

VARDAN ALNANEA	DICLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DIYARBAKIR-2022
-----------------------	---	---------------------	------------------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYARBAKIR BÖLGESİNDEKİ KADINLARDA HLA-E VE
HLA-G GEN POLİMORFİZMİ İLE AÇIKLANAMAYAN
TEKRARLAYAN SPONTAN DÜŞÜK (RSA) ARASINDAKİ
İLİŞKİ**

Vardan ALNANEA

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mahmut BALKAN

DİYARBAKIR – 2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYARBAKIR BÖLGESİNDEKİ KADINLARDA HLA-E VE
HLA-G GEN POLİMORFİZMİ İLE AÇIKLANAMAYAN
TEKRARLAYAN SPONTAN DÜŞÜK (RSA) ARASINDAKİ
İLİŞKİ**

Vardan ALNANE

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mahmut BALKAN

DİYARBAKIR – 2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Vardan ALNAEAN' in hazırladığı **“Diyarbakır Bölgesindeki Kadınlarda HLA-E ve HLA-G gen Polimorfizmi ile Açıklanamayan Tekrarlayan Spontan Düşük (RSA) Arasındaki İlişki”** başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 22 /06/2022

Danışmanı: Prof. Dr. Mahmut BALKAN

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı		_____
Üye		_____
Üye		_____
Üye		_____
Üye		_____

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun /.../2022 tarih ve..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi , bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

29.06.2022

Vardan ALNANEA

İmza

TEŞEKKÜR

Çalışma sürecinde her türlü yol gösterici olan, bilgi birikimiyle çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan beraber çalışmaktan ve her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Mahmut BALKAN' a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan verdikleri dersler ile aynı zamanda eğitimime katkı sunan, üzerimde büyük emekleri olan birbirinden değerli Dr. Öğr. Üyesi Diclehan ORAL ve Doç.Dr. Selahattin TEKEŞ hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Doktora aşaması boyunca iyiliklerini hiçbir zaman unutmayacağım, yanımda olup bana manevi ve bilimsel destek sağlayan değerli iki dostum Dr. Mahir BİNİCİ ve Dr. İlyas YÜCEL' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bana yardım eden değerli arkadaşlarım Fulya, Gülbahar, Garib ve Mert' e teşekkür ederim.

Çalışmalarımda her türlü katkıyı esirgemeyen çok değerli anabilim dalı çalışanlarımız Fatma AYATA, Gül KILIÇ, Asiye BAYRAK, Ferda TEKİN, Emel ESEN, Berivan ATEŞ, Serap BİNİCİ, Hasan GÖYA ve Muhammet AKDEMİR' e teşekkür ederim.

Benim için gece gündüz dua etmeyi bırakmayan sevgili babama ve anneme, beni destekleyen, yanımda duran ve beni cesaretlendiren sevgili eşim Huda KASSEM' e, umudum, ilham kaynağım, çocuklarım Hasan ve Humam' a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.20.005 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER	III
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER.....	IX
1. ÖZETLER.....	1
1.1. Türkçe Özet	1
1.2. Abstract	2
2. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
3. GENEL BİLGİLER	5
3.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları	5
3.2. Tekrarlayan Düşük Nedenleri.....	5
3.2.1. Uterus anomalileri	5
3.2.2. Kalıtsal trombofili	5
3.2.3. Endokrinolojik nedenler	5
3.2.4. Bağışıklık faktörleri	5
3.2.5. Genetik faktörler	6
3.2.6. Çevresel ve diğer faktörler	6
3.3. Bağışıklık Sistemi.....	6
3.3.1. Doğal bağışıklık	7
3.3.2. Adaptif bağışıklık.....	7
3.4. Gebelikte Bağışıklık	9
3.5. Fetal Maternal Arabirim	10
3.6. Fetal-Maternal Arabirimin İmmünolojik Özellikleri	11

3.7.	Gebelikte Başışıklık Toleransı.....	12
3.8.	HLA Gen Kompleksi.....	12
3.8.1.	Trofoblast hücrelerde HLA gen ifadesi.....	15
3.8.2.	Klasik olmayan HLA sınıf IB genleri	16
3.8.3.	HLA-G gen.....	18
3.8.4.	HLA-G gen fonksiyonu.....	19
3.8.5.	HLA-E.....	20
.4	GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
4.1.	Materyal.....	22
4.1.1.	Karyotip için kimyasal maddeler	22
4.1.2.	Kültürün ortamı	23
4.1.3.	DNA ekstraksiyonu için ekipman ve malzemeler.....	23
4.1.4.	Kullanılan kimyasal maddeler ve deney ekipmanları	24
4.1.5.	PCR bileşenini aşağıdaki gibi karıştırarak ana karışım.....	25
4.1.6.	HLA-G geni amplifikasyonu için.....	25
4.1.7.	HLA-E genotiplendirme.....	25
4.1.8.	RFLP enzimleri	25
4.1.9.	Cihazlar ve diğer malzemeler.....	25
4.2.	Metod.....	26
4.2.1.	Çalışma adımları	26
4.2.2.	Pedigri metodu	27
4.2.3.	Periferik kültürü yöntemi	27
4.2.4.	Preperatların boyanıp değerlendirilmesi	28
4.2.5.	Karyotiplerin belirlenmesi	29
4.2.6.	Alınan kanlardan DNA eldesi	29
4.2.7.	PCR aşağıdaki prosedür kullanılarak yapıldı	31

4.2.8.	HLA-G ve HLA-E gen polimorfizmin amplifikasyonu için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	32
4.2.9.	HLA-G ve HLA-E PCR amplifikasyonu	33
4.2.10.	Enzimatik kesim.....	34
4.2.11.	RFLP analizi	35
4.2.12.	İstatistiksel analiz	38
5.	BULGULAR.....	39
5.1.	Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-G0104 Allel Sıklığı	40
5.2.	Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-G0105N Allel Sıklığı	41
5.3.	Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-G0103 Allel Sıklığı	42
5.4.	Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-E0101 Allel Sıklığı.....	42
5.5.	Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-g Genotipi Sıklığı	44
5.6.	Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-E Genotipi Sıklığı.....	45
6.	TARTIŞMA	47
7.	SONUÇ	50
8.	KAYNAKLAR	52
9.	ÖZGEÇMİŞ	62
10.	EKLER.....	63
10.1.	Orijinallik Raporu	63
10.2.	Etik Kurul Onay Raporu	64
10.3.	Bilgilendirilmiş Gönüllü Onay Formu.....	65

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

A: Adenin

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

APAS: Antifosfolipid Sendromu

APC: Antigen-Presenting Cells (Antijen Sunucu Hücreler)

ASRM: Amerikan Tıbbi Üreme Derneği

Bç: Baz Çifti

C: Sitozin

CD: Farklılaşma antijenleri

CRP: akut faz proteinleri

CTL: Cytotoxic

Datp: Deoksiadenintrifosfat

dCTP: Deoksisitozintrifosfat

dd: H₂O Didistile su

ddNTP: Dideoksinükleozidtrifosfat

dGTP: Deoksiganintrifosfat

DNA: Deoksiribonükleik Asit

dTTP: Deoksitimintrifosfat

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EDTA: TGF-β1 Transforming Growth Factor-β1

ESHRE: Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği

G: Guanin

HbA1c: Glikozile hemoglobin A1c düzeyleri

HLA-E: Human Leukocyte Antigen-E (İnsan Lökosit Antijeni-E)

HLA-G: Human Leukocyte Antigen-G (İnsan Lökosit Antijeni-G)

HPA: Human Platelet Antigen (İnsan Trombosit Antijeni)

IFN- γ : İnterferon- γ

IL: İnterlöklin

IL: İmmünglobulin-Benzeri Transkript vii

ISCN: Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemi

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

K⁺: Potasyum iyonu

KIR2DS: Doğal Öldürücü Hücre İmmünglobulin-Benzeri Reseptör Genleri

LPD: Luteal faz defekti

Mg⁺⁺: Magnezyum iyonu

MHC: Major Histocompatibility Complex (Doku Uygunluk Kompleksi)

ML: Mililitre

MRNA: Messenger Ribonucleic acid (Haberci Ribonükleik asit)

NK: Hücreleri Natural Killer Hücreleri (Doğal Öldürücü Hücreler)

PCR: Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR-ARMS: Amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi

PCR-RFLP: RFLP Parça Uzunluğu Polimorfizmi

PCR-SSCP: Tek iplikli konformasyonel polimorfizm

PCR-SSOP: Polimeraz zincir reaksiyonu-diziye özgü oligonükleotit probu

PGD: prenatal genetik tanı

POC: Gebelik metaryalinde

RCOG: Kadın Doğum ve Jinekoloji Kraliyet Koleji

TGK: Tekrarlayan gebelik kayıpları

S: Siozin

T: Timin

TBE: Tris Borik asit



ŞEKİLLER

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Farklı trokoblast popülasyonlarını gösteren bir plasental kesit..	10
Resim 2. HLA gen kompleksi.	13
Resim 3. HLA Sınıf I ve Sınıf II MHC molekülleri.	15
Resim 4. Klasik olmayan insan lökosit antijeni (HLA) sınıf IB genler.	17
Resim 5. HLA-G mRNA' nın alternatif bir yolu ile oluşturulan farklı HLA-G izoformları.	19
Resim 6. 46,XX'li normal nadın karyotip.	29
Resim 8. HLA-G EKZON 2 281bp PCR ürünleri.	34
Resim 9. HLA-G EKZON 3 281bp PCR ürünleri.	34
Resim 10. HLA-E 280bp PCR ürünleri.	34
Resim 11. HLA-G*0103 gen polimorfizmine ait bant bölgeleri.	37
Resim 12. HLA-G*0105 gen polimorfizmine ait bant bölgeleri.	37
Resim 13. HLA-G*0104 gen polimorfizmine ait bant bölgeleri.	37
Resim 14. HLA-E*0101 \0103 gen polimorfizmine ait bant bölgeleri.	38

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Pedigri sembolü	27
Şekil 2. Hasta düşük sayılarının yüzdelik dağılımı.	40
Şekil 3. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0104 allel sıklığı.	41
Şekil 4. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0105N allel sıklığı.	42
Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E0101 allel sıklığı.	43
Şekil 6. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E0103 allel sıklığı.	44
Şekil 7. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-g Genotipi sıklığı.	45
Şekil 8. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E Genotipi sıklığı.	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Sınıf 1 MHC genlerinin polimorfizmi.	13
Tablo 2. Sınıf 2 MHC genlerinin polimorfizmi.	14
Tablo 3. HLA-G gen polimorfizmlerinin amplifikasyonu için polimeraz zincir reaksiyon bileşenleri.....	32
Tablo 4. HLA-G gen polimorfizminin Exon2' nin PCR amplifikasyonu için termosikler programı.	32
Tablo 5. HLA-G ve HLA-E gen polimorfizminin Exon3 PCR amplifikasyonları için termosikler.....	33
Tablo 6. HLA-G geni ve HLA-E polimorfizmleri.	35
Tablo 7. Enzymatic kesim bileşenleri.	35
Tablo 8. HLA-G geni ve HLA-E polimorfizmleri.	36
Tablo 9. Kontrol ve hasta gruplarının yaşa göre dağılımı.....	39
Tablo 10. Hasta gruplarının düşük sayısına göre dağılımı.....	39
Tablo 11. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0104 allel sıklığı.	40
Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0105N allel sıklığı.	41
Tablo 13. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0103 allel sıklığı.	42
Tablo 14. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E0101 allel sıklığı.....	43
Tablo 15. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E0103 allel sıklığı.....	44
Tablo 16. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-g Genotipi sıklığı.	45
Tablo 17. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E Genotipi sıklığı.....	46
Tablo 18. Literatürde TKG ve HLA çalışmaların sonuçları.	48

1. ÖZETLER

1.1. Türkçe Özet

Diyarbakır Bölgesindeki Kadınlarda HLA-E ve HLA-G gen Polimorfizmi ile

Açıklanamayan Tekrarlayan Spontan Düşük (RSA) Arasındaki İlişki

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Vardan ALNANEA

Danışmanı: Prof. Dr. Mahmut BALKAN

Ana Bilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Amaç: Diyarbakır’ da Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) yaşayan hastalarda; HLA-G (HLA-G*0105N, HLA-G*0103, HLA-G*0104) ve HLA-E (HLA-E*0101, HLA-E*0103) allellerinin artan genetik riskleri açısından araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastahaneleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Tanı Laboratuvarına tekrarlayan gebelik kayıpları tanısı ile gelen ve 46,XX kromozom kuruluşuna sahip hastalar değerlendirilmiştir. 100 bireyden oluşan hasta ve 100 sağlıklı bireyden oluşan kontrol gruplarından izole edilen DNA, PCR-RFLP teknikleri uygulanarak. HLA-E ve HLA-G gen polimorfizm analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda hasta ve kontrol arasında HLA G*0105N, HLA-G*0103, HLA-E*0103 gen polimorfizm açısından istatistiksel bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Hasta ve kontrol grupları arasında HLA-G*0104 ve HLA-E*0101 polimorfizmleri bakımından yapılan analizler sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$).

Sonuç: Çalışmamızda elde edilen bilgilerin ışığında HLA-G*0104 ve HLA-E*0101 gen polimorfizmleri ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında anlamlı bir korelasyon olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızın mevcut literatür bilgilerine göre ülkemizde HLA-G ve HLA-A ile TGK arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Düşük, Tekrarlayan Gebelik Kaybı, HLA-E, HLA-G, RFLP.

1.2. Abstract

Association between HLA-E and HLA-G gene polymorphism in unexplained recurrent spontaneous abortion (RSA) women in Diyarbakir region

Student' s Surname and Name: ALNANEAA, Vardan

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Mahmut BALKAN

Department: Medical Biology

Aim: This study aimed to investigate the increased genetic risks of the HLA-G (HLA-G*0105N, HLA-G*0103, HLA-G*0104) and HLA-E (HLA-E*0101, HLA-E*0103) alleles in patients with recurrent spontaneous abortion (RSA) in Diyarbakir region.

Material and Method: In this study, patients women who came to Dicle University, Faculty of Medicine Hospital, Medical Biology Department, Genetic Diagnosis Laboratory with a diagnosis of recurrent spontaneous abortion (RSA) and had 46,XX karyotype were evaluated. PCR-RFLP techniques were used for DNA isolated from patients and control groups. HLA-E and HLA-G gene polymorphism analyses were performed.

Results: In our study, there was no statistical difference between the patient and the control groups in terms of HLA G*0105N, HLA-G*0103, HLA-E*0103 gene polymorphism ($p>0,05$). There was a statistically significant difference between the patient and control groups in terms of HLA-G*0104 and HLA-E*0101 polymorphism ($p<0,05$).

Conclusion: Through the results obtained in our study, it is considered that there is a significant relationship between HLA-G*0104 ve HLA-E*0101 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. This study is the first to investigate the relationship between HLA-G and HLA-A and RSA in our country according to current literature information.

Key Words: Abortion, Habitual, HLA-E, HLA-G, RFLP.

2. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, bir yıl boyunca korunmaksızın cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin gerçekleşmemesi olarak tanımlanmaktadır. Hem erkeklerde hem de kadınlarda görülmekte ve üreme çağındaki çiftlerin %10-15'ini etkilemektedir. İnfertilite sorunu birçok faktöre bağlıdır. Yaş, obezite, yapısal sorunlar, uterus fibroidleri, otoimmün bozukluklar, hormonlar ve enfeksiyon kadınlarda infertilitenin en önemli nedenleridir (1).

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), genellikle gebeliğin 20. haftasından önce fetüsün kaybı şeklinde üreme çağındaki kadınların yaklaşık %1-2' sinde ortaya çıkar (1). Tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisinde güncel olarak %15-20 antifosfolipid sendrom, %10-15 anatomik anomaliler, %5-15 hormonal ya da metabolik problemler, %2-4 sitogenetik bozukluklar, %1-2 alloimmün faktörler yer almaktadır (2). Bununla birlikte, vakaların en az yarısında etyoloji aydınlatılamamaktadır (3,4). İdiopatik infertilite olarak da adlandırılan bu kaynağı bilinmeyen TGK' de vakalar klinik olarak normal olduğundan ve patofizyolojisi bilinmediğinden büyük endişe uyandırmaktadır (2) .

İmmünolojik bir bakış açısından, fetüs yabancı bir grefti temsil eder. Bu nedenle, semiallojenik fetüsün maternal bağışıklık hücreler tarafından kabul edilmesini garanti etmek için immünoregülasyon esastır.

Üreme biyolojisinde; maternal bağışıklık sistemin gelişen fetüsü reddetmeme mekanizması gizemini koruyan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. HLA-G ve HLA-E, maternal-fetal toleransta rol oynayan HLA sınıf I antijenleridir. Yapılan çalışmalar HLA-G ve HLA-E antijenlerinin; insan preimplantasyon embriyosunda eksprese olduğu, bağışıklık düzenleyici rolü ile tolerojenik fonksiyonunun olduğu ve implantasyonun kontrolünde rol oynadığını ortaya koymuştur (2).

TGK vakalarında yapılan bir dizi çalışmada HLA-G allellerinin farklı sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir (5). Örneğin; Kuzey Hindistan popülasyonundaki yapılan bir çalışmada G*0103 allelinin TGK vakalarında daha yüksek sıklıkta görüldüğü gözlemlenmiştir (6,7). Bununla birlikte; Yan ve arkadaşlarının Çin' de Yamashita ve arkadaşlarının Japonya' da yaptıkları başka çalışmalarda HLA G ile TGK arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadığı gözlenmiştir (8).

Bu alışmada Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastahaneleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Tanı Laboratuvarına başvuran, aynı partnerle 20 haftadan önce en az 2 ardışık spontan gebelik kaybı olan 46, XX karyotipli idiyopatik hastalarda HLA-E ve HLA-G gen polimorfizmleri ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Nedenini açıklayamadığımız TGG' li 100 kişilik hasta grubu ile en az bir sağlıklı doğum yapmış ve hiç gebelik kaybı olmayan 100 kişilik kontrol grubundan alınan maternal kanlardan elde edilen DNA'ya HLA-E ve HLA-G gen polimorfizmlerine ait kitler kullanılarak PCR-RFLP tekniği uygulandı. Daha sonra elde edilen bu gen polimorfizmlerinin genotip ve allel frekansları belirlenip ortaya çıkan sonuçlar karşılaştırıldı.

Literatürde HLA-E ve HLA-G genlerinin riskli alellerini taşıyan kadınların erken gebelikte düşük yapmaya daha yatkın olduğu sonucuna varılan çalışmalara dayanarak; bu çalışmada açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybında HLA-E ve HLA-G allellerinin rolünü araştırmayı ve bu alanda markır olabilecek polimorfizmleri bulmayı amaçladık.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları

Amerikan Tıbbi Üreme Derneği (ASRM) yakın zamanda tekrarlayan gebelik kayıplarını iki veya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlamıştır (9,10).

