

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

IVF TEDAVİSİ SONRASI İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN
OLGULARDA ENDOMETRİAL MFAP2, MFAP5 VE NLF2 GEN
EKSPRESYONLARININ FERTİL GRUPLA KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Esengül Türkyılmaz

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Haldun Güner

ANKARA -2009

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim ve uzmanlık tezimin hazırlanmasında değerli emekleri olan başta tez danışmanım PROF. DR. HALDUN GÜNER ve Anabilim Dalı Başkanı PROF.DR. ONUR KARABACAK olmak üzere tezimi destekleme ve hasta bulma aşamasında sonsuz desteklerini gördüğüm hocalarım PROF. DR. M. ERDEM , PROF. DR. A. ERDEM ve DOÇ. DR. AYDAN ASYALI BİRİ'ye ve tüm öğretim üyelerimize şükranlarımı sunarım. Beş yıl boyunca her türlü zorluğu birlikte aştığımız tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin oluşmasında büyük katkıları olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan YRD. DOÇ.DR. ECE KONAÇ'a ve uzman biyologlar EBRU ALMAYANLAR ve İLKE ÖNEN'e teşekkürlerimi sunarım.

En zor günlerimde bana destek olan moral kaynağım, yaşam gücüm biricik babama, anneme ve abime en derin sevgilerimi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Esengül Türkyılmaz

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	4
GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	27
BULGULAR.....	28
TARTIŞMA	40
SONUÇ.....	48
TÜRKÇE ÖZET	49
İNGİLİZCE ÖZET	50
KAYNAKLAR	51
ETİK KURUL KARARI	57

KISALTMALAR

MFAP2: Microfibril associated glycoprotein 2

MFAP5: Microfibril associated glycoprotein 5

NLF2: Nuclear localized factor 2

LH: Luteinizan hormon

IVF: İnvitrofertilizasyon

CSF-1: Colony-stimulating factor-1

LIF: Leukemia- inhibitory factor

IL-1: İnterlökın 1

CAM: Cell adhezion molecule

ICAM-1: İntercellular adhezion molecule-1

MAGP: Microfibril associated glycoprotein

Dnaz: Deoksiribonükleaz

Rnaz: Ribonükleaz

DEPC: Dietilpirokarbonat

cDNA: komplementer DNA

GAPDH: Gliseraldehit 3- fosfat- dehidrogenaz

ICSI: İnrastoplazmik sperm enjeksiyonu

mRNA: Messenger RNA

GİRİŞ

İmplantasyon, blastokistin maternal endometrial yüzeye bağlanarak plasentayı oluşturması ve bu yolla büyüyen fetus ile maternal sirkülasyon arasında iletişim kurulması olarak tanımlanmıştır(1,2). İnsan endometriumu menstruel siklus boyunca çoğu zaman oluşan embriyoların adezyonuna engel olan hormonal olarak regüle edilen bir dokudur. Bu hormon bağımlı dokuda endometrial reseptivite, blastokist adezyonuna izin veren ovaryen steroid bağımlı fonksiyonel bir ortam gerektirir. Embriyonun implantasyonunun mekanizmasını ve insan üreme fizyolojisinin bilimsel temellerini anlamak için endometrial reseptivite sürecini anlamak gerekir(3). İmplantasyonda bir çok molekülün ve dolayısıyla çok sayıda genin rol oynadığı bilinmektedir.

Endometrium her menstruel siklusta blastokisti “ implantasyon penceresi” denilen sınırlı bir süre için almaya uygundur. Bu süre ovulasyondan sonra 6-8 günde başlar ve yaklaşık 4 gün sürer. İnsanda implantasyonun birkaç farklı aşamadan geçerek oluştuğu; önce blastokistin bir kutuptan endometriuma yaklaştığı; apozisyon denilen bu aşamadan sonra zona pellucidanın dökülerek blastokistin epitelyal tabaka ile temasıyla “adezyon” gerçekleşir. Sonunda blastokist epitelyal tabakayı penetre eder ve stromaya doğru ilerleyerek “invazyonu” başlatır. İnsanda implantasyonun düşük oranda olduğu bilinmektedir. Embriyoların invitro ortamda fertilizasyonu ve transferi ile gerçekleşen yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) ise tedaviyi kısıtlayan en önemli faktör implantasyonun düşük oranda olmasıdır. YÜT’de düşük

implantasyon oranlarının embriyo gelişimindeki bozukluk ve/veya anormal uterin reseptiviteden kaynaklandığı düşünülmektedir.

İmplantasyonda pek çok genin ve bu genlerin ürünü olan faktörlerin rolü olduğu yapılan çeşitli çalışmalardan anlaşılmaktadır. İmplantasyonda rolleri henüz çalışmaya başlanan genlerden üçü MFAP5, MFAP2 ve NLF2 dir. MFAP2 ve MFAP5 elastinin yapısal komponenti olan mikrofibrilin yapısını oluşturur. MFAP5 embriyogenesis, gelişim ve normal homeostaziste vaskularizasyonla ilgili yolda sinyal aktivasyonunda rol alır. MFAP2 nin ise kalıtsal bağ doku hastalıklarının etyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Her iki genin de menstrüel siklusa LH pikinden sonraki 7. günde (reseptif dönem) fazla ifade olduğu bulunmuştur. “Nuclear localize factor 2” ise implantasyon penceresi boyunca endometriumun yeniden düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülen bir genidir. Endometrial stroma invazyonunun gerçekleşmesi için inflamasyon olayını gerçekleştirir. NLF2 de reseptif dönemde (LH+7) endometriumda daha fazla ifade olur. Bu genlerin reseptif dönemde ekspresyonlarının artması endometrial reseptivitede rol alabileceklerini göstermektedir.

Bu çalışmada invitro fertilizasyon (IVF) ile en az bir kaliteli embriyo transferi yapıp implantasyon başarısızlığı olduğu kabul edilen hastalarda reseptif dönemde alınan endometrial biopsilerdeki MFAP5, MFAP2, NLF2 ekspresyonunun fertil kadınlardaki reseptif dönemde alınan endometrial biopsilerdeki ekspresyonlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır. Embriyo kalitesini etkileyebilecek şiddetli erkek faktörü dışında bir nedenle IVF tedavisi alan ve 1 veya daha fazla embriyo transferini takiben implantasyon başarısızlığı olan hastalar çalışma grubunu oluşturmaktadır. Bu

hastalarda kaliteli embriyo transferi ile embriyoya ait implantasyonu etkileyebilecek faktörlerin ekarte edildiği kabul edilip, endometrium tarafında başarısız implantasyona yol açabileceği düşünülen MFAP2, MFAP5, NLF2 genlerinin ekspresyonları reseptif dönemde incelenmiştir.

Bu genlerin ve başarısız implantasyonda rol oynaması muhtemel daha bir çok genin doğal siklusta ve stimüle siklusta ekspresyonlarının araştırıldığı bazı çalışmalar literatürde görülmektedir. MFAP2, MFAP5 ve NLF2 genlerinin IVF sonrası başarısız implantasyon olan hastalarda sikluslarının reseptif dönemindeki ekspresyonlarının daha önce sağlıklı çocuk sahibi olan ve kötü obstetrik öyküsü olmayan kadınlarla karşılaştırıldığı bir çalışma bugüne kadar yapılmamıştır. Literatürde bu konuyla ilgili yapılmış olan bu ilk çalışmada , elde edilen sonuçların IVF sonrası implantasyon başarısızlığı olan infertil hastalarda bunun nedenini açıklama çabalarına yeni bir bakış açısı getirmesi ve üzerinde çok az çalışılmış bu alanda yeni gelişmeleri tetiklemesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER:

Yardımcı üreme tekniklerinde pek çok ilerleme kaydedilmesine rağmen implantasyon oranları hala düşük seviyededir (4). İmplantasyon başarısızlığı embriyo gelişimindeki bozukluk ve/veya anormal uterin reseptiviteden kaynaklanabilir.. Endometrium her menstrüel siklusta blastokisti “ implantasyon penceresi” denilen sınırlı bir süre için almaya uygundur. Bu süre ovulasyondan sonra 6-8 günde başlar ve yaklaşık 4 gün sürer (5).

Yapılan çalışmalar insanda implantasyonun birkaç farklı aşamadan geçerek oluştuğunu göstermiştir (6). Blastokist ilk olarak polarite gösterir ve bir kutuptan endometriuma yaklaşır. Appozisyon denilen bu aşamada embriyoyu çevreleyen zona pellucida dökülür. Blastokistin epitelyal endometrium tabakası ile temasa geçmesiyle “adezyon” gerçekleşir. Sonunda blastokist epitelyal tabakayı penetre eder ve stromaya doğru ilerleyerek “invazyonu” başlatır.

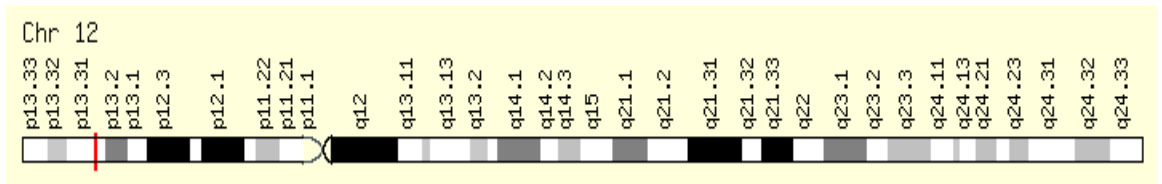
Tüm bu basamaklarda rol alan çok farklı moleküller bulunmaktadır. Endometriumda implantasyonla ilişkili olduğu bilinen en az 3 sitokin sentezlenmektedir. Colony-Stimulating Factor-1 (CSF-1), Leukemia- İnhibitory Factor (LIF) ve İnterlökin -1 (IL-1) dir (7). CSF -1 hem endometrium hem de preimplantasyon dönemindeki embriyoda exprese olur. CSF-1 üretiminin implantasyon penceresi sırasında azaldığı gösterilmiştir. (8). CSF-1 desidual makrofajların gelişim ve büyümesinde rol alır. CSF-1, IL1 ve LIF mutasyonu olan ratların infertil olduğu bulunmuştur (9). Leukaemia- İnhibitory Factor (LIF) mRNA

expresyonu glandüler epitelde stromaya göre 3 kat daha fazla bulunur ve proliferatif faza göre sekretuar fazda daha fazla ifade olur (10).

