

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

**PRİMER AMENORE VE CİNSİYET BELİRSİZLİĞİ GÖSTEREN
OLGULARIN SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER SİTOGENETİK
TEKNİKLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RABİA AKEL

ELAZIĞ- 2006

ONAY SAYFASI

Prof.Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Halit ELYAS

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halit ELYAS

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halit Elyas _____

Doç. Dr. İhsan Halifeoğlu _____

Yrd. Doç. Dr. Selahattin Kumru _____

Yrd. Doç. Dr. S. Erhan Deveci _____

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Yüce _____

TEŞEKKÜR

“Primer Amenore Ve Cinsiyet Belirsizliği Gösteren Olguların Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Tekniklerle Değerlendirilmesi” adlı yüksek lisans tezimin hazırlanmasında bilgi ve önerilerini eksik etmeyen danışman hocam Prof. Dr. Halit ELYAS’ a, saygı değer hocam Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YÜCE ve laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Arş. Gör. Ebru ETEM’ e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmaya dahil edilen hastaları sağlayan Fırat Üniversitesi Araştırma Hastanesi, Elazığ Devlet Hastanesi ve Ağrı Jinekoloji- Memorial Hastanesi Kadın Doğum Kliniklerine teşekkür ederim. Yüksek lisansa başladığım günden itibaren maddi ve manevi katkılarını hep yanımda hissettiğim aileme ayrıca teşekkür ederim.

FÜBAP- 1052 numaralı proje kapsamında çalışmama maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ ne de teşekkür ederim.

Rabia AKEL

İÇİNDEKİLER

1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ.....	3
3.1 Cinsel Gelişme.....	3
3.1.1 Gonad farklılaşması.....	3
3.1.2 Dış genital organların farklılaşması.....	6
3.2 Anormal Cinsel Gelişme.....	7
3.3 Overlerin Embriyolojisi ve Gelişimi.....	13
3.3.1 Farklılaşmamış Gonad Evresi.....	14
3.3.2 Farklılaşma Evresi.....	14
3.3.3 Oogonial Çoğalma ve Oosit Oluşumu.....	16
3.3.4 Foliküllerin Oluşumu.....	17
3.3.5 Ön Hipofiz.....	17
3.4 Amenore.....	19
3.4.1 X Kromozom Delesyonları ve Primer Amenore.....	22
3.4.2 Amenorrhea'nın başlıca nedenleri.....	23
3.4.2.1 Terminal Organlara Bağlı Nedenler.....	23
3.4.2.1.1- Hymen İmperforatus.....	24
3.4.2.1.2 Vajen enine septus.....	23
3.4.2.1.3 Vajen aplazisi	24
3.4.2.1.4 Uterus agenezisi.....	24
3.4.2.1.5 Uterus hipoplazisi.....	24
3.4.2.1.6 Uterus snişleri (Asherman Sendromu).....	25
3.4.2.1.7 Gestagenlere Bağlı Endometrial atrofi.....	25

3.4.2.1.8 Histerektomi.....	26
3.4.2.2 Ovarial Amenore Nedenleri.....	26
3.4.2.2.1 Over Agenezisi.....	26
3.4.2.2.2 Over Disgenezi.....	26
3.4.2.2.3 Prepuberter Kastrasyon.....	27
3.4.2.2.4 Rezistan Over Sendromu.....	27
3.4.2.2.5 Polikistik Over Sendromu (PKOS).....	27
3.4.2.2.6 Hipertekozis.....	28
3.4.2.2.7 Hormon Salgılayan Over Tümörleri.....	28
3.4.2.2.8 Erken Menapoz.....	28
3.4.2.2.9 Overlerin Alınması.....	29
3.4.2.3 Hipotalamo- Hipofizer Amenore Nedenleri.....	29
3.4.2.3.1 Serebral Enfeksiyonlar.....	29
3.4.2.3.2 Serebral Tümörler.....	29
3.4.2.3.3 Galaktore- Amenore Sendromu(Hiperprolaktinemi).....	29
3.4.2.3.4 Sheehan Sendromu.....	29
3.4.2.3.5 Hipogonodotropik- Hipogonodizm.....	29
3.4.2.3.6 Emesyonel Şok.....	30
3.4.2.3.7 Anorexia Nevrosa.....	30
3.4.2.3.8 Pseudocyesis (yalancı gebelik).....	30
3.4.2.4 Genel Nedenler.....	30
3.4.2.4.1 Tiroid hastalıkları.....	30
3.4.2.4.2 Sürrenal Hastalıkları.....	31
3.4.2.4.3 Diabetes Mellitus.....	31
3.4.2.4.4 Siroz.....	32

3.4.2.4.5 Genital Tüberküloz.....	32
3.4.2.4.6 Böbrek Hastalıkları.....	32
3.4.2.4.7 Kalp ve Kan Hastalıkları.....	32
4.GEREÇ VE YÖNTEM	34
4.1 Sitogenetik ve FISH Preparatlarının Hazırlanması.....	35
4.1.1. Kullanılan solüsyonlar, araç ve gereçler.....	35
4.1.2. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	35
4.1.3. Periferik Kan Kültür Ortamının Hazırlanması.....	36
4.1.4. Preparasyon İşlemleri.....	36
4.2 Periferik Kan (PK)'dan İnterfaz Preparatı Hazırlanması.....	37
4.3 FISH (Fluoresans İn- Situ Hibridizasyon) Tekniği.....	37
4.3.1 Kullanılan solüsyonlar.....	37
4.3.2. Kullanılan Gereçler.....	38
4.3.3. Prob	38
4.3.4 Hedef Örneklerin Hazırlanması.....	38
4.3.4.1 Preparatların Hazırlanması.....	38
4.3.4.2 Probun Hazırlanması.....	39
4.3.4.3 Denatürasyon.....	39
4.3.4.4 Hibridizasyon.....	39
4.3.4.5 Hibridizasyon Sonrası Yıkama.....	39
4.4 DNA İzolasyonu.....	39
4.4.1 Kullanılan solüsyon ve gereçler.....	40
4.4.2 İzolasyon İşlemi.....	40

4.5 PZR Protokolü.....	41
4.5.1 Kullanılan Solüsyon ve Gereçler.....	41
4.5.2 PZR Kurulması İşlemi.....	42
4.5.3 Agaroz Jel Elektorforezi.....	42
5. BULGULAR.....	43
5.1 Sitogenetik Bulgular.....	43
5.2 FISH Analiz Sonuçları.....	51
5.3 Moleküler Genetik Analiz Sonuçları.....	52
6. TARTIŞMA.....	53
7. KAYNAKLAR.....	61
8. ÖZGEÇMİŞ.....	70

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Anormal cinsel gelişmede X ve Y kromozomlarında etkilenmiş bölgeler.....	4
Şekil 2 Y kromozomu üzerinde cinsiyet belirleyen SRY bölgesi	5
Şekil 3: : SRY geninde nokta mutasyonları	12
Şekil 4: Ovarian fonksiyon üzerine Xq terminal delesyonlarının etkilerini gösteren grafik.....	22
Şekil 5: 46, X, del (X) (q23) karyotipine sahip olgunun metafaz plağı...	45
Şekil 6: 46, X, i (Xq) karyotipine sahip olgunun metafaz plağı.....	46
Şekil 7: 46, XX, inv (9) (p13;q22) karyotipine sahip olgunun metafaz plağı.....	47
Şekil 8: 45, X karyotipine sahip olgunun metafaz plağı.....	49
Şekil 9: SRY lokus spesifik (kırmızı işaretli) ve sentromerik X (yeşil işaretli) prob kullanılarak yapılan interfaz FISH sonucu elde edilen sinyallere sahip interfaz hücresi.....	51
Şekil 10: SRY genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR sonrası elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	52

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Anormal cinsel farklılaşmayla ilgili hastalıklar.....	7
Tablo 2: Androjen duyarsızlık sendromları.....	10
Tablo 3: Turner sendromundaki yapısal anomaliler.....	11
Tablo 4: primer ve sekonder amenoreye özgü karyotipler.....	19
Tablo 5: Primer amenorenin farklı isimlendirilmesi.....	20
Tablo 6: Primer amonore ve Turner sendromu şüphesiyle gelen hastalarda tespit edilen anormal karyotipler ve karşılık gelen sendromlar.....	43

KISALTMALAR LİSTESİ

TDF:	Testis Belirleyici Faktör
SRY:	Sex-determining Faktör
HMG:	Yüksek Hareketli Gurup
AMH:	Anti Mülleriyan Hormon
hCG:	İnsan Koryonik Gonodotropin Hormon
HSD:	Hİdroksi Steroid Dehidrogenaz
DHT:	Dihidro Testesteron
FSH:	Folikül Uyarıcı Hormon
SD:	Standart Sapma
GnRH:	Gonadotropin Serbesleştirici Hormon
IGF-1:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
TS:	Turner Sendromu
TBC:	Tüberküloz
PKOS:	Polikistik Over Sendromu
FISH:	Floresans <i>in situ</i> Hibridizasyon
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ADS:	Androjen Duyarsızlık Sendromu
UTS:	Ullrich- Turner Sendromu
PG:	Procto Glandin

1.ÖZET

Kromozomal ve gonadal fenotipik cinsiyet arasındaki beraberliğin olması cinsiyet dönüşümü olarak bilinmektedir. SRY (Sexs **R**egion of the **Y** kromosome) yaklaşık olarak Y kromozomunun kısa kolunun psödootozomal bölgesinde yer almaktadır. Gendeki delesyon veya translokasyonların, insanlarda görülen cinsiyet belirsizliği ve primer amenoreye neden olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Primer amenore ve cinsiyet belirsizliğiyle beraberlik gösteren kromozomal anomalilerin saptanarak bu tür hastalarda farklı kromozomal anomalilerin (yeniden düzenlemelerin) oranlarının bulunması amaçlanmıştır. Cinsiyet belirsizliği gösteren bireylerde karyotipin sitogenetik yöntemle bulunması ve bunu takiben SRY geninin varlığının belirlenmesi bu hastaların tanısında önemli bir yer almaktadır.

Çalışmaya 62 primer amenore, 10 ambigius genitalya, 8 Turner Sendromu ve 7 hipogonadotropik hipogonadizm ön tanısıyla gelen toplam 87 hasta dahil edildi. 87 hastada, konvansiyonel sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik incelemeleri sonucunda 12. 86% (9)'unda anormal karyotip tespit edildi. Toplam 62 primer amenore ve 10 ambigius genitalyalı olguya lokus spesifik SRY ve sentromerik X dual probu kullanılarak yapılan interfaz FISH ve PZR çalışmasında iki olguda SRY pozitifliği gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: primer amenore, cinsiyet belirsizliği, interfaz- FISH, SRY,

2. ABSTRACT

The union between chromosomal and gonadal phenotypic sex is considered as sex transformation. SRY gene is localised in the pseudoautosomal regions of the short arm of Y chromosome. It has shown that the deletions or translocations of the gene causes ambiguous genitalia and Primary Amenorrhoea seen in human.

This study, it has been aimed at finding the rate of the different chromosomal anomalies in these patients by determining the chromosomal anomalies which appear with primary amenorrhoea and sex indefiniteness. It takes an important position to find the karyotype in those who are diagnosed as sex indefiniteness by the cytogenetics method and along with this event, to determine the existence of the SRY gene in the diagnosis of these patients.

In this study 87 patients have been analyzed this are 62 Primary Amenorrhoea, 10 ambiguous genitalia, 8 Turner syndrome, and 7 Hypogonadotropic hypogonadism. In 87 patients conventional cytogenetics, molecular cytogenetics and molecular genetics studies showed 9 (12. 86%) abnormal karyotypes. It has been done FISH, PCR was studied on totaly 62 Primary Amenorrhoea patients and on 10 ambiguous genitalia patients by using SRY locus specific and centromeric dual probe. It has been observed positive SRY in 2 patients with ADS.

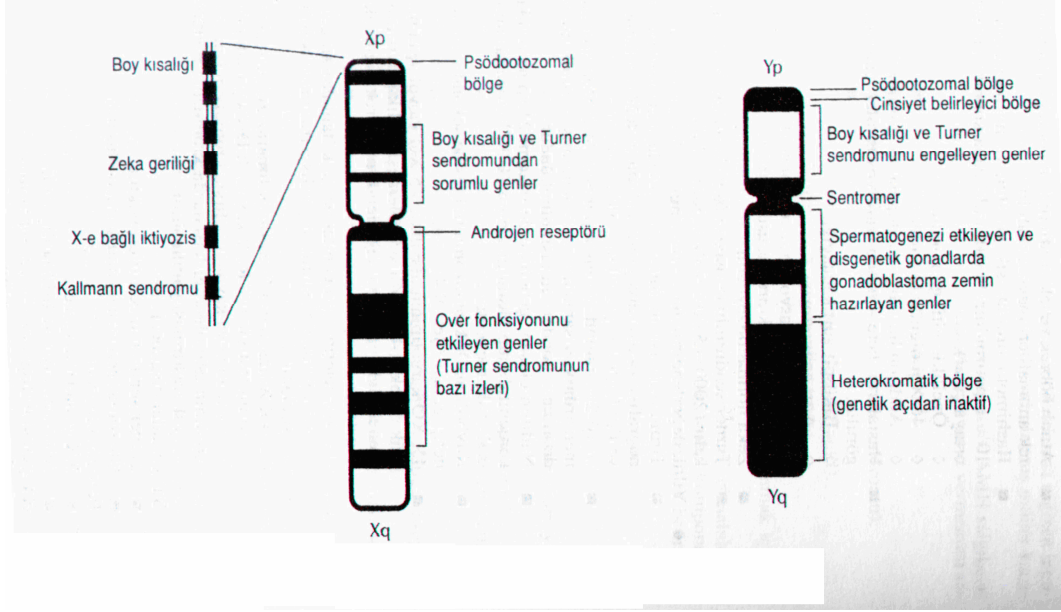
Key words: Primary Amenorrhoea, ambiguous genitalia, interfaz- FISH, SRY,

3.GİRİŞ

3.1 Cinsel gelişme; Cinsel kimlik; genetik cinsiyet, gonadal cinsiyet, iç ve dış genital organlar, ikincil cinsel karakterler ve çevrenin etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Cinsel kimliğin ortaya çıkması prenatal dönemde birbirini takip eden olayları içeren bir süreci izler. Bunlar; genetik cinsiyet, gonad farklılaşması, hormonal ortam, merkezi sinir sistemi, iç ve dış genital organların gelişimi şeklindedir. Memelilerde cinsel gelişim kompleks bir süreçtir. Bu süreç gonadların gelişimi ve farklılaşması olmak üzere iki basamak içerir (86).

3.1.1Gonad farklılaşması; gonadlar mezonefrik kanalların üzerindeki kabartılar şeklinde gelişmeye başlar. Gebeliğin 4- 6. haftalarında germ hücreleri göç eder. Germ hücreleri gonad gelişimini indüklemeyiz. Gebeliğin 6. haftasında gonad bipotansiyeldir ve bazı yapılardan oluşur. Bunlar; germ hücreleri, özelleşmiş epitelyum hücreleri (potansiyel granuloza ve sertoli hücreleri), mezenşim (potansiyel teka ve Leyding hücreleri) ve mezonefrik kanal sistemidir (Wolffian ve Müllerian) (20).

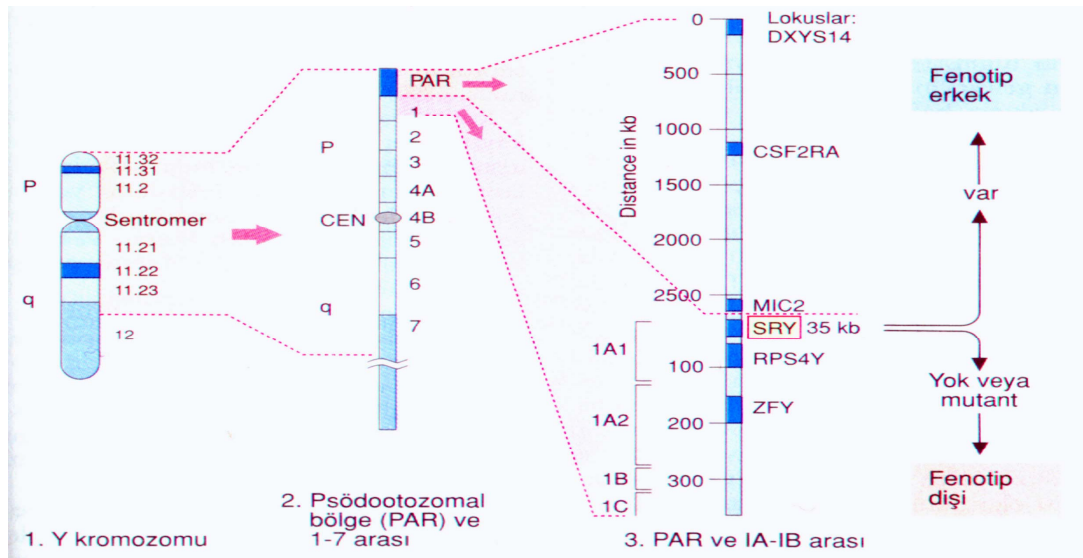
Y kromozomunun kısa kolunun distal ucu cinsiyet belirleyici bölgeyi içerir ve X kromozomunun kısa kolunun distal kısmının (psödootozomal bölge) (Xp22.3) homologudur(11, 25, 74). Mayoz sırasında bu bölgede krosingver ile X ve Y'nin homolog eşleşmesi vardır. Genler çiftler halinde kendini gösterir. Herhangi bir X inaktivasyonu yoktur. Bu bölgede oluşacak delesyonlar; kısa boy, zeka geriliği, X bağlantılı iktiyozis, kalman sendromu ve cinsiyet belirsizliği gibi hastalıklar ortaya koyar (40) anormal cinsel gelişimde X ve Y kromozomunun etkilenmiş bölgeleri ve oluşabilecek hastalıklar Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1- Anormal cinsel gelişmede X ve Y kromozomları ve etkilenmiş bölgeler (86).

Testis belirleyici faktör (TDF) geni, Y'nin kısa kolunun distal kısmındadır (41, 81). TDF'nin kaybı gonadal disgeneziye yol açar. Bu genin X kromozomuna aktarımı bir XX erkeğini oluşturur (4).

SRY(sex-determining region) geni Y kromozomunun psödotozomal bölgesinde potansiyel bir TDF adayıdır ve cinsiyet değiştirme potansiyeline sahip bir gendir (23, 90). Cinsel farklılaşmanın uygun zamanlarında exprese edilir, XY erkeklerde bulunur, XX dişilerde yoktur. SRY, genin protein ürünü 204 aminoasit içerir. DNA'yı bağlayan 80 aminoasitlik kısma sahiptir. Y kromozomu ve üzerinde yer alan SRY geni Şekil 2'de verilmiştir (76).



