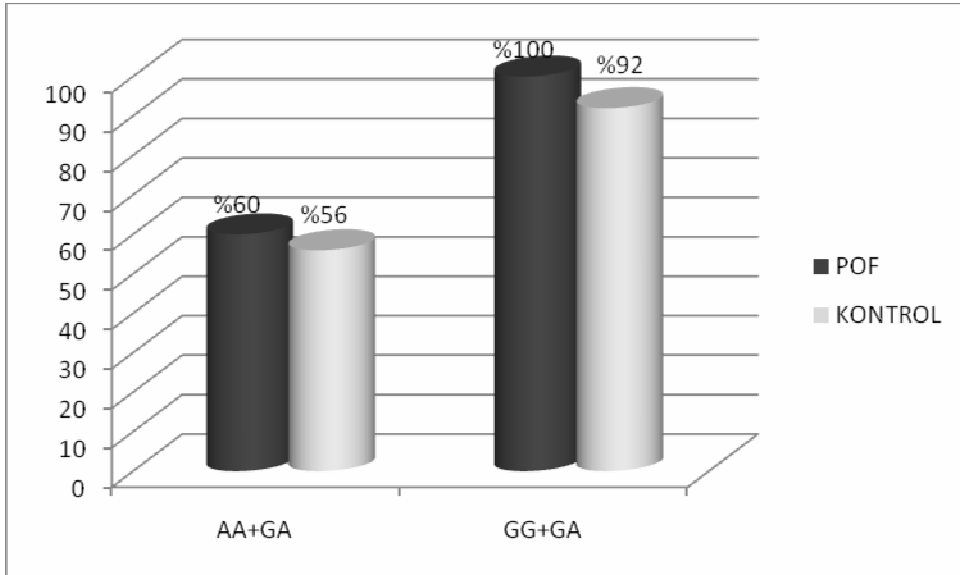
Şekil 4.7: XRCC1- Arg399Gln için POF ve kontrol gruplarında genotip dağılım yüzdeleri

POF ve kontrol gruplarında, toplam allellerin içerisinde sırası ile A (*Gln*) ve G (*Arg*) allellerinin oranları Şekil 4.8’de gösterilmiştir. POF ve kontrol grubu arasında allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P=0.829).



Şekil 4.8: XRCC1- Arg399Gln için A (*Gln*) ve G (*Arg*) allel frekansları

Şekil 4.9’da POF ve kontrol gruplarındaki bireylerin sırası ile, homozigot ya da heterozigot olsun, A (*Gln*) alleli ve G (*Arg*) alleli taşıma yüzdeleri gösterilmiştir. A (*Gln*) alleli taşıma açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=0.774$). G (*Arg*) alleli taşıma açısından POF ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=0.490$).



Şekil 4.9: POF ve kontrol gruplarındaki bireylerin A (*Gln*) ve G (*Arg*) allellerini bulurdurma yüzdeleri

5. TARTIŞMA

XRCC1 ve XPD DNA tamir genlerinde tariflenen tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) içerisinde, bu çalışmada araştırdığımız XPD'nin Lys751Gln; XRCC1'in ise Arg194Trp ve Arg399Gln; polimorfizmlerinin DNA tamir kapasitesinde değişikliğe neden olduğu önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur (267,268). DNA tamir kapasitesindeki değişikliklerin foliküllerin apoptozis hızını etkileyebileceği hipotezinden yola çıkarak bu çalışmamızda bu polimorfizmler ile POF arasında nedensel bir ilişki olup olmadığını incelemeyi amaçladık. DNA tamir genlerindeki bazı polimorfizmlerin, başta kanserler olmak üzere pek çok hastalıkla ilişkisi araştırma konusu olmuştur. Ancak çalışmamız, prematür ovaryan yetmezlik ile DNA tamir genlerinin ilişkisini inceleyen literatürdeki ilk çalışma olma özelliğindedir.

İç ve dış etkenler, DNA'da mutasyon veya hasara neden olabilmektedir. Mutasyonlar, nükleotid dizilimindeki delesyon, insersiyon ya da yer değiştirmelere bağlı meydana gelen ve anormal ya da disfonksiyonel proteinlerin oluşumuna neden olabilen değişikliklerdir. DNA hasarı ise, DNA'nın çift sarmal yapısında meydana gelen fiziki ya da kimyasal değişiklikleri ifade etmektedir. Diğer bir deyişle, mutasyonlar DNA molekülünün bilgi içeriğini değiştirirken, DNA hasarı onun moleküler yapısını değiştirmektedir. Yaşlanma ile ilgili geçmişte öne sürülen teorilerde DNA mutasyonları üzerinde durulmuştur. DNA hasarları da mutasyonlara neden olabildiğinden, yaşlanmayı daha geniş bir pencerede ele almak adına, günümüzde DNA hasarı ve yaşlanma ilişkisi üzerinde daha çok durulmaktadır (269).

DNA hasarlayıcı ajanlar hakkında göz önünde bulundurulması gereken diğer bir şey, bunların DNA dışında farklı bazı hücrel yapıları da hedef aldıklarıdır. Örneğin

alkilleyici ajanlar, mitojen aktive protein (MAP) kinaz yolağı aracılığı ile DNA hasarından bağımsız olarak apoptozise yol açan hızlı bir hücrenel cevap oluşturur (270). Öyleyse, apoptozis sürecinde DNA hasarının rolü ne ölçüde vardır?

Genotoksinlere bağlı apoptozisin büyük oranda DNA hasarına bağlı olduğu görüşünü destekleyen üç grup kanıt vardır (271):

Bunlardan birincisi, DNA onarımı olmayan hücrelerde görülen hipersensitif apoptotik cevaptır. Neredeyse DNA tamir defekti gösteren tüm hücre serilerinde genotoksinlerin sitotoksik etkilerine karşı aşırı derecede hassasiyet ve artmış apoptotik cevap görülür. Bu etki nükleotid eksizyon onarımı (NER), baz eksizyon onarımı (BER), DNA çift zincir kırığı onarımı ve çapraz bağ onarımı defekti gözlenen mutantlarda gösterilmiştir (249).

Diğer bir kanıt, DNA ya sokulan modifiye nükleotid öncüllerinin apoptozisi indüklemesidir. Herpes simpleks virüsünün timidin kinaz geni ile transfektede edilmiş, HSV timidin kinaz eksprese eden hücrelerin diğer hücelere göre gansiklovirin sitotoksik etkilerine karşı daha hassas oldukları gösterilmiştir. Bu hassasiyet apoptozisin potent bir şekilde indüklenmesinden kaynaklanmaktadır (272). Bu sistem, replikasyon sırasında DNA'da bulunan tek bir modifiye bazın apoptozisi tetikleyebileceğini göstermektedir (271).

Genotoksinlere bağlı apoptozisin, büyük oranda DNA hasarından kaynaklandığı görüşünü destekleyen kanıtların üçüncüsü, DNA çift zincir kırıklarına neden olan enzimlerin yeni bazı yöntemlerle hücre içerisine sokulması ile elde edilmiştir. Bu hücrelerde oluşan çift zincir kırıkları hücrelerde nekrozu tetiklemezken apoptozisi tetiklemektedir (273)

DNA hasarına bağlı yaşlanma teorisi, yaşa bağlı olarak gerçekteşen fonksiyonel gerilemeyi doku hemostazını bozan ve hücrenel değişikliklere neden olan DNA hasarlarının birikimine bağlamaktadır (274,275). Diğer moleküllerdeki hasarlanmalar da yaşlanma sürecine katkı yapabilmektedir. Ancak DNA, yenilenebilir olan diğer hücre yapıları ile kıyaslandığında, hücre yaşamı boyunca varlığını sürdürmesi gereken bir moleköl olması nedeni ile farklı bir öneme sahiptir (276). DNA hasarı, hasarın tipi ve etkilenen genom bölgesine göre farklı etkilere neden olabilir. DNA hasarı, gen

ekspresyonlarının ve hücrel fonksiyonların bozulmasına, transkripsiyon bozukluklarına, hücre döngüsünün durmasına ve daha ciddi hasarlanma durumunda programlanmış hücre ölümüne (apoptozis) neden olabilir. DNA hasarı sonrası meydana gelen DNA onarımı, mutasyonlara neden olabilir. Bu nedenle DNA hasarı teorisi, hasarın mutasyonel ve hücrel etkileri açısından farklı şekillerde ele alınabilir (269)

Hücrel DNA'nın (nDNA) yanı sıra mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarının da yaşlanma sürecinde önemli olduğu bildirilmiştir. mtDNA, histon proteinleri ile sarılı olmadığından ve mitokondriyal membrandaki ROS üretim bölgesi ile yakınlığından dolayı nDNA'ya oranla çok daha hasara açık durumdadır. Ayrıca DNA tamir mekanizmaları mitokondride daha az etkindir. Bununla birlikte mtDNA sadece 37 gen kodlamaktadır ve yaşlanma sürecindeki yeri ile ilgili nDNA'ya göre daha az kanıt elde edilebilmiştir (277).

Luteinize granuloza hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, 38 yaşın üzerindeki kadınlarda bu hücrelerin sayısının azaldığını, daha az steroid ve glikoprotein sentezleyebildiğini ve daha fazla mtDNA kırıkları içerdiklerini ve antioksidan enzim ekspresyonlarının azaldığını ortaya koymuştur (234). Yaşlı kümülüs hücrelerinde, oositin apoptozis sürecinde ikincil mesajcı olarak görev alan seramid sentezinin artması, folikül yaşlanması sürecinde somatik kompartmanın etkinliğini ortaya koymaktadır (278).

Foliküler gelişimin erken evreleri yeterince incelenmediğinden yaşa bağlı değişikliklerin ne zaman ve nasıl başladığı henüz netlik kazanmamıştır. İmmatür ovaryan foliküllerdeki atreziye eşlik eden morfolojik değişiklikler deBruin ve ark.'nın ortalama yaşı 40.8 olan, tubal sterilizasyon için laparoskopi yapılan sağlıklı kadınların over biyopsilerini değerlendirdikleri çalışmalarında ortaya konulmuştur (279). Buna göre, yaşa bağlı olarak oositlerde sitoplazmik vakuolizasyonda artış, matriks dansitesindeki artışla bağlantılı olarak mitokondriyal fraksiyonda azalma, düz endoplazmik redikulum ve golgi kompleksinde genişleme gözlenirken, granuloza hücrelerindeki mitokondri sayısında da azalma gözlenmektedir.