3.2. Tekrarlayan Düşük Nedenleri

3.2.1. Uterus anomalileri

Uterus anomalilerini; fibroidler, endometriyal polipler veya intrauterin yapışıklıkları içerebilmektedir. Gebelik kaybına yol açan en yaygın uterus anomalisi ise Uterin Septum' dur (10).

3.2.2. Kalıtsal trombofili

Erken gebelik kaybı ile kan pıhtılaşması kaskadındaki kalıtsal anormallikler arasında bir ilişki olduğu varsayılmıştır, ancak henüz açıkça tanımlanmış bir ilişki yoktur (11,12).

3.2.3. Endokrinolojik nedenler

Hipotiroidizmi olan kadınlar gebelik düşükleri için artmış risk altındadır. Kadınlarda tanımlanmayan veya yetersiz tedavi edilen diabetes mellitus da düşüklerin artmasına neden olmaktadır. Polikistik over sendromlu kadınlarda hiperinsülinemi veya aşırı androjenler salınımından kaynaklı düşük oranlarının daha yüksek olduğu gözlenmektedir (10).

3.2.4. Bağışıklık faktörleri

Gebelik kaybına neden olan bağışıklık faktörlerinin ortak bir özelliği, fetüse karşı azalan maternal bağışıklık toleransı gibi görünmektedir (13).

Tekrarlayan gebelik kayıplarının oluşumunda önerilen otoimmün mekanizmalar; Ebeveynler arasında HLA uyumluluğu, maternal bloker antikorların yokluğu ve maternal lökositotoksik antikorların yokluğu şeklindedir (7,14–16). Bununla birlikte, önerilen mekanizmaların hiçbiri kesin olarak kanıtlanamamıştır. HLA tiplmesi veya lökosit popülasyonunun belirlenmesi gibi immünolojik testler,

bazı klinisyenler tarafından babanın bağışıklığına karşı annenin bağışıklık tepkisi için önerilir. Bu görüş, semiallojenik bir greft olarak gebe kalma ürününün maternal immünolojik reddinin TKG' nın nedeni olduğu hipotezine dayanmaktadır. Ancak, çoğu çalışma bu testleri desteklememektedir (17–19).

3.2.5. Genetik faktörler

Birçok erken gebelik kaybı, embriyo veya fetüsteki genetik anomalilerden kaynaklanmaktadır. Bu genetik anomalilere bağlı düşük riski 35 yaşından küçük kadınlarda %10-15'iken 40 yaşından büyük kadınlarda %50' den fazladır. Anöploidi, tekrarlayan gebelik kayıplarının nedenlerinden biri olabilmektedir. Konseptus veya fetüste anöploidi, tüm gebeliklerin %5-10' unda görülür ve insanlarda yaygın bir üreme sorunudur (20). Anomaliler özellikle her iki partnerde görülen translokasyon anomalileri tekrarlayan düşüklerin en önemli nedenlerinden biridir (21–23).

3.2.6. Çevresel ve diğer faktörler

Anne yaşı ile gebelik kaybı artar. 35 yaşın üzerindeki kadınların normal gebelik şansı genç kadınlara göre önemli ölçüde azalır (12,24). 40 yaş üstü kadınlarda düşük yapma riski %50' ye kadar yaklaşmaktadır (20). Kadınlar bu riskler konusunda eğitilmelidir. İskandinav ülkelerinde yapılan çalışmalarda kadınların işe başlamasının düşük riskini artırmadığı gösterilmiştir. Ancak hastaların çalıştıkları yerde gebeliği riske atabilecek kimyasallarla karşılaşmamasını sağlamak gerekir (16). Sigara ve alkol kullanımı düşük riskini artırır. Pasif sigara dumanının etkisine gelince, net bir bilgi yoktur. Psikolojik faktörlerin incelenmesi zor olduğundan, tekrarlayan bir düşük nedeni olup olmadığı açık değildir (14,25).

3.3. Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık, organizmanın herhangi bir yabancı maddeye olan cevabını, özellikle mikroorganizmalara yanıtını tanımlamak için kullanılır. Bağışıklıktan sorumlu hücreler ve moleküler bağışıklık sistemini oluşturur (26,27).

Bağışıklık sistemi; Doğal bağışıklık ve Edinilmiş bağışıklık sistemi olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır (28)

3.3.1. Doğal bağışıklık

Bireyi potansiyel olarak tehlikeli ajanlardan korur ve bu ajanların çoğu organizmadadır, koruyucu mekanizmalar zaten doğal bağışıklık oluşturur. Doğuştan gelen bağışıklık elemanları mikroorganizmalara karşı birinci basamak savunma yapar ve bazı durumlarda mikroorganizmayı ortadan kaldırmak için yeterli olabilir (29). Cilt ve mukoza membranları tarafından oluşturulan fiziksel engeller (Epitel yüzeyler, Kan makrofajları, Doğal öldürücü hücreler, Kompliman sistemi) doğuştan gelen bağışıklığın ana unsurlarını oluşturur (39).

Doğal bağışıklık sadece farklı mikroorganizma sınıflarını ayırt edebilir, çeşitlilik sınırlıdır ve hafıza yoktur (40, 41).

Aktivitelerini çok hızlı gösterdikleri için, oluşturan reseptör şeklini taşıyan hücreler ise efektör fonksiyon göstermek için gerekli değildir (30). Doğal bağışıklık sistemi, adaptif bağışıklık sisteminin reseptör sayısı ve çeşitliliği ile karşılaştırıldığında sınırlı reseptörlerle mikroorganizmaların spesifik yapılarını tanır. Costimulatorler, antijen spesifik lenfositlerin uyarılmasını sağlar, aynı zamanda sitokin ve kemokinlerin yapımını indükleyerek uyarlamalı bağışıklık yanıtı çalıştırır (26).

Böylece doğuştan gelen bağışıklık sistemi bir şekilde kendi hücrelerini tanıyarak organizmaya zarar vermez, o zaman gelişecek adaptif bağışıklık tepkisinin türü de belirleyici olabilir (29).

3.3.2. Adaptif bağışıklık

Yabancı bir ajanla karşılaşıldığında sadece antijene özgü olan cevap geliştirmeyi ve antijenle bir kez daha karşılaştığında daha güçlü bir yanıtın oluşmasını sağlayan sistemdir. Çok çeşitli hücreler ve moleküller, adaptif bağışıklıkla birlikte çalışır (31).

Adaptif bağışıklığın ana unsurları; T lenfositleri, B lenfositleri, antikorlar ve bazı sitokinlerdir. Antijen sunan hücreler de bağışıklık sisteminde çok önemli bir role sahiptir (44).

Adaptif bağışıklık yanıtlar doğal bağışıklık yanıtı takip eder. Adaptif bağışıklık, doğal bağışıklığın koruyucu mekanizmalarını güçlendirir ve antijeni giriş

noktasına yönlendirerek yabancı antijenin ortadan kaldırılmasını daha kolay hale getirir (32).

Sekonder lenfoid dokular olarak adlandırılan lenf nodları, dalak ve mukoza ile ilişkili lenfoid dokularda adaptif bağışık yanıtlar geliştirir. Bu tür tepkiler, onu oluşturan bağışıklık sisteminin unsurlarına göre, iki grupta incelenir: hümorale ve hücresele bağışıklık farklı mikroorganizmaların yok edilmesinde işlev görürler (31–33).

3.3.2.1. Hümorale bağışıklık

Bu bağışıklıkta antijeni mümkün olduğu kadar uzaklaştıran ve farklı mekanizmalarla ilişkili moleküller antikorlar ana rolü oynar. Antikorlar, belirli bir antijen ile karşılaşan lenfositlerden ayrılan plazma hücrelerinin yaptığı immünoglobülinlerdir.

Antikorlar; dolaşımdaki hücre dışı mikroorganizmalara ve toksinlerine bağlanır ve eliminasyonlarını yönlendirir. Buna karşılık antikorlar; bazı virüs, mantar ve göz içi yerleşimli bazı bakterilere ulaşamazlar. Bu durumda hücresele bağışıklık devre girer. Hücresele bağışıklık, aktif makrofajlar veya enfekte hücrenin lizisi ile mikroorganizmaların fagositozunda önemli bir rol oynar (27,30).

3.3.2.2. Hücresele Bağışıklık

Hücresele bağışıklıkta, özellikle antijeni tanımlayan T lenfositleri ana rolü oynar. T lenfositleri antijeni, ancak antijen sunum hücresi (Ash) veya hedef hücre üzerindeki MHC molekülleri ile sunar (34). CD4 molekülünü yüzeylerinde taşıyan yardımcı T lenfositleri (Th), Sınıf II MHC tarafından sunulan antijenleri tanıyabilir, bu nedenle bu olaya Sınıf II MHC 'ye bağımlı veya Sınıf II MHC 'ye sınırlı sunum denir. Yüzeylerinde CD8 molekülleri taşıyan sitotoksik T lenfositleri (Tc veya CTL) MHC Sınıf I'e bağımlıdır. Sitotoksik T lenfositleri (TC veya CTL) Yüzeylerde CD8 molekülünü taşıyan MHC sınıfına bağlıdır (35).Th hücrelerinin 4 tip vardır: TH1, TH2, TH17, TREG hücreleri. TH1 ve TH2 farklı sitokinler salgılayarak birbirlerinin etkilerini kontrol eder.

Somatik hücrelerin neredeyse tamamında MHC I molekülleri bulunurken, Sınıf II MHC molekülleri antijen sunan sınırlı sayıda hücrede (dendritik hücreler, aktif makrofajlar ve B lenfositleri) bulunur. Deri altında ve mukozal yüzeyin altında bulunan dendritik hücreleri Langerhans hücreleri, karaciğerdekiler kupffer hücreleri,

merkezi sinir sistemindekiler mikrofaj hücreleri olarak adlandırılırlar. Kemikteki osteoblastların spesifik özelliklerine sahip doku makrofajlarıdır (29,30,35,36).

3.4. Gebelikte Bağışıklık

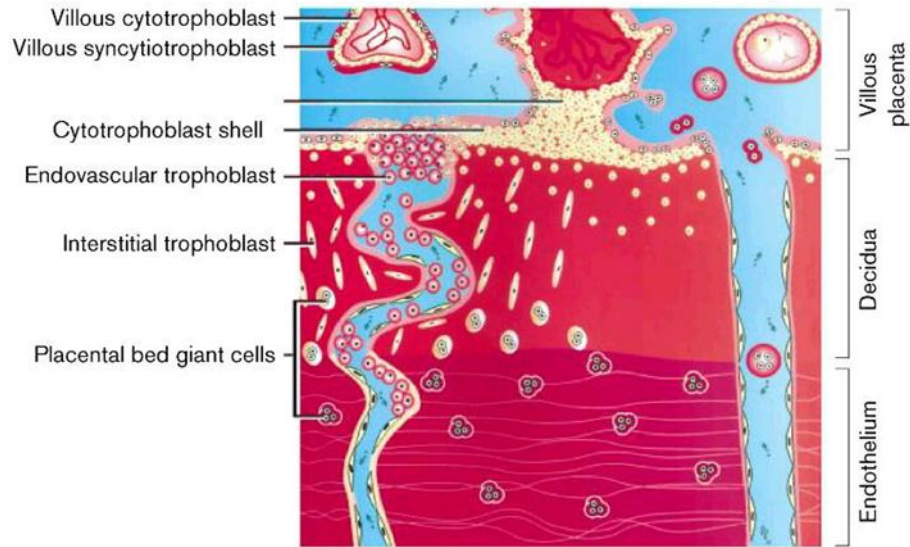
Gebelik boyunca bilinen T lenfositlere bağımlı mekanizmalar açısından bağışıklık sisteminde sorun görülmez ve gebelik boyunca bağışıklık sistemi aktif olarak kalır (49, 50). Ancak hamilelik sırasında annenin bağışıklık tepkileri bazı değişikliklere uğrar. IL-2' yi oluşturan Th1 sitokin profili gebelik sırasında baskılanır ve profil Th2 yönüne kayar. Th1 yanıtı fetal allogreftin reddedilmesine neden olur, bu nedenle Th2 hücrelerinin etkisi altında gebelik boyunca baskılanır. Hamile kadında, TH1 / TH2 sitokin oranı önemli ölçüde düşüktür ve bu doğumdan sonra bir süre devam eder. Desidual TH1 hücrelerinin azalması, Fas ligandının neden olduğu apoptozdan önce gelebilir. TH2 dominasyonu özellikle fetoplental ortamda belirgindir. Fetoplental ünitelerden alınan süpernatantlarda TH2 ürünü IL-3, IL-4, IL-5 ve IL-10 seviyelerinde artış tespit edilmiştir. TH1' in bir ürünü olan IFN- γ ise geçici olarak baskılanmıştır. Gebelikteki nötrofil aktivitesi de önemli ölçüde azalır. TH2 dominasyonuna uygun olarak, maternal bağışıklık tepkisi, hücresel bağışıklıktan uzaklaşır ve antikorun üretimine doğru kayar. Hamilelikte RA (romatoid artrit) geçici remisyona girer. Buna karşılık, SLE (sistemik lupus eritematozus), otoantikor yapımı ile şiddetlenebilir (51, 52-54).

Hamile kadınlarda maternal-fetal karşılıklı yüzeylerde Th2 sitokin üretiminin artması fetal yaşam için önemlidir ve muhtemelen immünolojik tolerans korumalı bir durumu ifade eder. NK aktivitesi gebelikte birlikte azalır. Farelerde, IFN- γ tarafından NK aktivitesinin indüklenmesi, fetal rezorpsiyona yol açar. Gebelik sırasında uteroplental TNF- α yapımı artmasına rağmen, sitokin, sensitiyotrofoblastlar, sensinotrofogramlar tarafından sentezlenen çözünür TNF- α reseptörleri tarafından nötralize edilir. CD4⁺ T hücrelerinin azaldığı ve B hücre bağışıklığının değişmediği bildirilmiştir. Hamilelik sırasında yukarıda özetlenen bu değişikliklerin hücre içi patojenlere (bazı virüsler, T.Gondii, M.Tuberculosis, L.monositogenes) bağlı olduğu düşünülebilir. Bununla birlikte, hamilelik sırasında anne ve fetus arasındaki karşılıklı immünolojik etkileşimler, yalnızca maternal lenfositlere fetal antijen sunumunun olmaması nedeniyle veya maternal lenfosit işlevleri amacıyla baskılanır. Hamile kadın enfeksiyona karşı önemli ölçüde duyarlı olmasa bile, edinilmiş (adaptif) bağışıklığın

aktif olarak bastırıldığı dönem olarak gebelik dikkate alınmalıdır. Ancak bu, annenin doğuştan gelen bağışıklığının aktivasyonu ile telafi edilir. Gebelikte granülositlerin, monositlerin/makrofajların sayı ve fonksiyonları artar. Buna karşılık, NK hücrelerinin sayısı, sitotoksik kapasiteleri ve IFN- γ sentez kapasiteleri azalır. Kompleman sisteminin bileşenleri ve akut faz proteinleri de hamilelik sırasında artmıştır (24, 26, 47, 55). Bu nedenle, hamilelik sırasında fetüsün selektif immünolojik değişikliklerinin güvenliğini, bağışıklık yetmezlik gibi değerlendirmek doğru değildir. Hamilelik sırasında doğal bağışıklığın aktivasyonu anneye (artmış enfeksiyonlar, preeklampsi) ve fetüse (düşük risk) zararlı olabilir. Gebe enfeksiyonlarında, doğum eyleminin proinflatuar sitokin ağırları erken doğuma neden olabilir (29, 56).

3.5. Fetal Maternal Arabirim

Hamilelik sırasında, maternal bağışıklık sistemi yarı allojenik fetüsten gelen hücreler ve dokularla yakın temas halindedir. Bu nedenle, maternal bağışıklık sistemini mevcut spesifik mekanizmalarla modüle edilmelidir (51,57).



Resim 1. Farklı trokoblak popölasyonlarını gösteren bir plasental kesit. Villöz sitotrokoblak ve mendelöz syndictiotrochoblast' ın her ikisi de HLA-G negatiftir. Diğer tüm trokoblak popölasyonları HLA-G pozitifdir. Desidua taban çizgisinde, interstisyel trokoblak hücreleri ile yakın temasta bulunan desidua NK hücreleri (57,58).

Anne ile fetüs arasında damarsal devamlılık olmadığı için plasenta fetüsün kabulünde önemli bir rol oynamaktadır. Genel olarak, iki hücre tipi, desidua ve trofoblak, anneyi ve fetüsü korumak için gerekli koşulları ve anatomik yapıları

oluşturmak için fetal-maternal arayüz çevresini değiştiren çeşitli düzenleyici faktörlerin hem salgılanmasında hem de bunlara yanıt vermesinde rol oynar.

Trofoblast hücreleri, maternal hücrelerle temas eden en önemli fetal hücrelerdir ve farklı maternal elementlere maruz kalan üç farklı trofoblast türü tespit edilmiştir. İlk tip villöz sitotrofoblasttır; bunlar, villusta kalan aktif olarak bölünen trofoblast hücrelerinden oluşan bir hücre havuzu oluşturur. İkinci tip trofoblast birinci tipi kapsar ve sensityotroblast olarak adlandırılır; bunlar maternal kanda yüzerler. Üçüncü tip trofoblast popülasyonu, villöz olmayan sitotrofoblasttır; bunlar, desidua ve miyometriyuma göç eden çoğalan öncül trofoblast hücreleridir. 20 haftalık insan hamileliğinde toplam trofoblast yüzey alanı yaklaşık 15 m²’ dir. Villöz sensityotroblast anne kanında yüzer ve bu nedenle maternal periferik lökositlerle yakın temas halindedir (5, 59, 60).

3.6. Fetal-Maternal Arabirimin İmmünolojik Özellikleri

Periferik bağışıklık cevabının, yarı- allojenik sensityotrofoblast hücrelerinin varlığına adapte olması beklenebilir. Karmaşık fetal-maternal arayüzü içeren ortam normalde uterus ortamı ile düzenleyici faktörler (kemokinler, kitokinler, büyüme faktörleri, antijenler, hormonlar) arasında düzenlemesi yapılmış bir etkileşimdir. Bu durum da fetüsün büyümesi ve gelişmesini desteklemek için gerekli immünolojik açıdan güvenli ve beslenme ortamlarını oluşturur (17,18,37).