Şekil 2- Y kromozomu üzerinde, cinsiyeti belirleyen SRY bölgesi
(98).

SRY'nin hareketli HMG (high-mobility- group) box bölgesi p450 aromataz ve antimüllerien hormonu (AHM) inhibe edici madde MIS (Mullerian inhibiting substance) olarak bilinir (28, 48, 34). AHM glukoprotein farklılaşma faktörlerinden transforme edici büyüme faktörü- β ailesinin bir üyesidir. İnhibin ve aktivinde bu ailenin bir üyesidir (39). AHM geni 19'ncü kromozomunun kısa kolunda, reseptörü ise 12. kromozom üzerindedir (32, 51). Sertoli hücreleri tarafından sentezlenir (sentez SRY tarafından aktive edilir). Testesteronun ortaya çıkması ve wolffian kanalların uyarılmasından önce oluşur. Gen mutasyonu uterus ve tubaların gerilemesini engeller. Oositlerin mayoz bölünmesi sırasında inhibe edici etkisi vardır. Testislerin inguinal kanal içine inişini kolaylaştırır. Gebelikte sürfaktan üretimi inhibe edilir (51). Testesteron puberteden sonra AHM'yi inhibe eder. Yaşamın ikinci on yılına kadar yetişkin kadınlarda AHM bulunmaz.

Doğru bir cinsel farklılaşma için WT1, SOX9, DSS ve SF- 1 gibi başka genlere de gerek vardır (55). Otozomal genler germ hücrelerinin göçünü ve

steroidogenetik enzimlerin doğru biçimde ekspresyonunu yönlendirir. Bu olaylar SRY ile kontrol edilmektedir (97).

SF- 1 ve DAX- 1 kökeni belirsiz nükleer reseptörlerdir (42). SF- 1 steroidogenetik enzimlerin ve AHM'nin ekspresyonunda rol alır (28, 31, 76). DAX- 1 mutasyonları adrenal hipoplazisiyle sonuçlanır (42).

Testiküler farklılaşma 6- 7. haftalarda başlar. Sertoli hücreleri kümeleşerek spermatozoik kordların oluşumunu sağlar. Kordun oluşmasından sonra seminifer tübüller meydana gelir. Bir hafta sonra Leyding hücreleri oluşur. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) uyarısı Leyding hücrelerinin hipertrofisine neden olur. Fetal testesteron üretimi 15- 16. haftalarda doruk düzeye ulaşır (97). Y kromozomunun etkisi olmaksızın XX gelişimi görülür.

Overler testislere kıyasla iki hafta sonra gelişir. Foliküller birinci mayoz bölünmenin profazında askıda kalmış oositler içerirler (54). Daha sonra üreme kanalları sisteminin farklılaşması böbreklerin gelişmesiyle başlar.

Testesteron; sekizinci haftada Leyding hücreleri oluşuktan hemen sonra testesteron üretmeye başlar. 15- 18 haftalarda maksimum seviyeye ulaşır. Wolff sisteminin gelişimini uyararak Epididim, Vaz deferans, Seminal veziküllerin oluşmasını sağlar. Testesteron düzeyi; Leyding hücrelerinin gelişmesi, gonadları ağırlığı, 3 β -hidroksi steroid dehidrogenaz (HSD) aktivitesi, hCG konsantrasyonuyla korelasyon gösterir (86).

3.1.2 Dış genital organların farklılaşması; Nötral primordiya, erkek veya dişi genitallere farklılaşma yeteneğine sahiptir. Farklılaşma gonadal steroid sinyallere bağımlıdır. Maskülinizasyon 10. haftada kendini gösterir ve 14. hafta itibari ile tamamlanır (86).

3.2 Anormal Cinsel Gelişme

Gerçek hermafroditte hem testis hem de over dokusu bulunur (45). Erkek psödohermafroditte testisler bulunmasına rağmen dış görünüş dişi fenotiptedir (43). Dişi psödohermafroditte overler bulunmasına rağmen dış görünüş erkek fenotiptedir (70). Anormal cinsel gelişim bozuklukları ve nedenleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1: Anormal Cinsel Farklılaşmayla ilgili hastalıklar

Fetal endokronolojik bozukluklar

- Maskülinize dişiler (dişi psödohermafroditizm)
 - Konjenital adrenal hiperplazi
 - 21- hidroksilaz (p450c21)
 - 11 β - hidroksilaz (p450c11 β)
 - 3 β - hidroksidteroid dehidrojenaz yetersizliği
 - Anne dolaşımında yüksek androjenler
 - İlaç alımı
 - Annenin hastalıkları
 - Aromataz (p450 aromataz) yetersizliği
- Maskülinizasyonu eksik kalmış erkekler (erkek psödohermafroditizmi)
 - Androjen duyarsızlık sendromları
 - 5 α - redüktaz yetersizliği
 - Testesteron biyosentez defektleri
 - 3 β - hidroksidteroid dehidrojenaz yetersizliği
 - 17 α - hidroksilaz (p450c17) yetersizliği

- 17 β - hidroksidteroid dehidrogenaz yetersizliği

- Gonodotropine dirençli testis

- Antimüllerliyen hormon yetersizliği

Gonad gelişim bozuklukları

- Erkek psödohermafroditizmi

- Primer gonad defekti – Swyer sendromu
- Anorşi
 - Gerçek hermafroditizm
 - Gonadal disgenezi
- Turner sendromu
- Mosaizim
- Normal karyotip – Noonan sendromu (86)

Konjenital adrenal hiperplazi (adrenogenital sendrom); Androgenital sendromlu dişilerde maskülinize dış genitaller ve wolff kanal dokusunun var olmadığı normal diş i karakteriskli iç genitaller mevcuttur (65). Dış genitaller belirgin derecede değ işmiş olabilir. Labialar (anterior -posterior) birleşmiş (füzyon) olabilir. Klitoris hipertrofisi olabilir. Palpal bir testisin olması diş i psödohermafroditizimi düş ündüren tek belirteçtir (16). Zamanlaması maskülinizasyonun düzeyine bağı mlıdır. 7- 12. haftalar arasında erken maruz kalma tam bir maskülinizasyon sağ larken, 18- 20. haftada geç maruz kalma sınırlı bir cinsiyet belirsizliğine neden olmaktadır. Klitoris büyüklüğü androjen fazlalığ ının miktarına bağı mlıdır. Tedavi edilmezse ilerleyici tipte virilizasyon potansiyeli devam eder (16, 54).

Yalnızca adrenalde enzim defekti (p450c21) olguların %95'inde görülür (91). Cinsiyet belirsizliğinin en sık görülme nedeni olup otozomal resesiftir (43).

11 β - hidroksilaz yetersizliğinde 11- deoksikortizol, kortizole dönüşemez. 11 β - hidroksilaz enzimi kortizal sentezinde önemli rol oynar ve bu enzimin geni 8. kromozom üzerindedir. Otozomal resesif olarak iletilir. Bu hastalıkta 11 β - hidroksilaz yetersizliği virilizasyon, hipertansiyon ve aşırı sıvı yüklenmesine neden olur (13).

Over ve adrenallerde 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz yetersizliğinde, steroid hormonları üretiminde azalma olur. Virilize dişiler ciddi derecede hastadır (96).

P450c17 eksikliğinde, kortizol, androjen ve östrojen sentezi azalır. Pubertede olgunlaşmayan infantil dişi cinsel organlar mevcuttur (85). FSH ve LH düzeyleri yüksektir. Erkek bebeklerde belirsiz genital yapılar görülür (11).

Erkek psödohermafroditizmde hastalar kalıtsal olarak erkektirler fakat dış genitaler normal erkek görünümünde değildir. Etyolojisinde ki nedenlerden en önemlisi androjenlere karşı duyarsızlıktır. Komplet androjen duyarsızlığı sendromunun da testiküler feminizasyon mevcuttur. Maternal X'e bağlı resesiftir (43).

Dişi psödohermafroditizmde bireyler dişi fenotipe sahip olmasına rağmen uterus ve tubalar yoktur. Pubik kıllanma seyrek. Karyotipi 46, XY'dir. Testisler inguinal halka şeklinde kalmıştır. Androjen duyarsızlığı sendromu primer amenore olgularının %10'un da görülür (54). Gonadal disgenezi ve konjenital vajinal yokluktan sonra primer amenorenin en sık üçüncü nedendir (54, 71).

5 α -yetersizliği otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Bu bireylerde ailevi inkompley erkek psödohermafroditizm, perineal hipospadiyas ve vajinal hipoplazi görülür (11). Anormal androjen sentezi erkek psödohermafroditizminin %4'ünden sorumludur ve bu Tablo 2'de verilmiştir (6).

Tablo2:Androjen Duyarsızlık Sendromları (86)

	<i>5α-redüktaz</i>	<i>Tam</i>	<i>Tam Olmayan</i>	<i>Reifenstein</i>	<i>İnfertil</i>
Geçiş	Otozomal resesif	X' e bağlı resesif	X' e bağlı resesif	X' e bağlı resesif	X' e bağlı resesif
Spermatogenezis	Azalmış	Yok	Yok	Yok	Azalmış
Mülleryen	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Wolffian	Erkek	Yok	Erkek	Erkek	Erkek
Eksternal	Dişi	Dişi	Dişi kliteromegali	Erkek hipospadias	Erkek

Swyer sendromuna sahip bireyler 46,XY karyotipindedir. Dış ve iç genital organlar dişi görünümünde olup gonadlar fibröz bantlar şeklindedir. Neden olarak SRY geninin mutasyonu düşünülmektedir (22).

Anorşi veya vanishing testes sendromu 1/20. 000 gibi bir oranda ender olarak görülür. Doğuştan testisler bulunmaz, seksüel immatürite vardır. Karyotip normal 46,XYşeklindedir. FSH, LH yüksek ve testosteron çok düşüktür. İnfantil erkek dış genital organlar, testisler yoktur, müller kanalları mevcut değildir, iç genital organlar erkektir (2).

Gerçek hermafroditler; hem over hemde testis dokusunun birlikte bulunduğu bireylerdir (18). Bir gonadda her ikisi de mevcut olabilir (ovotestis), bir tarafta over diğerinde tetis olabilir. %50'sinde unilateral ovotestis ya da contralateral over veya testis bulunurken %20'sinde her iki tarafta da ovotestis yapısı vardır. %30'unda bir tarafta over bir tarafta testis yapısı mevcuttur (45). Dörtte üçünde jinekomasti, yarısında menstrüasyon olur. Yaklaşık %60'ı XX, küçük bir kısmı XY'dir. Geri kalan en az bir XX hücre dizini içeren mozaisizim gösterir (90).

Gonodal disgenezili olguları en sık karşılaşılan formu Turner sendromudur. X kromozomlarından birinin yokluğu veya anormalliğidir (25, 54). Vakaları yaklaşık %60'ın da X kromozomu yoktur. Geri kalanlarda ise yapısal bir anormallik ya da mozaizm mevcuttur. Dişi fenotipe sahiptirler (100). Turner Sendromu yaklaşık olarak 2000 canlı dişi doğumda bir görülmektedir. Vakaların yaklaşık %50'sinde, periferik kandan yapılan karyotipik analizler bir X kromozomunun tam kaybını göstermektedir. Vakaların %60'ında paternal X kromozomunun mayoz boyunca kaybedilmesi söz konusudur (75). Turner Sendromuna ait yapısal anomaliler Tablo 3'de verilmiştir.

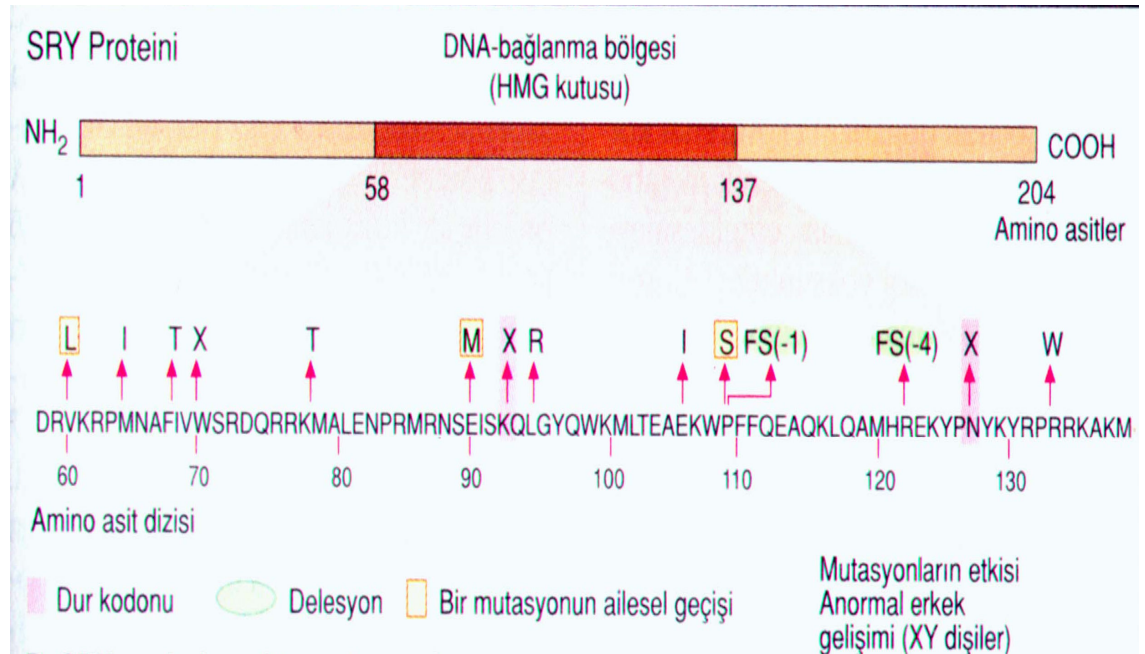
Tablo 3: Turner Sendromunda ki (TS) Yapısal Anomaliler (53).

Kısa boy,
Yele boyun,
Kalkan göğüs,
Geniş aralıklı göğüs uçları,
Ense saç çizgisinin düşüklüğü
Kabitus valgus deformitesi
Band şeklinde gonadlar ve seksüel infantilizm
Atnalı böbrek veya tek taraflı böbreği içeren anormallikler
Kardiovasküler patolojiler
Zeka normal düzeydedir

Saf gonadal disgenezide Turner sendromu belirtileri yoktur. Otozomal gen mutasyonunun sonucudur (46).

XY gonodal disgenezili vakaların çoğunda Turner belirtileri görülmez (11). Puberte gecikmiştir, dış genital organlar dişi karakterdedir, uterus ve fallop tüpleri mevcuttur. Gonadların yaşamın en erken devresinde çıkarılması gerekmektedir. Etiyolojisi konusunda birçok faktör söz konusudur; SRY’i içeren Y kısa kolunun delesyonu, SRY mutasyonu veya SRY’de XXqi mutasyonu bu faktörlerden bazılarıdır (35, 96).

SRY geninde intron bulunmaz ve 1.1 kb’lık bir transkripti kodlar (75). SRY proteininin kritik bölgesi, DNA’ya bağlanma bölgesinde (HMG) tek aminoasitlik bir değişiklik cinsiyet değişimine neden olabilir (68). SRY geninde oluşabilecek nokta mutasyonları Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 3- SRY geninde nokta mutasyonları (98).

Miks gonodal disgenezide 45,X/46,XY en sık görülen formlardır (38,75). Hastalık, belirsiz genitallere sahip erkek hastalar, band şeklinde gonad taşıyan dişiler şeklinde geniş bir çerçeveyi kapsar (96). Noonan sendromu (erkek Turner Sendromu) (XO) kısa boy, kısa boyun, kubitus valgus, düşük kulak, göz ve kalp-damar anomalileri olur. FSH ve LH yüksekliği, inmemiş testis ve infertilite vardır. XO/XY mozaisizmi de görülebilir, tedavisi yoktur (2).

3.3 Overlerin Embriyolojisi ve Gelişimi

İnsan overi, gametlerin salınımından ve steroid hormonların üretiminden sorumludur. Over heterojen siklik fonksiyonlu bir dokudur (79, 94).

Üç ana kısımdan oluşurlar:

Dış korteks

- En dışta tunika albuginea bulunur. Tek katlı kübik epitelle örtülüdür. Folliküller içinde oositler bulunur.

Hilum

- Mezovariyuma bağlantı noktasıdır. Sinirler, kan damarları ve hilus hücrelerini içerir.

Stromal doku

-Mezenşimel hücrelerden farklılaşmıştır. Bağ dokusu ve interstisyel hücreleri oluşturmaktadır. Merkezi medüller bölüm mezonefrik hücreler içermektedir.

Organogenez sırasında fetus overi dört gelişim evresi geçirmektedir:

1-Farklılaşmamış gonad evresi

2-Farklılaşma evresi

3-Oogoniaların çoğalma ve oosit oluşum evresi

4-Follikül oluşum evresi (86)

3.3.1 –Farklılaşmamış Gonad Evresi

Gebeliğin 5. haftasında gonadlar çölemik çıkıntılarda yerlerini alarak gonodal kabartıları oluştururlar. Morfolojik olarak bu aşamada over ve testisler aynı görünümündedirler. Bu evre 7- 10 gün sürer (30). Mezonefroz ve genital kabartı ürogenital kabartıyı oluşturur. Kaynağı tam olarak bilinmemekle beraber somatik hücreler germinal epitelin alttaki mezenşime invazyonu sonucu (mezonefrozdan) oluşmuştur. Primordiyal germ hücreleri primitif ektoderm içinde oluşurlar, spesifik köken hücreler ayırt edilemez. İlk kez döllenmeden sonra 3.ncü hafta sonunda tanımlanırlar. Primitif endoderm ve vitellus kesesi içinde lokalizedirler. Gonodal kabartı germ hücrelerinin sağ kalabildiği tek yerdir. Germ hücreleri genital kabartıların dorsal mezenter kenarı boyunca göç eder. Germ hücreleri göç sırasında çoğalmaya başlar, gebeliğin 6. ayına gelindiğinde 10.000 germ hücresine ulaşılır (67).

3.3.2 Farklılaşma Evresi

Gonad sonunda testise dönüşecekse farklılaşma 6- 9. haftalarda olur. Fetus dişi cinsiyette ise gonad olgunlaşmadan önce iç ve dış genitaler farklılaşır (63, 94).