Yaşlı kadınların primer foliküllerindeki granuloza hücrelerinin sayısında artış olduğunun bildirilmesi, yaşlı kadınlardaki foliküllerin büyüme fazına daha erken girme

eğiliminde oldukları şeklinde yorumlanmıştır (280). Bu durum, ovaryan yaşlanmanın kalitatif ve kantitatif yönlerinin bir arada açıklanmasını sağlayabilir (234).

Oosit ve embriyoda anöploidi yaşla birlikte anlamlı şekilde artış göstermektedir (281). Yaşlanmaya bağlı artan anöploidi sıklığından mayoz I'de görülen ayrılma kusurları sorumlu tutulmaktadır (282, 283). Kromozomal morfoloji üzerine yapılan çalışmalarda yaşlanma ile birlikte, mayotik iğ (spindle) anomalilerine bağlı olarak kromozomal dizilim bozuklukları ve decondensasyon kusurları meydana geldiği gösterilmiştir (284).

Oosit kalitesinin, uzun süren primordiyal folikül aşamasında etkilenmiş olması daha muhtemel olmakla birlikte büyüme aşamasındaki foliküllerin mikroçevrelerine bağlı olarak da kromozomal ya da stoplazmik hasar meydana gelebilir. POF hastalarında GDF9, BMP15 ve FOXL2 gibi folikül gelişiminin parakrin düzenleyicileri ile ilgili yapılan genetik çalışmalarda ortaya konan bozukluklar mikroçevre ile ilgili bu hipotezi desteklemektedir. Bu düzenleyici faktörlerin yanında, sağlıklı foliküler gelişim için uygun vasküler destek de gereklidir. Perfüzyonunu stromal damarlardan sağlayan primordiyal ve preantral foliküllerden farklı olarak, daha ileri aşamalarda foliküllerin perfüzyonu kapillerlerin teka içerisine doğru gelişmesine bağlıdır (285). Vaskülarizasyon ile ilgili genetik bozuklukların foliküllerin erken tükenmesine neden olduğu bildirilmiştir (286). Mikroçevrenin önemini vurgulayan bir başka çalışmada, yaşlı farelerin preovulatar foliküllerinin overlerden uzaklaştırılıp, in-vitro ortamda mature edilmelerinin oositlerin reproduktif potansiyelini artırdığı bildirilmiştir (287). Bazı çalışmalarda yaşlı fare oositlerinin, mayoz aktive edici sterol (FF-MAS) içeren ortamda, erken kromatid ayrılmasının önlenmesi nedeniyle reproduktif kapasitelerinin arttığı bildirilmiştir (234).

Yaşa bağlı olarak oositte meydana gelen moleküler değişiklikleri açıklamak üzere son zamanlarda ortaya atılan hipotezlerden birisi de protein glikasyonunun (non-enzimatik glikozilasyon) olası etkisidir. Proteinlerin non-enzimatik glikozilasyonu, vücuttaki tüm organ fonksiyonlarını olumsuz etkileyen ve yaşlanmanın evrensel bir belirteci olarak kabul edilen, AGEs adı verilen moleküllerin oluşumuna neden olur (288). AGEs kendi reseptörleri ile etkileşime geçerek, hücre içi oksidatif stres oluşumuna ve NF-kB gibi bazı redoks bağımlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olur (289). AGEs birikiminin reproduktif yaşlanma üzerine etkisi

net olarak bilinmemekle birlikte Tatone ve ark. AGEs'in major öncüllerinden birisi olan metilglioksalı detoksifiye eden bir enzimin aktivite ve ekspresyonunun reproduktif yaşlanma görülen farelerde azaldığını bildirmiştir (290). AGEs birikimi vaskülarizasyonu bozucu ve ROS seviyesini artırıcı etki yaptığından, reproduktif yaşlanma üzerindeki etkisinin ileri düzeyde araştırılması önemlidir (234). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, AGEs birikiminin folikül gelişimi, fertilizasyon, embriyonik gelişim, gebelik kaybı ve devam eden gebelik oranları üzerine etkisi, IVF ve ICSI uygulanan 157 kadın üzerinde değerlendirilmiştir (291). AGEs birikiminin reproduktif sağlık üzerine etkileri konusundaki kanıtların ilk kez ortaya konulduğu bu çalışmada, serum ve foliküler sıvıdaki AGEs düzeyinin foliküler gelişim, fertilizasyon ve embriyonik gelişim ile anlamlı, negatif bir korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar neticesinde, ovaryan disjeksi tedavisinde AGEs oluşumunu ya da etkilerini önlemeye yönelik yeni tedavi modaliteleri gündeme gelmektedir. Benfotiyamin adındaki, yağda çözünen bir tiyamin türevinin çeşitli mekanizmalarla AGEs oluşumunu inhibe ettiği (292) ve kullanımının serum, böbrek ve retinadaki AGEs miktarlarını azalttığı gösterilmiştir (293,294). IVF ve ICSI siklusları üzerine AGEs birikiminin etkilerini inceleyen çalışmada, benfotiyaminin foliküller üzerine etkisi konusunda henüz yayınlanmamış bir çalışmaya dair bilgiler verilmiştir (291). Buna göre, çeşitli defalar yardımcı üreme teknikleri uygulanan, gebe olmayan 7 kadına 3 ay boyunca 75 mg/gün benfotiyamin tedavisi verilerek foliküler sıvıdaki AGEs düzeyinde anlamlı ölçüde azalma sağlanmıştır. Ancak bunun yardımcı üreme tekniklerinin başarısı üzerine etkisi, hasta sayısındaki kısıtlılıktan dolayı değerlendirilememiştir.

5.1. XPD-Lys751Gln

Bizim çalışmamızda, XPD-Lys751Gln polimorfizm bölgesindeki genotip dağılımları açısından POF ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, NER mekanizmasında görev alan XPA, XPC, XPD ve XPG genlerindeki bazı polimorfizmler ile sağlıklı bireylerin DNA tamir kapasitesi ve DNA hasarı düzeyi arasındaki ilişki incelenmiştir. XPD-Lys751Gln polimorfizminin de incelendiği çalışmada, bu polimorfizmin DNA hasarı miktarı ve DNA tamir kapasitesi ile ilişkisi gösterilememiştir (295). Bu çalışmada bahsi geçen DNA tamir kapasitesi kavramı, DNA tamir geni polimorfizmleri dışında bireyler

arasında farklılık gösterbilen bir etken olarak son zamanlarda farklı çalışmalarda ele alınmaktadır. Bu kavram gen varyantları, gen ekspresyonları, gen ürünlerinin stabilitesi, yaşam stili ve çevresel faktörler gibi pek çok değişkeni içeren kompleks bir biyokimyasal belirteç olarak ortaya çıkmaktadır (296).

XPD geni polimorfizmleri ile DNA tamirinin etkinliği arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, Lys/Lys genotipine sahip hastalarda kromatid hatalarının diğer hastalara göre anlamlı biçimde daha yüksek görüldüğü bildirilmiştir (268). Bizim çalışmamızda, POF grubunda Lys/Lys genotipi kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat daha fazla görülmektedir. Bu da, Lys/Lys genotipinin POF etiyolojisinde rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir.

XPD-Lys751Gln mutasyonunun asidik rezidünün kaybı nedeniyle XPD proteinin elektronik konfigürasyonunu bozduğu (297) ve UV'ye bağlı DNA hasarlarının tamir kapasitesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (298). Yeni bir çalışmada, Gln/Gln genotipinin, düşük baş ve boyun kanseri riski ile anlamlı derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir. Türk toplumunda 2010 yılında yapılan bir çalışmada, yaşa bağlı maküler dejenerasyon riski açısından Gln/Gln genotipinin anlamlı bir koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (299). Patogenezinde DNA hasarının rol oynadığı bilinen senil katarakt hastaları ile ilgili yine Türk toplumunda yapılan bir başka çalışmada da Gln/Gln genotipinin anlamlı derecede koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (300). Gln/Gln genotipinin bizim çalışmamızda, POF grubunda hiç gözlenmezken kontrol grubunda %48 ile en çok izlenen genotip olması dikkat çekicidir. Bu nedenle Gln/Gln genotipinin POF için de koruyucu etkisi olabileceğini düşünmekteyiz.

Azospermi hastalarında XPD ve XRCC1 polimorfizmlerini inceleyen, Çinli populasyonda yapılan bir çalışmanın sonuçları, gamet hücresinde DNA hasarına bağlı apoptozis teorisini paylaşmasından dolayı önem teşkil etmektedir (301). Bu çalışmada Lys/Lys genotipi ile kıyaslandığında Lys/Gln+Gln/Gln genotipinin, artmış idiyomatik azospermi riski ile anlamlı derecede ilişkili olduğu ve 751Gln'in risk alleli olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, Lys/Gln+Gln/Gln genotipi POF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha az görülmektedir. Diğer bir deyişle, Gln taşıyan hasta yüzdesi POF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktür. Bu bulgular, Gln allelinin POF açısından koruyucu allel olduğu şeklinde değerlendirilmektedir.

Literatürde Türk toplumunda, preeklampsi (302) ve endometriyozis (303) olgularında XPD ve XRCC1 polimorfimleri araştırılmıştır. Bu iki çalışmada da, XPD-Lys751Gln genotipi ve allel dağılımının preeklampsi ve endometriyozis ile ilişkisi gösterilememiştir.