IL-1 gibi kemoatraktiv sitokinler invazyon süreci için önemlidir ve implantasyonun adezyon basamağında “ cell adhesion molecule (CAM) family” olarak adlandırılan ve İntegrin, Selektin, Cadherin ve İmmünglobulin olmak üzere 4 alt gruptan oluşan bir gen ailesi rol almaktadır. Bu moleküller glikoprotein yapısında olup hücreden hücreye adezyonun gerçekleşmesini sağlamaktadırlar (11). İntegrinler heterodimer yapıda olup α ve β subünitlerinden oluşur ve extraselüler kısımları fibronektin, laminin ve kollajen için reseptör görevi yapar (12). İntegrinler siklus bağımlı ekspresyon gösterir ve implantasyon döneminde en yüksek seviyeye ulaşır (13). Blastokist de benzer şekilde implantasyonla uyumlu olacak düzeylerde integrin ifade eder (14).

Selektinler de glikoprotein yapısında olup P- selektin, L- selektin ve E- selektin olmak üzere 3 formda bulunurlar. Embriyodan zona pellucida döküldükten sonra L- Selektin ifade eder (15). Selektinler “implantasyon penceresi” başlangıcında up regüle olurlar. Embriyonun ifade ettiği L-Selectin epitelyal yüzeydeki oligosakkaridleri bağlar, blastokist yavaşlar ve integrinlerle sıkı yapışmaya izin verir, bu da embriyonun adezyonunu sağlar. Cadherinler de glikoprotein yapısındadır ve E-, P-, ve N- Cadherin olmak üzere 3 formda bulunurlar. E- cadherin molekülünün preimplantasyon gelişimde önemli olduğu bulunmuştur (16). İmmünglobulin ailesi geniş olup en önemli üyesi “İntercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)” dir.

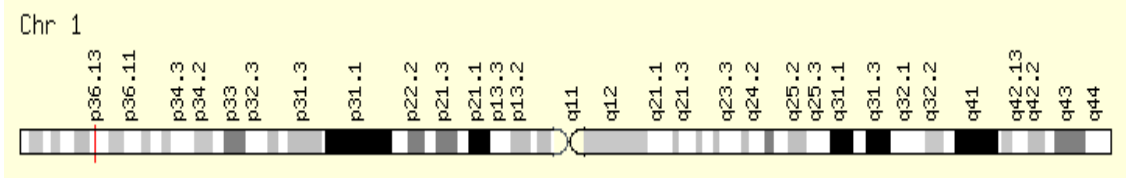
Tüm bu moleküllerin yanında insan blastokistinin endometriuma implantasyonunda prostaglandinler, tromboksanlar, büyüme faktörleri gibi çok çeşitli moleküller rol alır. Bu moleküllerden üçü “Microfibril-Assay Protein 5” (MAGP2) , “Microfibril-Assay Protein 2” (MFAP 2) ve “Nuclear Localized Factor 2” (NLF 2) dir. MFAP5 MAGP 2, MP25 olarak da bilinir. Bu gen 12. kromozomda (12p 12.3-13.1) lokalizedir. MAGP2 nin 10 exon bölgesinden oluştuğu gösterilmiştir. Serin ve treonin rezidülerinden zengin 25-kD microfibril assosiye glikoproteini kodlar. “Mikrofibril Assosiye Glikoprotein” elastik dokunun önemli bir komponenti olan mikrofibrilin yapısını oluşturur. Bu protein hem kollajen gibi extraselüler matriks komponentleri ile hem de integrin gibi hücreyle ilişkili proteinlerle etkileşerek hücre matriks ilişkilerini de düzenler ve hücre sinyal yolağına katılır (17,18). MAGP2 nin Notch reseptörü ile etkileşimi aracılığıyla direk hücre sinyal yolağına katıldığı yeni gösterilmiştir (19). Dahası henüz ortaya atılmıştır ki MFAP5 embriyogenez, gelişim ve normal homeostaziste vaskularizasyonla ilgili yolakta sinyal aktivasyonunda rol almaktadır. (20). MFAP 5 geninin normal menstruel siklusun reseptif döneminde (LH peak’inden sonraki 7. gün) daha fazla exprese olduğu bulunmuştur (20).



ŞEKİL 1 : MFAP5 geninin kromozomal lokalizasyonu

Microfibril associated glikoprotein 2 (MFAP2) ise MAGP, MAGP 1, FLJ5091 olarak da bilinir. MFAP2 elastinle ilişkili mikrofibrillerin major antijenidir ve kalıtsal bağ doku hastalıklarının etyolojisinde suçlanan bir gendir. Bu gen için 2

farklı isoformu kodlayan 4 transkript bulunur. MFAP2 1. kromozomda (1p36.1-p352) lokalizedir.

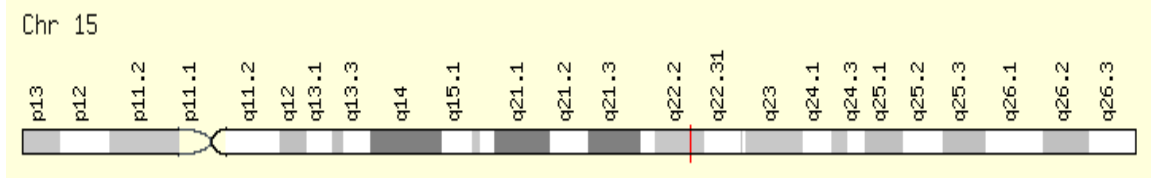


Şekil 2: MFAP2 geninin kromozomal lokalizasyonu

MAGPs akciğer, deri, vasküler yapılar gibi elastik dokuların önemli komponenti olan mikrofibrilin yapı taşıdır ancak elastik dokular dışında da bulunur. MAGP2 diğer MAGPs proteinlerine göre daha sınırlı sayıda dokuda bulunur. MAGP2 ekspresyonunun insan kanserlerinin bir kısmında ve insan kanser modellerinde artmış ekspresyonu MAGP2'nin tümör büyüme ve metastazı için gerekli olan vasküler yapının sağlanmasında önemli rol aldığını düşündürmektedir.

Nuclear localize factor 2 FAM148B olarak da bilinir. 15. kromozomda (15q22.2) lokalizedir. Endotelial hücrelerde nüclear factor hücre adezyon moleküllerinin hücre yüzeyinde eksprese olmasını ve kemokinlerin sekresyonunu belirgin şekilde artırır. Bu da lökositlerin endotel hücre yüzeyine sıkıca yapışmasını ve lökositlerin endoteli aşarak dokuya hareketini sağlar. Nuclear Localize Factor 2 (NLF 2) geni de LH+7 (implantasyon penceresi) döneminde endometriumda daha fazla eksprese olur.(20) Bu durum bu genin implantasyon penceresi boyunca endometrium yeniden biçimlenmesinde role sahip olduğunu düşündürmektedir. Endometrial stromaya invazyon inflamasyon ile güçlendirilmektedir. NLF 2' nin de

endotel hücre inflamasyonunda rol alan regulator genlerin bir üyesi olduğu düşünülmektedir (21). Endometriuma embriyonun implantasyonunda rol oynaması muhtemeldir.



Şekil 3: NLF2 geninin kromozomal lokalizasyonu

III. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Spin vortex (Biosan FV-2400, Rusya)
- Homojenizatör (T10 Basic Ultra- Turrax, IKA-Werke , Almanya)
- Masaüstü mini soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Spektrofotometre (Nano Drop ND-1000, ABD)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Mikropipetler (CLP Bt10, Bt 100, Bt 1000 Beta pipetor, ABD)
- Derin dondurucu (-86 °C) Sanyo MDF –U 53865, Japonya)
- Derin Dondurucu (-30 °C) (Sanyo MDF –U333, Japonya)
- Güvenlik Kabini (DanLaf VFRS 1206, Danimarka)
- Azot tankı (Air liquide GT 212, Fransa)
- Otomatik Isı Döngü Cihazı (Thermo Hybaid PCR-sprint, ABD)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan TDB-120 , Rusya)
- Real Time PCR cihazı (Roche LightCycler, Almanya)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Tris- HCl (Sigma, ABD)
- KCl (Sigma, ABD)
- MgCl₂ (Fermantas, Litvanya)
- CaCl₂ (Merck , Almanya)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat) (Sigma, ABD)
- Sodyum hidroksit peleti (Merck, Almanya)
- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye)
- Steril distile su (Eczacıbaşı, Türkiye)
- DEPC'li (Dietilpirokarbonat) su (Biological Industries, İsrail)
- Kloroform (Amresco, ABD)
- İzopropanol (Amresco, ABD)
- Saf etanol (Carlo Erba, İtalya)
- Dnaz I recombinant (Roche, Almanya)
- TaqMan Master mix (Roche, Almanya)
- NLF2, MFAP2, MFAP5 ve GADPH primerleri(Tıbmolbiol, Almanya)
- NLF2, MFAP2, MFAP5 ve GADPH probları (UPL, Almanya)

3.1.3. Kitler

- peqGOLD Trifast Dokudan RNA İzolasyon kiti (Peqlab, Erlangen, Almanya)
- Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikleri

Gazi Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan bu çalışmaya Gazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran kadınlar dahil edildi. Hasta grubunu daha önce en az 1 kez birden fazla kaliteli embriyo transferine rağmen başarısız IVF öyküsü olan hastalar oluşturmuştur. Embriyo kalitesini etkileyebilecek şiddetli erkek faktörü olan hastalar, implantasyonu direk olumsuz etkileyebilecek hidrosalpenks, endometrial polip ve myom gibi patolojisi olan hastalar çalışma dışında tutulmuştur. Anovulasyonu olan hastalar da postovulatuvar dönemde endometrial örnekleme yapılamayacağı için çalışma grubuna dahil edilmemiştir.