Testis belirleyici faktör (TDF- testis determining factor) Y kromozomu üzerindeki genin bir ürünüdür (74,81). En iyi aday Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde lokalize olmuş SRY genidir (90). SRY geninin protein ürünü bir DNA bağlayıcı alan içerir. Normal testis gelişimi için başka genlere de gerek vardır. SHOX (Short Stature **H**omeobox **G**ene) genleri bunlardan biri olup (SRY box bölgesiyle benzerlik vardır) DNA bağlayıcı sekansa (dizine) sahiptirler. SRY ekspresyonu fetal yaşamda genital tümsekle sınırlı olmasına rağmen yetişkinin germ hücrelerinde de aktif halde bulunur (81). Erkek fenotip Atimülleriye Hormon (AMH) ve testesterona bağımlıdır. Bu fetal gonodal ürünlerin yokluğunda dişi

fenotipi oluşur (97). AMH, müller kanallarının oluşumunu inhibe eder (32). Bu işlem 7. haftada başlar. AMH' nin gerilemesi (regresyonu) Sertoli hücrelerinin yeterli sayıda olup olmamasına ve AMH reseptörünün regülasyonuna bağlıdır. Mülleriye sisteminin gerilemesinden sonra AMH salgılanır ve granuloza hücrelerinde üretilirler. Oosit olgunlaşması ve foliküler gelişimdeki otokrin-parakrin etkilerle ilişkisi vardır (42). Testis 6- 7.haftalarda olgunlaşmaya başlar. Bu dönem içerisinde sertoli hücreleri belirir ve bir araya toplanarak testiküler kordları oluştururlar. Primordiyal germ hücreler (spermatogonialar) Sertoli hücrelerini oluşturacak testiküler kordlar içine gömülüdürler. Olgunlaşmış Sertoli hücreleri androjen bağlayan protein ve inhibini oluştururlar (7). Sekizinci haftaya doğru Leyding hücreleri farklılaşarak interstisiyel komponentlerin mekanizmal hücrelerini meydana getirirler (66). Leyding hücrelerindeki steroidogeneze önce Sertoli hücreleri tarafından AMH salgılanır. 15-18. haftalarda androjen sekresyonu doruk düzeye ulaştıktan sonra Leyding hücreleri gerilemeye başlar. Doğumda sadece birkaç hücre kalır. Fetal Leyding hücrelerinin siklusu insan koryonik gonodotropinin (hCG) yükselme ve düşüşlerini izler (10. haftada maksimum ve 20. haftada en alt düzeyde). Fetal testislerde hCG düzeyleri annedeki düzeylerin % 5'i kadardır. Testesteron üretimi, androjen üretiminde olduğu gibi 15- 18. haftalarda maksimuma ulaşır ve daha sonra düşer. Başlangıçta fetal hCG düzeylerine yanıt verir. Daha sonra fetal hipofiz tarafından düzeyleri idame ettirilir. Fetal Leyding hücreleri alt düzeylerde regüle olmayı engeller. Bu hücrelerin yerine en sonunda yetişkin kuşak Leyding hücreleri geçer. Bu hücreler pubertede fonksiyoneldir. Yüksek düzeylerde hCG lüteinleştirici hormon (LH) bu hücrelerde "down-regulation" yanıtı oluşturur. Fetal spermatogonialar en eski germ hücrelerinden türemişlerdir ve testiküler kordonlar içinde lokalize olup Sertoli hücreleriyle kuşatılmışlardır. Puberteye kadar

mayoz bölünmeye başlamazlar (67). Testiküler testosteronda artışla birlikte wolf sistemi farklılaşmaya başlar (86). Androjene bağımlı dokuların tümü dihidrotestosterona (DHT) bağımlı değildir (84). Wolf kanalından çıkan oluşumlar intraselüler mediatör olarak testosterona bağımlıdır (44). Ürogenital sinüs ve tüberküllerin gelişimi DHT'yi (dihidrotestosteron) gerektirir (65). Dişi fetüste lokal testosteron yokluğu nedeniyle wolf sistemi kaybolur (44).

3.3.3 – Oogonial Çoğalma ve Oosit Oluşumu

Over farklılaşmasının ilk belirtisi hızlı mitotik çoğalmadır (79). 16- 20.nci haftaya doğru gonadın maksimum oogonial sayısı 6- 7 milyona ulaşır (29). Oogoniyalar mitoz bölünmeyle meydana gelirler. İlk mayotik bölünme evresine geldiklerinde oositler haline dönüşürler. Profazın diploten evresinde duraklama (arrest) olmuştur. Arrest granuloza hücrelerini inhibe eden maddelerce profaz süresince idame ettirilir (30). Oositlerin geçirdiği iki mayotik bölünme sonucu tek bir ovum oluşur. Ovülasyondan önce ilk bölünme, spermin penetrasyonu sırasında ikinci bölünme meydana gelir. Gonodotropin ve büyüme faktörleri mayozun tekrar başlamasına yol açabilir. Foliküler sıvıda sterollerden oluşan bir grup bulunur. Steroller mayozu aktive eder (97).

Germ hücreleri mitoz bölünme, mayozun evreleri, foliküllerin oluşumundan sonra kaybolurlar. Mayoz sırasında oositler gerilemeye başlar. Granuloza hücreleri tarafından kuşatılmaz. Yüzeye göç ederek periton boşluğunda elimine olurlar. Kromozomal anomaliler germ hücre kaybını hızlandırabilir (29, 67, 83).

3.3.4 Foliküllerin Oluşumu

18- 20.nci haftalarda korteks damarlarla perfore edilir. Foliküller oluşmaya başlar. Primordiyal follikül aşamasında, mayozun profazında oositlerin gelişimi durur. Oositler bazal membranlı pregranuloza hücrelerinin tek katmanıyla

kuşatılırlar. Diploten evresindeki oositlerin tümü foliküllerin içinde yerlerini alıncaya kadar süreç devam eder. Primer folikül pregranuloza silindrik katmana dönüşür. Preantral folikül aşamasında daha fazla tamamlanmamış bir granuloza poliferasyonu gerçekleşir. Call-Exner cisimciği oluşur. Bu oluşum gebeliğin 6.ncı ayında saptanır. Antral foliküller gebeliğin bitimine doğru ortaya çıkarlar. Büyük miktarlarda görünmezler. Yalnızca teka hücreleri üçüncü ayda gürülür. Gebeliğin son dönemine gelinceye kadar herhangi bir östrojen üretimi olmaz. Fenotipin gelişmesi için gonadal steroidlere gerek yoktur (29). Doğumda over kistik foliküller içerebilir (79).

3.3.5 Ön Hipofiz

Fetal yaşamın 4- 5. haftalarında gelişmeye başlar. Dokuzuncu haftada median tüberkül belirir. Dördüncü haftaya doğru hipotalamik –hipofizer –portal dolaşım fonksiyonel statü kazanır. 20- 23. haftalarda hipofizer folikül uyarıcı hormon düzeyleri (FSH) maksimum düzeye ulaşır (52). Son 6 haftaya gelene kadar dişi fetustaki düzeyler erkek fetüslere nazaran daha yüksektir. Anensefalik fetüste overler daha küçüktür. Gonadotropin serbesleştirici hormon (GnRH), gonadotropin mevcut değildir. Ancak mayoz yoluyla süreç primordiyal foliküllerin oluşumuna doğru ilerler. Normal fetüste gebeliğin yalnızca ikinci yarısında gonadotropin reseptörleri mevcuttur. Oositlerin kaybı yalnızca gonadotropinlerdeki düşüşle açıklanamaz. Gebeliğin ikinci yarısında foliküler büyüme gonadotropine bağımlıdır (37).

Yenidoğan Overi: Yenidoğanda 20. haftada 4- 5 milyon oosit kaybolur. Yenidoğan oositlerinin yaklaşık % 80'ini kaybetmiştir (37). Over 1cm çapındadır, doğumda ağırlığı 250-350 mg düzeyindedir. Sağ gonad soldakine göre daha büyüktür (79). Dişi fetuslarda hipofiz ve dolaşımdaki FSH/LH düzeyleri daha

yüksek ve doğum sonrası FSH yükselmesi daha uzun sürelidir. Bir yaşına doğru bu oran azalır. Yaşamın ilk 6 ayında foliküllerin gelişimi oldukça sık görülür. Doğum sonrası yükselmeler normal hipotalamo-hipofizer fonksiyon açısından önemlidir. Dişilerde 1- 2 yaşında en düşük düzeylere iner. Dört ile on yaş arası hafifçe yükselir (37, 57).

Çocuklukta Over: Gonodotropin düzeyleri düşer. Over inaktif durumda değildir. Foliküller büyümeye devam ederek bir bölümü antral evreye ulaşır. Oositler aktiftir (52).

Yetişkin Overi: Pubertenin başlangıç döneminde germ hücresinde 300.000- 500.000 oosit vardır (3). Otuz yılda ancak 400- 500 oosit ovulasyon aşamasına gelmeyi başaracaktır (79). Menapozdan önceki son 10- 15 yılda oosit kaybı hızlanacaktır. İnhibin ve insilüne benzer büyüme faktörü I'in (IGF-I) düzeyleri azalır (15). FSH yükselir. Sikluslar kısalmır. Siklusların kısalmasının FSH'nın yükselmesi ve buna bağlı erken oosit seçimiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (61). Foliküller ve oositler atraziye uğrayarak kaybolur (91).

Foliküller prenatal dönemde de gelişimlerini devam ettirirler. Granuloza proliferasyonu, teka interna ve zona pellucida oluşumu bu dönemde gerçekleşir. Primer follikülün gelişmesinden ovulasyona ve ovulatuvar oositlerin oluşumuna kadar geçen süre 25 gündür. Bu sürenin büyük bir bölümünde büyüme gonadotropinlerden bağımsızdır. İleri dönemlerde FSH' ya bağımlı aşamalar görülür. Granuloza hücreleri üzerinde FSH reseptörleri saptanır (61).

Bu aşamada Call-Exner cisimciklerinin, transüda oluşumu ile birlikte granuloza avasküler statüsünü sürdürür. Bunun sonunda bazı folliküllerin büyümesi durur ve regresyona uğrarlar (79).

Ovulasyon; Follikül yeterli gonadotropin uyarısı altındaysa ovulasyon dönemi geçirecektir. Bu aşamada, antrum genişler, granuloza sıkışır, kapsül zayıflar ve oosit dışarı atılır. Fiziksel yolla dışarı atılması prostoglandin (PG) sentezindeki dalgalanmalara bağlıdır (79). Rüptüre folliküllerde köklü değişiklikler olur. Granuloza hücreleri hipertrofiye uğrayarak lüteinize olurlar. Teka hücreleri daha az belirgin haldedir. Korpus luteum LH'nın düşük düzeylerine bağlıdır. Yeni LH kaynakları yoksa hCG hızla yaşlanmaya başlar (52).

3.4 Amenore

Birçok tanımı olmakla birlikte kabul edilen birkaç tanım aşağıdaki gibidir:

1. Büyüme veya sekonder seks karakterlerinin gelişim ve büyümesindeki yokluk ile 14 yaşına kadar adet görememe (43).
2. Sekonder seks karakterlerinin oluşması ile birlikte normal büyüme ve gelişmenin varlığına bakılmaksızın 16 yaşına kadar adet görememe (43).
3. Daha önce adet görmekte olan bir kadında önceki siklus aralarının en az 3 katına uyan toplam zamanda adet olmaması veya 6 ay adet görememesi (43, 86).

Amenore ikiye ayrılmaktadır.

1. Primer amenore
2. Sekonder amenore

Primer ve sekonder amenorede farklı karyotipler ortaya çıkmaktadır bunlar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4: Primer ve Sekonder Amenorede Karyotipler (93)

-
- primer amenorede karyotipler
 - 45, X (%50)

- Mozaik (%25)
 - 46, XX (%25)
 - sekonder amenorede karyotipler
 - 46, XX
 - Mozaikler (45, X / 46, XX)
 - X delesyonu
 - 47, XXX
 - 45, X
-

Primer amenore 16 yaşına kadar hiç adet görmemiş bir bireyi tanımlar. Dişi bireylerin çoğu ırk, iklim, genetik geçiş, beslenme ve sosyal durum gibi faktörlerin etkisiyle 9- 18 yaşları arasında menstruasyon görmeye başlar ve ortalama yaş 12’dir (43, 86, 92). Primer amenore olgularının yaklaşık %30- 40’ı gelişim anormalliğine bağlı bant şeklinde (streak gonad)gonadlara sahiptir (61). Primer amenorede farklı alternatif adlandırmalar mevcuttur bunlar Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5: Primer Amenorenin farklı isimlendirilmesi

- Absent Menses (Menslerin olmaması)
 - Absent Periods (Peryodların olmaması)
 - No Period (Peryodların yokluğu)
 - Primary Amenorrhea
-

Sekonder amenore ise normal menstrüasyon gören bir kadında 6 ay süreyle menstrüel kanamanın olmaması halidir (61).

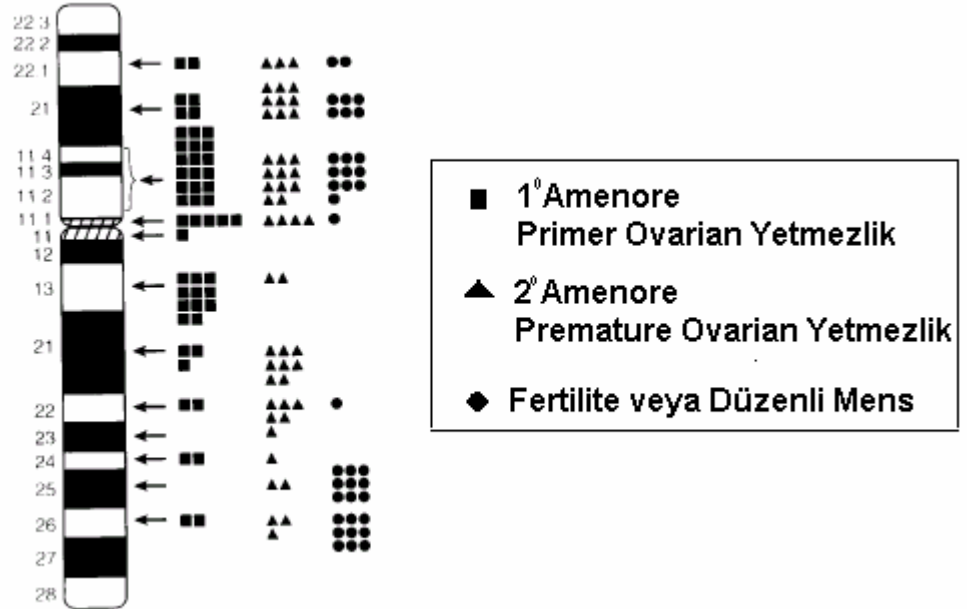
Normal bir menstural fonksiyonun klinik kanıtı, adet kanamasının gözle görülen dış belirtilerine bağlıdır. Akıntının dahili kaynağını dışarıyla birleştiren bir dışa akıtma, akım yolunun olması gereklidir. Bunlar; vagina deliği, vagina kanalı, kolum kanalı ve uterus boşluğunda açıklıktır. Adet kanamasının oluşması, uterus boşluğunu örten endometriumun varlığına ve gelişmesine bağlıdır. Bu doku steroid hormonlarından östrojen ve progesteronun belirgin miktarları ve etkisine bağımlı olarak uyarılır ve ayarlanır (26). Bu hormonlar overlerden salgılanır. Kısacası menstrüel fonksiyonda temel ilkeler;

- Sağlam bir dışarıya akım yolunun olması gereklidir.
- Dışarıya akımın olması için endometrial dökülme olmalıdır.
- Endometrium over hormonlarına bağımlıdır.
- Over fonksiyonu ön hipofize bağımlıdır.
- Hipofiz fonksiyonu gonadotropin- serbestleştirici hormonu (GnRH) varlığını gerektirir (86).

Amenorenin değerlendirilmesi ve erken tanı konulması önemlidir. Çünkü amenoreli kadınlar ovulasyonsuzdur. E2 (östrojen) yokluğunda genital organlarda atrofi ve osteoporoz gerçekleşir. E2 varlığında ise endometrial hiperplazi ve karsinom riski yüksektir. Sekonder seks karakterlerinin gelişmesiyle birlikte sosyal ve psikoseksüel problemler ortaya çıkmaktadır (97).

3.4.1 X Kromozom Delesyonları ve Primer Amenore

Bu güne kadar X kromozomu ile ilgili olarak pek çok yapısal anomali tanımlanmıştır. Xq delesyonları, Turner Sendromlu bireylerin % 4.4'ünde tanımlanmıştır (93). Ancak bu oran konusunda farklı raporlarda mevcuttur. Xq delesyonuna sahip dişilerin fenotipi, delesyon bölgesine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Xq delesyonlarında Xq13'de yer alan inaktivasyon bölgesinin etkilenmesine bağlı olarak farklı fenotipler ortaya çıkabilmektedir (80). Bu bölgenin proksimalindeki delesyonlar primer ve sekonder ovarian yetmezliğe neden olurken distal delesyonlar daha çok sekonder ovarian yetmezliğe neden olmaktadır (80). Xq22-q26 bölgesini içeren delesyonlar genellikle normal bir fenotip ve bazen primer veya sekonder ovarian yetmezliğe neden olmaktadır. Normal ovarian fonksiyon için gerekli olan genlerin Xp11, Xq13- 25 ve Xq 26- 28'de yer aldığı gösterilmiştir (93). Xq delesyonlarının etkileri Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4: Ovarian fonksiyon üzerine Xq terminal delesyonlarının etkilerinin gösteren grafik (93).

3.4.2 Amenore'nin başlıca nedenleri (92).

Primer

- gonadal yetmezlik (% 48. 5)
- uterus vevajinanın konjenital yokluğu (%16. 2)
- konstitusyonel gecikme (%0. 6)
- GnRH yetersizliği (% 8.3)

Sekonder

- kronik anovulasyon (%39)
- hipotiroidizm/hiperprolaktinemi (%20)
- kilo kaybı/ anorexia nevrosa (%16)

Amenorenin bu nedenlerini dört ana başlık içinde inceleyebiliriz:

3.4.2.1 Terminal Organlara Bağlı Nedenler

3.4.2.1.1 Hymen İmperferatus

Hymenin ortasındaki deliğin olmaması ya da hymenin tamamen kapalı olması. Bu durum puberteye kadar fark edilmez. İlk adetten itibaren menstrual kan dışarı akmayarak vajende toplanır ve vajenin genişlemesine neden olur. Bu genişleme sınırlı olduğundan sonraki siklularda olan kanamalar uterus kavitesine ve tubalara dolar (11). Bunun sonucunda kişinin karnında büyüme, kasık ve karında ağrılar oluşur. Tedavide hymende bir insizyon yapılarak uterusu dolan kan boşaltılır (69).

3.4.2.1.2 Vajen enine septus

Konjenital olarak bazen vajenin herhangi bir seviyesinde enine septus olabilir. Bu durumda menstrual siklus başladığı halde dışarıya kanama olmaz kan

septus üzerinde toplanır. Tedavide septus tam ortasından bir insizyonla açılır, vajen içindeki kan boşaltılır, vajenin üst kısmının alt epitelyumu, alt kısmının üst epitelyumu birbirine dikilerek vajenin tekrar kapanması önlenir (77).