Hamilelik sırasında, implantasyon bölgesindeki mikro ortamda yerel bağışıklık genel sistematik bağışılıktan farklı olmaktadır. Ayrıca bu düzenleme hamileliğin farklı aşamalarında farklı da olabilir. İmmün hücrelerde bilinen değişikliklerden biri implantasyon sırasında desiduada uterus NK hücreleri (uNK) olarak adlandırılan farklı tipte NK hücrelerinin gelişimidir(38,39). Bu uNK hücreleri, periferik kanda bulunan çoğu NK hücresinden farklıdır; çoğunluğu CD56 ve CD38’ i eksprese eder, ancak klasik T hücresi veya NK hücre belirteçleri (CD3, CD4, CD8, CD16 ve CD57) eksprese etmez, Decidua’l daki bağışıklık tepkisini düzenlemedeki rolleri nedeniyle bunlar sitotoksik değildir, bağışıklık modüle edilir ve trofoblast tarafından düzenlenir. Rahim CD16- CD56’ lar doğal öldürücü hücreler olarak da adlandırılır. CD56+ /CD16- desidual NK hücreleri, granülosit-makrofaj-koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) β 1, interferon (IFN) γ , tümör nekroz faktörü

(TNF) α , IL-2 ve lösemi inhibitör faktör (LIF) de dahil olmak üzere çeşitli sitokinler üretir (10–12,40).

İnsan hamileliğinde CD56+ /CD16- hücrelerinin rolü kapsamlı olarak çalışılmış olmasına rağmen, henüz tam olarak belirlenmemiştir. Son zamanlarda farelerle yapılan çalışmalar neticesinde plasenta oluşumu sürecinde uterus kan damarlarının modifikasyonunda desidual NK benzeri hücrelerin rol aldığı öne sürülmüştür (13,40).

Gebelik esnasında ilgi çekici bir değişim gözlenmektedir, erken gebelikte çok sayıda olan CD56+/CD16- hücreleri, ikinci ve üçüncü trimesterde büyük ölçüde düşer, bu nedenle varlıkları trofoblast invazyonu periyodu dönemine denk gelir, çünkü plasenta oluşumu gebeliğin 20. haftasında tamamlanır.

3.7. Gebelikte Bağışıklık Toleransı

İnsan gebeliğinin başarısı, fetüsün reddedilmeden dokuz ay boyunca anne karnında kalabilmesi immünoloji ilkelerine aykırıdır. Önerilen mekanizmalar, maternal ve fetal dokuların fiziksel olarak ayrılmasını, aynı zamanda greft reddine yol açacak fetal antijenlerin yokluğunu ve toleransın gelişmesini içerir (51, 63-65).

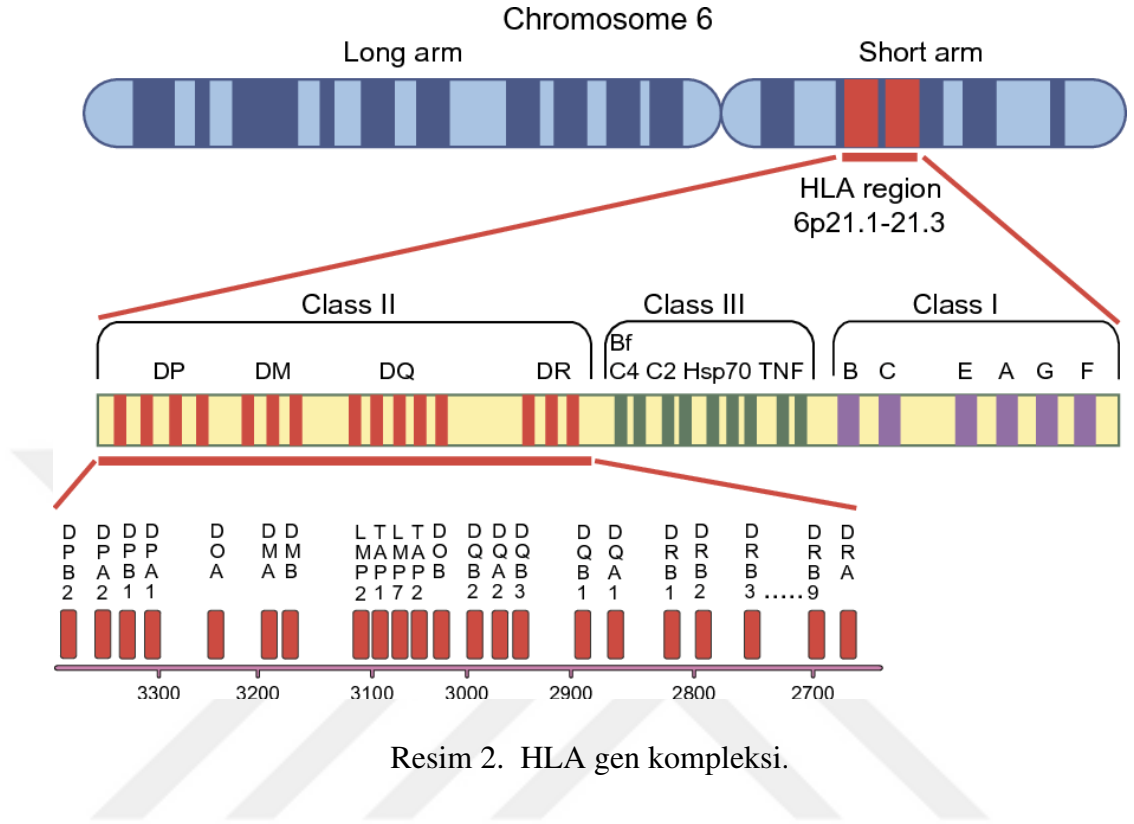
3.8. HLA Gen Kompleksi

Bağışıklık sisteminin esas görevi organizmayı yabancı moleküllere ve mikroorganizmalara karşı savunmak, farklı mekanizmalarla cevap vermektir (41). İmmün tanımada yabancı antijenleri kendi kendine indüklemekten ayırt etme görevi esas olarak MHC (Major Histo-uyumluluk Kompleksi) molekülleri, yani doku uyumluluk antijenleri tarafından gerçekleştirilir. Hücre yüzeyin üzerinde MHC molekülleri, yabancı antijenlere bağlanır ve bağışıklık sistemini efektör hücrelere sunarak, bağışıklık tepkisinin başlatılmasında kilit bir rol oynar.

MHC molekülleri yüksek derecede bağışık olduğundan, transplantasyondaki alıcı ve verici arasındaki farklı MHC molekülleri onları yabancı antijen olarak tanır ve reddetme mekanizmaları bağışıklık tepkisini uyarak başlatır. Bundan dolayı MHC molekülleri transplantasyon antijenleri olarak adlandırılır. MHC yerine HLA (İnsan Lökosit Antijeni) ismi de kullanılabilir (42,43).

HLA (insan lökosit antijeni) molekülleri, insanlarda büyük doku uyumluluk kompleksi (MHC), veya HLA gen kompleksi olarak adlandırılır. HLA kompleksi, alfa ve beta zincirlerinden oluşur. Alfa zinciri kromozom kodlayan genler 6p21 üzerinde

bulunur ve yaklaşık 4 Mb DNA içerir. Bu bölge genleri üç ana sınıfa ayrılır: I, II ve III (41,44,45).



HLA Sınıf I kompleksi (HLA-A, -B ve -C -G, -E -F), bir alfa ve en az bir beta polipeptid için genler içerir (44,49). Alfa zincirlerini kodlayan Sınıf I genleri, hemen hemen tüm çekirdekli hücrelerde eksprese edilir (45). Sınıf I genlerinin ürünleri, kromozom 15 üzerindeki polimorfik bir genin ürünü olan Beta-2 Mikroglobulin ile birleşerek HLA kompleksini oluşturur. HLA sınıf I genleri, klasik HLA-A, -B ve -C genlerine ve klasik olmayan Hla-G, -E -F genlerine ayrılır. Ayrıca sınıf I bölgesi bazı psödogenleri, HLA-H, -J, -K ve -L' yi içerir (46–48).

Tablo 1. Sınıf I MHC genlerinin polimorfizmi.

HLA-A	218
HLA-B	439
HLA-C	96
HLA-E, HLA-F ve HLA-G	Nispeten az sayıda allel

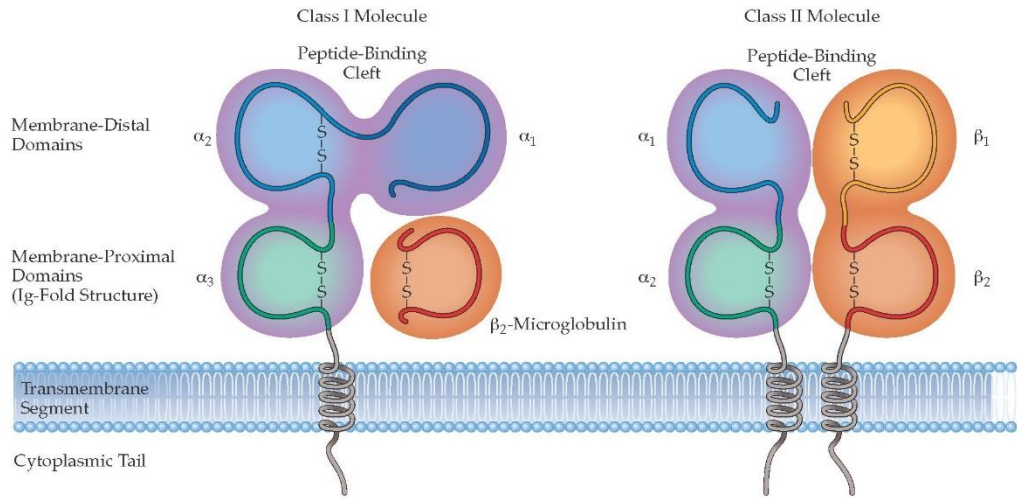
HLA Sınıf II kompleksi (HLA-DR, -DQ, -DP, -DM, -DO), bir alfa ve en az bir beta polipeptid için genler içerir (44,49).

HLA Sınıf II molekülleri, zincirsiz bir şekilde birbirine bağlı alfa ve beta zincirleri ile oluşturulur. HLA sınıf II molekülleri, B lenfositleri, T hücreleri, monositler, immünolojik olarak aktif hücreler ve dendritik hücreler gibi makrofajlardan oluşur (41–43,50).

Tablo 2. Sınıf II MHC genlerinin polimorfizmi.

HLA-DPA	12
HLA-DPB	88
HLA-DQA	17
HLA-DQB	42
HLA-DRA	2
HLA-DRB1	269
HLA-DRB3	30
HLA-DRB4	7
HLA-DRB5	12
HLA-DM ve HLA-DO	Az sayı

Sınıf I ve Sınıf II MHC molekülleri, sistemin antijen tanımasında önemli bir rol oynar. Örneğin; endojen antijenler, enfekte hücre üzerinde oluşturulan ve hücre yüzeyinde eksprese edilen viral peptit Sınıf I molekülüne bağlanır ve CD8⁺ T hücreleri bu peptidi tanır. Daha sonra bağışıklık tepkisinin diğer aşamaları gerçekleşir ve virüs, enfekte olmuş hücreyi öldürür. Ekzojen antijenler MHC Sınıf II molekülüne bağlandığında bağışıklık tepkisi; CD4⁺ T hücreleri tarafından tanınan bu hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu ile ortaya çıkar (49–52).



Resim 3. HLA Sınıf I ve Sınıf II MHC molekülleri.

HLA III kompleksi, yapısında III (C2, C4) genlerini içerir. TNF proteinlerinin HLA bölgesi insan genomundaki en polimorfik bölgedir. Özellikle sınıf I ve II kompleksi, çok çeşitli allellerle kendini gösterir. Bazı lokuslarda 600' den fazla farklı allel vardır (45,50,51).

3.8.1. Trofoblast hücrelerde HLA gen ifadesi

Fetal-maternal arayüzün immünolojik özelliklerinden açıkça anlaşılmaktadır ki, maternal bağışıklık hücreleri trofoblast hücreleri ile yakın temas halinde olmasına rağmen onlara saldırmazlar (53). Plasentanın dış epitel tabakasını oluşturan trofoblast hücreleri üzerindeki polimorfik majör doku uygunluk kompleksi (MHC) antijen ekspresyonunun down regülasyonu, semiallojenik fetüsün anne bağışıklık sistemi tarafından reddedilmemesini sağlayan mekanizmalardan biri olduğu hipotezi öne sürülmüştür (45,54,55).

Yakın dönemde yapılan çalışmalara göre, trofoblast hücrelerinin fetal allogreft toleransına HLA-G kompleksinden sorumlu genlerin sınırlı ekspresyonun neden olduğu ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, bu genlerle ilgili veriler birikmeye devam ettikçe, fetal-maternal etkileşimlerdeki işlevi hakkında net bir sonuca ulaşmak mümkün değildir. Bunun nedeni kısmen HLA-G protein izoformlarını ayırt edecek antikorların olmaması, ekstrasitotroblastta HLA-E ve HLA-C' nin birlikte ekspresyonu,

iyi bir hayvan modelinin olmaması ve HLA-G biyolojisinin diferansiyel RNA ekleme modeli de dahil olmak üzere doğal karmaşıklıklarından kaynaklanmaktadır (46).

Fetal-maternal arayüz HLA-G' de 1992 gibi erken bir tarihte tanımlanan alternatif ekleme varyantları lokal maternal bağışıklık yanıtın yeniden programlanmasından büyük ölçüde sorumlu görünmektedir. Klasik olmayan HLA-G molekülü hemen hemen her gebelikte bulunan trofoblasta özgü bir moleküldür.

Abbs ve ark. ayrıca primer villöz trofoblast hücrelerinde HLA' nın bulunmadığını, ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin ise normal gebelikte HLA-C, HLA-G ve HLA-E' yi ifade ettiğini, ancak HLA-A, HLA-B veya HLA-DR moleküllerini ifade etmediğini doğruladı (47).

3.8.2. Klasik olmayan HLA sınıf IB genleri

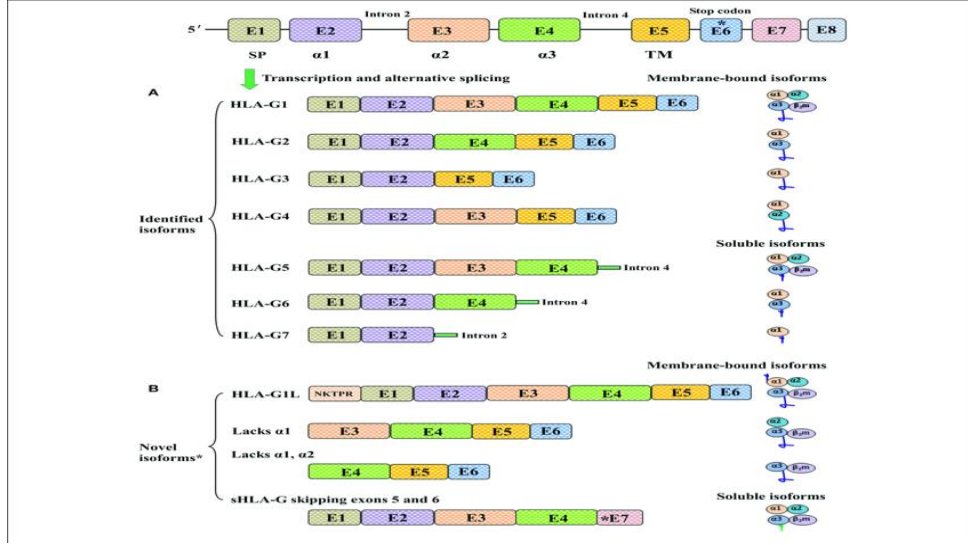
Klasik olmayan MHC sınıf Ib molekülleri olan HLA-E, -F ve -G (resim 4), klasik sınıf Ia molekülleriyle yakından homologtur, ancak sınırlı polimorfizmleri ve düşük hücre yüzeyi ekspresyonu ile ayırt edilirler (56).

Ib sınıfı moleküller, yalnızca klasik sınıf Ia moleküllerinin körelmiş evrimsel kalıntıları değildir, bunun yerine bağışıklık tepkilerinin baskılanmasında rol oynar ve uzun süreli bağışıklık kaçışına veya toleransına katkıda bulunurlar. HLA sınıf Ib genlerinin gen yapısı, HLA sınıf Ia genlerinininkine çok benzemekle birlikte özellikle 3'-ucu (sitoplazmik kuyruk) ile ilgili farklılıklar mevcuttur. HLA-G' nin kısa sitoplazmik kuyruğu, yüksek oranda azaltılmış spontan endositozu için önemli görünmektedir. HLA-E; sınıf Ia antijenleri olarak birçok farklı hücre ve doku tipinde eksprese edilir. HLA-E-bağlama oluğu, HLA-G sinyal peptidi için büyük bir afiniteye sahiptir ve bu bağlanma, trofoblast hücre yüzeyinde HLA-E' nin ekspresyonu için önemlidir (57–60). HLA sınıf I proteinlerinin hücre yüzeyi ve hücre içi taşınması ekspresyonu, endoplazmik retikulum içindeki peptidlere bağlıdır (57,61).

HLA-F' nin işlevi şu anda bilinmemektedir. HLA-F ekspresyonu yalnızca plasentadaki invaziv sitotrofoblast hücrelerinde tespit edilmiştir ve bunlar şimdiye kadar bilinen üç HLA sınıf Ib molekülünün tümünü eksprese eden tek hücre tipidir. Bu bağlamda, üç sınıf-Ib molekülü plasentada sinerji içinde hareket edebilir ve bir dereceye kadar fonksiyonel olarak birbirinin yerine geçebilir (12). HLA sınıf-Ib genlerinin polimorfizmi, yüksek oranda polimorfik HLA sınıf-Ia ve -II genlerinin aksine çok seyrek. HLA-E ile ilgili olarak, protein seviyesinde üç allel ve HLA-F için ise sadece iki allel olduğu bildirilmektedir (62,65–67).