IVF sonrası başarısız implantasyon öyküsü olup çalışma grubuna dahil edilen hastaların hepsi primer infertil hastalardan seçildi. IVF sonrası biyokimyasal düşüğü olan hastalar çalışma grubuna alınırken klinik abortusu olan hastalar çalışma dışında tutuldu. Bu kriterlere sahip olan 28 hasta çalışma grubunu oluştururken fertilitelerini kanıtlamış 16 ovulatuvar hasta kontrol grubunu oluşturdu. Kontrol grubundaki sağlıklı

kadınların seçiminde; en az bir yaşayan çocuklarının olması ve obstetrik öykülerinde başarısız implantasyonu düşündürecek spontan abortus, blighted ovum ya da missed abortus olmaması şartı arandı.

Her iki grupta implantasyon ve başarılı gebelik üzerine etki edebilecekleri düşünülerek tiroid fonksiyon testleri ve tam trombofili paneline de bakıldı. (22) Tiroid fonksiyon testleri normalken yalnız tiroid antikor pozitifliğinin görüldüğü durumların infertilite üzerine etkileri net olmadığından tiroid antikorları rutin olarak her iki grupta da çalışılmadı (23).

Embriyo kalitesine karar verirken tüp bebek merkezimizde kullanılan bölünme hızı, blastomer büyüklüğü, fragmentasyon derecesi göz önüne alınan grade'leme sistemi kullanılmıştır. İyi kalitede bir embriyonun 2. günde (42-44. saat) 4-5 blastomere ve 3. günde (66-68 saat) en az 7 blastomere sahip olması gerekmektedir. Çok yavaş yada çok hızlı embriyo gelişiminin implantasyon oranlarını olumsuz yönde etkilediği konuyla ilgili çalışmalarla gösterilmiştir (24,25). Üçüncü gün optimal bölünme hızı olan embriyolar transfer edildiğinde daha yüksek implantasyon oranları ile karşılaşmıştır (26,27,28). Yapılan çalışmalar eşit bölünmeyen embriyoların transferiyle gebelik ve implantasyon oranlarının olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir (29,30). Bölünme hızı ve blastomer boyutuyla birlikte embryo fragmentasyonu da embryo seçim kriterleri arasında yer almaktadır (31). Bu bakımdan blastomer büyüklüğü embryo kalitesine karar verirken kullandığımız parametredir. Bu sisteme göre grade I embriyo 3. günde en az 7 blastomere sahip olan, blastomer büyüklükleri eşit olan, fragmentasyon oranı % 5'in

altında olan embriyolardır. Çalışma grubunu oluşturan 22 hastanın hepsinde daha önce iyi kalitede (GRADE I) en az bir embriyo transferi yapılmış ve gebelik elde edilememiştir.

Endometrial örnekleme için hasta takibi:

Yukarıdaki kriterlere uyan hastalara ve kontrol grubunu oluşturan hastalara çalışma anlatılmış ve gerekli izin alındıktan sonra siklusun foliküler fazında dominant folikül gelişimi ile birlikte ultrasonografik olarak seri takipler yapılmış ve ovulasyon günü tespit edilmiştir. Hormon bakılabilen hastalarda LH+7 ile LH+12 günler arası veya ultrasonografik olarak ovulasyon tespit edilen hastalarda ovulasyon sonrası 6. günden sonra endometrial biyopsi alınmıştır. Endometrial biyopsi günü önce serum progesteron bakılarak hormonal olarak sekresyon dönemine girdiği teyid edilmiştir. Endometrial biyopsinin gününün saptanmasında aşağıdaki bulgulara göre karar verilmiştir

- Her menstrüel siklusun kısa bir bölümünde endometrium implantasyon için uygundur ve bu döneme “implantasyon penceresi” denir. Endometriumun reseptivitesi ovulasyondan sonra yaklaşık 6-8 günde başlar ve yaklaşık 4 gün sürer (5).

- MFAP2, MFAP5 ve NLF2 genlerinin LH+7 döneminde daha fazla ifade olduğu bulunmuştur.

-Seçilen 20-26. gün arasındaki periyot hem implantasyon penceresini oluşturmakta hem de MFAP2, MFAP5 ve NLF2 genlerinin ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğu döneme denk gelmektedir.

- Örnekleme yapılacak hastalar litotomi pozisyonunda muayene masasına alınmış ve paraservikal lidokain ile lokal anestezi uygulaması sonrası steril tenekulum ile serviks tutulmuş ve Pipelle endometrial biopsi kanülü ile uterin kaviteye girilerek bir seferde endometrial örnekleme yapılmıştır. Yeterli doku elde edilemeyen hastalarda aynı prosedür bir kez daha uygulanarak örnekleme sonucu elde edilen doku iki eşit parçaya ayrılarak hem genetik inceleme hem de patolojik olarak Noyes klasifikasyonuna (32) göre endometrial gnleme yapmak amacıyla patolojik inceleme için gönderilmiştir.

3.2.2. Endometrium Dokusundan Total RNA Saflaştırılması

Hastalardan steril pipelle ile alınan endometrium örnekleri steril petri kutularında serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun (50 mg-100 mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. Dnaz ve Rnaz freee 1.5 ml’lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde donduruldu. Örnekler izole edilinceye kadar -80 C de saklandı.

Doku örneklerinden total RNA saflaştırma işlemi peqGOLD TriFast dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı.

Kontaminasyonu engellemek amacı ile işlemler güvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

- 1- 1.5 ml’lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden homojenizatör ile parçalandı.
- 2- Homojenat üzerine 1000 mikrolitre (μ l) Trifast eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 3- 200 μ l kloroform eklenerek, 15 sn boyunca karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu.
- 4- Örnekler 11.000 rpm’de 5 dk 4 °C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı olmak üzere üç faza ayrıldı.
- 5- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml’lik ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 μ l izopropanol eklenip karıştırıldı.
- 6- Örnekler 1.5 saat – 20 C’de bekletildi. 11.500 rpm’de 10 dk 4 °C’de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- 7- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 μ l Dnaz (mikrogram başına 5 U Dnaz), 300 μ l Dnaz Buffer I ve 400 μ l DEPC’li su eklenerek 30 dk 37 °C’de sıcaklığında bekletildi.
- 8- Örneklerin üzerine 300 μ l 25 mM EDTA eklendi ve 65 °C’de 10 dk bekletildi.
- 9- 12.000 rpm’de 10 dk 4 °C’de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan süpernatant atıldı.
- 10- 1000 μ l % 75’lik alkol (taze hazırlanır) eklenerek, 12.000 rpm’de 10 dk 4 °C’de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan süpernatant atıldı.

- 11- Peletin üzerine tekrar 1000 µl % 75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan süpernatant atıldı.
- 12- Pelet kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı. Çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

3.2.3. cDNA Sentez Tepkimesi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de [RNA için 260 nanometre'de (nm); protein için 280 nm] ölçülerek mikrolitre/ (µl/ug) miktarları ve saflıkları belirlendi. Primer olarak random hegzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları tablo-1' de verilmiştir.

Tablo 1. RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O –PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x(8 mM MgCl)	4 µl
dNTP	1 mM	2 µl
Random hegzamerler	60µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite (U)	0,5 µl
Ters Transkriptaz	10 U	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

RT-PCR karışımı ince çeperli 0,2' lik tüplere hazırlandıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

3.2.3.1. RT-PCR Programı

Otomatik ısı döngü cihazı aşağıda belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA'lerden cDNA elde edildi.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Sayısı			
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1 döngü
Ters transkripsiyon	50 °C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1
döngü			

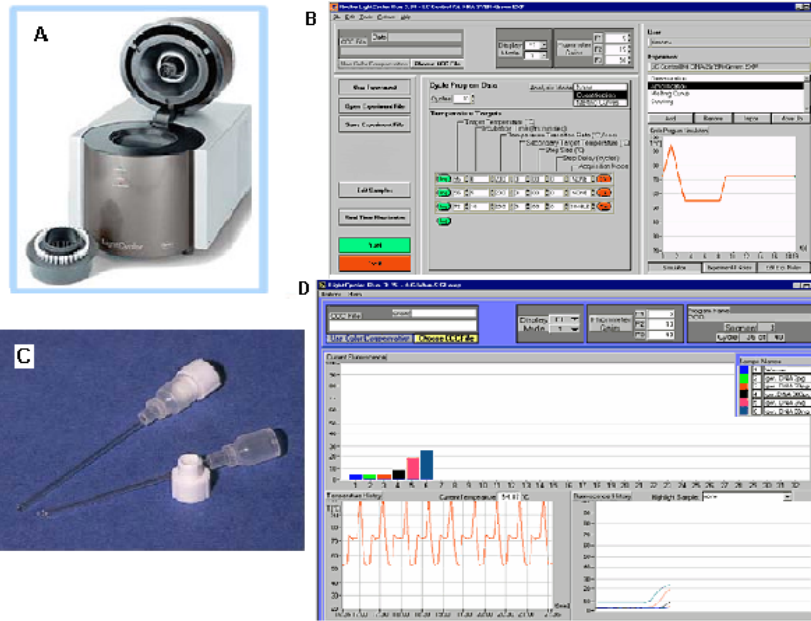
Reaksiyon sonrası cDNA örnekleri Real Time PCR'da kullanılıncaya kadar - 20 °C' de saklandı.

3.2.4. MFAP2, MFAP5, NLF2 Genlerinin İfade düzeylerinin Real-Time PCR

Yöntemi ile Değerlendirilmesi

MFAP2, MFAP5, NLF2 genlerinin ifadenin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler™ (LC) cihazı kullanıldı. (Şekil-1)

Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 4. Real Time PCR tepkimesi için kullanılan LC cihazına ait görüntüler.

A: Real Time PCR cihazı

B: PCR tepkimesi için gerekli sıcaklık, süre ve döngü sayısının bilgisayar ortamında girildiği program sayfası

C: PCR tepkimesi için hazırlanan karışımın konulduğu cam malzemeden üretilmiş kapiller

D: Tepkime sırasında örneklerin durumunu grafik ve logaritmik eğri olarak gösteren program sayfası

3.2.4.1. MFAP2 Geninin İfadeleme Düzeyinin Kantitatif Analizi

MFAP2 genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri şekil 5' de gösterildi.