3.4.2.1.3 Vajen aplazisi

Vajen aplazisi tek başına nadir görülen bir durumdur. Çoğu zaman uterus yokluğuyla birlikte. Vajenin yokluğu ve primer amenorenin varlığı müllerian gelişimin olmaması (Mayer- Rokitansky- Küster- Hausre sendromu) tanısını koydurur (33). Bu durum gonadal disgenezi ve konjenital androjen duyarsızlığından kaynaklanan primer amenorenden daha sık görülür. %0.002- 4 canlı doğan kız bebekte bir görülür (33). CFTC genin de (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) meydana gelen bir mutasyon sorumludur. Bu hastalarda vajina yoktur ya da hipoplaziktir. Uterus normal olabilir ama introitusu açılan yol olmayabilir. Kısmi bir endometrial kavite var ise siklik abdominal ağrı olabilir. Erkek pseudohermafroditizme benzemesine rağmen bu tip normal dişi karyotipine sahiptir. Büyüme ve gelişme normaldir. Hastaların 1/3'ü üriner trakt anomalileri veya %12'sinde iskelet sistemi anomalileri görülür (33).

3.4.2.1.4 Uterus agenezisi

Gerçek hermafrodit ve erkek tipi yalancı hermafroditlerde uterus yoktur (agenezi). Buna bağlı olarakta menstrual siklus görülmez. Bu hastalarda primer amenore meydana gelir (8).

3.4.2.1.5 Uterus hipoplazisi

Bazı hastalarda gelişme geriliği olarak uterus hipoplazisi olabilir. İnfanıl olarak uterus bulunur ancak normalden küçük ve hipoplaziktir. Bu olgularda overlerde hipoplaziktir. Primer, nadir olarakta sekonder amenore ve infertilite görülür (49).

3.4.2.1.6 Uterus sınırları (Asherman Sendromu)

Asherman sendromu (uterus sınırları); endometrium harabiyetini takiben sekonder amenore oluşur. Bu durum genellikle intrauterin skarifikasyona sebep olan aşırı pospartum küretilin sonucudur. Asherman sendromu, sezeryan, myomektomi, metroplasti gibi ameliyatlara sonucunda oluşabilir (45). Çok ciddi yapışıklıklar görülebilmektedir ve Sheehan Sendromu gibi pospartum hipogonadizmde tespit edilmiştir. Sınırlı enfeksiyonun şiddetine göre inkomplet ya da komplet olabilir. Yapışıklıklar endometriyal kaviteyi, orificium internumu, canalis cervicalisi veya bu alanların kombinasyonlarını kısmen veya tamamen tıkayabilir. Sınırlı bir başka nedeni de genital tüberkülozdur (76). Tüberküloz (TBC) çocukluk döneminde geçirilmiş ve tedavisi yapılmamış ise, komplet sınırlı meydana gelmesi kaçınılmazdır. Bu durumda primer amenore meydana gelir (89). Fakat TBC genital organların gelişmelerini tamamladıktan sonra meydana gelmişse, önce inkomplet sınırlı meydana gelir ve adetler hipermenore tarzında oluşur, daha sonra hastalığın ilerlemesine bağlı olarak komplet sınırlı ve amenore ortaya çıkar. Asherman sendromlu hastalarda amenore yanında hipermenore, dismenore, abortus gibi problemler gözlenmektedir (43). Bu hastalar normal mensesine sahip olmalarına rağmen yapışıklıklara bağlı olarak infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıplarıyla karşı karşıyadırlar (69).

3.4.2.1.7 Gestagenlere Bağlı Endometrial Atrofi

Gestagenler 14 günden fazla uygulandığında endometriumda atrofiye neden olmaktadır. Oral kontraseptiflerin içinde östrojen ve progesteron vardır (69). İki hormonun birlikte olduğu durumlarda daima progesteron hakimiyeti vardır. Kontraseptif amaçlı kullanıldıklarında alındıktan iki gün sonra endometriumda gestagenlere bağlı değişiklikler meydana gelir. Endometriumda daha poliferatif

gelişme tamamlanmadan ve belirli bir kalınlığa ulaşmadan sekretuar değişiklikler başlar (19). Bu tedavi uzun süre devam ettiğinde endometrium iyice incelir ve oral kontraseptifler bırakıldığında siklus başlamaz ve postpilul amenore adı verilen amenore meydana gelir (86).

3.4.2.1.8 Histerektomi

Uterusun tamamen cerrahi olarak çıkarılması durumudur. Bunun sonucu olarak adetler meydana gelmeyecek ve amenore durumu ortaya çıkacaktır (69).

3.4.2.2 Ovarial Amenore Nedenleri

3.4.2.2.1 Over Agenezisi

Genellikle primer amenore belirtisiyle ortaya çıkan bir durumdur. Bilinen en önemli klinik şekli Turner Sendromu'dur. En yaygın görülen kromozomal anomalidir. Tüm dişi fetüslerin %3'nü etkilemektedir (54). Ancak bunların %1'i doğuma kadar ulaşmaktadır. Sendrom 2000- 2500 canlı doğumda bir görülmektedir. Primer amenoreyle birlikte boy kısalığı, yelken boyun, kubitus valgus ve güvercin göğüs en belirgin kriterleridir. Koltuk altı kılları gelişmemiş, pubis kıllar ise çok seyrek. Göğüsler gelişmemiş ve dış genital organlar infantildir. Overler Turner sendromluların %44'ünde yoktur (25). Spontan menarş olguların %12, spontan gebelik %5'inde söz konusudur (65, 79).

3.4.2.2.2 Over Disgenezi

Gonadların testis yönünde gelişmesi durumudur (20). Over ve testisin birlikte olması durumuna hermafroditizm denir. Bir gonadta hem over hem de testisin olmasına ovo- testis ismi verilir. Hermafroditizmde her iki tarafta ovo- testis olabileceği gibi, bir tarafta ovo- testis diğer tarafta testis veya over olabilir (3). Bulunan over ya da testisin hangisinde hormonal fonksiyon mevcut ise gelişim o yönde olmaktadır. Dış genital organlar değişik derecede yapısal farklılıklar

gösterebilir. Bazılarında üretra ve vajen birbirinden ayrı olarak oluşur, dış genital organlar dişi tipi görünüm alır. Fakat klitoris hipertrofisi vardır. Değişik derecede meme gelişmesi ve kıllanma olur. İç genital organlar fonksiyon görmeyen taslaklar halindedir (20).

3.4.2.2.3 Prepuberter Kastrasyon

Puberte veya prepuberter dönemde nadir olarak görülen bir durumdur. Puberte döneminde over tümörleri nedeniyle overlerin cerrahi yolla çıkartılması sonucunda amenore oluşmasıdır (69).

3.4.2.2.4 Rezistan Over Sendromu

Sık rastlanmamakla birlikte amenore ile karakterize bir sendromdur. İkincil seks karakterleri normal olarak gelişir fakat vajen mukozasında atrofi vardır ve uterus hipoplaziktir. Gonodotropinler yüksek olmasına rağmen östrojen seviyesi düşüktür. Overler normalden daha küçüktür. Amenore ve beraberinde infertilite mevcuttur. Bu sendromun nedeni overdeki FSH reseptörlerinin eksikliğidir (52).

3.4.2.2.5 Polikistik Over Sendromu (PKOS)

Bu Sendrom ilk kez 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından tanımlanmış ve onlarınadlarıyla isimlendirilmiştir. Hipofizde yüksek dozda FSH salgılanması sonucu, aşırı sitümlasyondan dolayı overlerde kistleşmenin olduğu bir durumdur (14). Tunika albugineanın kalınlaşmasının, mekanik bir bariyer meydana getirerek folikül çatlamasını engellediği düşünülmektedir (14). Hastalığın genetik faktörlere dayandığıda ileri sürülmektedir (87). PKOS'li hastalarda adet düzensizlikleri sırayla hipermenore, oligomenore ve amenore şeklinde olabilir. Vakaların %30'unda şişmanlık görülür. Olguların yarısında hafiften orta dereceye varan tüylenme mevcuttur (15). Amenoreye bağlı infertilite de mevcuttur (87).

3.4.2.2.6 Hipertekozis

Yumurtalık dokusunda hormon üreten dokuların bulunmasıdır. Polikistik overin son aşamasıdır. Hikayede uzun süreli anovülasyon (yumurtlama olmaması) ve adet gecikmeleri ile karakterizedir. Yavaş ama sürekli olarak artan virilizasyon (erkekleşme) belirtileri vardır. Testosteron düzeyleri çok yüksektir fakat LH düzeyi normaldir (2).

Ovaryal hipertekoziste stromal hiperplazi vardır. Buna bağlı olarak aşırı androjen salgılanmaktadır. Hastada amenoreyle birlikte aşırı tüylenme mevcuttur (69).

3.4.2.2.7 Hormon Salgılayan Over Tümörleri

Over tümörleri hormon salgılayan ve salgılamayan olmak üzere ikiye ayrılırlar (79). Hormon salgılayan over tümörleri; Arrenoblastoma, granüloza Hücreli Tümör, Teka Hücreli Tümör ve Gynandroblastoma. Arrenoblastoma androjen salgıladığından, kişide önce defeminizasyon, daha sonrada maskülinizasyon belirtileri ortaya çıkar. Östrojen salgılayan Granüloza ve Teka Hücreli tümörler de ise, hipotalamo- hipofizer merkezlere baskı sonucu, sürekli olmayan geçici amenore ve arkasından juvenil tarzda şiddetli kanamalar meydana gelir (69). Gynandroblastoma da ise her iki cinse özel değişik belirtiler ortaya çıkar. Hormon salgılamayan over tümörleri, over dokusunu tamamen işgal ederek amenoreye neden olabilirler (2, 43).

3.4.2.2.8 Erken Menapoz

Menapozun 40 yaşından önce meydana gelmesine erken menopoz denir (69). Familial ve sekonder olarak oluşabilir. Bazı ailelerde genetik nedenlere bağlı olarak ailenin pek çok ferinde menopoz erken meydana gelmektedir.

Overlerin 40 yaşından önce cerrahi olarak çıkarılması ve pelvik organlara yapılan radyoterapi sonucu erken menapoz sekonder olarak meydana gelebilir (77).

3.4.2.2.9 Overlerin Alınması

Hangi nedenle olursa olsun üreme çağında overlerin alınması durumunda sikluslar ortadan kalkacaktır (69).

3.4.2.3 Hipotalamo- Hipofizer Amenore Nedenleri

3.4.2.3.1 Serebral Enfeksiyonlar

Serebral enfeksiyonlar nadirde olsa ilerlemiş durumlarda amenoreye neden olmaktadır (69).

3.4.2.3.2 Serebral Tümörler

Özellikle hipotalamusu ilgilendiren serebral tümörler amenoreye neden olmaktadır (69).

3.4.2.3.3 Galaktore- Amenore Sendromu (Hiperprolaktinemi)

Normal değerler üzerinde salgılanan prolaktin, hormonal sistemi etkileyerek anovulasyon, oligomenore ve amenoreye neden olmaktadır. Olguların yarısında hiperprolaktinemiye bağlı olarak galaktore meydana gelir (5).

3.4.2.3.4 Sheehan Sendromu

Sheehan tarafından tarif edilen, doğumda kan kaybına bağlı olarak, total ve parsiyel hipofiz nekrozundan sonra meydana gelmektedir. İlk klinik belirti göğüslerde süt kesilmesidir. Kolostrum kaybolur ve çok kısa zamanda memelerde atrofi meydana gelebilir. Daha sonra gonadotropin yokluğuna bağlı olarak amenore meydana gelir. Amenoreyi takiben genital organlarda atrofi görülmeye başlar (1).

3.4.2.3.5 Hipogonadotropik- Hipogonadizm

Hipofizden yeterli seviyede gonadotropin salgılanmaması sonucu ortaya çıkan ve primer amenore nedeni olan patolojik bir durumdur. Overlerde

sitümülasyon olmadığından sekonder seks karakterlerinde ve genital organlarda gelişme geriliği ortaya çıkar. FSH ve LH düzeyleri düşüktür. Vulva infantil tipte, vajen küçük ve dar, uterus hipoplaziktir. Overler normalden küçük ve folikül sayıları son derece azdır. Bu hastalar infertildir (43, 56).

3.4.2.3.6 Emesyonel Şok

Ani ve ciddi şok durumu amenoreye neden olabilir. Genç kızlarda sık karşılaşılan bir durumdur. Klinik olarak tek belirti amenoredir (69).

3.4.2.3.7 Anorexia Nevrosa

Hastalığın ilk belirtisi amenoredir. Amenore ya şiddetli bir heyecan ile ortaya çıkar ya da oligomenore veya düzensiz adetleri takriben daha sonra meydana gelir. İkinci belirti aşırı zayıflamadır. Hastalarda iştah azalmıştır. Yemek yemeleri önerildiğinde tepki gösterirler hatta kusmalar bile meydana gelir. Gonadotropinler ve östrojenlerde azalma vardır. Buna bağlı olarak dış genital organlarda gerileme (atrofi) görülür (43).

3.4.2.3.8 Pseudocyesis (yalancı gebelik)

Bu durum ya doğurmaktan korkan ya da çok çocuk arzu eden, kadınlarda görülür. Bu olgularda oligomenore tarzında düzensiz adetler ve infertilite durumu her zaman mevcuttur. Bütün olgularda gebelik belirtileri mevcuttur. Amenore durumu 9 aylık dönemi kapsadığı gibi daha kısıda olabilir (69).

3.4.2.4 Genel Nedenler

3.4.2.4.1 Tiroid hastalıkları

Tiroid hormonları gelişme, oksijen tüketimi, ısı yapımıyla, yağ, karbonhidrat ve protein metabolizmasını stimüle ederek organizmada farklı doku seviyelerinde etki göstermektedir (82). Bu hormonlar (T3, T4) hücre membranı, mitokondria, ribozomlar ve çekirdek üzerine etkili olmaktadır. Tiroid hastalıkları kadınlarda

erkeklerle oranla 4- 5 kat daha fazladır. Tiroid bezi ve overler arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Tiroid bozuklukları seks hormonlarının metabolizmasını ve üreme fizyolojisini yakından ilgilendirmektedir. Hipertiroidili olgularda hem östradiol sentezinde artma, hem de periferde androjenlerde dönüşüm sonucu östrojenlerin total plazma seviyeleri yükselmektedir. Hipotiroidili olgularda ise, hiperprolaktinemi meydana gelmektedir. Bunun sonucu olarak anovulatuvar sikluslardan, galaktore- amenore sendromuna kadar varabilen siklus bozuklukları oluşur. Hipotiroidi olgularında bazen puberte gecikmesi, bazen de erken puberte ortaya çıkmaktadır. Hipertiroidi olgularında bu belirti pek görülmez fakat oligomenore, amenore ve menometroraji tarzında adet kanamaları meydana gelebilir (43).

3.4.2.4.2 Sürrenal Hastalıkları

Sürrenal hastalıklarından konjenital sürrenal hiperplazisi ile Cushing sendromunda menstrual siklus bozuklukları ortaya çıkabilir (43).

Konjenital sürrenal hiperplazisi hereditör bir hastalıktır. Dış genital organlarda anomali, erken virilizim, boy kısalığı, pigmentasyon artması ve menstruasyon olmaması ile karakterizedir (43).

Cushing sendromunu meydana getiren patoloji hipofiz ve sürrenal orjinli olabilir. Sendrom, obezite, aydede yüzü, manda sırtı, kılınma, hipertansiyon ve amenore ile karakterizedir. Pelvis organları normaldir (24).

3.4.2.4.3 Diabetes Mellitus

Diabet, disfonksiyonel kanamalar ve amenoreyi de beraberinde getirir (15). Diyabet genellikle 3 nedenle siklus bozukluklarına neden olur. Bunlardan ilki insülin yokluğu nedeni ile bizzat diabetin kendisidir. İkincisi diabet nedeni ile

düzensiz beslenmedir. Üçüncüsü ise diabette sıkça görülen emosyonlardır. Klinik olarak obezite, polidipsi, poliüri ve vulvo-vajinitler ortaya çıkabilir (1).

3.4.2.4.4 Siroz

Östrojen ve progesteron metabolizması karaciğerde olmaktadır. Karaciğerin ileri derecede fonksiyon bozukluğu durumunda bu hormonların metabolizmalarında da bir bozukluk olacaktır. Buna bağlı olarakda siklus bozuklukları ve amenore ortaya çıkar (69).

3.4.2.4.5 Genital Tüberküloz

Genital tüberkülozun ileri dönemlerinde, endometrial kavitede adezyon meydana gelir. Endometrial kavitede başlangıçta parsiyel sineşi olur. Hastalık tedavi edilmediğinde komplet sineşi gelişir ve buna bağlı olarakda amenore ortaya çıkar (43).

3.4.2.4.6 Böbrek Hastalıkları

Over steroidleri, hipofizer gonadotropinlerin eliminasyonu böbreklerle olmaktadır. Böbreklerde meydana gelen bir bozukluk sonucu bu hormonların vücutta birikimi artacaktır. Bunun sonucunda da siklus bozuklukları ve amenore oluşabilir (43).

3.4.2.4.7 Kalp ve Kan Hastalıkları

Kardiyak hastalıklarda ve anemilerde amenore meydana gelebilir (69).

Çalışmanın Amacı;

Primer amenore ve cinsiyet belirsizliğiyle beraberlik gösteren kromozomal anomalilerin saptanarak bu tür hastalarda farklı kromozomal anomalilerin (yeniden düzenlemelerin) yüzdesinin bulunması,

Primer amenoreli ve cinsiyet belirsizliği gösteren hastalarda SRY loku spesifik prob kullanılarak yapılacak interfaz FISH çalışmasıyla Y kromozom kökenli dizilerin tespit edilmesi,

Çalışmada, SRY spesifik primerler kullanılarak yapılacak moleküler genetik analizlerle SRY pozitifliğinin değerlendirilmesi, tespit edilen karyotipler ve fenotipler arasındaki ilişkilerin ortaya konması amaçlanmıştır.

4.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Fırat üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik anabilim dalına Şubat 2003- 2005 yılları arasında gelen 62 primer amenore, 10 ambigius genitalya, 8 Turner Sendromu ve 7 hipogonodotropik hipogonadizim tanısıyla gelen toplam 87 hasta dahil edildi. Primer amenoreli hastaların yaş ortalaması 21.14 ± 7.27 ve boy ortalamaları 153.60 ± 14.00 cm idi. Hipogonodotropik hipogonadizim nedeniyle çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması 18.43 ± 3.99 ve boy ortalamaları 162.00 ± 12.00 cm. Primer amenore ve Turner Sendromlu hastaların 33 (%47.2) tanesinde meme gelişimi yoktu, 13 (%18.5) tanesinde normal meme gelişimi ve 24 (%34.3) tanesinde de az meme gelişimi tespit edildi. Bu olguların 7 (%10) uterus agenizi (Mayer- rokitansky-Küster- Hauser Sendromu), 7 (%10) atrofik, 49 (%70) hipolazik uterus, 7 (%10) tanesinde normal uterus gelişimi gözlemlendi. 8 (%11.4) tanede agenezi, 44 (% 62.8) hipoplazik, 5 (%7.2) atrofik, 5 (%7.2) immatür ve 8 (%11.4)'inde normal over yapısı gözlemlendi. Değerlendirmeye alınan hormon bulguları hastaları gönderen hastanelerin laboratuvar verileridir.