5.2. XRCC1-Arg194Trp

XRCC1-Arg194Trp polimorfizm bölgesindeki genotip dağılımları açısından, bizim çalışmamızda POF ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. XRCC1 geni BER mekanizmasında, en sık görülen hücrel DNA hasarı olan tek zincir kırıklarının tamirinde rol alan bir proteini kodlamaktadır. XRCC1 mutasyonu görülen hücrelerde DNA tamir kapasitesinde değişiklikler meydana gelebilmektedir (304). XRCC1 polimorfizmleri ile mutajen hassasiyeti ilişkisini inceleyen bir çalışmada ise Arg/Arg genotipinin artmış mutajen hassasiyeti ve artmış kromozomal kırık oranı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (304). Diğer bir çalışmada, XRCC1- Arg194Trp polimorfizminin azospermi ile direk ilişkisi gösterilememiş ancak Arg/Arg genotipinin, XPD geninin riskli genotipi ile kombine edildiğinde azospermi riskinde 3 kata varan artış ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (301). Bizim çalışmamızda ise, Arg/Arg genotipi POF ve kontrol gruplarında benzer oranlarda bulunmuştur (%64 ve %80).

Çalışmamızda, Trp/Trp genotipine POF ve kontrol grubundaki hiçbir bireyde rastlanmamıştır. Türk toplumunda XRCC1-Arg194Trp polimorfizminin çeşitli hastalıklar ile ilişkisini araştıran diğer çalışmaların kontrol gruplarında da Trp/Trp genotipi %0 ile %2 arasında bildirilmiştir (299,302,305).

XRCC1, hasarlı DNA ve BER mekanizmasında rol alan APE/Ref-1, DNA polimeraz β , poly ADP-riboz polimeraz-1 (PARP-1), DNA ligaz III α gibi diğer proteinlerle etkileşime girerek DNA onarımında koordinasyonu sağlar (306,307). XRCC1 ligasyonun son basamağına kadar görev yapar; DNA glikozilazın APE/Ref-1 ile değişimini sağlayarak modifiye bazın eksizyonunu hızlandırır, pol β ile APE/Ref-1 etkileşimini düzenler ve son olarak ligasyon basamağını aktive eder (305). BER mekanizması daha çok endojen kaynaklı oksidatif DNA hasarlarının onarımında devreye girer (308)

XRCC1 geni polimorfizmleri çoğunluğu kanserler olmak üzere, pekçok hastalıkla ilişkili araştırmalara konu olmuştur. Literatürde XRCC1 geni polimorfizmlerinin meme kanseri (309,310,311,312), akciğer kanseri (313,314), pankreas kanseri (264), baş ve boyun kanserleri (315), kolon kanseri (316), mide kanseri (317), prostat kanseri (318,319), hematolojik kanserler (320,321), azospermi (301), katarakt (322) ve myoma uteri (323,324) ile ilişkisini inceleyen çalışmalar vardır.

XRCC1 polimorfizmlerin Türk toplumunda da meme kanseri (325), mesane kanseri (326), beyin tümörü (327), hematolojik kanserler (328,329), gastrik ve kolorektal kanserler (330,331), glakom (332), katarakt (300), astım (333), endometriyozis (303), Graves hastalığı (305) ve romatoid artirit (334) ile ilişkisi önceki çalışmalarda araştırılmıştır.

5.3. XRCC1-Arg399Gln

Bizim çalışmamızda XRCC1-Arg399Gln polimorfizm bölgesindeki genotip dağılımları açısından POF ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. İnfertil 620 erkek hastanın dahil edildiği 2010 yılında yapılan bir çalışmada, sperm DNA hasarı ile XRCC1-Arg399Gln polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (335). DNA hasarı ve XRCC1-Arg399Gln polimorfizmi ilişkisini inceleyen diğer bir çalışmada ise Gln/Gln genotipine sahip olan bireylerde kardeş kromatid değişikliklerinin ve polifenol DNA katımlarının daha yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir (308). Başka bir çalışmada yine Arg/Arg genotipi ile karşılaştırıldığında 399Gln alleli taşıyan bireylerde kardeş kromatid değişikliklerine daha sık rastlandığı bildirilmiştir (336). Bizim çalışmamızda Arg/Arg genotipine POF ve kontrol gruplarında benzer oranlarda rastlanmıştır (%40 ve %44).

XRCC1-Arg399Gln polimorfizmi literatürde daha çok kansere yatkınlık ile ilgili çalışmalara konu olmuştur. Yaklaşık 3000 akciğer kanserli hastanın değerlendirildiği meta analizde, akciğer kanseri ile 399Gln allelinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (337). Bir başka geniş meta analizde 399Gln alleli artmış meme kanseri riskiyle ilişkili bulunmuştur (338). Bizim çalışmamızda 399Gln alleli frkansları arasında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Sağlıklı Türk populasyonunda XRCC1-Arg399Gln polimorfizminin sıklığını inceleyen 2006 tarihli bir çalışmada Arg/Arg genotipi %37.3, Arg/Gln genotipi %45.2, Gln/Gln genotipi ise %17.5 olarak bildirilmiştir (339). Allel frekansları 399Arg için %60, 399Gln için %40 olarak bildirilmiştir. Bizim alışmamızda XRCC1-Arg399Gln polimorfizmi için tespit ettiğimiz genotip dağılımı ve allel frekansları kısıtlı hasta sayımıza rağmen bu prevalans çalışması ile benzer niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- XPD-Lys751Gln, XRCC1-Arg194Trp ve XRCC1-Arg399Gln polimorfizm bölgelerinin genotip dağılımı ve allel sıklığı bakımından POF ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır
- XPD-Lys751Gln polimorfizmi için Gln/Gln+Lys/Gln genotipi sıklığı POF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha düşük bulunmuştur.
- 751Gln allelinin POF'a karşı koruyucu bir rolü olduğu bulundu.
- XPD-Lys751Gln polimorfizm bölgesinde Gln/Gln genotipinin POF grubunda hiç gözlenmezken kontrol grubunda %48 ile en çok izlenen genotip olduğu görülmüştür. Bu nedenle, Gln/Gln genotipinin POF için koruyucu etkisinin olduğu sonucuna varıldı.
- XPD-Lys751Gln polimorfizm bölgesi için, POF grubunda Lys/Lys genotipinin kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat daha fazla görüldüğü tespit edildi. Lys/Lys genotipinin POF etiolojisinde rol oynayabileceği sonucuna varıldı.
- XRCC1-Arg194Trp ve XRCC1-Arg399Gln polimorfizmlerinin POF ile ilişkili olmadığı tespit edildi.
- Bu çalışma POF hastalarında DNA tamir gen polimorfizmlerini araştıran ilk çalışma olduğundan bu alanda hasta sayısı yüksek olan çalışmalara ihtiyaç vardır.
- DNA tamir gen polimorfizmlerinin POF hasta grubunda oksidatif stres belirteçleri ile birlikte çalışılmasının sonuçların yorumlanmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

ÖZET

PREMATÜR OVARYAN YETMEZLİKLE XPD VE XRCC1 DNA TAMİR GEN POLİMORFİZMİNİN İLİŞKİSİ

Prematür ovaryan yetmezlik (POF), reproduktif yaş grubundaki kadınların yaklaşık %1'ini etkileyen, 40 yaşın altında ovaryan fonksiyonların kesilmesine artmış gonadotropin ve düşük östrojen seviyelerinin eşlik ettiği heterojen bir tablodur. POF vakalarının %90'ında etiyolojik faktör belirlenmemektedir. Kadınların tüm reproduktif hayatları boyunca sahip oldukları yedi milyon oositten sadece 500'den azı ovule olabilmektedir. POF'un ovaryan gelişim sırasındaki folikül sayısının düşük olmasından ya da folikül kayıp hızındaki bir artıştan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda DNA hasarlayıcı ajanlara maruziyetin fertilitede azalmaya ve folikül sayısında kayba neden olduğu gösterilmiştir. DNA tamir geni polimorfizmleri DNA tamir enzimlerinin fonksiyonlarını değiştirebilmekte ve tamir edilmeyen DNA hasarları apoptozisi tetikleyebilmektedir. Bu nedenle biz bu çalışmada, Türk toplumunda idiopatik POF ile XPD ve XRCC1 polimorfizmlerinin ilişkili olup olmadığını araştırdık. Bu amaçla POF ve kontrol grubunda XPD-Lys751Gln, XRCC1-Arg194Trp ve XRCC1-Arg399Gln polimorfizmlerinin sıklığı analiz edildi. Hasta grubu yaşları 17-39 arasında değişen 25 POF hastasından oluşturuldu. Yaşları 21-64 arasında olan, 40 yaşından sonra menapoza girmiş olan ya da halen düzenli adet gören 25 kadın kontrol grubuna dahil edildi. Standart metodlar kullanılarak periferik kandaki lökositlerden DNA analizi yapıldı. Polimorfizmlerin tespiti bir LightCycler-System ile floresan işaretli hibridizasyon problemleri kullanılarak erime eğrisi analizi ile yapıldı. Yaptığımız çalışmada araştırılan polimorfizmlerin genotip dağılımları ve allel frekansları açısından POF ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. XPD-Lys751Gln polimorfizmi için Gln/Gln+Lys/Gln genotipi sıklığı POF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha düşük bulundu. Bu çalışmada 751Gln allelinin POF'a karşı koruyucu bir rolü olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Prematür ovaryan yetmezlik, polimorfizm, DNA tamir geni, XPD, XRCC1

SUMMARY

ASSOCIATION OF PREMATURE OVARIAN FAILURE WITH THE POLYMORPHISMS OF DNA REPAIR GENES XPD AND XRCC1

Premature ovarian failure (POF) is a heterogeneous disorder defined as the cessation of ovarian function accompanied by elevated gonadotrophins and low estrogen level before the age of 40 which affects approximately 1% of women of reproductive age. In 90% of the cases of POF, the etiology remains unknown. Fewer than 500 of a women's original seven million oocytes are released in their entire reproductive life span. POF may result from either a decreased number of follicles being found during ovarian development or an increased rate of follicle loss. Epidemiological studies have demonstrated that exposure to certain DNA damaging agents may result in decreased fertility and reductions in ovarian follicle numbers. The polymorphisms of DNA repair genes may alter the functions of DNA repair enzymes and unrepaired DNA damage can activate apoptosis. We therefore investigated whether polymorphisms in the XPD and the XRCC1 genes associated with idiopathic POF in Turkish population. For this, we analyzed the frequency of XPD-Lys751Gln, XRCC1-Arg194Trp and XRCC1-Arg399Gln polymorphisms in patients with POF and the controls. The patient group with 25 POF subjects between 17 and 39 years old was chosen for this study. The control group included 25 women ranging from 21 to 64 years old who underwent menopause after age 40 or who had regular menstrual cycles. DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by standard methods. Detection of polymorphisms was done by rapid capillaryPCR with melting curve analysis using fluorescence-labeled hybridization probes in a LightCycler. In this study, no statistically significant differences were found in genotype distributions or allele frequencies of the evaluated polymorphisms between the patients with POF and the controls. For XPD-Lys751Gln polymorphism, POF group showed a significantly lower frequency of Gln/Gln+Lys/Gln genotype compared with the controls. We found that there is a protective role of 751Gln allele against POF.