3.8.3. HLA-G gen ve polimorfizmleri

HLA-G, 6. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuş ve nükleotid ve amino asit seviyelerinde HLA-A2 ile yüksek derecede dizi benzerliği gösterir (68–70). HLA-G geni; ekzon 1'de bir sinyal peptidini, ekzon 2'de $\alpha 1$ - alanını, ekzon 3'de $\alpha 2$ alanı, ekzon 4'de $\alpha 3$ alanı, ekzon 5'de transmembran alanı, ekzon 6 ve 7'de sitoplazmik kuyruk ve ekzon 8'de untransle bir bölge olmak üzere toplam sekiz kodlayan ekzon içeren sınıf Ia genlerine (HLA-A, HLA-B ve HLA-C) benzemektedir (bkz. resim 5). Bununla birlikte, HLA-G' nin 6. ekzonunun ikinci kodonunda stop kodonu ile sonuçlanan bir mutasyon alfa zincirinde kesik bir sitoplazmik kuyruk oluşumuna neden olur, HLA-A, B ve C' nin karşılık gelen bölgelerinden 19 amino asit daha kısa olan HLA-G' nin mRNA' sı alternatif splayzing'e uğrar, bu da en az beş farklı proteinle sonuçlanır- böylece polimorfik yapılar oluşur (71,72). En büyük mRNA, HLA-G1 proteininin $\alpha 1$, $\alpha 2$ - ve $\alpha 3$ 'ün transmembran ve sitoplazmik kuyruğu içeren bölgelerini kodlar. Bu proteinin çözünür bir formu olan HLA-G1sol, intron 4' ten gelen nükleotidler tarafından kodlanan $\alpha 3$ alanını takip eden ilave 21 amino asit içerir. Daha küçük bir mRNA'ya sahip olan HLA-G2, $\alpha 2$ alanından yoksundur, $\alpha 1$ - ve $\alpha 3$ -alanlarının birleştiği bir protein ile sonuçlanır. Bu proteinin çözünür bir formu olan HLA-G2 sol, ayrıca $\alpha 3$ -alanından sonra ilaveten 21 amino asit daha içerir. En küçük ekleme formu olan HLA-G3, $\alpha 1$ -alanı çıkarılmış hem ekzon 3 hem de 4' e ($\alpha 2$ - ve $\alpha 3$ -domainlerine karşılık gelir) sahiptir. HLA-G3'te ekzon 4 ($\alpha 3$ alanı) bulunmadığından, $\beta 2$ -mikroglobulin ile bağlanamaz ve hücre yüzeyinde kararsız olabilir (73–76).



Resim 5. HLA-G mRNA' nın alternatif bir yolu ile oluşturulan farklı HLA-G izoformları (4,6).

3.8.4. HLA-G gen fonksiyonu

HLA-G klasik MHC sınıfı I genleri (HLA-A ve HLA-B) olmamlarına rağmen, HLA-G placentadaki ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinde (EVT) eksprese olarak gebelikte bağışıklık toleransında rol oynayabilmektedir (16,25,77–80). HLA-G ilk kez plasenta örneklerinde tanımlanmış olup, preeklampsi ve tekrarlayan gebelik kayıpları gibi gebelik bozukluklarındaki rolü birçok çalışmada araştırılmıştır (9,76,81,82). HLA-A ve -B down regülasyonu sitotoksik T hücre yanıtlarından korunmaya neden ve doğal öldürücü hücrelerin tepki kaybına neden olur. HLA-G, NK hücre inhibitörü reseptörü KIR2DL4 için bir ligandır ve bu nedenle bu HLA' nın trofoblastlarda ekspresyonu onu NK hücre aracılı ölüme karşı korur (72,73,83).

Bazı "null" HLA-G allellerini homozigot olarak taşıyan bireylerde hamilelik oluşabilir, doğum gerçekleşebilir ve immünyetmezlik, otoimmün hastalık veya tümörler görülmeyebilir (71). Bu "null" allellerden HLA-G * 01: 05N, İranlılar gibi bazı popülasyonlarda oldukça yaygınken, bazı yerli Amerikan popülasyonlarında nadirdir (12). Ayrıca, bazı yüksek primatlar tüm MHC-G izoformlarını göstermez. Buna birlikte, orta ölçekli eski dünya maymunlarında (Cercopithecinae), HLA-G' nin 6. ekzonunun ikinci kodonunda stop kodonu ile sonuçlanan bir mutasyon görülür ki bu da alfa zincirinin stoplazmik kuyruğunda eksilmeye neden olur (14). Tüm bu polimorfizmler incelenmelidir.

Embriyolarda çözünür HLA-G (sHLA-G) varlığı ise daha iyi gebelik oranları ile ilişkilidir. Gebelik oranlarını optimize etmek için embriyo seçiminde morfolojik skora sisteminin en iyi strateji olduğuna dair önemli kanıtlar vardır. Bununla birlikte, eşit morfolojik kalitede embriyolar arasında bir seçim yapılması gerekiyorsa, çözünür HLA-G varlığı ikinci bir parametre olarak düşünülebilir (5,84–88).

3.8.5. HLA-E

İnsan lökosit antijeni HLA-E, doğal öldürücü ön reseptörler ve T hücreleri ile etkileşim yoluyla hem doğuştan hem de adaptif bağışıklık yanıtta rol oynayan sınıf I Klasik olmayan bir HLA molekülüdür (73,89). HLA-E geni, kromozom 6' daki klasik Hla Loki' ye kıyasla sınırlı polimorfizm ile karakterizedir. Önceki çalışmaların çoğu ekzon 2 ve 3' teki polimorfizme veya spesifik gen bölgelerine odaklanırken, diğer ekzon ve intronlardaki polimorfizmler protein ekspresyonunu ve fonksiyonunu da etkileyebilir. Bu nedenle, HLA-E' nin sağlık ve hastalıktaki fonksiyonel etki düzeyini daha iyi anlamak için genişletilmiş HLA-E polimorfizmini araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır (65). HLA-E geni, diğer insan MHC sınıfı I genleri arasında en çok korunan olanıdır: homologları yeni dünya maymunlarında bile bulunmuştur (7,62). Bugüne kadar, HLA-E geninin 27 alleli keşfedilmiştir, ancak bunların çoğu ya çok nadirdir ya da sadece fonksiyonel olmayan proteinleri kodlar (90). Bu alellerden E * 01:01 ve E * 01:03 alelleri iki ana allel olarak tanımlanmış olup insan popülasyonunda birlikte görülme sıklığı neredeyse %100' ü oluşturur. Bu gerçek, HLA-E' nin, çok çeşitli aleller gelişen HLA sınıfı Ia genlerinin aksine, uzun bir süre boyunca seçimi stabilize etme baskısı altında olduğunu göstermektedir (91). Bu iki HLA-E allel dünya çapında neredeyse eşit oranlarda dağılım gösterdiğinden HLA-E dimorfizmi olarak kabul edilmektedir. Bu alellerin polipeptid ürünlerinde, pozisyon 107. kodondaki tek bir amino asit farklılık gösterir; allel*01:01 (HLA-E) Arg107, allel *01:03 (HLA-E) – Gly107'. Arg107Gly polimorfizmi, HLA-E molekülünün peptit bağlayıcı oluşunun dışında bulunur; bununla birlikte, yüzey ekspresyon seviyesi ve peptitlerin repertuarı da dahil olmak üzere HLA-E' nin bazı

özelliklerini etkiler (62,89,92). NK hücrelerinin inhibisyonu veya fonksiyonların aktivasyonu, HLA-E etkileşimleri ile kontrol edilir.

Literatürdeki HLA-E genlerinin risk alellerini taşıyan kadınların erken gebelikte düşük yapmaya daha yatkın olduğu sonucuna varılan çalışmalara dayanarak; bu çalışmada açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybında HLA-E (HLA-E*0101, HLA-E*0103) ve HLA-G (HLA-G*0105N, HLA-G*0103, HLA-G*0104) risk allellerinin ilişkisini araştırmayı ve bu alanda markır olabilecek polimorfizmleri bulmayı amaçladık.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta grubu olarak üniversitemizin Tıbbi Biyoloji- Genetik bölümüne Kadın Doğum polikliniği tarafından sevk edilen en az iki trimesterde ve açıklanamayan en az iki gebelik kaybı yaşayan 46,XX karyotipli 100 kadın hasta dahil edilmiştir. Parental yapısal kromozomal bozukluklar, erkeğe bağlı faktörlerden kaynaklan vakalar, endokrin ve enfeksiyona bağlı nedenler; anatomik ve immunolojik nedenler, trombofili, sigara, alkol, kimyasallar, radyasyona maruz kalan vakalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Kontrol gurubu olarak en az iki canlı doğumlu ve sağlıklı gebelik öyküsü olan 100 sağlıklı kadın kullanmıştır.

Yerel etik komitesinin (s.86) ve katılımcılarının yazılı onayı aldıktan sonra, vakalardan alınan periferik kan örnekleri EDTA tüplerinde (4 mL) toplanmıştır.

4.1. Materyal

4.1.1. Karyotip için kimyasal maddeler

- Besi ortamı (F10) (ham) (biological industries 752348 * (glutaminli
- Etil Alkol (Sigma)
- Fetal serumu Gibco 41G957P)
- Asetik Asit Glacial (Glacial) (Riedel-de Haen)
- Heparin (Mustafa Nevzat)
- Colcemid solüsyonu (Biological Industries 816646)
- PHA-M (Phytohemagglutinin M)
- Metanol (Riedel-de Haen)
- Potasyum fosfat (KH_2PO_4)
- • Penisilin / Streptomisin Solüsyonu (Biological Industries)
- • İzotonik (Eczacıbaşı)
- • Tripsin -EDTA solüsyonu (Biological Industries)

- • Sodyum Fosfat (Na_2HPO_4)
- (Potasyum Klorür)
- • L-Glutamin Solüsyonu (Biological Industries)
- Giemsa Boyası (Sigma)

4.1.2. Kültürün ortamı

Periferik kan kültürü için uygun solüsyonlar aşağıdaki gibidir:

1. Medya Penicillin solüsyonu
2. Streptomisin solüsyonu
3. PHA (phytohemagglutinin)
4. Fetal bovine serum

4.1.3. DNA ekstraksiyonu için ekipman ve malzemeler

- Üçlü Merkez PM
- Magnezyum Klorür PM
- Sodyum Klorür PM
- EDTA
- HCL%
- Sodyum hidroksit (macun)
- SDS %20 (500 ml)
- Fenol
- Kloroform
- Propanol (1 litre)
- Protein K (500 mg)

Stok çözümlerinin hazırlanması

- Tris 2m ph 7,6

- 242,2g tris üssü tartılır
- 800ml saf su
- HCl ile pH 7,6' ya ayarlanır (95 mi)
- 1000 ml' lik saf su

- Mgcl2 1m

- 203,3 g ağırlığında MgCl2
- 1000 ml' lik saf su

- NaCl 3m

- 175,32g NaCl ağırlığında
- 1000 ml' lik saf su

- EDTA 0,4 m pH 8

- 148,96 g' lık EDTA
- 18 g NaOH ağırlığında
- Su 800 ml
- eritildikten sonra, pastilin, pastilin pastille ekleyerek pH 8' e ayarlanır.
- 1000 ml' lik saf su

Bu stok solüsyonları + 4°C' de saklanmalıdır ve çalışma solüsyonları hazırlanmasında kullanılır.

Çalışma solüsyonları steril saf su (karışım için parafilm ile kapak) kullanarak steril edilmiş silindirlerde hazırlanır ve + 4 °C' de saklanır.

4.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve deney ekipmanları

PCR reaksiyon 50–100 ng şablon DNA içeriyordu,

4.1.5. PCR bileşenini aşağıdaki gibi karıştırarak ana karışım

- 250 nM forward primer.
- 250 nM revers primer.
- 0,2 mM dNTP' ler.
- 2,5 µl PCR tampon (10X).
- Toplam 25 µl hacimde 1U Taq DNA polimeraz.

4.1.6. HLA-G geni amplifikasyonu için

Ekzon 2: İleri: 5'-TCCATGAGGTATTTTCAGCGC3`

Ters: 5`-CTGGGCCCGGAGTTACTCACT-3`

Ekzon 3: İleri: 5'-CACACCCTCCAGTGGATGAT3`,

Ters: 5'-GGTACCCGCGCGCTGCAGCA-3'

4.1.7. HLA-E genotiplendirme

İleri 5'-GGC TGC GAG CTG GGG CCC GCC-3`,

Ters primer 5`-AGC CCT GTG GAC CCT CTT-3`.

4.1.8. RFLP enzimleri

Tüm RFLP enzimleri tanımlanmaktadır (Gazit ve diğerleri, 2004).

HinfI RFLP enzimi (thermo fisher scientific).

PPUM-I RFL enzimi (New England Biolabs).

Bser-I RFLP enzimi (New England Biolabs).

HPAII RFLP enzimi (thermo fisher scientific).

4.1.9. Cihazlar ve diğer malzemeler

- a. Mikrosantrifüj

- b. Termosikler
- c. PCR
- d. Elektroforez
- e. Elektronik hassas terazi
- f. Etüv
- g. Falkon tüpler 15 ml
- h. Kuru Hava Sterilizasyonu
- i. Plastik Eldiven
- j. Mikrofotografi Cihazı
- k. Mikroskop (Olympus)
- l. Enjektörler ve pipetler
- m. pH metre
- n. Lam
- o. Laboratuvar saati
- p. Buzdolabı

4.2. Metod

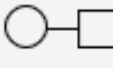
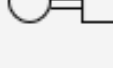
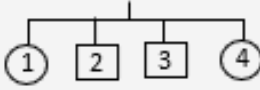
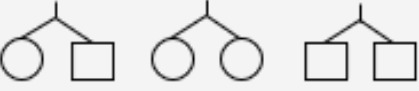
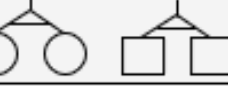
4.2.1. Çalışma adımları

- Ailenin hasta hikayesini (pedigri) alma
- Kan toplanması
- Karyotip analiz
- DNA izolasyonu
- PCR reaksiyonu
- Gel elektroforezi

- RFLP geninotype sonuç analizi

4.2.2. Pedigri metodu

Pedigri, genetik olarak farklı nesillerde kalıtsal bir özelliği veya hastalığı gösteren soy ağacının genetik bir sembolüdür. Aile üyeleri arasında genetik hazırlık ve bireysel sessizlik veya sessizliğin özelliklerine atıfta bulunulur (Şekil 6).

				
Normal Dişi	Normal Erkek	Bilinmeyen cinsiyet	Etkilenen erkek birey	Etkilenen dişi birey
				
Ebeveynler (Akrabalık yok)		Ebeveynler (Akrabalık var)		Taşıyıcı erkek
				
Doğum sırasına göre çocuklar				Taşıyıcı dişi
				
Çift yumurta ikizi çocuklar (Yalancı ikizler)				
				
Tek yumurta ikizi çocuklar (Özdeş ikizler)				

Şekil 1. Pedigri sembolü

4.2.3. Periferik kültürü yöntemi

Kromozomlar kültür yöntemi ile elde edilir. Lenfosit kültürü yöntemi ile kromozom elde etme yöntemi aşağıdaki gibidir:

- 1- Heparinli steril enjektör yardımıyla hastadan 4-5 ml kan alınır. Tüpte hastanın adı ve soyadı yazılır.
- 2- 15ml lik falcon tüplere 5 ml besi ortamı bırakılır.
3. Hastanın kanı 5-6 damla tüpe ilave edilir ve 37 °C etüvde 72 saat inkübasyon bırakılır.

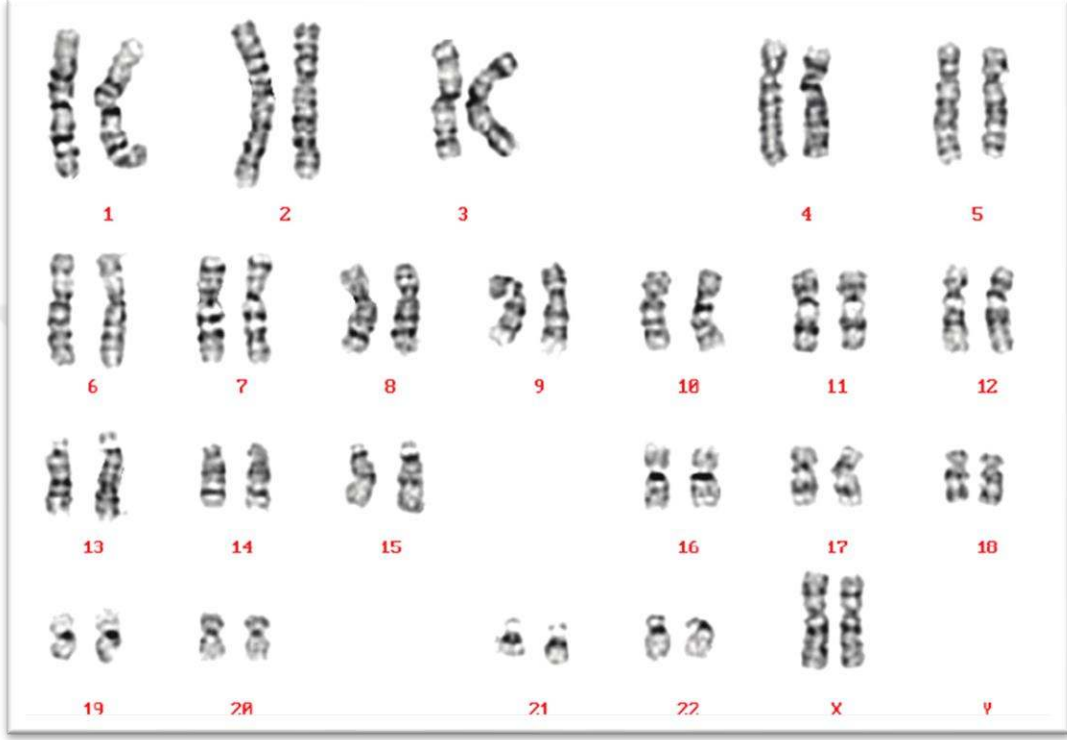
4. Son 45 dakikada etüvden çıkarılan tüpe 2 damla colcemid ilave edilir ve 72 saat sonunda kültür tamamlanır.
5. Çalışmadan çıkarılan tüpler, bazı girdaplardan sonra 1200 rpm' de 10 dakika Mikrosantrifüjlenir.
6. Mikrosantrifüjlemeden sonra, üstteki süpernatant uzaklaştırılır, altta yatan pelet, girdapta 10 ml hipotonik çözeltiye eklenir ve 10 dakika bekletilir.
7. 1200 rpm' de 10 dakikalık bir Mikrosantrifüjlendikten sonra, 10 dakikadaki üstündeki süpernatant atılır ve vorteks, üstte pasteur pipette 10 ml fiksatif eklenir.
8. Fiksatif ile birkaç kez yıkama işlemi tekrarlanır.
9. Son Mikrosantrifüjden sonra, tüplerde 0,5-1 CC pelet kalır.
10. Alt kısımdaki pelet pipetle karıştırıldı ve damla damla yayıldı.
11. Kurumaya tutulan preparat, çalışmada 3 gün boyunca yaşlanma için bırakılır.
12. Üçüncü günün sonundaki preparatlar, pankreatin çözeltisindeki şalelerde 30-60 saniye bekliyorlardı.
13. Oradan çıkarılan preparatlar, iki kez destile su içeren şalelere batırılır.
14. 4-5 dk Giemsa boya şalelerde bekletilir.
15. Temizlenen preparatlar, kromozom analizi yapmak ve karyotip oluşturmak için mikroskop altında incelemeye hazır hale getirildi.