Çalışmada olgular çalışmaya alınırken herhangi bir kritere bakılmaksızın incelenecek hasta guruplarının sadece primer amenore olması şartı olgunun çalışılması için yeterli görülmüştür. Primer amenoreli olgular içerisinde olup aynı zamanda hipogonodotropik hipogonadozimli 7 vaka mevcuttur. Bu tür hastalarda LH, FSH, GnRH gibi hormon reseptörlerinde mutasyonlara rastlanabilmektedir. Bu hastalar çalışma dışı bırakıldığında kromozomal anomali oranı artmaktadır.

Çalışmaya dahil edilen 7 hipogonodotropik hipogonadizim tanısına sahip erkek hastalar, primer amenore tanısıyla gönderilip aynı zamanda hipogonodotropik hipogonadizimli olan hastalarla karşılaştırılmak üzere kullanılmıştır.

4.1 Sitogenetik ve FISH Preparatlarının Hazırlanması

4.1.1. Kullanılan solüsyonlar, araç ve gereçler

Kolşisin (Biological Industries, Israel), Metanol (Merck), Etil alkol (Merck), Mc Coys 5A Basal Medyum (IRVINE SCIENTIFIC, California), New Born Calf Serum (Biological Industries, Israel), L- Glutamin (Sigma, U.S.A, Germany, U.K), Fitohemaglutinin (PHA) solüsyonu (Biological Industries, Israel), Penisilin-Streptomisin-Niasin (Biological Industries, Israel), Glasiyel asetik asit (Merck), % 70- % 85 - % 100'lük etanol, Gimsa boyası (Merck), Söransan tamponu (pH=6.80), Trypsin Certified (Difco, 1:250), Distile su, Entellan (Merck), Heparin (A.I.), KCL (Potasyum klorid), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Germany), $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Germany), Mikroskop (Nikon Eclipse E600), Etüv (Nüve EN 400), Santrifüj (Hettich Universal), Hassas elektronik terazi (Chyo), Enjektörler, pipetler, 15 ml'lik kültür tüpleri, Şaleler, Mezürler, Lamel, Lam, Fotoğraf Filmi, UV lambası (Dalga boyları ayarlanabilir) pH metre (HANNA Instruments).

4.1.2. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Hipotonik solüsyon: 0.075 M KCL 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

Fiksatif (Tesbit solüsyonu) : 1:3 oranında asetik asit : metil alkol (metanol) ile hazırlandı.

Söransan Tamponu (pH = 6.80) : 18.96 gr Na_2HPO_4 ve 18.16 gr KH_2PO_4 1000 ml distile suda çözüldü. Daha sonra toplam hacim 2000ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon 1 Normal NaOH veya 1 Normal HCL ile pH=6.80'e ayarlandı.

Gimsa Boya Solüsyonu: 5 ml Gimsa boyası üzerine pH'ı 6.80 olan söransan

tamponundan 95 ml ilave edilerek hazırlandı.

4.1.3. Periferik Kan Kültür Ortamının Hazırlanması

1. Mc Coys 5A Basal medium.....100 ml
2. New Born Calf Serum..... 20 ml
3. L-Glutamin.....1 ml
4. Fitohemaglutinin (PHA) solüsyonu.....4.25 ml
5. Penisilin- Streptomisin-Niasin.....1 ml

Yukarıda belirtilen oranlar kullanılarak hazırlanan besiyerinden steril, kapaklı tüplere 5 ml konularak -20°C’de saklandı. Kültür yapılmadan önce besiyeri oda ısısında çözülerek kullanıldı.

4.1.4. Preparasyon İşlemleri

Steril disposable 5 ml’lik enjektör 0.5ml heparinle yıkandı. Heparinle yıkanmış enjektör ile hastalardan 3-4 ml venöz kan alınarak içerisinde 5 ml besi yeri olan tüpe 8-10 damla (0.5 ml) ekildi ve ekimden hemen sonra 37°C’de etüvde 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Kültürün 70. saatinde 100 µl (10 µg/ml) kolşisin ilave edilerek tüp hafifçe alt üst edildi. 2 saatlik 37°C’de inkübasyonu takiben 72. saatte etüvden çıkarılan deney tüpleri, 1250 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki supernatant, pastör pipeti ile atıldı. Pellet üzerinde kalan 1 ml’lik sıvı, pastör pipeti ile karıştırıldı ve üzerine hipotonik solüsyondan 8 ml (0,075 M KCl) vorteks kullanılarak damla damla ilave edilerek 37°C’de 20 dakika bekletildi. Süre sonunda tekrar 1250 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak dipteki pellet üzerine 8 ml fiksatif damla damla ilave edildi. Tekrar 1250 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Fiksasyon üç kez tekrar edildi. Son fiksasyondan sonra pastör pipeti ile süpernatant atılarak hücreler karıştırıldı. Süspansiyon pipete çekildi. Önceden

temizlenmiş ve üzerine ad, soyad, tarih, sıra numaraları yazılmış lamlar kuvvetli nefesle nemlendirildi. Hücre süspansiyonu 8-10 cm'lik mesafeden, 45°'lik açı ile lam üzerine damlatıldı. Preparatlar oda sıcaklığında bir hafta yaşlandırılarak GTG bantlama metodu ile bantlandı.

4.2 Periferik Kan (PK)'dan İnterfaz Preparatı Hazırlanması:

- a) 0.5 ml periferik kan, içinde 7- 8 ml hipotonik solüsyon (0.075 M KCl) bulunan steril disposable tüpe eklendi
- b) 37°C'de 20 dakika inkübe edildi.
- c) 1250 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet 1/3 glasiyel asetik asit/metanol fiksatifinde yıkandı. Fiksasyon işlemi üç kere tekrarlandı.
- d) Son fiksasyondan sonra pastör pipeti ile süpernatant atılarak hücreler karıştırıldı. Karışım nemli lamlara 8- 10 cm yüksekten 45°'lik açıyla bırakıldı.
- e) Yayma tamamlandıktan sonra preparatlar kurumaya bırakıldı (3- 5 saat).
- f) % 50, % 70, % 85, % 90 ve % 99,5'lik alkol serisinde her birinde 2'şer dakika olmak üzere bekletildi ve preparatlar kuruduktan sonra kullanılıncaya kadar - 20°C'de muhafaza edildi.

4.3 FISH (*Fluoresans İn- Situ Hibridizasyon*) Tekniği

Olgulardan 62 primer amenoreli, 10 ambigius genitalya olmak üzere toplam 72 olguya interfaz FISH metodu uygulandı. (FISH Technology-2002).

4.3.1 Kullanılan solüsyonlar

1. 20xSSC (Standart Sodyum Sitrata) (1 litre)

Sodyum klorür (Merck, Darmstadt, Germany)..... 175.3 gr

Tri-sodyum-sitrat (Merck, Darmstadt, Germany)..... 88.2 gr

700 ml distile suda eritilerek 1 litreye tamamlandı. pH=7.0'a ayarlandı. Otoklavda sterilize edildi ve buzdolabında + 4 °C'de muhafaza edildi.

2. 2xSSC (500 ml)

50 ml 20xSSC solüsyonu, 450 ml distile suda çözülerek 500 ml'ye tamamlandı. pH=7.0 olarak ayarlandı.

3. % 70, % 80 ve % 100'lük etil alkol serisi

4. DAPI (4,6-diamino-phenyl-indole) yüzey boyası (Cytocell, Banbury Business Park Addenbury, Oxfordshire, United Kingdom)

5. Tween-20 veya NP-40 yıkama solüsyonu (Nonidet NP-40, Amresco, Solon, Ohio, United States).

50 ml 2xSSC solüsyonu içerisine 50 µl NP-40 ilave edilerek hazırlandı.

6. 0.4xSSC

2 ml 20xSSC solüsyonu, 98 ml distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

4.3.2 Kullanılan Gereçler

0.5 ml mikrosantrifüj tüpleri, mikropipet ve uçları (1, 10 ve 100 µl'lik), 37°C'ye ayarlanabilen benmari, 37°C'ye ayarlanmış etüv, 73°C'ye ayarlanabilen benmari, plastik şale, lamel, rubber solüsyonu (Fixogum Rubber Cement, Marabu, Germany), floresans mikroskop, immersiyon yağı ve parafilm.

4.3.3 Prob

SRY: X Sentromerik (yeşil işaretli), SRY (kırmızı işaretli) lokus spesifik dual-prob kullanıldı (VYSIS London, UK).

4.3.4 Hedef Örneklerin Hazırlanması

4.3.4.1 Preparatların Hazırlanması

1. Seçilen olguların sitogenetik çalışma sonucunda elde edilen preparatlarında, elmas uçlu bir kalemle hibridizasyon alanı işaretlendi.

2. Preparat, şaleye konulan 2xSSC solüsyonda 2 dakika bekletildi (37°C).
3. % 70, % 85, % 100'lük alkol serilerinde 2'şer dakika tutuldu ve daha sonra kurumaya bırakıldı.

4.3.4.2 Probun Hazırlanması

Prob ve hibridizasyon solusyonu -20°C'den çıkarılarak oda ısısına gelene kadar bekletildi. Prob solüsyonunun son hacmi 10 µl olacak şekilde 1 µl prob, 2 µl saf su ve 7 µl hibridizasyon solüsyonu alınarak prob hazırlandı.

4.3.4.3 Denatürasyon

Preparatlar ve prob 37°C'de 5 dakika bekletildi ve 10 µl prob preparatlarda işaretlenmiş bölgeye uygulandı. Üzeri lamelle kapatılan preparatlar rubber solüsyonu ile yapıştırılarak kurumaya bırakıldı. Denatürasyon, PCR cihazında 75°C'de 5 dakika bekletilerek gerçekleştirildi.

4.3.4.4 Hibridizasyon

Örnekler 37°C'ye ayarlanmış benmaride bir gece hibridizasyona bırakıldı.

4.3.4.5 Hibridizasyon Sonrası Yıkama

Rubber solüsyonu uzaklaştırıldı. Örnekler 0.4xSSC'de 72°C'de iki dakika bekletildi ve bu işlem sonunda lamelin düşmüş olmasına dikkat edildi.

Örnekler daha sonra sırasıyla 2xSSC'de ve % 0.05'lik oda ısısındaki Tween-20'de 30'ar saniye yıkandı.

Örneklere 8,5 µl DAPI (4',6- Diamidino-2-phenylindole) ve 1,5 µl PI (Propidium İodide) uygulanarak, lamel ile yeniden kapatıldı ve 10 dakika karanlık bir ortamda bekletilerek floresans mikroskop ile incelendi.

4.4 DNA İzolasyonu

İncelemeye alınan tüm olguların DNA izolasyonları gerçekleştirilerek moleküler çalışma için ayrıldı.

4.4.1 Kullanılan solüsyon ve gereçler

DNA purifikasyon kiti (Promega Cat.#1125), 1. 5 ml'lik tüpler (Axygen scientific MCT- 150-A), 100 ve 1000 µl'lik pipet (Eppendorf), pipet uçları (Axygen scientific), mikrosantrifüj, vorteks, izopropil alkol, % 70'lik etil alkol

4.4.2 İzolasyon İşlemi

1. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 900 µl cell lizis solüsyonu eklendi.
2. Kan tüpü kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallandı, sonra 300 µl kan cell lysis solusyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.
3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi, bu esnada tüp 2-3 defa alt- üst edildi. 13 000-16 000xg de 20 dakika santrifüj edildi.
4. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakacak şekilde atıldı.
5. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
6. 300 µl Nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi. Solüsyonun visköz bir hale geldiği gözlemlendi. Karıştırma sonunda hücre çökeltileri görünürse bunlar çözülene kadar solüsyon 37°C de inkübe edildi. Eğer 1 saat sonra hala çökeltiler görülüyorsa ek olarak 100 µl nuclei lysis solüsyonu ilave edilip inkübasyon tekrarlandı.
7. 1.5 µl Rnase solüsyonu eklendi ve tüp 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 10-20 saniye vortekslemedi. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
9. 13 000-16 000xg de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak karıştırıldı.
11. Solüsyon alt-üst edilerek ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar karıştırıldı.
12. 13 000-16 000xg de 1 dakika santrifüj edildi. DNA küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.
13. Süpernatant atılarak 300 µl %70 lik etanol eklendi ve -20°C’de saklandı.

4.5 PZR Protokolü

-20°C’de saklanmış olan DNA’lar çıkartılarak 1 dakika 13000 g’de santrifüj edildi ve üstte kalan % 70’lik etanol atıldı. DNA örneklerinin üzerine 50 µl distile su konarak oda ısısında 1 saat, takiben 37°C ‘lik etüvde overnight’a bırakıldı.

4.5.1 Kullanılan Solüsyon ve Gereçler

Hasta DNA’ları, H₂O, dNTP seti, MgCl₂, 10X buffer, Taq polimeraz, agaroz, EtBr, DNA boyut markırı, 5X TBE tamponu, yükleme tamponu, mikrosantrifüj, elektronik hassas terazi, vorteks, 37°C’ye ve 65°C’ye ayarlanabilen su banyosu, elektroforez aparatı, elektroforez box, Eppendorf Mastercycler Gradient, UV lambası ile ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi, steril 1.5 ml, 0.5 ml ve 0.2 ml’lik Eppendorf santrifüj tüpleri, SRY geni için revers:

5’-GTCGCACTCTCCTTGTTTTTTGAC-3’ ve forward:

5’-CGATTGTCCTACAGCTTTGTC-3’ primerleri kullanıldı.

4.5.2 PZR Kurulması İşlemi

Her bir tüpe 10 µl hasta DNA'sı ve üzerine 6 µl MgCl₂, 6 µl 10X buffer, 6 µl dNTP (2.5mM), 1 µl primer 1 (30pmol), 1 µl primer 2 (30pmol), 0.3 U Taq DNA polimeraz ve 19.7 µl ddH₂O konuldu. Hazırlanan tüpler vortekslendi ve PZR cihazında çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek için yalnızca bir döngü olmak üzere 96°C'de 3 dakika, denatürasyon (melting) için 96°C'de 30 saniye, yapışma (annealing) için 60°C'de 1 dakika, uzatma (extension) için 72°C'de 1 dakika olmak üzere toplam 35 döngü gerçekleştirildi. En son döngüdeki uzatma periyodu 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PZR amplikonları agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

4.5.3 Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde koşturuldu. % 2'lik agaroz jelin hazırlanmasında 2 gr agaroz tartılarak üzerine 100 ml 0.5XTBE eklendi ve mikrodalga fırında eritildi. Eriyen agaroz-TBE solüsyonu içerisine 7 µl EtBr konuldu ve agaroz-TBE solüsyonu içinde iyice karışması sağlandı. Hazırlanan solüsyon daha önce kenarları bantlanmış olan elektroforez aparatına döküldü ve donmaya bırakıldı.

PZR ürünlerinden 13 µl alınarak 3 µl yükleme boyasıyla karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Her yükleme işleminde 100 bp'lik DNA boyut markırı kullanılarak karşılaştırma ve kontrol işlemleri yapıldı.

5. BULGULAR

Çalışmaya 62 primer amenore, 10 ambigius genitalya, 8 Turner Sendromu ve 7 hipogonadotropik hipogonadizim ön tanısıyla gelen toplam 87 hasta dahil edildi.

5.1. Sitogenetik Analiz Sonuçları

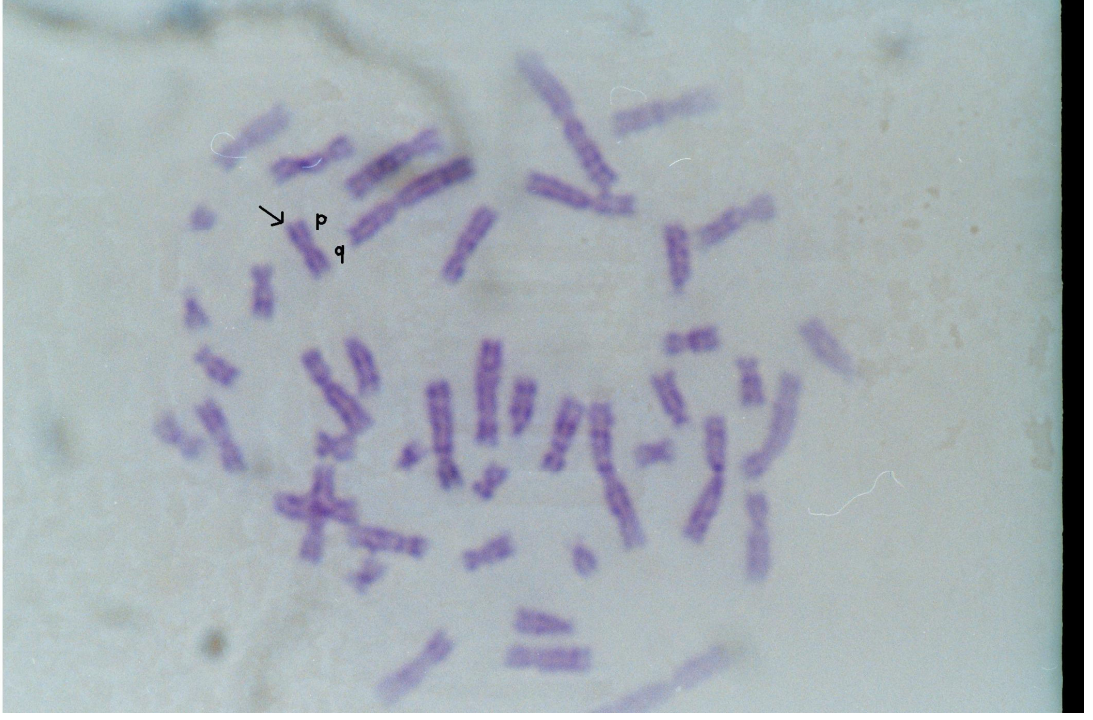
62 primer amenoreli olgu, 10 ambigius genitalya, 7 hipogonadotropik hipogonadizim ve 8 Turner Sendromu şüphesiyle gönderilen olguda yapılan konvansiyonel sitogenetik analizleri sonucunda hastaların 9 (%12.86)'unda anormal karyotip tespit edildi. 9 anormal karyotipin 5 tanesi TS fenotipik özelliklerine sahip olup 3'ünde klasik olmayan TS karyotipleri bulundu. 1 hastada 46,XY karyotipi tespit edildi ve hasta ADS klinik özelliklerine sahipti. Anormal karyotipe sahip olan konvansiyonel sitogenetik analiz yapılan hastaların metafaz plağı görüntüleri şekil 5, 6, 7 ve 8'de verildi. Anormal karyotip tespit edilen hastaların klinik özellikleri tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6: Primer amonore ve Turner sendromu şüphesiyle gelen hastalarda tespit edilen anormal karyotipler ve karşılık gelen sendromlar.

