

EZGİ GİZEM BERKAY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2020



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI OLAN
ÇİFTLERDE İLİŞKİLİ TEK GEN MUTASYONLARININ
ARAŞTIRILMASI**

EZGİ GİZEM BERKAY

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEHER BAŞARAN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

EZGİ GİZEM BERKAY

İTHAF

Antik çağlardan günümüze bebeğini kaybetmiş tüm kadınlara...



Tellus, Remus ve Romulus'u büyütürken. M.Ö. 13, Roma, İtalya.

TEŞEKKÜR

Bilgisine ve tecrübesine hayran olduğum, araştırmacılığı destekleyen ve yol gösteren, tez danışmanım Prof. Dr. Seher Başaran'a,

Moleküler genetiği öğreten, bilgi ve tecrübesini güleryüzü ile paylaşan Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner'e,

Doktora eğitimimde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Beyhan Tüysüz'e,

Bilgi ve çalışmalarıyla katkı sunan Prof. Dr. Birsan Karaman'a,

Meslektaşım, ablam ve kıymetli dostum Doç. Dr. Asuman Gedikbaşı'na,

Yeni nesil dizileme analizlerimde yol gösteren Dr. Güven Toksoy'a ve desteğini, bilgisini ve engin şakalarını paylaşan Dr. Çağrı Güleç'e,

Çalışma grubumuzun oluşturulması ve olgu değerlendirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Tuğba Kalaycı'ya,

Islak laboratuvar işlerinde bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim Alev Yalın'a ve olgularımızla ilgilenmekten çekinmeyen dostum Nuray Kırmızı'ya,

Değerli çalışma arkadaşlarım Hamdi Kale, Emel Özvardar, Ebru Pektaş, Volkan Karaman, Havva Öztürk ve Zuhal Kaplan olmak üzere tüm Tıbbi Genetik poliklinik ve laboratuvar çalışanlarına,

Dostluğu, paylaşımı, birlikte mücadeleyi öğreten Hasır Şapka Korsanları ve yaratıcısı Eichiro Oda'ya; bilgi kaynağım koca yürekli kanal Viasat History'e,

Her daim yanımda olan yol arkadaşım Can Veysel Şoroğlu'na ve akademik hayatın sadece emir komuta zinciri olmadığını, bir hocanın aynı zamanda dost ve abla da olabileceğini gösteren Prof. Dr. Burçak Vural'a,

Beni büyüten, durmadan okuyan ve araştıran biri olmamı sağlayan Fatma ve Erdinç Berkay'a,

İnsanın en iyi dostunun birlikte yaşadığı hayvanlar olduğunu gösteren Metigoshe, Naruto ve Reçel'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-31561 ve TSA-2018-32135

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XVII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XIX
ÖZET	XXII
ABSTRACT.....	XXIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek Üreme Sistemi	3
2.2. Dişi Üreme Sistemi	3
2.2.1. Menstrüel Döngü.....	5
2.2.2. Gebeliğin Oluşumu	8
2.2.3. Uterin Bezler ve Gebelik.....	12
2.2.4. Gebelik Endokrinolojisi	13
2.2.5. Plasenta	14
2.2.6. Gebelik ve Normal İmmün Fonksiyon.....	16
2.3. Gebelik Kayıpları.....	19
2.4. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları	21
2.4.1. İmmün Nedenler	23
2.4.1.1. Antifosfolipid Sendromu (APS).....	24
2.4.2. Endokrin Nedenler	25
2.4.3. Anatomik Nedenler	26
2.4.4. Genetik Nedenler	27
2.4.4.1. Kromozom Anomalileri	27
2.4.4.2. Bilinen Tek Gen Defektleri.....	29
2.4.5. Enfeksiyonlar	31
2.4.6. Çevresel ve Bireysel Faktörler.....	31

2.4.7. Erkek Faktörü.....	32
2.4.8. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları İçin Hazırlanmış Uluslararası Kılavuzların Karşılaştırılması	34
2.5. Sebebi Açıklanamayan Tekrarlayan Gebelik Kayıplarının Etiyolojisini Açıklamaya Yönelik Güncel Hipotezler	36
2.5.1. İmplantasyon Kontrol Noktası Hipotezi	36
2.5.2. İmplantasyon Kusurları.....	37
2.5.3. Endometrial Kök Hücre	38
2.5.4. mikroRNA ve Embriyo-Endometriyum İletişim Ağı	39
2.5.5. Maternal Mitokondriyal DNA Varyantları	40
2.5.6. Dişi Embriyo Hipotezi	41
2.5.7. LINE-1 Retrotranspozon Hipotezi	42
2.6. TKG Etiyolojisinin Aydınlatılmasında Moleküler Analizlerin Etkileri	43
2.7. TKG Etiyolojisinin Aydınlatılmasında YND Teknolojisi ile Yapılan Çalışmalar	45
2.8. İnfertilite Etiyolojisinin Araştırılmasında YND Teknolojisinin Kullanımı ve Etkileri.....	49
2.9. Tıbbi Genetik Alanında Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri	52
2.9.1. Sitogenetik Yöntemler	52
2.9.2. Moleküler Genetik Yöntemler	53
2.9.2.1. Yeni Nesil Dizileme	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	58
3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması.....	58
3.2. Klinik Değerlendirmeler	59
3.3. Kromozom Analizleri	59
3.4. Moleküler Çalışmalar.....	60
3.4.1. DNA İzolasyonu ve Kalitesinin Değerlendirilmesi	60
3.4.2. Islak Laboratuvar Çalışmaları.....	61
3.5. Varyantların Biyoinformatik Analizi	62
3.5.1. Varyantların Patojenitesinin Belirlenmesi	63
3.6. Primerlerin Tasarlanması	68
3.7. Ekzonik Bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Çoğaltılması ve Saflaştırılması.....	69
3.8. Sanger Dizi Analizi ile Varyantın İncelenmesi ve Biyoinformatik Analizi	70

3.8.1. Dizi PZR Çalışması.....	70
3.8.2. Kapiller Elektrophorez.....	71
3.8.3. Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Biyoinformatik Analizi	72
4. BULGULAR.....	73
4.1. Gebelik Öyküsüne Göre Oluşturulan Olgu Grupları	73
4.2. Sitogenetik analiz sonuçları	74
4.3. Moleküler Analiz Sonuçları	77
4.3.1. TED Analiz Sonuçları ve Olgu Sunumları	77
4.3.1.1. Olgu 1.....	77
4.3.1.2. Olgu 2.....	79
4.3.1.3. Olgu 3.....	81
4.3.1.4. Olgu 4.....	82
4.3.1.5. Olgu 5.....	84
4.3.1.6. Olgu 6.....	86
4.3.1.7. Olgu 7.....	87
4.3.1.8. Olgu 8.....	89
4.3.1.9. Olgu 9.....	90
4.3.1.10. Olgu 10.....	92
4.3.1.11. Olgu 11.....	94
4.3.1.12. Olgu 12.....	96
4.3.1.13. Olgu 13.....	98
4.3.1.14. Olgu 14.....	100
4.3.1.15. Olgu 15.....	102
4.3.1.16. Olgu 16.....	104
4.3.1.17. Olgu 17.....	107
4.3.1.18. Olgu 18.....	109
4.3.1.19. Olgu 19.....	110
4.3.1.20. Olgu 20.....	112
4.3.1.21. Olgu 21.....	114
4.3.1.22. Olgu 22.....	116
4.3.1.23. Olgu 23.....	118
4.3.1.24. Olgu 24.....	121
4.3.1.25. Olgu 25.....	122

4.3.1.26. Olgu 26.....	124
4.3.1.27. Olgu 27.....	126
4.3.1.28. Olgu 28.....	128
4.3.1.29. Olgu 29.....	130
4.3.1.30. Olgu 30.....	132
4.3.1.31. Olgu 31.....	134
4.3.1.32. Olgu 32.....	136
4.3.1.33. Olgu 33.....	137
4.3.1.34. Olgu 34.....	139
4.3.1.35. Olgu 35.....	141
4.4. Saptanan Varyantların Yolaklarına Göre Sınıflandırılması	143
5. TARTIŞMA	147
5.1. Sitogenetik Analiz Sonuçları	148
5.2. Moleküler Analiz Sonuçları	150
5.2.1. Metabolik Yolaklarda Görevli Genler	151
5.2.2. İmplantasyonda Etkin Genler.....	156
5.2.3. Plasantasyon, Anjiyogenez ve Koagülasyonda Etkin Genler	158
5.2.4. Embriyogenezde Etkin Genler	162
5.2.5. Epigenetik Mekanizma ile Düzenlenen Genler	167
5.2.6. İmmün Regülasyonda Etkin Genler	168
5.2.7. Hücre Bölünmesi / Döngüsünde Etkin Genler.....	169
5.2.8. DNA Hasarı Tamir Yolağı.....	173
5.2.9. Siliyopatilerle ilişkili genler.....	176
5.2.10. Polikistik Over Sendromu ile İlişkili Genler.....	181
5.2.11. Oosit olgunlaşma Defekti ile İlişkili Genler	181
5.2.12. Prematür Over Yetmezliği ile İlişkili Genler	183
KAYNAKLAR	188
FORMLAR	242
ETİK KURUL KARARI	247
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	249
ÖZGEÇMİŞ	250

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Gebelik kayıplarında kullanılan terminoloji (Silver (84)'dan değiştirilerek)	19
Tablo 2-2: Saptanabilen tekrarlayan gebelik kayıplarında etiyolojik faktörler (Kolte (90)'den değiştirilerek)	21
Tablo 2-3: Gebelik kaybı riskini arttıran kontrol edilemeyen faktörler.....	33
Tablo 2-4: Gebelik kaybı riskini azaltan kontrol edilemeyen faktörler.....	33
Tablo 2-5: Gebelik kaybı riskini arttıran kontrol edilebilen faktörler	33
Tablo 2-6: Gebelik kaybı riskini azaltan kontrol edilebilen faktörler	33
Tablo 2-7: Gebelik kaybı riskini etkilemediği düşünülen faktörler.....	34
Tablo 2-8: Tekrarlayan gebelik kayıpları için hazırlanmış uluslararası kılavuzların karşılaştırılması (Youssef (158)'ten değiştirilerek)	34
Tablo 2-9: Tekrarlayan gebelik kayıplarında tanıda kullanılan testler ve tedavi yaklaşımları (Youssef (158)'ten derlenerek)	36
Tablo 2-10: İmplantasyon kusuruna yol açtığı bilinen nedenler ve mekanizmaları (Koot (164)'tan değiştirilerek)	38
Tablo 2-11: İmplantasyonda etkin miRNA'lar (Revel (180)'den değiştirilerek)	40
Tablo 2-12: TGK olgularına ait spontan abortus dokusunda saptanan miRNA'lar ve ilişkili yolaklar (Söber (181) ve Wang (182)'dan değiştirilerek)	40
Tablo 2-13: Sanger dizileme tekniği kullanarak TGK etiyolojisi ile ilişkilendirilmeye çalışılmış genler ve saptanan varyantlar	43
Tablo 2-14: Farklı moleküler teknikler kullanarak TGK etiyolojisi ile ilişkilendirilmeye çalışılmış genler ve polimorfizmleri	44
Tablo 2-15: TGK etiyolojisini açıklamaya YND teknikleri ile saptanmış yönelik aday genler	47
Tablo 2-16: YND tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda saptanan erkek faktörü ile ilişkili genler ve fenotipik bulguları (Patel (213)'den değiştirilerek)	49
Tablo 2-17: YND ile saptanan POY, ovaryan disgenezi, OOMD ve PKOS ile ilişkilendirilmiş genler, fenotipik bulguları ve görevleri	50
Tablo 2-18: YND teknolojisi terminolojisi.....	55
Tablo 2-19: Tüm ekzom dizileme işlem akışı	56
Tablo 2-20: Ekzom dizileme ile elde edilen veri dosyası türleri	56

Tablo 2-21: Tanısal amaçlı kullanılan dizileme tekniklerinin karşılaştırılması (Green (255)'den değiştirilerek)	56
Tablo 3-1: Olgulardan, eşlerden veya aile üyelerinden elde edilen DNA konsantrasyonları	60
Tablo 3-2: Varyantların fenotipe olası etkileri açısından sınıflandırılması – Sue (259)'den değiştirilerek.....	63
Tablo 3-3: İnsan ve model organizma çalışmaları veri tabanları.....	66
Tablo 3-4: Populasyonlara ve hastalıklara özgü veri tabanları.....	66
Tablo 3-5: Tez kapsamında kullanılan in siliko varyant tahmin aracı veri tabanları	67
Tablo 3-6: Primer listesi	68
Tablo 3-7: PZR çalışması için kullanılan malzemeler ve final konsantrasyonları	69
Tablo 3-8: PZR çalışma koşulları	70
Tablo 3-9: Dizi PZR çalışması için kullanılan malzemeler	70
Tablo 3-10: Dizi PZR çalışma protokolü.....	71
Tablo 3-11: Kapiller elektroforez yürütme koşulları.....	71
Tablo 4-1: Olguların gebelik öyküsüne göre gruplara dağılımı ve gruplardaki akrabalık oranları	73
Tablo 4-2: TGK olgu grubunda (n= 650 olgu) kromozom analiz sonuçları.....	74
Tablo 4-3: KOÖ olgu grubunda (n= 158) kromozom analiz sonuçları	74
Tablo 4-4: Pİ olgu grubunda (n= 73) kromozom analiz sonuçları	75
Tablo 4-5: Başarısız YÜT uygulaması olan (n= 92) olgu grubunda kromozom analiz sonuçları.....	75
Tablo 4-6: Olgu grubundaki çiftlerin gebelik ürünlerinde (n= 105) kromozom analiz sonuçları.....	76
Tablo 4-7: Olguların TED verilerinin biyoinformatik analizlerinde saptanan varyantların genel varyant sınıflamasına göre dağılımı	77
Tablo 4-8: Olgu 1'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	78
Tablo 4-9: Olgu 1'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	78
Tablo 4-10: Olgu 1'e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar.....	78
Tablo 4-11: Olgu 2'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	80

Tablo 4-12: Olgu 2'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	80
Tablo 4-13: Olgu 2'ye ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar.....	80
Tablo 4-14: Olgu 3'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	81
Tablo 4-15: Olgu 3'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	82
Tablo 4-16: Olgu 3'e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar.....	82
Tablo 4-17: Olgu 4'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	83
Tablo 4-18: Olgu 4'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	83
Tablo 4-19: Olgu 4'e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar.....	84
Tablo 4-20: Olgu 5'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	84
Tablo 4-21: Olgu 5'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	85
Tablo 4-22: Olgu 5'e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar.....	85
Tablo 4-23: Olgu 6'ya ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	86
Tablo 4-24: Olgu 6'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	87
Tablo 4-25: Olgu 6'ya ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar.....	87
Tablo 4-26: Olgu 7'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	88
Tablo 4-27: Olgu 7'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	88
Tablo 4-28: Olgu 7'ye ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar.....	89
Tablo 4-29: Olgu 8'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	89
Tablo 4-30: Olgu 8'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	90

Tablo 4-31: Olgu 8'e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar.....	90
Tablo 4-32: Olgu 9'a ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	91
Tablo 4-33: Olgu 9'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	91
Tablo 4-34: Olgu 9'a ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar.....	92
Tablo 4-35: Olgu 10'a ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	93
Tablo 4-36: Olgu 10'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	93
Tablo 4-37: Olgu 11'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	94
Tablo 4-38: Olgu 11'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	95
Tablo 4-39: Olgu 11'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	95
Tablo 4-40: Olgu 12'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	97
Tablo 4-41: Olgu 12'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	97
Tablo 4-42: Olgu 12'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	98
Tablo 4-43: Olgu 13'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	99
Tablo 4-44: Olgu 13'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları.....	99
Tablo 4-45: Olgu 13'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	100
Tablo 4-46: Olgu 14'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	101
Tablo 4-47: Olgu 14'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları.....	101
Tablo 4-48: Olgu 14'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	102
Tablo 4-49: Olgu 15'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	103
Tablo 4-50: Olgu 15'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları.....	103

Tablo 4-51: Olgu 15'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	104
Tablo 4-52: Olgu 16'ya ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	105
Tablo 4-53: Olgu 16'ya ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları.....	105
Tablo 4-54: Olgu 16'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	106
Tablo 4-55: Olgu 17'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	107
Tablo 4-56: Olgu 17'ye ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları.....	108
Tablo 4-57: Olgu 17'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	108
Tablo 4-58: Olgu 18'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	109
Tablo 4-59: Olgu 18'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları.....	109
Tablo 4-60: Olgu 18'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	110
Tablo 4-61: Olgu 19'a ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	111
Tablo 4-62: Olgu 19'a ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları.....	111
Tablo 4-63: Olgu 19'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	112
Tablo 4-64: Olgu 20'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	113
Tablo 4-65: Olgu 20'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	113
Tablo 4-66: Olgu 20'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	114
Tablo 4-67: Olgu 21'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	115
Tablo 4-68: Olgu 21'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	115
Tablo 4-69: Olgu 21'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	116
Tablo 4-70: Olgu 22'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	117

Tablo 4-71: Olgu 22'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	117
Tablo 4-72: Olgu 22'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	118
Tablo 4-73: Olgu 23'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	119
Tablo 4-74: Olgu 23'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	119
Tablo 4-75: Olgu 23'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	120
Tablo 4-76: Olgu 24'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	121
Tablo 4-77: Olgu 24'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	122
Tablo 4-78: Olgu 24'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	122
Tablo 4-79: Olgu 25'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	123
Tablo 4-80: Olgu 25'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	123
Tablo 4-81: Olgu 25'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	124
Tablo 4-82: Olgu 26'ya ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	125
Tablo 4-83: Olgu 26'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	125
Tablo 4-84: Olgu 26'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	126
Tablo 4-85: Olgu 27'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	127
Tablo 4-86: Olgu 27'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	127
Tablo 4-87: Olgu 27'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	128
Tablo 4-88: Olgu 28'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	129
Tablo 4-89: Olgu 28'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	129

Tablo 4-90: Olgu 28'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	130
Tablo 4-91: Olgu 29'a ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	131
Tablo 4-92: Olgu 29'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	131
Tablo 4-93: Olgu 29'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	131
Tablo 4-94: Olgu 30'a ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	132
Tablo 4-95: Olgu 30'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	133
Tablo 4-96: Olgu 30'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	133
Tablo 4-97: Olgu 31'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	134
Tablo 4-98: Olgu 31'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	134
Tablo 4-99: Olgu 31'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	135
Tablo 4-100: Olgu 32'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	136
Tablo 4-101: Olgu 32'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	136
Tablo 4-102: Olgu 32'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	137
Tablo 4-103: Olgu 33'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	138
Tablo 4-104: Olgu 33'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	138
Tablo 4-105: Olgu 33'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	139
Tablo 4-106: Olgu 34'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	140
Tablo 4-107: Olgu 34'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	140
Tablo 4-108: Olgu 34'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	141
Tablo 4-109: Olgu 35'e ait klinik ve laboratuvar bulguları.....	142

Tablo 4-110: Olgu 35’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları.....	142
Tablo 4-111: Olgu 35’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	142
Tablo 4-112: Yolaklarına göre saptanan genler ve varyantlar.....	143
Tablo 5-1: Çalışma kapsamında saptanan implantasyon ile ilişkili genler.....	156
Tablo 5-2: Çalışmada saptanmış POY ilişkili genler.....	184



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Dişi üreme sistemi (Smartdraw (4)'dan değiştirilerek).....	5
Şekil 2-2: Menstrüel döngü (Wikipedia (5)'dan alınmıştır)	7
Şekil 2-3: Uterin döngü (BioRender (6)'dan değiştirilerek).....	8
Şekil 4-1: Olgu 1'e ait aile ağacı	77
Şekil 4-2: Olgu 2'ye ait aile ağacı	79
Şekil 4-3: Olgu 3'e ait aile ağacı	81
Şekil 4-4: Olgu 4'e ait aile ağacı	83
Şekil 4-5: Olgu 5'e ait aile ağacı	84
Şekil 4-6: Olgu 6'ya ait aile ağacı	86
Şekil 4-7: Olgu 7'ye ait aile ağacı	88
Şekil 4-8: Olgu 8'e ait aile ağacı	89
Şekil 4-9: Olgu 9'a ait aile ağacı	91
Şekil 4-10: Olgu 10'a ait aile ağacı	93
Şekil 4-11: Olgu 11'e ait aile ağacı	94
Şekil 4-12: Olgu 12'ye ait aile ağacı	97
Şekil 4-13: Olgu 13'e ait aile ağacı	99
Şekil 4-14: Olgu 14'e ait aile ağacı	101
Şekil 4-15: Olgu 15'e ait aile ağacı	103
Şekil 4-16: Olgu 16'ya ait aile ağacı	105
Şekil 4-17: Olgu 17'ye ait aile ağacı	107
Şekil 4-18: Olgu 18'e ait aile ağacı	109
Şekil 4-19: Olgu 19'a ait aile ağacı	111
Şekil 4-20: Olgu 20'ye ait aile ağacı	113
Şekil 4-21: Olgu 21'e ait aile ağacı	115
Şekil 4-22: Olgu 22'ye ait aile ağacı	117
Şekil 4-23: Olgu 23'e ait aile ağacı	119
Şekil 4-24: Olgu 24'e ait aile ağacı	121
Şekil 4-25: Olgu 25'e ait aile ağacı	123
Şekil 4-26: Olgu 26'ya ait aile ağacı	125
Şekil 4-27: Olgu 27'ye ait aile ağacı	127
Şekil 4-28: Olgu 28'e ait aile ağacı	129

Şekil 4-29: Olgu 29'a ait aile ağacı	130
Şekil 4-30: Olgu 30'a ait aile ağacı	132
Şekil 4-31: Olgu 31'e ait aile ağacı	134
Şekil 4-32: Olgu 32'ye ait aile ağacı	136
Şekil 4-33: Olgu 33'e ait aile ağacı	138
Şekil 4-34: Olgu 34'e ait aile ağacı	140
Şekil 4-35: Olgu 35'e ait aile ağacı	141
Şekil 5-1: 21. kromozom ve <i>PCNT</i> geni yerleşimi (GeneCards (270)'tan değiştirilerek)	150



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- TGK:** Tekrarlayan gebelik kayıpları
- GH:** Gebelik haftası
- YÜT:** Yardımcı üreme teknikleri
- TED:** Tüm ekzom dizileme
- TDF:** Testis belirleyici faktör
- CRH:** Kortikotropin salıcı hormon
- ZP:** Zona pellusida
- LIF:** Lösemi inhibitör faktör
- CSF-1:** Koloni stimülan faktör-1
- IGFBP-1:** İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1
- CAM:** Hücrel adezyon molekülü
- HB-EGF:** Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü
- TİK/TİD:** Tekrarlayan implantasyon kusuru/defekti
- BF:** Büyüme faktörü
- PAEP:** Progesteron ilişkili endometriyal protein
- EGF:** Epidermal büyüme faktörü
- FGF:** Fibroblast büyüme faktörü
- hCS:** İnsan koryonik somatomamotropin
- VEGF:** Vasküler endotelial büyüme faktörü
- PIGF:** Plasental büyüme faktörü
- HLA:** İnsan lökosit antijeni
- PIF:** Preimplantasyon faktör
- PIBF:** Progesteronla indüklenen bloke edici faktör
- Treg:** Regülatör T hücreler
- uNK/dNK:** Uterin/desidual doğal öldürücü hücreler
- PDL1:** Programlı ölüm ligandı 1
- DM:** Diyabetes mellitus
- SLE:** Sistemik lupus eritematozus

ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology

İVIG: İntravenöz immünglobulin

APS: Antifosfolipid sendromu

ACA: Antikardiyolipin

LAC: Lupus antikoagülan testi

RCOG: Royal College of Obstetricians and Gynecologists

ASRM: American Society for Reproductive Medicine

OR: Otozomal resesif

8OHdG: 8-hidroksi deoksiguanozin

mRNA: mesajcı RNA

miRNA: mikro RNA

YND: Yeni nesil dizileme

mtDNA: Mitokondriyal DNA

TE: Transposable element

LTR: Uzun terminal tekrarlar

ERV: Endojen retrovirus

L1: LINE-1

CNV: Kopya sayısı değişiklikleri

POY: Prematür over yetmezliği

OOMD: Oosit olgunlaşma defekti

PKOS: Polikistik over sendromu

DP: Direkt preparasyon

PHA: Fitohemaglutinin

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ddNTP: dideoksi nükleotid trifosfat

bç: Baz çifti

qPZR: Gerçek zamanlı PZR

PPi: Pirofosfat

MLPA: Multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu

TDG: Tüm genom dizileme

BCL: Binary base call

SAM: Sequence alignment map

BAM: Binary alignment map

VCF: Variant call format

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

IGV: Interactive Genomic Viewer

VUS: Variant uncertain significance/önemi bilinmeyen varyant

HiDi: Highly deionized formamide

KE: Kapiller elektroforez

KOÖ: Kötü obstetrik öykü

PAT-USG: Patolojik ultrason bulgusu

PI: Primer infertilite

İUFÖ: İntrauterin fetal ölüm

TT: Tıbbi terminasyon

pat: Paternal

mat: Maternal

G: Gravida

P: Parite

A: Abortus

OD: Otozomal dominant

T: Trizomi

HSD11B1: 11 β hidroksisteroid dehidrogenaz

MMP: Matriks metalloproteinaz

ACE: Anjiyotensin-I dönüştürücü enzim

PAI-1: Plazminojen aktivatörü-1

MCM: Minikromozom devamlılık kompleksi

PSD: Primer siliyar diskinezi

KF: Kistik fibroz

ÖZET

Berkay EG. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Olan Çiftlerde İlişkili Tek Gen Mutasyonlarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2020.

Tekrarlayan gebelik kaybı öykülü (≥ 2) çiftlerde bilinen klasik faktörler için yapılan testlerle olguların yaklaşık %50'sinde etiyoloji saptanabilmektedir. Tez kapsamında kromozom anomalisi ve bilinen genetik/nongenetik faktörlerin dışlandığı ≥ 3 fetal kayıp öykülü kadınlarda 'tüm ekzom dizileme (TED)' yöntemi ile olası monogenik faktörlerin rolü araştırıldı.

İlk aşamada, İÜ, İTF, Tıbbi Genetik AD'na başvuran 973 olguya ait dosya verileri retrospektif olarak değerlendirildi. İkinci aşamada tüm klasik testleri normal sonuçlanan çiftlerden 35 kadın seçilerek tüm ekzom dizi analizi için bilgilendirildi ve onamları alındı. TED ıslak laboratuvar çalışmaları hizmet alımı ile yapıldı. Farklı yolaklardaki varyantların analizi, konfirmasyon ve segregasyon çalışmaları laboratuvarımızda gerçekleştirildi. 34 olguda ilişkili olabilecek doksan üç varyant tespit edildi. İki olguda etiyoloji açıklanırken (%5,7), 18 olguda (%51,4) diğer aile bireylerinin de (eş, kız kardeş ve anne) davet edilerek segregasyon çalışmalarının genişletilmesi ve 10 olguda (%28,5) varyantların etkisinin aydınlatılabilmesi için fonksiyonel çalışmaların yapılması planlandı. Yedi olguda (%20) poligenik kalıtım öngörüldü.

Bu çalışmada tespit edilen varyantlar, metabolizma (n=8), siliya aktivitesi (n=8) ve embriyogenez (n=7); hücre bölünmesi (n=5), oosit olgunlaşması ve gelişimi (n=6) ve fetomaternal iletişim gibi gebeliğin erken dönemlerinde aktif (n=8) yolaklardadır.