MFAP2F 5' - TGCAAACAGTGTCTCAACGA-3'

MFAP2R 5' - CTTGTCCCGACAGAGGTCAG -3'

75 numaralı prob dizisi: 5'-CAGCCTCC-3'

```
5' - TGCAAACAGTGTCTCAACGA-3'

301  CAGTACCCGTGCACCCGCCTCTACTCCATACACAGGCCTTGCAAACAGTGTCTCAACGAG
      5' -CAGCCTCC-3'
361  GTCTGCTTCTACAGCCTCCGCCGTGTGTACGTCATTAACAAGGAGATCTGTGTTCTGTACA
421  GTGTGTGCCCATGAGGAGCTCCTCCGAGCTGACCTCTGTCTGGGACAAGTTCTCCAAATGT
      3' - GACTGGAGACAGCCCTGTTC-5'
```

Şekil 5. MFAP2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: ENST00000375535 giriş no'lu dizi). (Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır).

Şekil 5' de gösterilen primer ve probalar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. MFAP2 real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
MFAP2 PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
MFAP2 PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
MFAP2 TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
TaqMan mix (10x)	1x	1 µl
cDNA	-	1 µl

3.2.4.2 MFAP5 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

MFAP5 genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri şekil 6'de gösterildi.

MFAP5F 5'-GGAACACGAAGCTATGAAAGATG-3'

MFAP5R 5'-GGGTCTCTGCAAATCCACAT-3'

69 numaralı prob dizisi: 5'-CTTCCTCC-3'

5' -GGAACACGAAGCTATGAAAGATG-3'

361 AAGGAGATCTGCTCTCGTCTGTCTGTAAAGGAACACGAAGCTATGAAAGATGAGCTTTGC

5' -CTTCCT

421 CGTCAGATGGCTGGTCTGCCCTAGGAGACTCCGTCGCTCCAATTACTTCCGACTTCCT

CC-3'

481 CCTGTGAAATGTGGATTTCAGAGACCCAAATGGTCTGTGA

3' -TACACCTAAACGTCTCTGGG-5'

Şekil 6. MFAP5 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: ENST00000359478 giriş no'lu dizi). (Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır).

Şekil 6’de gösterilen primer ve probler kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. MFAP5 Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH₂O	-	6.2 µl
MgCl₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
MFAP5 PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
MFAP5 PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
MFAP5 TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
TaqMan mix (10x)	1x	1 µl
cDNA	-	1 µl

3.2.4.3 NLF2 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

NLF2 genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri şekil 7'de gösterildi.

NLF2F 5'-GCTTGCAACCAGATCCAGAG-3'

NLF2R 5'-GGCCGAGGAACAGAGTTTC-3'

75 numaralı prob dizisi: 5'-CAGCCTCC-3'

```

                                     5'-GCTTGCAACCA
1  AGTACTGAAGGTGGCGCCTCGGCAGCGGGCTAGAGGCCACTGGCACTGAGCTTGCAACCA
   GATCCAGAG-3'                                     5'-CAG
61 GATCCAGAGACACTGAAGAAGAGAGAAAGGCGCACCTCTCCCGCCACTCCTAGCCCAG
   CCTCC-3'
121 CCTCCAAGGATGCGGCTCCTCGAGAACTCTGTTCTCGGCCGAGGCAGCTCCGCGCCG
      3'-CTTTGAGACAAGGAGCCGG-5'
```

Şekil 7. NLF2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: ENST00000380392 giriş no'lu dizi).

Şekil 7' de gösterilen primer ve probolar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. NLF2 Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
NLF2 PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
NLF2 PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
NLF2 TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
TaqMan mix (10x)	1x	1 µl
cDNA	-	1 µl

3.2.4.4. GAPDH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

GAPDH genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri şekil 8'de gösterildi.

GAPDHF 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

GAPDHF 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

60 numaralı prob dizisi: 5'-TGGGGAAG-3'

5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

61 TCTTCITTTTGGCTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGTC

5'-TGGGGAAG-3'

121 GGAGTCAACGGATTGGTCGTATTGGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGT

3'-CCTAAACCAGCATAACCCG-5'

Şekil 8. GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: ENST00000229239 giriş no'lu dizi).

Şekil 8’de gösterilen primer ve probler kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler tablo 5’de gösterildi.

Tablo 5. GADPH Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH₂O	-	6.2 µl
MgCl₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
GADPH PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
GADPH PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
GADPH TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
TaqMan mix (10x)	1x	1 µl
cDNA	-	1 µl

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA’ler eklendi. Kapiller tüpler 3000-5000 rpm’de 10 sn santrifüj edildi. Tüpleryerleştirildikten sonra LC cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. MFAP2, MFAP5, NLF2 ve GADPH genleri için aynı PCR programı kullanıldı.

3.2.4.5.MFAP2, MFAP5, NLF2 ve GADPH LC Denev Programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)

Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00 dk
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)

Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60

İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10 sn	20 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0

Program 3. Soğutma

Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Reaksiyon sonucu herbir bireye ait MFAP2, MFAP5, NLF2 ve GADPH genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren crossing point (Cp) değerleri belirlendi. MFAP2, MFAP5 ve NLF2 ifade düzeyleri GADPH ifade düzeyine göre normalize edildi.

3.2.4.6 İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Hasta ve kontrol grubundaki yaş, tiroid fonksiyon testleri, gen mutasyonları dışındaki trombofili faktörleri, örnekleme günleri ve progesterone seviyeleri açısından karşılaştırmak için SPSS (SPSS 11,5) istatistik programı ile uygun parametrik ve nonparametrik testler uygulanmıştır. FV Leiden, MTHFR ve protrombin gen mutasyonları açısından fark olup olmadığını anlamak için ki-kare testi uygulanmıştır. Hasta ve kontrol grubu endometriyum dokularında izlenen MFAP2, MFAP5 ve NLF2 mRNA ifade düzeylerine ait veriler REST (2008 Beta V2.0.7) programı ile karşılaştırılmıştır. Relatif gen ifade düzeyi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

$$R = \frac{E_{\text{(hedef)}}^{\Delta Ct \text{ (kontrol- hasta)}}}{E_{\text{(referans)}}^{\Delta Ct \text{ (kontrol- hasta)}}$$

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade eder. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile hasta örneklerinin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR:

28 hastanın bir kısmında ultrasonografi monitorizasyonu ve progesteron değeri bakılarak örnekleme yapılmasına rağmen endometrium Noyes kriterlerine göre implantasyon penceresiyle uyumlu olmadığı saptandı. Bu 6 hastanın endometrial örnekleme materyalinden gen ifadelenmesine bakılmadı.

IVF yapıp implantasyon başarısızlığı olan hastaların tümü primer infertil hastalardı. Bu gruptaki çiftlerin ortalama infertilite süresi $8.8 \text{ yıl} \pm 5.1$ (minimum: 3 yıl maksimum: 20 yıl) olarak bulunmuştur. Çalışma grubunu oluşturan 22 hastanın hepsinde çeşitli yöntemlerle tubal açıklık değerlendirilmiş olup bu hastalardan sadece ikisinde tek tüp kapalı tespit edilmiştir. Hiçbir hastada radyolojik veya ultrasonografik olarak hidrosalpenks tespit edilmemiştir. Bir hastanın öyküsünde implantasyonu bozacağı için embriyo transferi öncesi histeroskopik septum rezeksiyonu yapılmıştır. 22 hastanın değerlendirmesinde eşlerinin önceki sperm analizi sonuçlarında ortalama sperm sayısı $31.7 \pm 27,3$ milyon (minimum: 1 milyon; maksimum 90 milyon) ve ortalama sperm motilitesi yüzde 43.8 ± 17.4 (minimum: % 24; maksimum % 43) olarak bulunmuştur (Tablo 6). Çalışma grubunda minimum invitro fertilizasyon deneme sayısı: 1; maksimum IVF deneme sayısı 5 olarak bulunmuştur

Tablo 6'dan da görüldüğü gibi infertil hasta grubunda ortalama yaş 32.3 ± 3.9 (minimum :25, maksimum: 41) olarak tespit edildi. Fertil hasta grubunda ise

ortalama yaş 31.6 ± 3.82 (minimum:24; maksimum:38) tespit edilmiş olup iki grup arasında yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.592$).

Bu çalışmada her iki grup örnekleme günü açısından da değerlendirildi. İnfertil grupta ortalama örnekleme günü 21.4 ± 0.6 iken kontrol grubunda 21.5 ± 0.81 olarak bulunmuştur ve iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.490$). İnfertil grupta Noyes kriterlerine göre histolojik günlendirme 22.8 ± 1.51 iken fertil grupta 22.6 ± 2.9 olarak bulunmuştur ve iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.641$).

Her iki grup örnekleme günü bakılan serum progesteron değerleri açısından da karşılaştırılmış ve infertil grupta ortalama 10.1 ± 4.5 iken fertil grupta 9.7 ± 3.4 olarak bulunmuş ve iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. ($p=0.918$)

Her iki grup tiroid fonksiyon testleri açısından de değerlendirilmiş ve infertil grupta ortalama TSH değeri 1.50 ± 0.81 iken fertil grupta 1.85 ± 0.63 olarak bulunmuş ve iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. ($p=0.089$) İnfertil grupta ortalama sT3 değeri 2.8 ± 0.35 iken fertil grupta 2.6 ± 0.5 olarak bulunmuş ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. İnfertil grupta ortalama sT4 değeri 1.1 ± 0.12 iken fertil grupta 1.05 ± 0.28 olarak bulunmuş ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.506$) (Tablo 6).

Her iki gruptaki hastaların trombofili faktörleri karşılaştırıldığında; Antitrombin III değeri ve ATIII değeri yüzdesi açısından her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo 6). Protein C değeri fertil hasta grubunda 3 hastada normalden düşük bulunmuştur. İnfertil hasta grubunda

normalden düşük değer tespit edilmemiştir. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo 6). İnfertil grupta 1 hastanın, fertil grupta 5 hastanın protein S değeri normalden düşük bulunmuş; iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo 6).

İnfertil hasta grubundan 10 hastanın, fertil hasta grubundan 4 hastanın aktive protein C rezistansı (APCR) normalden yüksek bulundu (normal değer:< % 0.86) .

İnfertil hasta

grubunda ortalama APCR değeri 0.88 ± 0.17 iken fertil hasta grubunda 0.64 ± 0.21 olarak

bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir.