Olgu No	Tanımlanan Sendrom	Karyotip
1,2	Turner Sendromu	45,X
3	Turner Sendromu	46,X,del(X)(q23)
4	Turner Sendromu	46,X,i(Xq)
5	Ullrich Turner Sendromu	45,X(%30)/46,XY(%70)
6,7	Androjen Duyarsızlığı Sendromu	46,XY
8,9	Primer Amenore	46,XX,inv(9)(p13;q22)

OLGU 1: Primer amenore, kısa boy nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen 27 yaşında, 1. 37cm boyunda ve 33 kg ağırlığındaki olguda; düşük kulak, kısa kol ve bacaklar gibi Turner Sendromunun pek çok özelliğini taşıdığı tespit edildi. Hastanın sekonder seks karakterleri tam gelişmemiş olup göğüs gelişimi ve pubik kıllanma yoktu. USG’de uterus hipoplazik ve bilateral overler izlenmiştir. Total T3 3. 44 µg/ml (Normal değer:1. 8- 4. 6 µg/ml), Total T4 1. 05 µg/dl (Normal değer:0. 93- 1. 71 µg/dl) ve TSH değeri 1. 85 µIU/ml (Normal değer: 0. 27- 4. 2 µIU/ml), FSH 141. 5 (Postmenapozal: 25.8- 134. 8 µIU/ mL), LH 38. 18 µIU/ mL (Postmenapozal: 7. 7- 58. 5 µIU/mL), Estradiol 11. 40 (Postmenopozal: 10- 40 µg/ml), Prolaktin 13. 24 µg/ml (postmenopozal: 2.74- 64 µg/ml), Testesteron 0. 154 µg/ml. Olgunun karyotipi 45, X olarak tespit edildi.

OLGU 2: Kısa boy ve turner bulguları nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen 9 yaşında, 1.17 cm boyunda ve 22 kg ağırlığındaki olguda; ense saç çizgisi düşük, el ve ayakları küçüktü. Olgunun karyotipi 45, X olarak tespit edilerek buna ait görüntü Şekil 5’de verildi.



Şekil 5: 45, X karyotipine sahip olgu'nun metafaz plağı.

OLGU 3: Primer amenore ve kısa boy nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen 22 yaşında, 1.57 cm boyunda ve 57 kg ağırlığındaki olguda; ense saç çizgisi, el ve ayak büyüklüğü normaldi. Sekonder seks karakterleri tam gelişmemiş olup göğüs gelişimi ve pubik kıllanma Tanner stage 3 ile uyumlu idi. Pelvik USG' de, hipoplazik uterus (43X20X10mm) ve bant şeklinde hipoplazik overler izlendi. Kemik dansitometresinde ise osteoporoz bulguları ile uyumluydu. Total T3 1.15 µg/ml (Normal değer: 0.87- 1.78 µg/ml), total T4 8.93 µg/dl (Normal değer: 6.09- 12.23 µg/dl) ve TSH değeri 0.22 µIU/ml (Normal değer: 0.34- 5.60 µIU/ml) olup olguda subklinik hipertiroidi mevcuttu. Diğer endokrinolojik çalışmalar ise hipergonadotropik hipogonadizm tablosu ile uyumlu idi FSH 90.49 µIU/ml (Postmenopozal:16. 74- 113. 59 µIU/ml), LH 37.45 µIU/ml (Post Menopozal: 10.87- 58.64 µIU/ml), estradiol 44pg/ml (Postmenopozal: 20- 88 µg/ml), prolaktin

12.79 µg/ml (Postmenopozal: 2.74- 64 µg/ml). Olgunun karyotipi 46,X,del(X)(q23) olarak tespit edilerek buna ait görüntü Şekil 6’da verildi.



Şekil 6: 46, X, del (X) (q23) karyotipine sahip olgunun metafaz plağı.

OLGU 4: Primer amenore, kısa boy nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen 27 yaşında, 1. 40 cm boyunda ve 50 kg ağırlığındaki olgunun düşük kulak, kısa kol ve bacaklar gibi Turner Sendromunun pek çok özelliğini taşıdığı tespit edildi. Hastanın sekonder seks karakterleri tam gelişmemiş olup göğüs gelişimi ve pubik kıllanma yoktu. Pelvik USG’de, hipoplazik uterus ve overler izlendi. Kemik dansitometresinde ise osteoporoz bulguları ile uyumluydu. TSH değeri 1. 45 µIU/ml (Normal değer: 0. 27- 4. 2 µIU/ml) idi. FSH 58. 92 µIU/ mL (Postmenapozal: 25.8-

134. 8), LH 19. 21 μ lU/ mL (Postmenapozal: 7. 7- 58. 5 μ lU/mL), estradiol 16.72 μ g/ml (Postmenopozal: 10- 40 μ g/ml), prolaktin 16. 55 μ g/ml (Postmenopozal: 2.74- 64 μ g/ml). Olgunun karyotipi 46, Xi (Xq) olarak tespit edilerek buna ait görüntü Şekil 7' de verildi.



Şekil 7: 46, X, i (Xq) karyotipine sahip olgunun metafaz plağı.

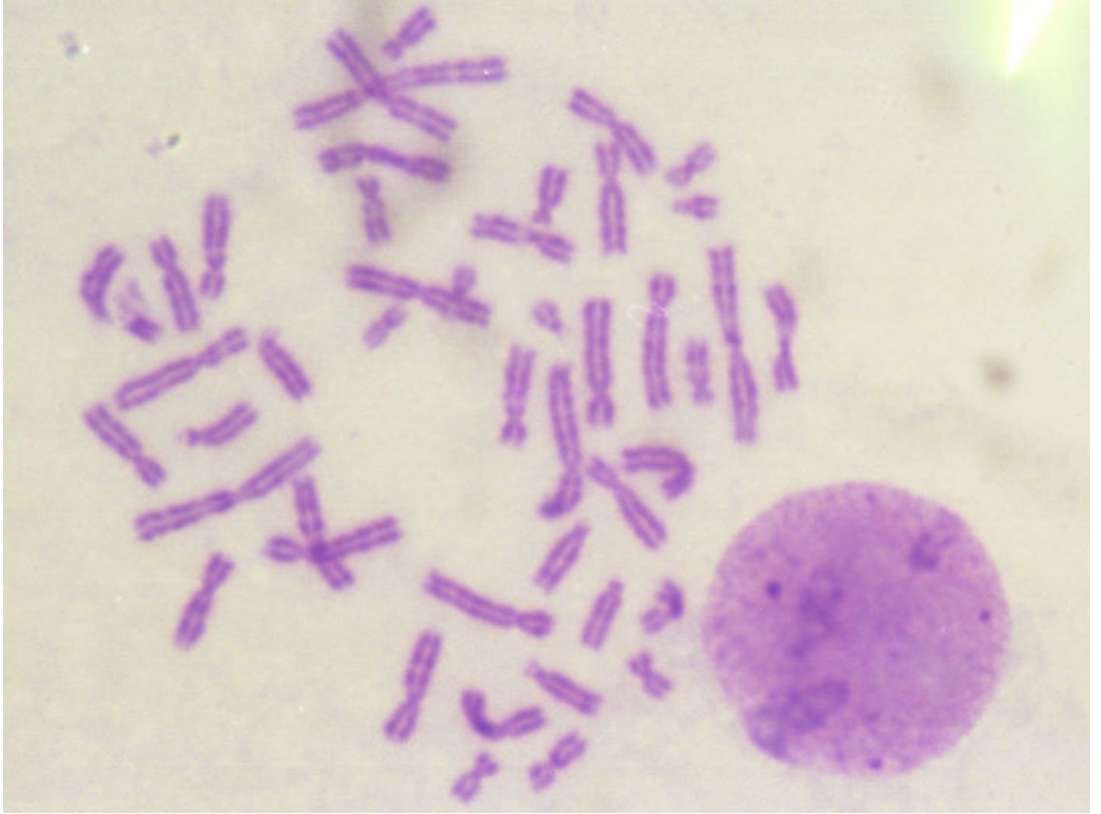
OLGU 5: Primer amenore, kısa boy nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen 30 yaşında, 1.35 cm boyunda ve 50 kg ağırlığındaki olgunun düşük kulak, kısa kol ve bacaklar gibi Turner Sendromunun pek çok özelliğini taşıdığı tespit edildi. Endokronolojik çalışmalar olguda hipogonadizm hipogonadotropik FSH, 35. 57 mIU/ mL (Postmenapozal: 25.8- 134. 8 μ lU/ mL), LH 21. 31 μ lU/ mL

(Postmenapozal: (7. 7- 58. 5 μ lU/mL), Estradiol 20. 86 μ lU/ mL (Postmenopozal: 10- 40 μ lU/ mL) olduğunu göstermiştir. Pelvik USG’ de, uterusun hipoplazik, her iki overin atrofik görünümde olduğu tespit edilmiştir. Periferik kan metafazlarından yapılan sitogenetik inceleme sonucunda bazı hücrelerde Y kromozomunun varlığı tespit edilmiştir. Hastanın karyotipi 45, X /46, XY olarak tespit edildi. Sitogenetik çalışmada oran 45,X(%30) / 46, XY (%70) olarak bulundu. Fluoresans in situ Hibridizasyon (FISH) çalışmasında oran 45,X (%27) / 46, XY (%73) olarak bulundu. Kullanılan lokus spesifik seks tanımlayıcı bölge (Sex Determining Region: SRY) probu için sinyal görülemedi.

OLGU 6: Primer amenore nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen 35 yaşında, 1.60 cm boyunda ve 57 kg ağırlığındaki olguda sekonder seks karakterleri tam gelişmemiş olup göğüs gelişimi yoktu. Hastada erkek tipi kıllanma ve gırtlak (adem elması) mevcuttu. Pelvik USG’de, uterus agenezi ve overler izlenmedi. Hasta laboratuvarımıza gelmeden önce inguinal kanalda bulunan testis yapısı cerrahi olarak çıkartılmış. Olgu tam androjen duyarsızlığı Sendromunun klinik özelliklerini göstermektedir. Olgunun karyotipi 46,XY olarak tespit edildi.

OLGU 7: Ambiguous genitalia nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen dış görünümü dişi olan bebek 15 günlüktü. Doğumdan sonra yapılan cerrahi operasyonla inguinal herni kesesinden çıkarılan gonadlar yapılan patolojik çalışma sonucunda bu dokuların testis olduğu anlaşılmış. Olgunun karyotipi 46, XY olarak tespit edilmiştir. SRY lokus spesifik ve sentromerik X dual probu kullanılarak yapılan interfaz FISH çalışmasında SRY pozitif bulundu. Olgu androjen duyarsızlığı sendromunun klinik özelliklerini göstermektedir. Olgu 7’ye ait görüntü Şekil 9’da verildi.

OLGU 8: Primer amenore ve kısa boy nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen 28 yaşında, 1.55 cm boyunda ve 57 kg ağırlığındaki olguda; ense saç çizgisi, el ve ayak büyüklüğü normaldi. Sekonder seks karakterleri tam gelişmemiş olup göğüs gelişimi ve pubik kıllanma mevcuttu. USG’de uterus atrofik ve overler hipoplazik izlenmemiş. FSH 12. 81 μ lU/ mL (Postmenapozal: 258- 134. 8 μ lU/ mL), LH 19. 21 μ lU/ mL (postmenapozal : (7. 7- 58. 5 μ lU/mL), progesteron 1. 35 μ lU/ mL (Postmenopozal: 10- 40 μ lU/ mL), Testesteron 0. 780 μ g/ml. Olgunun karyotipi 46,XX, inv (9) (p11- q18) olarak tespit edilerek buna ait görüntü Şekil 8’de verildi.



Şekil 8: 46, XX, inv (9) (p13;q22) karyotipine sahip olgu 8’in metafaz plağı.

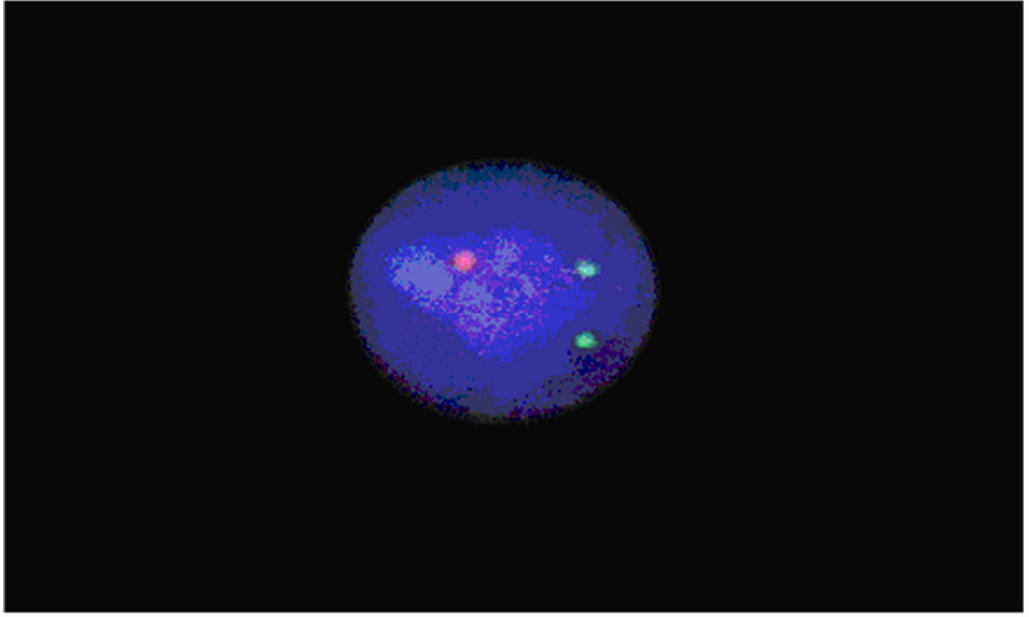
OLGU 9: Primer amenore ve kısa boy nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen 18 yaşında, 1. 60 cm boyunda ve 50 kg ağırlığındaki olguda; ense saç çizgisi normal, el ve ayaklar büyüktü. Sekonder seks karakterleri tam gelişmemiş olup göğüs gelişimi ve pubik kıllanma yoktu. USG’de uterus ve overler hipoplazik izlenmiştir. . Total T3 4. 33 μ IU/ mL (Normal değer:1. 8- 4. 6 μ IU/ mL), total T4 2. 24 μ IU/ mL (Normal değer: 0. 93- 1. 71 μ IU/ mL) ve TSH değeri 2. 32 μ IU/ mL (Normal değer: 0. 27- 4. 2 μ IU/ mL), FSH 0. 427 μ IU/ mL (Postmenapozal: 25.8- 134. 8 μ IU/ mL), LH 0. 100 μ IU/ mL (Postmenapozal: 7. 7- 58. 5 μ IU/mL), Estradiol 18. 26 μ IU/ mL (Postmenopozal: 10- 40 μ IU/ mL), prolaktin 18. 81 μ IU/ mL (Postmenopozal: 2.74- 64 μ IU/ mL)), Testesteron 0. 361 μ g/dL. Olgunun karyotipi 46,XX, inv (9) (p13, q12) olarak tespit edildi.

Fenotipik olarak erkek yönünde genitalya belirlenen 9 ambigius genitalyalı yenidoğanın 9’unda 46,XX karyotipi ve dış genitalyası dişi yönünde değerlendirilen, ultrasonda ovotestis yapısı gözlenen 1 yenidoğanda 46,XY karyotipi bulundu. SRY loku spesifik ve sentromerik X dual probu kullanılarak yapılan interfaz FISH çalışmasında SRY pozitif bulundu.

7 hipogonadotropik hipogonadizmli erkek hastanın karyotipleri 46,XY olarak tespit edildi.

5.2. FISH Analiz Sonuçları

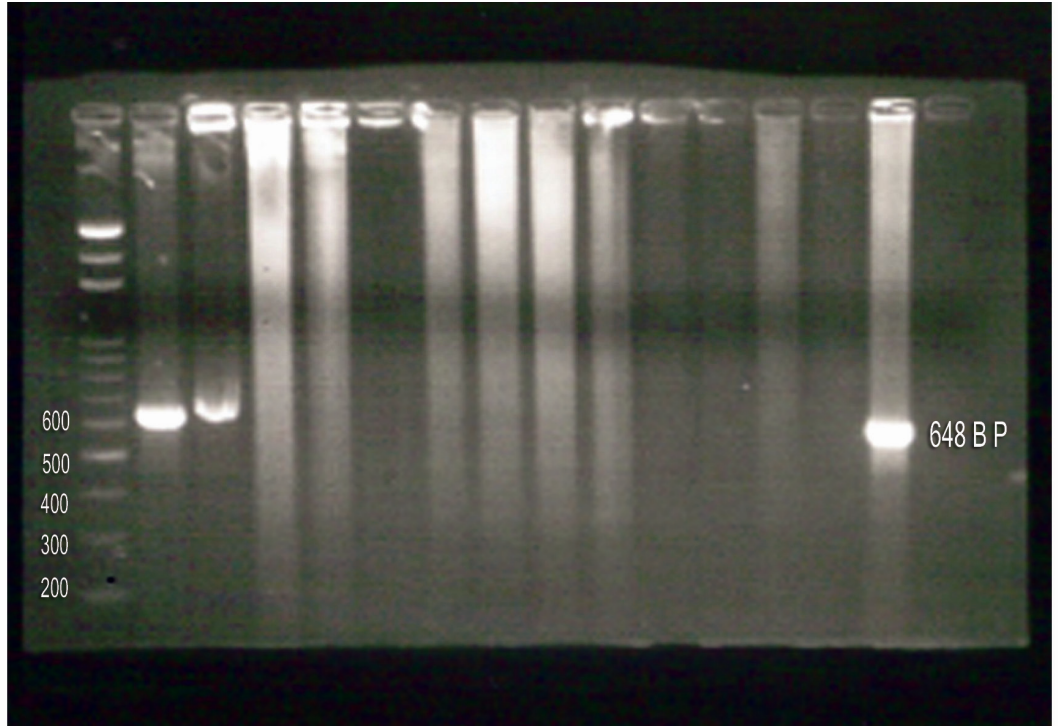
Toplam 62 primer amenore ve 10 ambigius genitelyalı olguya SRY lokus spesifik ve sentromerik X dual probu kullanılarak yapılan interfaz FISH çalışmasında iki olguda SRY pozitifliği gözlemlendi. Olgulardan ilki androjen duyarsızlığı sendromu görülen primer amenoreli olgu 6 ve ikincisi ambigius genitelyalı olup ovo testis yapısı gözlenen olgu 7'dir. Ambigius genitelyalı olan olgu 7'nin yapılan interfaz FISH görüntüsü Şekil 9'da gösterildi.