4.2.4. Preparatların boyanıp değerlendirilmesi

İncelenmeye hazır preparatlar mikroskop içine yerleştirilerek yeterli sayıda tarama yapıldı ve her hasta için 20 ila 40 metafaz evresi bulunduğundan sonra resimler çekildi, sayısal ve yapısal anomaliler belirlendi ve değerlendirilen hastaların karyotipleri alındı.

4.2.5. Karyotiplerin belirlenmesi

Mikroskop altında değerlendirilen uygun metafaz analiz edildikten sonra karyotipler belirlenir ve arşivlenir.



Resim 6. 46,XX'li normal nadın karyotip.

4.2.6. Alınan kanlardan DNA eldesi

4.2.6.1. Hücrenin hazırlanması

- +4°C' ye kadar ön soğutma Mikrosantrifüjü.
- 5-10 ml kan ve 40 ml reaktif A solüsyonu karıştırılır. (Geçici ayrışma analisti; 12,11 g TRI-HCL, 109 g sukroz, 1,017 g MgCl₂, 990 ml distile su, pH 8,0. 10 ml Triton-X eklendikten sonra otoklav edilir ve +4°C'de saklanır).
- Tüpü 2 dakika boyunca elle hafifçe sallayın.
- 4°C' de 3,000 rpm' de santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası pellet ve süpernetan birbirinden ayrılır.

4.2.6.2. Hücre parçalanması

Kalan pelete 2 ml reaktif B (48.44 g Tris-HCl, 22.32 g EDTA, 8.76 g 990 ml distile su, pH 8,0) ilave edilir ve sonra pipetaj yapıldı. Her bir tüpü pipetaj yaptıktan sonra 15 ml' lik tüplere alındı.

4.2.6.3. Proteinlerin uzaklaştırılması

Çalışmanın başında, 15 ml' lik bir tüpe 500 ml sodyum perklorat ilave edildi, tüpler oda sıcaklığında 15 dakika boyunca bir rotora yerleştirildi ve tüpler birbenmared içinde inkübe edilmeye bırakıldı (65°C) 30 dakikaya kadar.

4.2.6.4. Makromolekülerin uzaklaştırılması

Benmari' den çıkarılan her tüpe 2 ml kloroform (-20° C) ilave edildi, 10 dakika boyunca rotar mixte karıştırıldı, 10 dakika santrifüj yapıldı.

4.2.6.5. DNA çökmesi

DNA içeren supernatant Pasteur pipeti ile alındı ve 15 ml' lik farklı bir tüpe aktarıldı, +4 ° C' demuhafaza edilen etanol ilave edildi Falcon tüpü bir defa yavaşça alt üst edildi. Bu işlemten sonra öze yardımcı ile solüsyondan DNA elde edildi. Öze ucu 1,5ml'lik ependorf tüpe akarıldı ve 200ml saf su ilave edildi.

RFLP nedir?

Bir DNA molekülünün restriksiyon enzimleri kullanılarak farklı boyutlardaki parçalara bölünmesi ve elde edilen DNA fragmentlerinin jel elektroforez teknolojisi kullanılarak görüntülenmesi işlemine restriksiyon fraksiyonunun uzunluğunun polimorfizmi (RFLP) denir.

İlk RFLP haritası maymun virüsü 40' ın (S40) DNA' sının HINDII enzimi ile kesilmesi sonucu oluşturulmuş ve analizden elde edilen 11 spesifik fragment sayesinde virüsün DNA' sı üzerindeki biyolojik öneme sahip alanları tespit etmek mümkün olmuştur. Bu çalışma birçok kalıtsal hastalığın tanı ve tedavisinde RFLP tekniği kullanılmıştır.

RFLP tekniğinin uygulanması kolay bir yol olsa da çalışılan gen alanı için doğru enzimi seçmek çok önemli bir adımdır. Çalışma alanına uygun olmayan enzimler kullanıldığında, çok sayıda aralık veya çok yakın görülebilir. Bu durumda oluşan bantların sayı ve boyutlarını karşılaştırmak ve değerlendirmek mümkün

olmayabilir. Bu amaçla, PCR ürünlerinin belirli alanlarından RFLP enzimleri hakkındaki bilgilerin değerlendirilmesini tamamlayan organizmalardan elde edilen enzimler için çeşitli programlar vardır.

RFLP Endonükleaz nerede kullanılır?

1970' lerde RFLP endonükleaz enzimlerinin piyasaya sürülmesiyle Rekombinant DNA teknolojisinin ilk adımları atıldı. Rekombinant DNA, DNA parçalarının DNA ligaz enzimi ile birleştirilmesiyle üretilen ve RFLP endonükleaz enzimleri ile doğada kendiliğinden oluşamayan farklı türlerden DNA moleküllerinin kesilmesiyle elde edilen yeni bir DNA molekülüdür.

Özellikle klonlama çalışmalarında sıklıkla kullanılan bu yöntem sayesinde spesifik hedef gen bölgesini çoğaltmak, gen tarafından kodlanan proteini üretmek ve DNA dizisini belirlemek mümkündür.

4.2.7. PCR aşağıdaki prosedür kullanılarak yapıldı

PCR için PCR mikrosantrifüj tüpleri hazırlanır

Her tüpe yerleştirilen her primerden 2 µl (ileri ve geri).

10 µl PCR Master Mix (DATP, DTTP, DCTP, DTTP ve 3 MMGCL2 ve 0,05 DNA polimeraz) eklendi.

31µL ultra saf su.

Sonunda hasta tüpüne 3 ul DNA eklendi

Her primer seti için uygun programda termosikler içine yerleştirilmiş karışım.

Programın tamamlanmasından sonra, PCR ürünü spesifik enzimler ile kesilmeye hazır.

4.2.8. HLA-G ve HLA-E gen polimorfizmin amplifikasyonu için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) toplam 50 µl hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenleri tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. HLA-G PCR bileşenleri.

Reaktif	Hacmi µl/50
Forward primer	1
Reverse primer	1
Saf su	31
PCR Mastermix	14
DNA	3

Hazırlanan mikrosantrifüj tüpleri PCR cihazına yerleştirilir ve PCR amplifikasyonu tablo 4 ve 5'te gösterilmiştir.

Tablo 4. HLA-G Exon2' nin PCR programı.

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Zaman
1	94 °C	5 dk
35	94 °C	1 dk
	57 °C	1 dk
	72 °C	1 dk
1	72 °C	7 dk

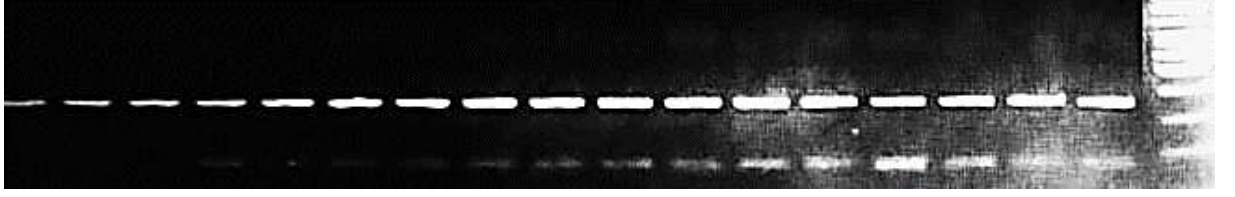
Tablo 5. HLA-G ve HLA-E gen Exon3 PCR programı.

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Zaman
1	95 °C	5 dk
35	94 °C	45 sn
	61 °C	45 sn
	72 °C	45 sn
1	72 °C	7 dk

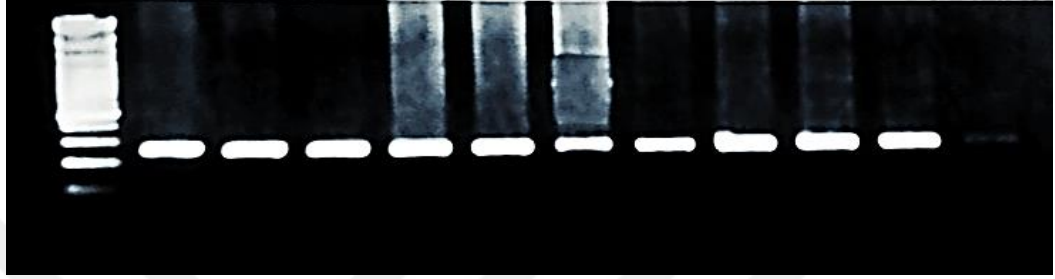
4.2.9. HLA-G ve HLA-E PCR amplifikasyonu

HLA-G ve HLA-E polimorfizmleri için elde edilen PCR ürünleri, retraksiyon enzimleri ile kesilerek polimorfizm varlığı belirlendi. 25 µl nihai hacim elde etmek için 15 µl amplifiye PCR ürünü, 0.5 µl (Hinf-I, PpuM-I, BseR-I, HpaII) RFLPenzimleri (10 µl/µl) ve bidistile su ile 5 mg bovin serum albümini ekleyin.; Kırpma, gece boyunca 37 °C’ de inkübe edilerek sağlandı. 10 µl enzim kesme ürünü eklenerek, 2 µl 6X yükleme tamponu karışımı ilave edildi, %2 agaroz jelde 100 bp DNA moleküler markör (Fermentas) 110 V’ da 30 dakika uygulandı ve ultraviyole transilluminatur ile değerlendirildi.

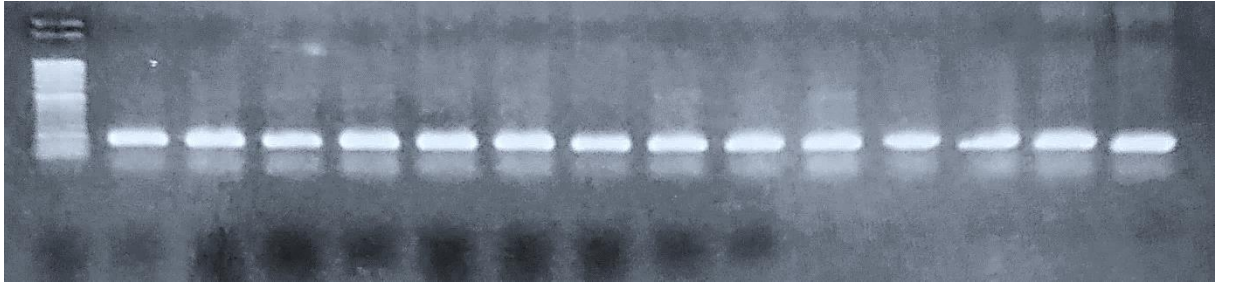
Tüm TGK hasta ve kontrol gruplarında HLA-G geninde ekzon 2 ve 3’ ün amplifikasyonu için polimeraz zincir reaksiyonları yapıldı. Agaroz jel elektroforezi, her bir ekzon için doğru moleküler boyutlara sahip keskin, tek bantlar elde edildiğinde optimizasyon deneyini takiben her ekzon için bu amplifikasyonu doğrulamak için kullanıldı. Aşağıdaki şekiller, ekzon 2 (281BP) (Resim 7), ekzon 3 (276BP) (Resim 8) ve 3 (280BP) (Resim 9) için olan HLA-G geninin amplifiye edilmiş ekzonlarını göstermektedir. Tüm hastalar ve kontroller için amplifikasyon sağlandı.



Resim 8.HLA-G EKZON 2 281bp PCR ürünleri.



Resim 9 HLA-G EKZON 3 281bp PCR ürünleri.



Resim 10. HLA-E 280bp PCR ürünleri.

4.2.10. Enzimatik kesim

HLA-G ve HLA-E PCR ürünleri %2,0 lık agaroz jelde amplifikasyonun teyiti için yürütüldü. Amplifikasyonun olan PCR ürünleri tablo 6 da belirtilen enzimler ile RFLP analizi gerçekleştirildi.

Tablo 6. HLA-G geni ve HLA-E polimorfizmleri.

Gen	Gen Exon	Enzim
HLA-G	2	Hinf-I
	3	PpuM-I
		BseR-I/
HLA- E	Exon 3	Hpa II

Enzimatik kesim bileşenleri kullanılan bileşenler tablo 7 de belirtiler.

Tablo 7. Enzimatik kesim bileşenleri.

Reaktif	miktar (µl)
PCR Ürün	15
10x Nebuffer	2
Enzim	1

DNA yükseltilmiş ürün değişken uzunluk RFLP enzimlerinin parçalarına ayrılır ve daha sonra elde edilen parçalar jel elektroforez ile uzunluklarına göre ayrılır.

Mikrosantrifüj tüpleri daha sonra, RFLP endonükleazının PCR ürününü sindirmesini sağlamak için 16 saat boyunca 37°C’ de PCR inkübesyon bırakıldı. RFLP ürünleri %2’lik agaroz gelde yürütüldü.

4.2.11. RFLP analizi

HLA-G ve HLA-E polimorfik tipleri Tablo 8’ de gösterilmektedir.

HLA-G geninin Exon 2 bölgesi PpuMI ile kesildikten sonra oluşan 276 bp bandı HLA-G*0105N polimorfizminin varlığını göstermektedir.

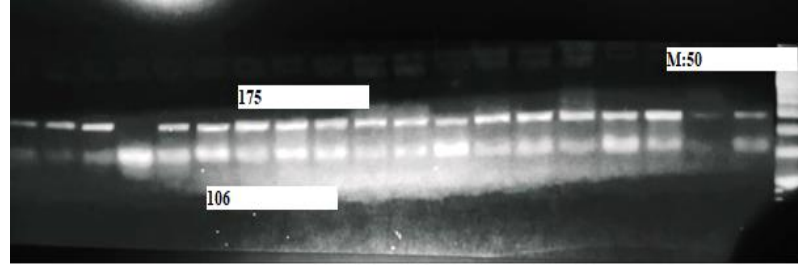
HLA-G geninin Exon 2 bölgesi HinfI ile kesildikten sonra oluşan 79+175+ 27 bp bandı HLA-G*0103 polimorfizminin varlığını göstermektedir.

HLA-G geninin Exon 3 bölgesinin BseRI ile kesimden sonra oluşan 276 bp bandı HLA-G*0104 polimorfizminin varlığını göstermektedir.

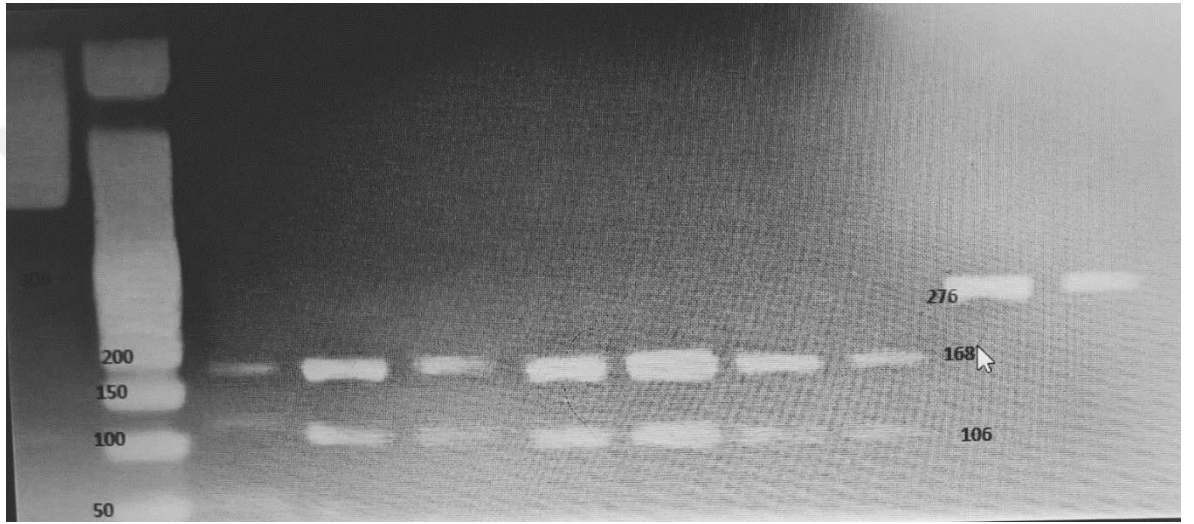
HLA-E geninin Exon3 bölgesi Hpa II enzimi ile kesildikten sonra oluşan 280 bp bandı HLA-E*0101 polimorfizminin varlığını göstermektedir. HLA-E genini Exon3 bölgesi Hpa II enzimi ile kesildikten sonra oluşan 260bp bandı HLA-E*0103 polimorfizminin varlığını göstermektedir

Tablo 8. HLA-G geni ve HLA-E polimorfizimleri.

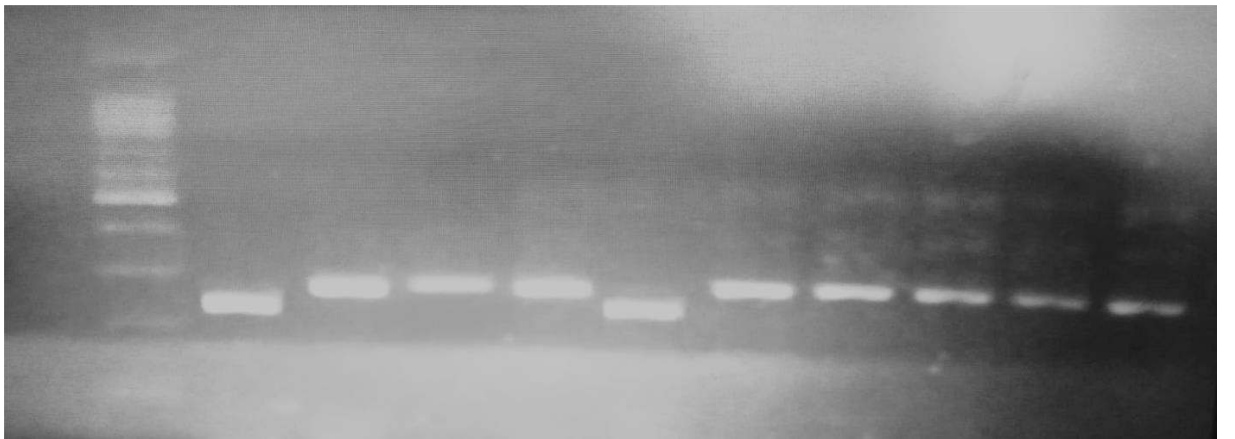
Gen	Exon	Enzim	Band (bp)	Özellikleri
HLA-G	Exon 2	Hinf-I	79 +175+27	G*0103
			106+175	Hepsi G*0103 hariç
	Exon 3	PpuM-I	276	G*0105N
			108+168	Hepsi G*0105N hariç
		BseR-I/	276	G*0104
			40+236	Hepsi G*0104 hariç
HLA-E	Exon3	Hpa II	280	3 E*0101
			260+20	E* 0103



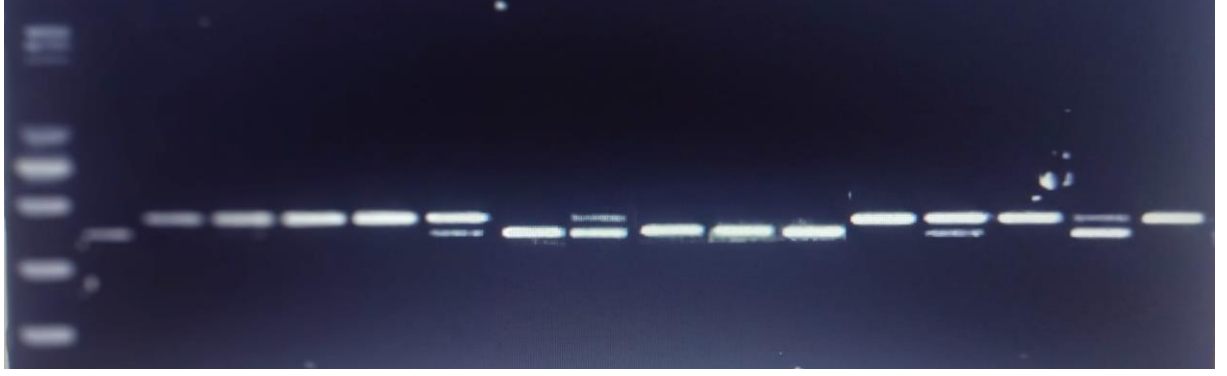
Resim 11. HLA-G*0103 gen polimorfizmine ait bant bölgeleri.