(P= 0.002)

Tablo 6. Hasta ve kontrollere ait klinikopatolojik özellikler

	çalışma n=22)	kontrol (n=16)	p değeri
Yaş (ortalama)	32.32 ± 3.98	31.63 ± 3.82	0.592
Örnekleme günü	21.36 ± 0.65	21.50 ± 0.81	0.490
Noyes kriterine göre histolojik ęünlendirme	22.79 ± 1.51	22.64 ± 2.92	0.641
Progesteron (ng/ml)	10.09 ± 4.52	9.70 ± 3.36	0.918
TSH (mIU/L)	1.50 ± 0.81	1.85 ± 0.63	0.089

Serbest T3 (pg/ml)	2.88 $\pm$ 0.35	2.64 $\pm$ 0.51	0.183
Serbest T4 (ng/dl)	1.06 $\pm$ 0.12	1.05 $\pm$ 0.28	0.506
ATIII (%)	95.94 $\pm$ 16.32	100.75 $\pm$ 10.01	0.450
Protein C (%)	88.18 $\pm$ 20.82	92.69 $\pm$ 30.99	0.773
Protein S (%)	84.65 $\pm$ 19.03	86.81 $\pm$ 31.01	0.829
APCR (%)	0.88 $\pm$ 0.17	0.64 $\pm$ 0.21	0.002
İnvitro fertilizasyon sayısı	1-5	-	
Sperm konsantrasyonu	31.66 $\pm$ 27.27	-	
Sperm motilitesi	43.85 $\pm$ 17.41	-	

APCR: Aktif protein C direnci

ATIII: Antitrombin 3

p değeri <0.05' den küçük olanlar koyu gösterilmiştir.

Trombofili nedeni olan genetik faktörlerden F V Leiden , protrombin ve metilen tetrahidrofolat gen mutasyonları karşılaştırılmıştır. Her üç faktör açısından iki gruptaki dağılımların istatistiksel olarak farklı bir dağılım göstermediği tespit edilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Trombofili panelinin hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması

Genotipler	Çalışma (n=22)	Kontrol (n=16)	<i>p</i> Değeri	OO (%95 GA)	<i>p</i> Değeri
Factor V Leiden			1.00		
R506Q/G1691A (rs6025)					
RR	17 (%77.3)	13 (%81.3)		1 ^a	
RQ	5 (%22.7)	3 (%18.7)		1.28 (0.26- 6.33)	1.00
QQ	0 (%0)	0 (%0)		-	-
MTHFR C677T (rs1801133)			0.053		
CC	10 (%45.5)	13 (%81.3)		1 ^a	
CT	8 (%36.4)	3 (%18.7)		3.47 (0.73- 16.53)	0.152
TT	4 (%18.1)	0 (%0)		0.43 (0.27- 0.69)	0.098
MTHFR A1298C (rs1801131)			0.596		

AA	17 (%77.3)	10 (%62.5)	1 ^a	
AC	3 (%13.6)	4 (%25)	0.44 (0.08-2.39)	0.410
CC	2 (%9.1)	2 (%12.5)	0.59 (0.07-4.85)	0.630
prothrombin			0.349	
G20210A				
(rs1799963)				
GG	21 (%95.5)	15 (%93.7)	1 ^a	
GA	0 (%0)	1 (%6.3)	0.42 (0.28-0.61)	0.432
AA	1 (%4.5)	0 (%0)	0.58 (0.44-0.77)	1.000

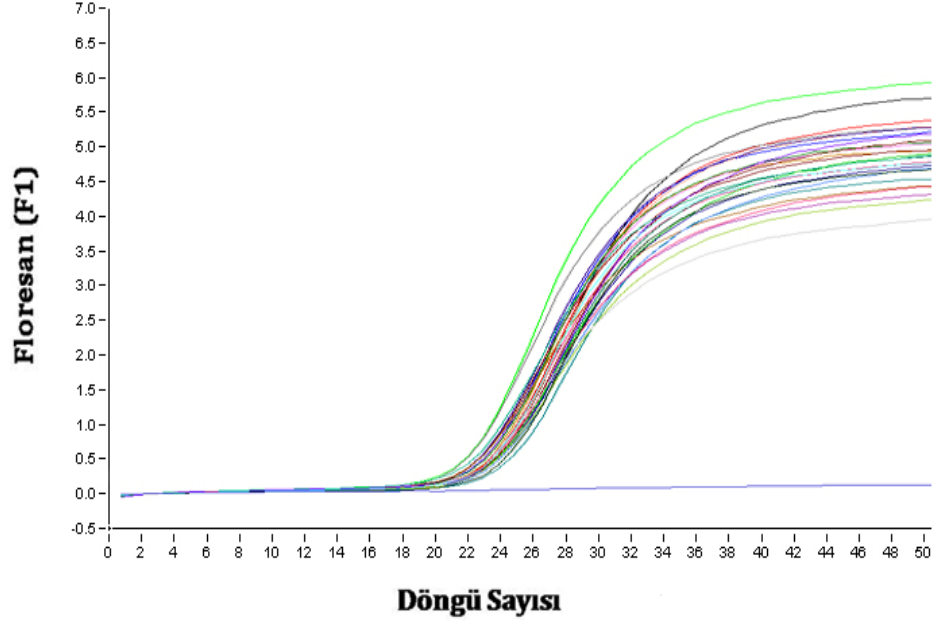
OO, Olasılıklar oranı; GA, Güven aralığı. *p* değeri <0.05' den küçük olanlar koyu gösterilmiştir.

^aReferans Genotip/Alel

MFAP2, MFAP5 ve NLF2 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi:

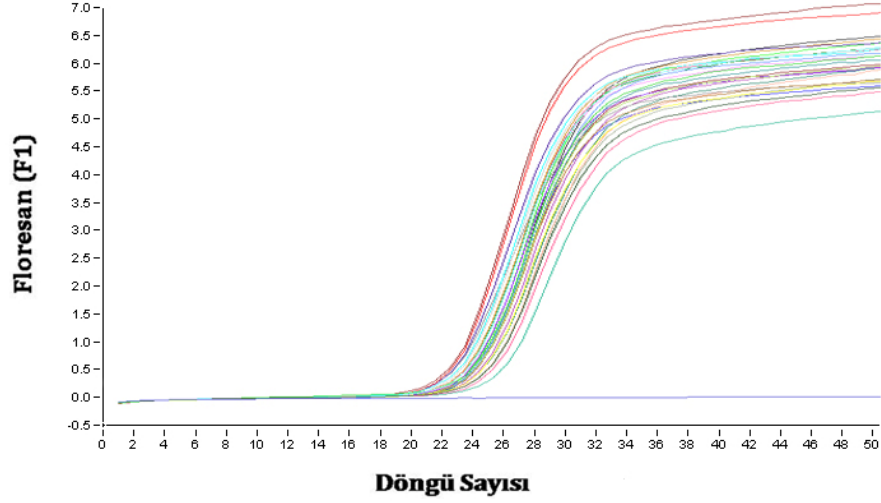
Light Cycler™ cihazı kullanıldı. Hasta ve kontrol grubundan alınan doku örneklerine ait her bir cDNA MFAP2, MFAP5, NLF2 ve GAPDH genine özgü primer ve UPL RNA probu kullanılarak çalışıldı. Tüm doku örneklerinde MFAP2, MFAP5 ve NLF2' nin mRNA düzeyinde ifade edildiği belirlendi.

MFAP2 geninin mRNA düzeyinde ifade düzeyini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 9’da gösterilmiştir.



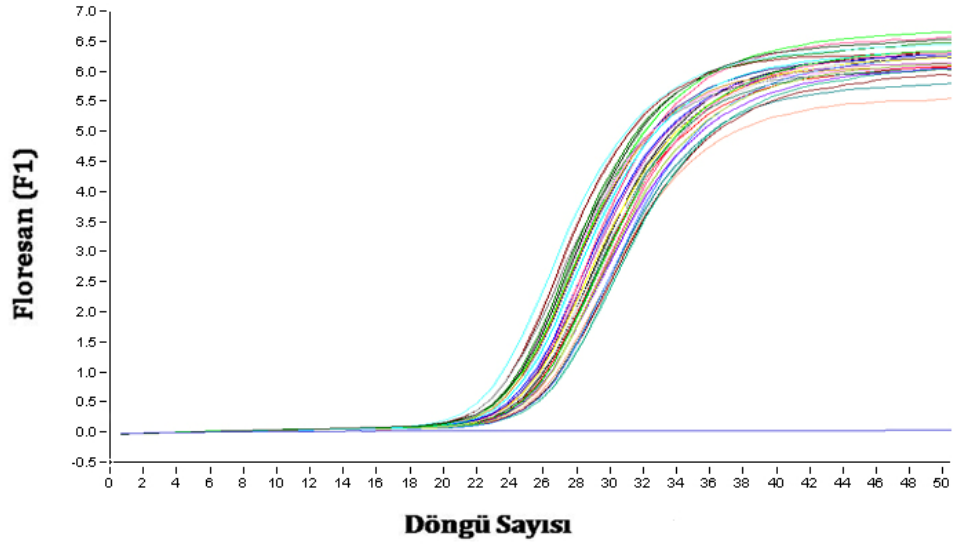
Şekil 9: MFAP2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri; MFAP2 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyal izlenmektedir.

MFAP5 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 10’de gösterilmiştir.



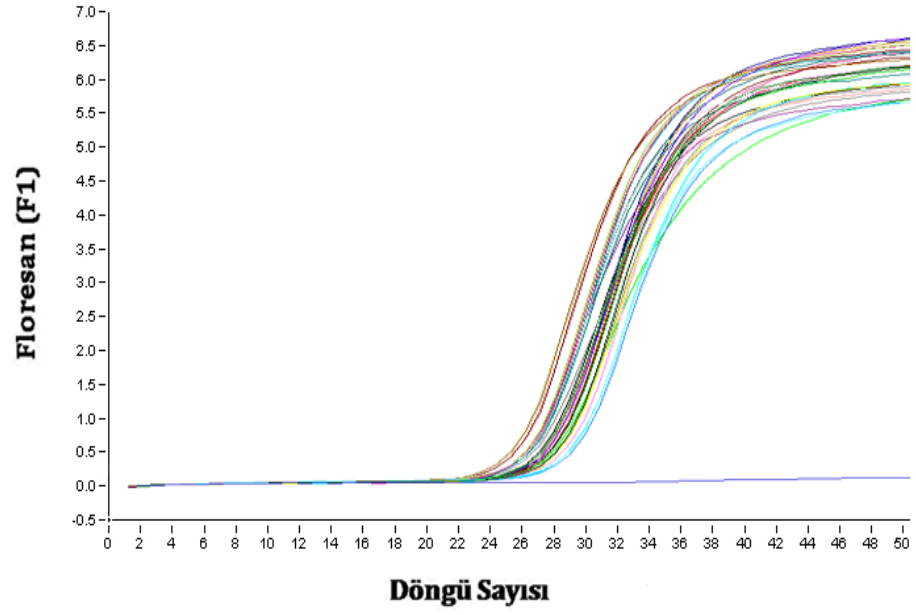
Şekil 10: MFAP5 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. MFAP5 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyal izlenmektedir.

