



Primer Amenore ve Cinsiyet Belirsizliği Gösteren Olguların Sitogenetik ve Moleküler Genetik Tekniklerle Değerlendirilmesi

Ebru ETEM
Rabia AKEL
Halit ELYAS
Hüseyin YÜCE

Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı
Elazığ-TÜRKİYE

Primer amenore üreme çağındaki dişilerin %1 ile 3'ünde görülmektedir. Çalışmada primer amenoreli hastalarda sitogenetik anomali oranının ve genotip fenotip korelasyonlarının bulunması amaçlanmıştır.

Primer amenoreli 62 olguda sitogenetik çalışma yapıldı. Olgular SRY geni FISH ve moleküler genetik yöntemler kullanılarak analiz edildi.

Kromozomal aberasyonlar 11 vakada bulundu. Kromozomal anomaliler müllerian kanal anomalilerinden sonra primer amenorenin en sık ikinci nedenidir. En sık kromozomal anomali 11 vakadan 7'sinde görülen Turner sendromudur. Erkek genotip ve inguinal testisli tam testiküler feminizasyonlu (ADS) 2 olguda tespit edildi. ADS'li 2 olguda SRY pozitifliği bulundu. Diğer olgularda SRY pozitifliğine rastlanmadı.

XY hücre hattı içeren bir karyotipin primer amenoreli bir olguda bulunması durumunda artmış neoplazi riskinden dolayı gonadoktomi önerilmelidir. Turner sendromu primer amenorenin yaygın olmayan bir nedenidir. Kısa boy TS'li dişilerde değişmeyen bir bulgudur. Biyosentetik büyüme hormonuyla tedavinin, TS'li olguların çoğunda yetişkin boy artışında etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle çocukluk ve adolesan dönemde TS'nin erken tanısı oldukça önemlidir. Genetik danışmanlık hastaların durumu kabullenmesi açısından gerçekçi olmalıdır. Böylece hastaların toplumda fiziksel, psikolojik, duygusal ve sosyal olarak uyum sağlamalarına yardımcı olunabilir.

Anahtar Kelimeler: Primer amenore, kromozom aberasyonu, FISH, sitogenetik

The Examination of Support Healthcare Personal Knowledge About Hepatitis

Primary amenorrhoea occurs in 1 to 3% of women in the reproductive age group. This study is aimed to find of cytogenetic anomalies ratio and of genotype-phenotype correlation in patients with primary amenorrhoea.

The cytogenetic study of 62 patients with primary amenorrhoea was performed. Cases were analysed using FISH and molecular genetic methods to detect of SRY gene.

Chromosomal aberrations were seen in 11 cases (17.7%) and it comes second most common cause of primary amenorrhoea after mullerian duct abnormalities. The most common cause was Turner's syndrome (TS) seen in 7 out of 11. Two cases of complete testicular feminisation syndrome with male genotype (46,XY) and inguinal testis were also detected. It has been observed positive SRY in patients with ADS. Other cases not detected the positive of SRY gene.

It is suggested that management of an patient with primary amenorrhoea whose sex karyotype includes an XY cell line should include gonadal excision because of increased risk of neoplasia. TS is a relatively common cause of primary amenorrhoea. Short stature is an almost invariable finding in women with TS. Treatment with biosynthetic growth hormone appears to be effective in increasing adult height in many of TS. In this reason, it is very important the early diagnosis of TS during childhood and adolescence. The genetic counselling should be realistic so that patients accept their condition, which will help them to adjust in society physically, psychologically, emotionally and socially.

Key Words: Primary amenorrhoea, Chromosome aberrations, FISH, cytogenetic

Geliş Tarihi : 19.09.2006
Kabul Tarihi : 18.10.2006

Yazışma Adresi

Ebru ETEM
Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı
23100
Elazığ-TÜRKİYE

ebruetem@gmail.com

Giriş

Primer amenore, büyüme veya sekonder seks karakterlerinin gelişim veya büyümesindeki yokluk ile 14 yaşına kadar adet görememe veya sekonder seks karakterlerinin oluşması ile birlikte normal büyüme ve gelişmenin varlığına bakılmaksızın 16 yaşına kadar adet görememe durumudur ve insidansı % 0.1 ile % 2.5 arasında değişir. Primer amenorenin başlıca nedenleri gonadal yetmezlik % (48.5), uterus ve vajinanın konjenital yokluğu % (16.2) ve konstitusyonel gecikme % (0.5)'dir (1, 2). Primer amenore hipotalamus veya merkezi, hipofiz, ovarian ve uterus kaynaklı olabilir.