Şu ana kadarki bilgimize göre bu çalışma, tekrarlayan gebelik kayıpları olan kadınlarda TED sonuçlarını paylaştan üçüncü uluslararası ve ilk ulusal seri çalışmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Tekrarlayan gebelik kayıpları, infertilite, genetik faktörler, tüm ekzom dizileme

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-31561 ve TSA-2018-32135.

ABSTRACT

Berkay EG. Investigation of Associated Single Gene Mutations in Couples with Recurrent Pregnancy Losses. Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Istanbul. 2020.

In couples with recurrent pregnancy loss (≥ 2), the aetiology can be explained in approximately 50% by using traditional tests for known causative factors. In this study, we have investigated the women, with ≥ 3 fetal losses and without known genetic/nongenetic factors, by ‘Whole Exome Sequencing (WES)’ technique to determine the effect of monogenic disorders.

At first, clinical records of 973 cases, who were referred to the outpatient clinic of Medical Genetics Department of Istanbul Medical Faculty, Istanbul University are evaluated retrospectively. From the couples with normal cytogenetic and other traditional test results, women are selected and informed about the study. The women who gave written consent (n:35) are included. Wet-laboratory work of WES was carried out with service provider. Analyses of variants involved in different pathways, including their confirmations and segregations are performed in our laboratory. Ninety-three variants with possible associations have been observed in 34 cases. In two of those cases, the aetiology is determined (5.7%), while in 18 (51.4%), admittance of other family members (husbands, sisters, and mothers) are planned to expand the segregations. Functional studies are also planned to clarify the effect of variants in 10 cases (28.5%). Polygenic inheritance has been proposed in seven cases (20%).

Variants found in this study were divided according to the pathways such as metabolism (n=8), cilia activity (n=8) and embryogenesis (n=7); providing cell division (n=5), oocyte maturation and development (n=6) and fetomaternal communication in the early stages of pregnancy (n=8).

According to best of our knowledge, this is third international and first national series sharing the WES results in women with recurrent pregnancy losses.

Key Words: Recurrent pregnancy loss, infertility, genetic factors, whole exome sequencing.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2018-31561 and TSA-2018-32135.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Üreme, tüm canlılar aleminde varlığın sürdürülmesi için elzemdir. İnsan ömrünün uzamasıyla üreme dönemi uzamıştır. Fertilite, genetik yapı ve çevre koşulları ya da her ikisinin birlikte etkisi ile azalabilmektedir. Gamet hücresinin oluşumundan bebeğin doğumuna kadar olan süreçte etkin birçok faktör ve önemli yolak genetik ve/veya nongenetik faktörlerden etkilenebilmektedir. Günümüzde her beş çiftten biri infertilite sorunu ile karşı karşıya kalmakta, tüm dünyada 50 ila 80 milyon çiftin fertilite problemleri yaşadığı bildirilmektedir (1, 2). Teknolojideki gelişmelere paralel gelişen modern tıp teknikleri sayesinde hastalıkların tanısı ve tedavisinde yaşanan çok önemli başarılarla rağmen infertilitenin etiopatogenezinin büyük bir kısmı hala aydınlatılamamıştır.

Fertilite problemleri içerisinde önemli bir yer tutan tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK), 20. gebelik haftasından (GH) önce veya <500 gr olan en az iki fetal kayıp için kullanılan terimdir. TGK olgularının yaklaşık yarısında altta yatan etiyolojik neden saptanamamaktadır.

Tekrarlayan gebelik kaybına yol açtığı bilinen faktörler kromozomal anomaliler, immün, endokrin, anatomik ve çevresel faktörler ile enfeksiyonlardır. Bunlara ek olarak son yıllarda erkek faktörü üzerinde de durulmaktadır. Bu nedenle olgulara uygulanan klasik laboratuvar testleri parental kromozom analizleri, düşük materyallerinde yapılan kromozom analizi veya a-CGH; pelvik ultrason, manyetik rezonans inceleme ve histerosalfingografi; trombofilik gen mutasyonlarının araştırılması; hormon paneli ve otoimmünite paneli gibi biyokimyasal testler, kan grubu incelemesi, sperm DNA fragmentasyon analizi ve spermiyogramı kapsamaktadır.

Tüm bu incelemelere rağmen olguların yarısında etiyolojiyi aydınlatacak ve gerekli tedaviyi yönlendirecek bir faktör saptanamamaktadır. Yeni nesil dizileme (YND) tekniğinin geliştirilmesi ile genomdaki bilinen genlerin ekzonlarının tümünün TED ile incelenmesi mümkün hale geldiğinden bir çok hastalık grubunda olduğu gibi infertilite sorunu ile de ilişkili henüz tanımlanmamış genleri ortaya koyma olanağı doğmuştur. Bu tekniğin kullanımı ile tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisini aydınlatmaya yönelik henüz literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Tekniğin pahalılığı, analizlerinde bilgisayar tabanlı programlar kullanılmasına rağmen son

ilişkilendirme için uzmanlık gerektirmesi kısıtlayıcı faktörleri oluşturmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar genellikle olgu ve aile bazında yapılan fetal genetik etkenlerin saptanmasının amaçlandığı ebeveynler ile birlikte yapılan üçlü tüm ekzom dizileme çalışmalarıdır. Sebebi açıklanamayan TGK olgularına yönelik çalışmalar genellikle birkaç geni içeren polimorfizm ya da ilişkilendirilme çalışmaları ile panel gen testlerini kapsamaktadır. TED yöntemi kullanılarak yapılmış ve maternal genetik faktörlerin tespiti amaçlayan tüm dünyada sadece iki çalışma olmakla birlikte, ülkemiz olgularıyla oluşturulmuş bir kohort ile yapılmış hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez kapsamında kromozom analizleri ve etiyolojiyi açıklamaya yönelik yapılan diğer testleri normal sonuçlanmış, sebebi açıklanamayan TGK ve/veya yardımcı üreme teknikleri (YÜT) uygulaması ile gebelik oluşmama öyküsü bulunan çiftlerde ‘tüm ekzom dizileme (TED)’ yöntemi kullanılarak Türk popülasyonunda etiyoloji ile ilişkili olabilecek maternal genomda saptanan tek gen mutasyonlarının ve yeni aday gen/yolakların tespiti amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Fertiliteyi etkileyen faktörleri araştırabilmek için öncelikli olarak normal üreme sistemini, gebelik oluşumunu ve devamını sağlayan etkin yolların, sistemlerin ve süreçlerin bilinmesi gereklidir. Üreme fonksiyonunu göz önüne alırken ve üreme bozukluklarını değerlendirirken dişi ve erkek üreme sistemi birlikte ele alınmalıdır.

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, spermatogenez ve erkek üreme fonksiyonlarının hormonal kontrolü ve erkek cinsel fonksiyonları ile birlikte değerlendirilmelidir. Spermatogenez yani erkek üreme hücresi olan spermin oluşumu süreci, seminifer tübüllerde hipofiz ön lobundan salgılanan gonadotropik hormonların (LH, FSH, GH) ve steroid hormonların (testosteron, östrojen) etkisiyle meydana gelir ve spermler epididimde depolanır. Sertoli hücreleri yakınında yerleşen öncül hücre spermatogonialar primer spermatositlere dönüşürler. Her bir primer spermatosit bölünerek iki adet sekonder spermatositi oluşturur, sonrasında sekonder spermatositler de bölünür ve spermlere olgunlaşacak spermatidleri meydana getirirler. Tüm bu süreç yaklaşık 64 gün sürer (3). Spermler olgunlaştıklarında baş ve kuyruk olmak üzere iki ana bölgeden oluşurlar. Baş kısmı golgi aygıtı, büyük bir nukleus ve lizozomal enzimler (hiyalüronidaz ve proteolitik enzimler) ile ovum içine girişi sağlayan golgiden farklılaşmış akrozomdan oluşurken, kuyruk bölgesi mitokondri açısından zengin, hareket potansiyeli olan flagellum karakterindedir. Spermler uygun ortamda (nötral veya hafif alkali koşullar) 1 ila 4 mm/dak hızla ilerleyebilir. Dişi genital sisteminde bir sperm en fazla 1-2 gün canlılığını koruyabilir. Her bir cinsel birleşmede yaklaşık 120 milyon/ml sperm 3,5 ml semen ejakülat ile atılır (3). Sperm sayısında azalma, hareketsiz veya morfolojisinin bozuk olması erkek infertilitesi nedenleri arasındadır.

2.2. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi değerlendirilirken; gebelik öncesi menstrüel döngü, gebeliğin oluşumu ve devamı şeklinde farklı aşamalar olarak göz önüne alınmalıdır. Bu çalışmada öncelikli olarak maternal faktörler araştırıldığı için dişi üreme sistemi daha ayrıntılı ele alınacaktır.

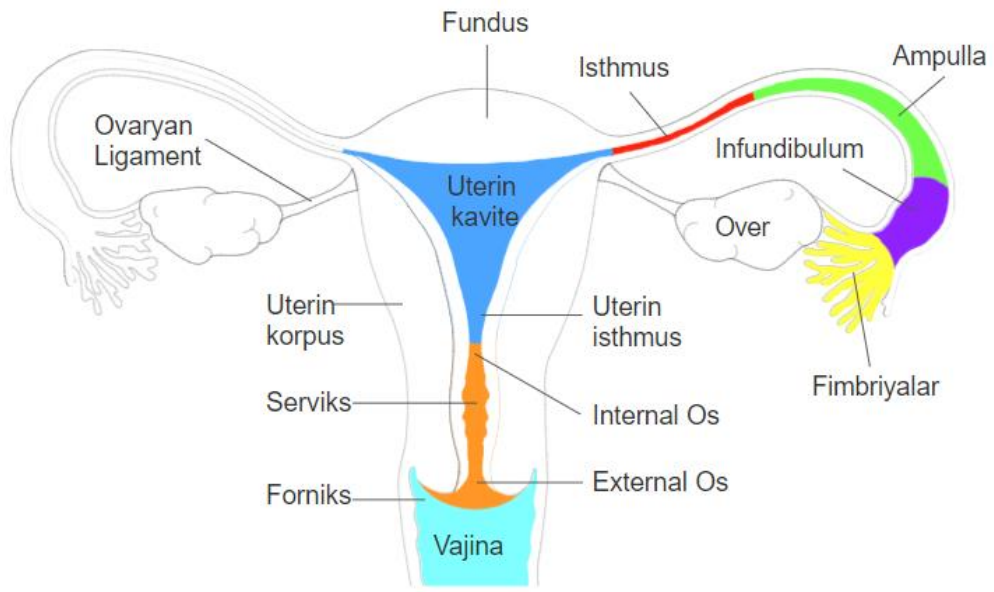
Dişi üreme sistemi, erkek üreme sistemine göre daha karmaşık bir yapıdadır ve çok faktörlüdür. Overler, overleri uterin kaviteye bağlayan fallop tüpleri, uterus, uterus ile vajina arasındaki bağlantıyı sağlayan kapı görevini gören serviks ve vajina üremedeki etkin iç genital yapıları oluşturur (Şekil 2-1). Embriyonik dönemde dişi yönde farklılaşma pasif özelliktedir. Fetusta Y kromozomu, Y kromozomunun kısa kolunda bulunan *TDF* (testis belirleyici faktör), *SRY* bölgesi, testis ve AMH'nin olmadığı ortamda Müllerian (paramezonefrik) yapılar orta alanda birleşir ve uterus, fallop tüpleri ile vajinanın 2/3'ünü (üst kısmını) oluşturur (~10. GH). 20. GH'da endometriyum uterin kaviteyi kaplar. Bunların beraberinde Wolfian (mezonefrik) kanal regrese olur. Androjen etkisi olmadığında ürogenital sinüs, vulva ve vajinanın alt 1/3'lük kısmına dönüşür.

Overler korteks, medulla ve hilus bölgelerinden oluşur. İlk germ hücrelerinin 3. GH'da yolk saka yakın primitif endodermden ortaya çıktıkları düşünülmektedir. İntrauterin 5. GH'da bir gonadal çıkıntı görülür, germ hücreleri bu çıkıntıya göç ederler ve mitoz bölünmeler başlar. Bu aşamada dişi ya da erkek gonad dokusu şeklinde bir farklılaşma yoktur. Eğer germ hücresi dişi genotipte ise 9. GH'dan sonra korteks gelişimi başlar. Tüm farklılaşma 18. GH'da tamamlanır. Overlerde ovumların yerleşim yeri, testislerde medullada yerleşen spermlerin öncü hücrelerinin aksine kortekstedir. Bu aşamada etkin genler *WNT4* ve *RSPO1*'dir. Bu iki genin ekspresyonu ile *SOX9* gen aktivasyonu durur. 20. GH'da 6-7 milyon oogonia ile en yüksek oogonia sayısına ulaşılır ve mitoz bölünmeler durur. Mayoz bölünme başlar ve doğuma kadar tüm oogonialar, primer oositlere dönüşürler. Tüm oositler Mayoz I'in diploten aşamasında duraklar ve atrezi başlar. Doğuma kadar oosit sayısı 2 milyona iner, ergenliğe kadar ise 300 ila 500 bin kalır. Tüm bu oositlerin sadece 400-500 tanesi fertil dönemde ovulasyon ile atılacaktır.

İntrauterin dönemde I. mayoz bölünme esnasında duraklayan primer oositler, oosit olgunlaşma inhibe edici faktör etkisi ile puberteye kadar bu aşamada beklerler. Menstrüel döngü ortasındaki LH piki sonrasında mayoz bölünmesini tamamlar ve sonucunda sekonder oosit ile beraberinde 1. polar cisim oluşur. Sekonder oosit 'haploid=n' kromozom yapısındadır (22 somatik ve 1 cinsiyet kromozomu). Ovulasyon ile atılan bu sekonder oosit, II. mayoz bölünmesine başlar, bu bölünme de mayoz-metafaz aşamasında duraklar ve bu duraklamadan oositte kodlanan 'PP39MOS' proteini

sorumludur. Oluşan sekonder oositi granüloza hücreleri (corona radiata) çevreler, bu hücreler tarafından sentezlenen glikoprotein yapıda zona pellusida (ZP) tabakası bulunur ve bu tabakada spermier için özğün reseptörler (ZP proteinleri) içerir.

Gebeliğın sürdürüldüğü ana organ uterus, histolojik olarak 3 tabakadan oluşur; peritonun devamı olan seroza tabakası (perimetriyum), kas tabakası (miyometriyum) ve kendi içinde bazal (alt 1/3) ve fonksiyonel (üst 2/3) olmak üzere iki alt tabakaya ayrılan mukoza tabakası (endometriyum).



Şekil 2-1: Dişi üreme sistemi (Smartdraw (4)'dan değiştirilerek)

2.2.1. Menstrüel Döngü

Menstrüel döngü, dişi üreme sisteminde 24-35 günlük aralıklarla ovumun seçilip, fertilizasyona hazır halde dişi genital sisteme atıldığı ve dişi genital sistemin özellikle de uterin kavitenin gebeliğe uygun hale geldiği süreçtir. Ovaryan döngü; foliküler faz, ovulasyon ve luteal faz olarak üç aşamalıdır. Menstrüel döngünün düzenlenmesinden hipotalamustaki arkuat nukleustan pulsatil salgılanan GnRH ile ön hipofizden salgılanan ve ikincil haberci olarak cAMP kullanan FSH ile LH hormonları görevlidir. FSH ve LH uyarısı ile overlerden östradiol, androstenedion, testosteron ve progesteron sentezlenir (hipotalamohipofizogonadal yolak).

GnRH, yarılanma ömrü 2-4 dakika olan dekaeptid yapılu bir hormondur. Bu hormonu salgılayan hücreler embriyolojik dönemde olfaktör alandan kranial sinirler ile birlikte göç ederler. Hipotalamohipofizer sistemdeki yetersizlikler (hipogonadotropik

hipogonadizm), erkeklerde 4 kat daha fazla olmak üzere yenidoğanlarda 1/8.000 oranında görülür. *KAL1* (*ANOS1* - Xp22.31) genindeki mutasyonlarla ortaya çıkan Kallmann Sendromu'nda GnRH eksikliği ve anosmi görülür. Kallmann Sendromu ile *KAL2* ve *KAL3* genleri de ilişkilidir. GnRH salınımı farklı mekanizmalarla düzenlenir. Katekolaminerjik sistem, östradiol, progesteron, melatonin, serotonin, GABA, asetilkolin, nöropeptid Y gibi maddeler bu düzenlenmede görevlidir.

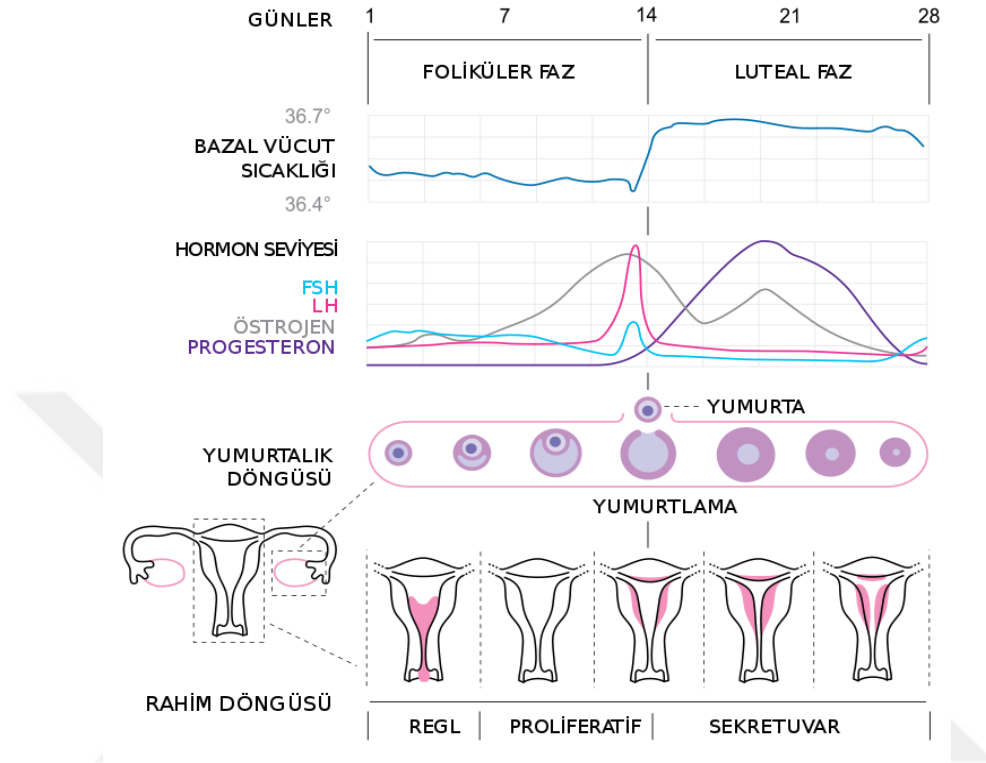
FSH ve LH glikoprotein yapıda hormonlar olup adenohipofizdeki bazofilik hücrelerden salgılanır. FSH, LH, TSH ve hCG hormonları glikoprotein yapıdadır. α alt üniteleri ortak olan bu hormonların sadece β alt üniteleri farklıdır. Gebeliğin tespitinde de kullanılan ana hormon hCG ile LH hormonlarının β alt üniteleri %96 oranında benzer yapıdadır ve aynı reseptörlere bağlanarak etki gösterirler.

Foliküler faz: Döngünün ilk 14 gününü kapsar. Her overde ~3-11 ovum seçilerek foliküler gelişim sürecine alınır. Foliküler gelişimde etkin hormon FSH'tır. FSH reseptörleri overlerde granüloza hücrelerine yerleşmişlerdir. Sırasıyla primordiyal folikül → primer folikül (tek katlı hücreler) → primer folikül (çok katlı hücreler, preantral folikül) → antral folikül (sekonder folikül) → Preovulatuvar folikül (olgun folikül, Grafian folikül) aşamalarından geçer ve bu süreç ~85 gün sürer. Menstrüel döngü tarihlerinde meydana gelen uzamaların asıl nedeni bu fazda olan gecikmelerdir. Foliküler gelişme basamaklarında erken dönemde LH reseptörleri bulunmazken, FSH uyarılarının ardından granüloza hücrelerinde LH reseptör sayısı artar.

Ovulasyon: LH pikinden yaklaşık 10 ila 12 saat ve östrojen pikinden yaklaşık 24 ila 36 saat sonra meydana gelir. LH salınımı ile ovaryan kan akımı hızlanır, oosit ile çevreleyen granüloza hücreleri arasındaki bağlantılar (gap junctionlar) parçalanır ve oosit I. mayozunu tamamlar. Oosit folikül duvarından ayrılır. Bu aşamada aktivin, inhibin, follistatin, IGF-1 ve IGF-2 gibi hormonlar etkilidir. Progesteron sentezi başlar, prostoglandin E ve F2 α sentezi artar.

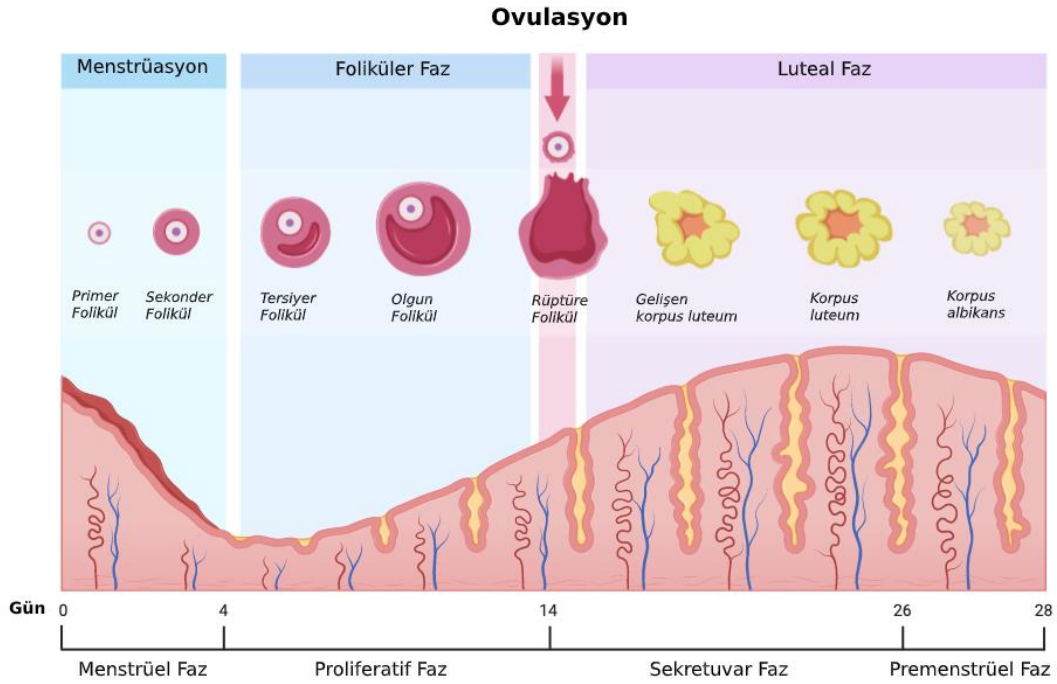
Luteal faz: Yaklaşık 14 gün sürer ve LH etkisiyle overde oositin atılmasıyla geride kalan granüloza ve teka hücrelerinde lipid birikimiyle ortaya çıkan korpus luteum meydana gelir, VEGF salınımı artar. Vaskülarizasyonun artışıyla steroid hormonların ve gebeliğin devamı için gerekli progesteronun öncülü LDL kolesterol alımı artar. Bu aşamada gebelik oluşmazsa korpus luteum geriler, atrezi sonucunda beyaz renk alır (korpus albicans). Gebelik oluşursa hCG, LH'ı uyarır, korpus luteumun atrezisi önlenir ve plasental gelişim tamamlanana kadar görevine devam eder. Artan progesteron

salgısıyla endometriyal stromal hücreler desidual reaksiyon geçirirerek desidua tabakasını oluşturur. Buradan prolaktin, 1,25 vitamin D₃, kortikotropin salıcı hormon (CRH) ve relaksin sentezlenir (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Menstrüel döngü (Wikipedia (5)'dan alınmıştır)

Döngü devam ederken, endometriyum da değişim gösterir (uterin döngü). Overin foliküler fazında endometriyum proliferatif fazda (bezlerin uzun ve kıvrımlı hale gelmesi, mikrovillus oluşumu, siliyar aktivite), overin luteal fazında ise endometriyum sekretuar fazdadır (glikojen sekresyonu ve vakuollerin oluşumu, stromal ödem gelişmesi). Bu süreçler ile endometriyal kavite gebeliğe ve implantasyona hazırlanır. Eğer gebelik oluşmazsa, korpus luteumun atreziye uğraması ile progesteron seviyeleri azalır, endometriyumda lokal prostaglandin artışı olur. Spiral arterlerde spazm ve vazokonstriksiyon sonrası fonksiyonel tabaka dökülür (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: Uterin döngü (BioRender (6)'dan değiştirilerek)

2.2.2. Gebeliğin Oluşumu

Spermin bir ovumu dölleyebilmesi için geçirdiği süreçlerden en önemlisi dişi üreme sistemi içerisinde tamamlanan 'kapasitasyon'dur. Bu aşamada spermler; hareket özelliği değişir, ovum çevresindeki ZP tabakasına tutunma ve enzimatik aktivite ile bu tabakayı delerek ovumun içine girdiği akrozom reaksiyonu gerçekleşir. Ovulasyon ile atılan II. mayoz bölünmede bekleyen sekonder oositin bölünmesi, ancak fertilizasyon gerçekleşirse tamamlanır. Fertilizasyon, en sık tuba uterinanın (fallop tüplerinin) ampulla kısmında olur. Yaklaşık 24 saat süren fertilizasyon aşaması, 1994 yılında Acosta'nın dediği gibi "birbiri ile ilişkili karmaşık moleküler olaylar dizisidir" (7). Bu aşamaya kadar olabilecek herhangi bir sorun ya da bozukluk zigotun ölümüne ve gebeliğin kaybına sebep olur (8).

Fertilizasyon, oositin ZP tabakasını çevreleyen korona radiata tabakasının sperm tarafından geçilmesi, ZP'nin delinmesi, oosit ve sperm plazma membranlarının birleşmesi, oositin II. mayoz bölünmeyi tamamlaması, dişi ve erkek pronükleuslarının oluşması ve parçalanması, kromozomların birleşmesi ve mitoz bölünmelerin başlaması aşamalarından oluşur.

Oosit ve sperm nükleuslarının birleşmesi ile diploid kromozom yapısında zigot oluşur ve arkasından seri mitoz bölünmeler başlar. Bu bölünmeler ile oluşan her bir hücre ‘blastomer’ olarak adlandırılır. Bu hücrelerin sayısı 16 hücreye ulaştığında ise oluşan hücre topluluğuna ‘morula’ denir. Morula, fertilizasyon sonrası 3-4. günde intrauterin kavitededir. Blastomerler arasındaki boşlukta sıvı birikimi başlar ve bu hücre topluluğu ‘blastosist’ olarak adlandırılır, bu topluluğun iç tabakasından ‘embriyoblast’, dış tabakasından ‘trofoblast’ meydana gelir.

Fertilizasyondan sonraki 24 ila 48. saatler arasında başlayarak ilk 10 gün boyunca yoğun olarak trofoblastlardan salgılanan erken gebelik faktörü, gebeliğin en erken belirteçlerinden biridir ve maternal immün sistemi baskılayıcı etkisi olduğu düşünülmektedir (9). İmplantasyon, gebeliğin 6-7. gününde gerçekleşir. Apozisyon, adezyon ve invazyon olmak üzere üç aşamadan meydana gelir. Blastosistin ~6. günde uterin kavite içerisinde endometriyal dokuya tutunması, yani apozisyon aşaması ilk aşamadır. Ardından blastosist, tutunduğu dokunun iç tabakasına doğru gömülür, etrafı endometriyal doku tarafından kuşatılır. Sitokinlerin, steroid hormonların ve büyüme faktörleri gibi biyomoleküllerin implantasyon aşamasında etkin oldukları düşünülmektedir (10, 11).