NLF2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 11’ de gösterilmiştir.



Şekil 11: NLF2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. NLF2 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyal izlenmektedir.

MFAP2, MFAP5 ve NLF2 genlerini normalize etmek için seçilen GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 12’da gösterilmiştir.



Şekil 12: GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyal izlenmektedir.

Relatif gen ifade düzeyi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

$$R = \frac{E^{\{\text{hedef}\} \Delta C_t (\text{kontrol- hasta})}}{E^{\{\text{referans}\} \Delta C_t (\text{kontrol- hasta})}}$$

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade eder. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. Δ Ct değeri ise kontrol ile hasta örneklerinin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

4.1. MFAP2 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi

MFAP2 geninin mRNA düzeyinde ifadesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre 1.34 kat daha az olduğu görüldü (ifade oranı= 0.746). Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.362$).

4.2. MFAP5 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi

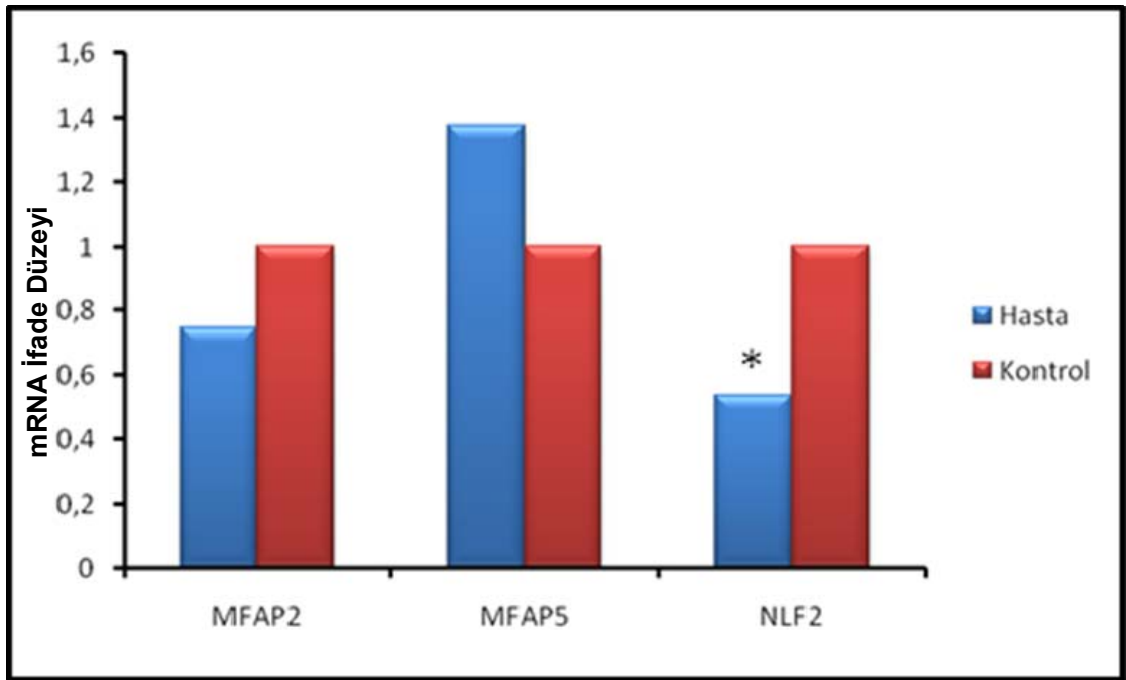
Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında hasta grubundaki MFAP5 mRNA ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 1.37 kat arttığı belirlendi (ifade oranı=1.375). Ancak hasta ve kontrol grupları arasında MFAP5 mRNA ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.138$).

4.3. NLF2 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi

Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında NLF2 geninin mRNA düzeyinde ifadesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre 1.84 kat azaldığı gözlemlendi (ifade

oranı=0.541). Hasta grubundaki mRNA ifadenme düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0.023$).

MFAP2, MFAP5 ve NLF2 mRNA ifade düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 13'da gösterilmiştir.



Şekil 13: MFAP2, MFAP5 ve NLF2 mRNA ifade düzeylerinin hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması. * Hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlam olduğunu göstermektedir.

TARTIŞMA

İmplantasyon blastokistin maternal endometrial yüzeye bağlanarak plasentayı oluşturması ve bunun sonucunda büyüyen fetus ile maternal sirkülasyon arasında iletişim kurulması olarak tanımlanmıştır (1,2). Bir çok molekülün rol oynadığı implantasyon olayında çok sayıda gen de rol almaktadır. İmplantasyonu ve insan üreme fizyolojisini anlamak için endometrial reseptivite sürecindeki moleküler olayları bilmek gereklidir. Endometrial reseptivite ve implantasyonda rol alan mekanizmaların tam olarak anlaşılması IVF hastalarında implantasyon ve gebelik oranlarını iyileştirmek için kullanılabilecektir.

Üzerinde henüz çalışılmaya başlanılan ve implantasyondaki rolleri tam bilinmeyen genlerden üçü MFAP2, MFAP5 ve NLF2'dir. MFAP2 ve MFAP5 elastinin yapısal komponenti olan mikrofibrilin yapısını oluşturur. Bu genlerin endometriumun reseptif döneminde daha fazla eksprese olduğunu gösteren tek bir çalışma literatürde görülmektedir (33). Bu çalışmada erkek faktörü nedeniyle ICSI'ye giden 31 hastanın LH peak'inden 2 gün sonra (LH+2; erken sekretuar faz) ve LH peak'inden 7 gün sonra (LH+7; mid sekretuar faz) alınan endometrial biopsilerdeki microfibril-associated protein 5 (MFAP5), Nuclear localized factor 2 (NLF) genlerinin ekspresyonları karşılaştırılmış ve her iki genin de implantasyon penceresi döneminde ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir.

Bazı araştırmacılar insan endometrium örneklemelerinden mikroarray teknolojisi kullanılarak preresptif fazdan reseptif faza geçiş sırasındaki gen ekspresyon değişimlerini incelemişlerdir. Ancak tüm bu çalışmalarda regülasyonları

değişen bu çeşitli genlerden çok azı ortaktır. Haouzi ve ark. nın çalışmasında daha önceki bazı araştırmacılar (Carson et al., 2002; Riesewijk et al., 2003; Mirkin et al., 2005; Talbi et al., 2006) gibi erken sekretuar faz ve geç sekretuar faz sırasında alınan örneklerden global gen ekspresyonu bakılmıştır. Aynı hastadan farklı zamanlarda gen ekspresyonu bakan bu çalışma hastalar arası değişkenliği de azaltmaktadır. Bu çalışmada up-regüle olan genler diğer dört çalışma ile karşılaştırılarak reseptivite döneminde ortak aday genler tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu dönemde up-regüle olan ortak beş genin; laminin $\beta 3$, microfibril-associated protein 5 (MFAP5), angiopoietin-like I (ANGPTL) , endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF), nuclear localized factor 2 (NLF2) olduğu gösterilmiştir. Haouzi ve ark. nın çalışmasında erkek faktörü nedeniyle ICSI'ye giden, dolayısıyla infertilite yapabilecek bir faktörün olmadığı kabul edilen kadınlarda LH peak'i tespit edilerek LH+2 ve LH+7. günlerde endometrial biopsiler alınmıştır. Alınan endometrium örneklerinin histolojik olarak konfirme edilmemesi bu çalışmanın dezavantajını oluşturmaktadır. Bizim çalışmamızda ise alınan tüm endometrium örneklerinin histolojik olarak incelenmiş olup reseptif dönem dışında tespit edilen örneklerden gen ekspresyonu bakılmaması çalışmamızın avantajını oluşturmaktadır.

Bizim çalışmamızda infertil hastalarda IVF tedavisi sonrası tekrarlayan implantasyon başarısızlığı tanımı içine giren bir hasta grubunda, daha önce ekspresyonu gösterilen MFAP5 ve NLF2 genleri dışında MFAP2 genini de içine alan bir gen spektrumunun implantasyon penceresindeki ekspresyonu fertil hasta popülasyonu ile karşılaştırılmış; IVF'de endometrial reseptivite ile bu genlerin ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Haouzi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada

erkek infertilitesi nedeniyle IVF tedavisine alınan hastalar ICSI öncesi bir doğal siklusta implantasyon penceresi öncesi ve sırasında biopsi alınarak gen ekspresyon paternleri değerlendirilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada tedaviye alınan kadınların infertilite ile ilgili herhangi bir faktör taşımadığı varsayılmıştır. Bizim çalışmamızda Haouzi ve ark. dan farklı olarak başarısız IVF öyküsü olan hastaların endometrial reseptivite döneminde alınan endometrial biopsilerinde MFAP2, MFAP5 ve NLF2 genlerinin ekspresyonları çalışılmış ve kontrol grubu olarak da sağlıklı, en az bir yaşayanı olan ve obstetrik öykülerinde başarısız implantasyonu düşündürecek spontan abortus, missed abortus yada blighted ovum öyküsü olmayan kadınlar ile karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamız infertil grupta spesifik bir alt gruptaki hastalardaki endometrial MFAP2, MFAP5 ve NLF2 genlerinin ekspresyonlarının fertil grupla karşılaştırılmasını; dolayısıyla bu infertil populasyonun endometriumundaki MFAP2, MFAP5 ve NLF2 ekspresyonu bozukluğunun bu hastalardaki implantasyon kusurunu açıklamaya yöneliktir.