Key Words: Premature ovarian failure, polymorphism, DNA repair gene, XPD, XRCC1

KAYNAKLAR

1. Coulam CB. Premature gonadal failure. *Fertil Steril* 1982;38:645–655.
2. Coulam C, Adamson S, Annegers J. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 604–06.
3. Nelson LM, Anasti JN, Kimzey LM, et al. Development of luteinized Graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1470–5.
4. van Kasteren YM, Schoemaker J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Update* 1999;5:483–92.
5. Bakalov VK, Anasti JN, Calis KA, et al. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2005;84:958–65.
6. Rebar RW, Connolly HV. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril* 1990; 53(5):804-810.
7. Tarin JJ. Aetiology of age-associated aneuploidy: a mechanism based on the 'free radical theory of ageing'. *Hum Reprod* 1995;10:1563-5.
8. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997;12:1047-55
9. Albright F, Smith P, Fraser R. A syndrome characterized by primary ovarian insufficiency and decreased stature. *Am J Med Sci* 1942;204: 625–48.
10. Rebar RW, Erickson GF, Yen SSC. Idiopathic premature ovarian failure: clinical and endocrine characteristics. *Fertil Steril* 1982;37:35–41.
11. Sklar CA, Mertens AC, Mitby P et al. Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 890–896.
12. Panay N & Fenton A. Premature ovarian failure: a growing concern. *Climacteric* 2008; 11: 1–3.
13. Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB and Santoro N. 2003. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum.Reprod.* 18:199-206.
14. Panay N, Kalu E. Management of premature ovarian failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2009 Feb;23(1):129-40.
15. Groff AA, Covington SN, Halverson LR et al. Assessing the emotional needs of women with spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2005; 83: 1734–1741.
16. Alzubaidi NH, Chapin HL, Vanderhoof VH, Calis KA, Nelson LM. Meeting the needs of young women with secondary amenorrhea and spontaneous premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 2002;99:720 –5.
17. Stenchever MA, Droegemueller W, Herbst AL, Mishell DRJ. Primary and secondary amenorrhea. In: Stenchever MA, Droegemueller W, Herbst AL, Mishell DRJ, eds. *Comprehensive gynecology*. St. Louis: Mosby, 2001:1099–123.
18. De Vos M, Devroey P, Fauser BC. Primary ovarian insufficiency. *Lancet.* 2010 Sep 11;376(9744):911-21.
19. Anasti JN: Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril* 1998; 70: 1–15
20. Nelson L. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2009; 360: 606–14.
21. Nippita TA and Baber RJ. 2007. Premature ovarian failure: a review. *Climacteric.* 10:11-22.

22. Nelson L, Covington S, Rebar R. An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. *Fertil Steril* 2005; 83: 1327–32.
23. Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, et al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril* 2007;87:456–65.
24. Çelik, Ö. (2011). Yardımcı üreme teknikleri temel klinik ve embriyolojik uygulamalar. Adana: Nobel Kitabevi.
25. Chemaitilly W, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Yasui Y, Robison LL, Sklar CA. Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1723–1728.
26. Mark-Kappeler CJ, Hoyer PB, Devine PJ. Xenobiotic effects on ovarian preantral follicles. *Biol Reprod*. 2011 Nov;85(5):871-83.
27. Chapman R. Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. *Semin Oncol* 1982; 9: 84–94.
28. Blumenfeld Z. Preservation of fertility and ovarian function and minimalization of chemotherapy associated gonadotoxicity and premature ovarian failure: the role of inhibin-A and -B as markers. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 93–105.
29. Byrne J. Long-term genetic and reproductive effects of ionizing radiation and chemotherapeutic agents on cancer patients and their offspring. *Teratology* 1999; 59:210–215.
30. Petrillo SK, Desmeules P, Truong TQ, Devine PJ. Detection of DNA damage in oocytes of small ovarian follicles following phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 253:94–102.
31. Harel S, Fermé C, Poirot C. Management of fertility in patients treated for Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2011 Nov;96(11):1692-9.
32. Bines J, Oleske D, Cobleigh M. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1718–29.
33. Shamberger R, Rosenberg S, Seipp C, Sherins R. Effects of highdose methotrexate and vincristine on ovarian and testicular functions in patients undergoing postoperative adjuvant treatment of osteosarcoma. *Cancer Treat Rep* 1981; 65: 739–46.
34. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 251–66.
35. Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 2005; 6:209–218.
36. Thibaud E, Rodriguez-Macias K, Trivin C, Esperou H, Michon J, Brauner R. Ovarian function after bone marrow transplantation during childhood. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21:287–290.
37. Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod* 2003; 18:117–121.
38. Davis VJ. Female gamete preservation. *Cancer* 2006; 107:1690–1694.
39. Stroud JS, Mutch D, Rader J, Powell M, Thaker PH, Grigsby PW. Effects of cancer treatment on ovarian function. *Fertil Steril* 2009; 92:417–427.
40. 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. *Fertil Steril* 2000; 74: 743–748.
41. Cramer DW, Xu H and Harlow BL. 1995a. Does "incessant" ovulation increase risk for early menopause? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172:568-573.
42. Busacca M, Riparini J, Somigliana E, Oggioni G, Izzo S, Vignali M, Candiani M. Postsurgical ovarian failure after laparoscopic excision of bilateral endometriomas. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:421–425.

43. Hascalik S, Celik O, Sarac K, Hascalik M: Transient ovarian failure: a rare complication of uterine fibroid embolization. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 682–685.
44. 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. *Fertil Steril.* 1987 Jan;47(1):94-100.
45. Chang SH, Kim CS, Lee KS, Kim H, Yim SV, Lim YJ, Park SK. Premenopausal factors influencing premature ovarian failure and early menopause. *Maturitas.* 2007 Sep 20;58(1):19-30.
46. Tuttle AM, Stampfli M, Foster WG. Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. *Hum Reprod* 2009; 24:1452–1459.
47. Vahakangas K, Rajaniemi H, Pelkonen O. Ovarian toxicity of cigarette smoke exposure during pregnancy in mice. *Toxicol Lett* 1985; 25:75–80.
48. Sharara FI, Seifer DB and Flaws JA. 1998. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil. Steril.* 70:613-622.
49. Hoyer PB, Sipes IG. Development of an animal model for ovotoxicity using 4-vinylcyclohexene: a case study. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; 80:113–125.
50. Mayer LP, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Marion SL, Sipes IG, Hoyer PB. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4- vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol* 2002; 16:775–781.
51. Kim Y, Park J, Moon Y. Hematopoietic and reproductive toxicity of 2-bromopropane, a recently introduced substitute for chlorofluorocarbons. *Toxicol Lett* 1999; 108:309–313.
52. Morrison JC, Givens JR, Wisner WL, et al. Mumps oophoritis: A cause of premature menopause. *Fertil Steril* 1975; 26:655–659.
53. Jequier AM, Davis SR. The premature menopause: An example of a difficult diagnostic problem. In *Programs and Abstracts of the 1st Australasian Menopause Society Congress, Perth, Australia, 1997.*
54. Balen A. *Reproductive Endocrinology for the MRCOG and beyond.* 1st ed. London: RCOG Press; 2003.
55. Shelling AN. Premature ovarian failure. *Reproduction.* 2010 Nov;140(5):633-41.
56. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA: Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 1997; 18: 107–134.
57. Doldi N, Belvisi L, Bassan M, Fusi FM, Ferrari A: Premature ovarian failure: steroid synthesis and autoimmunity. *Gynecol Endocrinol* 1998; 12: 23–28.
58. Khole V. Does ovarian autoimmunity play a role in the pathophysiology of premature ovarian insufficiency? *J Midlife Health.* 2010 Jan;1(1):9-13.
59. Novosad JA, Kalantaridou SN, Tong ZB, Nelson LM. Ovarian antibodies as detected by indirect immunofluorescence are unreliable in the diagnosis of autoimmune premature ovarian failure: A controlled evaluation. *BMC Womens Health.* 2003;3:2.
60. Avrameas S. Natural antibodies: From ‘horror autotoxicus’ to ‘gnothi seauton’ *Immunol Today.* 1991;12:154–9.
61. Goswami D and Conway GS. 2005. Premature ovarian failure. *Hum. Reprod. Update.* 11:391-410.
62. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Horm Res.* 2007;68(4):196-202.

