

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**IVF TEDAVİSİ SONRASI İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN
OLGULARDA ENDOMETRİAL IGF2 VE H19 GEN EKSPRESYONLARININ
FERTİL GRUPLA KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Aydan Asyalı Biri

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Sevdâ MENEVŞE

ANKARA
ŞUBAT 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**IVF TEDAVİSİ SONRASI İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN
OLGULARDA ENDOMETRİAL IGF2 VE H19 GEN EKSPRESYONLARININ
FERTİL GRUPLA KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Aydan Asyalı Biri

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Sevda MENEVŞE

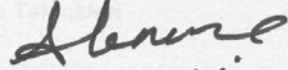
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2005-65
proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
ŞUBAT 2010

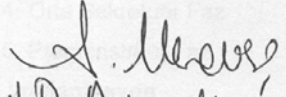
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

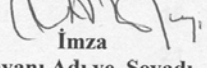
Tez Savunma Tarihi : 08/02/2010


Prof. Dr. Serda Menervce
İmza

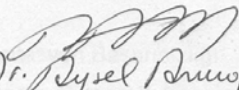
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Adnan Menervce
İmza

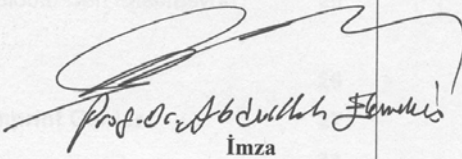
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. A. Mithat Bırdal

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Reyhan Bırdal
İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi


Prof. Dr. Abdullahi Fıratlı
İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Grafikler	V
Tablolar	VII
Semboller, Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. İnfertilite ve Yardımcı Üreme Teknikleri	6
2.2. Endometriyum	8
2.2.1. Erken Proliferatif Endometriyum	10
2.2.2. Geç Proliferatif Faz	11
2.2.3. Erken Sekretuar Faz	11
2.2.4. Orta Sekretuar Faz	12
2.2.5. Premenstrüel Faz	13
2.3. İmplantasyon	14
2.3.1. Endometriyal Reseptivite ve Embriyo İmplantasyonu	16
2.3.2. İmplantasyonda Epitel Yüzey Modifikasyonları	21
2.3.3. Endometriyumun Biyokimyasal Belirteçleri	23
2.3.4. İmplantasyon Penceresi Sırasında Global Gen Ekspresyon Paternleri	25
2.3.5. İmplantasyon Başarısızlığı	26
2.4. Epigenetik, Genomik İmprintig ve İmprint Genler	27
2.4.1. İmprint genler ve üreme	31
2.4.2. İmprint Genler	36
2.4.3. İmprint Genler Endometriyum	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Hasta Seçimi ve Örneklerin Alınması	40
3.1.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikleri	41

3.1.2. Endometrial Örnekleme İçin Hasta Takibi	43
3.2. Araç ve Gereçler	44
3.2.1. Laboratuvar Cihazları	44
3.2.2. Kimyasal Maddeler	45
3.2.3. Kullanılan Kitler	46
3.3. Solüsyonların Hazırlanışı	46
3.3.1. 0.5 M EDTA Çözeltisi Hazırlanışı	46
3.3.2. TBE 5X Çözeltisi Hazırlanışı	46
3.3.3. TBE 1X Çözeltisi Hazırlanışı	46
3.3.4. Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı	47
3.3.5. %2'lik Agaroze Jel	47
3.3.6. Orange G Jel Yükleme Tamponu	47
3.4. Yöntemler	47
3.4.1. Endometrium Dokusundan Total RNA Saflaştırılması	47
3.4.2. cDNA Sentezi	49
3.4.2.1 RT-PCR Programı	49
3.4.3. IGF2 ve H19 Genlerinin İfade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi	50
3.4.3.1 IGF2 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	51
3.4.3.2 H19 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	52
3.4.3.3 GAPDH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	54
3.5. Endometrium Dokusunda IGF2 ve H19 Genlerinin Metilasyon Düzeylerinin (allelif ifadelerinin) Belirlenmesi	56
3.5.1 Dokudan Genomik DNA Eldesi	56
3.5.2. Genomik DNA ve cDNA'dan IGF2 Geni (rs680) Polimorfizminin Belirlenmesi	57
3.5.2.1 IGF2 Gen Bölgesinin Çoğaltılması	58
3.5.2.2 IGF2 Geni PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroferezinde Değerlendirilmesi	60
3.5.2.3. IGF2 Geni PCR Ürünlerinin Apal Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	60

3.5.2.3.1. Deneyin Yapılışı	61
3.5.3. Genomik DNA'dan H19 Geni (rs2839704) Polimorfizminin Belirlenmesi	61
3.5.3.1. H19 Gen Bölgesinin Çoğaltılması	61
3.5.3.2. cDNA'dan H19 Geni (rs2839704) Polimorfizminin Belirlenmesi	64
3.5.3.2.1 H19 Gen Bölgesinin Çoğaltılması	64
3.5.3.2.2. H19 Geni PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Değerlendirilmesi	67
3.5.3.2.3 H19 Geni PCR Ürünlerinin RsaI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	67
3.5.3.2.3.1. Deneyin Yapılışı	68
3.6. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	68
4. BULGULAR	69
4.1. IGF2 ve H19 Genlerinin İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	72
4.1.1. IGF2 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi	76
4.1.2. H19 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi	77
4.2. Endometriumda H19 Geninin Allelik İfadesi	76
4.3. Endometriumda IGF2 geninin Allelik İfadesi	79
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇ	91
7. ÖZET	92
8. SUMMARY	93
9. KAYNAKLAR	94
10. EKLER	115
11. ÖZGEÇMİŞ	118

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER

	Sayfa No
Şekil 1: İmplantasyon basamakları	15
Şekil 2: Menstrual siklusun düzenlenmesinde ve implantasyon sırasında görev alan faktörler	19
Şekil 3: RNA, histon modifikasyonu ve DNA metilasyonu arasındaki ilişki	28
Şekil 4: Epigenetik modifikasyonlar	28
Şekil 5: Gen ifade düzeyini etkileyen kromatin organizasyonunda görülen geri dönüşümlü değişimler	29
Şekil 6: DNA metilasyonu	30
Şekil 7: İnsan kromozom 11p15.5' de yerleşmiş imprint gen kümesi	37
Şekil 8: IGF2 ve H19 gen bölgesinde etiketlenme modeli	38
Şekil 9: Real Time PCR tepkimesi için kullanılan Light Cycler (LC) cihazına ait görüntüler	51
Şekil 10: IGF2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	52
Şekil 11: H19 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun RNA dizisi üzerindeki yerleşimi	53
Şekil 12: GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	54
Şekil 13: IGF2 gen bölgesini çoğaltan primerler ve bölgenin genomdaki yerleşimi ve rs680 polimorfizmi için kullanılan Apal restriksiyon enzimi ve kesim yeri	58
Şekil 14: H19 gen bölgesini çoğaltan primerler ve bölgenin genomdaki yerleşimi ve rs2839704 polimorfizmi için kullanılan RsaI restriksiyon enzimi ve kesim yeri	62
Şekil 15: cDNA'dan H19 geni rs2839704 polimorfizmini içeren bölgenin çoğaltılmasında kullanılan primerler, RsaI restriksiyon enzimi ve kesim yeri	65

Şekil 16: IGF2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	73
Şekil 17: H19 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	74
Şekil 18: GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	74
Şekil 19: H19 geni rs2839704 polimorfizmini içeren bölgenin DNA ve cDNA'dan elde edilen PCR ürünlerini ve RsaI restriksiyon enzimi ile kesimini gösteren agaroz jel fotoğrafı	78
Şekil 20: IGF2 geni rs680 polimorfizmini içeren bölgenin DNA ve cDNA'dan elde edilen PCR ürünlerini ve ApaI restriksiyon enzimi ile kesimini gösteren agaroz jel fotoğrafı	80
Grafik 1: IGF2 ve H19 mRNA ifade düzeylerinin hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması	77

TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 1: cDNA RT-PCR tepkime karışımı	49
Tablo 2: IGF2 Real-time PCR tepkime karışımı	52
Tablo 3: H19 Real-time PCR tepkime karışımı	53
Tablo 4: GAPDH Real-time PCR tepkime karışımı	54
Tablo 5: IGF2 gen bölgesi PCR karışımı	59
Tablo 6: IGF2 PCR programı	59
Tablo 7: H19 gen bölgesi PCR karışımı	63
Tablo 8: H19 PCR programı	63
Tablo 9: H19 gen bölgesi PCR karışımı	66
Tablo 10: H19 PCR programı	66
Tablo 11: Hasta ve kontrollere ait klinikopatolojik özellikler	71
Tablo 12: Trombofili paneli genotiplerinin hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması	72
Tablo 13: İnfertil ve Fertil gruplarda ifadesi araştırılan genlerin Real-Time PCR sonu elde edilen Ct değerleri	76
Tablo 14: H19 ve IGF-2 genlerinin allelik ifadeleri	81

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

ANGPTL	: anjiyopoietin-benzeri I
ATIII	: Antitrombin 3
APCR	: Aktif protein C direnci
AS	: Angelman sendromu
BAP	: Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
BMP	: Kemik Morfogenetik Proteinler
BWS	: Beckwith- Wiedeman sendromu
°C	: Santigrad Derece
CAM	: Hücre Adezyon Molekülü
cDNA	: Komplementer DNA
CSF-1	: Koloni Sitümüle Edici Faktör-1
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH₂O	: Distile Su
dk	: Dakika
DMR	: Farklı Metillenmiş Bölge
DMT	: DNA metiltransferaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNAaz	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksinükleotidtrifosfat
EEC	: Endometriyal Epitel Hücresi
EG-VEGF	: Endokrin Bezinden Köken Alan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
ER	: Endoplazmik Retikulum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FV Leiden	: Faktör V Leiden
GAPDH	: Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrojenaz
HAT	: Histon Asetil Transferaz
HDAC	: Histon Deasetilaz
HMT	: Histon Metil Transferaz

HOX	: Homeotik Genler
ICAM-1	: İnterselüler Adezyon Molekül-1
ICR	: İmprint Kontrol Bölgesi
ICSI	: İnterasitoplazmik Sperm İnjesiyonu
IGF2	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGF2/M-6-PR	: IGF2, mannoz-6-fosfat reseptörü
IL-1	: İnterlökin -1
IR-A	: İnsülin Reseptör İzofarm A
IUGR	: İnteruterin Gelişme Geriliği
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
Kb	: Kilobaz
kDa	: KiloDalton
LOI	: imprinting kaybı (Loss of imprinting)
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktör
M	: Molar
mA	: Miliamper
M-CSF	: Makrofaj Koloni Stimulasyon Faktör
MEST	: Mezoderm Spesifik Transkript
MFAP5	: mikrofibril-ilışkili protein 5
miRNA	: Mikro RNA
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
mRNA	: Elçi RNA
MTFHR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
NK	: Doğal Katil Hücreler
NLF2	: Nükleer Lokalize faktör 2
nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
PDGF	: Trombosit Türevi Büyüme Faktörü

PEG10	: Paternal ifade edilen Gen 10
pmol	: Pikomol
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PWS	: Prader-Willi sendromu
REST	: Relatif Ekspresyon Software Tool
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakika Başına Dönme Sayısı
RT-PCR	: Real Time PCR
siRNA	: small-interfering RNA
sn	: Saniye
TNF-alfa	: Tümör Nekroz Faktör-alfa
TSH	: Tiroit stimulan hormon
UPL	: Universal Probe Library
UV	: Ultraviyole
V	: Voltaj
XIST	: X inaktivasyon spesifik transkript
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

1.GİRİŞ

İmplantasyon, blastokistin önceden hazırlanmış olan maternal endometriyal yüzeye yerleşmesidir ve plasenta oluşumuna gidecek ilk basamaktır. Bu yolla embriyo-fetüs ile maternal sirkülasyon arasında iletişim kurulacak ve üreme gerçek hedefine ulaşacaktır ^{1,2}. İnsan endometriyumu hormonal olarak regüle edilen ve çoğu menstrüel siklus sırasında oluşan embriyoların implantasyonuna izin vermeyen bir dokudur. Endometriyumun embriyonik implantasyonu sağlama kapasitesi endometriyal reseptivite olarak ifade edilir ve ovaryen steroidlerle regüle edilir. Bu sürede blastokist adezyonuna izin veren geçici bir süreyle sınırlı fonksiyonel bir ortam oluşur. Endometriyumda implantasyona giden süreçteki değişimlerin neler olduğu ve implantasyon başarısızlığı henüz açıklığa kavuşmamıştır. Günümüzde geliştirilmiş tedavi yöntemlerine rağmen bu basamak aşılamamıştır ve implantasyon başarısızlığı diğer yönlerden sağlıklı kadınlarda infertilitenin temel nedeni olarak durmaktadır ³.

İnsanda implantasyonun düşük oranda olduğu da bilinmektedir. Gerçek oranları ortaya koymak tam olarak mümkün değilse de embriyoların %30'luk kısmı implante olmadan, %30'u çok erken dönemde, klinikte normal siklus gününden önce, adet rotarına bile neden olmadan kaybedilmektedir. Ancak %10'luk bir kısmı klinik gebelik oluşturduktan sonra kaybedilir ⁴. Yine siklus başına implantasyon oranlarının insanlarda %30, primatlarda %70 olduğu gösterilmiştir ⁵. Bu oranlar insan üremesinde implantasyonun az oranda başarılı olduğunu ortaya koymaktadır.

Embriyoların *in vitro* ortamda fertilizasyonu ve transferi ile gerçekleşen yardımcı üreme tedavilerinde son 25-30 yıldır over stimulasyon protokolleri ve fertilizasyon tekniklerinde ciddi ilerleme kaydedilmiş, her siklus başına iyi kalitede embriyo transfer oranları

artmış olmasına rağmen, implantasyon başarısında ve gebelik oranlarında ciddi değişimler olmamıştır ⁶. Yardımcı üreme teknikleri (YÜT)'nde düşük implantasyon oranlarının embriyo gelişimindeki bozukluk ve/veya anormal uterin reseptiviteden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yetersiz uterin reseptivitenin implantasyon başarısızlığı olan olguların 2/3'ünden sorumlu iken, embriyodan kaynaklanan nedenlerin 1/3'ünü oluşturduğu düşünülmektedir ⁷.

Embriyonun implantasyon mekanizmasını ve insan üreme fizyolojisinin bilimsel temellerini anlamak için endometriyal reseptivite sürecini anlamak gerekir ⁸. Endometriyum her menstruel siklusta blastokisti implantasyon penceresi" denilen sınırlı bir süre için almaya uygundur. Bu pencerede endometriyum blastokist trofektoderminin invaze olması için maksimum hazırlığını yapmıştır. Bu süre ovulasyondan sonra 6-8 günde başlar ve yaklaşık 4 gün sürer ⁹. Sonunda blastokist epitelyal tabakayı penetre eder ve stromaya doğru ilerleyerek "invazyonu" başlatır.

Tüm bu basamaklarda pek çok genin ve bu genlerin ürünü olan faktörlerin rolü olduğu gösterilmiştir. İmplantasyon penceresinde blastokist ve endometriyum arasındaki ilişkiyi sağlayan çok sayıda molekül ekprese edilir. Büyüme faktörleri (IGF1-2, CSF, EGF, TGF), sitokinler, (interlökinler, LIF, IL-1, IL-6, IL-10, IL-15), prostaglandinler (PGI2, PGE2), matrix metalloproteinazlar (MMP), adezyon molekülleri, ekstrasellüler matriks proteinleri ve homeobox genlerinin endometriyum büyümesi ve implantasyonda rol aldığı gösterilmiştir ¹⁰⁻¹⁶. Farelerde bu moleküllerin mutasyona uğratılması ile implantasyonun engellendiği gösterilmiştir ¹⁷⁻¹⁹.

Endometriyum maturasyonunu ve implantasyonu kontrol eden kesin moleküler mekanizmaların anlaşılması implantasyondan

kaynaklanan infertilitenin tedavisinde oldukça önemli bir adım olacağı açıktır.

İmplantasyon ve bu süreçte rol alan faktörler üzerine araştırmalar sürerken bir yandan da embriyo-fetal gelişim üzerine yapılan çalışmalarda, 1980'li yılların başında memeli parental genlerinde fonksiyonel asimetri olduğu keşfedildi. Paternal eksprese edilen genlerin (PLGAL1, PEG1/MEST, IGF2 ve PEG3) fetal büyümeyi uyarırken, bu genlerdeki fonksiyon kaybının intrauterin gelişme geriliği (IUGR) ile sonuçlandığı, maternal ekprese edilen genlerin (IGF2R, GRAB10, H19, CDKN1C, TSSC3, MASH2, MEG3) fetal gelişimi sınırlaması ve bunlardaki fonksiyon kaybının aşırı büyüme ile sonuçlandığı gösterilmiştir ^{3,8,9}. Tüm bu veriler maternal ve paternal genomun fonksiyonel olarak eşit olmadıklarını ve normal embriyonik gelişim için her ikisinin de gerekli olduğunu ortaya koymuştur ⁷. 1990'lı yıllara gelindiğinde bu farkın nedeni olarak gamet gelişimi sırasında genomun bazı bölgelerinin işaretlendiği ve sonra farklı olarak ifadelendikleri belirlenmiş, genlerin alele özgü olarak eksprese edilmesi, genomik imprinting (işaretlenme, damgalanma, etiketlenme) kavramını ortaya çıkarmış ve bu durumun iki parental alelin farklı epigenetik düzenlenmelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir ^{7, 20}. Genomik imprinting, genetik materyalin hem kromozomal hem de alelik düzeyde farklı ifade edilmesi olarak tanımlanmıştır ²¹. İnsanlarda yapılan bir çok çalışmada imprint genlerin embriyo-fetal gelişim ve plasentasyonda görev aldığı gösterilmiştir ^{8, 22}.

İmprint genlerin plasentasyon ve embriyo-fetal gelişim üzerine etkileri göz önüne alındığında bu genlerin endometriyumun implantasyona hazırlanma süreci ve implantasyonunda etkili olabilecekleri teorik olarak mümkündür. Fakat imprint genlerin implantasyondaki rolleri yeterince araştırılmamıştır. H19 ve IGF2 ilk

keşfedilen ve en çok çalışılan imprint genlerdendir. IGF2 bir büyüme faktörü iken H19'un tümör baskılayıcı gen olarak görev yaptığı düşünülmektedir. H19 ifadesi, postnatal hayatta birçok dokuda kaybolurken endometriyum ve over dokularında devam ettiği görülmektedir ²⁰.

Benzer şekilde IGF2 ifadesinin de endometriyumda devam ettiği izlenmiştir ²¹. Bu iki genin endometriyum dokusundaki ifade düzeyi aynı zamanda menstrüel siklusun fazlarıyla da farklılık göstermektedir. Proliferatif faz ve erken sekretuar dönemde çok düşük düzeylerde bulunan IGF2 ifadesi geç sekretuar fazda yüksek seviyelere ulaşmaktadır. H19 ifadesi ovülasyonla birlikte hemen düşmekte ve erken sekretuar fazda oldukça düşük seyretmektedir. Daha sonra giderek artmakta ve siklusun 21. gününde oldukça yüksek düzeylere ulaştıktan sonra hafif artışla siklusun sonunda en yüksek değerine ulaşmaktadır ²¹. Bu genlerin ifadelenmesinin postnatal hayatta pek çok dokuda baskılanırken, endometriyumda devam etmesi ve menstrüel siklusun fazlarıyla değişiklik göstermesi embriyo implantasyonunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada invitro fertilizasyon (IVF) ile en az bir kaliteli embriyo transferi yapıp implantasyon başarısızlığı olduğu kabul edilen hastalardan reseptif dönemde alınan endometriyal biyopsilerdeki IGF2 ve H19 genlerinin ekspresyonun fertil kadınlardan reseptif dönemde alınan endometriyal biyopsilerdeki ekspresyon düzeyleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Erkek faktörü nedeniyle IVF tedavisi alan ve en az 2 kaliteli embriyo transferini takiben gebelik oluşmayan olgular implantasyon başarısızlığı grubunu oluşturmak üzere çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalarda kaliteli embriyo transferi ile embriyoya ait implantasyonu etkileyebilecek faktörlerin ekarte edildiği kabul edilip, endometriyum tarafında başarısız implantasyona yol açabileceği

düşünülen IGF2 ve H19 genlerinin ifadeleri reseptif dönemde incelenmiştir. Başarısız implantasyonda rol oynaması olası birçok genin doğal siklusta ve stimüle siklusta ekspresyonlarının araştırıldığı bazı çalışmalar literatürde görülmektedir²³.

Literatürde erkek faktörü nedeniyle IVF tedavisi alan ve implantasyon başarısızlığı olan hastaların sikluslarının reseptif dönemindeki IGF2 ve H19 gen ekspresyonlarının daha önce sağlıklı çocuk sahibi olan ve kötü obstetrik öyküsü olmayan kadınların reseptif dönemindeki gen ifadeleri ile karşılaştırılmasına yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. 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.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 İnfertilite ve Yardımcı Üreme Teknikleri

Memeli üremesinin esası sperm ile ovumun birleşmesi ve yeni bir organizmaya farklılaşabilen bir konseptus oluşturmaktır. İnsan üremesi kadın ve erkeğin vücudunda gerçekleşen, spermin vajene atılmasından itibaren kadın bedenindeki biyolojik olaylarla tamamlanan müdahale gerektirmeyen doğal bir süreçtir. Yine de gebeliğin ilk korunmasız koitusda gerçekleşmesi düşük olasılıktır, o yüzden bir çiftte infertil diyebilmek, araştırmaya başlamak için bir yıl düzenli korunmasız ilişki ile gebelik elde edilmemiş olması şartı aranır. Bu sürenin sonunda inceleme başlatılır ve gebeliğin oluşmasını engelleyebilecek nedenler gözden geçirilir.

İnfertilite nedenlerine ait araştırmaların sonuçlarında elde edilen veriler nasıl bir tedavi yaklaşımı olacağı konusunda klinisyene bilgi verir. Yardımla üreme tedavileri (YÜT) infertilite araştırmalarının sonunda elde edilen bilgilere göre kadın ya da erkeğe ait nedenlerle doğrudan bir tedavi seçeneği olarak önerilebilir, ya da diğer infertilite tedavi seçeneklerinin tümünün uygulandığı ve sonuç alınmadığı durumlarda son geline nokta olabilir. Günümüzde tubal faktöre bağlı infertilite, endometriyozis, erkek faktörü (sperm parametrelerinde bozukluk, sayısal azlık, hareket azlığı, yapı bozukluğu), idiyopatik infertilite, polikistik over sendromu, immunolojik infertilite, kanser tedavileri, yardımla üremenin temel endikasyonlarıdır ²⁴.

Teknolojiye bağımlı olarak yardımla üreme teknikleri hızla gelişmiş ve değişmiştir, bazı teknikler yerleşik hale gelirken [in vitro fertilizasyon (IVF-ET), intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI)] bazıları

terkedilmiştir (ZIFT, GIFT). Yakın tarihdeki bu hızlı değişimlere rağmen yardımla üreme uygulamalarının geçmişi, infertilitenin nedenleri ve çözümlerine yönelik düşüncelerin tarihi oldukça eskiye dayanmaktadır. Yapay döllenme konusunda saptanabilen ilk düşünceler milattan önce 3. yüzyılda yaşamış ibrani filozoflara aittir. İnsanların "yaratıcılığa soyundukları" bir alan olan yapay döllenme konusundaki ilk çalışmalar ise 18. yüzyılın son yarısından beri yapılmaktadır. Çoğu kez toplumun tepkisinden çekinilerek gizli tutulan bu araştırmaların yardımla üreme yöntemlerine ait olan kayıtlı kısımları 110 yıllık bir geçmişe sahiptir. İlk denemeler Schenk'in invitro fertilizasyon çabaları ve Heape'nin donör tavşanından alıcıya başarılı nakli ile başlar ²⁵. Uzun bir süreç sonrasında 1968'de tüpleri tıkalı bir kadına başarısız yapay tüp takılmasını içeren bir denemenin ardından, çalışmalar vücut dışında döllenme araştırmalarına dönmüştür ve ilk kez 1973' te vücut dışında döllenme başarılabilmiştir. Fakat döllenme sonrası oluşan embriyo implante olamamış ve bu girişim düşükle sonuçlanmıştır ²².

Teknolojinin gelişmesinin katkıları ve o güne kadar elde edilen sonuçlar ışığında, 1978 yılında doğal bir sikluseden elde edilen tek preovulatuvar insan oositinin invitro fertilizasyonu ve blastokist evresinde uterusu transferi ile oluşturulan ilk IVF gebeliği Louise Brown'un doğumu gerçekleşti. Bu tarihten itibaren çok hızlı bir gelişme kaydeden yardımla üreme teknikleri, bugün infertil çiftlerin tedavisinde oldukça popüler bir yöntem haline gelmiştir ²⁶.

Yardımla üreme, üreme tıbbı adına laboratuvaru elde edilen bilgilerin insan tedavisine aktarımı anlamında en iyi örnektir denilebilir. Kompleks bir memeliye dönüşüm için gerekli olan tüm bilgiyi barındıran bir zigot yaratmak için iki haploid hücrenin sırlarını ve infertilite tedavisinde teknolojinin uygulamalarını araştıran geniş bir alandır.

Sonuçta, doğal yollarla gebeliğin başılamadığı durumlarda gebeliğin elde edilmesi için IVF-ET ve ICSI infertilite tedavisinde yeni bir çağ başlatmıştır. 1979 ve 1980 yıllarında geliştirilmeye başlanan ovulasyon indüksiyonu tedavileri ile yardımcı üreme teknikleri daha da çeşitlenmiş ve orijinal kullanılış noktası olan tüplerin tıkalı olduğu durumların dışında kullanılmaya başlanmış, uygulama alanları ve nedenleri de her geçen gün artmıştır ^{27,28}. Yaklaşık 25 yıldır tüm dünyada yaygın olarak kullanılmakta ve günümüzde tüm doğumların % 1-3'ü YÜT sonrası gerçekleşmektedir ²⁹.