Bunun yanı sıra hipotiroidizm veya hipertroidizm, kronik hastalıklar, kistik fibrosis, sürrenal hastalıklar (Cushing's hastalığı), hipoglisemi, aşırı şişmanlık, diabetes mellitus, konjenital kalp hastalığı(cyanotic), konjenital adrenal hiperplazi, kraniyofarinjom, adrenal tümörler, Prader Willi sendromu, aşırı kilo kaybı (anorexia nervosa, bulimia, aşırı egzersiz, veya diğer nedenler) ve malnutrisyon gibi genel nedenlerden de kaynaklanabilir (3).

Primer amenorede kromozomal anomalilerin oranı farklı çalışmalarda farklı oranlarda bulunmuştur. Bu oranlar %15.9'la %63.3 arasında değişmektedir (4-10). Bu farklılık muhtemelen farklı hasta seçim kriterlerinden kaynaklanmaktadır. Bu güne kadar X ve Y kromozomu ile ilgili olarak pek çok yapısal anomali tanımlanmıştır (11, 12). Özellikle Turner sendromunun (TS)'da X kromozomuyla ilgili olarak en sık rastlanılan kromozomal anomaliler 45,X , 45,X/46,XX , 46,X,i(Xq), 46,X,del(X), 46,X,r(X) ve 45,X/47,XXX şeklindedir (13). Primer amenoreli olgularda 46,XY karyotipi başta olmak Y kromozomunun delesyon ve duplikasyonlarının da yer aldığı kromozomal anomaliler saptanmıştır (12). Androjen Duyarsızlığı Sendromu (ADS) X'e bağlı resesif geçiş gösteren bir sendromdur. Sendromda karyotip 46,XY olup olgularda inguinal testis yapısı ve belirsiz dış genitaler en belirgin özelliklerdir (14).

Çalışmada primer amenoreli bireylerde kromozomal anomalilerin saptanarak bu tür hastalarda farklı kromozomal anomalilerin (yeniden düzenlemelerin) yüzdesinin bulunması, SRY lokus spesifik prob kullanılarak yapılacak interfaz FISH çalışmasıyla Y kromozom kökenli dizilerin tespit edilmesi, SRY spesifik primerler kullanılarak yapılacak moleküler genetik analizle SRY pozitifliğinin değerlendirilmesi ve tespit edilen karyotipler ve fenotipler arasındaki ilişkilerin ortaya konması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Sitogenetik Analiz: Çalışmada, 2003-2005 yılları arasında Fırat Tıp Merkezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD'na primer amenore nedeniyle kromozom analizi istemi yapılan 62 hasta retrospektif olarak değerlendirildi. Hastaların karyotipinin ortaya konması için fitohemaglutinin (PHA) indüklenmiş periferik kan lenfositleri kullanılarak 72 saatlik kültür yapıldı. Kültür sonrası elde edilen metafaz preparatları tripsin Giemsa bantlama yöntemi (GTG) kullanılarak boyandı (15). Toplam 5 metafaz plağının tam analizi yapıldı. İncelenen metafaz sayısı, X kromozomu açısından olguların mozaik Turner olup olmadığının belirlenebilmesi için 100 hücre sayılmalıdır.

FISH Analizi: İnterfaz-FISH çalışması TS'nin en azından 2 özelliğini (kısa boy, seksüel infantizim) taşıyan 34 ve erkek yönünde virilizasyonun belirlendiği 2 olguya yapıldı. FISH için biotinle işaretli sentromerik X ve teksas red işaretli SRY genine spesifik dual-color kokteyl bir prob kullanıldı (Vysis, Illinois, USA). Preparasyon işlemleri Vysis protokolüne uygun olarak yapıldı. Mozaiklik varlığının ve SRY pozitifliğinin

değerlendirilmesi için 100 interfaz hücresi floresan mikroskopta incelendi (15).

Moleküler Analiz: Moleküler genetik herhangi bir kriter uygulanmaksızın 62 hastaya uygulandı. Gerekli olan olgu DNA'ları kandan standart yöntemlerle elde edildi. SRY bölgesinin çoğaltılmasında ileri primer olarak 5' CGATTGTCCTACAGCTTTGTC-3' ve geri primer olarak 5'- TCGCACTCTCCTTGTTCCTTTTGAC-3' kullanıldı (16). PZR cihazında çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek için bir döngüde 96°C'de 3 dakika, denatürasyon (melting) için 96°C'de 30 saniye, bağlanma (annealing) için 60°C'de 1 dakika, uzama (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. PZR sonucunda elde edilen 648bp'lık PZR ürünü % 2'lik agaroz jelde yürütüldü.