‘Endometriyal reseptivite’, ovulasyondan sonra, 7-10. gün arasında ve ortalama 48 saat olan, blastosistin tutunarak implante olabilmesi için uygun döneme atfedilen terimdir. Histolojik incelemelerde pinopod hücrelerin (menstrüel döngünün 20-21. günlerinde belirgin hale gelen apikal hücresel protrüzyonlar) izlenmesi bu dönemin belirtecidir.

5. günde blastosist IL-1 α , IL-1 β ve hCG salgılar, endometriyumdan da lösemi inhibitör faktör (LIF) ve koloni stimülan faktör-1 (CSF-1) salgılanarak doku tanınması sağlanır. Her üreme döngüsünde endometriyal gelişme, farklılaşma ve reseptivitenin sağlanmasında ana role sahip genler *HOX* grubu genlerdir. *HOXA10* ve *HOXA11* genleri endometriyumda aktif olarak eksprese olurlar ve ekspresyonlarındaki artış, progesteron ve östrojenlerin artışıyla birlikte sekretuvar fazın ortasında ve sonlarında belirgin hale gelir (12-14). Yapılan fare çalışmalarında *Hoxa10* ve *Hoxa11*’in fertilitede önemli yere sahip olduğu, gen aktivitesinin susturulduğu farelerde implantasyonun gerçekleşmediği gösterilmiştir (15, 16). *HOXA10* gen aktivitesinin pinopod gelişimini,

pinopodlardaki $\beta 3$ integrin ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1'in (IGFBP-1) aktivasyonunu organize ettiği bilinmektedir (17).

Başarılı bir adezyon aşaması için trofinin, galektin-9, sitokinler ve hücrel adezyon moleküllerinin (CAM) uyum içinde çalışmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca hCG salınımı $\rightarrow$ LIF salgısının artışı $\rightarrow$ trofoblast gelişimini uyaran heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) dengesi önemlidir.

İmplantasyonda etkin moleküller arasında bulunan MUC-1, antimikrobiyal etkileri olan yüksek moleküler ağırlıklı bir transmembran proteindir ve progesteron uyarısı ile sentezi artar. Ekspresyonu, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları ile düzenlenir (18). Trofinin, blastosistin trofoektoderm hücrelerinden ve maternal uterin epitelyal hücrelerden üretilir ve adezyon oluşumu trofinin-trofinin bağlanması ile oluşur (18), embriyonun maternal yüzeyde karşılaştığı ilk molekül olup tüm endometriyumunu kaplar (19). Embriyo tarafından kontrol edildiği düşünülen bir mekanizma ile embriyonun implante olacağı yerdeki adezyon moleküllerini açıkta bırakarak doğru yere yerleşmesini sağlar (19-22). Yapılan çalışmalarda endometriyozisli olgularda mid-sekretuar fazdaki MUC-1 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (23).

Selektinler, blastomer ve endometrial epitel üzerinde bulunan tek zincirli transmembran glikoproteinleridir (24). Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) prosedürlerinde yüksek maternal L-selektin ligandlarının bulunması, başarılı implantasyon ile ilişkilendirilmiştir (25). Endotel üzerinde lökositlerin yuvarlanmasını uyarak transendoteliyal lökosit trafiğinde önemli rolleri vardır ve özellikle L-selektin blastosist adezyonunda etkin bir moleküldür (26, 27).

İntegrinler, insan endometriyumunda, implantasyon aşamasında iken trofoblastlarda üretilen transmembran proteinleridir (28, 29). Lamininler, integrinler için desiduada ligand oluştururlar, implantasyon ve plasentasyonda etkindirler (30) ve kollajeni degrade eden, implantasyonda etkin metalloproteinaz enzimleridir. Sebebi açıklanamayan infertilite olgularında, MMP8, MMP10 ve MMP26 gibi enzimlerin anormal seviyelerdeki endometrial ekspresyonları tespit edilmiştir (31).

Kalsiyum bağımlı adezyon molekülleri olan kadherinlerden E-kadherin, endometriyumda artan ekspresyonunun yanında erken embriyogenezde, nörolasyon ve organogenezde rol almasıyla en fazla çalışılmış olanıdır (32-34). E-kadherin, endometrial reseptivitede etkindir ve yapılan çalışmalarda tekrarlayan implantasyon

kusurlu/defekli (TİK/TİD) olgularda azalmış olduğu görölmüşür (35). Uterin siliyalı epitel hem embriyonun transferinde hem de implantasyon sürecinde önemlidir, elektron mikroskopundaki görüntülerine ithafen ‘uterodamlar’ olarak da adlandırılırlar. Galektin-9, galaktozidler bağlayan bir proteindir, geç sekretuvar fazda etkindir, implantasyonda uterodamlarda da eksprese olarak endometriyal reseptivitenin oluşmasına katkı sağlar (36).

Embriyo maternal immün sistem için semiallojen greft niteliğindedir, implantasyon sonrasında paternal genetik materyali de taşıyan embriyonun reddedilmesini önlemek için bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Embriyo ve maternal doku arasında yer alan trofoblastlar, MHC II antijenleri taşımazlar, MHC I antijenlerinden ise HLA-C, HLA-E ve HLA-G taşırlar (37-40). Diğer antijenler ise maternal doku ile temas etmezler ki bu da embriyoyu koruyucu mekanizmalardandır. HLA-G antijeni, sadece insanda görülen, ekstrasvillöz sitotrofoblastlarda bulunan, rejeksiyonu önleyen ve NK hücreleri ile ilişkide olan antijendir (41-45). Desidual hücrelerden salgılanan prostaglandin E₂, T lenfositleri ve NK hücreleri baskılar (46, 47). Ayrıca, maternal östrojen, progesteron, PAPP-A ve üromodilin gibi immün sistemi baskılayıcı maddelerin de embriyonun reddini önlemede önemli etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

Başarılı bir gebeliğin gerekliliklerinden birisi de başarılı bir implantasyondur. Endometriyumun hazırlanması ve erken embriyonik gelişme östrojen (E₂) ve progesteron (P₄) gibi LH ve FSH etkisiyle salgılanan ovaryan steroid hormonların kontrolünde olmaktadır. Östrojen, proinflatuvar bir medyatör iken, progesteron immün baskılayıcı etkileri ile bilinmektedir. Bu iki hormon ve etkileri arasında bir denge söz konusudur (48).

İlk 8 haftalık gebelik periyodu, ‘embriyonik dönem’ olarak da adlandırılır. Blastosistin endometriyuma tutunmasının ardından, trofoblastlar çoğalarak iki farklı tabaka oluştururlar. 2. GH’da dış hücre tabakasındaki trofoblastlar (maternal kan ile temas halinde olan), sitotrofoblast (embriyoya yakın, belirgin nukleuslu, sık mitoz geçiren, implantasyonda ürokinaz ve metalloproteinaz üreten) ve sinsityotrofoblast (sitotrofoblastları çevreleyen, jelimsi sitoplazmalı, multinukleuslu, mikrovilluslu, mitoz gözlenmeyen ve hormonal aktif) olmak üzere iki farklı hücre grubuna farklılaşırlar.

2. GH'da sinsityotrofoblastların içinde bulunan içi boş kavitelerden maternal kan geçişi ve beraberinde hCG üretimi başlar. İmplantasyonun gerçekleştiğinin tek klinik göstergesi hCG seviyesinin artışıdır. Tüm bunlar gerçekleşirken iç hücre tabakasında bir kavite oluşur, bu kavite amniyotik kavitenin ilk halidir. Amniyoblastlar, epiblasttan ayrılarak amniyonu oluşturmaya başlarlar. İç hücre tabakası, 'bilaminar germ disk' de denilen, amniyotik kavitenin tabanını oluşturan epiblast (ektodermi oluşturacak) ve ekzosölomik kavitenin çatısını oluşturan hipoblasta (endodermi oluşturacak) dönüşür. Ekzosölomik kavite ve membran primer vitellüs kesesine farklılaşır. 3. GH'da endoderm ile ektoderm arasından trilaminar germ diski de meydana getirecek olan mezoderm tabakası oluşur ve bu olaya 'gastrulasyon' denir. Bu farklılaşmanın ardından 'organogenez dönemi' başlar.

2.2.3. Uterin Bezler ve Gebelik

Endometriyumda, stromadan miyometriyuma kadar uzanan sarmal yapıda tübüler bezler vardır. Endometriyum, üstte stratum fonksiyonalis ve altta stratum bazalis olarak iki fonksiyonel tabaka içerir ve fonksiyonel tabaka menstrüasyonda kaybolur. Bu bezlerin embriyonik gelişimi incelendiğinde evcil hayvanlar ve diğer primatlarda olduğu gibi *Homo sapiens*'te de postnatal geliştiği görülür (50). Blastosistin endometriyuma tutunması yani 'nidasyon' 7. günde başlar, 10 ila 12. günlerde sonlanır (51). Sinsityotrofoblastlar büyüyüp genişledikçe uterin bezleri de aşındırarak lümenlerindeki sekresyonları bünyelerine katarlar ve intervillöz alanı doldururlar. Bu durumun, plasentanın asıl fonksiyonunun başladığı ve feto-maternal dolaşımın oluşacağı 10-12. GH'lara kadar fetal nütrisyon için önemli bir kaynak olduğu gösterilmiştir (52).

Uterin bezlerin sekresyonları, bir canlı organizmanın ihtiyaç duyabileceği amino asitler, iyonlar, glukoz, lipidler ve proteinleri (sitokinler, enzimler, hormonlar, büyüme faktörleri (BF), proteazlar vb.) içermektedir. Bu bezler gebelikle birlikte kolumnar uzun hücreler haline geçer, gebelik sonunda ise küboidal hal alır. Sekretuar faz defekti, implantasyon ve gebeliğin ilk zamanlarındaki yetmezlik nedeniyle gebelik kaybına yol açan yetersizlik durumunu anlatır.

'Glikodelin' olarak da bilinen progesteron ilişkili endometriyal protein (PAEP) miktarı da ilk trimester sonunda pik yapar. Sadece embriyonun beslenmesi için değil EGF (epidermal BF), vasküler EGF, LIF ve reseptörleri gibi büyüme faktörleri ile

birlikte plasentanın gelişimi için de uygun bir ortam hazırlarlar (53). LIF ve FGF (fibroblast BF) trofoblastik kök hücrelerinin devamlılığı için gerekli ana faktörlerdir (54). Overlerden salgılanan progesteron ile birlikte progesteron reseptörü ekspresyonu azalır, uterin bezlerin sekretuar faza geçişi için gen ekspresyonları indüklenir ve desidualizasyon başlar (55).

2.2.4. Gebelik Endokrinolojisi

Gebeliğin oluşumu ve devamında görev alan çeşitli biyomoleküllerin eksikliği ya da bozukluklarının gebeliğin akıbetini olumsuz yönde etkileyeceği aşıkardır.

hCG: Gebeliğin göstergesi olan ve gebeliğin akıbetinde etkin, sinsityotrofoblastlardan sentezlenen, glikoprotein yapıdaki ana hormondur. Alfa (LH, FSH ve TSH ile ortak) ve beta (peptid kısmı LH'nın beta alt ünitesi ile homolog) alt ünitelerinin birleşmesi ile oluşur ve hücre membranında LH-hCG reseptörleri ile etkileşir. Gebelik oluştuğunda, maternal kanda 7 ila 9. günler arasında saptanmaya başlar, her 1,5-2 günde iki katına çıkar. Bu artışın gözlenmediği gebeliklerde intrauterin ölüm, ektopik gebelik, gebelik kaybı görülürken, çok fazla artışın olması eritroblastozis fetalis, Down sendromu, trofoblast hastalıkları ve çoğul gebelikleri işaret eder. 8-10. GH'da en yüksek düzeyine ulaşır. 10. GH'dan itibaren azalmaya başlar ve 16. GH sonrasında aynı seviyede gebeliğin sonuna kadar devam eder. Ana işlevi plasentadan progesteron sentezi başlayana kadar maternal korpus luteumu uyararak buradan progesteron sentezinin devamını sağlamaktır. Ayrıca korpus luteumdan relaksin hormonu salgısını uyararak uterus düz kaslarını ve damarlarını gevşetir.

hPL: İnsan plasental laktojenidir, insan koryonik somatomamotropin (hCS) olarak da bilinir. Büyüme hormonu ve prolaktin ile özdeş yapıdaki bu hormon, intermediate trofoblastlardan salınır ve maternal dolaşıma geçer. Düzeyi, plasenta büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Asıl etkisi fetusa besin sağlamaktır. Bu etkiyi, lipolizi artırıp fetusun ana besin kaynağı glukoz miktarını maternal kanda arttırarak ve anti-insülinerejik etki ile periferik insülin direnci oluşturup maternal glukoz kullanımını azaltarak yapar. Maternal açlık, insülin ve cAMP salınımını uyarır. Ayrıca fetusta damarların oluşumunu uyarıcı etki ile anjiyogenik hormon olarak görev yapar.

İnhibin: Esas olarak korpus luteumdaki granüloza hücrelerinden olmak üzere plasentada da üretilen glikoprotein yapıda bir hormondur. FSH salınımını inhibe eder, LH aktivitesini ise arttırır.

Leptin: Fetal büyüme ve gelişme üzerine etkilidir. Plasentadan salgılanır. Ayrıca kemik ve immün sistem gelişimini de uyarır. İmplantasyon sırasında trofoblastlardan ve endometriyal hücrelerden de salgılanır.

Progesteron: İlk 7 haftada sadece korpus luteumdan, 7 ila 10. haftalar arasında plasenta ile birlikte korpus luteumdan, 10. GH'dan itibaren ise plasental sinsityotrofoblastlardan salgılanan, steroid yapıda, plasentada çok az bulunan 3 hidroksi 3-metil glutaril koenzim A nedeniyle kolesterol kaynağı olarak maternal LDL kolesterolün kullanıldığı bir 21 C'lu hormondur. Fetusta 3 β hidroksisteroid dehidrojenaz aktivitesi de olmadığından fetal progesteron sentezi olmaz. Gebeliğin ilk 10 haftasında uterin damarların dilatasyonunda etkindir (56). Maternal kandaki seviyelerinin fetal iyilik halinin göstergesi olduğu savı ise tartışmalıdır.

Östrojenler: Plasentada steroid hormon sentezinde görev alan 17 α hidroksilaz ve 17-20 liyaz enzimlerinin aktivitesi yoktur. Plasentada sentezlenen progesteron fetal dokuya geçer ve fetusta adrenal bezlerde DHEA-S'a çevirilir. Bu DHEA-S, östron-östrodiol sentezinde ana prekürsördür. Fetal karaciğerde sentezlenen 18 C'lu steroid yapıdaki bu hormonlar, fetal iyilik halini gösterir. Maternal kandaki östriol seviyesinin düşük olduğu durumlar, fetal ölüm, anensefali, fetal adrenal hipoplazi, plasental sülfataz eksikliği, plasental aromataz eksikliği, Down sendromu, maternal Addison hastalığı, hipertansiyon, DM ve maternal glukortikoid tedavisini işaret eder. Eritroblastozis fetaliste plasental dokunun normalden büyük olması nedeniyle östrojen miktarı da fazladır.

Prolaktin: Ön hipofizde bulunan laktotrop hücrelerden sentezlenir. Ana etkisi doğum ile birlikte meydana gelen laktasyonu sağlamak ve sürdürmektir. Beraberinde granüloza hücre sayısını azaltır, GnRH salınımını baskılar, progesteron salınımını azaltır. Bu etki ile hiperprolaktinemiye yol açar ve bu durum dişi infertilitesi sebebidir.

2.2.5. Plasenta

Gebeliğin oluşumunda etkin dokulardan biri olan plasenta, fetusu dış etkilere koruyup kan dolaşımı ile ihtiyaç duyduğu maddeleri karşılarken zararlı metabolitleri de uzaklaştırır. Ayrıca özgün hormonların sentezi ile gebeliğin devamı için elzem biyomolekülleri sağlar. Fetal (koryon kesesinden - villöz koryon) ve maternal (endometriyumdan - desidua bazalis) kısım olmak üzere iki parçadan oluşur. Plasental

septumlar, villöz koryonu yani plasentanın fetal kısmını alanlara ayırırlar. Bu alanlar dış bükeydir ve ‘kotiledon’ olarak adlandırılır.

Embriyonik 2. haftada sinsityotrofoblastlar arasında boşluklar oluşur. Maternal endometriyal kapiller damarlar ve bezler rüptüre olarak bu boşlukları doldururlar. Bu ilk temas, uteroplental dolaşımın başlangıcı olarak kabul edilir. 12. günde bu boşluklar bir ağ formasyonu oluşturur ve sünger benzeri bir yapı meydana gelir. Embriyo etrafındaki kapiller damarlar tıkanır, genişler ve sinusoidleri oluştururlar. Ekstraembriyonik somatik mezoderm ve trofoblastlar ise koryonu oluşturur. Gestasyonel üçüncü hafta sonunda primer koryon villuslarının oluşturduğu sekonder koryon villusların içerisinde kapillerler gelişmeye başlar (~17. gün). Sitotrofoblast uzantıları birleşir, koryon kesesi ile endometriyum arası bağlantı oluşur ve fetomaternal dolaşım artar. Villuslar dıştan sinsityotrofoblastlarla, içten ise sitotrofoblastlarla kaplıdır.

Oksijenden zengin kan umbilikal ven ile fetusa giderken oksijenini kaybetmiş ve fakirleşmiş, karbondioksit ile zenginleşmiş fetal kan umbilikal arterlere gelir ve buradan plasentaya aktarılır. Burada koryon arterleri de denen pek çok dala ayrılır ve bu dallar da villuslar içerisinde arteriyovenöz kapiller sistemi oluşturur. Bu geniş yüzeyde fetal ve maternal kan arasında madde alışverişi gerçekleşir. Fetus kanı ve maternal kan hiçbir zaman karışmazlar. Fetal damarların hasarlanmasıyla fetusa ait çok az miktarda kanın anne kanına karışabileceği bilinmektedir. Gebelik boyunca uterin kan akımı, vasküler direncin düşmesi ve uterustaki damarların genişlemesi ile dramatik bir şekilde artar. Bundan nitrik oksit ve prostasiklin, prostaglandin ve tromboksan gibi prostanoidler sorumludur (57). Ayrıca adrenomedullin ve sinsityotrofoblastlardan salınan anjiyotensin 1-7 gibi renin-anjiyotensin sistemi ürünleri de vasküler tonusu ayarlama görevlidir (58-60).

Trofoblastlardan, Hofbaur hücrelerinden ve maternal desidual hücrelerden üretilen vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ailesi üyeleri plasental vaskülogenez ve anjiyogenezin düzenlenmesinde etkindir (61). Bu grupta VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PIGF (plasental büyüme faktörü) vardır.

Plasentanın maternal kan ile ‘yıkınması’, desidua bazalisteki endometriyal spiral arterlerden geçen ve villuslar arasındaki boşluklara dolan yüksek basınçlı kan ile oluşur (150 ml hacminde ve 3-4 dakikada bir yenilenen). Minik kapillerlere dağılan bu kanın

akımı yavaşlar ve madde alışverişi mümkün hale gelir. Uteroplasental dolaşımın azalması ile fetal kayıp olabileceği bilinmektedir (62).

500 daltona kadar ağırlıktaki maddeler, su, elektrolitler, oksijen, karbondioksit, anestezi gazları ve üre plasentadan pasif difüzyon yoluyla geçerler. Glukoz, GLUT-1 ve GLUT-3 aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyon, aminoasitler ise aktif difüzyon ile geçer. IgM, kan grubu antikorları ve maternal insülin plasentadan geçemez.

Koryonik kese, plasentanın bir bölümünü oluşturur. Bu da fetusun ve plasentanın allograft - yabancı doku olarak algılanabilme riskini meydana getirir. Belirli mekanizmalarla fetal dokuların rejeksiyonu önlenir. Başarılı bir plaseenta fonksiyonu, blastosistin endometriyuma tutunup invaze olabilmesi, plasentanın uterin damarlar ile beslenebilmesi, besin maddelerinin plasentadan geçebilmesi ve fetusa transfer edilebilmesiyle gerçekleşir. Erken gebelik kayıplarının en az %25'inin plasental gelişim hatalarına bağlı olduğu düşünülmektedir (63). İleri gebelik haftalarında meydana gelen plasental yetmezlikler, fetal büyüme geriliği ve preeklampsiye yol açar.

2.2.6. Gebelik ve Normal İmmün Fonksiyon

Gebelik, immünolojik açıdan ele alındığında benzersiz bir yolculuktur. Hem maternal hem de paternal genleri taşıyan bir fetus, annenin immün sistemi tarafından tolere edilebilmeli ve rejeksiyondan kaçabilmelidir. Bu durum, ilk defa 1953'te Medawar tarafından 'gebelik paradoksu' olarak tanımlanmıştır (64).

Fetus, anne ile direkt temasta olmamasına rağmen, fetal kökenli trofoblastlar aracılığıyla ilişkidir. Fertilize olmuş bir ovum, maternal immün sistemden koruyan yarı geçirgen ZP ve 'cumulus oophorus' ile kaplıdır. Bu aşamada, embriyo kökenli sitokinlerin salınımı ile maternal immün sisteme sinyaller gitmeye başlar (65). Bu aşamadan implantasyon aşamasına kadar ~5 ila 7 gün geçer, bu süreç maternal immün sistemin ve endometriyumun gebeliğe ve implantasyona uygun hale gelmesi için gereklidir (66). İmplantasyonun başarı ile sonuçlanmasında maternal yanıt çok önemlidir.

Plasental trofoblastlar, sadece HLA-C, HLA-E, HLA-F ve HLA-G moleküllerinin anlatımını yaparlar. İnsan lökosit antijenleri (HLA) T hücrelerinin tanınmasını ve yanıt oluşturulmasını sağlar. Tüm HLA genleri 6. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir ve üç sınıfa ayrılır. Trofoblastlar tarafından ifade edilen HLA-C

sınıf 1a; HLA-E, HLA-F ve HLA-G sınıf 1b içerisinde. *HLA-G* bireyler arasında diğer *HLA* gruplarına göre daha az polimorfizm içerir, bu sebeple paternal *HLA-G* maternal forma oldukça benzerdir ve bu durum rejeksiyonu önleyici bir etki gösterir (67). *HLA-G* anlatımı, maternal immün toleransı artırır, desidual killer hücrelerin sitotoksik aktivitesini azaltır, Fas ligand yolağı ile CD8+ sitotoksik T hücrelerinin apoptozunu uyarır. YÜT ile elde edilen embriyolarda *HLA-G* ifade edilemiyorsa implantasyonun gerçekleşmediği gösterilmiştir (68) ve *HLA-G* incelemesi sonrasında embriyo seçimi ve transferi yapılmaya başlanmıştır (69). Ancak son yıllarda, *HLA-G*'nin azlığında veya yokluğunda da gebeliğin gerçekleşebildiği, *HLA-G* anlatımının gebelik oluşma oranlarını arttırıcı özellik gösterdiği bildirilmiştir (70). Plasental eksozomlardan salınan FasL, PDL, IDO ve MHC molekülleri gibi immün baskılayıcı moleküllerin de immün yanıtın düzenlenmesinde görevli olduğu bildirilmektedir (71).

Preimplantasyon Faktör (PIF): Embriyo gelişimini uyararak, uterin endometriyumu implantasyona hazırlayarak ve immün regülasyonu sağlayarak başarılı bir implantasyonun gerçekleşmesinde etkin bir peptiddir (66). Sadece embriyolardan salınan, 2 hücreli aşamada tespit edilebilen ve embriyonun yaşayabilirliğini gösteren bir belirteçtir. Biyokimyasal gebeliklerde embriyonun yaşayabilirliği yoksa tespit edilemez ve bu nedenle β -hCG'ye üstünlük sağlar. PIF'in tespit edilebildiği gebeliklerin prognozunun da iyi olduğu bildirilmiştir (72).

Progesteron: Gebeliğin devamı için esas gerekli olan hormondur. T hücre-monosit etkileşimini ve antikor üretimini inhibe ederek, MMP ve adezyon moleküllerini aktive ederek, T hücrelerine bağlı sitotoksiteyi azaltarak, NK hücre aktivitesini düzenleyerek ve koruyucu özellikteki antikorları uyararak maternal immün sistem üzerinde etki gösterir (73). Periferik CD8+ lenfositler başta olmak üzere maternal lenfositler, gebelik boyunca progesteron seviyelerine, progesteronla indüklenen bloke edici faktör (PIBF) aracılığıyla duyarlıdır. PIBF salınımı 37. GH'ya kadar artarak devam eder, terme kadar yavaş bir azalma gösterir ve JAK/STAT yolağı üzerinden etkindir (74). Ayrıca Th1 ve Th2 arasındaki denge serum progesteron, PIBF, TGF- α/β ve IL-10 düzeylerine bağlıdır (75).

Regülatör T hücreler (Treg): Treg hücreler (CD4+/CD25+/Foxp3+), baskılayıcı özellikte, otoimmüniteyi önleyen ve allojenik organ nakillerinde tolerasyona yardımcı hücrelerdir. TGF- α , Treg hücrelerin oluşumunu uyarır ve bu hücreler ile

FOXP3 uyarısı altında toleransın devamlılığı sağlanır. Bu süreçte IL-10 ve TGF- α uyumlu çalışırlar (76). Seminal sıvıda da artmış sayıda Treg hücreleri vardır. Ayrıca son dönemlerde yapılan çalışmalarda gebelik esnasında arttığı tespit edilen ve IL-17 üreten T lenfosit alt tipi Th17'dir ve feto-maternal tolerans oluşmasında temel bir rolü olduğu düşünülmektedir (77).

Uterin/desidual doğal öldürücü hücreler (uNK/dNK): Temel olarak kemik iliğinde farklılaşan bu hücreler, KIR, KAR ve inhibitör reseptörler ile düzenlenir. uNK hücreler luteal fazın ortalarında sayıca artarlar. Yüzeylerinde bol sayıda CD56 molekülü bulunur. Proliferasyonları, progesteron, stromal hücrelerden salınan IL-15 ve desidual prolaktin ile artar; aktiviteleri, CD56+ uNK hücrelerinde IL-15 reseptörlerinin artışı ve hCG ile uyarılır (78).

Desiduada erken gebelik dönemlerinde lenfositlerin %50-90'ı NK hücrelerinden oluşmaktadır. Fakat dNK'lar (CD16-/CD56) periferik kandaki NK'lardan (CD16+/CD56) farklı ekspresyon özellikleri gösterirler (79). Trofoblastların invazyonda ilk karşılaştığı doku, dNK baskın özellikteki uterin dokudur.

Programlı Ölüm Ligandı 1 (PDL1): Maternal immün toleransta PDL1, PDL2 ve reseptörleri de görev almaktadır. Gebelik boyunca tüm trofoblast hücrelerinde PDL1 anlatımı görülür, PDL2 anlatımı ise plasenta oluşumu esnasında sinsityotrofoblastlarda saptanır. Fetal antijenlere spesifik lenfositler aracılığıyla PDL1 anlatımı uyarılır (70).

Indolamin 2,3-dioksijenaz ilişkili triptofan katabolizması: Triptofanın plasental katabolizması, T hücre aktivitesini baskılar ve fetal rejeksiyonu engeller. Fakat,IDO ekspresyonunun fertil ve gebelik kaybı öyküsü olan kadınlar arasında farklılık göstermediği ileri sürülmüştür (70).