Resim 12. HLA-G*0105 gen polimorfizmine ait bant bölgeleri.



Resim 13. HLA-G*0104 gen polimorfizmine ait bant bölgeleri.



Resim 14. HLA-E*0101 \0103 gen polimorfizmine ait bant bölgeleri.

4.2.12. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen kategorik veriler yüzde ve sıklık, sayısal veriler ise aritmetik ortalama -standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz SPSS 23.0 (IBM SPS 23 istatistikleri) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kategorik verilerin analizinde sayısal verilerin analizinde Fisher hassasiyet testi kullanılmıştır. Anlam düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. HLA gen polimorfizmi, allel frekansları ve genotipleme gruplarının analiz sonuçları Fisher testi ve göreceli risk istatistiksel yöntemleri ile değerlendirildi.

Göreceli risk (RR): Göreceli risk: risk faktörü olan kişilerin, olmayanlara kıyasla bir hastalık geliştirme (veya bir olay yaşama) oranıdır. Göreceli risk, maruz kalan grup ile açığa çıkan grup arasında bir olay gelişme olasılığının oranı dikkate alınarak hesaplanır. Göreceli risk değerleri şu şekilde yorumlanabilir:

Göreceli risk = 1, maruz kalmanın sonucu etkilemediği anlamına gelir.

Göreceli risk < 1 , sonuç riskinin, koruyucu faktör olarak adlandırılabilen maruz kalma ile azaldığı anlamına gelir. Göreceli risk > 1 , sonuç riskinin maruz kalma ile arttığı anlamına gelir.

5. BULGULAR

Çalışmaya Ocak 2019- Şubat 2022 yılları arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' na gelen iki ve üstü TKG öyküsü olan 100 kadın dahil edildi. Hasta grubunun ve sağlıklı kontrol grubunun ortalamaları ve standart sapma değerleri Tablo 9' da gösterilmiştir.

Tablo 9. Kontrol ve hasta gruplarının yaşa göre dağılımı.

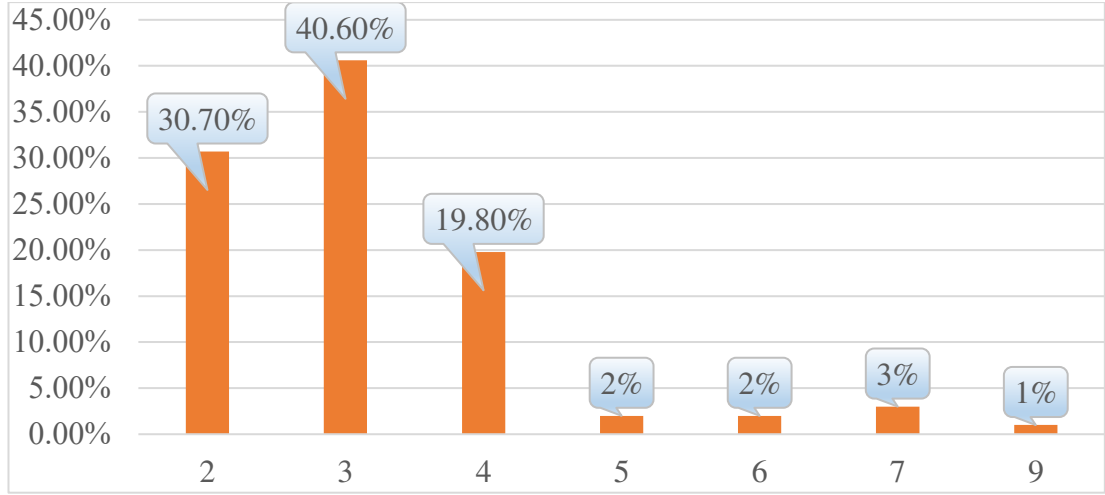
	Hasta (N=100)	Kontrol (N=100)	P
	Ort ± SS	Ort ± SS	
Yaş	8.0±3.2	7.2±3.5	0.075

Hasta grubunun yaş ortalaması 8,0±3,2 kontrol grubunun yaş ortalaması ise 7,2±3,5 olarak saptanmıştır. Hasta ile kontrol grupları arasında yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Çalışmamızda hasta grubundaki kadınlar 2 – 9 arasında değişiklik gösteren düşük sayılarına göre istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 10). 2 düşük oranı (%30,7), 4 düşük oranı (%19,8), 5 düşük oranı (%2), 6 düşük oranı (%2), 7 düşük (%3), 9 düşük oranı (%1) olarak bulundu ve çalışmada 3 düşük yapan kadınların oranı %40,6 ile en yüksek orana sahipti. Total Hasta grubunun ortalama düşük sayısı 3,17 ± 1,2 olarak tespit edildi.

Tablo 10. Hasta gruplarının düşük sayısına göre dağılımı.

Düşük Sayısı	Tekrar	Yüzde %	Kümülatif Yüzde
2.00	31	30.7	31.0
3.00	41	40.6	72.0
4.00	20	19.8	92.0
5.00	2	2.0	94.0
6.00	2	2.0	96.0
7.00	3	3.0	99.0
9.00	1	1.0	100.0
Total	100	100	100
Ortalama	Std. Sapma		
3.17	1.26		



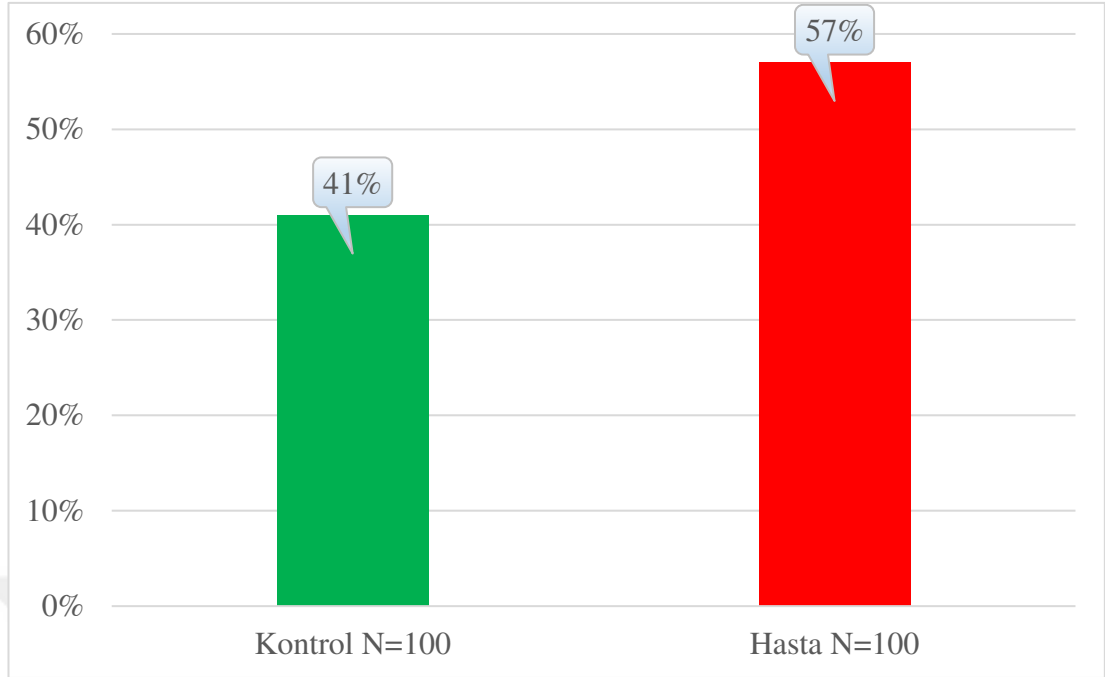
Şekil 2. Hasta düşük sayılarının yüzdelik dağılımı.

5.1. Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-G0104 Allel Sıklığı

Hasta ve kontrol gruplarında saptanan HLA-G0104 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyin 41' inde (%41,0) HLA-G0104 alleli, hasta grubundaki 100 hastanın 57' sinde (%57,0) HLA-G0104 saptandı. TKG ve kontrol gruplarının risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 11) ($p < 0,05$, $RR = 1,3$).

Tablo 11. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0104 allel sıklığı.

	HASTA N=100		KONTROL N=100		R R	(95% CI):	p-value
HLA-G0104	57	57 %	41	41%	1.390	(1.040,1.858)	0.0336



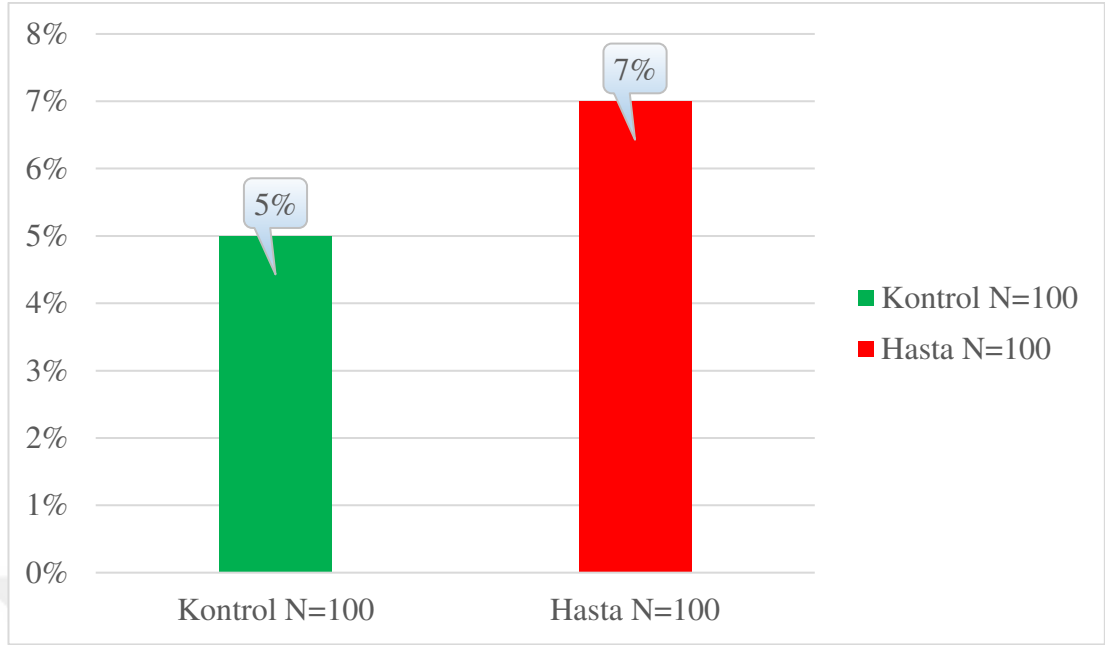
Şekil 3. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0104 allel sıklığı.

5.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-G0105N Allel Sıklığı

Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen HLA-G0105 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyin 5' inde (%5,0) HLA-G0105 alleli, hasta grubundaki 100 hastanın 7' sinde (%7,0) HLA-G0105 alleli saptandı. TGK ve kontrol gruplarının risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 12) ($p>0,05$, $RR=1,2$).

Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0105N allel sıklığı.

	HASTA N=100		KONTROL N=100		R R	(95% CI):	p-value
HLA-G0105	7	7%	5	5%	1.20	(0.793, 6.102)	0.536



Şekil 4. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0105N allel sıklığı.

5.3. Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-G0103 Allel Sıklığı

Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen HLA-G0103 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir (Tablo 13). Çalışmamızda kontrol grubunda ve hasta grubunda HLA-G0103 saptanmadı.

Tablo 13. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-G0103 allel sıklığı.

	HASTA N=100		KONTROL N=100		R R	(95% CI):	p-value
HLA-G0103	0	0%	0	0%	-	-	-

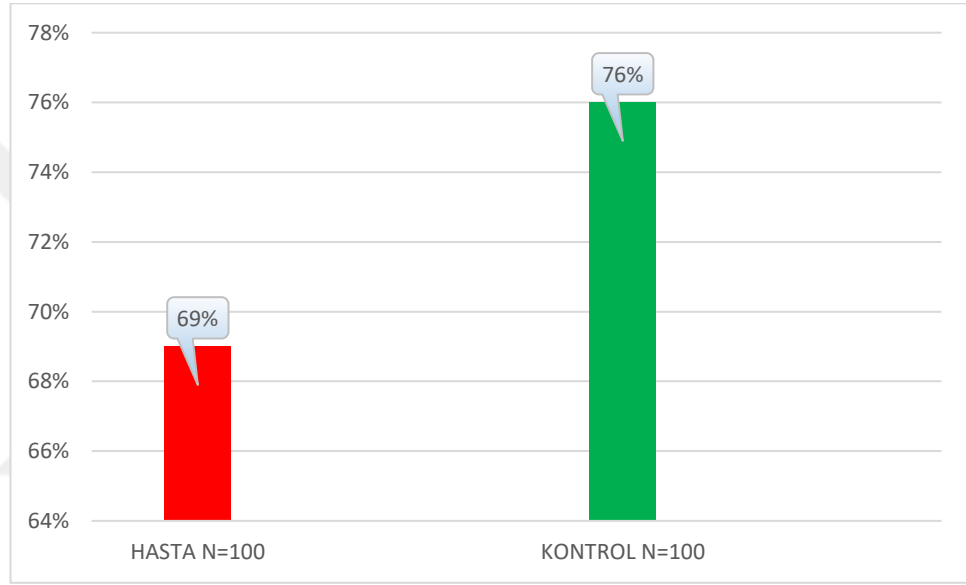
5.4. Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-E0101 Allel Sıklığı

Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen HLA-E0101 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyin 76' sında (%76,0) HLA-E0101 alleli, hasta grubundaki 100 hastanın 69' unda (%69,0) HLA-E0101 saptandı. TKG ve kontrol gruplarının risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$, $RR=0,09$) (Tablo 14).

Tablo 14. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E0101 allel sıklığı.

	HASTA N=100		KONTROL N=100		R R	(95% CI):	p-value
HLA-E0101	69	69%	76	76%	0.090	(0.765, 1.078)	0.336

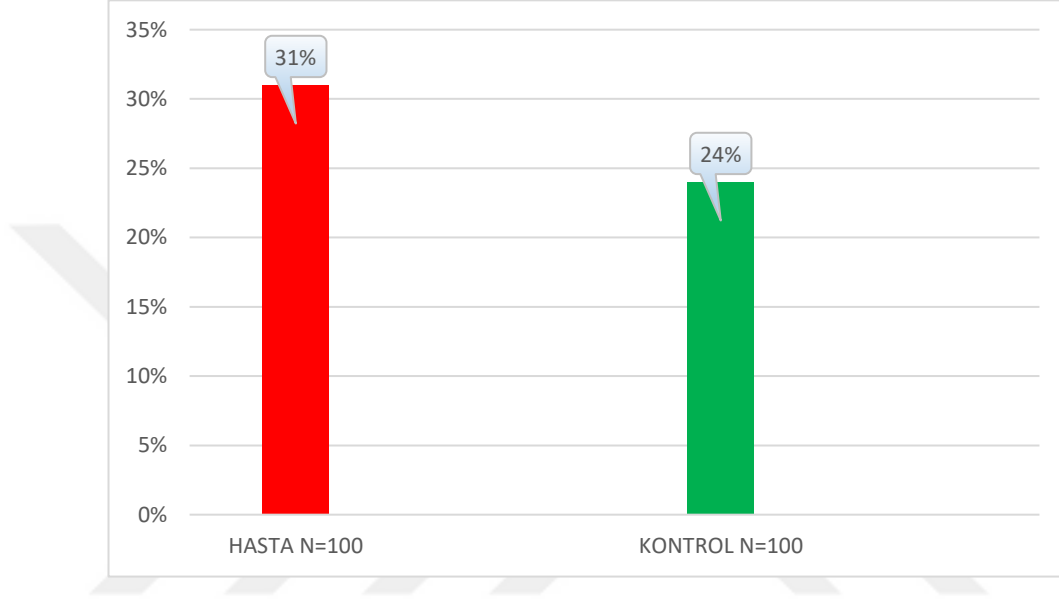


Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E0101 allel sıklığı.

Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında saptanan HLA-E0103 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir (Tablo 15). Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyin 24'ünde (%24,0) HLA-E0103 alleli, hasta grubunda ise 31 hastada (%31,0) HLA-E0103 saptandı. TGK ve kontrol gruplarının risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $RR=1,3$).

Tablo 15. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E0103 allel sıklığı.

	HASTA N=100		KONTROL N=100		R R	(95% CI):	P-value
HLA-E0103	31	31%	24	24%	1.29	(0.849, 2.141)	0.36



Şekil 6. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E0103 allel sıklığı.