Günümüzde IVF sırasında uygulanan rutin klinik ve laboratuvar protokolleri ile bir IVF siklusu sırasında ortalama 15 oosite ve %70'e kadar yumurta dölleme oranına ulaşmak çok kolaydır. Ancak ortalama canlı doğum oranı %30'un altında kalmıştır. Yüksek dölleme oranlarına karşın düşük gebelik oranlarının implantasyonun başılamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Gerçekte bugün bile endometriyum ve blastokist arasındaki hücresel ve moleküler etkileşimler iyi anlaşılamamıştır. Bu nedenle implantasyon başarısızlığı, IVF sırasında hız sınırlayan önemli bir adım gibi görünmektedir.

İmplantasyon mekanizmasının bilimsel temellerini anlamak için endometriyal siklusun değişimi ve endometriyal reseptivite sürecini anlamak gerekir ⁸.

2.2.Endometriyum

Sağlıklı bir fetusun doğması için temel basamak blastokistin yerleşeceği endometriyumun hazırlanması ve başarılı bir implantasyondur.

Her menstrüel siklus esasen bir gebelik oluşumu için endometriyumun hazırlaması döngüsü olarak görülebilir. Bu döngüde eş zamanlı olarak overde de bir döngü olur, bu ovarian döngüde folliküllerin içindeki oositler maturasyon geçirir, overden atılır, spermle karşılaşır ve döllenir ve hazırlanan endometriyuma yerleşir ³⁰.

Endometriyumun hazırlanması süreci ovarian döngü sırasında gelişen folliküllerden üretilen steroid hormonlar olan östrojen ve progesteron kontrolü altında gerçekleşir. Bu hormonlar dişi üreme sisteminin tümünde, özellikle endometriyumda siklik değişikliklere neden olur. Endometriyumda oluşturdukları değişimler implantasyon için gerekli olan yapısal ve fonksiyonel etkilere yol açarlar ³⁰.

Menstrual siklus endometriyumda oluşan histolojik ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle evrelere ayrılarak tanımlansa da, süreklilik gösterir. Her evre diğer evreyle devam eder. Bu siklus boyunca ilk evre menstrual evredir, genellikle 4–5 gün süren bu evrede, endometriyumun fonksiyonel tabakası dökülür ve menstrual akıntı ile dışarıya atılır. Menstruasyondan sonraki endometriyum, oldukça incedir. Sonrasında östrojen etkisi altında olan proliferasyon evresi başlar ve yaklaşık 9 gün sürer, gelişen olgun folikülün atılımı ile ovulasyon gerçekleşir, takiben atılan ovumdan geri kalan folikülden korpus luteum oluşur ve salgıladığı progesteron altında ise endometriyumda sekresyon evresi (luteal evre) başlar ve yaklaşık 13 gün sürer. Siklusun luteal evresinde progesteron hormonunun endometriyum üzerine etkili olabilmesinin ön koşulu siklusun foliküler fazında östrojen tarafından endometriyumun hazırlanmış olmasıdır ³⁰.

Hormonal kontrol altındaki primat endometriyumu esas olarak fonksiyonel tabaka ve bazal tabaka olarak iki katmandan oluşur.

Fonksiyonel tabaka her siklusda yenilenen, dökülen geçici bir tabakadır. Endometriyal yüzeyi döşeyen luminal epitel altında stromayı içeren kompakt kısım ve yoğun bir şekilde paketlenmiş kıvrımlı bezleri içeren süngerimsi kısımdan oluşur. Bazal tabaka ise süngerimsi bezlerin altında yer alır, myometriyum tabakasına bitişiktir. Bu fonksiyonel tabakalar sekretuar faz sırasında histolojik olarak tanımlanabilir. Fakat fonksiyon yönünden endometriyum farklı fenotipteki hücrelerin kutuplaşmış farklılığı gibi düşünülebilir. Üst tabaka menstrüasyon sırasında histolojik değişiklikler bakımından çarpıcı bir progresyon gösterirken bazal tabaka sadece ılımlı değişiklikler gösterir. Hücre çoğalması, programlanmış hücre ölümü ve gen ekspresyonları açısından katmanlar arasında farklılık vardır ³⁰.

2.2.1. Erken Proliferatif Endometriyum

Endometriyumdaki değişime eş zamanlı olarak overlerde foliküller büyümektedir ve proliferasyon evresi foliküllerden salgılanan östrojenin kontrolü altındadır. Hemen menstruel dökülmenin ardından başlayan bu onarım ve çoğalma evresinde, erken proliferasyon fazı sırasında, 2 mm kalınlığında olan endometriyumun su içeriği 2–3 kat artar. Bazal bölümdaki hücrelerin çoğalması ile uterusun alt segmenti ve kornual bölgede kalan hücrelerden, menstrüel siklusun 5. gününde luminal epitelin yeniden yapılanmasını sağlar. Yüzey epiteli yeniden oluşur ve yüzeyi kaplar. Hem glandüler epitel hem de stromadaki mitotik aktivite ile erken proliferatif fazdaki dar, düz ve tübüler yapıdaki alçak kolumnar epitel ile döşeli bezlerin sayısı ve uzunluğu artar, spiral arterler uzar. Ultrastrüktürel düzeyde epitelyal hücre sitoplazması sayısız poliribozom içerir, fakat endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi tam gelişmemiştir ³⁴.

2.2.2. Geç Proliferatif Faz

Hemen ovulasyondan önceki bu fazda endometriyal kalınlık glandüler hiperplazi, stromal ekstraselüler matriksin artışına bağlı olarak artmıştır. Bezler endometriyal yzeeye yakın olarak dağılmışlardır, daha yoğunlaşmıştır ve kıvrımları artmıştır. Glandüler epitel hücrelerin yoğunlukları artmıştır ve ovulasyon zamanı yaklaştıkça psödostratifiye hale gelirler ³⁴.

2.2.3. Erken Sekretuar Faz

Ovulasyonla birlikte endometriyal siklusun sekretuar fazı başlar. Aynı zamanda ovaryumlarda korpus luteum oluşur ve buradan salgılanan progesteron, bezleri uyarır, bezler genişler, kıvrılır, keseleşir, glikojenden zengin bir materyalin salgılanmasını sağlar. Korpus luteumdan salgılanan östrojen-projesteronun etkisi ve bağ dokusunda artan sıvı nedeniyle, endometriyumun kalınlığı artar. Spiral arterler kompakt tabakaya doğru ilerlerken kıvrımları artar. Venöz damarsal yapıda giderek daha kompleks olur ve geniş lakünler (venöz boşluklar) oluşur. Bu evrede direkt arteriovenöz anastomozlar oluşur ³⁴.

Glandüler epitel hücrelerin ve stromal hücrelerin çekirdekleri, erken sekretuar fazda heterokromatin oluşturur. Glandüler epitel hücreler altlarında glikojence zengin vakuoller biriktirmeye başlar ve çekirdekler kolumnar epitelin ortasına doğru yer değiştirir. Ilımlı sekretuar aktivitenin histolojik göstergesi bezlerin lümeninde açık eozinofilik toplanmalardır. Endometriyal epitelde yapılan ultrastrüktürel çalışmalar bol ER'yi ve geniş mitokondrileri göstermektedir. Erken sekretuar fazda, fibriller kollojen içeren arjinofilik liflerin retiküler ağı

saptanmıştır. Stromal ödem, bu dönmedeki endometrial kalınlığa katkıda bulunur ³⁴.

2.2.4. Orta Sekretuar Faz

Bu fazın karakteristik özelliği spiral arterlerin gelişimidir. Bu damarlar endometriyum kalınlığından daha hızlı genişledikleri için kıvrımları gittikçe artar. Endometrial bezler orta ve geç sekretuar dönemde oldukça eğri-kıvrımlı durumdadır. Bezlerin sekretuar kapasiteleri ovulasyondan sonraki 6. günde maksimum olur ³⁰.

Progesteron hormonunun etkisi altında siklusun 16. ve 24. günleri arasında sekretuar fazdaki epitel hücrelerinin %5- 10'nun nukleusunda nukleolar kanal sistemi gözlenir ³⁰. Bu sistemin iç nukleer membranın invajinasyonundan oluştuğu düşünülmektedir. Bu yapının sitoplazmaya mRNA transportu için perinuklear aralığa direk bağlantı sağladığı düşünülmektedir.

Orta-geç sekretuar faz arası kan damarlarının etrafındaki stromal hücreler genişler, perisellüler ve ekstrasellüler matriksi ve eozinofilik sitoplazma oluşmasını sağlarlar. Bu değişiklikler predesidualizasyon olarak tanımlanır. Bu değişimler ilk olarak damarların çevresinde başlar, bu yüzden lokal ve humoral faktörlerin bunu provake ettiği düşünülmektedir. Lokal faktörler arasında desidual granüler lenfositler, doğal katil hücreler (NK) hücrelerinin rolü olduğu gösterilmiştir ³¹. Ultrastrüktürel düzeyde predesidual stromal hücrelerde iyi gelişmiş Golgi kompleksleri ve ER paralel lamelleri bulunur. Bunları çevreleyen matriks, laminin, fibronektin ve heparan sülfat ve tip IV kollajenden oluşur ^{32, 33}. *In vitro* olarak insan stroma hücrelerini desidualize eden gen ekspresyon profili mikro-dizi analiz yöntemi ile haritalandırılmıştır ve 121

gen ifadesinin arttığı, 110 genin ifadesinin azaldığı ve 50 genin bifazik yanıt verdiği gösterilmiştir ³⁴.

Midsekretuar ve geç sekretuar fazın stromal hücreleri ayrıca homeostazisi sağlayan membran ile ilişkili bir protein olan doku faktörünü ve fibrinolizi sağlayan plazminojen aktivatör inhibitör tip 1'i proteinlerini eksprese ederler ^{35,36}. Bu gen ekspresyonları sayesinde trofoblast invazyonu sırasında oluşabilecek hemoraji engellenmiş olur.

2.2.5. Premenstrüel Faz

Bu fazın temel histolojik özellikleri matriksmetalloproteinazlar tarafından katalize edilen stromal retiküler ağın degradasyonu, stromanın polimorfonükleer lökositler ile infiltrasyonu ve bazal çekirdekli epitelyal hücreleri bulunan endometriyal bezlerin sekretuar dökülmesidir. Granüler lenfositlerde apoptoza neden olan piknozis ve koryoreksizi içeren morfolojik değişikliklerin mensi önceden bildiren ilk olaylar olduğu öne sürülmüştür. Bu değişiklikler ekstrasellüler matriksin kırılmasına ve lökosit infiltrasyonuna bağlı olarak meydana gelirler ³⁷. Glandüler epitelde nükleolar kanal sistemi ve erken-geç sekretuar fazların dev mitokondri karakteristikleri yok olmuştur. Endometriyum kısmen sekretuar aktivitedeki azalmanın ve ekstrasellüler matriks katabolizmasının bir sonucu olarak menstruasyonu takip eden dönemde büzülür.

Bu histolojik ve fonksiyonel olarak farklı evreleri sürdüren endometriyum her menstruel siklusta implantasyon penceresi denilen sınırlı bir süre içinde embriyo yerleşimi için uygundur. Bu pencerede endometriyum blastokist trofektoderminin invaze olması ve için maksimum hazırlığını yapmıştır. Bu süre ovulasyondan sonra 6-8. günde

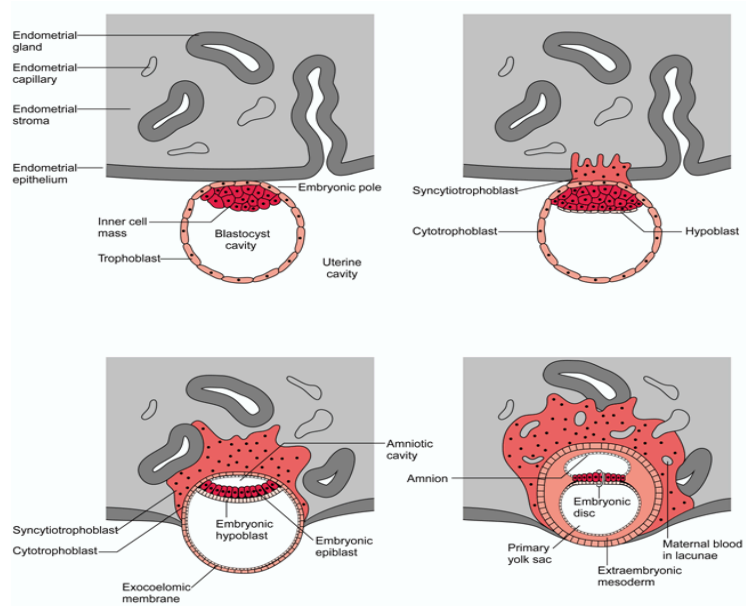
başlar ve yaklaşık 4 gün sürer ⁹. Bu implantasyona hazırlık sürecindeki endometriyum özellikleri ve moleküler ayrıntıları aşağıdaki bölümde gözden geçirilmiştir.

2.3. İmplantasyon

İmplantasyon genetik olarak farklı olan embriyonik ve maternal dokular arasında gelişen başarılı bir kaynaşmayı takiben blastokistin endometriyuma tutunması ve gömülmesidir. Oldukça karışık ve çok basamaklı bir ilişkinin sonucu implantasyon için, embriyo kalitesi ve endometriyumun reseptivitesi temel iki unsurdur ³⁸. Fertilizasyondan sonra embriyo içsel gelişimsel bir program içine girer. *In vivo* olarak hücre bölünme ve farklılaşma süreci fallop tüpü içinde geçer. Uterusun hormonal ortamına bağımlı olmayan fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim *in vitro* ortamda başarılabılır. Fertilizasyon sonrası 3. ve 4. gün itibarıyla embriyo, translusen zona pellusida kalıntısı ile çevrelenmiş solid bir hücre topu şeklindedir. Fertilizasyondan sonra 4. ve 5. günde embriyo içinde blastosel olarak adlandırılan sıvı dolu bir kavite oluşur. Bu evrede embriyo blastokist adını alır. Blastokistin en dışta kalan ve zona pellusidaya bitişik olan hücre tabakası trofektoderm olarak anılır. Bu hücreler daha sonra plasenta ve koryonu oluştururlar. Fetus ve amniyon ile plasentanın mezenşimal ve vasküler komponentleri blastoselin bir ucunda trofektodermin hemen altında yer alan iç hücre kitlesi adı verilen hücre grubundan gelişirler. Plasental memeliler arasında implantasyon olayı yönünden belirgin farklılıklar olsa da sonuç aynıdır, blastokist uterus duvarına fikse olup, fiziksel ve fonksiyonel bir ilişki kurar. İnsanda blastokist fertilizasyon sonrası 5. gün civarında uterusu ulaşır ve 2-3 gün kavite içerisinde serbest halde dolaşır.

Fertilizasyon sonrası 6. ve 7. gün civarında, trofektodermin direk olarak endometriyumla temasını sağlamak üzere, zona pellusida dejenerasyonu gerçekleşir. Başlangıçta blastokist invaziv değildir. Ancak zona pellusidadan sıyrıldıktan sonra trofektodermin yüzeyi yapışkan hale gelir. Trofoblast hücreleri epiteldeki reseptif bölgelere yapışır. Blastokist endometriyuma gömülür ve tamamen endometriyal stroma ile çevrilir.

Bu sürede implantasyon basamakları halinde gerçekleşir, ilk basamak olan apozisyon basamağında, blastokist bir kutuptan endometriyuma yaklaşır; bu aşamadan sonra bu erken embriyoyu saran güçlü zar yapısı zona pellusida dökülür ve blastokistin endometriyal epitelyal tabaka ile temasıyla “adezyon” gerçekleşir (Şekil 1). Sonunda blastokist epitelyal tabakayı penetre eder ve stromaya doğru ilerleyerek “invazyonu” başlatır. İlk tutunma reaksiyonu apozisyon muhtemelen hız kısıtlayıcı bir basamaktır ve tutunmanın engellenmesi, implantasyonun sonraki aşamalarında meydana gelir.



Şekil 1: İmplantasyon basamakları ³⁹.

İmplantasyonun başında trofoektoderm dışta multinukleuslu sinsityotrofoblast ve içte sitotrofoblast tabakalarını oluşturmak üzere farklılaşır. Sinsityotrofoblast tabakası aralarındaki bireysel hücre zarlarını kaybederek birbirleriyle birleşmiş olan trofoblast hücre ağından meydana gelir. Sinsityotrofoblastlar salgıladıkları proteazlarla endometriyal ekstrasellüler matriksi yıkarak implantasyon için öncü birimini oluşturur. Bu sayede embriyo uterus duvarına yerleşebilir.

Bu genel hatları ile anlatılan implantasyonun gerçekleşmesi için embriyo ve endometriyum arasında hormonların yönettiği karışık bir moleküler etkileşim gereklidir. İmplantasyon süresinde rol alan çeşitli moleküllerden bir kısmı belirlenmiştir ^{40,41}. Lösemi inhibe edici faktör-1 (LIF-1), interlekin 11, heparan bağlayıcı epidermal büyüme faktörü, prostasiklin, prostaglandin E2, peroksizom proliferasyonu edici aktivatör reseptör, homeobox genleri (HOXA10, HOXA11), fibroblast büyüme faktörü, kemik morfogenetik proteinler (BMP) ve bunların antagonisti proteinler, Wnt ve hedgehog sinyal iletili moleküller bu süreçte rol alan moleküllerden bir kısmı olarak belirlenmiştir.

Genetik olarak maternal dokudan farklı olan trofoblastların endometriyuma implantasyonu yine maternal immün defansın aşılmasını gerektirir. Embriyo sitotrofoblastlar tarafından salgılanan kendisine özgü HLA-G sınıf I antijeni sayesinde immün sistem salgısından korunabilir.

2.3.1. Endometriyal Receptivite ve Embriyo İmplantasyonu

İmplantasyon ovaryan steroidlerin kontrolü altında değişen endometriyumun luteal fazında gerçekleşir. Luteal faz içinde kısa ve kesin olarak belirlenmiş bir sürede endometriyal receptivite, embriyonun implantasyon kapasitesi, en yüksek durumdadır. Bu döneme

implantasyon penceresi denir, bu kısa sürede maternal-embriyonik ilişki en yüksek düzeyde olur ve endometriyuma blastokist adezyonu ve invazyonu başarılıdır.

Konsepsiyonun zamanlaması overyan olaylarla bir eş zamanlılık gösterir. Ovulasyonla birlikte korpus luteumdan salgılanan progesteron, proliferatif fazdaki endometriyuma sekretuar bir yapı kazandırarak henüz fertilize olmuş ovumu hazırlar³⁹. Uygun bir endokrin çevre sayesinde gelişmekte olan embriyo epitel yüzeyi ile temas eder, alttaki stromaya invaze olarak gestasyon başlar.

Deneysel ve evcil hayvan çalışmaları normal implantasyon ve gelişim için endometriyum ve embriyonun senkron bir gelişim gösterdiğini ortaya koymuştur⁴¹⁻⁴³. Laboratuvar hayvanlarında, bazı türlerde birkaç saat sürebilen implantasyon için ayrı bir zaman aralığı-implantasyon penceresi olduğu gösterilmiştir⁴¹.

Bu dar zaman aralığında 'uterin reseptivite' artar. Uterin reseptivite trofektodermin ve blastokistin endometriyal epitelyal hücrelere tutunması ve endometriyal stromaya invaze olması boyunca olan endometriyal maturasyon dönemi olarak tanımlanabilir. Non-reseptif durumdan reseptif duruma geçiş trofoblastların tutunma ve migrasyonuna olanak tanıyan membrana bağlı, çözülebilir veya sekretuar faktörlerin düzenli ekspresyonu sayesinde gerçekleşir. Bu geçici aralık süresince salgılanan faktörler reseptif durumun biyobelirteçleri veya fonksiyonel mediatörleri olarak adlandırılır^{44, 45}.

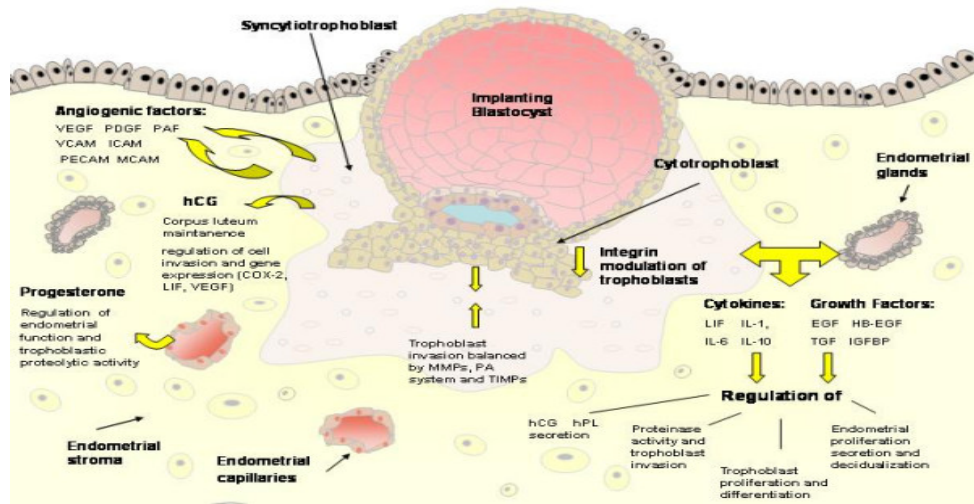
İnsan embriyolarının çeşitli ekstrasellüler matriks komponentlerinin ve diğer hücrelerinin üzerine yayılma ve onlarla bağlantı kurma yeteneği olmakla beraber sağlıklı bir embriyo-fetal gelişim

için benzer bir sürecin belli bir periyotta *in vivo* ve uterus içinde gerçekleşmesi gerektiği de açıkça bilinmektedir. Son 50 yıldır implantasyonun zamanlaması incelenmiş ve luteal fazdaki histerektomi materyallerinde embriyoların 28 günlük siklusda ilk 20 günde tutunmayı başaramadıklarını göstermişlerdir ⁴⁴. Novat ve arkadaşları fertilize donör oositlerini hormonal olarak hazırlanmış alıcılarla transfer etmek suretiyle implantasyonun siklusun 20-24. günleri arasında gerçekleştiğini bildirmişlerdir ⁴⁵. Yakın tarihlerde Wilcox ve arkadaşları normal sikluslara sahip ve gebelik elde etmiş olan 221 kadının gebelik zamanlarını incelemişler ve implantasyonun normalde ovulasyondan sonra 7-10 gün arasında (siklusun 21-24 günleri arasında) oluştuğunu göstermişlerdir ⁹. Bu çalışmalara göre gecikmiş implantasyon muhtemelen implantasyon zamanındaki kayma ve endometriyum-embriyo arasındaki uyumun kaybına bağlı olarak artmış düşük oranları ile birlikte.

İmplantasyon maternal endometriyum ile embriyo arasındaki oldukça karmaşık bir ilişki olarak tanımlanabilir. Çoklu çözünebilir ve membrana ait faktörler embriyonun büyümesini, farklılaşmasını, tutunmasını, invazyonunu, immunolojik reaksiyona karşı koymasını kolaylaştırır. Maternal faktörler bir yandan embriyonun anneye ait dokulara girişine izin verirken, diğer yandan invazyonun sınırlı kalmasını sağlarlar. Bazı embriyonik sinyal ve reseptörler maternal yüzeylerde tamamlayıcı reseptörlere sahiptir. Embriyonun endometriyuma invazyonu sırasında maternal antijenleri taklit etmek suretiyle konak defansından kaçısı penetrasyon sırasında kullandığı bir stratejidir ⁴⁶.

Menstruel siklus ve gebelikte oluşan endometrial değişikliklerin önemli bir kısmından büyüme faktörleri sorumludur. Endometriyum ve gebelik endometriyumu olan desiduada büyüme

faktörleri EGF, EGF benzeri büyüme faktörleri, TGF-alfa, HB-EGF, asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (FGF), IGF-1, IGF2, IL-1, IL-11, IL-6, LİF, makrofaj koloni stimülasyon faktör (M-CSF), TGF-beta, trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF), tümör nekroz faktör-alfa, (TNF-alfa) ve endotelin 1,2,3'ün ekspresyonu gösterilmiştir. Yanı sıra endometriyum bu büyüme faktörleri için reseptör de eksprese etmektedir. Büyüme faktörlerinin endometriyumun hücre büyümesi ve farklılaşmasında etkili olan ekstrasellüler matriks proteinleri ve onların reseptörleri, integrinler ve matriks metalloproteinazların (MMP) ekspresyonlarında düzenleyici oldukları gösterilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2: Menstrual siklusun düzenlenmesinde ve implantasyon sırasında görev alan faktörler²⁴

Endometriyumda implantasyonla ilişkili olduğu bilinen en az 3 sitokin sentezlenmektedir. Koloni-stimüle edici faktör-1 (CSF-1), LIF-1 ve İnterlökin -1 (IL-1) dir ⁴⁷. CSF-1 hem endometriyum hem de preimplantasyon dönemindeki embriyoda ifade edilir. CSF-1 üretiminin implantasyon penceresi sırasında azaldığı gösterilmiştir ⁴⁸. CSF-1 desidual makrofajların gelişim ve büyümesinde rol alır. CSF-1, IL1 ve

LIF-1 mutasyonu olan ratların infertil olduğu bulunmuştur ⁴⁹. LIF-1 mRNA ekspresyonu glandüler epitelde stromaya göre 3 kat daha fazla bulunur ve proliferatif faza göre sekretuar fazda daha fazla eksprese olur ⁵⁰.