63. Kim TJ, Anasti JN, Flack MR, Kimzey LM, Defensor RA, Nelson LM. Routine endocrine screening for patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1997;89:777–9.
64. Bakalov VK, Vanderhoof VH, Bondy CA, Nelson LM. Adrenal antibodies detect asymptomatic auto-immune adrenal insufficiency in young women with spontaneous premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2002;17:2096–100.
65. 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. *Arch Ophthalmol* 2004;122:151–6.
66. Davis CJ, Davison RM, Payne NN, Rodeck CH, Conway GS. Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect: Opinion. *Hum. Reprod.* 2000;15(11):2418-2422.
67. He C, Kraft P, Chen C, Buring JE, Pare´ G, Hankinson SE, Chanock SJ, Ridker PM, Hunter DJ & Chasman DI 2009 Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause. *Nature Genetics* 41 724–728.
68. Perry JR, Stolk L, Franceschini N, Lunetta KL, Zhai G, McArdle PF, Smith AV, Aspelund T, Bandinelli S, Boerwinkle E et al. 2009 Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche. *Nature Genetics* 41 648–650.
69. Cramer DW, Xu H and Harlow BL. 1995b. Family history as a predictor of early menopause. *Fertil. Steril.* 64:740-745.
70. Torgerson DJ, Thomas RE & Reid DM 1997 Mothers and daughters menopausal ages: is there a link? *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 74 63–66.
71. Murabito JM, Yang Q, Fox C, Wilson PW & Cupples LA 2005 Heritability of age at natural menopause in the Framingham Heart Study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 3427–3430.
72. Fitch, N.; De Saint Victor, J.; Richer, C.L.; Pinski, L.; Sitahal, S. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1982, 142, 968-972.
73. Marozzi, A.; Manfredini, E.; Grazia Tibiletti, M.; Furlan, D.; Villa, N.; Vegetti, W.; Crosignani, P.G.; Ginelli, E.; Meneveri, R.; Dalprà, L. *Hum. Genet.*, 2000, 107, 304-311.
74. Fassnacht W, Mempel A, Strowitzki T, Vogt PH. Premature ovarian failure (POF) syndrome: towards the molecular clinical analysis of its genetic complexity. *Curr Med Chem.* 2006;13(12):1397-410.
75. Powell, C.M.; Taggart, R.T.; Drumheller, T.C.; Wangsa, D.; Qian, C.; Nelson, L.M.; White, B.J. *Am. J. Med. Genet.*, 1994, 52,19-26.
76. Bione, S.; Sala, C.; Manzini, C.; Arrigo, G.; Zuffardi, O.; Banfi, S.; Borsani, G.; Jonveaux, P.; Phillippe, C.; Zuccotti, M.; Ballabio, A.; Toniolo, D. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998, 62, 533-541.
77. Stratakis CA, Rennert OM 1994 Turner syndrome: molecular and cytogenetics, dysmorphology, endocrine, and other clinical manifestations and their management. *Endocrinologist* 4:442–453
78. Jacobs P, Dalton P, James R, Mosse K, Power M, Robinson D, Skuse D 1997 Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 61:471–483
79. Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I, Segni M, Municchi G 1997 Spontaneous pubertal development in Turner’s syndrome. Italian Study Group for Turner’s Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1810–1813

80. Modi, D.N.; Sane, S.; Bhartiya D. *Mol. Hum. Reprod.*, 2003, 9, M.G.; Dalpra, L.; Ginelli, E. *Hum. Reprod.*, 2002, 17, 1741-1745. 219-225.
81. Sato, K.; Uehara, S.; Hashiyada, M.; Nabeshima, H.; Sugawara, J.; Terada, Y.; Yaegashi, N.; Okamura, K. *Am. J. Med. Genet.*, 2004, 130, 240-244.
82. Ogata T, Matsuo N (1995) Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. *Hum Genet* 95:607–629
83. Sybert, V.P.; McCauley, E. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 351, 1227-1238
84. Cacciari E, Mazzanti L., Italian Study Group for Turner Syndrome Final height of patients with Turner's syndrome treated with growth hormone (GH): indications for GH therapy alone at high doses and late estrogen therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999. 84:4510–4515.
85. Massa G, Heinrichs C, Verlinde M. et al Late or delayed induced or spontaneous puberty in girls with Turner syndrome treated with growth hormone does not affect final height. *J Clin Endocrinol Metab* 2003. 88:4168–4174.
86. Gault E J, Paterson W F, Young D. et al Improved final height in Turner's syndrome

following growth-promoting treatment at a single centre. *Acta Paediatr* 2003. 92:1033–1038.

87. Khastgir G, Abdalla H, Thomas A. et al Oocyte donation in Turner's syndrome: an analysis of the factors affecting the outcome. *Hum Reprod* 1997. 12:279–285.
88. Jacobs P, Baikie A, Brown W, Macgregor T, Maclean N, Harnden D: Evidence for the existence of the human "superfemale". *Lancet* 1959:423-425.
89. Nielsen J: Sex Chromosome Abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1990, 26(4):209-23.
90. Linden MG, Bender BG, Harmon RJ, Mrazek DA, Robinson A (1988) 47,XXX: what is the prognosis? *Pediatrics* 82(4):619–630
91. Lin HJ, Ndiforchu F, Patell S: Exstrophy of the cloaca in a 47,XXX child: review of genitourinary malformations in triple-X patients. *Am J Med Genet* 1993, 45(6):761-3.
92. Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis.* 2010 May 11;5:8.
93. 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. *Fertil Steril* 2003, 80(4):1052-4.
94. Amiri K, Hagerman RJ, Hagerman PJ (2008) Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: an aging face of the fragile X gene. *Arch Neurol* 65:19–25
95. Cordts EB, Christofolini DM, Dos Santos AA, Bianco B, Barbosa CP. Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Arch Gynecol Obstet.* 2011 Mar;283(3):635-43.
96. Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, et al. Methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1992;1:397–400.
97. Persani L, Rossetti R, Cacciato C, Bonomi M. Primary Ovarian Insufficiency: X chromosome defects and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2009 Aug;33(1):35-41.
98. Murray A, Ennis S, MacSwiney F, Webb J, Morton NE: Reproductive and menstrual history of females with fragile X expansions. *Eur J Hum Genet* 2000, 8:247-252.

99. Murray A: Premature ovarian failure and the FMR1 gene. *Semin Reprod Med* 2000, 18:59-66.
100. Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP et al (2007) Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod* 22:2142–2152
101. Toniolo D. X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2006 Jun;16(3):293-300.
102. Bodega B, Bione S, Dalprà L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W, Ginelli E, Marozzi A. Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod.* 2006 Apr;21(4):952-7.
103. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S et al.: The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 2001, 27:159-166.
104. Hagerman RJ, Leavitt BR, Farzin F, Jacquemont S, Greco CM, Brunberg JA et al (2004) Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. *Am J Hum Genet* 74:1051–1056
105. Matzuk, M.M., Lamb, D.J., 2002. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat. Cell. Biol.* 4 (Suppl.), s41–s49.
106. Laissue P, Vinci G, Veitia RA, Fellous M. Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Jan 30;282(1-2):101-11.
107. Ledig S, Röpke A, Haeusler G, Hinney B, Wieacker P. BMP15 mutations in XX gonadal dysgenesis and premature ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Jan;198(1):84.e1-5.
108. Hogan BL (1996) *Bmps: multifunctional regulators of mammalian embryonic development.* *Harvey Lect* 92:83–98
109. Persani L, Rossetti R, Cacciatore C. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol.* 2010 Nov;45(5):257-79.
110. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL et al. 2001 Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology* 15 854–866.
111. Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L & Mulsant P 2007 A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology* 148 393–400.
112. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. 2004. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 75:106–111.
113. Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakravarty B, Singh L. 2005. Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause* 12:749–754.
114. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, Dewailly D, Reyss AC, Jeffery L, Bachelot A, Massin N, Fellous M, Veitia RA. 2006. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 154:739–744.
115. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25:72–101.

116. Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, et al. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet* 2006;119:408-15.
117. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM & Matzuk MM 1999 Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology* 13 1035–1048.
118. McGrath, S.A.; Esquela, A.F.; Lee, S.-J. *Molec. Endocr.*, 1995, 9, 131-136
119. Dong, J.; Albertini, D.F.; Nishimori, K.; Kumar, T.R.; Lu, N.; Matzuk, M.M. *Nature*, 1996, 383, 531-535 .
120. Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: Energy metabolism. *Dev Biol* 279:20–30.
121. Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK. 2006. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol* 20:2456–2468.
122. Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. 2000b. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 141:3814–3820.
123. Huang Q, Cheung AP, Zhang Y, Huang HF, Auersperg N, Leung PC. 2009. Effects of growth differentiation factor 9 on cell cycle, regulators and ERK42/44 in human granulosa cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E1344–E1353.
124. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
125. Takebayashi K, Takakura K, Wang H, Kimura F, Kasahara K & Noda Y 2000 Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 74 976–979.
126. Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE & Carson SA 2007 Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 87 143–146.
127. Barton, D.E., Yang-Feng, T.L., Mason, A.J., Seeburg, P.H., Francke, U., 1989. Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta A, and beta B on human and mouse chromosomes and studies of jsd mice. *Genomics* 5, 91–99.
128. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP et al (1996) Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81(4):1401–1405
129. Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ & Bradley A 1992 Alphainhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360 313–319.
130. Prendergast, K.A.; Burger, L.L.; Aylor, K.W.; Haisenleder, D.J.; Dalkin, A.C.; Marshall, J.C. *Biol. Reprod.*, 2004, 70, 364-370.
131. Burger, H.G.; Dudley, E.C.; Robertson, D.M.; Dennerstein, L. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 2002, 57, 257-275.
132. Shelling, A.N.; Burton, K.A.; Chand, A.L.; Van Ee, C.C.; France, J.T.; Farquhar, C.M.; Milsom, S.R.; Love, D.R.; Gersak, K.; Aittomäki, K.; Winship, I.M. *Hum. Reprod.*, 2000, 15, 2644-2649.
133. Marozzi A, Porta C, Vegetti W, Crosignani PG, Tibiletti MG, Dalpra` L & Ginelli E 2002 Mutation analysis of the inhibin alpha gene in a cohort of Italian women affected by ovarian failure. *Human Reproduction* 17 1741–1745.
134. Corre T, Schuettler J, Bione S, Marozzi A, Persani L, Rossetti R, Torricelli F, Giotti I, Vogt P, Toniolo D et al. 2009 A large-scale association study to assess the