İstatistik Analizler: Yaş ve diğer demografik veriler SPSS 10 programına kaydedildi. Tüm İstatistik analizler bu programla gerçekleştirildi.

Bulgular

Primer amenoreli hastaların yaş ortalaması 21. 14 ± 7. 27 ve boy ortalamaları 153. 60 ± 14.00cm idi. Olguların %11.22'sinde (7) uterus agenezi, %11.3'ünde (7) uterus atrofi, %69.3'ünde (43) hipolazik uterus, %8.1'inde (5) normal uterus yapısı gözlemlendi. 62 primer amenoreli olguda yapılan konvansiyonel sitogenetik analiz sonucunda hastaların %17.7 (11)'sinde anormal karyotip tespit edildi. Tablo1'de karyotipler ve bu karyotiplere karşılık gelen sendromlar verilmiştir.

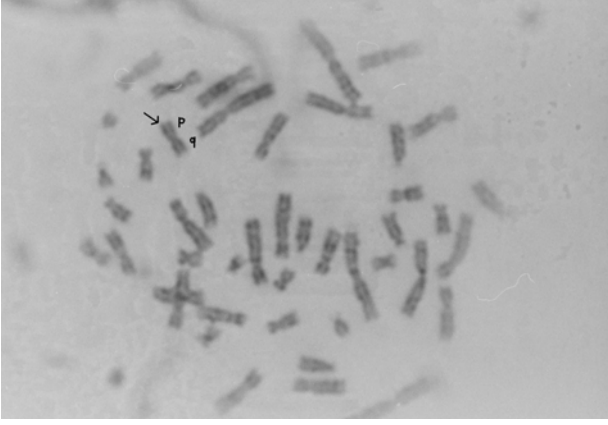
9 karyotipin 5'i TS'nin fenotipik özelliklerine sahip olup 3'ünde klasik olmayan Turner karyotipleri bulundu. 2 hastada 46,XY karyotipi tespit edildi ve bunlar androjen duyarsızlığı sendromunun klinik özelliklerine sahipti. Tablo 2'de primer amenorenin etyolojik nedenleri verilmiştir.

Tablo 1. Primer amonore'li hastalarda tespit edilen karyotipler ve karşılık gelen sendromlar.

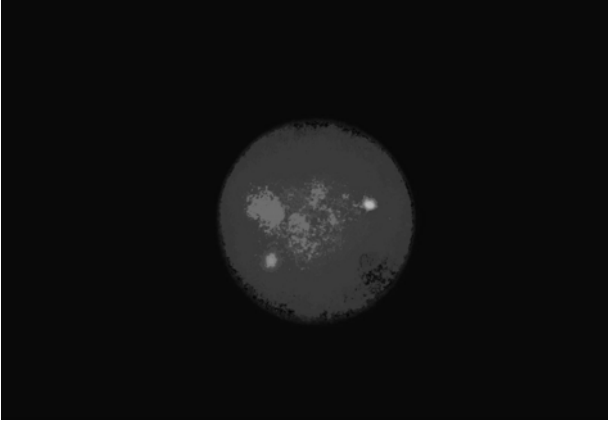
Olgu	Tanımlanan Sendrom	Karyotip
1,2,3	Turner Sendromu	45,X
4	Turner Sendromu	45,X(%43)/46,XX(%57)
5	Turner Sendromu	46,X,del(X)(q23)
6,7	Turner Sendromu	46,X,i(Xq)
8,9	Androjen Duyarsızlığı Sendromu	46,XY
10,11	Primer Amenore (-)	46,XX, inv(9)(p11;q13)

Tablo 2. Primer amenorenin etyolojisi.