Şekil 9: SRY lokus spesifik (kırmızı işaretli) ve sentromerik X (yeşil işaretli) prob kullanılarak yapılan interfaz FISH sonucu elde edilen sinyallere sahip interfaz hücresi.

5.3 Moleküler Genetik Analiz Sonuçları

62 primer amenoreli, 8 Turner şüpheli ve 10 ambigius genitalya olgusuna SRY genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR çalışması sonucunda androjen duyarsızlığı sendromu görülen primer amenoreli hastaya ait kromozom ve ambigius genitalyalı olup ovo testis yapısı gözlenen 2 hastaya ait kromozomlar (2 ve 3. kuyucukta, olgu 6 ve 7) SRY açısından pozitif olarak değerlendirildi. 15. kuyucukta karşılaştırma amaçlı kullanılan erkek hipogonadotropik hipogonadizimli hastaya ait kromozodur. Pozitif olarak değerlendirilen hastalara (6- 7) ait agaroz jel görüntüsü Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10: SRY genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR sonrası elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.

6.TARTIŞMA

Temocin ve arkadaşları (88) 77 primer ve sekonder amenoreli dişide yaptıkları sitogenetik çalışmada 68 primer amenoreli hastanın 18 (%26. 4)'inde patolojik veya erkek karyotipine rastlamışlardır. Mondal ve arkadaşları (64) 72 primer amenoreli hastada yaptıkları sitogenetik çalışmada vakaların 24 (%33. 3)'de kromozomal aberasyon olduğunu tespit etmişlerdir ve müllerian kanal anomalilerinden sonra primer amenorenin II. en sık nedeninin kromozomal anomaliler olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada olguların 13 (%18.5)'inde gonadal agenezi, 27 (%37. 5)'inde müllerian kanal anomalileri bulmuşlardır. Roy ve arkadaşları (78) primer amenoreli 60 hastada yaptıkları sitogenetik çalışmada iki vakada tam testiküler feminizasyon sendromu tespit etmişlerdir. Chryssikopoulos ve Grigoriou (12) 77 primer amenoreli hastada yaptıkları sitogenetik çalışmada 25 hastada abnormal karyotip tespit etmişlerdir, 5 hastada ise testiküler feminizasyon sendromu olduğunu göstermişlerdir. Khartun (47) 40 primer amenoreli hastada yaptığı sitogenetik çalışmada 25 vakada kromozomal anomali tespit etmiştir ve primer amenorenin majör nedeninin müllerian disgenezis (%75) olduğunu bulmuştur. Ganguly ve Sahni (27) primer amenoreli 280 hastada yaptıkları standart sitogenetik analizler sonucunda vakaların %29'unda anormal bir karyotip tespit etmişlerdir. Seks kromozom anomalileri içerisinde %34 fenotipik olarak dişi olup 46, XY karyotipine, %51 saf 45, X veya mozaik veya X kromozomunun diğer aberasyonlarına sahipti. Biz 87 hastada yaptığımız çalışmada anormal karyotipe olguların 9 (%12.86)'da rastlanmıştır. Diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışma gurubumuzda anormal karyotipe sahip hasta sayısı azdır. Çalışmaya dahil edilme kriterleri içerisinde sadece primer amenore olması şartı olgunun çalışılması için yeterli görülmüştür. Primer amenoreli olgular içerisinde olup aynı zamanda

hipogonodotropik hipogonodozimli 7 vaka mevcuttur. Bu tür hastalarda LH, FSH, GnRH gibi hormon reseptörlerinde mutasyonlara rastlanabilmektedir. Bu hastalar çalışma dışı bırakıldığında kromozomal anomali oranı artmaktadır.

Özellikle Turner Sendromunda moleküler düzeyde Y kromozom materyalinin varlığı tespit edilmiştir. Farklı çalışmalarda bu materyalin düzeyleri farklı rapor edilmiştir. Bu oranlar %28, %36 ve %12'dir (55). Bizim çalışmamızda ambiguis genitelyalı ve primer amenoreli hastalarda yapılan moleküler genetik analizler sonucunda SRY pozitifliğine 2 hastada rastlanmıştır. Bu iki hastada ADS (Androjen Duyarsızlığı Sendromu) sendromludur. Turner tanısı konan 5 hastada SRY pozitifliğine rastlanmamıştır.

Androjen Duyarsızlığı Sendromları (ADS), erkek psödohermafroditizmi başlığı altında incelenmektedir. ADS; Tam Androjen Duyarsızlığı Sendromu, Kısmi Androjen Duyarsızlığı Sendromu ve Orta Androjen Duyarsızlığı Sendromu olmak üzere 3 fenotipe ayrılmaktadır (54). Eksik maskülinize erkekler de denen bu grup olgular; genetik cinsiyet olarak erkektirler ve testisleri vardır; fakat dış genital organlar normal erkek görünümünde değildir (54). Androjen duyarsızlığı sendromu 2- 5/100.000 sıklığa sahiptir (100). ADS, X'e bağlı resesif geçişli bir sendromdur (6, 54). Memelilerde erkek cinsiyet belirlenmesi Y kromozomu üzerinde kodlanan genetik bilgiyle kontrol edilir ve embriyonik gonadların testise farklılaşmasına öncülük eder (54). Fenotipik görünüm Wolf ve Müller kanalları olmayan testisli tam bir dişi fenotipten infertil veya kıllanması olmayan erkek fenotipe kadar değişkenlik göstermektedir. Aradaki fenotipler kliteromegali ve labial füzyonu olan dişi fenotip, ambigious genitelyalı bir fenotip ve mikropenis, hipospadias veya jinekomastili erkek bir fenotipi içermektedir (54).

Olgu 6 bu sendromun özelliklerini taşıyan vakaya aittir. ADS açısından değerlendirildiğinde tam ADS'nin klinik özelliklerine sahip olduğu gözlemlendi. Hasta SRY açısından yapılan FISH ve moleküler genetik analizlerde pozitif olarak değerlendirildi.

İnsanda Xp ve Xq delesyonlarına sahip dişi bireylerin fenotipleri birbirine oldukça benzerdir. Bu nedenle karyotip-fenotip korelasyonunu tam olarak ortaya koymak oldukça zordur (93). Gerçekte, Xq delesyonlarına sahip olguların büyük bir kısmında delesyonlu bölgenin büyüklüğüne bağlı olarak oligoamenore ve sonrasında sekonder amenore ve erken menopoz ortaya çıkmaktadır. Ayrıca Xq- olguların %43'ünde kısa boy ve %93'ünde ovarian disgenezis mevcuttur. Turner stigmatları Xq24'ün distalindeki kırıklarda yoktur. Ayrıca Xq25'in distalindeki kırıklarda sekonder amenore ve prematür menopoz dışında herhangi bir fenotipik bulgu mevcut değildir (93). Maraschio ve arkadaşları(58) Xq delesyonlarının analizini yaptıkları bir çalışmada 3. olgumuzla aynı karyotipe sahip obezite ve kısa boy gösteren bir dişide oligoamenore ve daha sonra sekonder amenorenin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Marozzi ve arkadaşları (59) ise prematür ovarian yetmezliği olan olgularda yaptıkları çalışmada Xq23 delesyonuna sahip bir olguda Turner stigmatlarının olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca Xq23 bölgesindeki delesyonlara sahip mozaik olmayan olgularda Turner stigmatlarının gözlenmediği belirten çalışmalar mevcuttur (58). Mesa-Cornejo ve arkadaşları (62) 45,X(6)/46,X,del(X)(q23-24) karyotipine sahip mozaik bir Turner olgusu tanımlamışlardır. Aynı karyotipe sahip olgu 3'te ise kısa boy ve boyun olmasına rağmen obezite ve menarş gözlenmemiştir. Ayrıca olgumuzda hipertiroidi ve işitme kaybı gibi Turner Sendromunun tipik özellikleride tespit edilmiştir. Hipertiroidi Turner Sendromlu olguların ancak %3'ünde görülmektedir (62). Turner sendromunda bile az görülen

hipertiroidinin olgu 3’de görülmesi karyotip-fenotip korelasyonları açısından oldukça önemlidir. Literatürde mozaik olmayan Xq23 delesyonuna sahip ve bahsedilen Turner sendromu özelliklerini taşıyan olguya rastlanmamıştır. Olgu 3’ü diğer Xq23 delesyonuna sahip vakalardan farklı kılan özelliklerinin nedenlerini açıklamak oldukça güçtür. Dişilerdeki Xq delesyonlarının niçin genel olarak böyle değişken fenotipler ortaya çıkardığını açıklamak zordur. Çünkü normal olarak anormal X kromozomu tercihen inaktive edilmeli ve böylece genetik denge korunmalıdır. Ancak Xq delesyonuna sahip bireylerde X inaktivasyonunun non-random olduğunu veya bunun tersi şekilde Xq- açısından seçimli bir inaktivasyonun gerçekleştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (93). Fenotipin değişken olmasının en önemli nedenlerinden biri Xp veya Xq’nun proksimalindeki gelişim genlerinin, bazı X otozom translokasyonlarında görülen X inaktivasyonunun değişken yayılmasına benzer şekilde inaktive olmasıdır (93). Anormal Xq- kromozomuna sahip olan dişilerde herhangi bir fenotipik bulgunun görülüp görülmemesi bir kaç alternatif yol veya yolun beraber görev yapmasına bağlıdır. Bunlardan ilki, Xq- kromozom embriyonik gelişim boyunca inaktive edilirse herhangi bir fenotipik etki görülmeyebilir. Ancak X kromozom inaktivasyonunun random gerçekleştiği unutulmamalıdır. İkinci olarak, daha muhtemel bir hipotez Xq23- 27 kritik bölgesindeki kırılma noktasının bir pozisyon etkisi göstermesidir. Eğer kırılma noktası overlerin normal gelişimini sağlayacak genler üzerinde etkili değilse her iki X kromozomunun normal işlevlerini yerine getirdikleri söylenebilir. Üçüncü olarak eğer bu pozisyon etkisi direk olarak overlerin gelişiminden sorumlu olan genleri etkilerse fenotipik etkiler görülebilir (93). Sonuç olarak, yapısal anormal X kromozomlu bir bireyde tamamen bozuk bir inaktivasyon genellikle normal bir fenotiple beraberlik gösterirken random X inaktivasyonunun gerçekleştiği durumlar

anormal bir fenotiple beraberlik göstermektedir (93). Olgu 3 fenotip-genotip korelasyonu açısından literature önemli katkılar sağlayacağı kanatindeyiz. Bu tip hastalarda sekonder seks karakterlerini geliştirmek, adet görmelerini sağlamak ve kemik yoğunluğunu korumak için estrogen + progesteron preparatları siklik olarak kullanılmalıdır. Ayrıca potansiyel over kanseri açısından hastalar yakın takipte tutulmalı veya overler cerrahi olarak çıkartılmalıdır (93).

45, X/ 46, XY mozaikliği nadir kromozomal bir anomali olup her 10. 000 yenidoğan infantta ve ikinci trimester amniyosentezlerinde yaklaşık % 1.5 oranında görülmektedir. Oluşan fenotip normal bir erkekten klasik Ullrich- Turner Sendromuna (UTS) kadar değişmektedir (17). UTS hastalarının %40-60'ı X kromozomunun tek bir normal kopyasına sahipken geri kalan UTS hastaları ise yapısal olarak anormal ikinci bir seks kromozomuna sahiptirler veya ikinci seks kromozomu açısından mozaiktirler. Hastaların prognozu, karyotipin tipine bağlı olarak değişmektedir (10). Farklı karyotiplere sahip (45,X mozaik veya bir markır kromozomlu hastalarda) UTS hastalarında önceki raporlar Y kromozomunun veya Y kökenli dizilerin varlığının %4- 61 arasında değiştiğini göstermektedir. Canto ve arkadaşları (10) 3 UTS'li hastada yaptıkları çalışmada hastalardan 2'sinde SRY gen mutasyonunu tespit etmişlerdir. Tüm 3 hastada endokrinolojik çalışmalarla hipergonodotropik hipogonadizim varlığını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızdaki olgu 5 hem hipergonodotropik hipogonadizim varlığı hemde rudimenter bir uterusun varlığı açısından Canto ve arkadaşlarının olgularıyla benzeşmektedir. Dişiye yakın bir fenotipe sahip olan olguda, dış genitalyada virilizasyon olmamasına rağmen olguda göğüs gelişimi mevcut değildir. Bu fenotipin oluşumunda en önemli etkenlerden biri SRY geninin delesyona uğramış olması veya genin fonksiyon kaybına neden olan bir mutasyona sahip olmasıdır. UTS'li hastalarda SRY gen

pozitifliğinin ortaya konması için yapılan pek çok çalışmada farklı oranlar tespit edilmiştir. UTS'li dişi fenotipine sahip olan olgularda SRY gen pozitifliği oranı oldukça düşüktür. Held ve arkadaşları (36) 91 hastada yaptıkları çalışmada markır kromozoma sahip 8 hastada SRY geninin varlığını tespit etmişlerdir. Medlej ve arkadaşları (60) 40 hastada yaptıkları çalışmada 1 hastada SRY geninin varlığını bulmuşlardır. Kocova ve arkadaşları (49) 18 hastada yaptıkları çalışmada 6 hastada SRY pozitifliğini saptamışlardır. Ancak 3 çalışma grubu da SRY gen mutasyonlarını taramamışlardır. Yaptıkları çalışmadaki 6 olguda SRY gen pozitifliğinin ortaya koymak için yapılan FISH çalışmasında kullanılan SRY probu için sinyal görülememiştir. Buda olgularda SRY gen bölgesinin delesyona uğramış olduğunu göstermektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda farklı genotipe sahip farelerde aynı SRY gen mutasyonunun farklı fenotipler ortaya çıkardığı bulunmuştur. Cameron ve Sinclair farklı genetik altyapılı bireylerde, gendeki aynı mutasyonun SRY aktivitesini azaltarak testis gelişimini engelleyebileceğini ileri sürmüşlerdir (9). Bu SRY gen pozitifliğinin UTS hastalarında fenotipin belirlenmesinde etkili olmayabileceğini göstermektedir. Çalışmamızdaki hastada Y kromozom mozaikliği %73'dür. UTS olgularında periferik kanda bu derecede yüksek bir mozaiklik oranına literatürde rastlanmamıştır. UTS hastalarında bir Y kromozomunun varlığında gonadoblastom veya disgerminom gelişme riski %10-%20'dir (53, 95). Bu nedenle hastaya kesin tanı konduktan sonra hastanın derhal genetik danışmanlığa yönlendirilmesi ve gonadoblastom veya diğer tümöral gelişimler hakkında bilgilendirilmesi gerekmektedir. Olgunun yaşı 30 olmasına rağmen gonadoblastom gelişimi saptanmamıştır. Page Y pozitif dişi fenotipine sahip bireylerde kanser gelişme riski açısından Y kromozomu üzerinde bir gonadoblastom (GBY) geninin var olabileceğini ileri sürmüştür (73). GBY lokusu tam olarak lokalize

edilmemesine rağmen aday genler tanımlanmıştır (50). GBY lokusu tam olarak lokalize edilinceye kadar Y kromozom kökenli dizilere sahip UTS'li hastalarda disgenetik gonadların uzaklaştırılması gerekmektedir. Sonuç olarak UTS hastalarında SRY gen pozitifliği ve mutasyonlarının FISH veya moleküler genetik yöntemlerle belirlenmesi gerekmektedir. PZR, UTS olgularında Y kromozom materyalinin tespitinde oldukça duyarlı bir yöntemdir (72).

İ(Xq), Turner sendromlu vakaların %18'inde görülmektedir. Bu vakalarda fenotipik yapısal anomaliler yaygın değildir. Özellikle otoimmün hastalıklar açısından artmış riske sahiptirler. Bunun yanı sıra işitme kaybı sıklıkla görülmektedir. Gastrointestinal sistem bozukluğundan Crohn's hastalığına i(Xq) bireylerde oldukça sık rastlanmaktadır. İ(Xq)'lu dişilerin %83'ü tiroid oto antikorlarının pozitif olduğu gösterilmiştir. Diğer karyotiplere sahip Turner sendromuna sahip kişilerde bu oran %14'tür (21). Çalışmamızdaki olgu 4'te TSH hormon değerleri normaldir. Bu açıdan olgu i(Xq) karyotipine sahip hastalar içerisinde nadirdir. Hastada Turner sendromunun tipik özelliklerinden olan cubitus valgus tespit edilememiştir. Hastada işitme kaybı mevcuttur.