- impact of known variants of the human INHA gene on premature ovarian failure. *Human Reproduction* 24 2023–2028.
135. Aittomaki, K.; Herva, R.; Stenman, U.-H.; Juntunen, K.; Ylostalo, P.; Hovatta, O.; da la Chapelle, A. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 1996, 81, 3722-3726.
 136. Aittomaki, K.; Lucena, J.L.; Pakarinen, P.; Sistonen, P.; Chil. *Obstet. Ginecol.*, 1992, 57, 341-345. Tapanainen, J.; Gromoll, J.; Kaskikari, R.; Sankila, E.M.; Lehtvaslaiho, H.; Engel, A.R.; Nieschlag, E.; Huhtaniemi, I.; de la Chapelle, A. *Cell*, 1995, 82, 959-968.
 137. Rannikko A, Pakarinen P, Manna PR, Beau I, MisrahiM, Aittomaki K & Huhtaniemi I 2002 Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Molecular Human Reproduction* 8 311–317.
 138. Sundblad V, Chiauzzi VA, Escobar ME, Dain L, Charreau EH (2004) Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol* 222(1–2): 53–59
 139. Vilodre LC, Kohek MB, Spritzer PM (2008) Screening of follicle- stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure in southern Brazil and associations with phenotype. *J Endocrinol Invest* 31(6):552–557
 140. Al-Hendy, A.; Moshynska, O.; Saxena, A.; Feyles, V. *Lancet*, 2000, 356, 914.
 141. Ghadami M, El-Demerdash E, Salama SA, Binhazim AA, Archibong AE, Chen X et al (2010) Toward gene therapy of premature ovarian failure: intraovarian injection of adenovirus expressing human FSH receptor restores folliculogenesis in FSHR(-/-) FORKO mice. *Mol Hum Reprod* 16(4):241–250
 142. Risma KA, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J, Nilson JH (1995) Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1322–1326
 143. Latronico AC, Chai Y, Arnhold IJ, Liu X, Mendonca BB & Segaloff DL 1998 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* 12 442–450.
 144. Liao WX, Roy AC, Chan C, Arulkumaran S, Ratnam SS (1998) A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility. *Fertil Steril* 69(1):102–106
 145. Attisano, L., Silvestri, C., Izzi, L., Labbe, E., 2001. The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGF beta and activin signalling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 180, 3–11.
 146. Prueitt, R.L.; Zinn, A.R. *Nature Genet.*, 2001, 27, 132-134.
 147. Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M., Veitia, R.A., 2002. Evolution and expression of FOXL2. *J. Med. Genet.* 39, 916–921.
 148. Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomaki K, Shelling AN. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 729–733.
 149. Beysen D, Vandesomepele J, Messiaen L, De Paepe A, De Baere E. The human FOXL2 mutation database. *Hum Mutat* 2004; 24: 189–193.
 150. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC et al (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131:933–942

151. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W et al (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13:1171–1181
152. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW & DePinho RA 2003 Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301 215–218.
153. Watkins WJ, Umbers AJ, Woad KJ, Harris SE, Winship IM, Gersak K & Shelling AN 2006 Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 86 1518–1521.
154. Welt C. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 68: 499–509.
155. Santoro N: Mechanisms of premature ovarian failure. *Ann Endocrinol* 2003, 64:87-92.
156. van Kasteren YM, Hundscheid RD, Smits AP, Cremers FP, van Zonneveld P, Braat DD. Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Hum Reprod* 1999;14:2455–9.
157. Fogle RH, Stanczyk FZ, Zhang X, Paulson RJ. Ovarian androgen production in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3040–3
158. Ossewaarde ME, Bots ML, Verbeek AL, Peeters PH, van der Graaf Y. Age at menopause, cause-specific mortality and total life expectancy. *Epidemiology* 2005;16:556–62
159. Rocca WA, Grossardt BR, de Andrade M, Malkasian GD, Melton LJ III. Survival patterns after oophorectomy in premenopausal women: a population-based cohort study. *Lancet Oncol* 2006;7:821–8
160. Jacobsen BK, Knutsen SF, Fraser GE. Age at natural menopause and total mortality and mortality from ischemic heart disease: the Adventist Health Study. *J Clin Epidemiol* 1999;52:303–7
161. Kalantaridou SN, Naka KK, Papanikolaou E, et al. Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3907–13
162. Knauff EA, Westerveld HE, Goverde AJ, et al. Lipid profile of women with premature ovarian failure. *Menopause* 2008;15:919–23
163. van der Schouw Y, van der Graaf Y, Steyerberg E, Eijkemans J, Banga J. Age at menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. *Lancet* 1996; 347: 714–18.
164. Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* 1991;20:47–63.
165. Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2000;133:933–941.
166. Bairey Merz CN, Johnson BD, Sharaf BL, Bittner V, Berga SL, Braunstein GD, Hodgson TK, Matthews KA, Pepine CJ, Reis SE, Reichek N, Rogers WJ, Pohost GM, Kelsey SF, Sopko G. Hypoestrogenemia of hypothalamic origin and coronary artery disease in premenopausal women: a report from the NHLBI-sponsored WISE study. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:413–419.
167. Tolar J, Teitelbaum S, Orchard P. Osteopetrosis. *N Engl J Med* 2004;351: 2839–49.
168. Rosen C. Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 595–603.

169. van Der Voort DJ, van Der Weijer PH, Barentsen R. Early menopause: increased fracture risk at older age. *Osteoporos Int* 2003;14:525–30
170. Amarante F, Vilodre LC, Maturana MA, Spritzer PM. Women with primary ovarian insufficiency have lower bone mineral density. *Braz J Med Biol Res.* 2011 Jan;44(1):78-83.
171. Maclaran K, Horner E, Panay N. Premature ovarian failure: long term sequelae. *Menopause Int.* 2010 Mar;16(1):38-41.
172. van der Klift M, de Laet CE, McCloskey EV, et al. Risk factors for incident vertebral fractures in men and women: the Rotterdam Study. *J Bone Miner Res* 2004;19:1172–80
173. North American Menopause Society. The role of calcium in peri- and postmenopausal women: 2006 position statement of the North American Menopause Society. *Menopause* 2006;13:862–77.
174. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266–81.
175. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bis-phosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008;83:1032–45.
176. Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA (1997) Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci* 17:1848–1859
177. Hojo Y, Murakami G, Mukai H, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M, Ishii H, Kimoto T, Kawato S (2008) Estrogen synthesis in the brain—role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol* 290(1–2):31–43
178. Maki PM, Zonderman AB, Resnick SM (2001) Enhanced verbal memory in nondemented elderly women receiving hormone replacement therapy. *Am J Psychiatry* 158:227–233
179. Gorenstein C, Rennó J Jr, Vieira Filho AH, Gianfaldoni A, Gonçalves MA, Halbe HW, Fernandes CE, Demétrio FN. Estrogen replacement therapy and cognitive functions in healthy postmenopausal women: a randomized trial. *Arch Womens Ment Health.* 2011 Oct;14(5):367-73.
180. Rocca WA, Bower JH, Maraganore DM, et al. Increased risk of cognitive impairment or dementia in women who underwent oophorectomy before menopause. *Neurology* 2007;69:1074–83
181. Wright, J., Bissonnette, F., Duchesne, C., Benoit, J., Sabourin, S., & Girard, Y. (1991). Psychosocial distress and infertility: Men and women respond differently. *Fertility and Sterility*, 55(1), 100-107.
182. Harlow, B. L., Cramer, D. W., & Annis, K. M. (1995). Association of medically treated depression and age at natural menopause. *American Journal of Epidemiology* 141(12), 1170-1176.
183. van der Stege JG, Groen H, van Zadelhoff SJ, et al. Decreased androgen concentrations and diminishes general and sexual well-being in women with premature ovarian failure. *Menopause* 2008;15:23–31
184. Abdo CHN, Fleury HJ. Diagnostic and therapeutic aspects of female sexual dysfunctions. *Rev Psiquiatr Clin* 2006;33:162-167.
185. Graziottin A, Basson R. Sexual dysfunction in women with premature menopause. *Menopause* 2004;11:766–77
186. Elias AN, Pandian MR, Rojas FJ. Serum levels of androstenedione, testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in patients with premature ovarian failure to age-matched menstruating controls. *Gynecol Obstet Invest* 1997;43:47-48.

187. Hartmann BW, Kirchengast S, Albrecht A, Laml T, Soregi G, Huber JO. Androgen serum levels in women with premature ovarian failure compared to fertile and menopausal controls. *Gynecol Obstet Invest* 1997;44:127-131.
188. Falsetti L, Scalchi S, Villani MT, Bugari G. Premature ovarian failure. *Gynecol Endocrinol* 1999;13:189-195.
189. Meskhi A, Seif MW. Premature ovarian failure. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006 Aug;18(4):418-26.
190. Kalantaridou SN, Davies SR, Nelson LM. Premature ovarian failure. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27:989–1006.
191. Rebar RW. Premature ovarian "failure" in the adolescent. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1135:138-45.
192. Anasti JN, Kalantaridou SN, Kimzey LM, et al. Bone loss in young women with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1998; 91:12–15.
193. Papalia MA, Davis SR. What is the rationale for androgen therapy for women? *Treat Endocrinol* 2003; 2:77–84.
194. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011 Feb 7;9:23.
195. Haning R Jr, Hackett R, Flood C, Loughlin J, Zhao Q, Longcope C. Plasma dehydroepiandrosterone sulfate serves as a prehormone for 48% of follicular fluid testosterone during treatment with menotropins. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76(5):1301–7.
196. Yan Z, Lee GY, Anderson E. Influence of dehydroepiandrosterone on the expression of insulin-like growth factor-1 during cystogenesis in polycystic rat ovaries and in cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod* 1997;57(6):1509–16.
197. Casson PR, Santoro N, Elkind-Hirsch K, et al. Postmenopausal dehydroepiandrosterone administration increases free insulin-like growth factor-I and decreases high-density lipoprotein: a sixmonth trial. *Fertil Steril* 1998;70(1):107–10.
198. Barad D, Brill H, Gleicher N: Update on the use of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian function. *J Assist Reprod Genet* 2007, 24(12):629-634.
199. Gleicher N, Weghofer A, Barad D: Increased euploid embryos after supplementation with dehydroepiandrosterone (DHEA) in women with premature ovarian aging. *Fertil Steril* 2007, 88:S232.
200. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH: Anti-Mullerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 2010, 94(7):2824-2827.
201. Barad D, Gleicher N. Effect of dehydroepiandrosterone on oocyte and embryo yields, embryo grade and cell number in IVF. *Hum Reprod* 2006; 21:2845– 2849.
202. Mamas L, Mamas E. Premature ovarian failure and dehydroepiandrosterone. *Fertil Steril* 2009; 91:644–646.
203. Feigenberg T, Simon A, Ben-Meir A, Gielchinsky Y, Laufer N: Role of androgens in the treatment of patients with low ovarian response. *Reprod Biomed Online* 2009, 19(6):888-898.
204. Check JH. Mild ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 621–27.
205. Tangjitgamol S, Manusirivithaya S, Hanprasertpong J et al. Hormone replacement therapy after treatment of endometrial cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2008; 65: 35–38.
206. Nelson LM, Covington SN & Rebar RW. An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. *Fertil Steril* 2005; 83: 1327–1332.