IL-1 gibi kemoatraktif sitokinler invazyon işlemleri için önemlidir ve implantasyonun adezyon basamağında “hücre adezyon molekül (CAM) ailesi” olarak adlandırılan ve integrin, selektin, kaderin ve immunglobulin olmak üzere 4 alt gruptan oluşan bir gen ailesi rol almaktadır. Bu moleküller glikoprotein yapısında olup hücreden hücreye adezyonun gerçekleşmesini sağlamaktadırlar ⁵¹. İntegrinler heterodimer yapıda olup α ve β altbirimlerinden oluşur ve ekstraselüler kısımları fibronektin, laminin ve kollajen için reseptör görevi yapar ⁵². İntegrinler siklus bağımlı ekspresyon gösterir ve implantasyon döneminde en yüksek düzeye ulaşır ¹⁵. Blastokist de benzer şekilde implantasyonla uyumlu olacak düzeylerde integrin ifade eder⁵³.

Selektinler de glikoprotein yapısında olup P-selektin, L-selektin ve E-selektin olmak üzere 3 formda bulunurlar. Embriyodan zona pellusida’ ya döküldükten sonra L-selektin eksprese eder ⁵⁴. Selektinlerin “implantasyon penceresi” başlangıcında ekspresyon düzeyi artar. Embriyonun ifade ettiğı L-selektin epitelyal yüzeydeki oligosakkaridleri bağlar, blastokist yavaşlar ve integrinlerle sıkı yapışmaya izin verir, bu da embriyonun adezyonunu sağlar. Kaderinler de glikoprotein yapısındadır ve E-, P-, ve N-kaderin olmak üzere 3 formda bulunurlar. E-kaderin molekülünün preimplantasyon gelişiminde önemli olduğı bulunmuştur ⁵⁵. İmmunglobulin ailesi geniş olup en önemli üyesi “İnterselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1)” dir.

2.3.2. İmplantasyonda Epitel Yüzey Modifikasyonları

Embriyo tutunması ve invazyonu reseptör aracılı bir olaydır. Yüzey epiteline yerleşmiş moleküllerin bu aracılığı sağladığı gösterilmiştir. Bir çok türde endometriyal yüzeyde büyük bir glikoprotein olan MUC-1 gösterilmiştir, insanlarda tüm siklus boyunca eksprese olmaktadır. Yine de implantasyonda ilk tutunmada daha küçük moleküller olan trofoninler, integrinler, CD44, L-selektinler ve HB-EGF bilinmektedir. Trofonin olarak adlandırılan yeni bir hücre yüzey proteini bulan Fukuda, bunun implantasyon esnasında homolog çiftleşen eş olduğunu bildirmiştir ⁵⁶. İmplantasyon sırasında eksprese edilen avb alfa-v beta3 integrinini ve onun ligandı olan osteopontin lümen yüzeyinde bulunmaktadır. Osteopontin CD44 reseptörüne bağlanabildiği için bunların endometriyum ve embriyo arasındaki sandviç eşleşme mekanizması olarak görev yaptığı düşünülmektedir. İnsanda hem embriyo hem de endometriyumun yüzey epiteli avb alfa-v beta3 integrinini ve CD44 eksprese ettiği gösterilmiştir. İntegrin aracılı adezyonun da implantasyonda önemli olduğu rol oynadığı düşünülmektedir ^{57,58}.

HB-EGF'nin transmembran formu endometriyum yüzeyinde onun reseptörü olan ErB-4 embriyonun dış yüzey hücrelerinde eksprese olmaktadır. Bu moleküllerin implantasyon esnasında tutunma reseptörü-ligand şeklinde çalıştıkları gösterilmiştir ^{59,60}. L- selektininde embriyo ve endometriyal yüzeyde ifade edildiği ve implantasyonda rol aldığı gösterilmiştir ⁵⁴.

İnfertil kadınlarda bu tür mekanizmalardan herhangi birisi bozuk olabilmektedir, bu tür sorunların tanı yöntemini geliştirme başka

nedeni bulunamayan infertilite tedavilerinde ve tekrarlayan gebelik kayıplarında önemli olacaktır.

Yüzey epitelindeki yapısal değişimler biyokimyasal değişikliklere eşlik etmektedir. Taramalı elektron mikroskop ile insan endometriyal epitelinin sekretuar ve silyalı hücrelerden oluştuğunu göstermektedir. Siliyasız hücreler geç proliferatif fazda azalır, sekretuar fazda artar. Östrojen çekilmesi silyalı hücrelerin azalmasına neden olur. Silyalı hücrelerde siklus boyunca yüzey morfolojileri sabit kalmakta sekretuar hücrelerde siklusun evrelerine bağımlı yüzey değişimleri göstermektedir^{61, 62}.

İmplantasyonunun gerçekleşmesi için reseptivitenin başladığını gösteren morfolojik değişiklikler siklusun 19.gününde ortaya çıkar. Over steroidleri, endometriyal epitel hücrelerinde (EEC) fenotipik değişiklikleri indüklerler, plazma membranı ve hücre iskeletinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler oluştururlar. Bu değişiklikler sonrası endometriyum geçici adeziv özellik gösterir, apikal plazmada uzun, ince düzenli mikrovillus yapıları yavaş bir şekilde düzensiz düzleşmiş çıkıntılar haline dönüşür, değişiklikler sadece epitel yüzeyi değil endometriyum stroması ve vasküler yapıları da içine alır⁶¹⁻⁶³. Değişen endometriyal epitelyal morfoloji ile pinopod adı verilen membran projeksiyonları ortaya çıkar. Pinopodlar menstrual siklusun 20 ve 21 günlerinde apikal hücresel sitoplazmik çıkıntılar olarak görülürler⁶⁴. Uterodom ve **pinopod** olarak adlandırılan sekretuar hücrelerin geçici yüzey farklılaşmaları özellikle önemlidir. Bu geçici ekspresyon paternleri maksimal uterin reseptivite ile eş zamanlıdır⁶⁵. Bu yapılar ilk kez kemirgenlerde uterusun implantasyona hazır olduğu sınırlı bir süre (12 saat) için endometriyal luminal epitelde saptanmıştır, bunların pinositoz yaptıkları gözlenmiş ve Yunanca “içen ayak” anlamına gelen pinopod adını almışlardır. Benzer

yapılar insanlarda ve çeşitli türlerde gösterilmiştir. Bunların implantasyon zamanı ile bağlantıları bilinmektedir. İnsanlarda pinopod oluşumuna yol açan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Hücre iskeleti değişimleri ya da sekretuar aktivite sonucu birikmiş membran komponentlerine bağlı olabilir.

Pinopodlar insan endometriumunda kısıtlı bir zamanda (implantasyon penceresi) ortaya çıkar ve blastokist endometriumunda sadece pinopodlar içeren bölgelere implante olur. Çok sayıda faktörün endometriumunda implantasyon penceresi içinde ortaya çıkan değişikliklerde ve pinopod formasyonunun oluşumunda görev aldığı düşünülmektedir ⁶⁶. Diğer çalışmalarda da yüzey biyobelirteçlerinin pinopodlarda bulunduğu gösterilmiştir. HB-EGF membran bağımlı ligand olan ve embriyo için işaret olan parakrin bir faktördür ve beklenen implantasyon zamanında pinopodların yüzeyinde eksprese olmaktadır ⁶⁷.

MUC-1 ve osteopontin lümen yüzeyinde immunhistokimyasal yolla gösterildiği gibi farklı hücrelerde bulunmaktadır. Yine HOX A-10' nun pinopod oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiştir ⁶⁸. Pinopodların oluşumunun progesteron bağımlı olduğu ve östrojen ile regresyona uğradığı da gösterilmiştir. Pinopodaların implantasyon penceresi içinde ortaya çıkması nedeniyle uterin reseptivitenin bir belirteci olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

2.3.3. Endometriumun Biyokimyasal Belirteçleri

Hem doğal hem de IVF sikluslarındaki başarıda endometriumun bu hız sınırlandırıcı basamağının aşılması oldukça önemli bir yol katedilmesini sağlayacaktır. İnfertil çift için ciddi psikolojik, fiziksel ve ekonomik sorunlara ve kadın için artan morbidite, hatta mortaliteye, ülke için önemli sağlık yatırımına neden olabilen YÜT

uygulamalarında başarıyı artıracak faktörlerin araştırılması hem maliyeti hem girişimin ortaya çıkardığı riskleri azaltması açısından oldukça önemlidir.

Bu nedenle endometriyumun implantasyon kapasitesinin değerlendirilmesi amaçlanmış, ışık ve elektron mikroskobu teknikleri, hücre ve doku kültürleri, immunohistokimyasal teknikler, biyokimyasal analizlere dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Ayrıca, endometriyal işlevin değerlendirilmesi konusunda Doppler görüntüleme, moleküler belirteçler ve gen profili çıkarma gibi alternatif yöntemler de gelişmelere yol açmıştır.

Bu değerlendirme tekniklerine rağmen endometriyumun implantasyon kapasitesinin göstergesi olabilecek biyolojik belirteçler tespit edilememiştir. Endometriyumun implantasyon kapasitesini gösteren bir belirtecin bulunması gebelik isteyen olgularda gerek YÜT gerekse doğal sikluslarında implantasyon başarısını artırması açısından önemli olurken, etkili kontrasepsiyon sağlanması açısından da oldukça faydalı bir yaklaşıma temel olabilir.

Endometriyal reseptivitenin uygun belirteçlerini bulmak için yapılan araştırmalar menstrüel siklusun 20-24. gününde implantasyon esnasında geçici olarak eksprese edilen proteinlerin belirlenmesi temeline dayanır. Bu sırada değişimi gösterilen belirteç arasında 24 kD protein, LIF-1, alfa v beta 3 integrin, alfa 1 beta1 integrin, HB-EGF, HOXA-10, alfa 4 beta 1 integrin, prolaktin, MUC-1, IGF-II, glikodelin, kaderin-11, CD 44, kalsitonin sayılabilir^{68,69}. Bunların içinde reseptiviteyi gösteren en iyi belirteç ise integrinler olmakla beraber bunların tespitinin klinikte fayda sağlamadığı gösterilmiştir.

Progesteronun sub optimal olduğu ve endometriyumdaki değişiklerin tam olmadığı durumlarda implantasyon gerçekleşmemektedir. Histolojik olarak endometriyumdaki değişikliklerin tam olarak bulunsa bile endometriyumda reseptör düzeyindeki moleküler biyokimyasal değişiklikler olmadığı düşünölmektedir.

2.3.4. İmplantasyon Penceresi Sırasında Global Gen Ekspresyon Paternleri

Birçok molekülün rol oynadığı implantasyon olayının 100' den fazla genle kontrol edildiğı araştırma sonuçlarından anlaşılmaktadır ⁷⁰.

Midsekretuar fazda insan endometriyumunun moleküler fenotipi, fertil kadınlardan alınan endometriyal biyopsilerden elde edilen DNA mikro-dizi analizi yapılarak ortaya koyulmuştur ^{71,72}. Yayınlanan veriler yaklaşık 12 000 insan geni içeren çiplerden elde edilmiştir. Bu çiplerdeki genlerin %6'dan daha küçük kısmı tahmin edilen reseptivite fazında önemli ölçüde azalma veya artma göstermektedir. Mikro-dizi ile implantasyon penceresi sırasında osteopontin, DAF, glukodelin, IGF BP-1 genlerinin ifadelerinin arttığı, MMP-7 ve siklin B9 genlerinin ifadelerinin azaldığı gösterilmiştir. Daha önceden değerlendirilmemiş olan Wnt, Dickkopf 1 (DKK1)'in gibi birkaç genin artan ekspresyonları gösterilmiştir. Carson ve arkadaşları tarafından bez gelişimi ve meme bezlerinin hiperplazisine aracılık ettiği gösterilen Wnt 10b sinyal molekülünün implantasyon penceresi sırasında arttığı gösterilmiştir ⁷².

Mikro-dizi yöntemi ile su ve iyon taşınmasında rol alan genlerin ekspresyonunda da önemli artış olduğunu gösterilmiştir. Bu genlerin değişiminin değeri ve miktarı tam olarak belirlenememiştir.

Bulguların yorumlanmasını zorlaştıran spesifik hücre kompartmanındaki değişiklikler birçok ilgi alanında olan gen için kesinleştirilememiştir. Mevcut veriler ile fertil kadınlardan insan endometriyumunun moleküler imzası çıkarılabilir ve tanısal bir çip profili gerçekleştirilebilir ⁷².

2.3.5. İmplantasyon Başarısızlığı

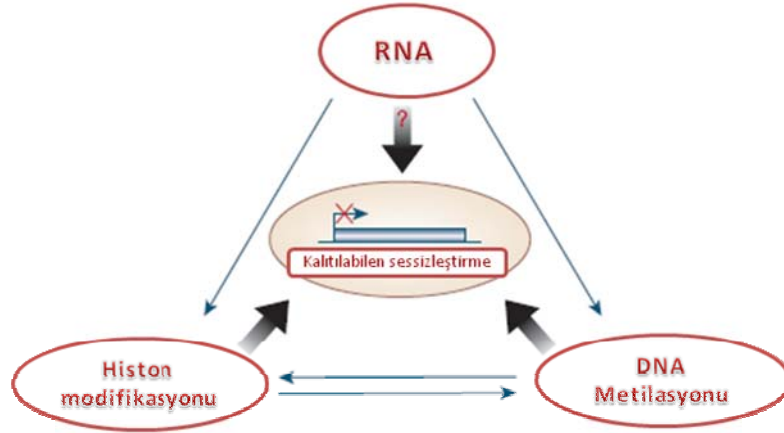
Doğal siklularda her siklusda follikulün gelişimi, sağlıklı olarak atılıp atılmadığı ve döllenme olup olmadığı yakından izlenmezken, IVF uygulamaları ile birlikte embriyo elde edilmesine rağmen gebeliğin her siklusda gerçekleşmediği net bir şekilde kanıtlanmıştır. Hatta her siklus için gebelik başarısını öngörmek adına embriyolar kalite için sınıflanmıştır ve kaliteli embriyo transferine rağmen implantasyonun gerçekleşmediği durumda bir implantasyon başarısızlığından ve altta yatan sorunlardan bahsedilmeye başlanmıştır. **Anne yaşı, oosit ve embriyo kalitesini** etkileyen kötü over rezervi, yaşa bağlı kromozomal anöploidiler, ebeveynde dengeli translokasyon, polikistik over sendromu, **immünolojik etkenler** (antifosfolipid antikorlar), anormal endometriyum sitokinleri ve doğal katil hücre ekspresyonu, ebeveynde ortak insan lökosit, antijenlerinde fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanan **otoimmün hastalıklar**, endometriyal reseptiviteyi etkileyen anormal endometriyal östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonu, anormal endometriyal integrin ve pinopod ekspresyonu, luteal faz bozuklukları, endometriyal polipler ve submüköz fibroidler, intramural fibroidler, hidrosalpinksler, endometriyozis, enfeksiyon, gibi **uterin, tubal ve peritoneal etkenler**, **stimülasyon protokolleri ve kültür ortamları** implantasyon başarısızlığının nedenleri arasında sayılmaya başlanmıştır ⁷³.

İmplantasyon başarısızlığının tanımı her yerde değişmekle birlikte, sık kullanılan kriterler, iyi kalitedeki embriyolar transfer

edilmesine rağmen, ard arda yapılan 3 ya da 2 IVF denemesinde implantasyonun başarısız olmasıdır. Blastokist ve endometriyum arasındaki etkileşime katkısı olan faktörler üzerindeki araştırmalar, pahalı ve zahmetli IVF uygulamalarındaki başarıyı arttırmak için önemlidir ⁷³.

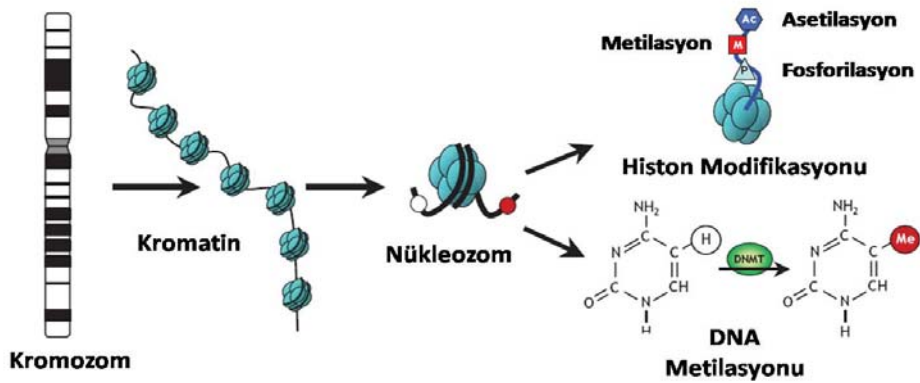
2.4. Epigenetik, Genomik İmprinting ve İmprint Genler

“Epigenetik” terimi DNA sekansında herhangi bir değişikliğe yol açmadan gen ekspresyonunda oluşan, mayoz ve mitoz bölünme ile aktarılabilen tüm değişiklikleri içermektedir ⁷⁴. Bir DNA sekansının taşıdığı genetik bilgi epigenetik modifikasyonlardan sonra tamamlanır. Epigenetik düzenleme DNA metilasyonu, RNA sessizleştirilmesi (kodlanmayan RNA, antisense transkriptler), kromatinle ilişkili yapıların modifikasyonu (histonların modifikasyonları, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon) yoluyla sağlanabilir (Şekil 3). Bunların içinde en çok araştırılan DNA metilasyonudur ve bu yolla genlerin aktivitesi değiştirilebilir. Genin promotör bölgesinin metillenmesi transkripsiyonu kontrol ederek, gen inaktivasyonunu veya aktivasyonu yoluyla gen ifadenmesini düzenler. Bu sayede damgalanan genlerin dozajları ve etkinlikleri kontrol edilir. Bu mekanizmalardan birinde gerçekleşecek bir hata gen ifade düzeylerinde değişikliğe neden olarak epigenetik hastalıklara yol açabilir ⁷⁴. Başta DNA metilasyonu olmak üzere epigenetik mekanizmaların bozulması sonucu kanser, pediatrik sendromlar, nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklar görülmektedir ⁷⁵.



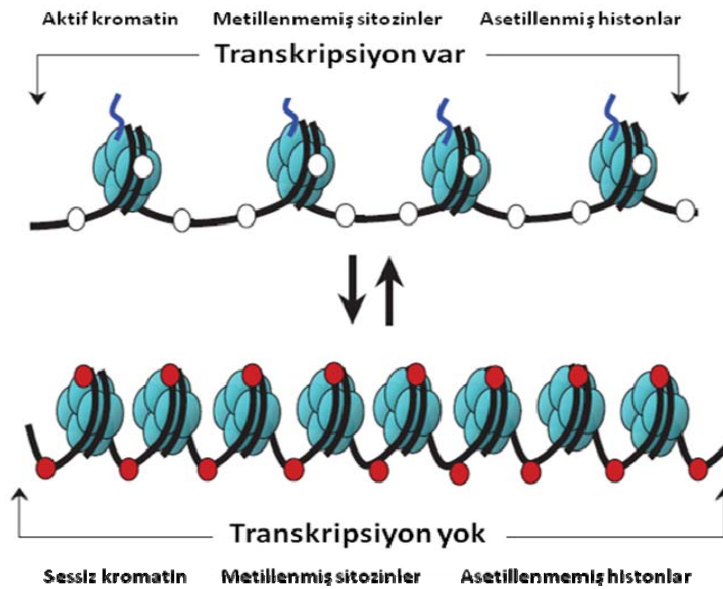
Şekil 3: RNA, histon modifikasyonu ve DNA metilasyonu arasındaki ilişki.

Histon modifikasyonunda histon proteinlerinin amino ucunda çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar görülmektedir. Bu modifikasyonlar asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikutinizasyon, ADP ribozilasyon ve sumozilasyon gibi biyokimyasal değişimlerdir ^{76,77} (Şekil 4). Histon modifikasyonlarının en önemlilerinden biri olan histon asetilasyonu, histon asetil transferaz (HAT) enzimi aracılığı ile gerçekleşirken, deasetilasyonu histon deasetilaz (HDAC) enzimi ile gerçekleşir. Histon metilasyonu ise histon metil transferazlar (HMT) aracılığı ile gerçekleşir ⁷⁸.



Şekil 4: Epigenetik modifikasyonlar

Özellikle DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu gibi kromatin yapısında değişime neden olan epigenetik mekanizmalar gen ifade düzeylerini etkilerler ⁷⁶⁻⁷⁸. Negatif yüklü olan asetil gruplarının histonlara aktarılmasıyla kromatin yapısı gevşer ve bu bölgeler transkripsiyonun aktif olduğu bölgelerdir. Histon deasetilasyonu ile kromatin yapısı daha yoğun hale gelir. Deasetile bölgeler transkripsiyon açısından aktif olmayan bölgelerdir ⁷⁸ (Şekil 5).

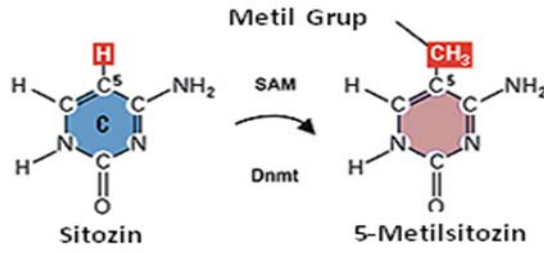


Şekil 5: Gen ifade düzeyini etkileyen kromatin organizasyonunda görülen geri dönüşümlü değişimler

Gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmaların en önemlileri ve üzerinde en çok çalışılan DNA metilasyonudur ⁷⁹. DNA metilasyonu baz diziliminde yer alan CG çiftleri halinde bulunan sitozinlerin 5. karbonuna metil grubu takılmasıyla gerçekleşir ⁸⁰. Metil gruplarının aktarılmasında DNA metiltransferaz enzimi görev alır ⁷⁹. DNA metilasyonunda metil vericisi olarak S-Adenozil metiyonin kullanılır ⁸⁰ (Şekil 6). DNA metilasyonu genellikle genlerin

promotor bölgelerinde yer alan CpG adalarında görülür ve gen aktivitesini etkiler⁸¹.

Promotör bölgelerdeki metilasyon transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek ve kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyon miktarını etkiler ve gen ifadesini kontrol eder^{79,82}. Aynı zamanda promotor bölgelerinin metilasyonu ile metillenmiş bölgelere özgü proteinlerin bağlanması hedef transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engeller⁸⁰. Genomik imprinting ve X-kromozom inaktivasyonu gibi cinsiyet farklılaşmasını düzenleyen olaylar DNA metilasyonu sonucu gerçekleşir^{83,84}.



Şekil 6: DNA metilasyonu

Mikro RNA (miRNA), small-interfering RNA (siRNA) ve XIST gibi kodlamayan RNA (non-coding RNA) adı verilen bazı küçük RNA moleküllerinin epigenetik süreçte rol aldıkları son yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. RNA interferans olarak bilinen miRNA'lar posttranskripsiyonel ve posttranslasyonel sessizleştirilmelerde görevliken, XIST RNA X kromozom inaktivasyonundan sorumludur⁸⁵.

RNA'ların, histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için itici güç oluşturduğu düşünülmektedir. DNA metilasyonu sonucu RNA'ların heterokromatin bölgenin oluşumuna

katkıda bulunarak kalıtsal olarak sessizleştirilmesini sağladığı düşünülmektedir^{74, 86}.

2.4.1. Imprint Genler ve Üreme

Embriyo-fetal gelişim üzerine yapılan çalışmalarda, 1980 li yılların başında memeli parental genlerinde fonksiyonel asimetri olduğu keşfedildi. Fare çalışmalarında partogenetik olarak aktive edilmiş iki erkek pronükleusu (Androgenetik E) ekstraembriyonik dokuların gelişimini sağlarken iki dişi pronükleusundan (jinogenetik E) ise embriyo gelişimi olduğu görülmüştür. Başka çalışmalarda ise paternal eksprese edilen genlerin (PLGAL1, PEG1/MEST, IGF2 ve PEG3) fetal büyümeyi uyarırken bu genlerdeki fonksiyon kaybının IUGR ile sonuçlandığı, maternal eksprese edilen genlerin (IGF2R, GRAB10, H19, CDKN1C, TSSC3, MASH2 ve MEG3) fetal gelişimi sınırlaması ve bunlardaki fonksiyon kaybının aşırı büyüme ile sonuçlandığı gösterilmiştir⁸⁷⁻⁸⁹.

Imprint genlerin çoğu gelişmekte olan fetusda, doğum sonrasında metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynayacak olan dokularda ifade edilir. Bu bulgu, gelişimsel olarak düzenlenen, epigenetik olarak kontrol edilen bu genlerin, fetusun ekstrauterin kaynak regülasyonunun düzenlenme sürecine katıldığını gösterir. İki ebeveynden gelen alellerden birinin veya ikisinin epigenetik olarak baskılanması ya da aktivasyonu, onları, muhtemelen adaptasyon ya da epimutasyon yolu ile in utero dozaj değişikliklerine karşı hassas duruma getirir ve bu durumun etkileri yaşamın daha sonraki yıllarında da görülür⁹⁰. Imprint genlerin en az iki bağımsız prenatal büyüme yolağı üzerinden etkili oldukları gösterilmiştir⁹¹. Tüm bu veriler maternal ve paternal genomun fonksiyonel olarak eşit olmadıklarını ve normal embriyonik gelişim için her ikisinin de gerekli olduğunu ortaya koymuştur⁹².

1990'lı yıllara gelindiğinde bu farkın nedeni olarak gamet gelişimi sırasında genomun bazı bölgelerinin işaretlendiği ve sonra farklı olarak ifadelendikleri tespit edilmiştir, genlerin alel spesifik olarak eksprese edilmesi, genomik imprinting kavramını ortaya çıkarmış ve bu durumun iki parental alelin farklı epigenetik düzenlenmelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir ^{92, 93}.

Genomik imprinting, genetik materyalin paternal ya da maternal kökenli olmasına bağlı olarak hem kromozomal hem de alelik düzeyde farklı ifade edilmesi olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmaları takiben yapılan çoğu hayvan çalışması ve deneysel çalışmalarda da normal embriyo-fetal gelişim ve büyüme için görev alan genlerin önemli bir kısmı imprint genler olduğu gösterilmiştir ^{88,94}.