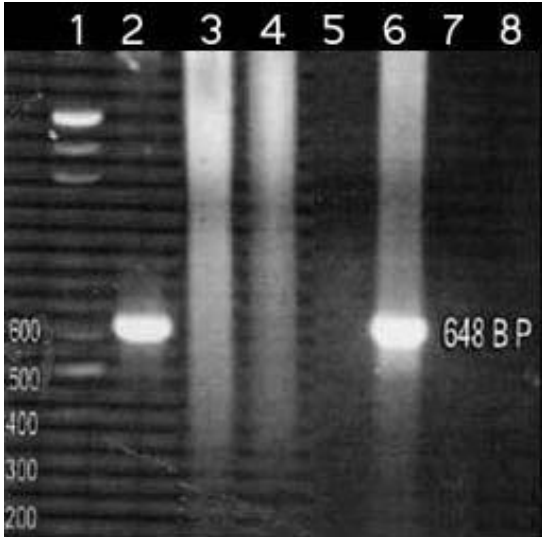
Nedenler	Olgu sayısı	Yüzdeler
Kromozomal aberasyonlar		%17.7
Turner ve Varyantları	7	%11.29
ADS sendromu	2	%3.22
Diğer kromozomal anomaliler	2	%3.22
Anatomik defektler	46	%74.2
Normal Mullerian Yapı	5	%8.1



Şekil 1. 46, X,del(X)(q23) karyotipine sahip olgunun metafaz plağı.



Şekil 2. SRY lokus spesifik kırmızı işaretli ve sentromerik X yeşil işaretli prob kullanılarak yapılan interfaz FISH sonucu elde edilen sinyallere sahip interfaz hücresi.



Şekil 3. SRY genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR sonrası elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü. Sütun 1: 100bp'lik DNA boyut markırı. Sütun 2: 46,XY karyotipine sahip normal bir erkeğe ait 648bp'lik bant. Sütun 3,4,5,7: SRY negatif olgular. Sütun 6: ADS'li olguya ait SRY bandı. Sütun 8: Negatif kontrol.

Del(X)(q23)'ü gösteren metafaz plağı Şekil 1'de gösterilmiştir. Yapılan interfaz FISH çalışması sonucunda sadece 2 ADS'li olguda SRY pozitifliği tespit edilmiştir. Yapılan interfaz FISH görüntüsü Şekil 2'de gösterildi. Yapılan moleküler genetik analizlerle bu 2 ADS'li olguda 648bp'lik PZR ürünü gösterilmiştir. Olgulara ait agaroz jel görüntüsü Şekil 3'de verilmiştir. Anormal karyotip tespit edilen diğer olgularda SRY pozitifliğine rastlanmamıştır.

Tartışma

Çalışmada primer amenoreli vakaların %17.7'sinde anormal karyotip tespit edilmiştir. En sık rastlanılan kromozomal anomaliler X kromozomuyla ilgili olup Turner sendromu ve varyantlarıdır. İkinci sırada ADS ve inv(9) yer almaktadır.

Temocin ve arkadaşları 68 primer amenoreli hastanın %26.4 (18)'inde, Ganguly ve Sahni primer amenoreli 280 hastanın %29'unda, Chryssikopoulos ve Grigoriou 77 primer amenoreli hastanın %38'inde ve Mondal ve arkadaşları 72 primer amenoreli vakanın %33.33'ünde sitogenetik olarak anormal bir karyotip tespit etmişlerdir. Anormal karyotipler içerisinde en sık TS karyotipi ve varyantlarının görüldüğünü ikinci sırada ise ADS'nin yer aldığını belirtmişlerdir (4, 8-10). Bu çalışmada olguların %17.7'sinde anormal karyotip tespit edilmiş olup anormal karyotipe sahip olguların %63.6'sında TS ve varyantlarında görülen kromozomal anomaliler ve %18'inde ise 46,XY karyotipi saptanmıştır.

TS'lu bireylerde moleküler düzeyde Y kromozom materyalinin varlığı tespit edilmiş olup bu materyalin varlığı değişik çalışmalarda %12, %28 ve %36 gibi farklı oranlarda bulunmuştur (17, 18). TS veya Ullrich Turner Sendromu (UTS) hastalarında bir Y kromozom materyalinin varlığında gonadoblastom veya disgerminom gelişme riski %10-%20 iken ADS'li olgularda bu oran yaklaşık %30'dur (19). Primer amenoreli hastalarda yapılan moleküler genetik analizler sonucunda SRY pozitifliği ADS'li 2 olguda tespit edilmiştir. SRY pozitifliğinin özellikle Turner sendromlu bireylerde rutin olarak araştırılması önerilmektedir. ADS'li 2 olguda inguinal testis dokusu tespit edilmiş olup her iki olguda tam ADS sendromunun özelliklerini göstermektedir. Bu hastalara sitogenetik ve klinik olarak tanı konduktan sonra özellikle gonadların malignant potansiyelinden dolayı prepubertel gonadoktomi yapılmalıdır. Her iki olguda da genetik danışmanlık verilerek hastalar gonadoktomi işlemi için cerrahi kliniklerine yönlendirilmiştir.