İn vitro fertilizasyonda tedavinin etkinliğini kısıtlayan en önemli faktörlerden birisi implantasyonun düşük olması ve bazen de iyi kalitede embriyolar transfer edilmesine rağmen gebelik elde edilememesidir. İmplantasyon başarısızlığının embriyonik gelişimin bozukluğu ve/veya uterin reseptivitenin anormal olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle populasyon olarak tekrarlayan implantasyon başarısızlığı seçilmiştir.

Bizim çalışmamızda, NLF2 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesinin tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan grupta kontrol grubuna göre yaklaşık 1.84 kat daha az ifade edildiği ve mRNA ifadenmesindeki bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. NLF2 son yıllarda ortaya konan bir

nükleer faktördür; endotel hücre inflamasyonunu regüle eden gen ailesinin bir üyesidir ve implantasyon penceresindeki ekspresyonunun endometriumun yeniden şekillenmesinde rolü olduğunu düşündürmektedir. İmplantasyondaki önemli bir aşama olan endometrial stromaya invazyon inflamasyon ile kolaylaşmaktadır. NLF2'nin endometriumda embriyo implantasyonunda rol alan inflamasyonu regüle eden genlerin bir üyesi olduğu düşünülürse infertil grupta ekspresyonunun azalmasının implantasyon kusuruna yol açması beklenebilir.

Bizim çalışmamızda kullanılan diğer genlerden MFAP2 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha az ifade edilmesine rağmen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir. MFAP2 elastinle ilişkili mikrofibrillerin major antijenidir ve kalıtsal bağ doku hastalıklarının etyolojisinde suçlanan bir gendir. MAGPs ekspresyonu vasküler yapının sağlanmasında rol oynamaktadır. İmplantasyon başarısızlığında vasküler yapının bozulmasının rol oynayabileceği düşünülebilir.

Embriyogenesis, gelişim ve normal homeostaziste vaskülarizasyonla ilgili yolakta sinyal aktivasyonunda rol alan bir gen olarak bilinen MFAP5 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesinin bizim çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre arttığının belirlenmesine rağmen, hasta ve kontrol grupları arasında MFAP5 mRNA ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. MFAP5 geninin normal menstrüel siklus sırasında LH+7 (reseptif dönemde) fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak MFAP5 geninin infertil grupla kontrol grubu arasında endometrial reseptivite döneminde farklı ekspresyonunun gösterilmesinin bu hastalardaki olası implantasyon kusurunu açıklayabileceği düşünülebilir.

Bizim çalışmamızda MFAP2 ve MFAP5 genlerinin ekspresyonunun düzeyi implantasyon başarısızlığı grubunda daha az olmasına rağmen bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olmamasının nedeni hasta sayısının azlığı ile açıklanabilir. Biyopsi çalışmalarının genel bir dezavantajı hasta sayısının az oluşudur. Endometriumda gen ekspresyonlarının araştırıldığı çalışmaların çoğunda vaka sayıları genelde azdır. Diğer bir açıklama implantasyon penceresinde örneklenmelerine rağmen histolojik olarak aynı günde olmamaları bu sonuca neden olmuş olabilir. İmplantasyon penceresi LH peak'inden 6-10 gün sonra başlamakta ve yaklaşık 48 saat sürdüğü düşünülmektedir. Diğer nedenler de, implantasyon başarısızlığının tanımının subjektif olması, kullanılan istatistiksel yöntemin metodolojisi gibi faktörleri içine alır. Endometriumda implantasyonla ilgili gen ekspresyonlarının araştırıldığı her çalışmada aynı genlerin ekspresyonunun gösterilememesi de bu tip çalışmaların bir dezavantajını oluşturmaktadır. Sonuç olarak bu genlerin ekspresyon düzeylerinin azalması istatistiksel olarak farklı olmasa da, bu genlerin bu alt grup hastada implantasyon kusurundan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmanın grubunu oluşturan İVF sonrası tekrarlayan implantasyon başarısızlığı grubunda global gen çalışmaları ortak genlerin ortaya çıkarılması açısından faydalı olacaktır. Ancak literatürde bu grup hastada yeni bir çalışma dışında başka çalışma olmadığı saptanmıştır. Koler ve ark. en az 3 kez tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan 4 hastada endometrium örneklerinden 313 adet genin ekspresyonuna mikroyarray yöntemi ile bakarak up ve down regüle olan genleri tespit etmişlerdir. Bu çalışmada 21. günde progesteron değeri bakarak progesteronu 20 ng/ml üzerinde olan hastalardan endometrial örnekleme yapılmıştır. 288 genin down-

regüle olduğu görölürken, 25 tanesinin up-regüle olduğu bulunmuştur. Bu genlere bakıldığında bizim ekspresyonlarını incelediğimiz MFAP2, MFAP5 ve NLF2'yi içermeyiği görölmektedir. Cyclin E2, SFRP1 ve LEF1'in tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan grupta down regüle olduğu tespit edilirken, Slug ve DKK1'in ise up regüle olduğu bu çalışmada gösterilmiştir. Down-regüle olan Cyclin E2 ve up-regüle olan Slug gibi genlerin estrojen bağımlı genler olduğu görölmüştür. Bu da tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda endometrial estrojen cevaplılığında defekt olduğunu düşündürmektedir. Hasta sayısının az olması ve bir kısım gen ekspresyonlarına bakılamaması bu çalışmanın dezavantajlarını oluşturmaktadır (33).

Literatürde endometrial reseptivitede rol aldığı düşünölen çok sayıda başka genin de çalışıldığı görölmektedir. Bunlardan bir kısmı da imprint (damgalanmış) genlerdir. Bugün için ortaya konulan ve yaklaşık yüz kadar olduğu düşünölen damgalanmış (imprint) genlerin hemen tümü implantasyon, plasantasyon ve embriyofetal gelişim için gereklidir ve normal gelişim için uygun dozlarda ve uygun zamanlarda aktivasyonları önemlidir. Endometriumda, bu genlerin ekspresyonlarıyla ilgili olarak tüm literatürde yalnız iki çalışma bulunmaktadır. Ariel I ve ark. (34) 1997 yılında yaptıkları çalışmada damgalanmış H19 ve IGF-2 genlerinin endometriumdaki ekspresyonlarını ve bu ekspresyonların menstrüel siklusla birlikte değişimini incelemişlerdir. Proliferatif fazda endometriumdaki stromal hücrelerde orta derecede H19 ekspresyonu olduğu bulunmuştur; buna karşın fetal endometriumdaki H19 ekspresyonundan biraz daha azdır. Ekspresyonu ovulasyonla birlikte hemen düşmekte ve erken sekretuar fazda oldukça düşük seyretmektedir.

H19 ekspresyonu daha sonra giderek artmakta ve siklusun 21. gününde oldukça yüksek seviyelere ulaştıktan sonra hafif artışla siklusun sonunda en yüksek değerine ulaşmaktadır. Aynı çalışmada, IGF-2 ekspresyonunun da endometriumda izlendiği ve menstrüel siklusun dönemleriyle değiştiği gösterilmiştir. (34) Proliferatif faz ve erken sekretuar dönemde çok düşük seviyelerde bulunan IGF-2 ekspresyonu geç sekretuar fazda yüksek seviyelere ulaşmaktadır. H19 ve IGF-2 implantasyon, plasentasyon ve embriyofetal gelişim için gereklidir ve normal gelişim için uygun dozlarda ve uygun zamanlarda aktivasyonları önemlidir. Postnatal hayatta ekspresyonları dokularda giderek azalan bu iki genin endometriumda tüm yaşam boyu ekspresyonlarının devam etmesi ve menstrüel siklusun fazlarıyla birlikte değişkenlik göstermesi (34) bu genlerin implantasyonun embryo-fetal kısmında olduğu kadar endometrium kısmında da etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Kliniğimizde yapılan ve yayın aşamasında olan bir çalışmada maternal eksprese olan H19'un açıklanamayan infertil grupta kontrol grubuna göre ekspresyonunun belirgin olarak daha düşük ve paternal eksprese olan IGF2'nin açıklanamayan infertil grupta kontrol grubuna göre ekspresyonunun belirgin olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu iki genin ekspresyonlarının infertil grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olması bu hastaların infertilitelerinin zemininde yatan olası genetik temeli düşündürmektedir.

Ayrıca literatüre bakıldığında çeşitli çalışmalarda doğal siklus sırasında endometrial reseptivite sürecini anlamak için genomik analiz yapıldığını görmekteyiz (Carson ve ark., 2002). Bununla birlikte hormonal stimulus altındaki endometrium doğal siklustakinden farklı bir gen ekspresyon paterni gösterebilir. Ovaryen stimülasyon gen ekspresyon paternini önemli ölçüde değiştirebilmektedir (35).

Gonadotropin tedavisiyle kontrollü ovaryen stimulus yapılan siklularda endometriumda eksprese olan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunda bozulma olduğu henüz gösterilmiştir (36).

Sonuç olarak; MFAP2, MFAP5 ve NLF2 genlerinin ekspresyonlarının MFAP2 ve MFAP5 anlamlı düzeyde olmasa da infertil ve fertil hasta grubunda farklı olduğunun gösterilmesi bu hastaların implantasyon başarısızlığının altında yatan genetik bir temeli düşündürmekte bu alandaki çalışmalardan elde edilecek sonuçların klinik kullanıma uygulanmasıyla fertilite oranlarını iyileştireceği ümit edilmektedir.

SONUÇ

Biz bu çalışmada NLF2'nin IVF tedavisi sonrası implantasyon başarısızlığı olan infertil grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değerde düşük, MFAP2 ve MFAP5 genlerinin ise infertil grupla kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık göstermediğini tespit ettik.

İmplantasyon için önemli olduğunu düşündüğümüz NLF2'nin implantasyon başarısızlığı olan grupta kontrol grubuna göre anlamlı değerde düşük olması bu hastaların implantasyon kusurunu açıklayacak genetik temeli düşündürmektedir.