Kortikotropin salıcı hormon (CRH) ve FasL ekspresyonunun düzenlenmesi: CRH, ACTH'nın strese yanıtını düzenleyen peptid yapılı bir hormondur. Prostaglandin düzenlenmesi, gestasyon süresi, plasenta büyümesi ve düzenlenmesinin kontrolü ile gebelikte rol almaktadır. Hipotalamustan salınan CRH anti-inflamatuvar etkiler göstermesine rağmen, periferik inflamasyon bölgelerinde pro-inflamatuvar etkileri görülmektedir. İntrauterin CRH, implantasyona aseptik inflamatuvar yanıt oluşturarak yardımcı olur. FasL, TNF ailesinin bir üyesidir ve salınımı CRH ile kontrol edilir. Fas-FasL sistemi apoptozda, lenfopoezde ve immün yanıtta etkindir. NK hücrelerin sitolitik ve virüslere karşı yanıtını düzenler, tümör

hücrelerinin yok edilmesinde görev alır. FasL, trofoblastlarda ve desidual hücrelerde anlatılır, implantasyona ve maternal immün toleransın gelişmesine yardımcı olur (80).

Haptoglobinler: Sekresyonları luteal fazın ortalarında artar ve implantasyon aşamasında pik yapar. Maternal immün hücreler üzerine etkisini, NK aktivitesini ve ekstrasellüler matrikse NK hücrelerinin adezyon ve invazyonunu azaltarak gösterir. Ayrıca blastosist sıvısının içinde bulunan Prostaglandin E, sitotoksik NK hücre aktivitesini azaltıcı etkiye sahiptir (70).

2.3. Gebelik Kayıpları

20. GH'dan önce veya fetusun <500 gr altında olduğu bir gebeliğin kendiliğinden sonlanması 'spontan abortus' olarak tanımlanır. Tüm gebeliklerin yaklaşık %50'si, klinik olarak fark edilmiş gebeliklerin ise yaklaşık %20'si abortusla sonlanmaktadır. Her 4 çiftten biri en azından bir kez gebelik kaybı yaşamaktadır (81, 82). Bu abortusların %80'i 12. GH'dan önce oluşmaktadır. İmplantasyon sonrasında 4 ila 6. GH sonrasında gebelik kayıp oranı %15-20 civarındadır. 10-13. GH'da ise bu oran %2,8'e düşer (83). Gebelik kayıplarının değerlendirilmesinde, kaybın hangi haftada olduğu önemlidir. 1. trimester kayıplarında ek sık neden kromozom anomalileri iken 2. trimester kayıplarında servikal yetmezlik ön plana çıkmaktadır.

Biyokimyasal gebelikte, kandaki gebelik göstergesi olan hormon β -HCG yükselir, fakat erken haftalarda gebelik kaybı olduğundan menstrüel döngü içerisinde kanama gerçekleşir, bu kanama ve atılan doku parçaları abortus materyalidir. Gebelik kesesinin gelişmesine karşın embriyonun gelişmemesi durumu ise 'anembriyonik gebelik' olarak tanımlanır.

Gebelik kayıplarının olduğu trimester, konseptusun gelişimsel evresi ve etiyolojik faktörler göz önüne alınarak güncel bir yaklaşım algoritması ve terminolojisi önerilmiştir (84)(Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Gebelik kayıplarında kullanılan terminoloji (Silver (84)'dan değiştirilerek)

Önerilen terim	Kullanılan terim	Tanım	Etkili gelişim evresi
Erken gebelik kaybı	Spontan abortus	Kanda ya da idrarda pozitif hCG saptanmasına rağmen USG ile saptanamamış <10. GH gebelik kaybı	Morula Blastosist Gastrula Embriyo
Peri-implantasyonal	Spontan abortus	USG ile gestasyonel sak	Morula

kayıp		görüntülenemeden <5. GH gebelik kaybı	Blastosist Gastrula
Ektopik gebeliği kapsayan, yerleşimi bilinmeyen gebelik	Ektopik gebelik	Ektopik gebelik dahil olmak üzere olası ektopik, olası bilinmeyen yerleşimli, olası intrauterin veya intraabdominal olan uterusu olmayan gebelik	Uygulanamaz
Preembriyonik kayıp	Spontan abortus	Gebeliğin ilk 6 haftasına kadar olan, embriyonun USG ile izlenemediği gestasyonel sak/yolk sakın izlendiği gebelik kaybı	Morula Blastosist Gastrula
Embriyonik kayıp	Spontan abortus	Gebeliğin ilk 10 haftasına kadar olan, kardiyak aktivite izlenmemiş, CRL <10 mm olan gebelik kaybı	Embriyo
Gebeliğin terminasyonu	Abortus	Gebeliğin erken indüksiyonu veya intrauterin müdahale ile gebeliğin sonlandırılması	Uygulanamaz
Fetal ölüm Erken (10-15. GH) Geç (16-19. GH)	Spontan abortus	10-19. GH arasında USG ile fetal ölümün tespiti, kardiyak aktivite yokluğu	
Ölü doğum	Ölü doğum	Doğum sonrasında ya da doğumda ölen ≥ 20 . GH fetus	Fetus

Normal bir kadının fertil olduğu dönem, puberteden başlayarak menopozal döneme kadar süren onlarca yılı kapsayan bir süreçtir. Bu süreçte kadının yaşadığı çevre, yaşı, fiziksel özellikleri, işi, anatomik ve genetik özellikleri fertilite oranlarını etkiler. Gebelik kaybı öyküsü ile kliniğe başvuran çiftlerde öncelikli olarak alınacak ayrıntılı anamnez ve aile öyküsü çok önemlidir. Anne adaylarının puberte ve menstrüel öyküsü alınmalı, önceki gebelikler hakkında ayrıntılı bilgi edinilmelidir. Parental yaş, vücut-kitle indeksi, yaşam tarzı, meslek ve sosyokültürel özellikler üzerinde durulması gereken konulardır. İleri anne yaşı ile birlikte olası kromozomal anöploidi ve özellikle trizomilerin riski artmaktadır. Ayrıca polistik over sendromu, endometriyozis, obezite ve diyabet gibi sonradan edinilen, toplumda sık görülen hastalıkların fertilite üzerine olumsuz etkisi bilinmektedir. Akraba evlilikleri mutlaka sorgulanmalıdır. Aile içi evliliklerde resesif özellikteki ve toplumda nadir olarak görülen patojenik varyantların bir sonraki kuşakta homozigot hale geçerek fetal letal bir tablo oluşturma ihtimali yüksektir. Geniş kapsamlı ve en az üç kuşağı içeren aile ağacı çizilmeli, ailede

konjenital anomalili, gelişme geriliği veya entelektüel gerilik ve özellikle anne, kız kardeş, erkek kardeşin eşinde olası gebelik kaybı öyküleri alınmalıdır. Spontan ve tekil gebelik kayıpları ile ilişkilendirilmiş faktörler şunlardır: kromozom anomalileri (özellikle 1. trimester kayıplarında), embriyonal anomaliler, plasenta anomalileri, teratojen-mutajen maruziyeti, uterin anomaliler, travmaya maruziyet, trombofilik sendromlar, yetersiz beslenme veya obezite, genital enfeksiyonlar, maternal hastalıklar (Hipo/hipertiroidi, DM, Luteal faz yetmezliği, SLE, KVS hastalıkları) (81-84).

2.4. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları

TGK ile ilgili literatürde bulunan ilk yayın 1938 tarihlidir ve bu durum ‘düşük dizileri’ olarak adlandırılmıştır (85). Günümüzde kullanılan terminoloji açısından ilk tanımlama ise 1983 yılında yapılmıştır (86).

TGK, primer ve sekonder olmak üzere iki gruba ayrılır. Primer TGK’da doğum ile sonlanabilmiş gebelik öyküsü yokken; sekonder TGK’da herhangi bir zamanda doğumla sonlanabilmiş gebelik mevcuttur (87).

TGK’da her yeni düşükle birlikte kromozomal olarak normal gebelik kaybı riski artarken (%30-45), gelecekte gebeliğin başarıyla tamamlanma şansında azaldığı bildirilmektedir (88).

Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü tarafından yapılan çalışmada, 2008-2013 yılları arasında ülkemizde her 100 gebelikten 14’ünün spontan abortus ile sonlandığı bildirilmiştir. %31,3 kadının daha önceden de benzer öyküsü olduğu, yardımcı üreme teknikleri yoluyla gebe kalmış olan kadınların da %35’inin gebelik kaybı yaşadığı tespit edilmiştir (89).

ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) Erken Gebelik Uzman Grubu tarafından TGK tanımı için ortak bir terminoloji ihtiyacı üzerinde durulmuş; ektopik gebelik ve biyokimyasal gebelik gibi görüntülenememiş gebeliklerin de bu kapsama alınması gerektiğini belirtmişlerdir (90). Tekrarlayan gebelik kayıplarında saptanabilen etiyolojik faktörler sıklıklarına göre Tablo 2-2’de sıralanmıştır (90).

Tablo 2-2: Saptanabilen tekrarlayan gebelik kayıplarında etiyolojik faktörler (Kolté (90)’den değiştirilerek)

İmmünolojik nedenler (%20-50)

- Hücresel mekanizma - Baskılayıcı hücre ya da faktör eksikliği - MHC antijen ekspresyon defektleri - Hücresel immün regülasyonda bozulma - Hümorale mekanizma - Antifosfolipid antikorlar - Antitiroid antikorlar - Antisperm antikorlar - Antitrofoblast antikorlar - Baskılayıcı antikor eksikliği
Endokrin nedenler (%17-20) - Luteal faz defekti - Hiperprolaktinemi - Androjen anomalileri
Anatomik nedenler (%12-16) - Konjenital - Dietilstilbestrole maruziyet - Uterin malformasyonlar - Servikal yetmezlik - Edinsel - Servikal yetmezlik - Sineşi - Leiomyom - Adenomyom
Genetik nedenler (%3,5-5) - Kromozomal - Tek gen defekti - Multifaktöriyel
Enfeksiyonlar (%0,5-5)
Diğer faktörler (%10) - Endometrial reseptivite bozukluğu - Çevresel faktörler - Toksinler - Sigara ve kafein

3. Yasadışı ilaçlar/uyuşturucu madde kullanımı
4. Maternal böbrek, kalp ve hematolojik hastalıkları
5. Erkeğe bağlı nedenler

2.4.1. İmmün Nedenler

İmplantasyon, anjiyogenez, trofoblast invazyonu ve plasantasyonu da içeren tüm gebelik aşamalarında immün sistem aktif bir yere sahiptir. Sebebi açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarında immünolojik faktörlerin en sık neden olduğu (~%15-25) ve olası immün nedenlerin; maternal dolaşımdaki sitotoksik antikorlar, MHC-I ve MHC-II uyumsuzlukları, fetal dokulara, plasantanın fetal bölümlerine karşı maternal immün yanıtın ve Th1-Th2-NK hücrelerin aktivitesinin artması olduğu düşünülmektedir.

Gestasyonel hormonların etkisi altında endometriyumu implantasyona hazırlayan mekanizmalar içerisinde T lenfositlerin önemli bir rolü vardır. IL-1 ve IL-1 β reseptörleri trofoblast ve endometriyal hücrelerde bulunmaktadır. IL-1, LIF'i ve IL-6'yı indükleyerek implantasyonda görevli ana sitokinlerden biri olarak görev alır ve Th2 hücreleri uyarır. Tekrarlayan implantasyon kusuru ve infertilite olgularında IL-11 ve LIF düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca immünsüpresif özelliğiyle bilinen IL-10 normal gebeliklerde, tekrarlayan gebelik kayıplarına göre daha yüksek oranda saptanmıştır. *TNF- α* geni polimorfik varyantları ile TKG arasında bir ilişki bulunamamıştır. *TGF- β* , *IFN- γ* , *IL-1 β* , *IL-6* ve *IL-10* genlerindeki polimorfik varyantların gebelik kayıplarına neden olduğu hipotezi ise geniş kapsamlı ve yeterli hasta sayısı içeren çalışmalarda gösterilememiştir. İmmünite ilişkili genler ile TKG ilişkisini gösterebilmek için etnik grup ve çevresel faktörler gibi nedenlerle sitokin seviyelerinin değişebileceği göz önüne alınarak ve homojen bir olgu grubu oluşturarak yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır (91).

Fertilite problemlerinde periferik kandaki Natural Killer hücreler ile ilk çalışma 1996 yılında Alan Beer ve ekibi tarafından yapılmıştır. Bu olgu grubunda '⁵¹Chromium-release assay' tekniği ile sitotoksikite ve NK aktivitelere bakılmış olup, yüzey aktivasyon belirteci CD69 ekspresyonunun arttığı ve baskılayıcı belirteç CD94 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (92). TKG ve anembriyonik gebelik olgularında immün etiyopatogenezi aydınlatmak için yapılan akım sitometri çalışmalarında desidual lenfositler içerisinde dNK hücrelerinin normal gebeliklere göre sayı ve aktivitesinin

artmış oldukları görülmüştür (78). Treg hücre sayısının azalması, sebebi açıklanamayan infertilite, gebelik kaybı ve preeklampsi ile ilişkilendirilmektedir (93, 94). IL-17 ve IL-23 üreten Th17 sayısının artması ile TKG arasında korelasyon olduğu ve regülatör T hücreleri arasındaki dengenin bozulması sonucunda preeklampsi gibi gebelik komplikasyonları, spontan abortus ve preterm doğumun olabileceği gösterilmiştir (95, 96). Sitokin düzeyleri ve genlerindeki polimorfizmlerin TKG ile ilişkisi olduğunu söyleyen yayınların yanında, aksi yönde sonuçlanmış çalışmalar da mevcuttur (79, 97). Primer hücresel immün yanıtla ilişkili *HLA* allel prevalansları, partnerler arasındaki farklılıklar ve özellikle *HLA-B*, *HLA-DR* ve *HLA-DQ* lokus paylaşımlarındaki artışların TKG ile ilişkisi olduğu ileri sürülmüştür (98). Olası immün nedenlerin tedavisinde denenen IVIG, kortikosteroid tedavisi ve çeşitli immünoterapilerin etkin olmadığı gösterildiğinden rutin kullanımda önerilmemektedir (99-100).

2.4.1.1. Antifosfolipid Sendromu (APS)

APS, tromboza eğilimin olduğu, kalıtsal olmayan, sıklıkla sistemik lupus eritematozus (SLE) ile birlikte görülen, antifosfolipid antikor varlığı ile kanıtlanan otoimmün bir durumdur. SLE, romatoid artrit, Sjögren sendromu, sistemik skleroz, diyabetes mellitus, Crohn hastalığı ve otoimmün tiroid hastalığı gibi otoimmün hastalıklara; sifiliz ve HIV enfeksiyonu gibi enfeksiyon hastalıklarına; lösemi, lenfoma, over ve serviks karsinomu gibi kanserlere ve oral kontraseptif kullanımına sekonder olarak görülebilir. Antifosfolipid antikor, anti $\beta 2$ glikoprotein-1 IgM/IgG ve lupus antikoagülanı, TKG ile ilişkisi kanıtlanmış tek otoantikor grubudur (101). Burada ana faktör, negatif yüklü olan fosfolipid ve fosfolipoproteinlere karşı oluşan otoantikorlardır. Etkisinin plasenta üzerinde tromboksan sentezi artışı, prostosiklin sentezi azalışı ve plasentada antitrombotik antifosfolipid bağlayan protein olan anneksin V uzaklaşması ile görüldüğü düşünülmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde, antifosfolipid antikorların trofoblastlara bağlanması ile C3 ve C5 kompleman faktörlerini aktive ederek inflamatuvar hücreleri uyardığı, fetal ve plasental dokularda hasar yarattığı gösterilmiştir (102, 103). İnsan plasentası ile yapılmış *in vitro* çalışmalarda ise bu otoantikorların ekstravillöz trofoblast farklılaşmasını ve devam eden plasantasyonu durdurduğu, bu etkilerinin de heparin ve aspirin ile engellendiği gösterilmiştir (104).

Klinik tanısında; küçük damarlarda açıklanamayan trombozlar, ≥ 3 adet <10 . GH gebelik kaybı, <34 . GH'da preeklampsi ve plasental yetmezlik bulguları vardır. Antikardiyolipin (ACA) IgM/IgG, Lupus Antikoagülan Testi (LAC-otoantikörlerin etkisiyle APTT'de uzama olduğunun gösterilmesi) pozitifliği ve anti $\beta 2$ glikoprotein-1 IgM/IgG bu sendrom ile ilişkili otoantikörler ve testlerdir. Tedavisinde aspirin ve düşük molekül ağırlıklı heparin kullanılır. Kesin tanıda en az bir klinik ve bir laboratuvar kriterinin karşılanması gereklidir.

Tanı kriterleri (Sapporo kriterleri);

-Klinik Kriterler

- Geçirilmiş tromboz öyküsü
- ≥ 1 sayıda ≥ 10 . GH gebelik kaybı
- Ağır preeklampsi, eklampsi ya da uteroplazental yetmezliğe bağlı olarak ≥ 34 . GH'da gerçekleşen prematür doğum öyküsü
- ≥ 3 sayıda 10. GH'dan önce sebebi açıklanamamış gebelik kaybı öyküsü

-Laboratuvar Kriterleri

- Antikardiyolipin IgG veya IgM pozitifliği
- Lupus antikoagülanı pozitifliği
- Anti $\beta 2$ glikoprotein IgG veya IgM pozitifliği (2006'da eklendi)

2.4.2. Endokrin Nedenler

Bu grup, gebelik kaybına neden olan etken bulunduğu ve tedavi sağlanabildiğinde başarı oranı yüksek bir gruptur.

Hipotiroidi, over fonksiyonlarını bozarak ve luteal faz yetmezliğine yol açarak gebelik kaybına sebep olabilir. Ancak, tiroid fonksiyon testleri ve antitiroid antikörlerin taranmasının TKG etiyojisi ve prognozu açısından bir etkisi olmayacağı söylenmektedir (105).

Diyabetes mellitus, sadece abortusa değil, gebelik boyunca farklı komplikasyonlara da yol açar. Embriyogenezi bozarak fetal anomalilere neden olur. Başarılı bir gebelik sürdürebilmek ve fetusun etkilenmemesini sağlamak için gebelik öncesinde diyabet mutlaka kontrol altına alınmalıdır.

Luteal faz yetmezliği, gebeliğin oluşumu ve implantasyon aşamasında etkin olacak ana aşamalardan biri olan luteal fazın 13 günden daha kısa olmasıdır ve korpus luteumun yeterli progesteron üretememesiyle sonuçlanır. Luteal fazda serum progesteron düzeylerinin 10ng/ml'den az olması luteal faz yetmezliğinin göstergesidir. Maternal serum progesteron seviyelerinin ≤ 12 ng/ml olması artmış gebelik kaybı riski ile ilişkilendirilmektedir, fakat gebelik sırasında bu düzeyler oldukça farklı aralıklarda seyredebildiği de göz önünde bulundurulmalıdır (106). Korpus luteumun yokluğunda gebeliğin devam etmediği bilinmektedir. Luteal faz yetmezliğinin TKG olgularındaki oranı %12-28 olarak bildirilmiştir (107). Hiperprolaktinemi, polikistik over sendromu, hipogonadotropik hipogonadizm, azalmış over rezervi, stress, aşırı egzersiz ve ciddi kilo kaybı luteal faz yetmezliğine de yol açabilir (108). Bu olgularda progesteron tedavisi ve hCG replasmanının iyi prognoza etkisinin olduğu söylenmekte, kullanım şekli ve fayda oranlarının netleşmesi için luteal faz yetmezliği olgularında çalışmaların artırılması gerektiğine dikkat çekilmektedir (105).

Hiperprolaktinemi, folikülogenez ve oosit olgunlaşmasında yetmezliğe yol açarak genellikle anovulasyon ve infertilite, ayrıca hipotalamohipofizoovaryan yolağı da bozarak kısa luteal faza neden olduğundan TKG ile ilişkilendirilmektedir (109).

2.4.3. Anatomik Nedenler

Dişi üreme sisteminde yer alan organlardaki anatomik bozukluklar nedeniyle oluşan TKG'larda gebelik kayıpları sıklıkla ikinci trimesterde meydana gelir. Histerosalfingografi, menstrüasyonun 6 ila 11. günleri arasında serviksten uterin kavite içerisine radyoopak madde verilmesi ile uterus, tubalar ve sonrasında bu maddenin periton boşluğuna yayılımı, bu yayılım sırasında lezyon, yapışıklıklar ve tubal tıkanıklıkların tespitinde kullanılan yüksek sensitiviteli bir yöntemdir.

Anatomik nedenler içinde en sık görülen (%35) uterin kavite içerisinde bir perde gibi kavitenin doğal yapısını bozan septat uterus (110). Erken embriyolojik dönemde bilateral gelişerek orta hatta uterus parçalarının birleşmesi (paramezonefrik kanallar) ve sonrasında aradaki dokuların rezorbe olması ile normal uterus oluşur. Rezorbsiyon aşamasındaki hatalar septat uterus oluşmasına, bu da plasentanın kan akımının bozulması ve büyüyen fetus için uterus içinde yeterli alan kalmamasına yol açtığından gebelik kaybına sebep olabilmektedir. Tedavide histeroskopik septoplasti uygulanır, tedavi sonrası gebelik başarısı yüksektir.

Gebelik kayıplarına sebep olabilen edinilmiş anatomik faktörler içerisinde uterin miyomlar (en çok submüköz yerleşimli), geçirilmiş enfeksiyonlar ve küretaj işlemlerine sekonder gelişen, kavite içerisinde yapışıklıklar görülen Asherman sendromu vardır.

İkinci trimester kayıplarında sık görülen etiyolojik faktörlerden biri olan servikal yetmezlik de anatomik faktörler arasında sayılmaktadır. Bağ dokusu hastalıkları gibi konjenital veya geçirilmiş cerrahi girişim, biyopsi öyküsü gibi edinsel nedenlerle meydana gelebilir. Tespit edildiğinde gebelik kaybı gerçekleşmeden önce servikal serklaj yapılması (servikte internal os hizasına servikal açıklığı önleyici suture atılması) etkin tedavi yöntemidir ve gebeliğin devamını sağlar.

2.4.4. Genetik Nedenler

2.4.4.1. Kromozom Anomalileri

Kromozomların sayısal veya yapısal tüm değişimleri kromozom anomalisidir. Eğer bu değişim aktif genlerde dozaj değişimine neden olur ve genlerin fonksiyonlarını bozarsa fenotipik etkiye yol açar ve ‘dengesiz kromozom anomalisi’ olarak tanımlanır; genomik dengesizliğe yol açmayanlar ise fenotipik etki yaratmazlar ve ‘dengeli kromozom anomalisi’ olarak adlandırılır. Ancak, dengeli kromozom anomalileri taşıyıcıları gametlerine %50 genetik materyali dengesiz aktarabildiklerinden embriyo etkilenmekte ve genetik dengesizliğin ağırlığına bağlı olarak embriyonun yaşam şansı değişmektedir. Bu nedenle tekrarlayan gebelik kayıplarında çiftlere kromozom analizi yapılması son derece önemlidir.

Sayısal Kromozom Anomalileri: Üreme tıbbı ile ilgilenen ve kılavuzlar yayınlayan uluslararası kuruluşlardan RCOG’a (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists) göre 3 gebelik kaybından sonra fetal karyotip analizi önerilmekte iken, ASRM (American Society for Reproductive Medicine) bu sayıyı 2 olarak vermektedir (110, 111). Yapılan çalışmalarda TKG embriyolarında kromozomal anomali saptanma oranı %25-60 arasında verilmektedir (112-114). Abortus materyallerinde yapılan kromozom analizlerinde, en sık sayısal anomalileri saptanır. Sayısal kromozom anomalilerinden triploidi ve tetraploidi ~%25, monozomi X %10 sıklıkla saptanırken, anomalilerin en büyük kısmını trizomiler oluşturur ve bunların büyük çoğunluğunun oogeneze, özellikle mayoz I’deki bölünme hatalarından kaynaklandığı ve ileri anne yaşı ile birlikte sıklığının arttığı gösterilmiştir (111).

Trizomiler içinde en fazla otozomal olanlar dikkat çeker. Trizomi 1 dışında, bütün kromozomların trizomileri abortus materyallerinde tespit edilmiştir. Trizomi 1’li embriyoların letal etki nedeniyle implantasyon aşamasında kaybedildiği, abortus olduğu fark edilebilecek kadar yaşamadığı bilinmektedir. Abortus materyali incelemelerinde en sık sırasıyla trizomi 16 (%7,27), trizomi 22 (%2,26) ve trizomi 21 (%2,11) tespit edilmektedir (115). Bu olgularda trizomiler için tekrarlama riski topluma göre artmıştır (ampirik olarak %1-1,4). Bunun sebebinin gonadal mozaikizm, mayotik ayrılamamaya yatkınlık gibi durumlar olduğu düşünülmektedir. Fertilizasyon aşamasında veya ilk mitoz bölünmelerde meydana gelen hataların yol açtığı anomaliler olan triploidi ($3n$) ve tetraploidi ($4n$) ile monozomi X için tekrarlama riski toplum riski kadardır. Triploidiye yol açan fazla haploid set maternal ya da paternal kökenli olabilmektedir. Fazla setin maternal kaynaklı olması plasentanın küçük kalmasına ve ağır fetal gelişim geriliğine yol açar. Plasentanın adeta bir üzüm salkımı şeklinde görüldüğü ve ‘komplet mol’ olarak adlandırılan gebeliklerde kromozom yapısı $46,XX$ olarak saptanabilmektedir. Bu olay çekirdeği olmayan boş bir ovumun $23,X$ kromozomal yapıdaki bir sperm ile döllenmesi, kromozom sayısının iki katına çıkması ile oluşur. Maternal genetik materyalin olmaması, plasental anomalinin oluşmasına ve embriyonal gelişimin geri kalmasına neden olur.

Yapısal Kromozom Anomalileri: Homolog olmayan iki kromozom arasında meydana gelen materyal paylaşımına ‘translokasyon’ denir ve dengeli ile dengesiz translokasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır. Dengeli translokasyonlarda kromozomal materyal açısından artma ya da azalma olmaz. Ailevi kromozomal translokasyonlar TKG etiyojijisinde ilk defa 1962 yılında Schmidt tarafından tanımlanmıştır (116). Tekil düşükten sonra parental translokasyon %2,2 oranında saptanırken, iki gebelik kaybından sonra bu oran %4,8, üç gebelik kaybından sonra ise %5,7 civarında olmaktadır (110, 117). ~%5 olguda gözlenen yapısal anomalilerin ise $2/3$ ’ü ailevi dengeli kromozom anomalisi taşıyıcılığının ürünleridir.

Erkek ile kadın taşıyıcılar arasında bir karşılaştırma yapıldığında, kromozom anomalilerinin iki kat daha fazla maternal kökenli olduğu görülür (118). Dengeli kromozomal yeniden düzenlenmeler, olguda fenotipik açıdan bulgu vermez; fakat bir sonraki kuşağa aktarıldıklarında ortaya çıkabilirler. Robertsonian translokasyon tipinde, kısa kollarını kaybeden iki kromozomun sentromer bölgesi yakınında birbirleri ile

birleşir ve bu durum akrosentrik kromozomlarda sık meydana gelir. Genel popülasyonda %0,1 oranında görülür, TGK olgularında ise oran %1,1'dir (119) ve %75'i 13 ve 14. kromozomlarda meydana gelir. Toplumda 1/1.300 oranında görülen 13q14q Robertsonian translokasyonu, en sık kromozomal yeniden düzenlenimdir (120). 21. kromozomu içeren 14q21q gibi translokasyonlarda oluşan dengesiz gametler ile oluşan gebeliklerde Down sendromu riski artar.