Daha sonra insanlarda yapılan çalışmalarda da imprint genlerin embriyo-fetal gelişim ve plasentasyonda görev aldığı gösterilmiştir ^{88,95}. Epigenetik programlamanın gerçekleştiği iki kritik dönem mevcuttur: birincisi gametogenez dönemi diğeri ise preimplantasyon dönemidir ⁸³. Gametogenez sırasında gerçekleşen programlama “imprinting” mekanizması için esastır. Damgalama mekanizması anneden ve babadan gelen genlerin farklı olarak ifade edilmesine imkan tanımaktadır. Başlangıçta gonadlara giren primordial germ hücrelerinde demetilasyon işlemi hem damgalanmış hem de damgalanmamış tüm genler için gerçekleşir ve hücreler erkekte mitozda ve kadında mayozda beklemeye başlar. Takiben, hücre siklusunun devamında, spermelerde daha fazla olmak üzere yeniden metilasyon işlemi başlar ve hem sperm hücresinin hem de ovumun genetik materyalleri tüm genleri içine alacak şekilde metillenmiş olur. Eğer fertilizasyon gerçekleşirse ikinci bir kez hızlı bir demetilasyon süreci

başlar fakat bu dönemdeki demetilasyondan damgalanmış genler korunurlar ⁹⁶. Demetile olmuş diğer genlerde ise implantasyondan hemen önce tekrar metilasyon gerçekleşir ⁸⁸. İmplantasyondan hemen önce gerçekleşen bu epigenetik programlanmada esas hedef implantasyon, plasentasyon, embriyo-fetal büyüme ve gelişimi kontrol eden damgalanmış olan genlerdir. Damgalanmış genler, diğer genlerden farklı olarak, ikinci demetilasyon işleminden etkilenmediklerinden fertilizasyondan sonra da metillenmiş durumlarını korurlar ve implantasyon öncesi gerçekleşen bu metilasyon ve demetilasyon aşamalarından etkilenmezler ve bu yolla etkileri uygun dozda aktif olarak gösterirler ⁹⁶.

Bu genlerin uygun şekilde aktivitelerini gösterebilmeleri için bu aşamalarda, metilasyonun, zamanında ve doğru olarak kurulması, bu kurulumun aktarılması ve korunması gereklidir. Bu sırada oluşacak herhangi bir kusur bu genlerin aktivitelerini değiştirerek gelişimi herhangi bir noktada durdurabilir ya da anormal gelişime yol açabilir.

Epigenetik mekanizmaların diyet, ilaçlar gibi çevresel faktörlerden etkilenmesi YÜT'ün de sorgulanmasına neden olmuştur ve en azından iki noktada YÜT işlemlerine bağlı değişiklikler olabileceği düşünülmüştür. YÜT işlemleri ile asıl ilişkilendirilen konuların biri tüm bu metilasyon ve demetilasyon işlemlerinde rol alan DNA metiltransferaz (DMT) enzimlerinin etkilenmesidir. Metilasyon ve demetilasyon işlemleri için birkaç DMT rol almaktadır. DNMT1 metillenmiş kalıbı koruma görevi görürken, DNMT3A ve DNMT3B enzimleri de-novo metilasyondan sorumludurlar ⁸⁸. Embriyo kültür ortamlarının etkilerini araştıran çalışmalarda DNA metil transferazlarının aktivitelerinin kültür içeriklerinden etkilenebildiği ve dolayısıyla hem gamet hem de embriyoda

implantasyon ve embriyonel gelişim dönemlerinde epigenetik değişikliklerin ortaya çıkabileceği gösterilmiştir ^{88, 97, 98}.

Embriyo kültür protokollerinde yapılacak değişikliklerin damgalanmış gen kusurlarında azalmaya (ya da artmaya) yol açacağı düşüncesinden yola çıkılarak yapılan hayvan çalışmasında Whitten kültür ortamının kullanımıyla fetal büyümeden sorumlu H19 damgalanmış geninin kaybının arttığı tespit edilmiştir ⁸⁹. Fare embriyolarında kültür ortamları, konsantrasyonları ve kültürde kalma süreleri değiştirilerek embriyonal gelişimden sorumlu olan H19, IGF2, Grb7, Grb10 gibi genlerin ekspresyonlarının değiştiği gösterilmiştir ⁹⁷.

Koyunlarda ise kültür ortamlarının IGF2R geninde kusurlu metilasyon ile anormal büyümeye neden olduğu gösterilmiştir ⁹⁸.

Yine hayvan çalışmalarında farklı embriyo kültür ortamlarının uzun dönemde nörogelişimsel ve davranış kusurları ortaya çıkardığı gösterilmiştir ⁹⁹⁻¹⁰².

Yine insanlarda da çok sayıda hastalık ve sendromun ortaya çıkmasında bu mekanizmanın etkisinin olduğu gösterilmiştir. Beckwith- Wiedeman sendromu (BWS), Prader-Willi sendromu (PWS), Angelman sendromu (AS), Russel- Silver sendromu genomik imprinting' in en önemli örneklerindendir ¹⁰³. Örneğin PWS ve AS' larının her ikisi de 15. kromozomun q11-13 bandında görülen delesyon sonucu oluşmaktadır. Bu delesyon paternal kaynaklı olursa PWS, maternal kaynaklı olursa AS oluşur ve bu iki sendrom farklı klinik özellikler gösterirler ¹⁰⁴.

YÜT ile epigenetik kusurların gelişmesine neden olabilecek diğer sorunlar ise ovulasyon indüksiyonu ile elde edilen ovumların ve immatür spermilerin kullanılmasıdır. Ovulasyon indüksiyonu ile elde edilen ovumların maturasyon süreçlerinin, dolayısıyla metillenme durumunun farklı olması ve immatür spermelerde henüz kurulmamış metillenmemiş ya da metillenme süreçlerini tamamlanmamış spermilerin işlem için kullanılması sonucunda embriyo-fetal ve plasental gelişimin etkilendiği gösterilmiştir ¹⁰⁵.

Yine başka çalışmalarda süperovulasyon siklusları sırasında oositte metilasyon kusurunun attığı(%20v.s%10), oosit kalitesinin bozulduğu, embriyoda (iki hücre) anormal metilasyon, anormal blastokist oranı ve embriyo-fetal gelişme geriliği gösterilmiştir ^{106,107}.

Ayrıca ICSI sırasında gamet ve embriyonun manipülasyonları ile hücresel stress artışı ile imprinting hasarları arasında ilişki gösterilmiştir ¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

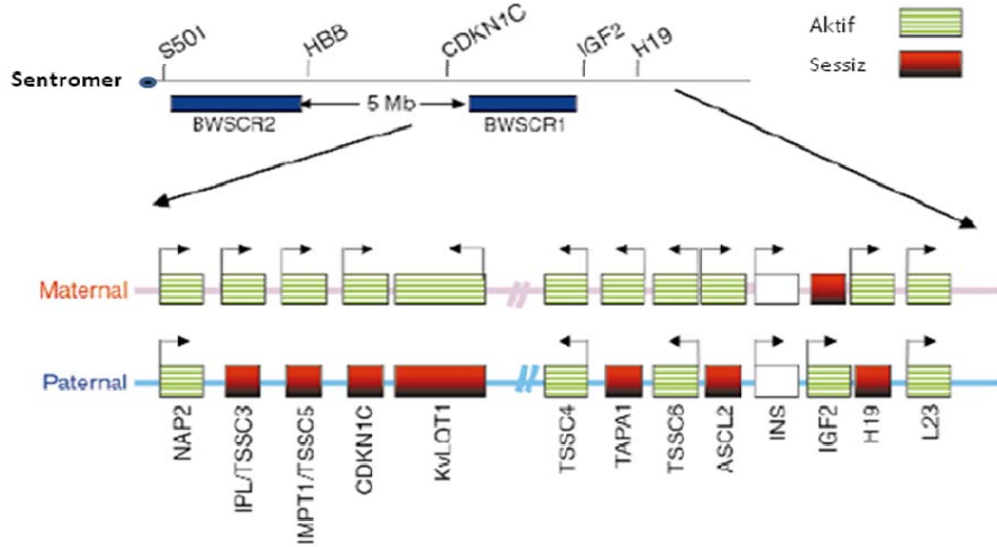
In vitro manipülasyonlar oositin hücre iskeletine zarar verebilir ve oosit içine verilen eksojen materyal ve sitoplazma sızması imprinting için gerekli enzimlerin kaybına neden olabilir ¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

Tüm bu veriler ışığında söylenecek olursa, bugün için ortaya koyulan ve yaklaşık yüz kadar olduğu düşünülen damgalanmış genlerin hemen tümü implantasyon, plasantasyon ve embriyo-fetal gelişim için gereklidir, ve normal gelişim için bu genlerin uygun dozlarda ve uygun zamanlarda aktivasyonları önemlidir. Araştırma sonuçlarına bakıldığında YÜT işlemlerinin çeşitli dönemlerde bu genleri etkileyerek aktivasyonlarını değiştirebilme olasılığı vardır ve YÜT sonrası bildirilen kötü gebelik sonuçlarında da etkisi olabilir ¹¹¹.

Son zamanlarda sonuçları açıklanan çalışmalarda bildirilen, preterm riski, düşük doğum ağırlığı riski, yapısal ve kromozomal anomalilerde artış, plasantasyon kusurları, bu gen kusurları ile ne kadar ilişkilendirebilir henüz tam olarak söylemese de YÜT işlemlerinin bağlı artmış riskler olabilir.

2.4.2. İmprint Genler

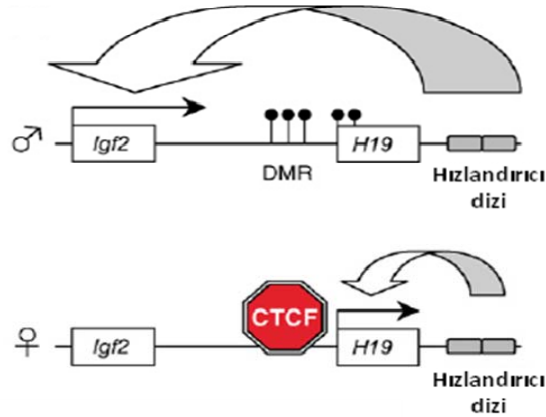
H19 ve IGF2 11. kromozomda yerleşmiş imprint gen kümesinin bir bölümünü oluşturur (Şekil 7). H19 geni yalnızca maternal olarak ifade edilirken IGF2 geni paternal ifade edilir ^{87, 112}. H19 ve IGF2 karşılıklı etiketlenen genlerdir. IGF2 bir büyüme faktörü iken H19'un bir tümör baskılayıcı gen olarak görev yaptığı düşünülmektedir ²⁰. IGF2, mannoz-6-fosfat reseptörü (IGF2/M-6-P R), IGF2 1 (IGF1R) reseptörü, insülin reseptör izoform A (IR-A) gibi birden fazla reseptöre bağlanabilir. Mitojenik etkisini IGF1R ve IR-A reseptörleri aracılığı ile gösterir ¹¹³. H19'un fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemekle beraber düzenleyici görevi olduğu düşünülmektedir ^{114, 115}. H19'un proteine translasyonu olmaz ve RNA molekülü olarak fonksiyon gösterir ¹¹⁶. H19'un endometriyal ve folliküler değişikliklere paralel olarak ifade edildiği gösterilmiştir. Endometriyum ve over dokularında postnatal hayatta H19 ifadesinin devam ettiği gösterilmiştir ²¹. H19 ifadesi özellikle embriyogenez ve fetal hayatta belirgin olup ¹¹⁴, postnatal dönemde birçok dokuda baskılanır ¹¹⁵. IGF2 ifadesinin de endometriyumda izlendiği ve menstrual siklusun farklı dönemlerinde değiştiği gösterilmiştir ²¹.



Şekil 7: İnsan kromozom 11p15.5' de yerleşmiş imprint gen kümesi ¹¹⁷

Leighton ve ark. tarafından endometriyal dokularda H19 promotörünün aşağı bölgesinde 7 ila 9 kb arasında yerleşmiş bir dizi hızlandırıcı dizi tanımlanmıştır. Aynı zamanda bu iki genin etiketlenmesi birbirine bağlıdır. Örneğin H19 geninin ve genin yukarı bölgesinde 10 kb' lık bir bölgenin delesyonu IGF2' nin biallelik ifadesine neden olur ^{118,119}. Moleküler çalışmalar sonucunda H19 geninin yukarı bölgesinde yer alan dizilerin H19 ve IGF2' nin monoalelik ifadesinde önemli rol aldığı gösterilmiştir ¹²⁰. H19 geninin yukarı bölgesinde -3.7kb' dan -2.1 kb' a kadar uzanan ve farklı metilasyon örüntüsüne sahip (DMR) bölgenin delesyonu paternal kalıttımda H19 geninin, maternal kalıttımda ise IGF2' nin biallelik ifadesine neden olur ¹²¹. Bu olaya imprinting kaybı (LOI) adı verilmektedir. Bu çalışma bize DMR bölgesinin bu iki genin monoalelik ifadesindeki önemini göstermektedir. H19 ve IGF2' nin imprinting kaybıyla gerçekleşen biallelik ifade, Wilms tümör, Ewing sarkom, emriyonal rabdomiyosarkom, germ hücre tümörleri, akciğer ve renal hücre

karsinomları gibi birçok pediatrik ve erişkin malignansilerde gözlenmektedir¹²²⁻¹²⁷. DMR bölgesi aynı zamanda etiketlenmiş genlerin imprint kontrol bölgesi (ICR) olarak görev yapar¹²⁸. ICR bölgesi CTCF olarak bilinen çinko parmak (CCCTC) bağlanma proteini için uygun diziyi içerir¹²⁹⁻¹³¹.



Şekil 8. IGF2 ve H19 gen bölgesinde etiketlenme modeli¹³¹

CTCF bağlanma dizisinin metillenmesi CTCF proteininin bağlanmasını engeller. Paternal alelde DMR bölgesinin metilasyonu CTCF bağlanmasını engeller ve H19 geninin aşağı bölgesinde yer alan hızlandırıcı diziler IGF2 promotörüne etki ederek ifadenmesini sağlar¹³². Maternal alelde ise metillenmemiş DMR bölgesine CTCF bağlanır ve maternal IGF2 ifadesini engeller ve hızlandırıcı diziler H19 geninin ifade edilmesini teşvik eder¹³²⁻¹³³ (Şekil 8).

2.4.3. Imprint Genler Endometriyum

Açıklanamayan implantasyon başarısızlığında, olgular dikkate alındığında ortaya koyulanların dışında çok sayıda faktörün ve belki de bugüne kadar ortaya çıkarılanların dışında birçok diğer genin de implantasyon sürecinde rol alması mümkündür. Plasentasyon ve

embriyo-fetal gelişimdeki rolleri net bir biçimde ortaya koyulmuş olan imprint genlerin implantasyondaki rolleri henüz yeterince araştırılmamıştır. Plasentasyon süresinde bu kadar aktif rol alan imprint genlerin implantasyon basamağında rol alması olasılık dahilindedir. Bu amaçla plasentasyon ve embriyo fetal gelişim üzerine etkileri araştırılmış olan çok sayıda imprint gen mevcuttur. Bunlardan paternal eksprese edilen genler (PLGAL1, PEG1/MEST, IGF2 ve PEG3) fetal büyümeyi uyarırken, bu genlerdeki fonksiyon kaybı IUGR ile sonuçlanır. Maternal ifade edilen genler, IGF2R, GRAB10, H19, CDKN1C, TSSC3, MASH2 ve MEG3 ise fetal gelişimi sınırlar. IGF2 ve H19 üzerinde en çok araştırma yapılan imprint genlerdir ^{134,135}.

Bu iki genin endometriyum dokusundaki ifade düzeyi aynı zamanda menstrüel siklusun fazlarıyla da farklılık göstermektedir. Proliferatif faz ve erken sekretuar dönemde çok düşük seviyelerde bulunan IGF2 ifadesi geç sekretuar fazda yüksek seviyelere ulaşmaktadır ²¹. IGF2 ifadesi stromal hücrelerde ve glandüler epitelde gözlenir. Uterin IGF2 mRNA düzeyi östradiole karşı 7 kat artışla cevap verirken progesterona karşı herhangi bir artışa neden olmaz ^{136,137}. IGF2' den farklı olarak sadece endometriyumdaki stromal hücrelerde proliferatif fazda orta derecede H19 ifadesi olduğu bulunmuştur. H19 ifadesi ovülasyonla birlikte hemen düşmekte ve erken sekretuar fazda oldukça düşük seyretmektedir. Daha sonra giderek artmakta ve siklusun 21. gününde oldukça yüksek seviyelere ulaştıktan sonra hafif artışla siklusun sonunda en yüksek değerine ulaşmaktadır ²¹.

Bu genlerin ifadelenmesinin postnatal hayatta pek çok dokuda baskılanırken endometriyumda devam etmesi ve menstrüel siklusun fazlarıyla değişiklik göstermesi embriyo implantasyonunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 01/2005-65 kod'lu bu çalışma için üniversitemiz yerel etik kurul onayı alındı. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Hasta Seçimi ve Örneklerin Alınması

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran kadınlar dahil edildi. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve Gazi Üniversitesi Bilimsel araştırma Projeleri (BAP) Bölümü tarafından desteklenmiştir. YÜT'de implantasyon başarısızlığı için en az iki kaliteli embriyo transferi ve Beta HCG ile gebeliğin oluşumunu takiben gebelik kaybı ile sonlanan olgular seçildi.

Çalışma grubuna 15 infertil ve kontrol grubunu oluşturmak üzere 16 fertil olgu dahil edildi. Seçilen olgularda oldukça sıkı hasta seçim kriteri uygulandı ve endometriyoma, anovulasyon, PKOS, tubal infertilite, gibi endometriyumda etki oluşturabilecek hastalığı olan tüm olgular çalışma dışı bırakıldı. Bu patolojilerin tümünde endometriyumun fonksiyonel değişime uğradığı ve implantasyon başarısızlığı kadar abortusda etken oldukları iddia edilmektedir. Biz de endometriyum üzerindeki çevresel etkiyi en aza indirmek açısından tamamen sağlıklı olan ve erkek üreme faktörü nedeniyle gebe kalamamış olguları çalışma grubuna dahil ettik. Bu arada gen ifadesi üzerine etki oluşturabilecek, ilaç kullanımı, sigara, diğer sistemik hastalıkları (Hipertansiyon, hipertiroidi, hipotiroidi, hematolojik hastalık, böbrek hastalığı, diabetes mellitus, kalp

hastalığı, kollajen doku hastalığı vs) olan kadınlarda çalışma dışında bırakıldı.

Yine hereditör trombofili, (pt, aptt, protein c, protein s, antitrombin 3, aktive protein C rezistansı, homosistein, faktör 5 Leiden mutasyonu, protrombin gen mutasyonu, MTFHR mutasyonu) ve akkiz trombofili, (lupus antikoagülan, AKL Igm, AKL Igg, Anti DNA) sonuçları açısından da gruplar karşılaştırdı ve istatistiksel anlamlılık bulunmadı. Sonuçlar bulgular bölümünde ayrıntılı verilmiştir.

Doku örnekleri (endometriyum) GÜTF Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisine başvuran çalışmaya alınması uygun olan olgulardan endometriyal biyopsi ile alındı. Doku örnekleri salin solüsyonu ile yıkanarak analiz süresine kadar -80 °C de saklandı.

3.1.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikleri

Hasta grubunu erkek faktörü nedeniyle IVF tedavisi yapılan, en az 1 kez bir veya daha fazla kaliteli embriyo transferine rağmen implantasyon olmayan hastalar oluşturdu. İmplantasyonu direk olumsuz etkileyebilecek hidrosalpenks, endometriyal polip, myoma uteri gibi patolojisi olan hastalar çalışma dışında tutuldu. Anovulasyonu olan hastalar da postovulatuvar dönemde endometriyal örnekleme yapılamayacağı için çalışma grubuna dahil edilmedi.

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 15 hasta çalışma grubunu oluştururken fertilitatesini kanıtlamış 16 ovulatuar 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 ¹³⁸. Tiroid fonksiyon testleri normalken yalnız tiroid antikor pozitifliğinin görüldüğü durumların infertilite üzerine etkileri net olmadığından tiroid antikorları rutin olarak her iki grupta da çalışılmadı ¹³⁹.

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 ya da çok hızlı embriyo gelişiminin implantasyon oranlarını olumsuz yönde etkilediği konuyla ilgili çalışmalarla gösterilmiştir ^{141,142}. Üçüncü gün optimal bölünme hızı olan embriyolar transfer edildiğinde daha yüksek implantasyon oranları ile karşılaşmıştır ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Yapılan çalışmalar eşit bölünmeyen embriyoların transferiyle gebelik ve implantasyon oranlarının olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir ^{145,146}. Bölünme hızı ve blastomer boyutuyla birlikte embriyo fragmentasyonu da embriyo seçim kriterleri arasında yer almaktadır ¹⁴⁷. Bu bakımdan blastomer büyüklüğü embriyo 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 15 hastanın hepsinde daha

önce iyi kalitede (Grade I) en az bir embriyo transferi yapılmış ve gebelik elde edilememiştir.

3.1.2. Endometriyal Örnekleme İçin Hasta Takibi

Yukarıdaki kriterlere uyan hastalara ve kontrol grubunu oluşturan olgulara 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 hastalardan LH+7 ile LH+12 günler arası veya ultrasonografik olarak ovulasyon tespit edilen hastalardan ovulasyon sonrası 6. günden sonra endometriyal biyopsi alınmıştır. Endometriyal biyopsi günü önce serum progesteron bakılarak hormonal olarak sekresyon dönemine girdiği doğrulanmıştır. Endometriyal 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 sürer⁹.

- IGF2 ve H19 genlerinin LH+7 döneminde daha fazla ifade edildiği bulunmuştur.
- Seçilen 20-26. gün arasındaki periyot hem implantasyon penceresini oluşturmakta hem de IGF2 ve H19 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 endometriyal biopsi kanülü ile uterin kaviteye girilerek bir seferde endometriyal 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 klasifikasyonuna¹⁴⁸ göre endometriyal günleme yapmak amacıyla patolojik inceleme için gönderilmiştir.

3.2. Araç ve Gereçler

3.2.1. Laboratuvar Cihazları

- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Homojenizatör (T10 Basic Ultra-Turrax, IKA-Werke, Almanya)
- Spin vorteks (Biosan FV-2400, Rusya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan TDB-120, Rusya)
- Masaüstü mini soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, ABD)
- pH metre (pH422, WTW, Almanya)
- Mikropipetler (Beta-Pette™ B.10, B.100, B.1000, CLP, ABD)
- Derin dondurucu (-86 °C) (Sanyo MDF-U53865, Japonya)
- Derin dondurucu (-30 °C) (Sanyo MDF-U333, Japonya)
- Güvenlik Kabini (DanLaf VFRS 1206, Danimarka)
- Azot tankı (Air liquide GT212, Fransa)
- Thermal Cyclers (Thermo Hybaid PCR-sprint, ABD)
- Real time PCR cihazı (Roche LightCycler, Almanya)
- Güç kaynağı (Thermo 3000P, ABD)
- Yatay elektroforez tankı (Thermo Scientific, ABD)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic 100, Almanya)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)

3.2.2. Kimyasal Maddeler

- Tris-HCl (Sigma, ABD)
- KCl (Sigma, ABD)
- MgCl₂ (Merck, Almanya)
- CaCl₂ (Merck, Almanya)
- EDTA (Etilendiamintetraasetik asit 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 rekombinant (Roche, Almanya)
- TaqMan Master mix (Roche, Almanya)
- IGF2, H19 ve GADPH primerleri (Tibmolbiol, Almanya)
- IGF2, H19 ve GADPH LNA problemleri (UPL, Roche, Almanya)
- NaCl (Sigma, ABD)
- Tris bazi (Sigma, ABD)
- PCR tamponu (Fermantas, Litvanya)
- dNTP karışımı (DNamp, İngiltere)
- Taq DNA polimeraz (Fermantas, Litvanya)
- Agaroz (ONBIO Inc., Kanada)
- Borik asit (Merck, Almanya)
- Gliserol (Sigma, ABD)
- Orange G (Sigma, ABD)
- RsaI Restriksiyon enzimi (Fermantas, Litvanya)
- ApaI Restriksiyon enzimi (Fermantas, Litvanya)
- 100 bp moleküler ağırlık belirteci (Fermantas, Litvanya)

3.2.3. Kullanılan Kitler

- peqGOLD TriFast™ Dokudan RNA İzolasyon kiti (Peqlab, Erlangen, Almanya)
- Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)
- High Pure PCR Template preparation kit (Roche, Almanya)

3.3. Solüsyonların Hazırlanışı

3.3.1. 0.5 M EDTA Çözeltisi Hazırlanışı

- EDTA 186.1 g
- 800 ml distile su

Kimyasallar çözüldükten sonra 1 litre olacak şekilde üzerine distile su eklendi.

3.3.2. TBE 5X Çözeltisi Hazırlanışı

- Tris 54 g
- Borik asit 27,5 g
- 0.5 M EDTA (pH: 8) 20 ml

Kimyasallar çözüldükten sonra 1 litre olacak şekilde üzerine distile su eklendi.

3.3.3. TBE 1X Çözeltisi Hazırlanışı

- 5X TBE' den 200 ml alınarak üzerine 800 ml distile su eklenerek 1000 ml'ye tamamlandı.

3.3.4. Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı

- 10 mg etidyum bromür 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.3.5. %2'lik Agaroz Jel

- 2 g agaroz
- 100 ml 1x TBE

100 ml toplam hacim olacak şekilde karıştırıldı.