5.5. Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-g Genotipi Sıklığı

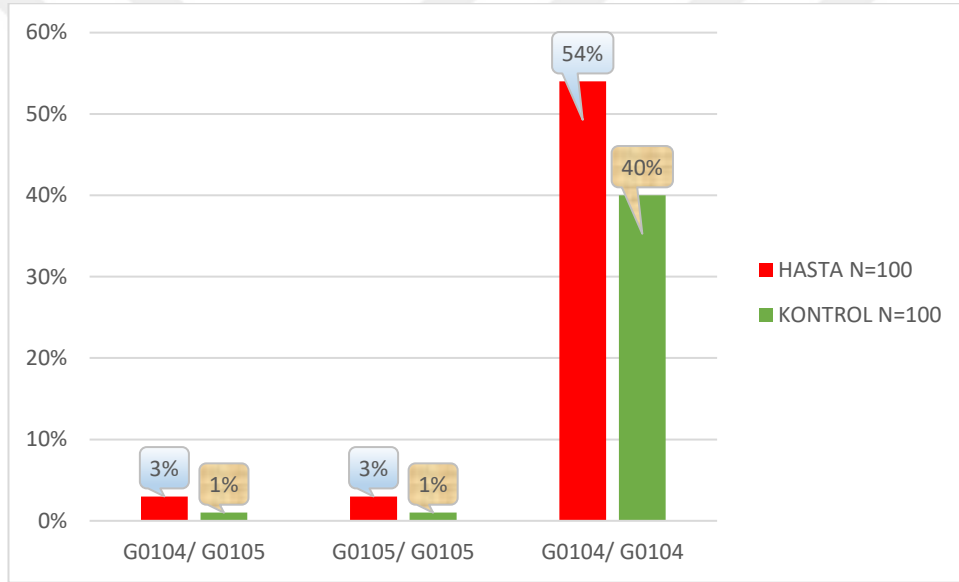
Çalışmamızda HLA-g genotipi açısından hasta grubundaki 100 kişiden 54'ünde (%54,0) G0104/G0104 genotipi, kontrol grubunda ise 40 (%40,0) sağlıklı bireyde G0104/G0104 genotipi saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p < 0,05$, $RR=1$).

Kontrol grubunda 1 bireyde (%1,0), hasta grubunda ise 3 bireyde (%3) G0104/G0105 genotipi saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$, $RR=1$).

Kontrol grubunda 1 (%1) kişi, hasta grubunda ise 3 (%3) kişide G0105/G0105 vardı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$, $RR=1$) (Tablo 16).

Tablo 16. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-g Genotipi sıklığı.

	HASTA N=100		KONTROL N=100		R R	(95% CI):	p-value
G0104/ G0105	3	3%	1	1%	1	(0.211, 4.934)	1.0000
G0105/ G0105	3	3%	1	1%	1	(0.211, 4.934)	1.0000
G0104/ G0104	54	54%	40	40%	1.333	(1.00, 1.82)	0.0652



Şekil 7. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-g Genotipi sıklığı.

5.6. Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-E Genotipi Sıklığı

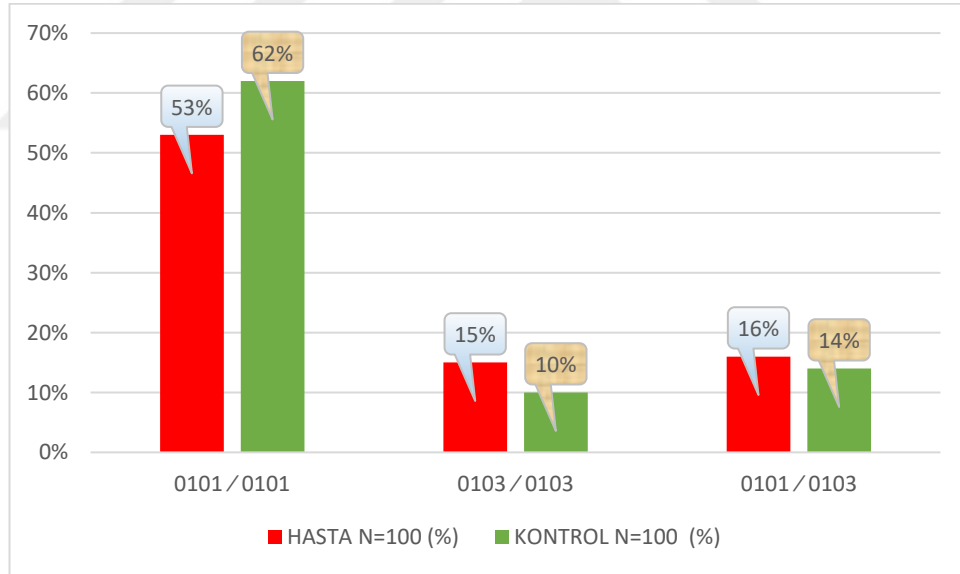
Çalışmamızda hasta grubunda 100 kişiden 53' ünde (%51,0) 0101/ 0101 genotip, kontrol grubunda ise 62 sağlıklı 100' ünde (%62,0) 0101 / 0101 genotip bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$, $RR = 0,855$).

Kontrol grubunda 14 kişinin (%14) ve hasta grubunda 16 kişinin (%16) 0101/ 0103 genotipine sahip olduğu belirlendi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu ($p > 0,05$, $RR = 0,853$). Kontrol grubunda 10 (%10) kişi, hasta grubunda 15

(%15) kişi 0103/0103 idi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, $RR=1,5$) (Tablo 17).

Tablo 17. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E Genotipi sıklığı.

Genotipi	HASTA N=100		KONTROL N=100		R R	(95% CI):	P-value
	N	(%)	N	(%)			
0101 / 0101	53	53%	62	62%	0.855	(0.672, 1.087)	0.2524
0103 / 0103	15	15%	10	10%	1.5	(0.70, 3.52)	0.32
0101 / 0103	16	16%	14	14%	1.01	(0.570, 2.32)	0.853



Şekil 8. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-E Genotipi sıklığı.

6. TARTIŞMA

Tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK), önemli ölçüde araştırılmış, ancak bu hastalığın nedenleri ve tedavisi henüz tam olarak çözülemediğinden stresli ve önemli bir klinik sorundur. TGK' nın etiyojisini açıklamaya yönelik kapsamlı araştırmalara rağmen, TGK' ların yaklaşık %50-60' ı idiyopatik olarak kalmaktadır. Tanımlanmayan bu durum TGK' nın birçok gen ve çevresel etkileşimi içeren çok faktörlü bir durum olmasından kaynaklanmaktadır (27).

Düşüğün olası bir nedeni, annenin bağışıklık sisteminin, özellikle gebeliğin erken evrelerinde, yarı allojenik fetüse (annenin antijenlerinin yarısını ve babanın antijenlerinin yarısını ifade eden) nasıl tepki verdiği ile ilgilidir. Anne adaylarının hamilelik sırasında genetik olarak farklı fetal dokuları tolere etmelerini sağlamak için birçok mekanizma geliştirdiği bilinmektedir (27). Bu mekanizmalardan en önemlisi, embriyonik kökenli dokular, annenin bağışıklık hücreleri (örneğin NK hücreleri) ve hamilelik boyunca bağışıklık yanıtında yer alan sitokinler (örneğin interlekin) tarafından sağlanan HLAs tipinin kısıtlanmasıdır (27,84,97-99).

HLA-G ve HLA-E, doğal öldürücü hücrelerle ilişkili bağışıklık yanıtta rol oynayan bir HLA sınıf I atijenleridir. İlk olarak uterusu doğal öldürücü hücreler üzerindeki inhibitör reseptörler için bir ligand olarak tanımlanmış ve maternal-fetal toleransa katkıda bulunduğu düşünülmüştür. HLA-G' nin uterus doğal öldürücü hücreler üzerindeki KIRDL4 reseptörüne bağlanması, sitokinlerin salgılanmasını, implantasyona yardımcı olan anjiyogenik faktörleri ve plasental anjiyogenez ve gelişimi düzenler (8). Antianjiyogenik etkiler, proanjiyogenik faktörleri dengelemek için trofoblast tarafından salgılanan HLA-G' ye bağlanmıştır. Tekrarlayan gebelik kaybı ve preeklampsi gibi gebelik bozuklukları ile HLA-G' nin düşük ekspresyonunun varlığı, HLA-G' nin maternal ve fetal toleransta önemli bir molekül olduğunu göstermiştir. Embriyonun başarılı implantasyonu ve hamileliğin korunmasında önemli bir role sahip olan HLA-G ve HLA-E seviyesini belirleyen genetik değişikliklerin araştırılmasına yol açmıştır (8,27,62,81,97,100).

Bu çalışmada açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpların hasta ve kontrol gruplarında HLA-G ve HLA-E gen polimorfizmleri ile ilişkisinin olup olmadığı

araştırılmıştır. Bu çalışma 18-43 yaş aralığındaki Tekrarlayan gebelik kayıpları olan 100 hasta ve 100 sağlıklı birey ile yapılmıştır.

HLA-G ve HLA-E gen polimorfizmleri ile TGK arasındaki ilişkiyi inceleyen yayınlarda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Bazı çalışmalar HLA-G/E gen polimorfizmlerin TGK riskini artırdığını öne sürerken, diğer çalışmalar bu polimorfizmlerin TGK için risk oluşturmadığını bildirmektedir (Tablo 18). Meta-analizlerin çelişkili sonuçları nedeniyle, HLA-G/E polimorfizmleri ile TGK arasındaki ilişki belirsizliğini korumaktadır.

Tablo 18. Literatürde TGK ve HLA çalışmaların sonuçları.

Çalışma	Çalışma türü	Teknik	Hasta sayısı	Kontrol sayısı	Sonuç
Hindistan Abbas ve ark. (2004)(76)	Hasta- Kontrol	PCR-SSOP	120	120	TGK ile G*0110103 arasında anlamlı bir ilişki bulundu.
Almanya Pfeiffer ve ark. (2001)(81)	Hasta- Kontrol	Ekzon 2 ve 3'ün DNA dizilimi	78	113	TGK ile G * 010103 ve G * 0105N arasında anlamlı bir ilişki bulundu.
İrak Reema ve ark (2016)(93)	Hasta- Kontrol	PCR-RFLP exons 2 and 3	100	100	TGK ile G * 0104 arasında anlamlı bir ilişki bulundu.
Filistin A. Sharif ve ark (2013)(7)	Hasta- Kontrol	PCR-RFLP exons 2 and 3 için	40	40	TGK ile HLA-G ilişkili bulunmadı
USA Aldrich ve ark (2001) (93)	Hasta- Kontrol	PCR- RFLP exons 2 and 3 için	113	107	TGK ile *0104 vey G*0105N arasında anlamlı bir ilişki bulundu
Çin Yan ve ark. (2011) 2006(17)	Hasta- Kontrol	(PCR-SSCP)	69	147	TGK ile HLA-G ilişkili bulunmadı
Japonya Yamashita ve ark (1999) (76)	Hasta- Kontrol	PCR-SSCP exons 2, 3, 4, DNA için	20	54	TGK ile HLA-G ilişkili bulunmadı
Danca Steffensen ve ark (2008) (94)	Hasta- Kontrol	PCR-SSOP)	80	150	TGK ile HLA-E ilişkili bulunmadı
India Tripathi ve ark (2006) (95)		PCR-RFLP exons 2 and 3 için	200	200	TGK ile ilişkili HLA-E*0101 ilişkili bulundu
Mısır Mosaad ve ark (2011)(91)	Hasta- Kontrol	PCR-RFLP exons 2 and 3 için	108	120	TGK ile ilişkili HLA-E*0101 ilişkili bulundu
Iran Fotoohi ve ark (2016)(96)	Hasta- Kontrol	PCR-ARMS of exons 2 and 3	200	200	TGK ile HLA-E ilişkili bulunmadı

Abbas ve arkadaşlarının, Hindistan' da 2004' de 2 ve daha fazla abortusu olan 120 TGK'li hasta ve 120 kontrol grubundan oluşan bir popülasyonda yaptıkları çalışmada, G*0110103 polimorfizm frekansının hasta grubunda daha yüksek olduğu ve TGK riskini 1-2 kat artırdığını göstermişlerdir (78). Almanya' da Pfeiffer ve arkadaşlarının 2001' de yaptığı 2 ve daha fazla abortus olan 78 hasta ve 113 kontrol

grubu arasındaki çalışmada Kadınlarda G * 010103 ve G * 0105N polimorfizm frekansının daha yüksek olduğu ve TKG için risk faktörü olduğunu ileri sürmüşlerdir (84). Irak' ta Reema ve arkadaşlarının 2016' de yaptığı 2 ve daha fazla abortus olan 100 hasta ve 100 kontrol grubu arasındaki çalışmada Kadınlarda G * 0104 TKG için risk faktörü olduğunu bildirilmiştir (96). Aldrich ve arkadaşlarının ABD' de 2016' de yaptığı 2 ve daha fazla abortus olan 100 hasta ve 100 kontrol grubu arasındaki çalışmada Kadınlarda *0104 veya G*0105N TKG için risk faktörü olduğunu saptanmıştır (96). Sharif ve arkadaşlarının Filistin' de Yan ve arkadaşlarının Çin' de Yamashita ve arkadaşlarının Japonya' da yaptıkları çalışmalarda HLA G ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında ilişki istatistiksel anlamda bir fark saptanmadığı gözlenmiştir (8). Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyin 41' inde (%41,0) HLA-G0104 alleli, hasta grubundaki 100 hastanın 57' sinde (%57,0) HLA-G0104 alleli saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$, $RR=1,3$). Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyden 5' inde (%5,0) HLA-G0105 alleli, hasta grubunda ise 100 hastanın 7' sinde (%7,0) HLA-G0105 saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$, $RR=1,2$). Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen HLA-G0103 polimorfizmlerinin allel saptanmadı. Çalışmamızın sonuçları bu sonuçlarla karşılaştırıldığında, sonuçlarımızın hem Irak hem de ABD' de yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu, fakat diğer çalışmalardan farklı bulunmuştur.

Çalışmamızda HLA-E gen allel frekanslarına baktığımızda HLA- E*0101 için hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Çalışmamızın sonuçlarının Mosaad ve arkadaşlarının Mısır'da (94), Tripathi ve arkadaşlarının Hindistan' da yaptıkları çalışmalar ile uyumlu olduğu görüldü (96) .

Sunuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ve literatür bilgileri ışığında HLA-G0104 ve HLA -E*0101 allel polimorfizmleri ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında anlamlı bir ilişkili olduğunu ve bu polimorfizmlerin TKG riskini arttırabileceğini ama bunun doğrulanması için değişik ırklara ait daha geniş hasta ve kontrol guruplarında çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

7. SONUÇ

1. Hasta grubunun yaş ortalaması $7,2 \pm 3,1$, kontrol grubunun yaş ortalaması ise $8,0 \pm 2,9$ idi. Hasta ile kontrol grupları arasında yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

2. Çalışmamızda hasta grubundaki kadınlar 2 – 9 arasında değişiklik gösteren düşük sayılara göre istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 11). 2 düşük oranı (%30,7), 4 düşük oranı (%19,8), 5 düşük oranı (%2), 6 düşük oranı (%2), 7 düşük (%3), 9 düşük oranı (%1) olarak bulundu ve çalışmada 3 düşük yapan kadınların oranı %40,6 ile en yüksek orana sahipti. Total Hasta grubunun ortalama düşük sayısı $3,17 \pm 1,2$ olarak tespit edildi. Düşük sıklığı istatistiksel olarak değerlendirildi.

3. Hasta ve kontrol gruplarında saptanan HLA-G0104 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyin 41' inde (%41,0) HLA-G0104 alleli, hasta grubundaki 100 hastanın 57' sinde (%57,0) HLA-G0104 saptandı. TKG ve kontrol gruplarının risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$, $RR=1,3$).

4. Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen HLA-G0105 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyin 5' inde (%5,0) HLA-G0105 alleli, hasta grubundaki 100 hastanın 7' sinde (%7,0) HLA-G0105 alleli saptandı. TKG ve kontrol gruplarının risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$, $RR=1,2$).

5. Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen HLA-G0103 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubunda ve hasta grubunda saptanmadı.

6. Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen HLA-E0101 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyin 76' sında (%76,0) HLA-E0101 alleli, hasta grubundaki 100 hastanın 69' unda (%69,0) HLA-E0101 saptandı. TKG ve kontrol gruplarının risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$, $RR=0,09$).

7. Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında saptanan HLA-E0103 polimorfizmlerinin allel frekansları tabloda gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyin 24' ünde (%24,0) HLA-E0103 alleli, hasta grubunda ise 31 hastada (%31,0) HLA-E0103 saptandı. TGK ve kontrol gruplarının risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $RR=1,3$).

8. Çalışmamızda hla-g genotipi açısından hasta grubundaki 100 kişiden 54' ünde (%54,0) G0104/G0104 genotipi, kontrol grubunda ise 40 (%40,0) sağlıklı bireyde G0104/G0104 genotipi saptandı. Grup. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p<0,05$, $RR=1$).

9. Kontrol grubunda 1 bireyde (%1,0), hasta grubunda ise 3 bireyde (%3) G0104/G0105 genotipi saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$, $RR=1$).

10. Kontrol grubunda 1 (%1) kişi, hasta grubunda ise 3 (%3) kişide G0105/G0105 vardı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, $RR=1$).

11. Çalışmamızda hasta grubunda 100 kişiden 53' ünde (%51,0) 0101/ 0101 genotip, kontrol grubunda ise 62 sağlıklı 100' ünde (%62,0) 0101 / 0101 genotip bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$, $RR=0,855$).

12. Kontrol grubunda 14 kişinin (%14) ve hasta grubunda 16 kişinin (%16) 0101 / 0103 genotipine sahip olduğu belirlendi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu ($p>0,05$, $RR=0,853$).

13. Kontrol grubunda 10 (%10) kişi, hasta grubunda 15 (%15) kişi 0103 / 0103 idi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, $RR=1,5$).

Sunuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ve literatür bilgileri ışığında HLA-G0104 ve HLA E*0101 allel polimorfizmleri ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında anlamlı bir ilişkili olduğunu ve bu polimorfizmlerin TGK riskini arttırabileceğini ama bunun doğrulanması için değişik ırklara ait daha geniş hasta ve kontrol gruplarında çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Pınar ATAUL. HLA-G genindeki 3'utr polimorfizminin infertil kadınlarda incelenmesi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, Ankara (Danışman: Yrd. Doç.Dr. Türker DUMAN).
2. Nicholson LB. The immune system. *Essays in Biochemistry*. 2016;60(3):275–301.
3. Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Leszczynska-Goarzelak B, Oleszczuk J. The expressions of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol*. 2002;48(6):381–6.
4. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update*. 8(5):463–81.
5. Sipak O, Rył A, Grzywacz A, Laszczyńska M, Zimny M, Karakiewicz B, et al. The relationship between the HLA-G polymorphism and sHLA-G levels in parental pairs with high-risk pregnancy. *IJER* 2019;16(9):1546.
6. Shankarkumar U, Shankarkumar A, Chedda Z, Ghosh K. Role of 14-bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene in recurrent spontaneous abortion patients. *J Hum Reprod Sci*. 2011;4(3):143–6.
7. Matter T, Sharif F. HLA-G and HLA-E Gene polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion women in Gaza strip-Palestine. *IJRCOG*. 2013; 2:277–83.
8. Hviid TVF. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update*. 12(3):209–32.
9. Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure II: immunogenetic and interacting factors. *Hum Reprod Update*. 7(2):135–60.
10. Dimitriadis E, Menkhorst E, Saito S, Kutteh WH, Brosens JJ. Recurrent pregnancy loss. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):98.

11. ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open*. 2018;2018(2):hoy004.
12. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;98(5):1103–11.
13. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2–3):281–94.
14. Loke YW, King A. Immunological aspects of human implantation. *J Reprod Fertil Suppl*. 2000;55:83–90.
15. Acar N, Ustunel I, Demir R. Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. *Acta Histochem*. 2011;113(2):82–91.
16. Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB. [Immunological mechanisms involved in pregnancy]. *Ginecol Obstet Mex*. 2012;80(5):332–40.
17. Hong Y, Wang X, Lu P, Song Y, Lin Q. Killer immunoglobulin-like receptor repertoire on uterine natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;140(2):218–23.
18. Arjmand F, Ghasemi N, Mirghanizadeh SA, Samadi M. The balance of the immune system between HLA-G and NK cells in unexplained recurrent spontaneous abortion and polymorphisms analysis. *Immunol Res*. 2016;64(3):785–90.
19. Valencia-Ortega J, Saucedo R, Peña-Cano MI, Hernández-Valencia M, Cruz-Durán JG. Immune tolerance at the maternal-placental interface in healthy pregnancy and pre-eclampsia. *Obs and Gynae*. 2020;46(7):1067–76.
20. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*. 2002;17 2:446–51.

21. Ozawa N, Ogawa K, Sasaki A, Mitsui M, Wada S, Sago H. Maternal age, history of miscarriage, and embryonic/fetal size are associated with cytogenetic results of spontaneous early miscarriages. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(4):749–57.
22. Ozawa N, Ogawa K, Sasaki A, Mitsui M, Wada S, Sago H. Maternal age, history of miscarriage, and embryonic/fetal size are associated with cytogenetic results of spontaneous early miscarriages. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(4):749–57.
23. Zhang T, Sun Y, Chen Z, Li T. Traditional and molecular chromosomal abnormality analysis of products of conception in spontaneous and recurrent miscarriage. *BJOG.* 2018;125(4):414–20.
24. Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure II: immunogenetic and interacting factors. *Hum Reprod Update.* 2001;7(2):135–60.
25. Sarafana S, Coelho R, Neves A, Costa Trindade J. [Gestational immunology]. *Acta Med Port.* 20(4):355–8.
26. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Engl J Med.* 2000;343(1):37–49.
27. Castelo-Branco C, Soveral I. The immune system and aging: a review. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30(1):16–22.
28. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(1):21–9.
29. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem.* 2016;60(3):275–301.
30. Getz GS. Bridging the innate and adaptive immune systems. *J Lipid Res.* 2005;46(4):619–22.
31. Choy MC, Visvanathan K, de Cruz P. An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2017;23(1):2–13.
32. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1014–22.

33. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34–50.
34. Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(1):15–28.
35. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med.* 2012;18(5):673–83.
36. Choy MC, Visvanathan K, de Cruz P. An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2017;23(1):2–13.
37. Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ, et al. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol.* 2010;85(1):25–32.
38. Arias-Sosa LA, Acosta ID, Lucena-Quevedo E, Moreno-Ortiz H, Esteban-Pérez C, Forero-Castro M. Genetic and epigenetic variations associated with idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(3):355–66.
39. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol.* 2009;2(2):76–83.
40. Papas RS, Kuttah WH. A new algorithm for the evaluation of recurrent pregnancy loss redefining unexplained miscarriage: review of current guidelines. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2020;32(5).
41. Mahdi BM. Human leukocyte antigen (Hla). BoD–Books on Demand; 2019.
42. Shankarkumar U. The human leukocyte antigen (HLA) system. *Int J Hum Genet.* 2004;4(2):91–103.
43. Greenbaum J, Sidney J, Chung J, Brander C, Peters B, Sette A. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics.* 2011;63(6):325–35.
44. Powis SH, Vaughan RW. MHC protocols. Vol. 210. SSBM. 2003.

45. Yakut T. HLA doku uygunluk kompleksi, genetik lokalizasyonları ve fonksiyonları. *Güncel Pediatri*. 2004;2(1):53–7.
46. Norman PJ, Norberg SJ, Guethlein LA, Nemat-Gorgani N, Royce T, Wroblewski EE, et al. Sequences of 95 human MHC haplotypes reveal extreme coding variation in genes other than highly polymorphic HLA class I and II. *Genome Res*. 2017;27(5):813–23.
47. Mellet J, Tshabalala M, Agbedare O, Meyer P, Gray CM, Pepper MS. Human leukocyte antigen (HLA) diversity and clinical applications in South Africa. *S Afr Med J*. 2019;109(8b):29–34.
48. Borghans JAM, Beltman JB, de Boer RJ. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics*. 2004;55(11):732–9.
49. Tiwari JL, Terasaki PI. HLA and disease associations. SSBM; 2012.
50. Birol A, Anadolu RY, Tutkak H, Gürgey E. HLAclass 1 and class 2 antigens in Turkish patients with pemphigus. *Int J Dermatol*. 2002;41.
51. Kostyu DD, Hannick LI, Traweck JL, Ghanayem M, Heilpern D, Dawson D v. HLA class I polymorphism: structure and function and still questions. *Hum Immunol*. 1997;57(1):1–18.
52. Hornick P, Rose ML. Transplantation immunology: methods and protocols. Vol. 333. SSBM. 2006.
53. Paul P, Rouas-Freiss N, Moreau P, Cabestre FA, Menier C, Khalil-Daher I, et al. HLA-G,-E,-F preworkshop: tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression. *Hum Immunol*. 2000;61(11):1177–95.
54. Hornick P, Rose ML. Transplantation immunology: methods and protocols. Vol. 333. SSBM; 2006.
55. Zachary AA, Leffell MS. Transplantation immunology: methods and protocols. Springer; 2013.

56. Simper G, Celik AA, Kunze-Schumacher H, Blasczyk R, Bade-Döding C. Physiology and pathology of drug hypersensitivity: Role of human leukocyte antigens. IntechOpen; 2017.
57. Mansour L, Alkhuriji A, Babay ZA, Alqadheeb S, Al-Khulaifi F, Al-Talhi R, et al. Association of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen class I ligand with recurrent abortion in Saudi Women. Genet Test Mol Biomarkers. 2020;24(2):78–84.
58. Kano T, Mori T, Furudono M, Ishikawa H, Watanabe H, Kikkawa E, et al. Human leukocyte antigen may predict outcome of primary recurrent spontaneous abortion treated with paternal lymphocyte alloimmunization therapy. Am J Reprod Immunol. 2007;58(4):383–7.
59. KANAI T, FUJII T, YAMASHITA T, HYODO H, MIKI A, UNNO N, et al. Polymorphism of human leukocyte antigen-E gene in the Japanese population with or without recurrent abortion. Am J Reprod Immunol. 2001;45(3):168–73.
60. Chen DP, Chang SW, Jaing TH, Wang WT, Hsu FP, Tseng CP. Single nucleotide polymorphisms within HLA region are associated with the outcomes of unrelated cord blood transplantation. Sci Rep. 2021;11(1):1–12.
61. Hviid TVF, Christiansen OB. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G—possible implications for human reproduction and autoimmune disease. Hum Immunol. 2005;66(6):688–99.
62. Martinez-Laso J, Gomez-Casado E, Arnaiz-Villena A. HLA-E and HLA-G typing. Methods Mol Biol. 2003;210:223–36.
63. Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Castro MJ, Morales P, Moscoso J, Varela P, et al. The evolution of the MHC-G gene does not support a functional role for the complete protein. Immunol Rev. 2001;183(1):65–75.
64. Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Vargas-Alarcón G, Varela P, Diaz-Campos N, Alvarez M, et al. Description of a new HLA-E (E* 01031) allele and its frequency in the Spanish population. Hum Immunol. 1997;54(1):69–73.

65. Fotoohi M, Ghasemi N, Mirghanizadeh SA, Vakili M, Samadi M. Association between HLA-E gene polymorphism and unexplained recurrent spontaneous abortion (RSA) in Iranian women. *Int J Reprod Biomed*. 2016;14(7):477–82.
66. Keskin F, Karatas A, Albayrak M, Bıyık I, Erkan M, Demirin H, et al. Maternal serum soluble HLA-G levels in missed abortions. *Medicina (B Aires)*. 2013;49(10):68.
67. Rebmann V, König L, Nardi F da S, Wagner B, Manvailer LFS, Horn PA. The potential of HLA-G-bearing extracellular vesicles as a future element in HLA-G immune biology. *Front Immunol*. 2016;7:173.
68. Hunt JS, Langat DK, McIntire RH, Morales PJ. The role of HLA-G in human pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4(1):1–8.
69. Krijgsman D, Roelands J, Hendrickx W, Bedognetti D, Kuppen PJK. HLA-G: a new immune checkpoint in cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4528.
70. Lynge Nilsson L, Djurisic S, Hviid TVF. Controlling the immunological crosstalk during conception and pregnancy: HLA-G in reproduction. *Front Immunol*. 2014;5:198.
71. Roussev RG, Coulam CB. HLA-G and its role in implantation. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24(7):288–95.
72. Morandi F, Pistoia V. Interactions between HLA-G and HLA-E in physiological and pathological conditions. *Front Immunol*. 2014;5:394.
73. Tripathi PK, Naik SR, Agrawal S. Role of HLA-G, HLA-E and KIR2DL4 in Pregnancy. *Int J Hum Genet*. 2007;7:219–33.
74. Flafil M. 9. Jassem RM, Shani WS, Loisel DA, Sharief M. Billstrand C, Ober C. HLA-G polymorphisms and soluble HLA-G protein levels in women with recurrent pregnancy loss from Basrah province in Iraq. *Hum Immunol*. 2012; 73: 811-817.

75. Slomov E, Loewenthal R, Goldberg I, Korostishevsky M, Brenner S, Gazit E. Pemphigus vulgaris in Jewish patients is associated with HLA-A region genes: mapping by microsatellite markers. *Hum Immunol.* 2003;64(8):771–9.
76. Abbas A, Tripathi P, Naik S, Agrawal S. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Immunogenet.* 2004;31(6):275–8.
77. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(3):369–95.
78. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2008;89(6):1603.
79. Trowsdale J, Betz AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol.* 2006;7(3):241–6.
80. Wang WJ, Hao CF, Yi-Lin, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol.* 2010;84(2):164–70.
81. Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, van der Ven H, van der Ven K. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(4):373–8.
82. Mallia J v, Das DK, Maitra A. Role of HLA in Human Pregnancy. *J Hum Genet.* 2012;12(1):33–6.
83. Tantengco OAG, Richardson L, Lee A, Kammala A, de Castro Silva M, Shahin H, et al. Histocompatibility Antigen, Class I, G (HLA-G)'s Role during Pregnancy and Parturition: A Systematic Review of the Literature. *Life.* 2021;11(10):1061.
84. Sadissou I, d'Almeida T, Cottrell G, Luty A, Krawice-Radanne I, Massougbojji A, et al. High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased risk of malaria in infancy. *Malar J.* 2014;13(1):1–8.

85. Mosaferi E, Majidi J, Mohammadian M, Babaloo Z, Monfaredan A, Baradaran B. HLA-G expression pattern: Reliable assessment for pregnancy outcome prediction. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(2):443.
86. Rizzo R, Vercammen M, van de Velde H, Horn PA, Rebmann V. The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(3):341–52.
87. Loisel DA, Billstrand C, Murray K, Patterson K, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. The maternal HLA-G 1597ΔC null mutation is associated with increased risk of pre-eclampsia and reduced HLA-G expression during pregnancy in African-American women. *MHR.* 2012;19(3):144–52.
88. Gregori S, Amodio G, Quattrone F, Panina-Bordignon P. HLA-G orchestrates the early interaction of human trophoblasts with the maternal niche. *Front Immunol.* 2015;6:128.
89. Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Alvarez M, Castro MJ, Varela P, Gomez-Casado E, et al. Primate Mhc-E and -G alleles. *Immunogenetics.* 1997;46(4):251–66.
90. Kanevskiy L, Erokhina S, Kobyzeva P, Streltsova M, Sapozhnikov A, Kovalenko E. Dimorphism of HLA-E and its Disease Association. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21).
91. Mosaad YM, Abdel-Dayem Y, El-Deek BS, El-Sherbini SM. Association between HLA-E *0101 homozygosity and recurrent miscarriage in Egyptian women. *Scand J Immunol.* 2011;74(2):205–9.
92. Stephen H. Powis Robert W. Vaughan. *MHC Protocols.* 2003. 1–327 p.
93. Aloubaidy R, Al-Azzawie H, Al-Kazzaz K. Genetic polymorphisms of HLA-G antigen in iraqi women with unexplained recurrent miscarriage. *IJAR.* 2016;4:2320–5407.
94. Steffensen R, Christiansen OB, Bennett EP, Jersild C. HLA-E polymorphism in patients with recurrent spontaneous abortion. *Tissue Antigens.* 1998;52(6):569–72.

95. Tripathi P, Naik S, Agrawal S. HLA-E and immunobiology of pregnancy. *Tissue Antigens*. 2006;67(3):207–13.
96. Fotoohi M, Ghasemi N, Mirghanizadeh SA, Vakili M, Samadi M. Association between HLA-E gene polymorphism and unexplained recurrent spontaneous abortion (RSA) in Iranian women. *Int J Reprod Biomed*. 2016;14(7):477.



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Vardan	Soyadı	ALNANEA
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Tel			
E-posta			

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Tezli Yüksek Lisans	Halep Üniversitesi	2013
Lisans	Halep Üniversitesi	2008
Lise	Mohamed Dip lisesi	2004

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	Okutman	Halep Üniversitesi	2009-2013
	Asistan	Şam Üniversitesi	2013-2015

10. EKLER

10.1. Orijinallik Raporu

Vardan Alnanea Doktora tezi

ORIJINALLIK RAPORU

% 17	%16	%6	%4
BENZERLIK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.dicle.edu.tr	%4
İnternet Kaynağı		
2	acikarsiv.ankara.edu.tr	%4
İnternet Kaynağı		
3	dspace.trakya.edu.tr:8080	%2
İnternet Kaynağı		
4	acikbilim.yok.gov.tr	%1
İnternet Kaynağı		
5	www.istanbulsaglik.gov.tr	%1
İnternet Kaynağı		
6	btd.odu.edu.tr	<%1
İnternet Kaynağı		
7	www.ijrcog.org	<%1
İnternet Kaynağı		
8	iugspace.iugaza.edu.ps	<%1
İnternet Kaynağı		
9	www.microbiologybook.org	<%1
İnternet Kaynağı		

10.2. Etik Kurul Onay Raporu

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DICLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR NONINTERVENTIONAL STUDIES					
87 KARAR					
Doç. Dr. Hilmi İSİ, Wardan ALNANEA isimli araştırmacılar tarafından planlanan "Diyarbakır bölgesindeki kadınlarda HLA-E ve HLA-G gen polimorfizmi ile açıklanamayan tekrarlayan spontan düşük (RSA) arasındaki ilişki" başlıklı araştırmaya <i>Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u</i> tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir.					
Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.					
DECISION					
The project titled as "Association between HLA-E and HLA-G gene polymorphism in unexplained recurrent spontaneous abortion (RSA) women in Diyarbakir region" planned by Hilmi İSİ, Wardan ALNANEA has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.					
Oturum No (Meeting number) :		Tarih (Date): 15.03.2019		Saat (Hour): 14:00-15:00	
KURUL BAŞKANI (CHIEF)		Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM			
KURUL ÜYELERİ / MEMBERS					
	ÜNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI	İMZA
1	Prof. Dr.	Hüseyin BÜYÜKBAYRAM	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Patoloji	
2	Prof. Dr.	Levent ERDİNÇ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya	
3	Prof. Dr.	Aziz KARABULUT	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Kardiyoloji	
4	Prof. Dr.	Cihan AKGÜL ÖZMEN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Radyoloji	İzmit
5	Prof. Dr.	İlhan KARAMAN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	
6	Doç. Dr.	İlker KELLİ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Farmakoloji	
7	Doç. Dr.	Zülfikar YILMAZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	İç Hastalıkları	
8	Doç. Dr.	M. Veysi BAHADIR	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	İzmit
9	Doç. Dr.	Ezeli AZARKAN	Dicle Üniversitesi Hukuk Fakültesi	Öğretim Üyesi	İzmit
10	Dr. Öğretim Üyesi	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyoistatistik	
11	Dr. Öğretim Üyesi	Diclehan ORAL	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji	İzmit

10.3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onay Formu

Sizi Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı tarafından yürütülen “Diyarbakır bölgesindeki kadınlarda HLA-E ve HLA-G gen polimorfizmi ile açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK) arasındaki ilişki” başlıklı araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz.

Sitogenetik analiz sonucu 46,XX karyotipindeki kadınlarda HLA-E ve HLA-G gen polimorfizmi ile açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK) etkisini saptayarak elde edilecek verilerin incelenmesi ve derlenmesi ile toplanacak bilgilerin bilimsel çalışmalara katkısı amacıyla sizlerin vereceği kan örnekleri bu araştırmaya büyük bir etki sağlayacaktır

Bağışlayacağınız kan örneğiyle, çalışmaların sonuçlarından herhangi bir ticari kazanç beklememeyi de taahhüt ediyorsunuz. Bu çalışmaya katılmak için herhangi bir ücret ödemeniz de gerekmemektedir.

Bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 10 ml (1 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Kol damarınızdan kan alınması sırasında iğne batmasına bağlı olarak biraz acı duyabilirsiniz. Az bir ihtimal de olsa, iğne batması sonrasında kanamanın uzaması, iğne batan yerde geçici bir morluk gelişmesi ya da çok daha nadir olarak enfeksiyon riski bulunmaktadır.

Prof. Dr. Mahmut BALKAN ve Sorumlu Araştırmacı doktora öğrencisi Vardana Hasan ALNAAEA tarafından Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında ortak olarak yürütülecek bu genetik araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam genetikçi ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına

inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim). Bu durumda genetik malzememle ilgili çalışma araştırmamın en yakın aşaması tamamlandığında sonlandırılacaktır.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz. Çalışmayı yanıtlamanız, araştırmaya katılım için onay verdiğiniz biçiminde yorumlanacaktır. Size verilen formlardaki soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayın. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır. Sizden alınacak kan örneği sadece çalışmada belirtilen amaç için kullanılacaktır. İlave bir inceleme yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu araştırmaya genetik/biyolojik incelemeler yapılmak üzere kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı ve kan örneği vermeyi kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-Soyadı: İmzası:

Vesayet altında bulunanlar için vasisinin:

Adı-Soyadı: İmzası:

Açıklamaları yapan/örneği alan araştırmacının:

Adı-Soyadı: İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-Soyadı: İmzası:

Tarih: / /