İnversiyonlar, bir kromozomda oluşan kırıklar sonrasında kırılan bölgenin, ters dönüp tekrar aynı yerle birleştiği durumlardır. Her iki kromozom kolunu kapsayan perisentrik inversiyonlar bölgesel olarak hem duplikasyon hem de delesyona yol açar. Dengesiz parasentrik inversiyonlar, asentrik ya da disentrik kromozomların oluşmasına neden olur. Perisentrik inversiyon taşıyıcısı bir ebeveynin dengesiz kromozom anomalili çocuk sahibi olma riski %5-10 civarında verilmektedir (121). Toplumda sıklıkla rastlanılan polimorfik kromozomal varyantı inv(9)(p11q12)'dir.

2013 yılında yapılan bir çalışmada TGK olgu grubunda parental kromozom anomalisi saptanma oranı %3,7 olarak bulunmuştur. Bu oran içerisinde %24,7 resiprokal translokasyonlar, %17,64 Robertsonian translokasyonlar, %4,11 mozaizm, %4,7 küçük markır kromozomlar ve %0,6 da mikrodelesyonlar tespit edilmiştir (122).

2.4.4.2. Bilinen Tek Gen Defektleri

Üçlü tekrar hastalıkları, immün sistemi etkileyen tek gen mutasyonları, trombofilik gen mutasyonları, enzim kodlayan genlerdeki defektler ve fetal letal sendromlar tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkilendirilmektedir. Mendeliyan hastalıklardan Barth sendromu, α Talasemi major, Letal multipl pterygium sendromu gibi hastalıklar intrauterin dönemde fetus üzerinde ölümcül etki yaparak gebelik kaybına sebep olurlar. TGK olgularında yaşamla bağdaşmayan OR hastalıklar özellikle akraba evliliği veya pozitif aile öyküsü varlığında sorgulanmalı ve araştırılmalıdır. Lizozomal veya amino asit defekti hastalıkları, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, glikojen depo hastalıkları ve yağ asidi oksidasyon bozuklukları fetal metabolik yolakları bozarak gebelik kaybına neden olurlar. X kromozomu üzerinde bulunan *MECP2* gen mutasyonları erkek fetusların tekrarlayan kayıplarına yol açabilen X'e bağlı kalıtım gösteren Rett sendromuna yol açar.

Muskuloskeletal tutulumun olduğu miyotonik distrofi, tanatoforik displazi, tip II osteogenezis imperfekta gibi hastalıklar da intrauterin dönemde letal olabildiğinden

gebelik kayıpları ile ilişkilendirilmektedir (123, 124). Miyotonik distrofi, *CNBP* ve *DMPK* genlerindeki üçlü nükleotid (CTG) tekrar sayısının artmasıyla karakterizedir. Bu genlerdeki tekrar sayısı normalden fazla ise, hücre bölünmesi esnasında eşleşmede hatalara yol açabilir. Miyotonik distrofinin gebelik kayıplarındaki yerini açıklayabilmek amacıyla yapılan incelemelerde düşük materyallerinde bu hastalık taşıyıcılarına göre daha fazla CTG tekrarları tespit edilmiştir (125).

Kalıtsal Trombofili Sendromları: Kalıtsal trombofililer, azalmış antikoagülan proteinleri veya artmış koagülasyon faktörleri ile tespit edilir ve genel popülasyonda ~%15 civarında görülür. Koagülasyon kaskadı, intrinsek ve ekstrinsek olmak üzere iki yolla aktive olur. İntrinsek yola yüzeyel temas yolu da denirken, ekstrinsek yol doku faktör yolu olarak adlandırılmaktadır.

Gebeliğin normal dışı fizyolojisine göre trombotik olaylara daha yatkın bir dönem olduğu bilinmektedir. Fibrinojen, faktör V, faktör VII, faktör VIII, faktör X ve PAI artışının yanında antitrombotik etkisi bilinen protein S azalması ve bunun sonucunda protein C direncinin oluşması gebelikteki tromboza eğilimin nedenleridir. Kalıtsal bir trombofili olması durumunda, gebeliğin abortusla sonlanabileceği uzun yıllar boyunca düşünülmüş, çalışmalarda ilişkili olabilecek genetik varyantların belirlenmesine rağmen, varyantı taşıyan annelerde sorunsuz süren gebelikler ve çocuk sahibi olunması üzerine bu hipotez geçerliliğini yitirmiştir (126). Oysa, gebelik kayıplarına yaklaşım kılavuzlarında bu tetkikler hala yer almaktadır. Aile öyküsünde veya daha önce geçirilmiş derin ven trombozu öyküsü olan anne adaylarında taranması gereklidir ve patojen varyant saptanması durumunda profilaktik olarak gebelik boyunca düşük molekül ağırlıklı heparin uygulanması önerilmektedir (127).

Faktör V (c.1691A>G) ve protrombin (c.20210G>A) genlerindeki işlev kazancı tipindeki mutasyonlar, artmış tromboembolik risk ile ilişkilidir. *F5* genindeki varyantın heterozigot sıklığı beyaz ırkta %5, protrombin geni için ise %2-3 civarındadır. Bu oran Asya ve Afrika kökenlilerde daha azdır. Ülkemizde taşıyıcılık oranı yaklaşık %3,1-4 olarak verilmektedir ve venöz tromboemboli öykülü bireylerde bu oran %5,3'tür (128). Protein C, Protein S ve antitrombin eksikliği ise ~%1 civarında olup, daha nadirdir.

TGK'da yıllarca etken olduğu düşünülen *MTHFR* gen mutasyonları, bugün gebelik kayıpları yerine nöral tüp defektleri ile ilişkilendirilmektedir. Kandaki homosistein seviyesi yüksekliğinin ve buna sekonder olarak gelişen metiyonin

metabolizması bozukluğunun en sık etkenidir. Gebelikte folik asit, B6 ve B12 vitamini replasmanı, fetusta nöral tüp defekti gelişmesini önler.

2.4.5. Enfeksiyonlar

Genellikle tekrarlayan değil, sporadik gebelik kayıpları ile ilişkili olması beklenir ve prematür eylem ile daha fazla ilişkilendirilmektedir. Bilinen tekrarlayan gebelik kaybı nedenleri arasında en az sıklıkla görülen etkindir. Patogenezinde enfeksiyonla makrofaj ve T hücrelerin artması ve Th1 sitokinlerinin yüksek oranda salınması vardır (129). Artan sitokinler de feto-maternal üniteyi bozarak gebelik kaybına neden olur. CMV gibi viral enfeksiyonlarda integrin ve MMP-9 gibi sitotrofoblast moleküllerini baskılar (130). Bakteriyel enfeksiyonlar ise komplemanı ve kemokin reseptörlerini aktive ederek nötrofilleri enfeksiyon bölgesine çekerler, böylece artmış maternal immün cevaba yol açarlar (131). Tekrarlayan gebelik kayıplarında, olgunun öyküsünde özellik yoksa, şikayetleri ve fizik muayene bulguları enfeksiyonu düşündürmüyorsa etioloji araştırmasında etken taraması gereksizdir.

Kronik endometrit, endometriyumda olan kronik inflamasyondur ve TGK olgu grubunda %10-27 civarında saptanmaktadır. Endometrial stromada CD138 yüzey belirteci yardımıyla plazma hücrelerinin tespiti ile tanısı konur. Etiyolojisinde enfeksiyonların etkili olduğu düşünülmektedir ve tedavide sıklıkla doksisisiklin (200mg/gün-14 gün toplamda) terapisi uygulanmaktadır (132, 133). Tedavinin etkinliği ve diğer olası nedenler için çalışmaların artırılması gerekmektedir (134).

2.4.6. Çevresel ve Bireysel Faktörler

Sigara, alkol, isoretionin, ağır metallere maruziyet, çözücüler ve anestezi ajanları gebelik kaybına neden olmaktadır. Çevreyi kirleten endüstriyel kimyasalların birçoğu fertilité problemlerine yol açar ve özellikle erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmektedir (135). Dişi bireylerde ise bisfenol A maruziyeti gebelik kaybı, azalmış gestasyon süresi ve preterm doğum ile (136-139), ayrıca YÜT uygulanan kadınlarda azalmış ovum kalitesi ve başarısız implantasyonla ilişkilendirilmektedir (140, 141). Pestisitler fetal gelişim basamaklarını bozmakla ve gebelik kaybı, preeklamps ve preterm doğuma sebep olmakla suçlanmaktadır (142, 143). Benzin ve gaz endüstrisinde kullanılan hidrolik kimyasallar erken menopo, ölü doğum ve gebelik kaybının çevresel-kimyasal nedenleri arasında sayılmaktadır (144, 145).

2012 yılında 35 TKG öykülü kadın ve 34 kontrol ile yapılmış olan bir çalışmada, TKG olgu grubunda serum çinko, bakır ve vitamin E düzeylerinin azalmış, selenyum, kurşun ve kadmiyum düzeylerinin ise artmış olduğu tespit edilmiştir (146).

2.4.7. Erkek Faktörü

TKG etiolojisinde erkek faktörüne dair çalışmalar oldukça azdır. Etiyolojide etkili olduğu iddia edilen faktörler arasında anormal sperm morfolojisiyle karakterize semen faktörü; sperm DNA hasarı ile giden kromozomal anomaliler ve/veya gen mutasyonları ile karakterize genetik faktörler, sperm DNA'sının anormal metilasyonuna yol açabilecek epigenetik değişiklikler, seminal oksidatif stres ve ileri baba yaşı gibi diğer faktörler belirtilmektedir (147). TKG'da semen analizi yapılması tartışmalı olmakla birlikte (148); sayı, motilite ve morfoloji bozukluklarının TKG ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (149, 150).

Normal ejakülatta spermilerin yaklaşık %1'inin anöploid olduğu bildirilmektedir (151). İleri anne yaşında olduğu gibi paternal yaş ilerledikçe anöploidi açısından risk artışı olmamakla birlikte; *de novo* nokta mutasyonuna bağlı tek gen hastalıkları ve yapısal kromozom anomalileri için riskin arttığı gösterilmiştir (152).

Y kromozom mikrolelesyonlarında, Y kromozomu uzun kolunda bulunan üç azospermi faktörü bölgelerinin (AZFa, AZFb, AZFc) TKG'dan daha çok azospermiye yol açarak infertiliteye neden olduğu bilinmektedir. Bu bölgeler spermatogenezde etkindir ve delesyonlarında kötü sperm kalitesi ve bozulmuş sperm fonksiyonları görülmektedir (153). Yapılan bir çalışmada TKG olgularında Y kromozom mikrolelesyonları incelenmiş, fertil çiftlere göre daha fazla oranda Y mikrolelesyonu saptanmıştır (154). Başka bir çalışmada, paternal proksimal AZFc bölgesi delesyonlarının TKG olgularında, fertil veya infertil erkeklere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (155). Bundan farklı olarak Y mikrolelesyonlarının TKG etiolojisinde yer almadığını belirten çalışmalar da vardır (156).

Spermlerdeki DNA hasarı/fragmentasyonu son yıllarda erkek infertilitesinde ve YÜT uygulamaları öncesinde üzerinde durulan bir konu olmuştur (147). Hidrojen peroksit, süperoksit bileşikleri ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri spermatozoa üzerinde oksidatif strese yol açmaktadır (151). Bu oksidatif stresin de sperm motilitesini etkilediği ve fertilizasyon aşamasında gamet membran füzyonunu bozduğu bulunmuştur. Ayrıca DNA'daki guanin başta olmak üzere bazlara ve

fosfodiester iskelete etki etmekte, böylece DNA'da zincir kırıkları meydana getirmektedir. 8-hidroksi deoksiguanozinin (8OHdG) infertil erkeklerin spermalarında yüksek düzeylerde bulunduğu gösterilmiştir (152). Sperm motilitesi ve sperm-ovum füzyonundan daha çok sperm nukleusundaki DNA oksidatif strese karşı hassastır, kemoterapi ve radyoterapinin, varikoselin, hiperterminin, sigara kullanımının ve ileri baba yaşının benzeri etki yaptığı bilinmektedir (157).

Tekrarlayan gebelik kayıpları için kontrol edilebilen ve edilemeyen faktörler literatür bilgileri değerlendirilerek Tablo 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7'de belirtilmiştir (90, 110, 111). Bu faktörlerin gebelik kaybının nedeni olmadığı, sadece riski arttırıcı etki gösterdikleri unutulmamalıdır.

Tablo 2-3: Gebelik kaybı riskini arttıran kontrol edilemeyen faktörler

35 yaş üzerinde olmak (>40 yaş en yüksek risk)
Gebelik kaybı öyküsü
Tıbbi nedenlerle olmayan gebelik tahliyeleri
İki gebelik arasındaki süre (süre kısaldıkça risk artar)
Fertilite problemleri
Yardımcı üreme tekniği ile oluşan gebelik
45 yaş üzerinde baba adayı

Tablo 2-4: Gebelik kaybı riskini azaltan kontrol edilemeyen faktörler

Canlı doğum öyküsü
Planlanmış gebelik
Erken gebelik haftalarında bulantı

Tablo 2-5: Gebelik kaybı riskini arttıran kontrol edilebilen faktörler

Aşırı zayıf olmak, gebelik öncesi vücut-kitle indeksinin <18,5 olması
Düzenli/ağır alkol kullanımı
Stress, özellikle kronik stres altında olmak
Kafein
Aşırı kilolu veya obez olmak
Sigara/tütün kullanımı

Tablo 2-6: Gebelik kaybı riskini azaltan kontrol edilebilen faktörler

Taze sebze-meyve, haftada en az iki kez balık veya beyaz et tüketmek
Folik asit, demir veya vitamin replasmanı almak
Stressiz yaşam

Tablo 2-7: Gebelik kaybı riskini etkilemediği düşünülen faktörler

Kaçıncı gebelik olduğu, gebeliğin sırası
Önceki gebelikte preeklampsi öyküsü
Kırmızı et, yumurta, soya ürünleri tüketimi
Tam zamanlı çalışma
Orta düzey fiziksel aktivite
Gebelikten önceki 3 ayda baba adayının alkol tüketimi
Gebelikten önce veya gebelikte baba adayının sigara/tütün tüketimi
Kanama olmadığında cinsel ilişki
Uçak yolculuğu

2.4.8. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları İçin Hazırlanmış Uluslararası Kılavuzların Karşılaştırılması

ESHRE, ASRM ve RCOG tarafından hazırlanmış olan kılavuzlar arasında TKG'ya yaklaşım açısından belli noktalarda farklılıklar bulunmaktadır (158). Bu farklılıkların karşılaştırması Tablo 2-8 ve 2-9'da belirtilmiştir.

Tablo 2-8: Tekrarlayan gebelik kayıpları için hazırlanmış uluslararası kılavuzların karşılaştırılması (Youssef (158)'ten değiştirilerek)

	ESHRE 2017	ASRM 2013	RCOG 2011
Gebelik	Serum/idrarda HCG pozitifliği; dış/molar gebelikler bu kapsamda değil	Ultrason veya histopatolojik incelemelerle tespit edilmiş klinik gebelik	Tüm gebelik tanımlarını kapsar
Gestasyonel hafta	24. GH'ya kadar	10. GH'ya kadar olan erken gebelik kayıpları	24. GH'ya kadar
Tekrar sayısı	2	2	3
Risk faktörleri	Yaş, anatomik, APS, embriyonik, endokrin, genetik, yaşam tarzı	Anatomik, APS, embriyonik, endokrin, genetik, kalıtsal trombofililer, yaşam tarzı	Anatomik, APS, embriyonik, endokrin, genetik, immün, yaşam tarzı, yaş, trombofililer
Genel incelemeler	Genel ve obstetrik muayene, aile öyküsünün alınması	Yaşam tarzının sorgulanması ve TKG açısından aile öyküsünün alınması	-
Genetik incelemeler	Rutin parental karyotip analizi önerilmemekte; fetal doku elde edilmiş ise a-CGH önerilmekte	Rutin parental karyotip analizi önerilmekte; mümkünse bu analize fetal karyotip analizinin eklenmesi faydalı olabilir	3 ve daha fazla gebelik kaybı yaşandıysa abort materyalinde karyotip analizi önerilmekte; eğer yapısal kromozom anomalisi saptanmışsa parental inceleme gerekmekte

Trombofililer	Trombofili açısından aile öyküsü veya risk faktörü yoksa gereksiz	Aile öyküsü veya <i>F5</i> , <i>F2</i> gen mutasyonları, Protein S ve Protein C bozuklukları açısından şüphe yoksa gereksiz	Sadece 2. trimester kayıplarında FVL, FII ve protein S taraması
Hiperhomosistinemi	Rutinde gereksiz	-	-
Immünolojik (APS için)	Antikardiyolipin antikorları ve lupus antikoagülanı Gerekli görülürse anti $\beta 2$ glikoprotein antikorları	Antikardiyolipin antikorları, lupus antikoagülanı ve anti $\beta 2$ glikoprotein antikorları	12. GH'dan ileri gebelik kayıplarında Antikardiyolipin antikorları ve lupus antikoagülanı
Endokrin	T4 seviyelerinde bir anormallik saptanmış ise TSH ve TPO bakılması	TSH ile tiroid fonksiyonlarına, prolaktin ve HbA1c seviyelerine bakılması	-
Anatomik	3D ultrason	Sonohisterogram, HSG ve/veya histeroskopi	Pelvik ultrason. Şüpheli bir durum saptanırsa 3D ultrason, laparoskopi veya histeroskopi
Erkek faktörü	Sperm DNA fragmentasyonuna bakılabilir	Sperm DNA fragmentasyonuna bakılması gereksiz	-
Yaşam tarzı için öneriler	Sigara ve alkolün bırakılması, dengeli beslenme	-	-
Dengeli kromozom anomalisi varsa	Genetik danışma YÜT+PGT önerilebilir	Genetik danışma YÜT+PGT önerilebilir	Genetik danışma YÜT+PGT önerilebilir
Trombofili saptanırsa	Klinik bulgu varsa tedavi gerekir Araştırma gruplarında denenebilir	-	Klinik bulgu varsa tedavi gerekir
APS varsa	Düşük doz aspirin (75-100 mg) ve profilaktik dozda düşük molekül ağırlıklı heparin	Düşük doz aspirin ve profilaktik dozda düşük molekül ağırlıklı heparin	Düşük doz aspirin ve heparin
Endokrin nedenler için tedavi	Hipotiroidi için levotiroksin, Vitamin D desteği, Hiperprolaktinemi için bromokriptin	Hiperprolaktinemi, hipotiroidi ve diyabet varsa uygun tedavi verilmeli	Klinik bulgu varsa tedavi gerekir
Anatomik neden saptanmışsa	Endikasyon varsa septum rezeksiyonu	Cerrahi düzeltme	Endikasyon varsa
Sebebi açıklanamayan TKG	Önerilen bir yaklaşım yok	Psikolojik destek	Erken Gebelik Birimlerinde destekleyici yaklaşımlar

Tablo 2-9: Tekrarlayan gebelik kayıplarında tanıda kullanılan testler ve tedavi yaklaşımları (Youssef (158)’ten derlenerek)

Genetik	Parenteral ve abortus materyali karyotip analizi	Genetik danışma PGT Gamet donasyonu
Anatomik	HSG, USG, MRG	Septum rezeksiyonu Miyomektomi
İmmünolojik	Lupus antikoagülanı Antikardiyolipin antikor Anti $\beta 2$ glikoprotein 1	Aspirin + heparin tedavisi
Endokrin	TSH Luteal faz süre tayini Açlık kan şekeri, HbA1c Prolaktin Androjen, LH, FSH seviyeleri	Progesteron Bromokriptin/kabergolin Metformin
Enfeksiyon	Semptom varsa taranır	
Çevresel	Anamnez	Nedenin ortadan kaldırılması

2.5. Sebebi Açıklanamayan Tekrarlayan Gebelik Kayıplarının Etiyolojisini Açıklamaya Yönelik Güncel Hipotezler

Tekrarlayan gebelik kayıpları incelendiğinde yaklaşık %50’sinin altında yatan bir neden gösterilememektedir. Bu durumu açıklamaya yönelik bazı hipotezler oluşturulmuş olup, kanıtlamaya yönelik çalışmalar devam etmektedir.

2.5.1. İmplantasyon Kontrol Noktası Hipotezi

2018 yılında yayınlanan bir makalede, TGK olgularının yaklaşık yarısında ‘Jenga Hipotezi’ olarak adlandırılan bir yaklaşımın yıllardır yürütüldüğü, bilinen klinik parametreler ve tedavi yöntemleri takip edildiğinde herhangi bir sonuç elde edilemediği belirtilmiştir. Bu hipoteze göre; klasik yaklaşımda erken gebelik dönemi Jenga oyunundaki gibi dengesiz bir yapıdır ve maternal sağlığın etkilemediği varsayımına dayanarak bilinen faktörler dışlanmaktadır. Fakat bu yaklaşımın, TGK’nın Hill Nedensellik Kriterleri’ni (olabilirlik, geçicilik, doz-davranış ilişkisi, etki, özgünlük, tutarlılık, uyumluluk) karşılamadığı ve bu alanda yeni bir bakış açısına ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Alternatif bir yaklaşım olarak da implantasyon kontrol noktası hipotezi öne sürülmüştür (159). Bu hipoteze göre, gebeliklerin erken haftalarında üç önemli kontrol noktası olduğu ve bu kontrol noktalarında bir sorun yaşandığında ya da kontrol noktasını geçemeyen embriyolar varlığında gebelik kayıplarının gerçekleştiği belirtilmiştir.

İlk kontrol noktası desidual biyoalgılamadır. Desidualizasyon ile implantasyon aşamasında konseptus hücrelerce çevrelenir, trofoblast invazyonu ve endometriyal dokunun yarı geçirgen bir hale gelmesi sağlanır (160). Bu aşamada, desidual hücrelerin biyoalgılayıcı olarak görev yaptığı (161) ve gebeliğin devamı için gerekli faktörlerin üretimini seçici olarak azaltarak düşük kaliteli ya da anöploid embriyoların implantasyonunu engellediği belirtilmektedir (162).

İkinci kontrol noktası embriyonik uyum sinyalidir. Erken gebelik haftalarında korpus luteumdan, daha sonra sitotrofoblast ve desidual hücrelerden üretilen β -HCG, gebeliğin devamı için önemlidir ve üretiminin bir kontrol noktası oluşturduğu düşünülmektedir (159).

Üçüncü kontrol noktası desidual stres testidir. Bu aşamada desidual hücrelerin seçici olarak stres ile ilişkili yolakları baskıladığı, hücrel stres seviyesi düştükçe implantasyon ve gebeliğin devamının sorunsuz devam ettiği gösterilmiştir. Hücrel stresin tamponlanabilir kapasitenin üzerine çıkması durumunda ise fetal-maternal ara yüzey hızlıca yıkıma programlanır ve bu da gebeliğin düşükle sonlanmasına yol açar (159).

2.5.2. İmplantasyon Kusurları

Yardımcı üreme tekniklerinin her geçen gün daha sıklıkla kullanılmasına, mümkün olduğu kadar iyi kalitede embriyoların transfer edilmesine rağmen gebeliklerin gerçekleşme, devam etme ve doğumla sonlanma oranında artış aynı oranda olmamaktadır. Bu durum, gebelik oluşumunda temel basamaklardan biri olan implantasyon sürecindeki bozukluk ya da hataların gebelik kaybına yol açabileceği ihtimalini desteklemektedir. Endometriyal reseptivitenin önemi daha fazla anlaşılmakta, başarısız YÜT denemelerinin altında yatan ana nedenlerden biri olarak görülmekte ve bu alandaki çalışmalar giderek artmaktadır (160-162).

≥ 2 embriyo transferi sonrasında implantasyonun gerçekleşmemesi, ‘tekrarlayan implantasyon kusuru’ (TİK/TİD) olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda gelişmiş ülkelerde her bir transferde (transfer başı ortalama 2 embriyo) gebelik olasılığının %30-35 civarında olduğu bildirilmektedir (163). Tekrarlayan implantasyon kusurlarında en önemli problemin, embriyo kalitesi ile ilişkili olduğu ve kaotik mozaik embriyoların varlığının da katkısının bulunduğu gösterilmiştir (164). Ayrıca embriyolarda yapılan kromozom analizleri ve metabolik çalışmalarda anöploid blastosist, artmış metabolik

hız (gürültülü embriyo); COX2, MUC-1, LIF, IL-6, PLGF ve integrinlerde azalma; SGK-1, IL-1 β , IL-15, IL-18 ve TNF- α da artma saptanmıştır. İmplantasyon kusurlarına yol açtığı bilinen nedenler ve olası mekanizmaları Tablo 2-10'da gösterilmiştir.

Tablo 2-10: İmplantasyon kusuruna yol açtığı bilinen nedenler ve mekanizmaları (Koot (164)'tan değiştirilerek)

Endometriyozis	İmplantasyon penceresi döneminde azalmış integrin ve LIF Sekretuvar fazda <i>HOXA10</i> ve <i>HOXA11</i> ekspresyon pikinin olmaması Progesteron direnci
Hidrosalfinks	Uterin kavitede olan sıvı birikimi nedeniyle appozisyonun gerçekleşmemesi Azalmış integrin ve LIF Azalmış <i>HOXA10</i> ekspresyonu
Leiomyom	Endometriyal hattın bozulması Tubal açıklığın ya da servikal kanalın tıkanması Azalmış <i>HOXA10</i> ekspresyonu
Endometriyal polip	Sperm transferinde ve embriyo implantasyonunda mekanik engel Sekretuvar fazda düşük IGFBP-1 düzeyi Sekretuvar fazda düşük progesteron reseptörü düzeyi
PKOS	Sekretuvar faz boyunca azalmış integrin, <i>HOXA10</i> ve IGFBP-1 düzeyleri Androjen reseptörlerinin artışı İmplantasyon penceresinde östrojen reseptörü- α 'ların aktivitesinin azalmaması Steroid reseptör aktivatörlerinin aşırı ekspresyonu
Endometrit	Kronik endometriyal enflamasyon

2.5.3. Endometrial Kök Hücre

Kök hücre çalışmalarında yeni yeni gündeme gelen ve oldukça umut vadeden bir grup da infertilite çalışmalarıdır. Endometriumda somatik kök hücrelerin varlığı 1970-80'lerde ortaya atılmıştır (165-167). 2004 yılında Cho ve arkadaşları insan endometriumundan CD117 ve CD34 yüzey belirteçlerine sahip hücreleri izole ettiler. Bu hücrelerin bazal tabakanın stromal bölgesinde bulunduğu gösterilmiştir (168). CD9, CD44 ve CD90 yüzey belirteçlerinin fibroblast; CD34, CD133 ve VEGFR2 belirteçlerinin ise endotelial öncü hücrelere ait olduğu bilinmektedir (169). Kültür ortamındaki epitelyal hücrelerin %0,22'sinin ve stromal hücrelerin %1,25'inin yüksek proliferasyon ve kendini yenileme özelliği olduğu gösterilerek döngülerde atılan dokuların yerini bu hücrelerin doldurduğu ileri sürülmüştür (170). Yapılan bir çalışmada kemik iliğinden alınan kök hücreler insan endometriumuna eklenerek bu hücrelerin endometriumun epitelyal ve stromal hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir (171). Asherman sendromu tedavisinde de kök hücre denemeleri yapılmaktadır. 2011 yılında yapılan bir çalışmada, Asherman sendromlu bir olgudan alınan otolog kemik iliği kök

hücreleri endometriyuma transfer edilmiş, hormon replasmanı ile birlikte endometriyal kavite kalınlığının implantasyona uygun hale geldiği gözlenmiş ve IVF uygulaması sonrası embriyo transfer edilerek implantasyonun tamamlandığı görülmüştür (172). Sebebi açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarında yapılan çalışmalarda endometriyal stromal hücrelerin yetersiz desidualizasyonu gösterilmiştir (173). Bunun da kök hücrelerin (plasental veya endometriyal) yetersiz çalışması ya da kusuru ile açıklanarak gebelik kayıpları ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (63).