207. Guttmann H, Weiner Z, Nikolski E et al. Choosing an oestrogen replacement therapy in young adult women with Turner syndrome. *Clin Endocrinol* 2001; 54: 159–164.
208. Mazaud S, Guyot R, Guigon CJ, Coudouel N, Le Magueresse-Battistoni B, Magre S. Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families. *Dev Biol* 2005; 277:403–416.
209. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 1992;7(10):1342–1346.
210. Pangas SA, et al. Intraovarian activins are required for female fertility. *Mol Endocrinol.* 2007;21(10):2458–2471.
211. Papadaki L. Binovular follicles in the adult human ovary. *Fertil Steril.* 1978;29(3):342–350.
212. Peters H 1979 Some aspects of early follicular development. In *Ovarian Follicular Development and Function*, pp 1–15. Eds AR Midgley & WA Sadler. New York: Raven Press.
213. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124:43–101.
214. Devine PJ, Sipes IG, Skinner MK, Hoyer PB. Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study the ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 184:107–115.
215. Desmeules P, Devine PJ. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. *Toxicol Sci* 2006; 90:500–509.
216. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 175:123–130.
217. Liang L-F, Soyal S, Dean J. FIGa, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development.* 1997;124(24):4939–4947.
218. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* 2010 Apr 1;120(4):963-72.
219. Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal.* 2006;18(9):1351–1359.
220. Deroo BJ, et al. Estrogen receptor beta is required for optimal cAMP production in mouse granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 2009;23(7):955–965.
221. Ingman WV, Jones RL. Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. *Hum Reprod Update* 2008;14:179–92.
222. Fulton N, Martins da Silva SJ, Bayne RA, Anderson RA. Germ cell proliferation and apoptosis in the developing human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Aug;90(8):4664-70.
223. Leridon, H. (2006) Demographic effects of the introduction of steroid contraception in developed countries. *Hum. Reprod. Update* 12, 603– 616
224. Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends.
225. van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *BMJ.* 1991;302(6789):1361-1365.

226. Fauser BC, Devroey P, Macklon NS. Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet*. 2005;365(9473):1807-1816.
227. Markstrom E, Svensson E, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 2002;123(1):23-30.
228. Faddy MJ, Gosden RG. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod*. 1996;11(7):1484-1486.
229. Faddy MJ. 2000. Follicle dynamics during ovarian ageing. *Mol. Cell. Endocrinol*.163 :43-48.
230. Evers JL. Female subfertility. *Lancet*. 2002;360(9327):151-159.
231. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:28.
232. El Mouatassim S, Guerin P, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Mol Hum Reprod* 1999;5:720–725.
233. Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 2003;9:639–643.
234. Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini PG, Piomboni P, Focarelli R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update*. 2008 Mar-Apr;14(2):131-42.
235. Tarin JJ, Gomez-Piquer V, Pertusa JF, Hermenegildo C, Cano A. Association of female aging with decreased parthenogenetic activation, raised MPF, and MAPKs activities and reduced levels of glutathione S-transferases activity and thiols in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004;69:402–410.
236. Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2002a;61:385–397.
237. Tarin JJ, Perez-Albala S, Pertusa JF, Cano A. Oral administration of pharmacological doses of vitamins C and E reduces reproductive fitness and impairs the ovarian and uterine functions of female mice. *Theriogenology* 2002b;57:1539–1550.
238. Zhang X, Wu XQ, Lu S, Guo YL, Ma X. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res* 2006;160:841–850.
239. Venkatesh S, Kumar M, Sharma A, Kriplani A, Ammini AC, Talwar P, Agarwal A, Dada R (2010) Oxidative stress and ATPase6 mutation is associated with primary ovarian insufficiency. *Arch Gynecol Obstet*.
240. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S (2001) Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 8:S40–S42
241. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil* 2000;45:314–320.
242. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. Reactive oxygen species level in follicular fluid-embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod* 2006;21:2403–2407.
243. St John JC, Cooke ID, Barratt CL (1997) Mitochondrial mutations and male infertility. *Nat Med* 3:124–125
244. Fallin MD, Matteini A. Genetic epidemiology in aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009;64:47-60.
245. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford. 1999

246. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 1995;18:1033-77
247. Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie.* 2003 Nov;85(11):1053-71.
248. Hung RJ, Brennan P, Canzian F, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Foretova L, Janout V, Bencko V, Chabrier A, Borel S, Hall J, Boffetta P. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Apr 20;97(8):567-76.
249. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 2003 Nov 15;193(1-2):3-34.
250. de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 1999 Apr 1;13(7):768-85.
251. Benhamou S, Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat Res.* 2000 Apr;462(2-3):149-58.
252. Ashwood-Smith MJ, Edwards RG. DNA repair by oocytes. *Mol Hum Reprod* 1996;2:46-51.
253. Fritz-Niggli H, Schaeppi-Buechi C. Adaptive response to dominant lethality of mature (class A) and immature (class B) oocytes of *D. Melanogaster* to low doses of ionizing radiation: effects in repair-proficient (yw) and repair-deficient strains. *Int J Radiat Biol* 1991;59:175-184.
254. Jacquet P, Buset J, Neefs M, Vanckerkom J. Studies on the adaptive response in mouse female germ cells X-irradiated in vitro at two different stages of maturation. *In vivo* 2008;22:179-186.
255. Masui Y, Pedersen RA. Ultraviolet light-induced unscheduled DNA synthesis in mouse oocytes during meiotic maturation. *Nature* 1975; 257:705-706.
256. Pedersen RA, Brandriff B. Radiation- and drug-induced DNA repair in mammalian oocytes and embryos. *Basic Life Sci* 1980;15:389-410.
257. Adriaens I, Smitz J, Jacquet P. The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages. *Hum Reprod Update.* 2009 May-Jun;15(3):359-77.
258. Pan H, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM. Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. *Dev Biol* 2005; 286:493-506.
259. Menezes Y, Russo G, Tosti E, Mouatassim SE, Benkhalifa M. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:513-520.
260. Zheng P, Schramm RD, Latham KE. Developmental regulation and in vitro culture effects on expression of DNA repair and cell cycle checkpoint control genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Biol Reprod* 2005;72:1359-1369.
261. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem.* 1997 Apr 11;272(15):10004-12.
262. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabiánová E, Srám RJ, Knudsen LE, Barale R, Fucic A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006 Aug 30;600(1-2):37-45.

263. Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* 1998 Feb 15;58(4):604-8.
264. Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Wiencke JK, Kelsey KT (2002) A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in XRCC1 and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research*;62(16):4630–4636.
265. Itin PH, Sarasin A, Pittelkow MR. Trichothiodystrophy: update on the sulfur deficient brittle hair syndromes. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 891–920.
266. Sung P, Bailly V, Weber C, Thompson LH, Prakash L, Prakash S. Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature.* 1993 Oct 28;365(6449):852-5.
267. Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, Dong Q, Shete S and Wu X: From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair* 2: 901-908, 2003.
268. Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, et al: XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 21: 551-555, 2000.
269. Freitas AA, de Magalhães JP. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutat Res.* 2011 Jul-Oct;728(1-2):12-22.
270. Tenzer, A. et al. (2002) Signal transduction inhibitors as radiosensitizers. *Curr. Med. Chem. AntiCancer. Agents* 2, 727–742
271. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 2006 Sep;12(9):440-50.
272. Tomicic, M.T. et al. (2002) Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidine kinase expressing cells: critical role of DNA breaks, Bcl-2 decline and caspase-9 activation. *Oncogene* 21, 2141–2153
273. Lips, J. and Kaina, B. (2001) DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis* 22, 579–585
274. L. Szilard, On the nature of the ageing process, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 45 (1959) 30–45.
275. R. Arking, *The Biology of Aging: Observations and Principles*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 2006.
276. D.B. Lombard, K.F. Chua, R. Mostoslavsky, S. Franco, M. Gostissa, F.W. Alt, DNA repair, genome stability and aging, *Cell* 120 (2005) 497–512.
277. J.P. de Magalhaes, Open-minded scepticism: inferring the causal mechanisms of human ageing from genetic perturbations, *Ageing Res. Rev.* 4 (2005) 1–22.
278. Perez GI, Jurisicova A, Matikainen T, Moriyama T, Kim MR, Takai Y, Pru JK, Kolesnick RN, Tilly JL. A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. *FASEB J* 2005;19:860–862.
279. de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CW, te Velde ER. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biol Reprod* 2004;70:419–424.
280. Westergaard CG, Byskov AG, Andersen CY. Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age. *Hum Reprod* 2007;22:2225–2231.
281. Hassold, T. and Chiu, D. (1985) Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum. Genet.*, 70, 11–17.
282. Battaglia, D.E., Goodwin, P., Klein, N.A. and Soules, M.R. (1996) Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum. Reprod.*, 11, 2217–2222.