Marozzi ve arkadaşları Xq23 delesyonuna sahip prematür ovarian yetmezliği olan ve Turner stigmatları olmayan bir olgu ve Mesa-Cornejo ve arkadaşları ise 45,X(6)/46,X,del(X)(q23)(24) karyotipine sahip TS'li bir olgu tanımlamışlardır (20, 21). Ayrıca Xq23 bölgesindeki delesyonlara sahip mozaik olmayan olgularda Turner stigmatlarının gözlenmediğini belirten çalışmalar mevcuttur (22). Aynı karyotipe sahip olgumuzda ise kısa boy, boyun olmasına rağmen obezite ve menarş gözlenmemiştir. Olgumuzda hipertiroidi ve iştih kaybı gibi Turner sendromunun tipik özellikleri de tespit

edilmiştir. Hipertiroidi Turner sendromlu olguların ancak %3'ünde görülmektedir (23). Hipertiroidinin olgu 5'te görülmesi karyotip-fenotip korelasyonları açısından oldukça önemlidir. Literatürde mozaik olmayan Xq23 delesyonuna sahip ve bahsedilen Turner sendromu özelliklerini taşıyan olguya rastlanmamıştır. Olguyu diğer Xq23 delesyonuna sahip vakalardan farklı kılan özelliklerinin nedenlerini açıklamak oldukça güçtür. Çünkü normal olarak anormal X kromozomu tercihen inaktive edilmeli ve böylece genetik denge korunmalıdır. Ancak Xq delesyonuna sahip bireylerde X inaktivasyonunun random olduğunu veya bunun tersi şekilde Xq- açısından seçimli bir inaktivasyonun gerçekleştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (24, 25, 26). Fenotipin değişken olmasının en önemli nedenlerinden biri Xp veya Xq'nun proksimalindeki gelişim genlerinin, bazı X-otozomal kromozom translokasyonlarında görülen X inaktivasyonunun değişken yayılmasına benzer şekilde inaktive olmasıdır (27).

X kromozomuyla ilgili anomalilerin yanı sıra 2 olguda 9 nolu kromozomda inversiyon gözlenmiştir. Daha önce Ganguly ve Sahni adlı araştırmacılar primer amenoreli olgularda bu anomaliye rastlamışlardır (8). Badovinac ve arkadaşları reproduktif başarısızlığı olan bireylerde (158 erkek ve 106 dişi) yaptıkları çalışmada aynı anomaliyi 4

Kaynaklar

1. Timmreck LS, Reindollar RH. Contemporary issues in primary amenorrhea. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003; 30: 287-302.
2. Pletcher JR, Slap GB. Menstrual disorders. Amenorrhea. *Pediatr Clin North Am* 1999; 46: 505-518.
3. Kiningham RB, Apgar BS, Schwenk TL. Evaluation of amenorrhea. *Am Fam Physician* 1996; 53:1185-1194.
4. Temocin K, Vardar MA, Suleymanova D, et al. Results of cytogenetic investigation in adolescent patients with primary or secondary amenorrhea. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 1997; 10: 86-88.
5. Roy AK, Banerjee D. Cytogenetic study of primary amenorrhoea. *J Indian Med Assoc* 1995; 93: 291-292.
6. Joseph A, Thomas IM. Cytogenetic investigations in 150 cases with complaints of sterility or primary amenorrhea. *Hum Genet* 1982; 61:105-109.
7. Opitz O, Zoll B, Hansmann I, Hinney B. Cytogenetic investigation of 103 patients with primary or secondary amenorrhea. *Hum Genet* 1983;65:46-47.
8. Ganguly BB, Sahni S. X chromosomal abnormalities in Indian adolescent girls. *Teratog Carcinog Mutagen* 2003;1:245-253.
9. Chryssikopoulos A, Grigoriou O. The etiology in 77 primary amenorrhea patients. *Int J Fertil* 1987; 32: 245-249.
10. Mondal SK, Guha D, Banerjee D, Sinha SK. Study of primary amenorrhoea with special reference to cytogenetic evaluation. *Indian J Pathol Microbiol* 2002; 45: 155-159.
11. Ogata T, Matsuo N, Fukushima Y, et al. FISH Analysis for apparently simple terminal deletions of the X chromosome:

bireyde tespit etmişlerdir. Bu anomali normal varyant olarak kabul edilmekle beraber primer amenoreye katkısı henüz bilinmemektedir (28).