2.5.4. mikroRNA ve Embriyo-Endometriyum İletişim Ağı

Gen ekspresyonunun ilk aşaması olan transkripsiyon ile mesajcı RNA (mRNA), mRNA'nın translasyonu ile de aminoasit dizileri ve proteinler oluşur. İfade edilen gen, protein kodlamayan bir RNA da oluşturabilir, bu RNA'lardan biri, genin ifadesini transkripsiyonal ve post-transkripsiyonal düzenlenmesinde rol oynayan mikroRNA'dır (miRNA).

Yaklaşık 20 yıl önce keşfedilen miRNA'lar, endojen, 18-24 nükleotidlik, tek zincirli RNA molekülleridir. Bu moleküller mRNA'ların 3' anlatımı olmayan bölgelerine (UTR) bağlanarak translasyonun durdurulmasını veya proteinin degradasyonunu sağlar. Bu mekanizmanın memeli genlerinin ~%30-60'ını kontrol ettiği düşünülmektedir (174, 175). Bugüne kadar 2.000'den fazla miRNA tanımlanmış olmasına rağmen, onbinlercesi olduğu tahmin edilmektedir (176).

Desidualizasyon ve implantasyon aşamalarında post-transkripsiyonal düzenlenmenin miRNA'lar ile kontrol edilebileceği öngörüsü ile 2009 yılında Qian ve arkadaşları tarafından mikroarray yöntemi ile yürütülen çalışmada implantasyonla ilişkili olabilecek, farklı ekspresyon özelliklerine sahip 49 miRNA tespit edilmiştir (177). Bu miRNA'ların transkripsiyonal faktörler, büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks enzimleri ve aktin filamanlarının düzenlenmesinde etkin interlökinleri hedef aldıkları belirlenmiştir. Bazı miRNA'lardaki polimorfizmlerin, TKG sorunu ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (178, 179). TİK olgu grubunda yapılmış bir çalışmada 3.800 genin ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu 13 miRNA'nın ekspresyonlarının farklı olduğu tespit edilmiş olup (180) bu miRNA'lar görevli oldukları yollara göre Tablo 2-11'de belirtilmiştir.

Tablo 2-11: İmplantasyonda etkin miRNA'lar (Revel (180)'den değiştirilerek)

Proliferasyon/Desidualizasyon	Anjiyogenez	İmmün Düzenlenme	Appozisyon/Adezyon	Migrasyon/İnvazyon
miR-222	miR-199a	miR-199a	miR-451	miR-199a
miR-424	miR-451	miR-101a	miR-424	miR-21
miR-30b	miR-424	miR-125b	miR-145	miR-424
miR-145	miR-125b	miR-155	miR-23b	miR-451
miR-99b				miR-145
miR-96				miR-99b
miR-135b				

TGK olgularına ait spontan abortus dokularında Yeni nesil dizileme (YND) tekniği ile yapılan çalışmada Tablo 2-12'de gösterilen miRNA'lar tespit edilmiştir (181, 182).

Tablo 2-12: TGK olgularına ait spontan abortus dokusunda saptanan miRNA'lar ve ilişkili yolaklar (Söber (181) ve Wang (182)'dan değiştirilerek)

Proliferasyon ve invazyon	Apoptoz, hücre döngüsü ve p53 yolağı
miR-3168	miR-191-5p
miR-1260b	miR-24-3p
miR-193a-3p	miR-100-5p
miR-494	miR-146a-5p
miR-142-3p	miR-1
miR-191-5p	miR-372
	miR-371a-5p
	miR-376c-3p
	miR-486-5p
	miR-516-5p
	miR-517a-3
	miR-519a-3p
	miR-519d

2.5.5. Maternal Mitokondriyal DNA Varyantları

Hücrelerin enerji kaynağı olan mitokondri, kendine ait DNA'ya sahip olmasıyla diğer organellerden farklılık gösterir. Solunum zinciri enzim kompleksi 46 farklı alt birim içermekte olup 7 tanesinin anlatımı mitokondriyal DNA (mtDNA) genleri tarafından (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*) yapılmaktadır (183). Gebeliğin oluşumu, implantasyon, plasenta ve embriyonun gelişimi yüksek düzeylerde enerji gerektirdiğinden, yeterli enerjinin sağlanamamasının embriyo gelişimini etkileyerek gebelik kaybına yol açabileceğine dair ilk hipotez Jansen ve de Boer tarafından 1998 yılında ortaya atılmıştır (184). Ortaya atılan hipotezlerden biri de, bazı maternal mtDNA varyantlarının enerji metabolizmasını bozarak TGK'ya yol açabileceğidir. Bu konuda oldukça az çalışma olmakla birlikte 2017 yılında 73 TGK öykülü kadın ve 100 kontrol

ile yapılan bir çalışmada mtDNA kompleks I genleri dizilenmiş; *ND1*'de T4216C, *ND2*'de A5153G, *ND3*'te C10142T, *ND4*'te C12063T, *ND5*'te A12662G, *ND6*'da G14179A ve C14623T varyantları tespit edilmiştir (185).

2.5.6. Dişi Embriyo Hipotezi

Embriyodaki fonksiyonel genlerin bazıları, maternal veya paternal olarak kalıtıldığı ebeveyne göre genomik baskılanmaya (imprinting) uğrar. Maternal genlerin baskılanması, plasental fonksiyonların sağlanması ve plasenta büyümesi lehine, paternal genlerin baskılanması ise fetusun büyümesi ve hayatta kalması üzerine odaklanır. Ayrıca, embriyolar cinsiyetlerine göre de oldukça farklı özellikler taşırlar. Erkekler Y kromozomuna sahip iken, dişilerde iki X kromozomu vardır ve X inaktivasyonu gerçekleşene kadar (implantasyon sonrası, geç blastosist aşaması) çift doz gen ekspresyonu gerçekleşir (186). Rastgele olmayan X inaktivasyonu ya da inaktivasyonun gecikmeleri, paternal X kromozomunun daha uzun aktif kalmasına yol açarak maternal endometriyumun embriyoyu 'yabancı' olarak algılama ihtimalini arttırmaktadır. Bu mekanizmanın da TKG etiolojisinde yer alabileceği düşünülmektedir (187). Rastgele gerçekleşen X inaktivasyonu sonucunda paternal kalıtılan X'ler aktif kalabilir; bu durum Y kromozomu varlığını ve erkek fetusların neden maternal endometriyum tarafından yabancı olarak algılanmadığını sorusunu akla getirir de, Y kromozomuna (57 Mb) göre daha büyük olan X kromozomunun (156 Mb) (dışideki paternal X), anne ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda 'yabancı' genomik bölge taşıdığı ileri sürülmüştür (188). Ayrıca çalışmalar, erkek embriyoların dişi embriyolara göre daha hızlı geliştiğini, yavaş büyüyen dişilerin endometriyal reseptivite penceresini kaçırmaya daha yatkın olduğunu göstermiştir. İmplantasyon sonrasında ise, dişi embriyoların metabolik olarak erkek embriyolara göre daha aktif olduğu, X kromozomu üzerinde yer alan *G6PD1* geni ile ilişkili pentoz-fosfat yolunu kullanmaya daha meyilli oldukları gösterilmiştir. Memeli embriyolarında 'aktif' embriyolara göre 'sessiz' olanların yaşayabilirliğinin daha yüksek olduğu, bu artmış metabolik aktivitelerin de artmış DNA hasarı tamir yolları ve oksidatif metabolizma ile ilişkili olabileceği söylenmiştir (189). Farklı mekanizmalardan yola çıkarak dişi embriyolar ile oluşan gebeliklerin düşükle sonlanma ihtimalinin daha yüksek olduğu, TKG etiolojisinde embriyonun dişi cinsiyeti taşımasının yer alabileceği hipotezi öne sürülmüştür (188).

2.5.7. LINE-1 Retrotranspozon Hipotezi

İnsan genomunun üçte ikisinden fazlasının tekrarlayan DNA dizilerinden oluştuğu, çoğunluğunu da transpozonların (transposable elementler, TE) oluşturduğu bilinmektedir (190). Bugüne kadar tanımlanmış iki sınıf TE bulunmaktadır; Sınıf I TE, RNA üzerinden ters transkripsiyon aktivitesi göstererek ‘kopyala-yapıştır’ mekanizması ile kendi cDNA’sının kopyasını genomun içerisine yerleştirir, LTR (uzun terminal tekrarlar) ve non-LTR olarak iki ana gruba ayrılır. Sınıf II TE ise DNA transpozonlarıdır, ‘kes-yapıştır’ mekanizmasını kullanarak replike olurlar ve insan genomu içerisinde aktif olan Sınıf II TE bulunmamaktadır.

LTR’ler, endojen retroviruslardır (ERV) ve insan genomunun yaklaşık %8’ini oluştururlar. LINE’ler (araya giren uzun diziler; LINE-1, LINE-2 ve LINE-3) ve SINE’ler (araya giren kısa diziler; Alu, MIR ve MIR3) ise non-LTR grubundadır. LINE-1 (L1) tam boyda olduğunda aktiftir (6,1 kb, ~600.000 kopya). RNA bağlayıcı domain, endonükleaz ve ters transkriptaz enzimlerini kodlayan genleri içerir, bu genlerin aktiviteleri çok zayıftır, birçoğu güdük dizidir. Genomda AT nükleotitlerinden zengin dizilere eklenir. İnsan genomunda bu bölgelerde aktif gen sayısı daha az olduğundan mutasyon yükleri azdır. Çalışmalar, yenidoğanların yaklaşık %5’inde yeni bir retrotranspozon insersiyonu olduğunu göstermiş, 125 kalıtsal hastalıktan non-LTR aktivitelerinin sorumlu olduğu (191, 192) ve her 62 doğumda bir yeni bir L1 insersiyonunun gerçekleştiği bildirilmiştir (193).

Embriyonik dokular ile yürütülen çalışmalarda, insan plasentasının L1 bölgelerinde hem hipermetilasyon hem de hipometilasyon saptanmış, üçüncü trimester plasentasında metilasyon oranının birinci trimestere göre azalmış olduğu gösterilmiştir (194). Mol gebelik plasentalarında L1’lerin normal plasentalara göre hipermetile olduğu, ancak diğer tekrar bölgeleri açısından mol gebelik ve normal gebelik plasentaları arasında fark olmadığı saptanmıştır (195). Öploid yapıdaki abortus materyalleri ile yapılan incelemelerde ise L1 bölgelerinin hipometile olduğu bildirilmiştir (196). L1 retrotranspozon hipotezinde, yeni bir L1 insersiyonun letal etkili bir gene eklenmesinin genin yapısını bozarak gebelik kaybına yol açabileceği öne sürülmektedir (196). Erken embriyolojik dönemde gelişimsel genlerde olası bir değişiklik veya retrotranspozon inhibe edici faktörlerin kaybı L1 aktivitesinin artmasına sebep olabilir. Bu aktivitelerin yeni kırılma bölgesi oluşumuna, poliadenilasyona,

promotör ve bağlanma bölgelerinin değişmesine, gen anlatımının etkilenmesine, ayrıca gen içi delesyon veya duplikasyonlara neden olabileceği bilinmektedir (197, 198). Ayrıca L1 aktivitelerinin duplikasyona yol açmasıyla gebelik kaybı ile ilişkili olabileceği düşünülen kopya sayısı değişikliklerinde (CNV) artış görülebilir (199, 200). Bu nedenle TKG etiyojisinde altta yatan nedenlerden biri de L1 aktivitesi olabileceğinden bu hipotezin araştırılması önerilmektedir (196).

2.6. TKG Etiyolojisinin Aydınlatılmasında Moleküler Analizlerin Etkileri

2003 yılında tamamlanan İnsan Genom Projesi ile elde edilen verilerin ve daha sonra biriken bilgilerin açık veri tabanları aracılığıyla ulaşılabilir hale gelmesi hastalıkların moleküler patogenezinin aydınlatılmasında büyük katkı sağlamıştır.

Tek gen hastalıklarının önemli bir bölümünde protein sentezinde herhangi bir aşamada kusur bulunduğu laboratuvar tanısı DNA, RNA ya da protein dizilerinin belirlenmesi ile gerçekleşmektedir. Günümüzde bu dizilerdeki varyantların saptanmasında farklı teknikler uygulanabilmektedir. Tanı laboratuvarlarında en sık kullanılan ve günümüzde de halen altın standart olan yöntem, ‘Sanger dizileme’dir. Frederick Sanger tarafından 1975’te geliştirilen bu yöntem ona Nobel ödülünü kazandırmıştır.

TKG olgu gruplarında Sanger dizileme ve farklı moleküler teknikler uygulanarak incelenmiş genler ve varyantları literatürden derlenerek tablolar 2-13 ve 2-14’te özetlenmiştir (128, 201-209).

Tablo 2-13: Sanger dizileme tekniği kullanarak TKG etiyojisi ile ilişkilendirilmeye çalışılmış genler ve saptanan varyantlar

<i>ALPP</i>	c.265A>T (rs13026692)
<i>AMN</i>	c.829A>G (rs146499374) c.1339_1344dupGCCGGG
<i>BAX</i>	c.-179A>G (rs751678403) c.26G>A (rs74422693)
<i>C4BPA</i>	c.359G>A (rs867500835) c.671T>C (rs116795518) c.1268G>A (rs116700161)
<i>C4BPB</i>	c.694A>G (rs141922788)
<i>CD46</i>	c.971C>T (rs41317833) c.638A>T
<i>EPCR</i>	c.655A>G (rs867186)
<i>FGB</i>	c.-455G>A
<i>FOXD1</i>	c.1067C>G (rs917127030)

	c.1092C>G (rs992724147) c.1285_1286insGCCGCG (rs370819776)
<i>HLA-G</i>	c.-1179G>A (rs1233335) c.*29-126G>A (rs915670) c.-788C>A (rs114252012)
<i>PAI-1</i>	c.-816A>G (rs1799889 4G/5G polimorfizmi)
<i>TAFI</i>	c.505G>A (rs3742264) c.*310T>A (rs1087)
<i>THBD</i>	c.1418C>T (rs1042579) c.457T>G
<i>TIMP-3</i>	c.-1604C>T (5749511) c.-914A>G (rs2234921)
<i>TIMP-4</i>	c.*387G>A (rs17035945)

Tablo 2-14: Farklı moleküler teknikler kullanarak TGK etiyolojisi ile ilişkilendirilmeye çalışılmış genler ve polimorfizmleri

<i>ACE</i>	I/D (rs1799752)
<i>CTLA4</i>	+49A>G (rs232775)
<i>DICER</i>	rs3742330
<i>DROSHA</i>	rs10719
<i>eNOS</i>	894G>T (rs1799983)
<i>F13A1</i>	103G>T (rs5985) 614A>T (rs3024477) 1694C>T (rs5982)
<i>F2</i>	20210G>A (rs1799963)
<i>F5</i>	rs6025
<i>FOXP3</i>	-924A>G (rs2232365)
<i>FOXP4</i>	-3279C>A (rs3761548)
<i>FOXP5</i>	delATT (rs5902434)
<i>FOXP6</i>	rs2294021
<i>IL-1β</i>	-511T>C (rs16944)
<i>IL-10</i>	-819C>T (rs1800871) 2195A>G (rs1518111)
<i>IL-17</i>	-197G>A (rs2275913)
<i>IL-18</i>	137G>C (rs187238)
<i>IL-6</i>	-634C>G (rs1800796)
<i>mir125a</i>	rs12976445 rs41275794
<i>mir27a</i>	rs895819
<i>mir423</i>	rs6505162
<i>mir449b</i>	rs10061133
<i>MMP2</i>	-735C>T (rs2285053)
<i>MMP9</i>	-1562C>T (rs34016235)
<i>MTHFR</i>	677C>T (rs1801133) 1298A>C (rs1801131)
<i>PAI-1</i>	-844G>A (rs2227631) 11053T>G (rs7242)
<i>PGR</i>	Val660Leu (rs1042838)

<i>PKR2</i>	rs6053283
<i>RAN</i>	rs14035
<i>SELP</i>	2123C>G (rs6127)
<i>SERPINC1</i>	786G>A (rs2227589)
<i>TGF-B1</i>	915G>C (rs1800471)
<i>TNF-α</i>	-863C>A (rs1800630)
<i>TP53</i>	Arg72Pro (rs1042522)
<i>VEGFA</i>	-2549 I/D (rs35569394) -1154G>A (rs1570360)
<i>VEGFR-2</i>	1719A>T (rs1870377)
<i>XPO5</i>	rs11077

2.7. TGK Etiyolojisinin Aydınlatılmasında YND Teknolojisi ile Yapılan Çalışmalar

Multifaktöriyel hastalıklarda, genetik risk faktörlerinin tespiti için mikrosatellit belirteçler kullanılarak yapılan genom-boyu çalışmalarda 15-30 nükleotidli kısa tekrarlı polimorfizmler kullanılmaktadır. 44 TGK olgusu ve 430 mikrosatellit ile yapılan bir çalışmada fenotip ile ilişkili olabilecek 3 farklı belirteç (6q27, 9q33.1 ve Xp22.11) ve 0bu bölgelerde aktif fonksiyonu olan 6 gen (*MLLT4*, *KIF25*, *TNFSF15*, *TNFSF8*, *EIF1AX* ve *RPS6KA3*) tespit edilmiştir (210).

Bir başka çalışmada, kız kardeşinde de TGK öyküsü olan 30 olgu, 25 kız kardeş ve 9 erkek kardeşin dahil edildiği bir genom-boyu ilişkilendirme çalışmasında 4 kromozom bölgesindeki 4 gene ait 4 farklı varyant (*FHIT* (3p14.2, rs10514716), *FAM154A/LOC 158297* (9p22.1, rs10511668), *PDE2A* (11q13.4, rs341048) ve *GRIK2* (6q16.3, rs10485275)) tespit edilmiştir. *FHIT* gen varyantları sıklıkla intestinal kanserlerde tespit edilmekle birlikte, apoptotik yollarda aktiftir ve trofoblast invazyonunda görevli olduğu düşünülmektedir. *PDE2A* geni beyin, kalp, plasenta, akciğer, iskelet kası, böbrekler ve pankreasta cAMP-cGMP yollarında görevli protein anlatımı yapar. *GRIK2* geni iyonotropik glutamat reseptörlerini kodlarken otizm ve Huntington hastalığı ile ilişkilendirilmiş ve şizofrenide anlatımının azaldığı gösterilmiştir (211).

Gebelik kaybı veya primer kadın ve erkek infertilitesi ile ilişkili olabilecek immün yanıt, koagülasyon, metabolizma, anjiyogenez, endokrin sistem ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi ile ilgili genlerden oluşan panel testi ile yapılmış bir çalışmada 187 gende 472 farklı varyant bulunmuştur (212). Başka bir çalışmada, kadın ve erkek infertilitesi ile ilişkili literatürde belirtilmiş 87 genden oluşan panel testi ile 118 bireyden oluşan heterojen bir olgu grubu çalışılmış, bu panelin primer infertilite olguları

için tanı koydurucu, fakat TKG etiyojisinin açıklanmasında yetersiz kaldığı bildirilmiştir (213).

Transkriptomik incelemelerde en çok tercih edilen yöntem, mikroarray temelli gen ekspresyon çalışmalarıdır. İnsan endometriyumunda yapılan transkriptomik çalışmaların ana araştırma konuları; siklik fazlar arasındaki gen ifadesi değişimleri ve ovaryan stimülasyonların etkisi ile fertil ve infertil olgular arasındaki endometriyal reseptivitenin karşılaştırılmasıdır (214). Endometriyumun reseptif olduğu dönemde ekspresyonu artmış olan genlerin implantasyon aşamasında etkin olduğu aşikardır. 2012 yılında yapılmış olan iki ayrı çalışmada hücre döngüsü ve farklılaşması, adezyon, apoptoz, hücre içi sinyal iletimi ve mobilitesi, immünite ve embriyonik morfogenez ile ilişkili genlerde ekspresyon değişkenliği tespit edilmiştir (215, 216). TİK olgu grubunda yapılan bir transkriptomik çalışmada hücre döngüsü, hücrel adezyon yolları ve Wnt sinyal yolağında etkin 313 genin ekspresyonunun değiştiği, bunların %92'sinin azaldığı, %8'inin arttığı ve ekspresivitesi azalmış olan genlerin %8'inin de östrojen aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir (217). 2016 yılında yapılan benzer bir çalışmada TİK olgu grubu ile kontrollerin luteal faz ortasında endometriyal ekspresyonları karşılaştırıldığında 303 gende farklı örüntü tespit edilmiştir (218). Makak maymunlarının sekretuar fazda endometriyal gen anlatımlarının incelendiği bir başka çalışmada, 108 genin progesteron aktivitesi ile anlatımlarının değiştiği, progesteronun bu süreçteki etkin temel hormon olduğu ve bu genlerin embriyo implantasyonunda etkin oldukları gösterilmiştir (219).

Maternal gen varyantlarının araştırıldığı, Avrupa ve Güney Amerika kökenli TKG olgu grubundan 49 dişi bireyde tüm ekzom dizileme yöntemi kullanılarak yapılmış bir çalışma bulunmaktadır. Burada 234 gen değerlendirilmiş ve 22 gende 27 varyant bulunmuştur (220).

YND tekniği kullanılarak abortus dokusu ile anne ve babanın birlikte incelendiği (üçlü tüm ekzom dizileme) bir çalışmada, embriyolojik ve/veya intrauterin gelişme basamaklarını etkileyerek fetal letal etkili patojenik gen varyantlarının fetusta homozigot veya birleşik heterozigot, anne ve babada ise heterozigot olarak bulunacağı öngörüsü ile araştırılmıştır. TKG öykülü dört ailede yürütülen çalışmada *DYNC2H1* ve *ALOX15* genlerinde gebelik kaybına yol açabilecek varyantlar saptanmıştır (221). Ayrıca fetal ultrason izlemlerinde veya ileri gebelik haftalarındaki kayıpların

postmortem fizik muayenelerinde dismorfik bulguların varlığı, ön tanıda bir sendromu düşündürdüğünde ilişkili olabilecek genin Sanger dizileme ile araştırılması mümkündür. Nonspesifik bulgular söz konusu olduğunda ise üçlü TED tanı koydurucu olabilmektedir. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada beyin ve böbrek gelişiminde etkin *KIF14* geninde bir mutasyon bulunmuştur (220). YND tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar ile saptanmış etiyolojide etkili olabilecek aday genler literatürden derlenerek Tablo 2-15'te gösterilmiştir (181, 220-248).

Tablo 2-15: TKG etiyolojisini açıklamaya YND teknikleri ile saptanmış yönelik aday genler

Gen	Genomik lokasyon	Genin işlevi veya ilişkili olduğu fenotip	Genin MIM numarası
<i>ADAMTS1</i>	21q21.3	Ekstrasellüler matriks düzenlenmesi	605174 (218)
<i>ALOX15</i>	17p13.2	Anti-inflamatuvar, membran düzenlenmesi, kanser metastazı	152392 (219)
<i>AMN</i>	14q32.32	Metabolizma	605799 (218)
<i>ATF4</i>	22q13.1	Hücre çoğalması ve apoptozu	604064 (179)
<i>AURKB</i>	17p13.1	İğ iplikçiklerinin oluşumunun kontrolü	604970 (221)
<i>BMP7</i>	20q13.31	Hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve apoptozu	112267 (218)
<i>C3</i>	19p13.3	Kompleman sistemi	120700 (179, 222)
<i>C4</i>	6p21.33	Kompleman sistemi	120810 (222)
<i>C4BP</i>		Kompleman sistemi	120830 (222)
<i>C6orf221</i>	6q13	Tekrarlayan mol gebelik	611687 (224)
<i>CD74</i>	1p32	İmmün fonksiyonların düzenlenmesi	142790 (179)
<i>CDH1</i>	16q22.1	Kadherin-1, hücre adezyonu	192090 (218)
<i>CEP55</i>	10q23.33	Çok nükleuslu nöronlar, anhidramniyos, renal displazi, serebellar hipoplazi, hidranensefali, siliyopati	610000 (225)
<i>CHD11</i>	16q21	Kadherin-11, hücre adezyonu	600023 (218)
<i>CHRNA1</i>	2q31.1	Multipl pterygium ve fetal akinezi sendromu	100690 (226)
<i>COL6A3</i>	2q37.3	Ekstrasellüler matriks düzenlenmesi	120250 (218)
<i>CR1</i>	1q32.2	Kompleman komponent reseptörü-1; immün fonksiyonun düzenlenmesi	120620 (218)
<i>CTSA</i>	20q13.12	Galaktosialidoz	613111 (227)
<i>DAF (CD55)</i>	1q32.2	Kompleman sistemi	125240 (222)
<i>DF(CFD)</i>	19p13.3	Kompleman sistemi	134350 (222)
<i>DNAH14</i>	1q42.12	Mikrotübül ilişkili protein-motor kompleksi	603341 (227)
<i>DNMT3L</i>	21q22.3	Olgunlaşmanın duraklaması	606588 (228)
<i>DYNC2H1</i>	11q22.3	Siliya oluşumu ve düzenlenmesi; Kısa kaburgalı torasik displazi-3, polidaktilili veya polidaktilisiz	603297 (219, 229)
<i>ECEL1</i>	2q37.1	Artrogripozis multipleks konjenita	605896 (230)

<i>EGR1</i>	5p31.2	Trofoblast invazyonu, proliferasyonu ve iletişimi	128990 (179)
<i>EPAS1</i>	2q21	Anjiyogenez	603349 (218)
<i>F5</i>	1q24.2	Koagülasyon faktörü-5	612309 (218)
<i>FGA</i>	4q31.3	Fibrinojen A alfa polipeptiti; koagülasyon kaskadı	134820 (218)
<i>FGFR2</i>	10q26.13	Hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve apoptozu	176943 (218)
<i>FLT1</i>	13q12.3	FMS ilişkili tirozin kinaz-1; anjiyogenez	165070 (218)
<i>FOXP3</i>	Xp11.23	Regülatör T hücrelerin gelişimi ve devamlılığı, IPEX sendromu	300292 (231)
<i>FZD6</i>	8q22.3	Wnt ailesi üyesi	603409 (227)
<i>GALNT14</i>	2p23.1	Glikoziltransferaz	608225 (227)
<i>GBE1</i>	3p12.2	Gilkojen depo hastalığı tip-IV	607839 (232)
<i>GLE1</i>	9q34.11	Letal konjenital kontraktür sendromu tip-1	603371 (229)
<i>GOLPH3</i>	5p13.3	Golgi fosfoproteini-3	612207 (233)
<i>GPX4</i>	19p13.3	İmmün fonksiyonların düzenlenmesi	138322 (179)
<i>GUSB</i>	7q11.21	Mukopolisakkaridoz tip-VII	611499 (227)
<i>H19</i>	11p15.5	H19, maternal imprintinge uğrayan, anlatımı olmayan transkript-epigenetik düzenlenme	103280 (234)
<i>HERG</i>	7q36.1	Polimorfik ventriküler taşikardi	152427 (235)
<i>ICAM1</i>	19p13.2	Adezyon	147840 (179)
<i>IDO2</i>	8p11.21	İmmün fonksiyonların düzenlenmesi	612129 (218)
<i>IFT122</i>	3q21.3-22	Kraniyoektodermal displazi tip-1	606045 (236)
<i>KHDC3L</i>	6q13	Tekrarlayan molar gebelik	611687 (237)
<i>KIF14</i>	1q32.1	Siliyopati, Meckel Sendromu tip-12	611279 (238)
<i>LAPTM5</i>	1p35.2	Hematopoez	601476 (179)
<i>LIFR</i>	5p13.1	Lösemi inhibitör faktör reseptörü; hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve apoptozu	151443 (218)
<i>LIT1</i>	11p15.5	Epigenetik düzenlenme	604115 (234)
<i>MAPK3</i>	16p11.2	Trofoblast invazyonu, proliferasyonu ve iletişimi	601795 (179)
<i>MMP10</i>	11q22.2	Matriks metalloproteinaz-10, ekstrasellüler yeniden düzenlenme	185260 (218)
<i>MMP9</i>	20q13.12	Matriks metalloproteinaz-9, ekstrasellüler yeniden düzenlenme	120361 (218)
<i>MSH4</i>	1p31.1	Olgunlaşmanın duraklaması	602105 (228)
<i>MuSK</i>	9q31.3	Fetal akinezi deformasyon sendromu	601296 (239)
<i>MYOM1</i>	18p11.31	Miyomesin-1, çizgili kas yapısının düzenlenmesi	603508 (227)
<i>NCOA1</i>	2p23.3	Nükleer steroid reseptörlerin aktivasyonu	602691 (218)
<i>NEB</i>	2q23.3	Nemalin miyopatisi tip-2	161650 (227)
<i>NLRP2</i>	19q13.42	Tekrarlayan molar gebelik	609364 (223)
<i>NLRP5</i>	19q13.43	Tekrarlayan molar gebelik	609658 (239)
<i>NLRP7</i>	19q13.42	Tekrarlayan molar gebelik	609661(241)
<i>NOP14</i>	4p16.3	TGK	611526 (242)
<i>PADI6</i>	1p36.13	Tekrarlayan erken embriyonik	610363 (246)

		duraklama	
<i>PDLIM1</i>	10q23.33	Trofoblast invazyonu, proliferasyonu ve iletişimi	605900 (179)
<i>PDZD2</i>	5p13.3	PDZ domaini içeren tip-2	610697 (233)
<i>PHLDA2</i>	11p15.4	Plasental büyüme	602131 (179)
<i>PIGC</i>	1q24.3	Glikozilfosfatidilinositol sentezi	601730 (227)
<i>RYS1</i>	19q13.2	King-Denborough sendromu, Konjenital uniform nöromusküler hastalık tip-1	180901 (229, 243)
<i>SERPING1</i>	11q12.1	Koagülasyon yolağı	606860 (222)
<i>SLC16A2</i>	Xq13.2	Metabolizma	300095 (179)
<i>SNRPN</i>	15q11.2	Epigenetik düzenlenme	182279 (234)
<i>STIL</i>	1p33	Sitokinez-sentriolar duplikasyon, OR kalıtmı fetal mikrosefali tip-7	181590 (244)
<i>SYCP3</i>	15q11.2	Olgunlaşmanın duraklaması	604759 (228)
<i>THBD</i>	20p11.21	Trombomodulin, koagülasyon kaskadı	188040 (218)
<i>THSD1</i>	13q14.3	Adezyon glikoproteini	616821 (227)
<i>TLE6</i>	19p13.3	Zigot oluşumunda hata	612399 (218)
<i>TLR3</i>	4q35.1	TOLL-benzeri reseptör-3; İmmün fonksiyonların düzenlenmesi	603029 (238)
<i>TNC</i>	9q33.1	Ekstrasellüler matriks düzenlenmesi	187380 (218)
<i>TRAF3IP1</i>	2q37.3	İmmün fonksiyonun düzenlenmesi	607380 (218)
<i>TRO</i>	Xp11.21	Trofinin, hücre adezyonu, trofoblast-endometriyum etkileşimi	300132 (218)
<i>UBN1</i>	16p13.3	Çoğalma	609771 (227)
<i>WNT6</i>	2q35	Kanatsız tip MMTV integrasyon bölgesi ailesi üyesi-6	604663 (245)

2.8. İnfertilite Etiyolojisinin Araştırılmasında YND Teknolojisinin Kullanımı ve Etkileri

İnfertilite başta olmak üzere üreme fonksiyonlarında görülen sorunların etiyolojisinde tek gen defektleri veya genetik bozuklukların da bulunduğu bilinmektedir. Bu heterojen grubun aydınlatılmasında YND kullanımı her geçen gün artmaktadır. Tablo 2-16'da erkek faktörü ile ilişkilendirilmiş genler ve görevleri belirtilmiştir (213).