3.3.6. Orange G Jel Yükleme Tamponu

- Gliserol 55ml
- Orange G 100mg
- 1X TBE çözeltisi 45ml

100 ml' ye tamamlandı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Endometriyum Dokusundan Total RNA Saflaştırılması

Endometriyum doku örnekleri steril petride serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun (50 mg – 100 mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. DNaz ve RNaz içermeyen 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 dokuların üzerine 1000 mikrolitre (μ l) TriFast eklendi ve homojenizatör ile parçalandıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 2- 200 μ l kloroform eklenerek, 15 sn boyunca karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu.
- 3- 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 faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
- 4- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 μ l izopropanol eklenip karıştırıldı.
- 5- Örnekler 1.5 saat -20 °C' de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.
- 6- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 μ l DNaz (μ g başına 5U DNaz), 300 μ l DNaz Buffer I ve 400 μ l DEPC'li su eklenerek 30 dk 37 °C' de bekletildi.
- 7- Örneklerin üzerine 300 μ l 25mM EDTA eklendi ve 65 °C' de 10 dk bekletildi.
- 8- 13.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 9- 1000 μ l %75' lik alkol (taze hazırlanır) eklenerek, 12.500 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 10- Çökelti üzerine tekrar 1000 μ l %75' lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.

11- Çökelti kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı. Çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı.

3.4.2. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'ların saflık ve miktar değerleri NanoDrop ND-1000 spektrofotometre cihazında ölçülerek 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: cDNA RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hegzamer primeri	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Ters Transkriptaz	10 ünite	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

RT-PCR karışımı ince çeperli 0.2 ml' lik tüplere hazırlandıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

3.4.2.1 RT-PCR Programı

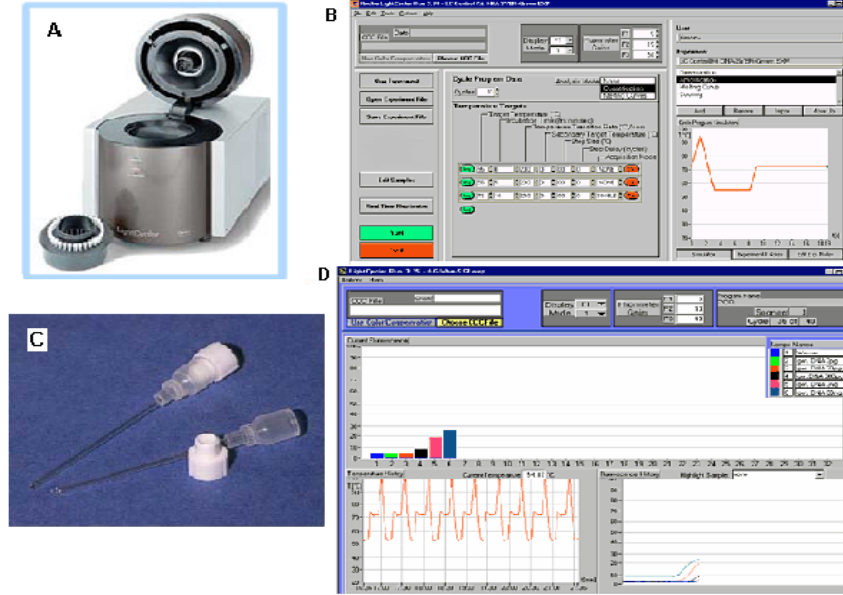
Otomatik ısı döngü cihazı aşağıda belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA'lardan cDNA elde edildi.

	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 sonucu cDNA örnekleri Real Time PCR’da kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

3.4.3. IGF2 ve H19 Genlerinin İfade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi

IGF2, H19, genlerinin ifadesinin kantitatif değerlendirmesi için Light Cycler™ (LC) cihazı kullanıldı (Şekil-9). Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu ve LC TaqMan Master mix kullanılarak gerçekleştirildi. IGF2, H19, gen ifadelerini normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, GADPH genine özgü primer ve UPL TaqMan probu kullanılarak da çalışıldı. Tüm cDNA örnekleri her üç gen içinde ikişer kez çalışıldı.



Şekil 9: Real Time PCR tepkimesi için kullanılan Light Cycler (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

3.4.3.1 IGF2 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

IGF2 genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri Şekil 10' da gösterildi.

IGF2F 5'- AAGTCCGAGAGGGACGTGT-3'
 IGF2R 5'- TCCAGGTGTCATATTGGAAGAAC -3'
 60 numaralı prob dizisi: 5'- ACCCCTTC-3'

5'-AAGTCCGAGAGGGACGTGT-3'

241 GAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGAGGGACGTGTCGACCCCTCCGACCGTG

3'-CTTCCCCA-5'

301 CTCCGGACAACTTCCCCAGATACCCCGTGGGCAAGTTCTTCCAATATGACACCTGGAAG

3'-CAAGAAGGTTATACTGTGGACCT-5'

Şekil 10: IGF2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: ENST00000416167 giriş no'lu dizi). (Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır).

Şekil 10' da gösterilen primer ve probun kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: IGF2 Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
IGF2 PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
IGF2 PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
IGF2 TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
TaqMan mix (10x)	1x	1 µl
cDNA	-	1 µl

3.4.3.2 H19 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

H19 genine ait UPL prob ve primerlerin RNA'daki yerleşimleri Şekil 11'de gösterildi.

H19F 5'-TTACTTCCTCCACGGAGTCG-3'
H19R 5'-GCTGGGTAGCACCATTCTT-3'
46 numaralı prob dizisi: 5'-ATGGCTGC-3'

1441 TCCGGCCTTCCTGAACACCTTAGGCTGGTGGGGCTGCGGCAAGAAGCGGGTCTGTTTCTT
TACTTCCTCCACGGAGTCG-3' 5'-ATGGCTGC-3'
1501 TACTTCCTCCACGGAGTCGGCACACTATGGCTGCCCTCTGGGCTCCAGAACCCACAACA
1561 TGAAGAAATGGTGCTACCCAGCTCAAGCCTGGGCCTTTGAATCCGGACACAAAACCCCTC
3'-TTCTTTACCACGATCCCAGC-5'

Şekil 11: H19 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: NR_002196.1 giriş no'lu dizi).

Şekil 11' de gösterilen primer ve probun kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3: H19 Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
H19 PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
H19 PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
H19 TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
TaqMan mix (10x)	1x	1 µl
cDNA	-	1 µl

3.4.3.3 GAPDH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

GAPDH genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri Şekil 12'de gösterildi.

GAPDHF 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
GAPDHF 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
60 numaralı prob dizisi: 5'-TGGGGAAG-3'

5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

61 TCTTCTTTTGGCTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGTC

5'-TGGGGAAG-3'

121 GGAGTCAACGGATTGGTCGTATTGGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAACCTCTGGT

3'-CCTAAACCAGCATAACCCG-5'

Şekil 12: GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: ENST00000229239 giriş no'lu dizi).

Şekil 12'de gösterilen primer ve probun kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 4'de gösterildi.

Tablo 4: GAPDH Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
GAPDH PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
GAPDH PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
GAPDH 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. Tüpler yerleştirildikten sonra LC cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. IGF2, H19 ve GAPDH genleri için aynı PCR programı kullanıldı.

IGF2, H19 ve GAPDH Light-Cycler Deney 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	

Deney sonucunda elde edilen Cp (Crossing point) değerleri kullanarak Pfaffl matematiksel metodu ile hasta ve kontrol grubu arasındaki IGF2 ve H19 mRNA düzeylerindeki değişimler belirlendi. GADPH mRNA düzeyleri IGF2 ve H19 düzeylerini normalize etmek amacı ile kullanıldı.

3.5. Endometriyum Dokusunda IGF2 ve H19 Genlerinin Metilasyon Düzeylerinin (allelık ifadelerinin) Belirlenmesi

IGF2 ve H19 genlerinin allelik ifadelerini belirlemek amacıyla endometriyum dokularından genomik DNA elde edildi. IGF2 geninde tanımlanan (rs680) ve H19 geninde tanımlanan (rs2839704) polimorfizmleri Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemiyle belirlendi. Heterozigot olan örneklerin, RNA' larından elde edilen cDNA' lar aynı primerler kullanılarak ile çoğaltıldı ve RFLP yöntemiyle genotiplendirildi. DNA ve cDNA genotiplendirme sonuçları karşılaştırıldı. Buna göre; DNA ve cDNA genotipi heterozigot olan örnekler biallelik, DNA genotipi heterozigot, cDNA genotipi homozigot olan örnekler ise monoallelik olarak kabul edildi.

3.5.1 Dokudan Genomik DNA Eldesi

Hastadan steril pipet ile alınan endometriyum örneklerinden High Pure PCR Template preparation kit kullanılarak genomik DNA elde edildi. DNA eldesinde kullanılan kit protokolü aşağıda belirtilmiştir.

- 1- Küçük parçalara ayrılmış doku örneği üzerine 200 µl doku parçalayıcı solüsyon, 40 µl Proteinaz K eklenerek tüm doku tamamen parçalanana kadar 1 saat 55 °C' de bekletildi.

- 2- 200 µl nükleotit bağlayıcı solüsyon eklenerek 70 °C' de 10 dakika bekletildi.
- 3- 100 µl izopropanol eklenerek karıştırıldı.
- 4- Kalan doku parçaları pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- 5- Toplama tüpüne kitin içinden çıkan filtre yerleştirildi. Örneğin sıvı kısmı filtreye aktarıldı.
- 6- 8000 g' de 1dakika santrifüj edildi.
- 7- Filtre yeni bir tüpe yerleştirildi.
- 8- 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı solüsyon eklendi.
- 9- 8000 g' de 1dakika santrifüj edildi.
- 10- Filtre yeni bir tüpe yerleştirildi.
- 11- 500 µl yıkama solüsyonu eklendi.
- 12- 8000 g' de 1dakika santrifüj edildi.
- 13- Filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 14- 500 µl yıkama solüsyonu eklendi.
- 15- 8000 g' de 1dakika santrifüj edildi.
- 16- Tüpün altındaki sıvı döküldü ve filtre aynı tüpe yerleştirildi.
- 17- 13000 g' de 5 dakika santrifüj edildi.
- 18- Filtre yeni 1.5 ml' lik ependorf tüpe aktarıldı. Daha önceden ısıtılmış çözücü solüsyon'dan 200 µl eklendi.
- 19- 8000 g' de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen genomik DNA -20 °C' de saklandı.

3.5.2. Genomik DNA ve cDNA'dan IGF2 Geni (rs680) Polimorfizminin Belirlenmesi

IGF2 geni rs680 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler eşliğinde çoğaltıldı. cDNA ve genomik DNA' dan elde edilen PCR ürünlerinin büyüklükleri, reaksiyon sırasında kullanılan malzemelerin oranları ve PCR koşulları aynıdır.

3.5.2.1 IGF2 Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen primerler kullanılarak 292 bç' lik bölge PCR ile çoğaltıldı. Seçilen primerlerin genomdaki yerleşimleri aşağıdaki Şekil 13'de gösterilmiştir.

ApaP1F (Forward Primer) 5'CTT GGA CTT TGA GTC AAA TTG G 3'

ApaP1R (Reverse Primer) 5'GGT CGT GCC AAT TAC ATT TCA TTT GCA3'



Şekil 13: IGF2 gen bölgesini çoğaltan primerler ve bölgenin genomdaki yerleşimi ve rs680 polimorfizmi için kullanılan ApaI restriksiyon enzimi ve kesim yeri. Referans: ENSG00000167244 giriş no'lu dizi.

IGF2 gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan malzemelerin oranları aşağıdaki Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5: IGF2 gen bölgesi PCR karışımı

	Stok	Son derişimi	Total Hacim: 50 µl
dH ₂ O	-	-	37.7 µl
PCR tamponu	10x	1x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 Mm	3 µl
dNTP	10 mM	100 µM	0.5 µl
ApaP1F	100 pmol/µl	50 pmol/µl	0.5 µl
ApaP1R	100 pmol/µl	50 pmol/µl	0.5 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	1.0 U/µl	0.2 µl
DNA veya cDNA	-	-	2.5 µl

PCR tepkime karışımı tablodaki miktarlara göre hazırlandı. Karışım PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan genomik DNA veya cDNA örneğinden 2.5 µl eklendi. Otomatik ısı döngü cihazında Tablo 6'da belirtilen programa göre PCR tepkimesi uygulandı.

Tablo 6: IGF2 PCR programı

	Derece	Süre	Döngü Sayısı
Ayrılma	94°C	5dk	1
	94°C	30 sn	30
Primer Bağlanması	55°C	1 dk	
Zincir Uzaması	72°C	1 dk	
Zincir Uzaması	72°C	5 dk	1

Çoğaltılan PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.5.2.2 IGF2 Geni PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Değerlendirilmesi

PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası örnekler %2'lik agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 50 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü. Jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip fotoğrafı çekildi.

3.5.2.3. IGF2 Geni PCR Ürünlerinin Apal Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Apal, *Acetobacter pasteurianus*' un *Apal* genini taşıyan *E. coli*'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı 5'-GGGCC[↓]C-3' dizisinden tanıyarak kesim yapar. PCR tepkimesi sonrası 292 bç'lik PCR ürünü *Apal* restriksiyon enzimi ile kesildi.

Bu bölgede guanin (G) içeren allel *Apal* enzimi için kesim noktası içerir. Adenin (A) içeren allel ise ilgili enzim için kesim noktası taşımamaktadır. Guaninden adenine (G→A) bir nükleotit değişimi olması halinde *Apal* enziminin tanıdığı bölge kaybolur ve kesim gerçekleşmez. Dolayısı ile enzim kesiminden sonra nükleotit değişimi olan (AA) bireylerde 292 bç'lik tek bant, her iki allelinde nükleotit değişimi taşımayan (GG) bireylerde 226 ve 65 bç'lik iki bant, heterozigot (GA) bireylerde ise 292, 226 ve 65 bç olmak üzere üç bant oluşur.

3.5.2.3.1 Deneyin Yapılışı

- 1- 1.5 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü konuldu.
- 2- 17 µl son hacim içerisinde 10 U *Apal* restriksiyon enzimi ve 1 µl 10X Buffer B [10 mM Tris-HCl (pH 7.5; 37°C), 10 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA] tamponu eklendi.
- 3- 30 °C' de bir gece kuru ısıtıcı blokta inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon sonrası tüplerin içine 5 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.
- 5- % 2' lik agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 50 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü. Jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip fotoğrafı çekildi.

3.5.3. Genomik DNA'dan H19 Geni (rs2839704) Polimorfizminin Belirlenmesi

H19 geni rs2839704 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler eşliğinde çoğaltıldı.

3.5.3.1. H19 Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen primerler kullanılarak 654 bp'lik bölge çoğaltıldı. Bölgeyi çoğaltmak üzere seçilen primerlerin genomdaki yerleşimleri aşağıdaki Şekil 14'de gösterildi.

H19F (Forward Primer) 5'-TAC AAC CAC TGC ACT ACC TG-3'

H19R (Reverse Primer) 5'-GAA TGC TTC AAG GCT GC-3'

2461 CTGGGCCTTTGAATCCGGACACAAAACCCTCTAGCTTGGAAATGAATATGCTGCACTT^{5' TA}TA

2521 CAACCACTGCACTACCTG^{3'} CAACCACTGCACTACCTGACTCAGGAATCGGCTCTGGAAGGTGAGCACCAGCGCTCCTTC

2581 CGGAAGCCTCCAGGCCCCCGAGCACCCTGCCCCCATCCCACCCACGTGTCGCTATCTCTA

2641 GGTGAAGCTAGAGGAACCAGACCTCATCAGCCCAACATCAAAGACACCATCGGAACAGCA

2701 GCGCCCGCAGCACCACCCCGCACCGGCGACTCCATCTTCATGGCCACCCCTGCGGCGG

2761 ACGGTTGACCACCAGCCACCACATCATCCAGAGCTGAGCTCCTCCAGCGGGATGACGCC

2821 GTCCCCACCACCTCCCTCTTCTTTTTCATCCTTCTGTCTCTTTGTTTCTGAGCTTTC

2881 CTGTCTTTCTTTTCTGAGAGATTCAAAGCCTCCACGACTCTGTTTCCCCCGTCCCTT

2941 CTGAATTTAATTTGCACTAAGTCATTTGCACTGGTTGGAGTTGTGGAGACGGCCTTGAGT

rs2839704

↓

3001 CTCAGT***A**CGAGTGTGCGTGAGTGTGAGCCACCTTGGCAAGTGCCTGTGCAGGGCCCGGCC

↑

RsaI

3061 GCCCTCCATCTGGGCCGGGTGACTGGGCGCCGGCTGTGTGCCCGAGGCCTCACCCCTGCCC

3121 TCGCCTAGTCTGGAAGCTCCGACCGACATCACGGAGCAGCCTTCAAGCATTCCATTACGC

^{3' CGTCGGAACTTCGTAAG 5'}

Şekil 14: H19 gen bölgesini çoğaltan primerler ve bölgenin genomdaki yerleşimi ve rs2839704 polimorfizmi için kullanılan RsaI restriksiyon enzimi ve kesim yeri. Referans: ENSG00000130600 giriş no'lu dizi.

H19 gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan malzemelerin oranları aşağıdaki Tablo 7' de gösterilmiştir.

Tablo 7: H19 gen bölgesi PCR karışımı

	Stok	Son derişimi	Total Hacim: 50 µl
dH ₂ O	-	-	31.8 µl
PCR tamponu	10x	1x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	5 µl
DMSO	-	%4	4 µl
dNTP	10 mM	100 µM	0.5 µl
H19F	100 pmol/µl	50 pmol/µl	0.5 µl
H19R	100 pmol/µl	50 pmol/µl	0.5 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	5 U/µl	1.0 U/µl	0.2 µl
DNA	-	-	2.5 µl

PCR tepkime karışımı tablodaki miktarlara göre hazırlandı. Karışım PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan genomik DNA'dan 2.5 µl eklendi. Otomatik ısı döngü cihazında Tablo 8'de belirtilen programa göre PCR tepkimesi uygulandı.

Tablo 8: H19 PCR programı

	Derece	Süre	Döngü Sayısı
Ayrılma	94°C	5dk	1
	94°C	30 sn	30
Primer Bağlanması	65°C	1 dk	
Zincir Uzaması	72°C	1 dk	
Zincir Uzaması	72°C	5 dk	1

Çoğaltılan PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.5.3.2. cDNA'dan H19 Geni (rs2839704) Polimorfizminin Belirlenmesi

H19 rs2839704 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler eşliğinde çoğaltıldı.

3.5.3.2.1 H19 Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen primerler kullanılarak 573 bp'lik bölge çoğaltıldı. H19 geninin genomik DNA'dan ve cDNA'dan çoğaltılması sırasında aynı primerler kullanılmıştır. Elde edilen ürünler arasındaki fark ekzonlar arasına giren intron büyüklüğünden kaynaklanmaktadır. Bölgeyi çoğaltmak üzere seçilen primerlerin genomdaki yerleşimleri Şekil 15'de gösterildi.

H19F (Forward Primer) 5'-TAC AAC CAC TGC ACT ACC TG-3'

H19R (Reverse Primer) 5'-GAA TGC TTC AAG GCT GC-3'

5' TACAACCACTGCACTACCTG 3'

1621 TAGCTTGGAATGAATATGCTGCACTT TACAACCACTGCACTACCTG ACTCAGGAATCGG

1681 CTCTGGAAGGTGAAGCTAGAGGAACCAGACCTCATCAGCCCAACATCAAAGACACCATCG

1741 GAACAGCAGCGCCCGCAGCACCCACCCCGCACCGGCGACTCCATCTTCATGGCCACCCCC

1801 TCGGGCGGACGGTTGACCACCAGCCACCACATCATCCAGAGCTGAGCTCCTCCAGCGGG

1861 ATGACGCCGTCCCCACCACCTCCCTCTTCTCTTTTTCATCCTTCTGTCTCTTTGTTTCT

1921 GAGCTTTCCTGTCTTTCCTTTTCTGAGAGATTCAAAGCCTCCAGACTCTGTTTCCCC

1981 CGTCCCTTCTGAATTTAATTTGCACTAAGTCATTTGCACTGGTTGGAGTTGTGGAGACGG

rs2839704

↓

2041 CCTTGAGTCTCAGT* ACGAGTGTGCGTGAGTGTGAGCCACCTTGGCAAGTGCCTGTGCAGG

↑

RsaI

2101 GCCCGGCCGCCCTCCATCTGGGCGGGGTGACTGGGCGCCGGCTGTGTGCCCGAGGCCTCA

2161 CCCTGCCCTCGCCTAGTCTGGAAGCTCCGACCGACATCACGGAGCAGCCTTCAAGCATTC

3' CGTCGGAACCTTCGTAAG 5'

Şekil 15: cDNA'dan H19 geni rs2839704 polimorfizmini içeren bölgenin çoğaltılmasında kullanılan primerler, RsaI restriksiyon enzimi ve kesim yeri. Referans: ENST00000252900 giriş no'lu dizi.

H19 gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan malzemelerin oranları aşağıdaki Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9: H19 gen bölgesi PCR karışımı

	Stok	Son derişimi	Total Hacim: 50 µl
dH ₂ O	-	-	31.8 µl
PCR tamponu	10x	1x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	5 µl
DMSO	-	%4	4 µl
dNTP	10 mM	100 µM	0.5 µl
H19F	100 pmol/µl	50 pmol/µl	0.5 µl
H19R	100 pmol/µl	50 pmol/µl	0.5 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	1.0 U/µl	0.2 µl
cDNA	-	-	2.5 µl

PCR tepkime karışımı tablodaki miktarlara göre hazırlandı. Karışım PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra cDNA'dan 2.5 µl eklendi. Otomatik ısı döngü cihazında Tablo 10'da belirtilen programa göre PCR tepkimesi uygulandı.

Tablo 10: H19 PCR programı

	Derece	Süre	Döngü Sayısı
Ayrılma	94°C	5dk	1
	94°C	30 sn	30
Primer Bağlanması	55°C	1 dk	
Zincir Uzaması	72°C	1 dk	
Zincir Uzaması	72°C	5 dk	1

Çoğaltılan PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.5.3.2.2. H19 Geni PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Değerlendirilmesi

PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası örnekler % 2'lik agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 50 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü. Jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip fotoğrafı çekildi.

3.5.3.2.3 H19 Geni PCR Ürünlerinin RsaI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

RsaI, *Rhodopseudomonas sphaeroides*' den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı 5'-GT[↓]AC-3' dizisinden tanıyarak kesim yapar. Guanin (G) içeren allel ise ilgili enzim için kesim noktası taşımamaktadır. Adeninden Guanine (A→G) bir nükleotit değişimi olması halinde *RsaI* enziminin tanıdığı bölge kaybolur ve kesim gerçekleşmez.

654 bp'lık genomik DNA' dan elde edilen PCR ürününün *RsaI* enzimiyle kesimi sonucu nükleotit değişimi olan (GG) bireylerde 654 bp'lık tek bant, her iki allelinde nükleotit değişimi taşımayan (AA) bireylerde 488 ve 166 bp'lık iki bant, heterozigot (AG) bireylerde ise 654, 488 ve 166 bp olmak üzere üç bant oluşur.

cDNA' dan PCR tepkimesi sonrası 573 bp'lık PCR ürünü *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonucu nükleotit değişimi olan (GG) bireylerde 573 bp'lık tek bant, her iki allelinde nükleotit değişimi

taşımayan (AA) bireylerde 407 ve 165 bp'lık iki bant, heterozigot (AG) bireylerde ise 573, 407 ve 165 bp olmak üzere üç bant oluşur.

3.5.3.2.3.1. Deneyin Yapılışı

- 1- 1.5 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü konuldu.
- 2- 17 µl son hacim içerisinde 10 U *RsaI* restriksiyon enzimi ve 1 µl 10X Buffer Tango tamponu [33 mM Tris-asetat (pH:7.9:37°C), 10 mM magnezyum asetat, 66 mM potasyum asetat, 0.1 mg/ml BSA] eklendi.
- 3- 37 °C' de bir gece kuru ısıtıcı blokta inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon sonrası tüplerin içine 5 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.
- 5- % 2'lik agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 50 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü. Jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip fotoğrafı çekildi.

3.6. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Hasta ve kontrol grubundaki yaş, tiroid fonksiyon testleri, gen mutasyonları dışındaki trombofili faktörleri, örnekleme günleri ve progesteron seviyeleri açısından karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanıldı. FV Leiden, MTHFR ve protrombin gen mutasyonları açısından fark olup olmadığını anlamak için ki-kare testi uygulandı. Hasta ve kontrol grubu endometriyum dokularında izlenen IGF2 ve H19 mRNA ifade düzeylerine ait veriler REST (2008 Beta V2.0.7) programı ile karşılaştırıldı. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

15 hastanın kan progesteron değerine bakılmış, eş zamanlı ultrasonografi monitorizasyonu yapılmıştır. Bir kısmına ek olarak, ovulasyon takibi yapılarak endometriyal örnekleme alınmıştır.

IVF yapıp implantasyon başarısızlığı olan hastaların tümü primer infertil hastalardı. Hastaların tamamında infertilite nedeni erkek faktörü olup kadınlarda açıklanabilen bir neden tespit edilmemişti. Bu gruptaki çiftlerin ortalama infertilite süresi 9.13 ± 5.13 (minimum 4; maksimum 20 yıl) olarak bulundu. Çalışma grubunu oluşturan 15 hastanın hepsinde tubal açıklık çeşitli yöntemlerle değerlendirilip bu hastalardan sadece ikisinde tek tüpün tıkalı olduğu tespit edildi. Hiçbir hastada radyolojik veya ultrasonografik olarak hidrosalpenks tespit edilmedi. Bir hastaya implantasyonu bozacağı için transfer öncesinde histeroskopik polip eksizyonu yapıldı. 15 hastanın değerlendirmesinde eşlerinin önceki sperm analizi sonuçlarında ortalama sperm sayısı 15 ± 18.85 (minimum 0; maksimum 45 milyon) ve ortalama sperm motilitesi yüzde 32.85 ± 18.83 (minimum % 0; maksimum 54) olarak bulunmuştur (Tablo 11). Hasta grubunda minimum IVF deneme sayısı 1; maksimum 4 olarak bulunmuştur.