283. Volarcik, K., Sheean, L., Goldfarb, J., Woods, L., Abdul-Karim, F.W. and Hunt, P. (1998) The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum. Reprod.*, 13, 154–160.
284. Liu L, Keefe DL. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum Reprod* 2002;17:2678–2685.
285. Gaulden ME. Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. *Mutat Res* 1992;296:69–88.
286. Pripp U, Eriksson-Berg M, Orth-Gomer K, Schenck-Gustafsson K, Landgren BM. Does body mass index, smoking, lipoprotein levels, surgically induced menopause, hormone replacement therapy, years since menopause, or age affect hemostasis in postmenopausal women? *Gend Med* 2005;2:88–95.
287. Eppig JJ, O'Brien MJ. In vitro maturation and fertilization of oocytes isolated from aged mice: a strategy to rescue valuable genetic resources. *Assist Reprod Genet* 1995;12:269–273.
288. Baynes JW. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol* 2001;36:1527–1537.
289. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E685–E694.
290. Tatone C, Carbone MC, Di Cola M, Marci R, Amicarelli F. Possible role of carbonyl stress in ovarian aging. *Hum Reprod* 2007;22:i75.
291. Jinno M, Takeuchi M, Watanabe A, Teruya K, Hirohama J, Eguchi N, Miyazaki A. Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. *Hum Reprod.* 2011 Mar;26(3):604-10.
292. Thomas MC, Baynes JW, Thorpe SR, Cooper ME. The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease. *Curr Drug Targets* 2005;6:453–474.
293. Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley PJ. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes* 2003;52:2110–2120.
294. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003;9:294–299.
295. Slyskova J, Naccarati A, Polakova V, Pardini B, Vodickova L, Stetina R, Schmuczerova J, Smerhovsky Z, Lipska L, Vodicka P. DNA damage and nucleotide excision repair capacity in healthy individuals. *Environ Mol Mutagen.* 2011 Aug;52(7):511-7.
296. Paz-Elizur T, Elinger D, Leitner-Dagan Y, Blumenstein S, Krupsky M, Berrebi A, Schechtman E, Livneh Z. 2007. Development of an enzymatic DNA repair assay for molecular epidemiology studies: Distribution of OGG activity in healthy individuals. *DNA Repair (Amst)* 6:45–60.
297. Sturgis, E.M., et al., 2000. XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 21, 2219–2223
298. . Au, W.W., et al., 2003. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ. Health Perspect.* 111, 1843–1850.
299. Görgün E, Güven M, Unal M, Batar B, Güven GS, Yenerel M, Tatlipinar S, Seven M, Yüksel A. Polymorphisms of the DNA repair genes XPD and XRCC1 and the risk

- of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Sep;51(9):4732-7.
300. Unal M, Guven M, Batar B, Ozaydin A, Sarici A, Devranoglu K. Polymorphisms of DNA repair genes XPD and XRCC1 and risk of cataract development. *Exp Eye Res.* 2007;85:328–334.
301. Gu A, Ji G, Liang J, Xia Y, Lu N, Wu B, Wang W, Song L, Wang S, Wang X. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and the risk of idiopathic azoospermia in a Chinese population. *Int J Mol Med.* 2007 Nov;20(5):743-7.
302. Vural P, Degirmencioglu S, Dogru-Abbasoglu S, Saral NY, Akgul C, Uysal M. Genetic polymorphisms in DNA repair gene APE1, XRCC1 and XPD and the risk of pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Oct;146(2):160-4.
303. Attar R, Cacina C, Sozen S, Attar E, Agachan B. DNA repair genes in endometriosis. *Genet Mol Res.* 2010 Apr 6;9(2):629-36.
304. Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, Dong Q, Shete S, Wu X. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair (Amst).* 2003 Aug 12;2(8):901-8.
305. Dogru-Abbasoglu S, Tanrikulu S, Ademoğlu E, Erbil Y, Ozderya A, Karadağ B, Uysal M. Polymorphisms of DNA base-excision repair genes APE/Ref-1 and XRCC1 are not associated with the risk for Graves' disease. *Cell Biochem Funct.* 2009 Oct;27(7):462-7.
306. Campalans A, Marsin S, Nakabeppu Y, O'Connor TR, Boiteux S, Radicella JP. XRCC1 interacts with multiple DNA glycosylases: A model for its recruitment to base excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2005; 4: 826–835.
307. Marsin S, Vidal AE, Sossou M, et al. Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem* 2003; 278: 44068–44074.
308. Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD, Mark EJ, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis.* 2000 May;21(5):965-71.
309. Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS, Winkel S, Lunn RM, Tse CK, Tse CKJ, Aeton A, Mohrenweiser HW, Newman B, Bell DA (2001). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10: 217-222.
310. Moullan N, Cox DG, Angele S, Romestaing P, Gerard JP, Hall J (2003). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 1168-1174.
311. Huang Y, Li L, Yu L. XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: a meta-analysis. *Mutagenesis.* 2009 Jul;24(4):331-9.
312. Roberts MR, Shields PG, Ambrosone CB, Nie J, Marian C, Krishnan SS, Goerlitz DS, Modali R, Seddon M, Lehman T, Amend KL, Trevisan M, Edge SB, Freudenheim JL. Single-nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and association with breast cancer risk in the web study. *Carcinogenesis.* 2011 Aug;32(8):1223-30.
313. Sreeja L, Syamala VS, Syamala V, Hariharan S, Raveendran PB, Vijayalekshmi RV, Madhavan J, Ankathil R (2008). Prognostic importance of DNA repair gene polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln in lung cancer patients from India. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134: 645-652.
314. Kalikaki A, Kanaki M, Vassalou H, Souglakos J, Voutsina A, Georgoulas V, Mavroudis D (2009). DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer,* 10: 118-123.

315. Tae K, Lee HS, Park BJ, Park CW, Kim KR, Cho HY, Kim LH, Park BL, Shin HD (2004). Association of DNA repair gene XRCC1 polymorphisms with head and neck cancer in Korean population. *Int. J. Cancer*. 111: 805-808.
316. Artac M, Bozcuk H, Pehlivan S, Akcan S, Pehlivan M, Sever T, Ozdogan M, Savas B (2010). The value of XPD and XRCC1 genotype polymorphisms to predict clinical outcome in metastatic colorectal carcinoma patients with irinotecan-based regimens. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 136: 803-809.
317. Yuan T, Deng S, Chen M, Chen W, Lu W, Huang H, Xia J. Association of DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms with genetic susceptibility to gastric cancer in a Chinese population. *Cancer Epidemiol*. 2011 Apr;35(2):170-4.
318. Rybicki BA, Conti DV, Moreira A, Cicek M, Casey G, Witte JS (2004). DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 13: 23-29.
319. Langsenlehner T, Renner W, Gerger A, Hofmann G, Thurner EM, Kapp KS, Langsenlehner U. Association between single nucleotide polymorphisms in the gene for XRCC1 and radiation-induced late toxicity in prostate cancer patients. *Radiother Oncol*. 2011 Mar;98(3):387-93.
320. Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, Das-gupta E, Russell N (2004). Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res*. 10: 2675-2680.
321. Seedhouse C, Russell N (2007). Advances in the understanding of susceptibility to treatment-related acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol*. 137: 513-529.
322. Luo YF, Wang BB, Zhou Z, Ding XC, Hu SS, Zhou GK, Ma X, Qi YH. Polymorphisms of the DNA repair genes XPD and XRCC1 and the risk of age-related cataract development in Han Chinese. *Curr Eye Res*. 2011 Jul;36(7):632-6.
323. Jeon YT, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. DNA repair gene XRCC1 Arg399Gln polymorphism is associated with increased risk of uterine leiomyoma. *Hum Reprod*. 2005 Jun;20(6):1586-9.
324. Yang Y, Zhai XD, Gao LB, Li SL, Wang Z, Chen GD. Genetic polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 and risk of uterine leiomyoma. *Mol Cell Biochem*. 2010 May;338(1-2):143-7.
325. Deligezer U, Dalay N. Association of the XRCC1 gene polymorphisms with cancer risk in Turkish breast cancer patients. *Exp Mol Med*. 2004 Dec 31;36(6):572-5.
326. Karahalil B, Kocabas NA, Ozçelik T. DNA repair gene polymorphisms and bladder cancer susceptibility in a Turkish population. *Anticancer Res*. 2006 Nov-Dec;26(6C):4955-8.
327. Cengiz SL, Acar H, Inan Z, Yavuz S, Baysefer A. Deoxy-ribonucleic acid repair genes XRCC1 and XPD polymorphisms and brain tumor risk. *Neurosciences (Riyadh)*. 2008 Jul;13(3):227-32.
328. Batar B, Güven M, Bariş S, Celkan T, Yildiz I. DNA repair gene XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2009 Jun;33(6):759-63.
329. Tumer TB, Yilmaz D, Tanrikut C, Sahin G, Ulusoy G, Arinç E. DNA repair XRCC1 Arg399Gln polymorphism alone, and in combination with CYP2E1 polymorphisms significantly contribute to the risk of development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2010 Oct;34(10):1275-81.
330. Canbay E, Cakmakoglu B, Zeybek U, Sozen S, Cacina C, Gulluoglu M, Balik E, Bulut T, Yamaner S, Bugra D. Association of APE1 and hOGG1 polymorphisms with

- colorectal cancer risk in a Turkish population. *Curr Med Res Opin.* 2011 Jul;27(7):1295-302.
331. Engin AB, Karahalil B, Karakaya AE, Engin A. Association between XRCC1 ARG399GLN and P53 ARG72PRO polymorphisms and the risk of gastric and colorectal cancer in Turkish population. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2011 Sep 1;62(3):207-14.
332. Güven M, Unal M, Batar B, Eroğlu E, Devarnoğlu K, Tamçelik N, Uçar D, Sarici A. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and risk of primary open angle glaucoma (POAG). *Mol Vis.* 2007 Jan 5;13:12-7.
333. Batar B, Guven M, Onaran I, Tutluoglu B, Kanigur-Sultuybek G. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and the risk of asthma in a Turkish population. *Allergy Asthma Proc.* 2010 Jul-Aug;31(4):349-54.
334. Yosunkaya E, Karakurt F, Cetin E, Ozgonenel L, Onaran I, Batar B, Guven M, Sultuybek GK. Rheumatoid arthritis risk associates with DNA repair gene XRCC1 Arg399Gln polymorphism in Turkish patients. *Rheumatol Int.* 2011 Jan 26.
335. Ji G, Gu A, Zhu P, Xia Y, Zhou Y, Hu F, Song L, Wang S, Wang X. Joint effects of XRCC1 polymorphisms and polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on sperm DNA damage and male infertility. *Toxicol Sci.* 2010 Jul;116(1):92-8.
336. S.Z. Abdel-Rahman, R.A. El-Zein, The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK, *Cancer Lett.* 159 (2000) 63–71.
337. Zheng, H., Wang, Z., Shi, X., and Wang, Z. (2009). XRCC1 polymorphisms and lung cancer risk in Chinese populations: a meta-analysis. *Lung Cancer* 65, 268–273.
338. Li, H., Ha, T. C., and Tai, B. C. (2009). XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: a meta-analysis. *Breast* 18, 183–191.
339. Kocabaş NA, Karahalil B. XRCC1 Arg399Gln genetic polymorphism in a Turkish population. *Int J Toxicol.* 2006 Sep-Oct;25(5):419-22.