Tablo 2-16: YND tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda saptanan erkek faktörü ile ilişkili genler ve fenotipik bulguları (Patel (213)'den değiştirilerek)

<i>AR</i>	Androjen insensitivesi, hipospadias
<i>AURKC</i>	Spermatogenez defekti tip-5
<i>CATSPER1</i>	Spermatogenez defekti tip-7
<i>CATSPER2</i>	Sağırılık ve infertilite sendromu
<i>CFTR</i>	Vas deferens agenezisi
<i>DAZL</i>	Spermatogenez defekti
<i>DDX25</i>	Spermatogenez defekti
<i>DPY19L2</i>	Spermatogenez defekti tip-9
<i>FSHB</i>	Hipogonadotropik hipogonadizm tip-24

<i>FSHR</i>	Spermatogenezde etkin, erkek infertilitesi
<i>LHB</i>	Hipogonadotropik hipogonadizm tip-23
<i>LHCGR</i>	Leydig hücre hipoplazisi, erkeklerde erken puberte
<i>NR5A1</i>	Spermatogenez defekti tip-8, cinsel gelişim bozukluğu
<i>PRDM9</i>	Spermatogenezde mayoz bölünme hatası
<i>PRM1</i>	Spermatogenez defekti
<i>SRY</i>	Cinsel gelişim bozukluğu
<i>USP26</i>	Spermatogenez defekti
<i>USP9Y</i>	Spermatogenez defekti

Heterojen bir grup olan kadın infertilitesi de günümüzde YND teknolojisi ile araştırılmakta, yeni genler ve yolaklar bulunmaya çalışılmaktadır. Prematür over yetmezliği (POY), ovaryan disgenezi, oosit olgunlaşma defekti (OOMD) ve PKOS ile ilişkili genlerin ve görevleri literatürden derlenerek Tablo 2-17’de gösterilmiştir (213, 249-253).

Tablo 2-17: YND ile saptanan POY, ovaryan disgenezi, OOMD ve PKOS ile ilişkilendirilmiş genler, fenotipik bulguları ve görevleri

<i>AMH</i>	Primer/sekonder amenore
<i>AMHR2</i>	POY
<i>BMP15</i>	Gecikmiş puberte, primer/sekonder amenore, küçük overler, folikül yokluğu, hipoplastik uterus, hirsutizm, pubik ve aksiller kıllanma yokluğu
<i>CAPN10</i>	PKOS
<i>CYP11A1</i>	Steroidogenez
<i>CYP17A1</i>	Steroidogenez
<i>CYP19A1</i>	Steroidogenez
<i>DAZL</i>	Düşük over rezervi
<i>DIAPH2</i>	Sekonder amenore, POY2A
<i>EIF2B2</i>	Ökaryotik translasyon, POY
<i>EIF2B3</i>	Ökaryotik translasyon, POY
<i>EIF4ENIF1</i>	Sekonder amenore - mRNA translasyonu
<i>ERCC6</i>	Sekonder amenore - DNA tamiri
<i>FIGLA</i>	Küçük/atrezik overler, foliküllerin yokluğu, atrofik endometriyum
<i>FMR1</i>	Frajil X sendromu, pre-mutasyon taşıyıcılarında artmış POY riski
<i>FOXL2</i>	Hipoplastik uterus/overler, folikül yokluğu, sekonder amenore
<i>FSHB</i>	Primer amenore, infertilite
<i>FSHR</i>	Osteoporoz, primer amenore
<i>GALT</i>	Galaktoz fosfat transferaz, galaktozemi
<i>GDF9</i>	Primer amenore, meme gelişiminin olmaması, pubik kıllanmanın gecikmesi
<i>GNAS</i>	McCune-Albright sendromu, ACTH bağımsız makronodüler adrenal hiperplazi

<i>GNRH1</i>	Normosmik hipogonadotropik hipogonadizm
<i>GNRHR</i>	Hipogonadotropik hipogonadizm
<i>HFM1</i>	Amenore - homolog rekombinasyon ve mayozda görevli
<i>INHA</i>	Primer amenore
<i>INS</i>	PKOS
<i>INSR</i>	PKOS
<i>IRS1</i>	Pre-ovulatuvar folikül gelişimi
<i>IRS2</i>	Pre-ovulatuvar folikül gelişimi
<i>KISS1</i>	Hipogonadotropik hipogonadizm
<i>KISS1R</i>	Hipogonadotropik hipogonadizm
<i>LHB</i>	İnfertilite
<i>LHCGR</i>	Primer amenore
<i>MCM8</i>	Telarşın yokluğu, primer amenore, overlerin yokluğu, hipergonadotropik over yetmezliği - DNA tamiri
<i>MCM9</i>	Kısa boy, meme gelişiminin az olması, overlerin yokluğu, kemik yaşı geriliği, pubik ve aksiller kıllanma azlığı, primer amenore - DNA tamiri
<i>MSH5</i>	Oligomenore, atrofik overler, folikül yokluğu
<i>NANOS3</i>	Primer amenore
<i>NOBOX</i>	Sekonder amenore ve folikül yokluğu
<i>NR5A1</i>	Düzensiz ve anovulatuvar döngüler, sekonder amenore, disgenetik gonadlar ve germ hücrelerinin yokluğu
<i>NUP107</i>	Overlerin yokluğu, küçük uterus, spontan puberte yokluğu - DNA tamiri
<i>PATL2</i>	Germinal vezikül aşamasında oosit olgunlaşmasının duraklaması, anormal 1. polar cisim, erken embriyonik duraklama - OOMD
<i>PGRMC1</i>	Hipergonadotropik hipogonadizm, amenore
<i>POF1B</i>	POY2B
<i>POLG</i>	mtDNA polimeraz gama
<i>POU5F1</i>	Folikülsüz küçük overler
<i>PSMC3IP</i>	Memede gelişim geriliği, pubik kıllanma yokluğu, hipoplastik uterus, primer amenore
<i>SGO2</i>	OY
<i>SOHLH1</i>	Kısa boy, telarş yokluğu, primer amenore, hipoplastik overler veya yokluğu, küçük uterus, kemik yaşı geriliği - mRNA transkripsiyonu
<i>SPIDR</i>	Hipoplastik overler/over yokluğu
<i>STAG3</i>	Primer amenore ve ovaryan disgenezi - homolog rekombinasyon ve mayozda görevli
<i>SYCE1</i>	Primer amenore, küçük uterus ve overler, foliküllerin yokluğu - homolog rekombinasyon ve mayozda görevli
<i>TACR3</i>	Normosmik hipogonadotropik hipogonadizm
<i>TGFBR3</i>	POY
<i>TUBB8</i>	Metafaz I veya II'de oosit duraklaması, anormal iğ iplikleri - OOMD
<i>WT1</i>	Sekonder amenore

ZP1	Zona pellusida yokluğu – OOMD
ZP2	Anormal zona pellusida - OOMD
ZP3	Oosit dejenerasyonu, zona pellusida yokluğu - OOMD

2.9. Tıbbi Genetik Alanında Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri

2.9.1. Sitogenetik Yöntemler

DNA molekülünün bazik yapıdaki histon proteinleri (H1, H2A, H2B, H3 ve H4) ve diğer proteinlere bağlanarak ve kendi içinde paketlenerek oluşturduğu kromozomlar, kalıtımı sağlayan temel genetik öğelerdir. İnsanlarda 22 çift otomozomal ve bir çift eşeyssel kromozom olmak üzere 46 adet kromozom bulunmaktadır.

Kromozom analizlerinde en çok periferik kan lenfositleri kullanılır, kemik iliği ve deri fibroblast hücrelerinden de yararlanılabilir. Prenatal tanı amacıyla yapılan çalışmalarda ise gebelik haftasına göre koryon villuslar, amniyotik sıvı hücreleri ya da kordon kanı hücreleri incelenmektedir. Hızlı tanı gerektiren prenatal olgularda koryon villuslardaki sitotrofoblast hücreleri ile yapılan ‘direkt preparasyon tekniği’ (DP) önemli bir kolaylık sağlar. Fakat elde edilen kromozomlar 300-400 bant aralığında olduğundan tanı kesinliği için hücre kültürü sonrası çalışmaların beklenmesi gerekmektedir. Karyotip incelemelerinde, hücreler mitoz bölünmeler esnasında prometafaz veya metafaz safhasında iken durdurulur ve farklı bantlama yöntemleri ile görünür hale getirilir (~550-600 bant). Analizler mikroskop aracılığıyla insan gözü ile yapıldığından tanı subjektif olmaktadır. İnceleme öncesi hücre kültürlerine bölünmeyi uyaran fitohemagglütinin (PHA) konarak, 48-72 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Kolşisin eklenmesi ile iğ iplikçiklerinin oluşumu engellenerek bölünmekte olan hücrelerin metafazda durmaları sağlanır ve hipotonik çözelti ile hücreler şişirilir (0,075 M KCl solüsyonu). Fiksasyon aşaması (alkol ve asetik asit uygulaması) sonrasında oluşturulan süspansiyonlar mikroskopta incelenmek üzere lamlara damlatılır ve kurutulur. Ardından mikroskop aracılığı ile incelenir.

Bantlama teknikleri farklı bölgelerin incelenmesini sağlar, rutin karyotiplemede en sık kullanılan yöntem G-bantlamadır. Açık renkli bantlar, aktif genlerin bulunduğu G-C bazları bakımından zengin ökromatin bölgeleri gösterirken, koyu renkli bantlar ile aktif genler açısından fakir, A-T bazlarınca zengin olan heterokromatin bölgeler işaretlenmektedir. C-bantlama tekniği heterokromatin bölgelerin incelenmesi ve markır kromozomlarda ökromatin bölge olup olmadığının araştırılmasında, NOR boyama

yöntemi akrosentrik kromozomların boyanmasında kullanılır. Q-bantlamada kuinakrin boyası ile A-T açısından zengin sentromerler, 1, 9 ve 16. kromozomların perisentromerik alanları boyanır.

‘FISH’ (Floresan in situ hibridizasyon) çalışmaları, en sık karyotip çalışmalarına ek olarak ya da mikrolelesyon/duplikasyon sendromları gibi ön tanısı bulunan hastalıkların tanısında kullanılmaktadır; translokasyonlar, inversiyonlar ve markır kromozomların incelenmesine katkı sağlar. Ayrıca hematolojik kanserlerin incelenmesi, enfeksiyon ajanlarının taranması, gen ekspresyon değerlendirmelerinde de kullanılmaktadır. Bu yöntemde hedeflenen DNA bölgeleri, spesifik problemlerin kromozoma veya interfaz hücrelerine hibridize olması sonrasında mikroskop aracılığıyla incelenmektedir. Lokus spesifik, tekrarlayan dizilere özgü ve kromozomun tümünü boyayan problemler olmak üzere üç tip prob bulunmaktadır.

‘Array-CGH’ tekniği, mikroarray tekniğinin karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi temelinde birleştiği, bir referans genom varlığında incelenen genomdaki kopya sayısı değişikliklerini saptayan bir tekniktir. Giderek konvansiyonel sitogenetik yöntemlerin yerini alsa da dengeli kromozomal yeniden düzenlenmeler olan translokasyonların incelenmesinde eksik kalmaktadır.

2.9.2. Moleküler Genetik Yöntemler

Sanger dizileme yöntemi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) temeline dayanır, ortamdaki deoksi nükleotidlerin yanında floresan boya ile işaretlenmiş dideoksi nükleotidler (ddNTP) bulunur. İncelenen örneğe ait DNA dizisinin eşleniği olarak devam eden reaksiyonlarda diziye eklendiklerinde o dizi sonlanır ve her birinin 3’ ucunda belli bir floresanlı ddNTP olan farklı boylardaki diziler oluşur. Kapiller jel elektroforezi sistemi ile çalışan bir dizileme cihazı yardımıyla bu diziler göç ettirilerek boylarına göre ayrılır ve floresan ışımasına göre dizi sonundaki nükleotid tespit edilir. Elde edilen veriler bilgisayar programları aracılığıyla değerlendirilir. Bu yöntem ile 600 bp’lik gen bölgeleri (6 bazdan 1.000 baza kadar) dizilenip okunabilir. Bu tekniğin bazı zorlukları da bulunmaktadır; uygulanması ve yorumlanması ciddi bir uzmanlık gerektirir ve nispeten uzun bir sürede sonuç elde edilir.

İlk kez 1992 yılında Higuchi ve arkadaşları tarafından kullanılan ‘Gerçek Zamanlı PZR’ tekniği (qPCR), PZR işlemine floresan özelliği eklenerek reaksiyona eş zamanlı ışıma verilerinin alınması ve bu verilerden amplifikasyon eğrilerinin

oluşturulması temeline dayanır. Günümüzde DNA ve RNA kantitasyonu, varyantların tespiti, viral, bakteriyel veya mikroorganizmal yüklerin gösterilmesi, gen dozaj değişimlerinin araştırılması, kanser çalışmalarında minimal rezidü hastalık ve translokasyon ürünlerinin tespiti gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Genel metot (çift iplikli DNA'ya bağlanan floresan boyalar - etidyum bromür, tiazol orange, oksazol yellow ve sybr green) ve dizi spesifik metot (tasarlanmış flofor işaretli oligonükleotid içeren proplar - hidroliz probları/Taqman prob, hibridizasyon probları, FRET ve moleküler fener/beacon) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Elde edilen veriler ile yapılan amplifikasyon grafiği, ekspansiyonel faz (her döngüde PZR ürünlerinin iki katına çıkması) ve plato fazı (reaksiyonların azalmaya başladığı faz) olmak üzere iki basamaktan oluşur. Ana hat (baseline), eşik değer (treshhold) ve Ct değerleri göz önüne alınarak analiz yapılır.

1996 yılında kullanıma giren ve nispeten yeni bir yöntem olan 'Pirodizileme', polimeraz aktivitesi ile pirofosfatın (PPi) ortaya çıkması, ATP sulfurilaz ile PPi'nin ATP'ye dönüşümü, lusiferaz enzimi ile birlikte ATP lusiferin → oksilusiferin reaksiyonunu gerçekleştirmesi ve ışık oluşması temeline dayanır. Işık şiddeti ATP miktarı ile orantılı olup buna göre nükleotidler belirlenir ve bir kamera tarafından tespit edilir.

'Multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu' (MLPA) tekniği genin bir kısmını ya da birkaç geni içeren kopya sayısı değişikliklerinin (büyük delesyon/duplikasyonların) saptanmasında kullanılan çoklu PZR esasına dayanan bir yöntemdir. DNA denatürasyonu, hedef DNA bölgelerine spesifik propların ilgili bölgelere hibridizasyonu, iki parça halinde olan propların birbiri ile ligasyonu ve PZR ile bu propların çoğaltılması aşamalarından oluşur. Elde edilen ürünler kapiller elektroforez sistemi ile çalışan cihazlar aracılığıyla yürütülür ve bilgisayar programları vasıtasıyla analiz edilirler. Çalışmanın esas koşullarından biri bilinen bir sağlık problemi olmayan bireylere ait DNA örneklerini referans olarak çalışılmasıdır. Referans pik boyutlarına göre azalma veya pikin olmaması delesyonu, artma ise duplikasyonu gösterir.

2.9.2.1. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme teknolojileri, genetik araştırma ve tanı protokollerinin ayrılmaz bir parçası haline gelmektedir. Nispeten kısa bir sürede büyük miktarlarda dizi

verisi üretebilmesi geniş bir yelpazedeki genetik analiz uygulamalarını mümkün kılmakta; araştırma, klinik ve biyoteknoloji alanındaki gelişmeleri hızlandırmaya yardımcı olmaktadır. YND teknolojisi, büyük ve çok ekzonlu genlerin (*DMD* gibi), non-allel heterojenite gözlenen hastalık gruplarının, bireyin tüm ekzomunun, transkriptomunun ya da genomunun dizilenmesine ve bir testte bir çok hastanın birlikte analizine olanak sağladığından moleküler analizlerde devrimsel bir aşama sağlamıştır.

YND çalışmalarında ilk aşamada DNA rastgele olarak küçük fragmanlara ayrılır ve kütüphane hazırlığına geçilir. Dizileme cihazı tarafından fragman tanıma için platforma spesifik sekansları içeren adaptörler, her bir örneğe ait kütüphanenin fragmanlarına eklenir (ligasyon, PZR veya etiketleme ile) ve fragmanların platformun akış hücrelerine bağlanmasını sağlar. Her bir YND sağlayıcısı, bu amaç için belirli bir dizi kullanır.

Numune indeksleri, aynı akış hücresinde birden fazla farklı numunenin birlikte sıralanmasını sağlar. Her bir örnek indeksi, tipik olarak 6 ila 10 baz içererek kütüphaneye özgüdür ve veri analizi sırasında ayrı dizilerin doğru numune adına çoğaltılması için kullanılır. Bağdaştırıcılar, birleştirilen kütüphane sayısına ve istenen doğruluk düzeyine bağlı olarak tekli veya çiftli örnek dizinler içerebilir.

Ekzom kelimesi bir genomun tüm ekzonları anlamına gelmektedir (exome = all exons of a genome). Bir Tüm Ekzom Dizileme çalışmasında 200.000'den fazla ekzon dizilenmektedir. TED ile hastalıklarla ilişkili gen mutasyonlarının ~%85'inin tespit edilebileceği bildirilmektedir (254). Tüm Genom Dizileme (TGD) ile de ifade edilmeyen intronik bölgelerin, kopya sayısı değişikliklerinin ve insersiyon/delesyonların incelenmesi mümkün olmakla birlikte, maliyetin yüksekliği ve elde edilen verinin büyüklüğü şu anda çalışmaların büyük oranda TED ile yapılmasına yol açmaktadır. Yeni nesil dizileme teknolojisi ile ilgili bilgiler tarafımızca oluşturularak Tablo 2-18-Tablo 2-20'de, moleküler genetik tekniklerin karşılaştırması Tablo 2-21'de verilmiştir (255).

Tablo 2-18: YND teknolojisi terminolojisi

Okuma (read)	Dizileme cihazından gelen ham dizi
Çoklu okumalar / okuma sayısı	Aynı dizinin birden fazla kez okunması
İşaretleme (tag)	Fragmanlara tanımlayabilmek amacıyla eklenmiş diziler
Paired-end dizileme	Fragmanın her iki uçtan da okunması, referans genom ile yapılan çalışmalarda kullanılır

Mate pair dizileme	Büyük fragmanların ortası okunmadan iki uçtaki son kısımların okunması, genom tamamlama ya da referans genom olmadan <i>de novo</i> dizilemede kullanılır
Hizalama (alignment)	Referans diziye göre hizalama
Assembly	İlk kez dizilenen <i>de novo</i> genomların keşfinde kullanılır ve yüksek kapsama gerektirir
Referans etkisi (bias)	Okumada referans genom ile uyuşmayan nükleotid bulunması
Kapsama	Okumada kapsanmış olan nükleotidler
Dizi derinliği/derinlik	Belli bir pozisyonu kapsayan okuma sayısı, kapsam içerisindeki tüm nükleotidlerin sayısı
IGV	Bütünleştirici genomik görüntüleyici, YND okuma verisinin görüntülenmesini sağlar
Stampy	Illumina platformunda dizilerin hizalanmasında kullanılan istatistiksel yöntem
BWA	Burrows-Wheeler hizalaması, kısa okumalara uygundur ve kısa in/del'leri gösterebilir

Tablo 2-19: Tüm ekzom dizileme işlem akışı

DNA'nın küçük fragmanlara ayrılması (~40 ila 500 bp arası)
Kütüphanenin hazırlanması (fragman uçlarına adaptör)
Ekzom yakalanması, amplifikasyon (zenginleştirme)
YND platformuna aktarım, dizileme
Kalite değerlendirme (pre-alignment/hizalama öncesi: kırpma, filtreleme)
Dizi parçalarının hizalanması (referans genom ile)
Varyant tespiti (SNP, in/del, CNV, SV şeklindeki referans diziden farklı okumaların bulunması)
Anotasyon (açıklama, isimlendirme)
Filtreleme/Görselleştirme
Veri analizi

Tablo 2-20: Ekzom dizileme ile elde edilen veri dosyası türleri

Raw dizileme verisi	Elde edilen ham veri
BCL (Binary base call)	Illumina YND cihazları tarafından çevrilen ham veri
FASTQ	BCL'den çevrilmiş harf temeline dayanan format
SAM (Sequence Alignment Map)	Hizalama programlarının çoğunun veriyi verdiği format
BAM (Binary Alignment Map)	SAM dosya tipinin BGZF algoritması ile sıkıştırılmış hali
VCF (Variant call format)	Okunabilir, excel benzeri tablo formatı, final çıktı, sadece referansa göre farkları içerir

Tablo 2-21: Tanısal amaçlı kullanılan dizileme tekniklerinin karşılaştırılması (Green (255)'den değiştirilerek)

Özellik	Tek Gen Dizileme	YND Temelli Panel Dizileme	Tüm Ekzom Dizileme	Tüm Genom Dizileme
İlgilendiği genomik bölge	1 gen	Fenotip ile ilişkilendirilmiş gen grubu	~19.000 gen	Tüm genom

Altyapı	Standart protokol	Tanı labları için uygun-altyapı gerekli	Altyapı ve biyoinformatik ekibi gerekli	Altyapı ve biyoinformatik ekibi gerekli
VUS tespiti	Olası	Olası	Evet	Evet
Fenotip ile ilişkisiz varyant bulma (yan bulgu)	Hayır	Panelin içeriğindeki genlerin kapsamına bağlı	Olası	Olası
Çalışma süresi (optimum)	~2-4 hafta	~2-3 ay	~4 ay	>4 ay
Hedeflenen varyant tipleri ve fenotipler	Tek gen hastalıkları, tekrar dizisi artışları, gen içi delesyonlar	Genetik heterojenitenin olduğu hastalık grupları, poligenik fenotipler	Genetik ve klinik heterojenite, ön tanının olmadığı atipik vakalar, nadir olgular	Ekzomun yanında anlatımı olmayan genomik bölgeler

YND tekniklerinden biri olan RNA dizileme çalışmaları ile gen ekspresyonlarının değerlendirilebilmesinin yanında insersiyon/delesyonların, kırılma bölgesi dahil nükleotid değişimlerinin, farklı transkriptlerin ve gen füzyonlarının tespiti de mümkündür (256). Bu yöntem özellikle, kanserleşme ve kanser hücrelerinin davranışlarının araştırılmasında ve tedavi çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (257, 258).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışmanın ilk aşamadaki olgu grubunu İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 2014-2019 yılları arasında başvuran 973 olgu oluşturdu ve olgulara ait dosya verileri retrospektif olarak değerlendirildi. Çalışma, iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Dosya değerlendirmesinde, çiftlere ait demografik bilgiler, gebelik ve doğum öyküsü, preterm eylem riski, varsa gebeliklerindeki fetal ultrasonografi bulguları, fetal kromozom analiz sonuçları, eşler arasındaki akrabalık durumu ve etiyolojinin açıklanmasına yönelik yapılmış tüm tetkikler incelenerek Excel dosyası hazırlandı. İkinci aşamada bu ailelerden tüm klasik testleri (kromozom analizi, trombofili paneli, hormon görüntülemesi, dişi üreme sistemi görüntülemesi, otoantikörlerin değerlendirilmesi, biyokimyasal testler) normal sonuçlanan çiftlerden tüm ekzom dizi analizi için onam veren 35 anne adayından kan örnekleme yapıldı.

Araştırma amacıyla yapılacak moleküler analizler için, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 16.01.2018 tarih ve 44 sayılı yazı ile etik açıdan onam alındı. Tekrarlayan gebelik kayıpları, tekrarlayan implantasyon kusuru ve sebebi açıklanamayan kadın infertilitesinde ortak yolaklar olabileceği düşünülerek İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 19.02.2018 tarih ve 249 sayılı yazı ile etik açıdan uygun bulunmuş olan ve İstanbul Üniversitesi BAP tarafından TSA-2018-32135 nolu "Sebebi Açıklanamayan İnfertilite ile İlişkili Genlerin Araştırılması" başlıklı projede çalışılan TKG ya da gebelik oluşmaması sonrası YÜT uygulamaları başarısızlığı öykülü olgular da tez çalışmasına dahil edildi. 04.09.2019 tarih ve 175219 sayılı 'Tez Değerlendirme Ara Rapor Formu' yazısı ile bu değişiklik İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bildirildi; 13.09.2019 tarih ve 182600 sayılı Sağlık Bilimleri Enstitüsü yazısı ile kabul edildi. Bu sayede incelenen olgu sayısı 35'e ulaştı.