ÖZET

İmplantasyon embriyo ile endometrium arasındaki kompleks ve sofistike ilişkinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu ilişkiyi etkileyen hücresel mekanizmalar çok çeşitlidir. Bir çok molekülün rol oynadığı implantasyon olayını çok sayıda gen kontrol etmektedir. NLF2, MFAP2, MFAP5 ise üzerinde henüz çalışılmaya başlanan ve implantasyondaki rolleri araştırılan genlerdir. Bu çalışmada, IVF yapıp implantasyon başarısızlığı olan hastalardan siklusun geç sekretuar döneminde alınan endometrial biopsilerdeki bu genlerin ekspresyonları ile sağlıklı en az bir yaşıyanı olan ve kötü obstetrik öyküsü olmayan hastaların endometriumlarındaki ekspresyonlarını karşılaştırmayı amaçladık. Bu genlerin ekspresyonlarının IVF’te implantasyon başarısızlığı olan hastalarla sağlıklı fertil gruplardaki ekspresyonlarının karşılaştırılmasına yönelik bir çalışma bugüne kadar yapılmamıştır.

NLF2 endometrial stromaya invazyonun inflamasyon aşamasında rol oynadığı düşünülen bir gendir. NLF2 ekspresyonunun infertil grupta fertil gruba göre anlamlı değerde düşük olmasının bu hastalardaki bozulmuş implantasyon mekanizmasını açıklayacağı düşünülebilir.

MFAP5 ve daha önce endometriumda hiç çalışılmamış olan MFAP2’nin ekspresyonlarının infertil grupta sağlıklı kontrol grubuna göre ekspresyonunun anlamlı derecede düşük olması bu hastalarda implantasyonun invazyon aşaması için gerekli olan inflamasyon mekanizmasındaki defekti düşündürmektedir.

SUMMARY

Implantation emerges as a result of the complicated and sophisticated interaction between the human embryo and the uterine endometrium. Diverse cellular mechanisms interfere with this interaction. The implantation event in which many molecules play role is governed by different genes. NLF2, MFAP2 and MFAP5 genes are the genes that are recently being investigated upon. Starting from this point, this study aims to compare the gene expressions of endometrial biopsies sampled during late secretory phase from patients who had undergone an IVF cycle with unsuccessful implantation, and the endometrial expressions of patients who had at least one healthy living child and had no evidence of poor obstetric history. To date, no study has reported comparison between the expression of such genes in the aforementioned study groups (ie. Patients undergoing IVF resulting in failed implantation vs. healthy fertile patients)

NLF2 is a gene that is thought to play a role in the inflammatory phase of endometrial stromal invasion. It may be considered that the significantly lower value of NLF2 in the infertile group compared to the fertile group can explain the impaired implantation mechanism in those patients.

The expressions of MFAP5 and MFAP2 which was previously not studied in endometrial samples before were significantly lower in the infertile group compared to the healthy control group; this is suggestive of defects in the inflammatory processes necessary for the invasion stage of implantation.

KAYNAKLAR:

1. Denker HW. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool* 1993; 266:541-58.
2. Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 757-64.
3. Yoshinaga K. (1994) Endocrinology of implantation . In Tulchinsky, D. and Little, A.B. (eds), *Maternal and Fetal Endocrinology*. Saunders, Philadelphia, pp. 336-349.
4. Donaghy M, Lessey BA. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med* 2007; 25:461-4
5. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340:1796-1799.
6. Enders AC, Schlafke S, Hendrickx AG. Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey. *Am J Anat* 1986; 177:161-185
7. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, Frances A, Velasco JG, Remohi J, Polan ML, Pellicer A. Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/ autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 405
8. Pampfer S, Tabibzadeh S, Chuan FC, and Pollard JW (1991) Expression of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) Messenger RNA in human endometrial glands during the menstrual cycle: molecular cloning of a novel transcript that predicts a cell surface form of CSF-1. *Mol Endocrinol* 5, 1931-1938
9. Stewart CL, (1994) The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other

cytokines in regulating implantation in mammals. *Ann N Y acad Sci* 734 , 157-165.

10.Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, and Mori T (1994) Expression of leukemia inhibitory factory in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 50, 882-887.

11.Burrows TD, King A, Loke Yw. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod update* 1996; 2: 307

12. Albelda SM and Buck CA (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4, 2868-2880.

13.Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck Ca, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy *Fertil Steril* 1994; 62: 497

14. Sutherland Ae, Calarco PG, damskey CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the Mouse embryo. *Development* 1993; 119: 1975

15. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD and Fisher SJ (2003) Trophoblast L- selectin mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 299, 405-408

16. Riethmacher D, Brinkmann V and Birchmeier C. A targeted mutation in the Mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl acad Sci USA* 1995; 92:855-9.

17. Lemaire R, Korn JH, Shipley JM, Lafyatis R. Increased expression of type I collagen induced by microfibril- associated glycoprotein 2: novel mechanistic insights into the molecular basis of dermal fibrosis in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2005;**52** :1812-1823
18. Miyamoto A, Lau R, Hein PW, Shipley JM, Weinmaster G. Microfibrillar proteins MAGP-1 and MAGP-2 induce Notch I extracellular domain dissociation and receptor activation. *J Biol Chem* 2006;**281**: 10089-10097
19. Alison Miyamoto, Rhiana Lau, Patrick W. Hein, J. Michael Shipley, and Gerry Weinmaster: Microfibrillar Proteins MAGP-1 and MAGP2 induce Notch 1 extracellular domain dissociation and receptor activation. *The journal of biological chemistry* Vol .281, NO.15pp.10089-10097. April 14,2006.
20. D. Haouzi, K. Mahmoud, M. Fourar, K. Bendhaou, H. Dechaud, J. De Vos, T. Reme, D. Dewailly, and S. Hamamah. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Human reproduction*, Vol.24, No.1 pp.198-205, 2009.
21. Warton K, Foster NC, Gold WA, Stanley KK. A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene* 2004; **342**:85-95
22. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod* 2006; 21(10): 2694-8.
23. Poppe K, Glinioer D, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem A, Kaufman L, Velkeniers B. Assisted reproduction and thyroid autoimmunity: an unfortunate

24. Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. (1986) . A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. J In Vitro Fert Embryo Transf, Oct;3(5):284-95.
25. Desal NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. (2000) Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. Hum Reprod, Oct; 15(10):2190-6.
26. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J.(1999). Characterization of a top quality Embryo, a step towards single-embryo transfer. Hum Reprod, Sep;14(9):2345-9.
27. Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, Van de Meerssche M, Valkenburg M. (1999) . Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. Hum Reprod, Oct;14(10):2581-7.
28. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. (2001). Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women Younger than 38 years of age: a new model. Hum Reprod, Feb;16(2):326-32.
29. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN.(1997). Embryo Morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Hum Reprod, Jul;12(7):1545-9.

30. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. (2001) Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. Hum Reprod, Feb;16(2):313-8.
31. Roseboom TJ, Vermeiden JP, Scheute E, Lens JW, Schats R. (1995). The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of the patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple logistic regression analysis. Hum Reprod, Nov;10(11):3035-41.
32. Noyes RW, Hertig A, Rock J. Dating the endometrial biopsy. Fertil Steril 1950;1:3- 25
- combination? J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(9): 4149-52
33. Moriah Koler, Hanna Achache, Avi Tsafrir, Yoav Smith, Ariel Revel, and Reuven Reich. Disrupted gene pattern in patients with repeated in vitro fertilization (IVF) failure. Human Reproduction, Vol.24, No.10 pp.2541-2548, 2009
34. Ariel I, Weinstein D, Voutilainen R, et al. Genomic imprinting and the endometrial cycle. Diagn Mol Pathol 1997; 6(1): 17-25.
35. Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S and Simon C (2005) Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on Endometrial gene expression profiles. Mol Hum Reprod 11, 195-205.

36. D. Haouzi, K. Mahmoud, M. Fourar, K. Bendhaou, H. Dechaud, J. De Vos, T. Reme, D. Dewailly, and S. Hamamah. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. Human Reproduction, Vol.24, No.6 pp. 1436-1445,2009.



T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, GAZİ UNIVERSTY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
İLAÇ DIŞI KLİNİK ÇALIŞMALAR

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL ADI	"Yardımcı Üreme Teknikleri YÜT ile implantasyon başarısızlığı olan hastaların endometriumlarındaki microfibril-associated protein 5 ve nuclear localized factor 2 genlerinin explorasyonlarının araştırılması"				
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI	Prof.Dr.Haldun Güner				
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi / değişiklik No.su	Dili Türkçe			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 390 Tarih : 24 Haziran 2009 Üniversitemiz Tıp Fakültesinde yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı araştırma projesine ait dosya; amaç, gerekçe, yaklaşım, yöntemler ve aydınlatılmış onamın yeterliliği yönünden incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde Etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU, HELSİNKİ BELGESİ, BİYOETİK SÖZLEŞMESİ					
ÜYELER						
Ünvanı / Adı / Soyadı Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof.Dr.Necla BUYAN BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları - Nefroloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K	x E	x E	İzinli
Prof. Dr.Firdevs Aktaş ÜYE	Enfeksiyon	G.Ü.T.F Enfeksiyon Hast. A.D.	K	x E	xx E	
Prof. Dr.Aysel ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	K	x E	xx E	
Prof.Dr.Fatma ATALAY ÜYE	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	G.Ü.T.F Fiziksel Tıp ve Reha.A.D.	K	x E	xx E	
Prof.Dr.Çağatay ÇİFTER ÜYE	Genel Cerrahi	G.Ü.T.F Genel Cerrahi A.D	E	x E	xx E	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya Ecz. Fak.	G.Ü.E.F (Ecz.Fak.) Farmasötik Kimya	K	x E	xx E	
Prof.Dr.Reha KURUOĞLU ÜYE (Başkan Vekili)	Nöroloji	G.Ü.T.F Nöroloji A.D.	E	x E	xx E	
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp tarihi A.D.	K	x E	xx E	
Doç.Dr.Mehmet Ali Ergün ÜYE	Tıbbi Genetik	G.Ü.T.F Tıbbi Genetik A.D.	E	x E	xx E	
Doç.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	x E	xx E	
Doç.Dr.Canar ULUOĞLU ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	x E	xx E	
Doç.Dr.Münci YAĞCI ÜYE	İç Hastalıkları - Hematoloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	x E	xx E	
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	x E	X E	Katılmadı
Hukuk Müşaviri Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	x E	X E	Katılmadı

* Araştırma İle İlişki

** Toplantıda Bulunma