Tablo 11' den de görüldüğü gibi infertil hasta grubunda ortalama yaş 32.60 ± 4.12 (minimum 25; maksimum 41) olarak belirlendi. Fertil hasta grubunda ise 31.63 ± 3.82 (minimum 24; maksimum 38) olup iki grup arasında yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.537$).

Bu çalışmada her iki grup örnekleme günü açısından da değerlendirildi. İnfertil grupta ortalama örnekleme günü 21.53 ± 0.74

(minimum 21, maksimum 23) iken kontrol grubunda 21.50 ± 0.81 (minimum 19; maksimum 23) olarak bulunmuş olup, iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0.965$).

Her iki grupta örnekleme günü bakılan serum progesteron düzeyleri karşılaştırıldı. İnfertil grupta 9.35 ± 3.85 (minimum 2.8; maksimum 15) tespit edilmiş olup, fertil grupta 9.70 ± 3.36 (minimum 5.7; maksimum 15.3) olup iki grup arasında anlamlı fark belirlenmedi ($p=0.621$).

Her iki grup tiroid fonksiyon testleri açısından da değerlendirilmiş ve infertil grupta ortalama TSH 1.55 ± 0.94 mIU/L iken fertil grupta 1.85 ± 0.63 mIU/L olup iki grup arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p= 0.220$). İnfertil grupta ortalama sT3 değeri 2.79 ± 0.32 pg/ml olup fertil grupta 2.64 ± 0.51 pg/ml bulundu. İki grup arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.476$). İnfertil grupta ortalama sT4 değeri 1.07 ± 0.13 ng/dl olup fertil grupta 1.05 ± 0.28 ng/dl bulundu. İki grup arasında anlamlı fark belirlenmedi ($p= 0.663$).

Tablo 11: Hasta ve kontrollere ait klinikopatolojik özellikler

	İnfertil (n=15)	Fertil (n=16)	p değeri
Yaş	32.60 ± 4.12	31.63 ± 3.82	0.537
Örnekleme günü	21.53 ± 0.74	21.50 ± 0.81	0.965
Noyes kriterine göre histolojik günlendirme	22.60 ± 2.26	22.64 ± 2.92	0.825
Progesteron (ng/ml)	9.35 ± 3.85	9.70 ± 3.36	0.621
TSH (mIU/L)	1.55 ± 0.94	1.85 ± 0.63	0.220
Serbest T3 (pg/ml)	2.79 ± 0.32	2.64 ± 0.51	0.476
Serbest T4 (ng/dl)	1.07 ± 0.13	1.05 ± 0.28	0.663
ATIII (%)	98.87 ± 12.62	100.75 ± 10.01	0.736
Protein C (%)	81.60 ± 13.69	92.69 ± 30.99	0.539
Protein S (%)	78.13 ± 13.80	86.81 ± 31.01	0.429
APCR (%)	1.20 ± 1.61	0.64 ± 0.21	0.032
Invitro fertilizasyon sayısı	1-4	-	
Sperm konsantrasyonu	15±18.85	-	
Sperm motilitesi	32.85±18.83	-	
İnfertilite süresi	9.13±5.13		
Kaliteli embriyo sayısı	1-6		
Transfer edilen embriyo sayısı	2-4		

APCR: Aktif protein C direnci

ATIII: Antitrombin 3

p değeri <0.05' den küçük olanlar koyu gösterilmiştir.

Her iki gruptaki hastaların trombofili faktörleri karşılaştırıldığında Antitrombin III değeri ve ATIII değeri yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (p= 0.736). Protein C değeri fertil ve infertil gruptaki 3'er olguda normalden düşük bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi (p=0.539). İnfertil hasta grubunda 3, fertil hasta grubunda 5 hastada protein S değeri normalden düşük bulundu; iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (p= 0.429).

İnfertil hasta grupta 5, fertil hasta grubundan 4 hastanın APCR değeri normalden yüksek bulundu (normal değer <%0.86). İnfertil hasta grubunda ortalama APCR değeri 1.20 ± 1.61; fertil hasta grubunda 0.64 ± 0.21 olarak tespit edildi. Aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p=0.032).

Trombofili nedeni olan genetik faktörlerden FV Leiden, protrombin ve metilen tetrahidrofolat gen mutasyonları karşılaştırılmıştır. Her üç faktör açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 12).

Tablo 12: Trombofili paneli genotiplerinin hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması

Genotipler	İnfertil (n=15)	Fertil (n=16)	p değeri	OO (%95 GA)	p değeri
Faktör V Leiden R506Q/G1691A (rs6025)			0.685		
RR	11 (%73.3)	13 (%81.3)		1 ^a	
RQ	4 (%26.7)	3 (%18.7)		1.58 (0.29-8.61)	0.685
QQ	0 (%0)	0 (%0)		-	-
MTHFR C677T (rs1801133)			0.054		
CC	6 (%40)	13 (%81.3)		1 ^a	
CT	8 (%53.3)	3 (%18.7)		5.78 (1.12- 29.85)	0.057
TT	1 (%6.7)	0 (%0)		0.32 (0.16-0.61)	0.350
MTHFR A1298C (rs1801131)			0.317		
AA	12 (%80)	10 (%62.5)		1 ^a	
AC	3 (%20)	4 (%25)		0.62 (0.11-3.48)	0.682
CC	0 (%0)	2 (%12.5)		0.45 (0.29-0.72)	0.478
Prothrombin G20210A (rs1799963)			0.367		
GG	14 (%93.3)	15 (%93.7)		1 ^a	
GA	0 (%0)	1 (%6.3)		0.52 (0.36- 0.73)	1.000
AA	1 (%6.7)	0 (%0)		0.48 (0.33-0.70)	1.000

OO, Olasılıklar oranı; GA, Güven aralığı.

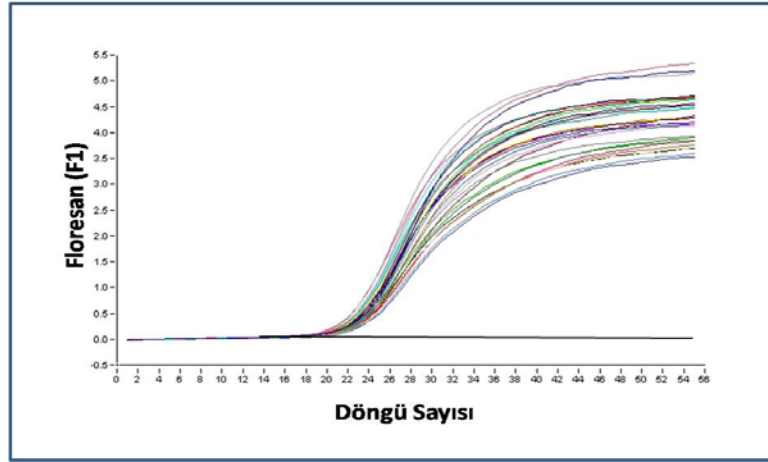
^aReferans Genotip

4.1. IGF2 ve H19 Genlerinin İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

IGF2 ve H19 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler™ cihazı kullanıldı. Hasta ve kontrol grubundan alınan doku örneklerine ait her bir cDNA IGF2, H19 ve GAPDH

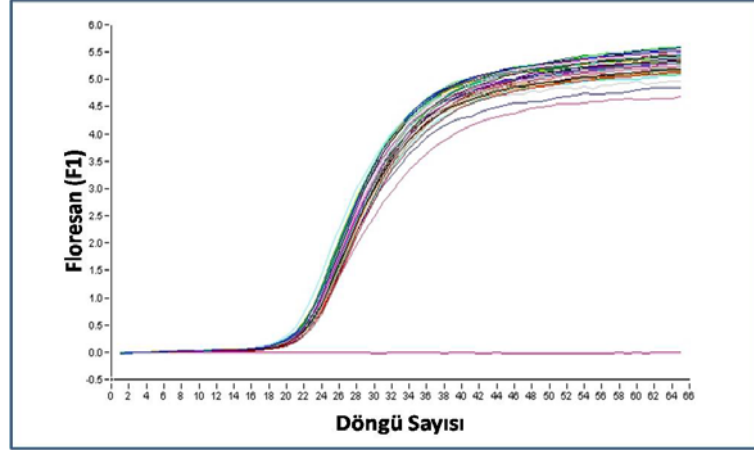
genine özgü primer ve UPL RNA probu kullanılarak çalışıldı. Tüm doku örneklerinde IGF2 ve H19' un mRNA düzeyinde ifade edildiği belirlendi.

IGF2 geninin mRNA düzeyinde ifade düzeyini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 16' da gösterilmiştir.



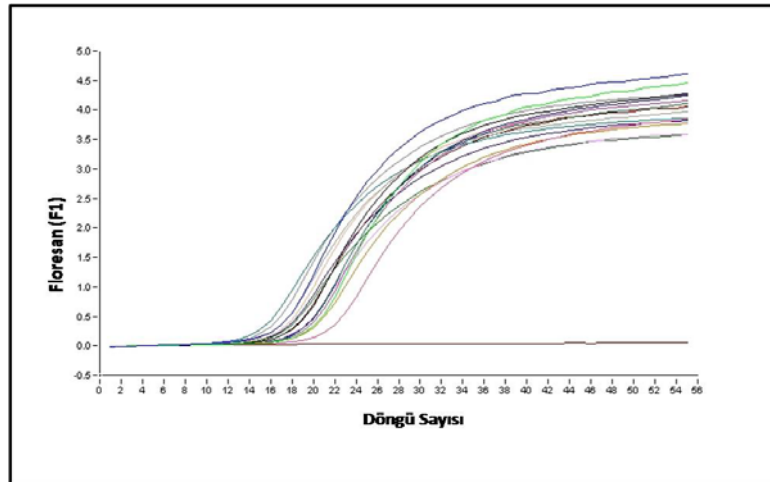
Şekil 16: IGF2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri; IGF2 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

H19 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 17' de gösterilmiştir.



Şekil 17: H19 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. H19 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

IGF2 ve H19 genlerini normalize etmek için seçilen GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 18’ de gösterilmiştir.



Şekil 18: 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 floresan sinyal izlenmektedir.

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

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

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. Tablo 13’ de infertil ve fertil gruplarda ifadesi araştırılan genlerin Real-Time PCR sonu elde edilen Ct değerleri gösterilmiştir.

Tablo 13. İnfertil ve Fertil gruplarda ifadesi araştırılan genlerin Real-Time PCR sonu elde edilen Ct değerleri

No		GAPDH	IGF-2	H19
1	Hasta	18.98	20.87	17.98
2	Hasta	18.95	21.45	17.23
3	Hasta	18.62	22.4	18.34
4	Hasta	18.59	19.77	17.18
5	Hasta	18.58	20.75	17.34
6	Hasta	18.09	21.25	18.25
7	Hasta	19.05	20.93	17.99
8	Hasta	19.54	19.78	17.62
9	Hasta	19.23	21.3	18.53
10	Hasta	19.28	21.34	19.24
11	Hasta	20.04	21.57	19.06
12	Hasta	20.76	20.52	18.79
13	Hasta	18.12	20.8	17.47
14	Hasta	18.31	21.43	18.01
15	Hasta	19.34	19.77	17.02
16	Kontrol	19.65	20.87	15.78
17	Kontrol	19.06	20.67	16.66
18	Kontrol	21.06	21.69	16.46
19	Kontrol	18.72	20.47	17.1
20	Kontrol	18.76	20.97	15.9
21	Kontrol	20.1	19.89	17.24
22	Kontrol	18.09	21.95	16.76
23	Kontrol	19.55	21.57	17.27
24	Kontrol	18.99	20.57	15.1
25	Kontrol	19.55	20.77	16.36
26	Kontrol	18.62	19.47	16.83
27	Kontrol	19.58	20.04	17.27
28	Kontrol	19.55	21.22	16.86
29	Kontrol	19.75	20.77	16.26
30	Kontrol	19.42	17	17.27
31	Kontrol	19.3	20.52	16.6

4.1.1. IGF2 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi

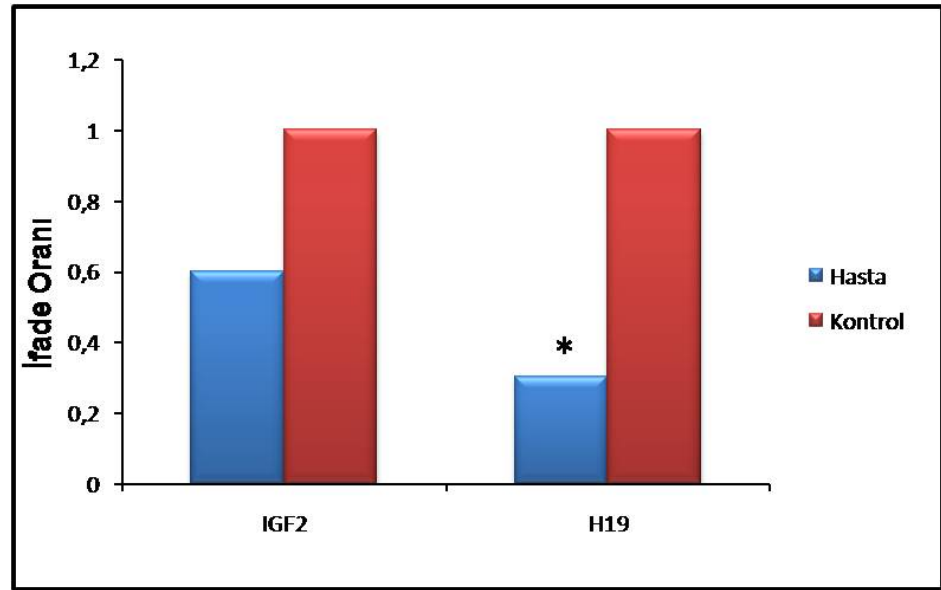
IGF2 geninin mRNA düzeyinde ifadesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre 1.66 kat daha az olduğu görüldü (ifade oranı=

0.601). Ancak hasta ve kontrol grupları arasında IGF2 mRNA ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.084$).

4.1.2. H19 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi

Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında hasta grubundaki H19 mRNA ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 3.31 kat azaldığı belirlendi (ifade oranı=0.302). Hasta grubundaki mRNA ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0.0001$).

IGF2 ve H19 mRNA ifade düzeylerinin karşılaştırılması Grafik 1’ de gösterilmiştir.

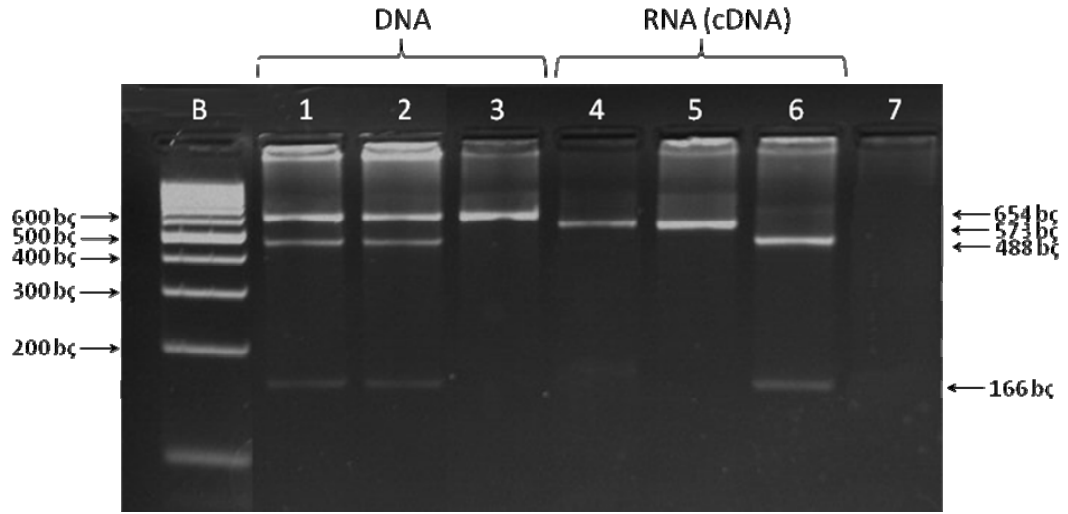


Grafik 1: IGF2 ve H19 mRNA ifade düzeylerinin hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması. * Hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

4.2. Endometriyumda H19 Geninin Allelik İfadesi

H19 geninin allelik ifadesinin belirlenmesi için 15 hasta ve 16 kontrolden alınan endometriyum dokularından genomik DNA elde edildi. rs2839704 polimorfizmini içeren H19 gen bölgesi özgül primerler

kullanılarak çoğaltıldı. Bu polimorfizmin RFLP yöntemiyle belirlenmesinde *RsaI* restriksiyon enzimi kullanıldı. DNA' dan elde edilen sonuçlara göre H19 için 15 hastadan 7 tanesi, 16 kontrolden ise 8 tanesi informatif (heterozigot) bulundu. Bireylerin allelik ifadelerinin belirlenmesi için DNA sonucuna göre heterozigot olan bireylerin cDNA' sından aynı primerler ile H19 gen bölgesi çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesildi. DNA ve cDNA genotipi heterozigot olan örnekler biallelik, DNA genotipi heterozigot, cDNA genotipi homozigot olan örnekler ise monoallelik olarak kabul edildi. DNA ve cDNA' dan elde edilen sonuçlara göre H19 açısından informatif olan 7 hastanın ve 8 kontrolün hepsinin monoallelik ifade edildiği belirlendi. H19 geninin allelik ifadesini gösteren agaroz jel fotoğrafı Şekil 19' da gösterilmiştir. Hastaların ve kontrollerin H19 genine ait allelik ifadeleri Tablo 13' de gösterilmiştir.



Şekil 19: H19 geni rs2839704 polimorfizmini içeren bölgenin DNA ve cDNA'dan elde edilen PCR ürünlerini ve *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesimini gösteren agaroz jel fotoğrafı

B: 100 bp' lik ağırlık belirteci,

1.ve 2. kuyu; DNA' dan yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünün *RsaI* restriksiyon enzim kesim sonucu

3. kuyu; DNA' dan yapılan PCR ürünü

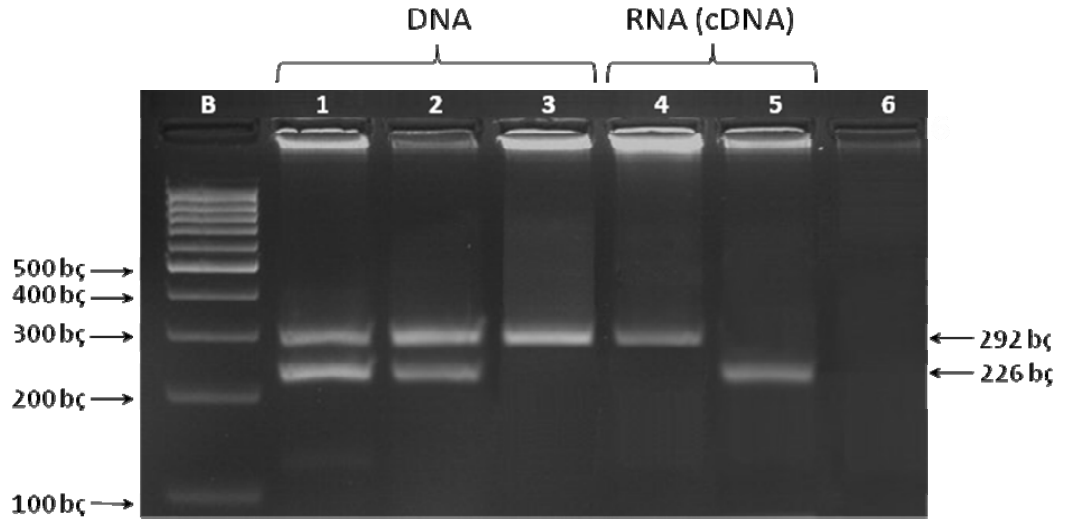
4. kuyu; cDNA' dan yapılan PCR ürünü

5. ve 6. kuyu; cDNA' dan elde edilen PCR ürününden monoallelik ifadenin gösterildiği *RsaI* restriksiyon enzimi kesim sonucu

7. kuyu; DNA kontaminasyonunun belirlenmesi için yapılan RNA eklenmiş PCR ürünü

4.3. Endometriyumda IGF2 geninin Allelik İfadesi

IGF2 geninin allelik ifadesini göstermek için 15 hasta 16 kontrol olmak üzere toplam 31 endometriyum dokusundan genomik DNA elde edildi. Uygun primerler ile çoğaltılan IGF2 gen bölgesinde yer alan rs680 polimorfizmi RFLP yöntemiyle belirlendi. Bu polimorfizmin belirlenmesinde *Apal* restriksiyon enzimi kullanıldı. DNA' dan elde edilen sonuçlara göre IGF2 için 15 hastadan 6 tanesi informatif (heterozigot) iken, 16 kontrolden 7 tanesi informatif bulundu. Bireylerin allelik ifadelerinin belirlenmesi için DNA sonucuna göre heterozigot olan bireylerin cDNA' sından aynı primerler ile IGF2 gen bölgesi çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri *Apal* restriksiyon enzimi ile kesildi ve rs680 polimorfizmini içeren örnekler belirlendi. DNA ve cDNA genotipi heterozigot olan örnekler biallelik, DNA genotipi heterozigot, cDNA genotipi homozigot olan örnekler ise monoallelik olarak kabul edildi. DNA ve cDNA' dan elde edilen sonuçlara göre IGF2 açısından informatif olan 6 hastanın ve 7 kontrolün hepsinin monoallelik ifadeleri belirlendi. IGF2 geninin allelik ifadesini gösteren agaroz jel fotoğrafı Şekil 20' de gösterilmiştir. Hastaların ve kontrollerin IGF2 genine ait allelik ifadeleri Tablo 13' de gösterilmiştir.



Şekil 20: IGF2 geni rs680 polimorfizmini içeren bölgenin DNA ve cDNA'dan elde edilen PCR ürünlerini ve *Apal* restriksiyon enzimi ile kesimini gösteren agaroz jel fotoğrafı

B: 100 bç' lik ağırlık belirteci,

1.ve 2. kuyu; DNA' dan yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünün *Apal* restriksiyon enzim kesim sonucu

3. kuyu; DNA' dan yapılan PCR ürünü

4. kuyu; cDNA' dan yapılan PCR ürünü

5. kuyu; cDNA' dan elde edilen PCR ürününden monoallelif ifadesinin gösterildiği *Apal* restriksiyon enzimi kesim sonucu

6. kuyu; DNA kontaminasyonunun belirlenmesi için yapılan RNA eklenmiş PCR ürünü

Tablo 14: H19 ve IGF-2 genlerinin allelik ifadeleri

		IGF-2 (<i>Apal</i>)			H19 (<i>Rsal</i>)		
No		DNA	RNA	Açıklama	DNA	RNA	Açıklama
1	Hasta	GG			AG	GG	Monoallelilik
2	Hasta	GA	AA	Monoallelilik	GG		
3	Hasta	GG			AA		
4	Hasta	GA	AA	Monoallelilik	AG	GG	Monoallelilik
5	Hasta	GA	GG	Monoallelilik	AG	AA	Monoallelilik
6	Hasta	GA	AA	Monoallelilik	AA		
7	Hasta	GG			GG		
8	Hasta	AA			AG	GG	Monoallelilik
9	Hasta	AA			AG	GG	Monoallelilik
10	Hasta	GA	GG	Monoallelilik	AA		
11	Hasta	GG			AG	AA	Monoallelilik
12	Hasta	GA	GG	Monoallelilik	AA		
13	Hasta	GG			AG	GG	Monoallelilik
14	Hasta	GG			GG		
15	Hasta	GG			AA		
16	Kontrol	GA	AA	Monoallelilik	AA		
17	Kontrol	GG			AG	GG	Monoallelilik
18	Kontrol	GA	GG	Monoallelilik	AA		
19	Kontrol	GG			AG	AA	Monoallelilik
20	Kontrol	GG			AG	GG	Monoallelilik
21	Kontrol	AA			AA		
22	Kontrol	GA	GG	Monoallelilik	AG	AA	Monoallelilik
23	Kontrol	GG			AA		
24	Kontrol	GG			AG	GG	Monoallelilik
25	Kontrol	GA	AA	Monoallelilik	AA		
26	Kontrol	GG			GG		
27	Kontrol	GG			AG	GG	Monoallelilik
28	Kontrol	GA	AA	Monoallelilik	GG		
29	Kontrol	GA	GG	Monoallelilik	AA		
30	Kontrol	AA			AG	AA	Monoallelilik
31	Kontrol	GA	AA	Monoallelilik	AG	GG	Monoallelilik

5.TARTIŞMA

Implantasyon, blastokistin maternal endometriyal yüzeye bağlanarak plasentayı oluşturması ve bu yolla büyüyen fetüs ile maternal sirkülasyon arasında iletişim kurulması olarak tanımlanmıştır ^{1,2}. Endometriyumda uzun bir hazırlık süresinin ardından oluşan fonksiyonel ve yapısal değişimlerin sonucunda kısa bir süre içinde gerçekleşen implantasyon olayında, tüm süreci kontrol eden ve düzenleyen çok sayıda gen rol almaktadır. İmplantasyonu ve insan üreme fizyolojisini anlamak için endometriyal reseptivite sürecindeki moleküler olayları anlamak önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar implantasyon penceresini tahminine yönelik moleküler belirteçlere odaklanmıştır. Endometriyal reseptivite ve implantasyonda rol alan bu moleküllerin tam olarak anlaşılması, bunlara yönelik uygulanan tedaviler sayesinde gerek doğal sikluslarda gerekse IVF hastalarında implantasyon ve gebelik oranlarını iyileştirmek için kullanılabilecektir.

In vitro fertilizasyonda tedavinin etkinliğini kısıtlayan en önemli faktörlerden biri implantasyonun düşük oranlarda olması ve iyi kalitede embriyo transferi yapılsa bile bazen gebelik elde edilememesidir ³. Bugünkü kullanılan teknolojinin verileri göstermektedir ki implantasyon başarısızlığı büyük oranda endometriyal reseptivite anormalliğinden kaynaklanmaktadır ⁷. Bu nedenle çalışmamızda populasyon olarak önceki IVF denemelerinde kaliteli embriyo transferine rağmen implantasyonun başaramadığı olgular seçilmiştir.