Sonuç olarak sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler incelemelerimiz sonucunda 87 hastanın 9 tanesinde anormal karyotip tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilme kriterleri içerisinde sadece primer amenore ve ambigius genitalya olması şartı olgunun çalışılması için yeterli görülmüştür. Primer amenoreli olgular içerisinde olup aynı zamanda hipogonodotropik hipogonodozimli 7 vaka mevcuttur. Bu tür hastalarda LH, FSH, GnRH gibi hormon reseptörlerinde mutasyonlara rastlanabilmektedir. Bu hastalar çalışma dışı bırakıldığında kromozomal anomali oranı artmaktadır. Çalışmamız anormal karyotipe sahip bireylerde kromozomal kırık noktalarda yer alan genlerin belirlenmesi ve primer

amenoreye neden olan genlerin ortaya konması açısından oldukça önemlidir. Primer amenore, ambigius genitalya ve Turner Sendromu nedeniyle sitogenetik laboratuvarlarına başvuran hastalarda rutin sitogenetik değerlendirmeyi takiben X kromozom mozaiklikleri ve SRY gen pozitifliğinin belirlenmesi için FISH metodu uygulanmasının daha başarılı sonuçlar vereceği kanaatindeyiz. Özellikle Turner karyotipine sahip hastalarda Y kromozom dizilerinin tespiti bu hastalarda gonodblastom gibi tümör oluşumları açısından bir gösterge olabilir. Bu nedenle bu tür hastalarda moleküler genetik yöntemlerle Y kromozom dizilerinin taranması tavsiye edilebilir. SRY pozitif değerlendirilen hastalarda eğer mümkünse daha sonra yapılacak test, SRY gen mutasyonlarının taranmasıdır. İlaveten primer amenore olup artmış düzeyde FSH ve LH hormon düzeylerine sahip normale yakın seksüel gelişim gösteren hastalarda bu gen reseptör mutasyonları taranmasının daha bilgi verici olacağını düşünmekteyiz. Ancak gen mutasyonlarının taranması maliyeti yüksek bir tanı yöntemidir. Bu nedenle bu tür hastaların DNA örneklerinin bu mutasyonları çalışan ana merkezlere gönderilerek mutasyon taraması yapılması daha uygun olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Ach K, Dallel YN, Bellara I, Trimech AS, Maaroufi BA, Chaieb CM, Chaieb L (2005). Nontraumatic ethmoid cerebrospinal fluid rhinorrhea complicating Sheehan syndrome. *Presse Med* 34 : 935- 937.
2. Anonim (2005). Erkek İnfertilitesi Erişim: (med.cu.edu.tr/urology/ DersNot/ bolum21.h tm). Erişim tarihi: 15. 12. 2005.
3. Baker TG (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond* 158: 417-419.
4. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellows M Genetic (1990). Evidence equating SRY and the testes-determining factor. *Nature* 348:448- 451.
5. Body AE, Spare S, Bower B, Reiehl S (1979). Neurogenic galaetorrhea-amenorrhea. *J. Clin. Endocr. Metab* 47: 1374- 1379.
6. Boehmer AL, Brinkmann O, Bruggenwirth H, Van Assendelft C, and et al (2001) Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4151- 4160.
7. Burger HG, Famada Y, Bangah ML, McCloud PI, Warne GL (1991). Serum gonadotropin, sex steroid, and immunoreactive inhibin levels in the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 682- 686.
8. Buvat J, Buvat-Herbaut M (1982). Prolactine, bromoeriptine et fontion gonadique de la femme. II. Traitement des hyperprolaetinemie feminines et autres indieations de la bromoeriptine. *J. Oyn. Obstet. Biol. Repr* 1: 509-514.
9. Cameron FJ, Sinclair AH (1997). Mutations in SRY and SOX9: testis determining genes. *Hum Mutat* 9: 388-395.
10. Canto P, Chesnaye E, Lopez M, Cervantes A, and et al (2000). A mutation in the 5' non-high mobility group box region of the SRY gene in patients with Turner Syndrome and Y mosaicism. *The Journal of Clin Endocrinol Metab* 85: 1908-1911.
11. Christopher M. Haqq and Patricia K. Donahore (1998). Regulation of Sexual dimorphism in mammals. *American Pysiological Society* 78: 213-221.
12. Chryssikopoulos A, Grgoriou O (1976). The etiology in 77 primary amenorrhea patients. *J Obstet Gynaecol India* 26: 268-79.

13. Chua CH, Szabo P, Vitek A, Grzeschik K-H, John M, White PC (1987). Cloning of cDNA encoding steroid 11 beta-hydroxylase (P450C₁₁). *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 71-93.
14. Clayton RN, Rodin DA, Robinson S, Hodgkinson J, Worswick L (1991). Epidemiology, clinical and hormonal diagnosis of polycystic ovarian syndrome. In *Polycystic Ovaries a disorder or a symptom*, edited by RW Show, Partheon Publishing. Sayfa 1- 16.
15. Conway GS (1991). İnsulin resistance and obesity in polycystic ovarian syndrome. In: *Polycystic Ovaries a disorder or a symptom*, edited by RW Show, Partheon Publishing, Sayfa 69-80.
16. Coran AG, Porley TZ (1991). Surgical management of ambiguous genitalia in the infant and child, *J Pediatr Surg* 26: 812-816
17. Costa T, Lambert M, Teshima I, Ray PN, Richer CL, Dallaier L (1998). Monozygotic twins with 45,X/46,XY mosaicism discordant for phenotypic sex. *Am J Med Gen* 75: 40- 44.
18. Modan-Moses D, Litmanovitch T, Rienstein S, Goldmanb B, and Aviram-Gordrin A (2003). True Hermaphroditism with Ambiguous Genitalia Due to a complicated mosaic karyotype. *American Journal of Medical Genetics* 116 A:300- 303.
19. De Brux J(1982). *Histopatologie Ginecologique*. Masson, Paris. Sayfa 417- 32.
20. Droeseh K, Droeseh J, Chumas J, Bronson R (1990). Laparoscopic gonadectomy for gonadal dysgenesis. *Fertil Steril* 53: 360- 371.
21. Elsheikh M, Dunger B, Conway S and Wass AH (2002) Turner's syndrome in adulthood. *Endocrine Reviews* 23: 120-140.
22. Etler K, Erel CT, Oral E, Calay Z (1997). 46 XY Nonfonksyonel gonat sendromu. *Türk Fertilite Dergisi* 5:151- 156.
23. Etsuji U, Agnes JR, Biaoru L, Lukasz M, and et al (2001). SRY and Architectural Gene Regulation: the Kinetic Stability of a Bent Protein- DNA Complex Can Regulate Its Transcriptional Potency. *Molecular Endocrinology* 15: 363- 377.
24. Findling JW, Raff H (2005). Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 34: 385- 402
25. Fisher EMC, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, et. Al (1990). Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosome: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell.* 63: 1205-1213.
26. Fogel CI (1997). Endocrine causes of Amenorrhea. *Nippon Rinso* 55 : 2876- 81.

27. Ganguly BB, Sahni S (2003). X chromosomal abnormalities in India adolescent girls. *Teratog Carcinog Mutagen. Suppl 1*: 245- 53.
28. Gokhan Ozisik, John C. Achermann, and J. Larry Jameson (2002). The role of SF1 in adrenal and reproductive function: insight from naturally occurring mutations in humans. *MolGenet and Metab* 76 : 85- 91.
29. Gondos B, Bhiraleus P, Hobel CJ (1971). Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1; 110: 644-52.
30. Gondos B, Westergaard L, Byskoy A (1986). Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study, *Am J Obstet Gynecol* 55: 189- 195.
31. Gurakan, and J. Larry Jameson (2002). Gonadal Determination and Adrenal Development are Regulated by the Orphan Nuclear Receptor Steroidogenic Factor-1 in a Dose- Dependent Manner. *The Journal of endocrinology* 87: 1829- 1833.
32. Gustafson ML, Lee MM, Asmundson L, MacLaughlin DT, Donahoe PK (1993). Müllerian inhibiting substance in the diagnosis and management of intersex and gonadal abnormalities. *J Pediatr Surg* 28: 439-447.
33. Hakan Kaya, Mekin Sezik, Okan Özkaya, and Seyit Ali Köse. (2002). Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. Associated with Unilateral Gonadal Agenesis . *J Repord Med* 18 : 2454- 2459.
34. Haqq CM, Donahoe PK (1998). Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiological, Reviews* 78: 1- 33.
35. Harley LR, Layfield S, Mitchell Ci, Forwood IK, Iohn AP, Brigg LI, McDowall S, Jans DA. (2003). Defective important recognition and rudiment import of the sex- determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Pnas* 100: 7045- 7050 .
36. Held KR, Kerber S, Kaminsky E, Singh S, and et al (1992). Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet* 88: 288-294.
37. Hengster P, Menardi G (1992.). Ovarian cysts in the newborn. *Pediatr Surg Int* 7: 372-376.
38. Hengstschlager M, [Van Trotsenburg M](#), [Repa C](#), [Marton E](#), [Huber JC](#), [Bernaschek G](#). (2003). Sex chromosome aberrations and transsexualizm. *Fertility and Sterility* 79 : 124-129.
39. Hughes EG, Robertson DM, Handelsman DJ, Hayward S, Healy DI, de Kretser DM (1990) Inhibin and estradiol responses to ovarian hyperstimulation: effects of age and predictive value for

in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 358-64.

40. Jennifer A. Marshall Graves (2000). Human Y Chromosome, Sex Determination, and Spermatogenesis. *Biology of Reproduction- Marshall Graves* 63: 667-71.

41. Jennifer A. Marshall Graves (2002). The rise and fall of SRY. *Trends in Genetics* 18: 259-64.

42. John C. Achermann, Joshua J. Meeks, J. Larry Jameson (2001). Phenotypic spectrum of mutations in DAX- 1 and SF- 1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 185: 17- 25.

43. Jonathan R. Pletcher, and Gail B. Slap, (1999). Menstrual Disorders– Amenorrhea. *Pediatric Clinics of North America* 46 : 158-163.

44. Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP (1973). Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* 29: 1- 41.

45. Joun Carlos Zenteno- Ruiz, Susano Kofman- Afaro and Juan Pablo Mendez (2001). 46, XX Sex Reversal. *Archives of medical Research* 32: 559- 566.

46. K. McElreavey, E. Vilain, Barbaux, J. S. Fuqua, and et al (1996). Loss of sequences 3' to the testis- determining gene, SRY including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination. *Medical Sciences* .93: .8590- 8594.

47. Khartun S (2000). Cytogenetics in primary amenorrhoea. *OB/GYN, Babgandhu sheikh mujib medical university. Banglades. sayfa* 123-126.

48. Kim JH, Seibel MM, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Ransil BJ, Hametz PA, Richards CJ (1992). The inhibitory effects of müllerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 911-922.

49. Kocova M, Siegel SF, Wenger SL, Lee PA, Truceo M (1993). Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *Lancet* 324: 140- 143.

50. Lau YF, Lau HW, Komuves LG (2003). Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res* 101: 250-260.

51. Lee MM, Donahoe PK (1993). Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrin Rev* 14: 152-64.

52. Lee SJ, Lenton EA, Sexton L, Cooke ID (1988). The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, estradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles. *Hum Reprod.* 38: 149-85 .

53. Livadas S, Mavrou A, Sofocleous C, Vliet-Constantinidou CV, Dracopoulou, Dacou-Voutetakis C (2003). Gonadoblastoma in a patients with del (9) (P22) and sex reversal: report of a case and review of tilt: literature. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 143: 174- 177.
54. Lopez M, Canto P, Aguinaga, Torres L, and et al (1998). Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner Syndrome. *American journal of medical Genetics* 76: 120-124.
55. Lopez-Lopez M, Zenteno JC, Mendez JP, Kofman-Alfaro S. (1998). Genetic heterogeneity and pbenotypic variability in 46,XY sex reversal. *Rev Invest Clin* 50: 171- 176.
56. M. D. Moura, P. A.A. S. Navarro, M. F. Silva de Sa, R. A. Ferriani, S. M. Unzer, R. M. Reis (2000). Hypogonadotropic- hypogonadism. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 71: 141- 145.
57. Mann DR, Akinbami MA, Gould KG, Tanner JM, Waiien K (1993). Neonatal treatment of male monkeys with a gonadotropin-releasing hormone agonist alters differentiation of central nervous system centers that regulate sexual and skeletal development, *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1319- 24.
58. Maraschio P, Tupler R, Dainotti L B E, Larizza D, Bernardi F, Hoeller H, Garau A, Tiepolo L(1996). An analysis of Xq deletions. *Hum Genet* 97: 375–381.
59. Marozzi A, Manfredini E, Tibiletti MG, Furlan D , Villa N, Vegetti W, Crosignani PG, Gineli EG, Meneveri ER, Dalprà L (2000). Molecular definition of Xq common-delated region in patients affected by premature ovarian failure. *Hum Genet* 107:304–311.
60. Medlej R, Lobaccaro JM, Berta P and et al (1992). Screening for Y- derived sex determinig gene SRY in 40 patients with Turner syndrome. *The J Clin Endocrinol Metab* 75: 1289- 1292.
61. Meduri G, Touraine P, Beau I, Laliuna O, and et al (2003). Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle- stimulating hormone receptor. Clinical, histological and molecular studies. *The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism* 88: 3491- 3498.
62. Mesa-Cornejoa VM, García-Cruza D, Monroy-Jaramillod N, Vásquez AI, Dávalosa NO, Galavizb C, Kofmand S (2001). Del Xq23 in a Mosaic Turner Female. *Molecular and Cytogenetic Studies Annales de Génétique* 44: 171–174.
63. Modan-Moses D, Linnanovitch T, Riensteirr S, Meyerovitch J, Goldmm B, Aviram-Goldring

- A. (2003). True hermafroditism with ambiguous genitalia due to a complicated mosaic karyotype. Clinacal Futures Cytogenetic Findings, and Literature Review. American Journal of Medical Genetics 116A: 300- 303.
64. Mondal SK, Guha D, Banerjee D, Sinha SK (2002). Study of primary amenorrhoea with special reference to cytogenetic evaluation. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 65: 450-452.
65. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG (1987). Biological actions of androgens. Endocr Rev 8: 1-28.
66. Moore CCD, Grumbach MM (1992). Sex determination and gonadogenesis: a transcription cascade of sex chromosome and autosome genes. Seminars Perinatol 16: 266-78.
67. Motta PM, Makabe S (1986). Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three-dimensional microanatomical study by scanning and transmission electron microscopy. J Submicrosc Cytol Pathol 18: 271-90.
68. Muller J, Schwartz M, Skakkebaek NE (1992). Analysis of the sex-determining region of the Y ehromosome (SRY) in sex reversed patients: point-mutation in SRY causing sex-reversion in a 46,XY female. J Clin Endocrinol Metab 75: 331-3.
69. Mülazım Y (2000). Klinik İnfertilite. İkinci Baskı Eryılmaz Ofset, Ankara. Sayfa 247- 269.
70. Myers-Seifer CH, Charest NJ (1992). Diagnosis and management of patients with ambiguous genitalia. Seminars Perinatol 16: 322- 329.
71. New MI (1992). Female pseudohermaphroditism. Seminars Perinatol. 16: 299-318.
72. Osipova GR, Karmanov ME, Kozlova SI, Evgrafov OV (1998). PCR detection of Y-specific sequences in patients with Ullrich-Turner Syndrome. Clin Implications and Limitations. Am J Med Genet 76: 283-287AA.
73. Page DC (1987). Hypothesis a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. Devolopment 101: 250- 260.
74. Poulat F, Goze C, Boizet B, Berta P (1994). Human Testicular Determining Factor from the gene to protein. Ann Endocronoloji (Paris) 54: 307- 14.
75. Ranke MB, Sanger P (2001). Turner's syndrome. The Lancet 358: 309- 314.
76. Reiner A, Veitia, Laura Salas- Cortes, Chris Ottolenghi, Eric Pailhoux, Corinne Cotionot, Marc Fellous (2001). Testis determination in mammals, more questions than answers. Molecular and Cellular endocrinology 179: 3- 5.

77. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF (1987). Follicular depletion during the menopausal transition evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion, *J Clin Endocrinol Metab* 65: 1231-1237.
78. Roy AK, Banerjee D (1987). Cytogenetic Study of primary amenorrhea. *Int J Fertil* 32: 245-249.
79. Schroeder B, Hertweck SP, Sanfilippo JS, Foster MB (1999). Correlation between glycemic control and menstruation in diabetic adolescent. *Department of Obstetrics and Gynecology* 46 : 505-518.
80. Simpson JL, Rajkovic A. (1999). Ovarian differentiation and gonadal failure. *Am J Med Genet* 29: 186- 200.
81. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith JJ, Foster JW, Frischauf A-M, Loyell-Badge R, Goodfellow PN (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
82. Southren AL, Olivo J, Gordon GG, Vittek J, Brener J, Rafii F (1974). The conversion of androgens to estrogens in hyperthyroidism. *J. Clin. Endocr. Metab* 38: 207-214.
83. Speed RM (1988). The possibly role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human fetal oocytes. *Hum Genet* 78: 260- 268.
84. Speiser PW, Laforgia N, Kato K, Pareira J, and et al. (1990). First trimester prenatal treatment and molecular genetic diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J Clin Endocrinol Metab* 70: 838- 841.
85. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC (1992). Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21 -hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 90: 584-589.
86. Sperof L, Gordon JD (1994). Clinical gynecology endocrinology and infertility. Nobel Tıp Kitabevleri. Beşinci Baskı. Ankara. Sayfa 715-63.
87. Stein LF, Leventhal ML.(1935) Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 29: 181- 185.
88. Temocin K, Vardar MA, Süleymanova D, Ozer E, Tanriverdi N, Demirhan O, Kadayifci O (1997). Results of cytogenetic investigation in adolescent patients with primary or secondary amenorrhea. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 10: 86-88.

89. Thigpen AE, Davis DL, Gautier T, Imperato-Meginley J, Russell DW (1992). Brief report The molecular basis of steroid 5 α -reductase deficiency in a large Dominican kindred. *New Engl J Med* 327: 1216-1219.
90. Tho SP, Layman LC, Lanclos DK, Plouffe L J, Byrd JR, McDonough PG (1992). Absence of the testicular determining factor gene SRY in XX true hermaphrodites and presence of this locus in most subjects with gonadal dysgenesis caused by Y aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol* 167: 1794 -1802.
91. Tiliy J, Kowalski KI, Sehomborg DW, Hsueh AJ (1992). Apoptosis in atresia ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 13 : 1670-1675.
92. Timmreck LS, Reindollar RH (2003). Contemporary issues in primary amenorrhea. *Obstet Gynecol Clin North Am* 30: 287- 302.
93. Ting TC, Chang SP (2002). Coexistence of gonadal dysgenesis and Mullerian agenesis with two mosaic cell lines 45, X/ 46, X, del (X) (p22. 2). *Medline* 14 : 441- 444.
94. Van Wagenen G, Simpson ME (1965). Embryology of the Ovary and Testis. *Homo Sapiens and Mucaca Mulatta*, Yale University. New Haven, Connecticut 56: 207-221.
95. Verp MS, Simpson JL (1987). Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 25: 191-218.
96. Vincent R. Harley, Sharon Layfield, Claire L. Mitchell, Jade K. Forwood, and et al. (2003). Defective importin β recognition and nuclear import of the sex- determining factor SRY are associated with XY sex- reversing mutations. *Pnas* 100: 7045- 7050.
97. Wilson JD, Griffin JE, George FW, Leshin M (1981). The role of gonadal steroids in sexual differentiation. *Recent Prog Horm Res* 37: 1- 12.
98. Wolf U, Schempp W, Scherer G (1992). Molecular Biology of the Human Y chromosome. *Rev, Physiol Biochem Pharmacol* 121: 148- 213.
99. Yıldırım M, Tıraş MB, Yıldız A, Güner H (1998). Estrogen- Progestagen Combination Therapy Before HMG Induction in Hypogonadotropic. *IFFS' 98, 16th World Congress on Fertility and Sterility and 54th Annual meeting of the American Society for Reproductive Medicine* 4-9.
100. Yüce H, Akın A, Etem E, Deveci ŞD (2004) 45,X/46,XY Karyotipine Sahip Ullrich-Turner Sendromlu Bir Olgu. *Fırat Tıp Dergisi* 9 : 96- 98.

101. Zenteno-Ruiz JC, Kofinan-Alfaro S, Mendez JP. (2001). 46,XX sex reversal. Archives of Medical Research 32: 559- 565.

8. ÖZGEÇMİŞ

1978 tarihinde Malatya’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Malatya’da tamamladım. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Ebelik Bölümünü kazandım ve 2001 yılında mezun oldum. 2002 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım.

Rabia AKEL