Kromozomal anomaliler müllerian kanal anomalilerinden sonra primer amenorenin en sık nedenlerindedir. Sitogenetik çalışmalar jinekolojik ve endokrinolojik çalışmalar için temel oluşturmaktadır. Bu nedenle hastaların klinik tanısı sitogenetik ve klinik çalışmalara göre yapılmalıdır. Tanıyı takiben genetik danışmanlık sürecinde hastalara olabildiğince hastalıklarının kabullenmeleri doğrultusunda bilgiler aktarılmalıdır. Turner Sendromun'da erken tanı ve tedaviler bu olguların hayat standartlarını artırmakta ve yetişkinlikte yaşayacakları kısa boy gibi bazı problemlerin önüne geçebilmektedir. Bu nedenle Turner Sendrom tanısının çocukluk ya da adolesan dönemde konması için hastalığın kısa boy ve gelişim geriliği gibi özelliklerinin göz önünde bulundurulması kromozom analizine yönlendirilmelerinin hastalığa erken dönemde tanı konmasına yardımcı olacaktır.

Teşekkür

Çalışmayı destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri kurumuna teşekkür ederiz.

- identification of hidden structural abnormalities. *Am J Med Genet* 2001; 311: 104-307.
12. Kotzot D, Dufke A, Tzschach A, et al. Molecular breakpoint analysis and relevance of variable mosaicism in a woman with short stature, primary amenorrhea, unilateral gonadoblastoma, and a 46,X,del(Y)(q11)/45,X karyotype. *Am J Med Genet*. 2002 ;15:51-55.
13. Gravholt CH, Juul S, Naeraa RW, Hansen J. Prenatal and postnatal prevalence of Turner's syndrome: a registry study. *BMJ* 1996; 312:16-21.
14. Gottlieb B, Pinsky L, Beitel LK, Trifiro M. Androgen insensitivity. *Am J Med Genet* 1999; 89: 210-217.
15. Rooney DE, Czepulkowski BH. *Human Cytogenetics*. 2. Edition. New York: Oxford University Press: 1992.
16. Gicquel C, Gaston V, Cabrol S, Le Bouc Y. Assessment of Turner's Syndrome by Molecular Analysis of the X Chromosome in Growth-Retarded Girls. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 1472-1476.
17. Lopez M, Canto P, Aguinaga M, et al. Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 1998; 76: 120-124.
18. Canto P, Chesnaye E, Lopez M, et al. 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* 2000; 85: 1908-1911.
19. Verp MS, Simpson JL. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 25: 191-218.
20. Marozzi A, Manfredini E, Tibiletti GM, et al. Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected

- by premature ovarian failure. *Hum Genet* 2000; 107: 304–311.
21. Mesa-Cornejo VM, Garcia-Cruz D, Monroy-Jaramillo N, et al. Del Xq23 in a Mosaic Turner Female: Molecular and Cytogenetic Studies. *Ann Genet* 2001; 44:171–174.
 22. Maraschio P, Tupler R, Barbierato L, et al. An analysis of Xq deletions. *Hum Genet* 1996; 97: 375–381.
 23. Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS, Wass JAH. Turner's syndrome in Adulthood *Endocr Rev* 2002; 23:120–140.
 24. Rosenberg T, Niebuhr E, Yang HM, Parving A, Schwartz M. Choroideremia, congenital deafness and mental retardation in a family with an X chromosomal deletion. *Ophtalmic Pediatr Genet* 1987; 8: 139-143.
 25. Cremers FP, van de Pol TJ, Wiering B. Molecular analysis of male-viable deletions and duplications allows ordering of 52 DNA probes on proximal Xq. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 452-461.
 26. Wolff DJ, Gustashaw KM, Zurcher V. Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattern. *Hum Genet* 1997; 100: 256-261.
 27. Gererakens C, Just W, Vogel W. Deletions of Xq and growth deficit: a review. *Am J Med Genet* 1994; 2: 105-113.
 28. Badovinac AR, Buretic-Tomljanovic A, Starcevic N, et al. Chromosome Studies In Patients With Defective Reproductive Success. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44: 279-283.