Bugün için ortaya konulan ve yaklaşık yüz kadar olduğu düşünülen imprint genlerin hemen tümü implantasyon, plasantasyon ve embriyofetal gelişim için önemlidir. Bu genlerin varlığının yanısıra normal bir gelişim süreci için uygun dozlarda ve uygun zamanlarda aktivasyonları

gereklidir. Embriyo ve fetusun besin kaynaklarının kullanımı imprint genler tarafından kontrol edilir. Paternal eksprese edilen genler (PLGAL1, PEG1/MEST, IGF2 ve PEG3) fetal büyümeyi uyarırken bu genlerdeki fonksiyon kaybı IUGR ile sonuçlanır. Maternal eksprese edilen genler (IGF2R, GRAB10, H19, CDKN1C, TSSC3, MASH2 ve MEG3) fetal gelişimi sınırlar ve bunlardaki işlev kaybı aşırı büyüme ile sonuçlanır⁸⁷⁻⁸⁹. Koryon villus gelişimi ve plasentadan besin taşınması için gerekli olan kanal proteinleri ve transporterlar imprint genlerin (Dlx3/DLX3, Gcm1/GCM1, Hand1/HAND1, Mash2/HASH2) kontrolü altındadır. ASCL2 maternal eksprese edilen plasentaya özgü transkripsiyon faktörüdür. İnsanlarda extravillöz trofoblastlarda ASCL2 ekspresyonu gösterilmiştir ve TSSC3, PEG1, PEG3 plasental fonksiyonla ilgili diğer imprint genleridir. Bu genlerde işlev kaybı olduğunda plasental gelişim bozulur ve erken dönemde embriyo ölür ve gebelik abortus ile sonuçlanır. İmprint genler plasenta ve embriyofetal gelişim bu kadar önemliken, embriyonun implantasyonu sürecinde, implantasyonun diğer kutbu olan endometriyumdaki yapısal ve fonksiyonel hazırlığın, değişimin ortaya çıkmasında önemli olabilir⁸⁸. Bu bilgi ve öngörüye rağmen endometriyumda, bu genlerin ekspresyonlarıyla ilgili olarak tüm literatürde oldukça az çalışma vardır. Bu çalışmalarda ise şimdiye kadar sadece iki imprint genin, H19 ve IGF2 ifadelerinin endometriyumda araştırıldığı görülmektedir. Tanos ve arkadaşları 2004 yılında yayınladıkları makalelerinde normal, malign ve hiperplastik endometriyumda H19 ve IGF2 gen ekspresyonları incelemişlerdir¹⁴⁹. Endometriyumda IGF2 araştıran ilk çalışma ise 1991 yılında Giudice ve arkadaşları tarafından yapılmış ve endometriyumda IGF II, ve IGF-II bağlayıcı proteinler incelenmiştir¹⁵⁰. İmprint genlerin normal bir sikluskıdaki değişimlerini gösteren tek çalışma ise Ariel ve arkadaşları tarafından 1997 yılında araştırılmış ve çalışmada H19/IGF2 imprint genlerin endometriyumdaki ifadeleri ve bu ifadelerin menstrüel siklusla birlikte değişimleri

incelenmiştir. Araştırmada endometriyumda H19 ekspresyonun geç sekresyon fazında maksimuma çıktığı ve IGF2, IGF reseptörleri ve IGF bağlayıcı proteinlerle paralel düzenlendikleri gösterilmiştir. H19'un özellikle stromal hücrelerin maturasyon sürecinde rol oynadığı ve metabolik etkileri düzenleyen genler üzerinde de etkili olacağı iddia edilmiştir. H19 ekspresyon düzeyinin insan endometriyumunda doku farklanmasını gösteren bir belirteç olarak kullanılması önerilmiş, ancak şimdiye kadar bu konuda başka araştırma yapılmamıştır ²¹.

Yine aynı araştırmada proliferatif fazda endometriyumdaki stromal hücrelerde H19' un orta derecede ifade edildiği bulunmuştur, buna rağmen ifadelenme ovulasyonla birlikte hemen düşmekte ve erken sekretuar fazda oldukça düşük seyretmektedir. H19 ekspresyonu daha sonra giderek artmakta ve siklusun 21. gününde oldukça yüksek düzeylere ulaştıktan sonra hafif artışla siklusun sonunda en yüksek değerine ulaşmaktadır. Çalışmada, IGF2 ifadesinin de endometriyumda izlendiği ve menstrüel siklusun dönemleriyle değiştiği gösterilmiştir. Proliferatif faz ve erken sekretuar dönemde çok düşük düzeylerde bulunan IGF2 ifadesi geç sekretuar fazda yüksek seviyelere ulaşmaktadır ²¹.

Postnatal hayatta ifadeleri dokularda giderek azalan bu iki genin endometriyumda tüm yaşam boyu ifadelerinin devam etmesi ve menstrüel siklusun fazlarıyla birlikte değişkenlik göstermesi, ²¹ bu imprint genlerin implantasyonun fetal kısmında olduğu kadar endometriyum kısmında da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Kliniğimizde yapılan ve henüz yayınlanan bir çalışmada intrauterin inseminasyon sonrası implantasyon başarısızlığı olan açıklanamayan infertilite grubunda kontrol grubuna göre maternal eksprese olan H19'un ifadesinin belirgin olarak daha düşük, paternal eksprese olan IGF2'nin ise yüksek tespit edilmesi bu

hastaların infertilitelerinin altında yatan genetik neden olabileceğini göstermiştir ¹⁵¹.

Çalışmamızda IGF2 geninin mRNA düzeyinde ifadesinin implantasyon başarısızlığı olan grupta kontrol grubuna göre 1.66 kat azaldığı (ifade oranı=0.601) ancak mRNA ifadesindeki bu azalmanın anlamlı olmadığı gösterildi (p=0.084). IGF2 büyüme faktörü olan ve reseptörler aracılığıyla mitojenik etkisini gösteren bir imprint gendir. IGF2 ifadesinin geç sekretuar fazda yüksek düzeylere ulaşması bu genin implantasyon penceresinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Anlamlı düzeyde olmasa da hasta grubunda daha az ifade edilmesi bu hastalardaki implantasyon kusuruna yol açabilir. Çalışmamızda hasta sayısının az olması bu farkın anlamlı olmamasına yol açmış olabilir. Ancak hasta sayısının az olması literatürdeki bu tür biopsi çalışmalarının ortak dezavantajını oluşturmaktadır. Aynı zamanda IGF2R ekspresyonuna da bakılması infertilitenin altında yatan nedenlerin gösterilmesi açısından yararlı olabilir. Ayrıca LH peak'inden 6-8 gün sonra başlamayan ve 4 gün sürdüğü düşünülen implantasyon penceresinde örneklenmelerine rağmen histolojik olarak aynı günde olmamaları da bu sonuca yol açmış olabilir ⁹. Sonucu etkileyebilecek diğer nedenler de implantasyon başarısızlığının tanımının subjektif olması, kullanılan istatistiksel yöntemin metodolojisi gibi faktörlerdir.

Çalışmamızda H19 geninin mRNA düzeyinde ifadesinin implantasyon başarısızlığı olan grupta kontrol grubuna göre 3.31 kat azaldığı (ifade oranı=0.302) ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p=0.0001). H19 tümör baskılayıcı gen olarak görev yapan bir imprint gendir. H19 ifadesi siklusun 21. gününde yüksek düzeylere çıkmakta ve siklusun sonunda en yüksek değere ulaşmaktadır ²¹. Sonuçlarımız, implantasyon kusuru olan hasta grubumuzda H19'un

anlamli düzeyde daha az ifade edilmesinin nedeninin bu hastalardaki implantasyon kusuru olabileceğini göstermektedir.

Bazı araştırmacılar insan endometriyum örneklemelerinden mikro-dizi teknolojisi kullanılarak prereseptif fazdan reseptif faza geçiş sırasındaki gen ifade değişimlerini incelemişlerdir. Ancak tüm bu çalışmalarda regölasyonları değişen çok sayıda genden çok azı ortaktır. Haouzi ve ark.'nın¹⁵² çalışmasında daha önceki bazı araştırmacılar^{72,153-155} tarafından erken sekretuar faz ve geç sekretuar faz sırasında alınan örneklerden global gen ifade düzeyleri incelenmiştir. Aynı hastadan farklı zamanlarda gen ifadesine bakan bu çalışma hastalar arası değişkenliği de azaltmaktadır. Bu çalışmada ifadesi artan genler diğer dört çalışma ile karşılaştırılarak reseptivite dönemine özgü ortak aday genler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu dönemde ifadesi artan ortak beş genin; laminin $\beta 3$, mikrofibril ilişkili protein 5 (MFAP5), angiopoietin benzeri I (ANGPTL), endokrin bezi vasküler endotelyal büyüme faktörü (EG-VEGF), nükleer yerleşimli faktör 2 (NLF2) olduğu gösterilmiştir. Haouzi ve ark.'nın¹⁵² çalışmasında erkek faktörü nedeniyle ICSI'ye giden, dolayısıyla kadına yönelik infertilite yapabilecek bir faktörün olmadığı kabul edilen kadınlarda LH peak'i tespit edilerek LH+2 ve LH+7. günlerde endometriyal biyopsiler alınmıştır. Alınan endometriyum örneklerinin histolojik olarak doğrulanmaması bu çalışmanın dezavantajını oluşturmaktadır. Bizim çalışmamızda ise alınan tüm endometriyum örneklerinin histolojik olarak incelenmiş olmasına karşın reseptif dönem dışında tespit edilen örneklerden gen ifadesinin bakılmaması çalışmamızın avantajını oluşturmaktadır.

Bizim çalışmamızda erkek faktörü nedeniyle IVF tedavisi yapılan ve implantasyon başarısızlığı olan hasta grubunda daha önce Ariel ve ark.²¹ tarafından reseptif dönemde endometriyumda ifadesi gösterilen

IGF2 ve H19 imprint genlerinin implantasyon penceresindeki ekspresyonu fertil bireyler ile karşılaştırılmış ve IVF'de endometriyal reseptivite ile bu genlerin ilişkisi ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

Haouzi ve ark.'nın ¹⁵² yaptığı çalışmada erkek infertilitesi nedeniyle IVF tedavisi yapılan hastalarda doğal siklusta implantasyon penceresi öncesi ve sırasında biyopsi alınarak gen ifade düzeyleri değerlendirilmiş; böylece implantasyon penceresini belirleyebilecek aday genler araştırılmıştır. Çalışmamızda da erkek faktörü nedeniyle IVF tedavisi uygulanan dolayısıyla kadına yönelik infertilite ile ilgili herhangi bir faktör taşımayan hasta popülasyonu araştırılmıştır. Ancak Haouzi ve ark.'dan ¹⁵² farklı olarak aynı hastadan farklı zamanlarda biyopsi almak yerine IVF tedavisi yapıp implantasyon olmayan hasta grubunda doğal siklusda implantasyonun maksimum beklendiği günlerde (implantasyon penceresi) tek endometriyal biyopsi ile IGF2 ve H19 ifadesi fertil grubun aynı dönemdeki gen ifadenmeleri ile karşılaştırılmıştır.

Endometriyumun reseptif döneminde rol alan molekülleri ve/veya genleri ortaya koymaya çalışan global gen ekspresyonu çalışmalarının hiç birisinde imprint genler araştırılmamıştır. Ariel ve ark. ²¹ çalışmasında da ortaya koyulduğu gibi H19 ve IGF2 genlerinin endometriyumda menstrüel siklus boyunca ifadenmeleri değişmektedir. Her ikisi de sinyal molekülleri veya transkripsiyon faktörleri olan bu genlerden H19'un özellikle hücre çoğalması ve farklılaşmasının yoğun olduğu dokularda ekspresyonu gösterilirken, ¹⁵⁶ IGF2'nin major bir fetal-plasental büyüme faktörü olduğu, embriyonik farklılaşmada görev aldığı, IGF2'nin implantasyon sürecinde embriyonik sinyal iletiminde katkısı olabileceği düşünülmektedir. ^{21, 157, 158}

Bu temel verilere dayanan çalışmamızda, erkek infertilitesi nedeniyle, IVF yoluyla gebelik denenen ve iki kez kaliteli embriyo transferine rağmen implantasyon başarısızlığı gözlenen kadınların endometriyumlarında IGF2 ve H19 imprint genlerinin ekspresyonları ilk kez araştırılmıştır.

Literatürde implantasyon penceresini tespit etmede kullanılabilecek genleri ortaya çıkarmaya yönelik son çalışma Koler ve arkadaşları²³ tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada en az 3 kez tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan 4 hastada endometriyum örneklerinden 313 adet genin ifadesine mikro-dizi yöntemi ile ifadesi artan ve azalan genler belirlenmiştir. Yirmibirinci günde progesteron değerine bakarak progesteronu 20 ng/ml üzerinde olan hastalardan endometriyal örnekleme yapılmıştır. 288 genin ifadesinin azaldığı görülürken, 25 tanesinin ifadesinin arttığı bulunmuştur²³. Bu genlere bakıldığında da bizim ifadelerini incelediğimiz IGF2 ve H19 genlerinin içermediğini görüyoruz. Siklin E2, SFRP1 ve LEF1 ifadesinin tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan grupta azaldığı tespit edilirken, SLUG ve DKK1'ine ise ifadesinin arttığı bu çalışmada gösterilmiştir. İfadesi azalan siklin E2 ve ifadesi artan SLUG gibi genlerin östrojen bağımlı genler olduğu görülmüştür²³. Bu da tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda endometriyal östrojen cevaplılığında defekt olduğunu düşündürmektedir. Hasta sayısının az olması, bir kısım gen ekspresyonlarına bakılmaması ve doku örneklerinin histolojik olarak doğrulanmaması bu çalışmanın dezavantajlarını oluşturmaktadır. Uterin IGF2 mRNA düzeyi östradiole karşı 7 kat artışla cevap verirken progesterona karşı herhangi bir artışa neden olmaz^{136,137}. Bu bilgi çalışma grubumuzda implantasyon başarısızlığı olan hastalarda IGF2 ekspresyon düzeyinin fertil gruptan daha az ifade edilmesiyle birleştirildiğinde Koler ve

ark.'nın ²³ da gösterdiği implantasyon başarısızlığı olan hastalardaki endometriyal östrojen cevabında defekt olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, IGF2 düzeyi anlamlı olmasa da IGF2 ve H19 gen ifadelerinin infertil ve fertil grupta farklı olduğunun gösterilmesi bu hastaların implantasyon başarısızlığının altında yatan genetik nedenlerden biri olabileceğini düşündürmektedir. İmplantasyon penceresindeki değişimi kesin olarak gösterilebilen bir ya da birkaç molekülün bulunması, ekspresyon düzeylerinin monitorize edilmesi, bunların klinik uygulamalara yansması gelecekte bugün için takıldığımız implantasyon basamağının aşılmasında oldukça önemli bir adım olacaktır. Hali hazırda kusurlu üretimin ne olduğu, nasıl düzeltileceği, sürekli değişim içinde olan endometriyumdaki günlük dinamik etkilerin nasıl ölçüleceği sorularının yanıtı kolay alınabilecek gibi görünmese de bu konuda yapılan araştırmalar implantasyon oranlarının artması için gereklidir.

Bu ve benzeri çalışmalar, çok sayıda faktörün etkilediği sorunun bir noktasına temas etmekte ve yeni bakış açıları yaratarak uzun vadede kullanılacak bilgilere temel taşı olmaktadır. Çalışmamızda, sağlıklı embriyo-plasenta gelişimi için hayati oldukları gösterilen imprint genlerin ekspresyonlarının implantasyonu başaramamış olguların endometriyumunda kontrol grubuna göre azaldığını gösterdik. Bu sonuçlar IVF tedavisi sırasında implantasyon başarısızlığında H19 ve IGF2 genlerinin ürünü olan büyüme faktörleri, ve transkripsiyon faktörlerinin endometriyumu reseptif döneme hazırlamada görevli olabileceği ve azalan ekspresyonları nedeniyle bunun başaramadığını düşündürmüştür. Yine proliferatif dönemde düzeyi yüksek olan ve endometriyumu implantasyon için gerekli olan sekretuar değişimlere hazırlayan östrojenin etkilerinin ortaya çıkmasında da bu büyüme faktörleri etkili olabilir. Sonraki çalışmalarda metodolojik zorluklar aşılabılırsa bu genlerin implantasyon

başarısızlığı olan infertil çiftlerde siklus boyunca değişimlerini daha fazla sayıda olgu ile değerlendirilebilir.

Elde edilen her bilgi bir katkı ve yeni bir bakış açısı sağlasa da, şimdiye kadar alınan sonuçların kliniğe uygulanması için uzun bir zamana ihtiyaç var gibi görünmektedir. Fakat konunun önemi açısından bakıldığında, bu çalışma sonucuyla ortaya çıkan bulgular infertilitenin de dahil olduğu birçok hastalığın altında yatan nedenler arasında genetik temelin olabileceğini düşündürmektedir.

6.SONUÇ

Çalışmamızda, IGF2 gen ifadesinin IVF tedavisi sonrası implantasyon başarısızlığı olan infertil grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azaldığı, H19 ifade düzeyinin ise anlamlı düzeyde azaldığını belirledik. Implantasyon için önemli olduğunu düşündüğümüz H19 ve IGF2 gen ifadelerinin implantasyon başarısızlığı olan grupta kontrol grubuna göre anlamlı değerde düşük olması bu hastaların implantasyon kusurunun altında yatan genetik temeli düşündürmektedir.

İmplantasyon sırasında meydana gelen moleküler düzeydeki değişimlerin belirlenmesi, özellikle implantasyon penceresini gösterebilen biyobelirteçlerin tespiti, IVF sonrası düşük ortalama canlı doğum oranının nedeni olduğu düşünülen implantasyon basamağındaki kusurların anlaşılması açısından önemli bir adım olacaktır. Yapılan araştırmaların klinik yansımaları için zaman gerekmektedir. Ancak, bu ve benzeri moleküler düzeyde yapılan çalışmalarla yeni bakış açıları oluşabilecek, uzun vadede kullanılabilecek temel bilgilere ulaşılabilecektir.

7. ÖZET

IVF TEDAVİSİ SONRASI İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN OLGULARDA ENDOMETRİAL IGF2 VE H19 GEN EKSPRESYONLARININ FERTİL GRUPLA KARŞILAŞTIRILMASI

Endometrium ve blastosist arasındaki hücresel ve moleküler etkileşimler günümüzde hala anlaşılamamıştır. Bu nedenle implantasyon başarısızlığı, IVF sırasında hız kısıtlayan önemli bir adımdır. İmprint genlerin implantasyondaki rolleri henüz araştırılmaya başlanmıştır. IGF2 ve H19 bu genlerden ikisi olup IGF2 bir büyüme faktörü iken H19'un tümör baskılayıcı gen olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Çalışmamızda, IGF2 ve H19 genlerinin ekspresyon düzeylerini belirleyerek IVF tedavisi sonrası implantasyon başarısızlığı olan olgulardaki olası rolünü araştırmayı amaçladık. Çalışmaya 15 infertil, 16 fertil olgu dahil edildi. Endometriyum örneklerinden total RNA ve DNA izolasyonu yapıldı. IGF2 ve H19 genlerinin nicel mRNA ifade düzeyleri Real time PCR yöntemi ile ölçüldü. Fertil ve infertil bireylere ait doku örnekleri sonuçları karşılaştırıldığında, infertil grupta IGF2 geninin mRNA ifade düzeyinde bir azalma gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. H19 mRNA düzeyinin ise infertil grupta anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Bu genlere ait allelik ifadelerdeki değişimler de araştırıldı ancak, her iki genin de mono allelik olarak eksprese edildiği gösterildi. Sonuçlarımız, H19 gen ekspresyonunun infertil grupta kontrole göre anlamlı olarak az bulunması, bu hastaların implantasyon kusurunun altında yatan moleküler nedenlerden biri olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Endometrium, IGF2, H19, ekspresyon, Real-time PCR

8. SUMMARY

Comparison of Endometrial IGF2 and H19 Gene Expressions in Fertile Groups and Patients With Implantational Failure Succeeding IVF Treatment

The complex molecular relationship between the endometrium and blastocyst still remains unclear. Due to this, failure in implantation during IVF cycles pose a major limitation to this procedure. The role of imprinting genes in the implantation process have been recently investigated. Among these are the genes IGF2 and H19. IGF2 acts as a growth factor, while H19 seems to function as a tumor suppressor gene. This study aims to both measure the levels of IGF2 and H19 in patients with supposed implantational defects following IVF treatment, and to evaluate their possible roles and importance in implantation. The study included 15 infertile patients and 16 fertile women. Total RNA and DNA isolation were performed from all endometrial samples. Quantitative mRNA assays of IGF2 and H19 were then assessed using Real Time PCR. When both groups were compared IGF2 mRNA levels were lower in the infertile group, although this difference was not statistically significant. However the H19 mRNA levels were significantly lower in the infertile group. Variation of allelic expression was also evaluated and both genes were found to possess a mono allelic expression pattern. Our results favour the view that H19 gene expression is decreased in the infertile group, and that this maybe one of the molecular factors behind implantational defects.

Key Words: Endometrium, IGF2, H19, expression, Real-time PCR

9.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. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. Hum Reprod 2006; 21: 3036-43.
4. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. Hum Reprod Update 2002; 8(4): 333-43.
5. Sharkey AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2003; 17(2): 289-307.
6. Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte AM. Future directions of failed implantation and recurrent miscarriage research. Reprod Biomed Online 2006; 13(1): 71-83.
7. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. Hum Reprod 2002; 17: 213-8.

- 8.** Yoshinaga K. Endocrinology of implantation. In Tulchinsky D and Little AB (eds), Maternal and Fetal Endocrinology. Saunders, Philadelphia, 1994: p.336-9.
- 9.** Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. N Engl J Med 1999; 340: 1796-9.
- 10.** Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB J 1990; 4(11): 2868-80.
- 11.** Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 1987; 48(4): 549-54.
- 12.** Daftary GS, Taylor HS. Molecular markers of implantation: clinical implications. Curr Opin Obstet Gynecol 2001; 13(3): 269-74.
- 13.** Bronson RA, Fusi FM. Integrins and human reproduction. Mol Hum Reprod 1996; 2(3): 153-68.
- 14.** Sueoka K, Shiokawa S, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M, Yoshimura Y. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. Fertil Steril 1997; 67(5): 799-811.
- 15.** 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(3): 497-506.
- 16.** Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation. Reprod Biomed Online 2007; 15(6): 728-39.

- 17.** Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 1995; 374(6521): 460-3.
- 18.** Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, Branford W, Li H, Small K, et al. Hoxa11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* 1995; 121(5): 1373-85.
- 19.** Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359(6390): 76-9.
- 20.** Ulaner GA, Yang Y, Hu JF, Li T, Vu TH, Hoffman AR. CTCF binding at the IGF2/H19 imprinting control region is insufficient to regulate IGF2/H19 expression in human tissues. *Endocrinology* 2003; 144 (10): 4420-6.
- 21.** Ariel I, Weinstein D, Voutilainen R, Schneider T, Lustig-Yariv O, de Groot N, Hochberg A. Genomic imprinting and the endometrial cycle. The expression of the imprinted gene H19 in the human female reproductive organs. *Diagn Mol Pathol* 1997;6(1): 17-25.
- 22.** Vicdan K, Işık A. infertilite ve üremeye yardımcı tedavi yöntemleri. In: Vicdan K, Işık A, eds. *In vitro Fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar*, 1999:17-2.
- 23.** Koler M, Achache H, Tsafrir A, Smith Y, Revel A, Reich R. Disrupted gene pattern in patients with repeated in vitro fertilization (IVF) failure. *Hum Reprod* 2009; 24(10): 2541-8.
- 24.** Strauss JF, Barbieri RL. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*. 5th ed.: Saunders Publishers; 2006.

- 25.** Heape W. Preliminary Note on the Transplantation and Growth of Mammalian Ova within a Uterine Foster-Mother. Proceedings of the Royal Society of London, 1890; 48: 457- 8.
- 26.** Hodgen GD. Perspectives in human reproduction. Hum Reprod 1988; 3(4): 573-6.
- 27.** Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM. Clinical aspects of pregnancies established with cleaving embryos grown in vitro. Br J Obstet Gynaecol 1980; 87(9): 757-68.
- 28.** Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. Lancet 1996; 348(9039): 1402-6.
- 29.** Schieve LA, Rasmussen SA, Buck GM, Schendel DE, Reynolds MA, Wright VC. Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes? Obstet Gynecol 2004; 103(6): 1154-63.
- 30.** Wynn RM. The placenta in preeclampsia. Obstet Gynecol Annu 1977; 6: 191.
- 31.** King A. Uterine leukocytes and decidualization. Hum Reprod Update 2000; 6(1): 28-36.
- 32.** Aplin JD, Charlton AK, Ayad S. An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. Cell Tissue Res 1988; 253(1): 231-40.

- 33.** Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Yamoto M, Nakano R. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. *J Reprod Fertil* 1996; 108(1): 147-55.
- 34.** Brar AK, Handwerger S, Kessler CA, Aronow BJ. Gene induction and categorical reprogramming during in vitro human endometrial fibroblast decidualization. *Physiol Genomics* 2001; 7(2): 135-48.
- 35.** Schatz F, Aigner S, Papp C, Toth-Pal E, Hausknecht V, Lockwood CJ. Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(8): 2504-10.
- 36.** Schatz F, Soderland C, Hendricks-Muñoz KD, Gerrets RP, Lockwood CJ. Human endometrial endothelial cells: isolation, characterization, and inflammatory-mediated expression of tissue factor and type 1 plasminogen activator inhibitor. *Biol Reprod.* 2000; 62(3): 691-7.
- 37.** Salamonsen LA, Zhang J, Hampton A, Lathbury L. Regulation of matrixmetalloproteinases in human endometrium. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 3:112-9.
- 38.** Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14(5): 815-26.
- 39.** Seppälä M, Koistinen H, Koistinen R, Timonen T. Implantation and placentation: glycodecins. In: Kempers R., Cohen J, Haney AF, Younger JB editors. *Fertility and Reproductive Medicine*. 1st ed. New York: Elsevier Science, 1998. p. 679–83.

40. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994; 266(5190): 1508-18.
41. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002; 296(5576): 2185-8.
42. Finn CA, Martin L. The control of implantation. *J Reprod Fertil* 1974; 39(1): 195-206.
43. Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 476:36-42.
44. Hertig AT, Rock J, Adams EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. 1956; 98: 435-93.
45. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992; 58: 537-42.
46. Zhou GQ, Baranov V, Zimmermann W, Grunert F, Erhard B, Mincheva-Nilsson L, et al. Highly specific monoclonal antibody demonstrates that pregnancy-specific glycoprotein (PSG) is limited to syncytiotrophoblast in human early and term placenta. *Placenta* 1997; 18(7): 491-501.
47. Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, Francés A, Garcia Velasco J, Remohí J, et al. Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod* 1996; 2(6): 405-24.

- 48.** Pampfer S, Tabibzadeh S, Chuan FC, Pollard JW. 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* 1991; 5: 1931-8.
- 49.** Stewart CL. The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 734: 157-65.
- 50.** Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, et al. Expression Of leukemia inhibitory factory in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 1994; 50: 882-7.
- 51.** Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 307.
- 52.** Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4(11): 2868-80.
- 53.** Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 1993; 119(4): 1175-86.
- 54.** Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, et al. Trophoblast L-selectin mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003; 299: 405-8.
- 55.** Riethmacher D, Brinkmann V, 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.

- 56.** Fukuda MN, Sato T, Nakayama J, Klier G, Mikami M, Aoki D, et al. Trophinin and tastin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation. *Genes Dev* 1995; 9(10): 1199-210.
- 57.** Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA. Blockade of the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod* 2000; 62(5): 1285-90.
- 58.** Illera MJ, Lorenzo PL, Gui YT, Beyler SA, Apparao KB, Lessey BA. A role for $\alpha v \beta 3$ integrin during implantation in the rabbit model. *Biol Reprod* 2003; 68(3): 766-71.
- 59.** Carpenter G, Zendegui JG. Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. *Exp Cell Res* 1986; 164(1):1-10.
- 60.** Chobotova K, Spyropoulou I, Carver J, Manek S, Heath JK, Gullick WJ, et al. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst. *Mech Dev.* 2002;119(2):137-44.
- 61.** Murphy CR. The plasma membrane transformation of uterine epithelial cells during pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; 55: 23-8.
- 62.** Thie M, Harrach-Ruprecht B, Sauer H, Fuchs P, Albers A, Denker HW. Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity. *Eur J Cell Biol* 1995; 66(2): 180-91.

- 63.** Martín JC, Jasper MJ, Valbuena D, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A, et al. Increased adhesiveness in cultured endometrial-derived cells is related to the absence of moesin expression. *Biol Reprod* 2000; 63: 1370-6.
- 64.** Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm* 1973; 31: 201-56.
- 65.** Usadi RS, Lessey BA, Bagnell RC, Meyer WR, Fritz MA. Distribution of pinopods in the secretory phase: a prospective, randomized assessment in healthy, fertile women. 2001; 76: 39.
- 66.** Nikas G, Develioglou OH, Toner JP, Jones HW Jr. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999; 14(3): 787-92.
- 67.** Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A, Sinatra F, Nardo F. Synchronous expression of pinopodes and alpha v beta 3 and alpha 4 beta 1 integrins in the endometrial surface epithelium of normally menstruating women during the implantation window. *J Reprod Med* 2003; 48(5): 355-61.
- 68.** Lessey BA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids* 2003; 68(10-13): 809-15.
- 69.** Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity--a review. *Placenta* 2003; 24 Suppl B: S39-47.
- 70.** Fazleabas AT, Kim JJ, Strakova Z. Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment-a review. *Placenta* 2004; 25 Suppl A:S26-31.

- 71.** Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; 144(7): 2870-81.
- 72.** Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, et al. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod*. 2002; 8(9): 871-9.
- 73.** Ola B, Li TC. Implantation failure following in-vitro fertilization. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18(4):440-5.
- 74.** Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones AP. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-63.
- 75.** Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; 174: 341-48.
- 76.** Peterson LC, Laniel M. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004; 14: 546-51.
- 77.** Lizuka M, Smith MM. Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 154-60.
- 78.** Grant AP. A tale of histone modifications. *Genome Biol* 2001; 2: 1-6.
- 79.** Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 1997; 13: 444-9.

- 80.** Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* 2000; 183: 145-54.
- 81.** Delgado S, Gomez M, Bird A, Antequera F. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *EMBO J* 1998; 17: 2426-35.
- 82.** Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293: 1068-70.
- 83.** Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089-93.
- 84.** Heard E, Clerc P, Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet* 1997; 31: 571-610.
- 85.** Jiang Y, Bressler J, Beaudet LA. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genet* 2004; 5: 479-510.
- 86.** Bora G, Yurter HE. Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2007; 38: 48-54.
- 87.** DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 1991; 64: 849-859.
- 88.** Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update* 2004; 10(1): 3-18.

- 89.** Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomci MS, Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation Mouse embryo. *Biol Reprod* 2000; 62: 1526-35.
- 90.** Charalambous M, Teixeira da Rocha S, Ferguson-Smith A, Genomic imprinting, growth control and the allocation of nutritional resources: consequences for postnatal life, *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity* 2007; 14: 3–12.
- 91.** Smith FM, Garfield AS, Ward A. Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113: 279-291.
- 92.** Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984; 308: 548-50.
- 93.** McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984; 37: 179-83.
- 94.** Tycko B, Morison IM. Physiological functions of imprinted genes. *J Cell Physiol* 2002; 192(3): 245-58.
- 95.** Paoloni-Giacobino A. *Expert Rev Mol Med* 2006; 8(12): 1-14.
- 96.** Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000; 403: 501-2.
- 97.** Mann MR, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, et al. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* 2004; 131: 3727-35.

- 98.** Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001; 27: 153-4.
- 99.** Cederblad M, Frøberg B, Ploman F, Sjöberg NO, Stjernqvist K, Zackrisson E. Intelligence and behavior in children born after in vitro fertilization treatment. *Hum Reprod* 1996; 11: 2052-7.
- 100.** Golombok S, Brewaeys A, Cook R, Giavazzi MT, Guerra D, Mantovani A, et al. The European study of assisted reproduction families: family functioning and child development. *Hum Reprod* 1996; 11: 2324-31.
- 101.** Levy-Shiff R, Vakil E, Dimitrovsky L, Abramovitz M, Shahar N, Har-Even D, et al. Medical, cognitive, emotional and behavioral outcomes in school-age children conceived by in-vitro fertilization. *J Clin Child Psychol* 1998; 27: 320-9.
- 102.** Barnes J, Sutcliffe AG, Kristofferson I, Loft A, Wennerholm U, Tarlatzis BC, et al. The influence of assisted reproduction on family functioning and children's socio -emotional development: results from a European study. *Hum Reprod* 2004; 19: 1480-7.
- 103.** Pfeifer K. Mechanisms of Genomic Imprinting. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 777-87.
- 104.** Hall JG. How imprinting is relevant to human disease ? *Development Suppl* 1990: 141-48.

- 105.** De Rycke M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod* 2002; 17(10): 2487-94.
- 106.** Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 329-34.
- 107.** Manning M, Lissens W, Bonduelle M, Camus M, De Rijcke M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Study of DNA-methylation patterns at chromosome15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 1049-53.
- 108.** Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 162–4.
- 109.** Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes and assisted reproductive technology. *Lancet* 2003; 361: 1975-7.
- 110.** Orstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, et al. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am. J Hum Genet* 2003; 42: 218–9.
- 111.** Cetin I, Cozzi V, Antonazzo P. Fetal development after assisted reproduction. *Placenta* 2003; 24 Suppl B: S104-13.
- 112.** Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 1991; 351: 153-5.

- 113.** Grbesa I, Marinkovic M, Ivkic M, Kruslin B, Novak-Kujundzic R, Pegan B, et al. Loss of imprinting of IGF2 and H19, loss of heterozygosity of IGF2R and CTCF, and Helicobacter pylori infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Mol Med* 2008; 86: 1057–66.
- 114.** Lustig O, Ariel I, Ilan J, Lev-Lehman E, de-Groot N, Hochberg A. Expression of the imprinted H19 gene in the human fetus. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 239-46.
- 115.** Pachnis V, Belayew A, Tilghman SM. Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 84: 5523-7.
- 116.** Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 28-36.
- 117.** Maher ER, ReikW. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 105:247-52.
- 118.** Leighton PA, Ingram RS, Eggenschwiler J, Efstratiadis A, Tilghman SM. Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature* 1995a; 375: 34-9.
- 119.** Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL, Tilghman SM. An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes & Dev* 1995b; 9: 2079-89.
- 120.** Srivastava M, Hsieh S, Grinberg A, Williams-Simons L, Huang SP, Pfeifer K. H19 and Igf2 monoallelic expression is regulated in two distinct ways by a shared cis acting regulatory region upstream of H19. *Genes Dev* 2000; 14: 1186-95.

- 121.** Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes & Dev* 1998; 12: 3693-702.
- 122.** Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 1993; 362: 747-9.
- 123.** Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 1993; 362: 749-51.
- 124.** Vu TH, Hoffman A. Alterations in the promoter-specific imprinting of the insulin-like growth factor-II gene in Wilms' tumor. *J Biol Chem* 1996; 271: 9014-23.
- 125.** Glassman ML, de Groot N and Hochberg A. Relaxation of imprinting in carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 89: 69-73.
- 126.** Nonomura N, Nishimura K, Miki T, Kanno N, Kojima Y, Yokoyama M, Okuyama A. Loss of imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 2575–7.
- 127.** Ross JA, Schmidt PT, Perentesis JP, Davies SM. Genomic imprinting of IGF-2 and H19 in pediatric germ cell tumours. *Cancer* 1999; 85: 1389-94.
- 128.** Singh V, Srivastava M. Enhancer Blocking Activity of the Insulator at H19-ICR Is Independent of Chromatin Barrier Establishment. *Molecular and Cellular Biology* 2008; 28(11): 3767–75.

- 129.** Zhang Y, Shields T, Crenshaw T, Hao Y, Moulton T, Tycko B. Imprinting of human H19: allele-specific CpG methylation, loss of the active allele in Wilms tumor, and potential for somatic allele switching. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 113-24.
- 130.** Jinno Y, Sengoku K, Nakao M, Tamate K, Miyamoto T, Matsuzaka T, Sutcliffe JS, Anan T, Takuma N, Nishiwaki K, Ikeda Y, Ishimaru T, Ishikawa M, Niikawa N. Mouse/human sequence divergence in a region with a paternal-specific methylation imprint at the human H19 locus. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1155-61.
- 131.** Vu TH, Li T, Nguyen D, Nguyen BT, Yao XM, Hu JF, Hoffman AR. Symmetric and asymmetric DNA methylation in the human IGF2-H19 imprinted region. *Genomics* 2000; 64: 132-43.
- 132.** Chao W, D'Amore PA. IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2008; 19: 111–20.
- 133.** Engel N, West AG, Felsenfeld G, Bartolomei MS. Antagonism between DNA hypermethylation and enhancer-blocking activity at the H19 DMD is uncovered by CpG mutations. *Nat Genet* 2004; 36: 883-8.
- 134.** Kawahara M, Morita S, Takahashi N, Kono T. Defining contributions of paternally methylated imprinted genes at the Igf2-H19 and Dlk1-Gtl2 domains to mouse placentation by transcriptomic analysis. *J Biol Chem* 2009;284(26): 17751-65.

- 135.** Bourque DK, Avila L, Peñaherrera M, von Dadelszen P, Robinson WP. Decreased Placental Methylation at the H19/IGF2 Imprinting Control Region is Associated with Normotensive Intrauterine Growth Restriction but not Preeclampsia. *Placenta* 2010 (Basımda).
- 136.** Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG. A role for the insulin-like growth factors as estromedins in the rat uterus. *Trans Assoc Am Physicians* 1987; 99: 204-14.
- 137.** Norstedt G, Levinovits A, Eriksson H. Regulation of uterine insulin-like growth factor I mRNA and insulinlike growth factor II mRNA by estrogen in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 120: 466-72.
- 138.** Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarian Zo, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, et al. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod* 2006; 21(10): 2694-8.
- 139.** Poppe K, Glinoeer D, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem A, Kaufman L, et al. Assisted reproduction and thyroid autoimmunity: an unfortunate combination? *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9): 4149-52.
- 140.** Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. 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* 1986; 3(5): 284-95.

- 141.** Desal NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod* 2000; 15(10): 2190-6.
- 142.** Van Royen E, Mangelschots K, de Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14(9): 2345-9.
- 143.** Gerris J, De Neuborg D, Mangelschots K, Van de Meerssche M, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum Reprod* 1999; 14(10): 2581-7.
- 144.** Van Royen E, Mangelschots K, de Neuborg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum Reprod* 2001; 16(2): 326-32.
- 145.** Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997; 12(7): 1545-9.
- 146.** Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16(2): 313-8.

- 147.** Roseboom TJ, Vermeiden JP, Schoute E, Lens JW, Schats R. 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* 1995; 10(11): 3035-41.
- 148.** Noyes RW, Hertig A, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3-25.
- 149.** Tanos V, Ariel I, Prus D, De-Groot N, Hochberg A. H19 and IGF2 gene expression in human normal, hyperplastic, and malignant endometrium. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14(3): 521-5.
- 150.** Giudice LC, Lamson G, Rosenfeld RG, Irwin JC. Insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF binding proteins in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 626: 295-307.
- 151.** Korucuoglu U, Biri AA, Konac E, Alp E, Onen IH, Ilhan MN, et al. Expression of the imprinted IGF2 and H19 genes in the endometrium of cases with unexplained infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (Basimda).
- 152.** Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, et al. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 2009; 24(1): 198-205.
- 153.** Riesewijk A, Martín J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, et al. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(5): 253-64.

- 154.** Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, et al. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005; 20(8): 2104-17.
- 155.** Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147(3): 1097-121.
- 156.** Ayesb S, Matouk I, Schneider T, Ohana P, Laster M, Al-Sharef W, et al. Possible physiological role of H19 RNA. *Mol Carcinog* 2002;35(2):63-74.
- 157.** Giudice LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium:their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 1994;61(1):1-17.
- 158.** Rutanen EM, Seppälä M. Insulin-like growth factor binding protein-1 in female reproductive functions. *Int J Gynaecol Obstet.* 1992;39(1):3-9.

10.EKLER

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimim süresince yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen bilgi ve deneyimleriyle yönlendiren değerli hocam, tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Sevda MENEVŞE' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Burada aldığım eğitim süresince öğrendiğim yeni bilgiler, teknikler, uygulamalar sayesinde mesleğime, araştırmalarımaya yeni bir açısı ile yaklaşabilirken, bu bilgiler doğrudan hasta hizmetlerimdeki kalitemi de yükseltmiştir. Oldukça faydalı ve huzurlu bir eğitim süresi geçirdiğim bu anabilim dalındaki herkese tek tek teşekkür ederken, özellikle eğitimim sırasında deneyimlerini ile yol gösteren, emeklerini bizden esirgemeyen değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Adnan MENEVŞE ve Sn. Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ' ye de ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Tezime hasta bulunması aşamasında desteklerini gördüğüm Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Ahmet ERDEM ve Prof. Dr. Mehmet ERDEM' e şükranlarımı sunarım. 3 yıl boyunca çalışmanın başarı ile bitirilmesinde her bir olgunun titizlikle seçilmesi ve takibindeki gayretlerinden dolayı Dr. Esengül Türkyılmaz' a teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin oluşmasında büyük katkıları olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Ece KONAÇ' a, Öğr. Gör. Dr. H. İlke ÖNEN' e ve Araş. Gör. Ebru ALP' e teşekkürlerimi sunarım.

En zor günlerimde bana destek olabilmek için hep yanımda olan, tüm zorlukları göğüslemek için gerekli gücü bana sağlayan fedakar aileme, eşime ve oğullarım Eren'e ve Hakan'a en derin sevgilerimi ve

teşekkürlerimi sunarım. Beni yetiştiren ve her gün yanımda olan, destekleyen, annem ve babama teşekkür de yetmez, hakları zaten ödenmez.

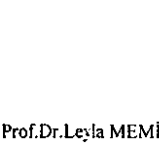


T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURULU

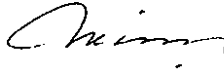
Tarih	Sayı	Konu
17. 10. 2005	246	Etik Kurul Kararı Hk.

Fakültemiz Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr.Aydan Asyalı Biri'nin sorumlu araştırmacısı olduğu "Açıklanamayan infertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları ve IVF'de implantasyon başarısızlığı olan olgularda endometriyumdaki imprint genlerin eksresyonu" başlıklı çalışması, Etik Kurulumuzca incelenerek uygun bulunmuştur.


Prof.Dr.Türkiz GÜRSEL
BAŞKAN


Prof.Dr.Leyla MEMİŞ
ÜYE (Katılmadı)


Prof.Dr.Ceyda KARADENİZ
ÜYE

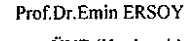

Prof.Dr.Candan TUNCER
ÜYE

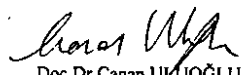

Prof.Dr.Ayşe ARICIOĞLU
ÜYE

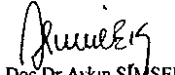

Prof.Dr.Ayla GÜLEKON
ÜYE


Prof.Dr.Esin ŞENOL
ÜYE


Prof.Dr.Fani AKAR
ÜYE


Prof.Dr.Emin ERSOY
ÜYE (Katılmadı)


Doç.Dr.Canan ULUOĞLU
ÜYE


Doç.Dr.Aykin ŞİMŞEK
ÜYE


Yrd.Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU
ÜYE

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Aydan

Soyadı : ASYALI BİRİ

Doğum Yeri ve Tarihi : Van, 1965

Eğitimi :

2006- Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Doçent Doktor

2003- Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Doktora Eğitimi

1996-2001 TCDD Ankara Hastanesi, Uzman Doktor

1993-1996 Niğde Devlet Hastanesi, Uzman Doktor

1988-1993 SSK Ankara Doğumevi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği Asistanı

1981-1987 Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Mezuniyet Sonrası Yurtdışı Eğitim :

1997 Ocak –Haziran University of Southern California, School of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology

2003 Ekim-2004 Ocak tarihleri arasında Cornell University Joan and Sanford I. Weill Medical College Department of Obstetrics and Gynecology, Maternal-Fetal Medicine and Ultrasound Division

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türkiye Maternal Fetal Tıp ve Perinataloji Derneği (yönetim kurulu üyesi), Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği, Ankara Jinekoloji Derneği, Obstetrik ve jinekolojik USG Derneği, Aile Planlaması ve Kontrasepsiyon Derneği (yönetim kurulu üyesi), Jinekolojik Endoskopi Derneği

Doç. Dr. Aydan Asyalı Biri'nin 53 adet yurt dışı ve 60 adet yurt içi basılmış yayını ve 140 adet yurtiçi ve yurtdışı tebliği bulunmaktadır.

Bilimsel Etkinlikleri:

Ödüller

1. 7.Ulusal jinekoloji ve obstetrik kongresi,14-19 mayıs, 2009, Girne, KKTC 3.sözlü bildiri dalında **3.'lük ödülü:** Açıklanamayan infertilite olgularında endometriyumda imprint genlerin ekspresyonu' Korucuoğlu Ü, **Biri A**, Konaç E, Alp E, Önen İ, İlhan M, Türkyılmaz E, Erdem A, Erdem M, Menevşe S.
2. Jinekoloji ve Obstetri Kış Kongresi,Uludağ,17-21 Ocak 2007.En iyi **4.poster ödülü:** "Umbilikal kord Kolizasyon İndeksi ve gebelik sonuçlarının değerlendirilmesi." **Aydan Biri**, Ercan Yılmaz, Ümit Korucuoğlu, Güven Günaydın, Bülent Tıraş.
3. 5. Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, Antalya, 16-21 Mayıs 2006. En iyi bildiri-**2.'lik ödülü:** "USG uygulanan fetal rat akciğer dokularında SOD aktivitesi ve lipid peroksidasyonu." **Aydan Biri**, Ümit Korucuoğlu, Figen Babacan, Nilhan Nurlu, Mustafa Kavutçu.
4. Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, Antalya, 16-21 Mayıs 2006. En iyi bildiri-**6.'lık ödülü:** Çocukluk döneminden ergenlik dönemine kadar olan evrede kullanılan valproik asit ve

okskarbamazepinin ovaryumda folikül gelişimine etkilerinin incelenmesi. **Aydan Biri**, Ümit Korucuoğlu, Ali Cansu, Seren Gülşen Giray, Ayşe Serdaroğlu, Deniz Erdoğan.

5. Biri, A., B.Ciftci, A.Erkan, M.A. Ergün, A.Yılmaz, B.Tıraş, H.Güner ve R.Yalcın,“The Association Of Raloxifene Treatment With Estrogen Receptor Gene Polymorphism,” VI.International Congress of the Turkish –German Gynecological Association, Antalya, Turkey, 18-22 May 2005. Türkiye, Sözel bildiri **1.’ lik ödülü.**

6. Biri A., Öztürk S., M.B.Tıraş. Impaired enzymatic antioksidant defense in uterine myoma tissues. 4.Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik kongresi. 20-25 Nisan 2004, Antalya, Sözel bildiri **2.’ lik ödülü.**

7. Yılmaz M., Biri A., Karakoç A., Törüner F., Bingöl B., Çakır N., Tıraş M.B.,Ayvaz G., Arslan M., Akçin Ü. Obez ve obez olmayan PCOS hastalarında roziglitazone ve metforminin insülin rezistansı ve serum androjen seviyeleri üzerindeki etkileri. 4.Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik kongresi. 20-25 Nisan 2004, Antalya, Sözel Bildiri **4.’lük ödülü.**

8. Biri A., Öztük J., Maral I. Maternal deaths occurred in hospitals in Ankara between 1997-2000. I. International and II. National Congress on Reproductive Health and Family Planning, 20-23 April 2001, Talya Hotel, Antalya, Turkey. Poster sunumu **ilk on ödülü.**

9. Bozdayı G., Biri A., Rota S. Rapid diagnosis and typing of human papillomavirus from genital biopsy specimens by PCR in microbiology laboratories. The World of Microbes, XI.International Congress of Virology, 27 Temmuz – 1 Agustos 2002, Paris, Fransa.

“Dünya Viroloji Kongresine gönderilen poster sunumumuza düzenleme kurulu tarafından **burs** (yol ve katılım ücreti) verilmiştir.”

10. Gazi üniversitesi rektörlüğü SCI'ye kaynak teşkil eden dergilerde 2002-2005-2006-2007-2008 yılında yayınlanan makaleler nedeniyle Üniversitesi Tıp fakültesi ve Rektörlüğü yayın ödülleri

Projeler

- 1.** Gölbaşı bölgesinde 15 yaş üzeri kadınlarda Herpes Simplex-II, Human Papilloma Virus ve Chlamidya Trochomatis seroprevalansı, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-22, **Proje Yöneticisi**, 2002.
- 2.** Douglasdan alınan örneklerden Chlamidya Trochomatisin polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-26, **Proje Yöneticisi**, 2002.
- 3.** Menorajili Türk Kadınlarında Von Willibrand Hastalığının sıklığı, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-121, **Proje Yöneticisi**, 2002.
- 4.** Human papilloma virusun tanısında servikovajinal lavaj ve servikal sürüntü olarak alınan örneklerin polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile karşılaştırılması, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-03, **Yardımcı Araştırmacı**, 2002.
- 5.** Konjenital enfeksiyona neden olan DNA virüslerinin (CMV,HSV II,HPV 16-18,Parvovirus B 19) perinatal tanısı ve enfekte bebeklerin izlenmesi, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-09, **Yardımcı Araştırmacı**, 2002.
- 6.** Gebelik öncesi ve gebelik süresince HSV2 IgM ve IgG antikoru pozitif kadınlarda kesin tanı amacıyla PCR ile etkenin

DNA'sının gösterilmesi, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-01, **Yardımcı Araştırmacı**, 2002.

7. Açıklanamayan erkek infertilitesinde HPV genotiplerinin ve AAV DNA'sının Real time PCR ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak araştırılması, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-107, **Yardımcı Araştırmacı**, 2003.

8. Endometriyozis tanısında Ca 19-9 ve Ca 125'in yararlılık açısından karşılaştırılması, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-42, **Yardımcı Araştırmacı**, 2003.

9. Hormon Replasman Tedavisinin yaratabileceği oksidatif DNA hasarının perifereal lenfositlerde araştırılması, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-41, **Proje Yöneticisi**, 2003.

10. Fetal kromozomal ve yapısal anomalilerde viral etkenlerin (HSV ,CMV, HPV,RSV,Parvovirus B19) rolünün araştırılması, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-101, **Proje Yöneticisi**, 2004.

11. Büyüme ve gelişme geriliği olan gebelerde kord kanında büyüme faktör düzeyleri ve ilişkisi, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-08, **Proje Yöneticisi**, 2004.

12. Açıklanamayan infertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları ve IVF'de implantasyon başarısızlığı olan olgularda endometriyumdaki imprint genlerin ekspresyonu, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-65, **Proje Yöneticisi**, 2005.

13. Karyotipi "46,XX" olarak belirlenen spontan abort materyallerinde, anne hücre kontaminasyonunun moleküler teknikler kullanılarak ayırımı, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP-22, **Yardımcı Araştırmacı**, 2005.

14. Tanısal amaçlı USG ve Doppler uygulamasının fetal antioksidan enzimler üzerine etkileri, Gazi Üniversitesi araştırma projesi, BAP, **Yardımcı Araştırmacı**, 2004.