Çalışmaya ait bilgi aktarımı sonrası araştırmaya onam veren olgulara her iki proje için hazırlanmış olan 'Gönüllü Olur Formu' imzalatıldı. Tüm ekzom analizi sonuçları değerlendirildikten sonra OR genlerde patojenik bir varyant tespit edilen anne adaylarının eşlerinden de kan alındı. İki çiftin (Olgu 2 ve 3) daha önceki spontan abortus materyallerinden elde edilmiş fetal DNA'ları da çalışmaya dahil edildi.

3.2. Klinik Değerlendirmeler

Olguların değerlendirilmesi ve fizik muayenesi, 8. bölümde sunulmuş olan muayene formu göz önüne alınarak gerçekleştirildi. Olguların en az üç kuşak olacak şekilde ve gebelik öyküleri ön planda tutularak alınan ayrıntılı anamnez ile aile ağaçları çizildi. Olgulara ait karyotip analizi, hormon paneli, trombofili paneli, otoimmünite paneli, tam kan sayımı, biyokimya testleri, yapılmış ise batin veya pelvik USG, HSG, koagülasyon faktörleri ve baba adaylarının spermiyogram sonuçları ayrıntılı olarak not edildi. Tüm bu testleri normal çıkan olgular içerisinde 35 anne adayını çalışmaya alındı.

3.3. Kromozom Analizleri

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD Sitogenetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen kromozom çalışmalarında, ilk aşamada çiftlerden alınan heparinli periferik kan örnekleri ile lenfosit hücre kültürleri yapıldı. Kültür medyumunun içeriğinde RPMI 1640 Medium (100 ml), Fetal Calf Serum (15 ml), L-Glutamin (2 ml), fitohemagglütinin solüsyon (2 ml) ve penisilin/streptomisin (1 ml) bulunmaktaydı. Bu medyundan 5 ml santrifüj tüplerine alınarak üzerine 5 damla (~0,25 ml) heparinli kan örneğinden ilave edildi. Fitohemagglütinin eklenerek hücreler bölünmek için uyarıldı ve hücrelerin bölünmeye devam edebilmeleri için 37°C'de 48 saat bekletildi. Sonrasında devam etmekte olan kültürlere 0,1 ml timidin ilave edildi ve kültür süresi 72 saate tamamlandı. Mitoz bölünme aşamasındaki hücrelere 0,1 ml kolşisin (kolşemid) ilave edilerek metafazda durduruldu. 2 saat sonrasında kültür sonlandırıldı ve hücreler toplandı. 0,075 M hipotonik KCl solüsyonu hücrelere eklendi ve ~20 dakika bekletildi. Santrifüj edilerek toplanan hücrelere, metil alkol ve glasiyel asetik asit ile 3:1 oranında hazırlanmış fiksatif solüsyonu eklendi ve yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Santrifüj sonrası hücreler pastör pipeti yardımıyla alındı ve lamaların üzerine damlatıldı. Lamalar 90°C'lik etüve alınarak 2,5 saat bekletildi. Ardından G-bantlama yapılarak kromozomların boyanması sağlandı. G-bantlama yönteminde, örnekler tripsin solüsyonunda ~30 saniye bekletildi ve sonrasında PBS ile yıkandı. Ardından Leishman solüsyonunda 1 dakika tutularak boyanması sağlandı ve distile su kullanılarak boyaların fazlası yıkandı ve ortam içerisindeki havada kurutuldu. Sonrasında lamaların üzeri lamel ile kapatıldı. Mikroskop aracılığı ile 100 kez büyütülerek incelenecek kısımlar konumlandırıldı ve Metasystem/Cytovision otomatik görüntüleme cihazı ile 250 kez büyütülerek her olgu için en az 20 metafaz olacak şekilde analiz yapıldı.

3.4. Moleküler Çalışmalar

3.4.1. DNA İzolasyonu ve Kalitesinin Değerlendirilmesi

Olgulardan mor kapaklı K₃EDTA'lı tüplere yaklaşık 2 ml periferik venöz tam kan alındı. Her olgu için 400 µl kan örneğinden MagPurix® 12 cihazı ile, MagPurix® Blood DNA Extraction Kit 200 (OP02001) kullanılarak prosedüre uygun şekilde DNA izolasyonu yapıldı. MagPurix® teknolojisi, manyetik boncuklar kullanarak materyallerden nükleik asitlerin çıkarılmasını sağlayan otomatik bir sistemdir. DNA saflaştırma aşaması parçalama, bağlama, yıkama ve elüsyon aşamalarını içerir.

Genomik DNA'ların izolasyonunun ardından, her biri için Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c cihazı aracılığıyla spektrofometrik olarak yoğunluk (ng/µl) ve saflık derecesi absorpsiyon ölçümleri ile kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçlarına göre DNA konsantrasyonlarının gerekli olan >50 ng/µl üzerinde ve A260/A280 oranlarının da 1,8-2,0 aralığında olduğu tespit edildi (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Olgulardan, eşlerden veya aile üyelerinden elde edilen DNA konsantrasyonları

Olgu no	ng/µl	260/280	260/230	eş DNA	ng/µl	260/280	260/230
1	33,2	1,85	2,66	-			
2	65,6	1,84	2,6	+	64,1	1,78	1,79
				fetus	178,7		
3	64,8	1,84	2,51	-			
				fetus	269,2		
4	124,9	1,84	2,03	+	92,8	1,51	0,67
5	73,9	1,8	2,41	+	75,6	1,77	2,4
6	51,6	1,8	2,54	+	75,1	1,83	1,94
7	61,5	1,8	2,42	-			
8	82,5	1,8	2,15	-			
9	63,6	1,8	2,42	-			
10	67,4	1,8	2,55	+	69,1	1,75	2,35
11	119,6	1,76	1,97	+	62	1,77	2,01
12	93,2	1,76	1,86	+	71	1,76	1,97
13	70,7	1,74	1,81	+	69,7	1,77	1,91
14	38,7	1,68	1,41	+	104,7	1,80	2,05
15	29,9	1,66	1,27	+	76,7	1,77	1,91
16	50	1,78	1,67	+	80,3	1,85	1,82
17	64,9	1,68	1,35	-			
18	74	1,74	1,72	+	59,6	1,77	1,92
19	62,8	1,77	1,73	-			
				anne	42,8	1,73	1,46

				baba	26,3	1,75	1,28
20	94,7	1,82	1,93	+	67	1,79	2,01
21	38,4	1,82	1,79	-			
22	60,4	1,78	1,85	+	91,5	1,83	2,05
23	56,7	1,82	1,92	+	73,5	1,81	1,90
				baba	50,9	1,75	1,71
24	74,5	1,81	1,92	-			
25	38,1	1,75	1,55	-			
26	52,5	1,70	1,62	-			
27	68,5	1,75	1,93	-			
28	88,6	1,82	1,81	-			
29	83,2	1,81	1,90	+	118,8	1,82	1,91
30	107,6	1,81	2,06	-			
31	74,7	1,79	1,93	-			
32	90,5	1,81	1,92	-			
33	65,1	1,77	1,76	-			
34	31,8	1,76	1,44	+	85,4	1,78	1,97
35	97,1	1,79	1,88	-			

3.4.2. Islak Laboratuvar Çalışmaları

35 olgudan elde edilen genomik DNA'ların kaliteleri değerlendirilip yeni nesil dizileme işlemleri için uygun oldukları tespit edildikten sonra, proje kapsamında maddi koşullar göz önüne alınarak TED ıslak laboratuvar çalışmalarının hizmet alımı ile gerçekleştirilmesi kararlaştırıldığından, materyaller ilgili merkezlere uygun koşullarda kargo ile gönderildi.

TÜBİTAK MAM'da gerçekleşen çalışmalar için (Olgu 1-10) ıslak laboratuvar iş akışı ve kullanılan kitler hakkında bilgi alınamamış olup, dizileme işlemi Illumina HiSeq 2500® cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Engin Tıp'ta yapılan ıslak laboratuvar çalışmaları şu şekildedir (Olgu 11-35): YND hazırlık aşamaları için DNA'ların uygunluğu bir kez daha kontrol edilmiş, çalışmaya uygunluğu ve yapısal bütünlüğü jel elektroforezi ile doğrulanmıştır, ileri kantitasyonu 'Qubit' ile gerçekleştirilmiştir. Dizileme öncesi kütüphane hazırlanması basamağında ekzom bölgesini hedef alan 'xGen Exome Research Panel' (IDT) kiti kullanılmıştır. Bu kit ile hedef genlerde yer alan ekzonlar ve ekzon-intron sınır bölgeleri 20 bç uzaklıklar dahil olacak şekilde seçilmiş ve çoğaltılmıştır. Çalışma kapsamında kitin standart protokolü izlenmiştir. Kütüphane hazırlanmasının ardından örnekler Illumina NextSeq® platformunda dizilenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen yaklaşık

5.000.000 okuma ile hedef ekzom bölgeleri için ortalama 65x okuma derinliği elde edilmiştir. Elde edilen veriler biyoinformatik iş akışı ile analiz edilip varyant listesi çıkarılmıştır.

Biyoinformatik analiz kapsamında 150 bç'lik tek uçlu dizi (single-end) ham verileri (.fastq) kullanılmıştır. Dizi verilerinin 5' ve 3' uçları kalite parametreleri göz önüne alınarak kesilmiştir (Trimmomatic). Elde edilen veriler referans genom verilerine göre hizalanmıştır (Burrows-Wheeler Aligner). Hizalama çalışması sonrasında varyantların çekimi 'GATK Unified Genotyper' ile yapılmıştır.

Sonraki basamaklarda tekrar hizalama ile in/del bölgelerindeki hizalama düzeltmelerinin yapılması, DNA dizilerinin kalite skor değerlerinin tekrar ayarlanması, düzenlenmiş dizilerdeki varyasyonlar için parametre optimizasyonlarının yapılması, varyasyon listesi için notların eklenmesi, varyantın tespit edilme yüzdesine ($\leq 30\%$) ve okunma derinliğine göre ($\leq 10x$) güvenilir olmayanların elenmesi, bölgesinin ekzonik veya intronik oluşuna göre filtreme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.5. Varyantların Biyoinformatik Analizi

Dizileme işlemleri sonucunda elde edilen veriler ham data halinde (.fastq, .bam, .bai) ve excel formatında düzenlenmiş olarak tarafımıza ulaştırıldı. Sonrasında biyoinformatik analizlere geçildi. Varyantların incelenmesinde ACMG'nin (American College of Medical Genetics and Genomics) yayınlamış olduğu varyant analiz kriterleri göz önüne alındı (259).

Biyoinformatik analizlere başlamadan önce literatürde veri madenciliği yapılarak çalışmalar kapsamında bildirilmiş genler ile gebeliğin ilk trimesterinde etkin olarak genlerini içeren gen listesi oluşturuldu. Analizler sonucu TKG ile ilişkisi olabileceğinin düşünüldüğü varyantların etki spektrumu değerlendirilirken yapılan ilk filtrelemede, bu liste kapsamındaki gen varyantları incelendi. İkinci filtrelemede en az üç in siliko tahmin araçlarına göre patojenik veya olası patojenik özellik taşıyan tüm genlerdeki değişimler değerlendirmeye alındı. İncelenen varyantın okuma derinliğinin en az 20x olmasına dikkat edildi ve dizileme görüntüleri Interactive Genomic Viewer (IGV) aracılığıyla incelendi. TKG'nın toplum sıklığının en az %1 olduğu göz önüne alınarak saptanan varyantların toplum sıklığı değerlendirildi ve $\leq 0,01$ değerinde olanlar göz önüne alındı.

3.5.1. Varyantların Patojenitesinin Belirlenmesi

Tüm dünyada birçok laboratuvar ve tanı merkezi tarafından da tercih edilen sınıflamada varyantların fenotipe etkisi açısından gruplanması ve kriterleri Tablo 3-2’te belirtildi.

Tablo 3-2: Varyantların fenotipe olası etkileri açısından sınıflandırılması – Sue (259)’den değiştirilerek

Patojenik (Pathogenic)	1 çok güçlü (PVS1) ve - ≥ 1 güçlü (PS1-PS4) veya - ≥ 2 orta (PM1-PM6) veya - 1 orta (PM1-PM6) ve 1 destekleyici (PP1-PP5) veya - ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) ≥ 2 güçlü (PS1-PS4) 1 güçlü (PS1-PS4) ve - ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya - 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya - 1 orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-PP5)
Olası patojenik (Likely pathogenic)	1 çok güçlü (PVS1) ve 1 orta (PM1-PM6) veya 1 güçlü (PS1-PS4) ve 1-2 orta (PM1-PM6) veya 1 güçlü (PS1-PS4) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5)
Önemi bilinmeyen (VUS: variant uncertain significance)	- Kriterlerin hiçbirini karşılamayan veya - Zararsız veya patojenik özellikleri karşılayan kriterlerin tutarsızlığı
Olası zararsız (Likely benign)	1 güçlü (BS1-BS4) ve 1 destekleyici (BP1-BP7) veya ≥ 2 destekleyici (BP1-BP7)
Zararsız (Benign)	1 tek başına (BA1) veya ≥ 2 güçlü (BS1-BS4)

PVS1: Fonksiyon kaybı bilinen bir hastalıkla ilişkili olan bir gendeki ‘null’ varyant (anlamsız, çerçeve kayması, art arda ± 1 veya 2 kırpılma bölgesi, inisiyasyon kodonu, tekli veya çoklu ekzon delesyonunu içeren varyant). Patojenik ve çok güçlü.

PS1: Nükleotid değişiminden bağımsız olarak önceden tespit edilmiş bir patojenik varyant ile aynı amino asit değişimi. Patojenik ve güçlü.

PS2: Hastalığı olan ve aile öyküsü olmayan bir olguda *de novo* varyant. Patojenik ve güçlü.

PS3: Gen veya gen ürünü üzerinde zararlı etkiyi destekleyen *in vitro* veya *in vivo* fonksiyonel çalışmaların bulunması. Patojenik ve güçlü.

PS4: Etkilenen bireylerde varyantın prevalansının, kontrollere göre önemli ölçüde artmış olması. Patojenik ve güçlü.

PM1: Zararsız bir varyasyon olmayan, mutasyonel hot spot ve/veya kritik bir fonksiyonel alanda bulunan varyant. Patojenik ve orta.

PM2: Ekzom Dizileme Projesi, 1000 Genom Projesi veya Ekzom Toplama Konsorsiyumu'ndaki kontrollerde bulunmaması veya resesif ise çok düşük sıklıkta olması. Patojenik ve orta.

PM3: Resesif kalıtılan hastalıklar için patojenik bir varyantın trans allelinde tespit edilen varyant. Patojenik ve orta.

PM4: Tekrarlanmayan bir bölgede çerçeve içi delesyon/insersiyon veya stop kodon kaybı varyantlar nedeniyle protein uzunluğunun değişmesi. Patojenik ve orta.

PM5: Daha önce patojenik olduğu belirlenen yanlış anlamalı değişikliğin görüldüğü bir amino asit rezidüsünde yeni bir yanlış anlamalı değişim. Patojenik ve orta.

PM6: Anne ve baba için segregasyon çalışması yapılmadan *de novo* olduğu varsayılan varyant. Patojenik ve orta.

PP1: Birden fazla etkilenen aile üyesinde hastalık ile birlikte hastalıkla ilişkisi kesin olarak bilinen bir gende varyant saptanması. Patojenik ve destekleyici.

PP2: Düşük oranda zararsız nitelikli yanlış anlamalı varyasyonu olan ve bu varyantların yaygın bir hastalıkla ilişkili bir gende yanlış anlamalı varyant. Patojenik ve destekleyici.

PP3: Birden fazla istatistiki hesaplamanın, gen veya gen ürünü üzerinde zararlı bir etkiyi (korunan, evrimsel, kırılma etkisi vb.) desteklemesi. Patojenik ve destekleyici.

PP4: Hastanın fenotipi veya aile öyküsü, bilinen bir genetik etiyolojisi olan bir hastalığa spesifiktir. Patojenik ve destekleyici.

PP5: Saygın bir kaynak tarafından varyant patojenik olarak rapor edilmiş, ancak bağımsız bir değerlendirme yapmak için laboratuvar çalışmaları ile ortaya konmuş kanıt yok. Patojenik ve destekleyici.

BS1: Allel sıklığı hastalık oluşturmak için beklenenden fazladır. Zararsız ve güçlü.

BS3: Protein fonksiyonu veya kırılma üzerinde hiçbir zararlı etkinin olmadığına dair *in vitro* veya *in vivo* fonksiyonel çalışmaların bulunması. Zararsız ve güçlü.

BS4: Bir ailenin etkilenmiş üyelerinde eksik segregasyon. Zararsız ve güçlü.

BP1: Gündük proteine sebep olan varyantların hastalık nedeni olarak bilindiği bir gendeki yanlış anlamlı varyant. Zararsız ve destekleyici.

BP2: Tam penetrans gösteren dominant bir gen/hastalık için patojenik bir varyant ile trans veya herhangi bir kalıtım paterninde patojenik bir varyant ile cis pozisyonda gözlenen varyant. Zararsız ve destekleyici.

BP3: Bilinen bir işlevi olmayan tekrar bölgesinde çerçeve içi delesyon/insersiyon. Zararsız ve destekleyici.

BP4: Birden fazla istatistiki hesaplamanın, gen veya gen ürünü üzerinde zararlı bir etkinin olmadığını (korunan, evrimsel, kırılma etkisi vb.) öne sürmesi. Zararsız ve destekleyici.

BP5: Hastalık için alternatif olası moleküler temeli olan varyant. Zararsız ve destekleyici.

BP6: Saygın bir kaynak tarafından varyant zararsız olarak rapor edilmiş, ancak bağımsız bir değerlendirme yapmak için laboratuvar çalışmaları ile ortaya konmuş kanıt yok. Zararsız ve destekleyici.

BP7: Kırılma bölgesi tahmin algoritmalarının herhangi bir etki öngörmediği ya da yeni bir kırılma bölgesinin oluştuğu ve nükleotidin fazla korunmadığı tahmin edilen eş anlamlı (sessiz) bir varyant. Zararsız ve destekleyici.

BA1: Ekzom Dizileme Projesi, 1000 Genom Projesi veya Ekzom Toplama Konsorsiyumu'nda saptanan allel frekansı $>5\%$ 'tir. Zararsız ve tek başına.

Varyantların fonksiyonel etkisinin belirlenmesinde ve TGK etiyolojisi ile ilişki kurulabilmesinde kullanılan veri tabanları Tablo 3-3-Tablo 3-5'te verildi.

Tablo 3-3: İnsan ve model organizma çalışmaları veri tabanları

PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Rat Genome Database (<i>Rattus norvegicus</i>)	https://rgd.mcw.edu/
Mouse Genome Informatics (<i>Mus musculus</i>)	http://www.informatics.jax.org/
KEGG PATHWAY	https://www.genome.jp/kegg/pathway.html
Reactome	https://reactome.org/
Gene Expression Atlas	https://www.ebi.ac.uk/gxa/home
The Human Protein Atlas	https://www.proteinatlas.org/

Tablo 3-4: Populasyonlara ve hastalıklara özgü veri tabanları

Populasyonlara özgü veri tabanları		
Exome Aggregation Consortium	Populasyon çalışmaları ya da projelerden elde edilmiş ekzom verilerini içerir	gnomAD veri tabanına eklenmiştir
The Genome Aggregation Database	Geniş kapsamlı ekzom (125.748) ve genom (71.702) dizileme çalışmalarından elde edilmiş verileri içerir	https://gnomad.broadinstitute.org/
Exome Variant Server	Avrupa ve Afro-Amerikan kökenli bireylere ait varyantları içerir	https://evs.gs.washington.edu/EVS/
1000 Genomes Project	2008-2015 yılları arasında yürütülen, 26 farklı populasyona ait <%1 sıklıktaki varyantların tespit edilmesini hedefleyen projedir	Ensembl GRCh38 veri tabanına eklenmiştir
dbSNP	Farklı kaynaklarda bildirilmiş ≤ 50 bç'lik varyantlara dair bilgileri içerir	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
dbVar	Farklı kaynaklarda bildirilmiş ≥ 50 bç'lik varyantlara dair bilgileri içerir	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar
Hastalıklara özgü veri tabanları		
ClinVar	Varyantların hastalıklar ve fenotipler ile ilişkisine dair bilgileri içerir	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
OMIM	Genler ve hastalık ilişkili gen varyantlarını içeren geniş kapsamlı bir veri tabanıdır	https://omim.org/

Human Gene Mutation Database	Lüteratürde yayınlanmış hastalık ilişkili varyant bilgilerini içerir	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
Human Genome Variation Society	Fenotip ve populasyonlar ile ilişkili varyantlar hakkında birçok farklı veri tabanını içerir	https://www.hgvs.org/
Leiden Open Variation Database	YND teknikleri ile elde edilmiş, genlere dair verileri içerir	https://www.lovd.nl/
DECIPHER	Klinisyenler ve araştırmacılara yönelik moleküler sitogenetik teknikler ile elde edilmiş genomik varyant verilerini içerir	https://decipher.sanger.ac.uk/
Dizilere özgü veri tabanları		
NCBI Genome	İnsan genomu referans dizilerini içerir	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome
RefSeq	Medikal, fonksiyonel ve araştırmaya yönelik çalışmalardan elde edilmiş referans dizileri içerir	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/
Locus Reference Genomic (LRG)	Klinik çalışmalar ve yayınlardan elde edilmiş gen, transkript ve protein dizilerini içerir	https://www.lrg-sequence.org/
MitoMap	İnsan mitokondriyal DNA'sı için Cambridge referans genomunu içerir	https://www.mitomap.org/MITOMAP
Ensembl	Vertebralılar için karşılaştırmalı, fonksiyonel ve evrimsel genomik bilgiyi, genlere ait varyant ve protein bilgilerini içerir	https://www.ensembl.org/index.html
UniProt	Protein dizileri ve fonksiyonları hakkında karşılaştırmalı bilgiler içerir	https://www.uniprot.org/
UCSC	Genomik bilgiyi ve gen dizilerini içerir	https://genome-euro.ucsc.edu/

Tablo 3-5: Tez kapsamında kullanılan in siliko varyant tahmin aracı veri tabanları

Missense değişimler için	
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php

PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
ConSurf	https://consurf.tau.ac.il/
FATHMM	http://fathmm.biocompute.org.uk/index.html
MutationAssessor	http://mutationassessor.org/r3/
PANTHER	http://pantherdb.org/
PhD-SNP	http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html
MutPred2	http://mutpred.mutdb.org/#qform
SNPs&GO	https://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/
nsSNPAnalyzer	http://snpanalyzer.uthsc.edu/
Kırılma bölgesi için	
GeneSplicer	https://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml
Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/index.html
MaxEntScan	http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
Nükleotid Korunmuşluğu için	
GERP	http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/
PhastCons	http://compugen.cshl.edu/phast/
PhyloP	http://compugen.cshl.edu/phast/help-pages/phyloP.txt

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda patojenik ve olası patojenik olarak saptanan varyantlar içerisinde aile segregasyonu çalışması için seçilerek Sanger dizileme planlandı ve primerlerin tasarlanması aşamasına geçildi.

3.6. Primerlerin Tasarlanması

Varyant konfirmasyonu ve segregasyonu için bölgeye spesifik primerler tasarlama aşamasında, primerlerdeki oligonükleotidlerin tekrarlayan dizi bölgesinde olmamasına, herhangi bir polimorfizm içermemesine ve içermesi kaçınılmaz ise toplum sıklığının %1'in altında olmasına, primerlerin DNA'ya bağlanma ısılarının birbirine yakın olmasına (~2-5°C farklılık), aralarında çift bağ yapısı bulunan A-T nükleotitlerinin sayısının üçlü bağ yapısı bulunan C-G sayısında olabildiğince eşit olmasına önem verildi. Ensembl veri tabanından alınan veriler ile tasarlanan primerler, USCS Genome Browser in siliko PZR aracı ile bağlanma ısıları, dizi uzunlukları ve spesifitesi açısından kontrol edildi. Tez kapsamında tasarlanmış olan primer dizilerine ait bilgiler Tablo 3-6'da verildi.

Tablo 3-6: Primer listesi

Gen ve Ekzon	Primer dizisi	Primer bağlanma ısıları (°C)	PZR ürün boyu
ALPL-F9	5'-CTCCCAGCCACCATACT-3'	54,1	482 bç
ALPL-R9	5'-GAACCTAAGTGCATCTCCAT-3'	56	
CEP290-F53	5'-CCTTGAAGTCAATTCGTAGTGG-3'	57,3	296 bç
CEP290-R53	5'-AGGAATAGTCAGATGAACATAATTAAC-3'	55,6	

CFTR-F5	5'-CAACTAGAAGCATGCCAGT-3'	56	471 bç
CFTR-R5	5'-CAGAATGGTGCTCTGCTA-3'	54	
CFTR-F14	5'-CTCAGTCTGTTAACATGCAA-3'	60	1207 bç
CFTR-R14	5'-CTG GCT TAG TAG AGG ACCA-3'	58	
CFTR-F20	5'-CCCATCTCTGGTAGCCAA-3'	56	760 bç
CFTR-R20	5'-CTATCTGACAATCTGTGTGCA-3'	60	
CYP17A1-F8	5'-CTGGGCAGGGCCATGTCT-3'	64.7	473 bç
CYP17A1-R8	5'-GTAGGGAAGAATGGCGGAGA-3'	61.5	
IGF2-F2	5'-CTTGGCTAGGCTTAGGCG-3'	58	318 bç
IGF2-R2	5'-GCCAGAGGAGAGAGGATCA-3'	58	
KIF7-F17	5'-CTATCTGCCTGCCCTTGTGA-3'	54	1381 bç
KIF7-R17	5'-GGACATCACCTGGCAGGTT-3'	58	
NOP14-F16	5'-AGGACTTGAGCAGCCACAGT-3'	59.1	475 bç
NOP14-R16	5'-ACTGTTAAGGAAGCAAGAGTCTGT-3'	57.9	
PLG-F15	5'-GATGCTGGGCTTGCACTC-3'	60.8	256 bç
PLG-R15	5'-GTATTTAAGACAAGACTTCATGTCAATT-3'	57.6	
PROKR2-F5	5'-GCTGGATAACAAGTACATGAGGA-3'	58.3	926 bç
PROKR2-R5	5'-GGAGGCATGAACACAGATGT-3'	58.5	
SLAIN1-F1	5'-CTGCCATGGGTTCTGCT-3'	58	380 bç
SLAIN1-R1	5'-CCAGTGAGGTCACCCCA-3'	58	
TTC21B-F13	5'-AACACTAGGGCTATCCGTAA-3'	54.1	309 bç
TTC21B-R13	5'-TTCAAGGAGGGTGATATGTC-3'	54.9	
ZMPSTE24-F9	5'-TTATGGATGCTACTGATCCATA-3'	58.5	276 bç
ZMPSTE24-R9	5'-AGCTCTAGATTTGAAGCAGGCA-3'	60.7	
ZP1-F3	5'-GGTACT TTCTGGAATCCACCAT-3'	59.2	731 bç
ZP1-R3	5'-GAGTTTCTGCCTAAAGTTAGGAAACA -3'	60.5	

3.7. Ekzonik Bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Olgulara ait DNA'lar ve tasarlanan primerler ile termal döngü cihazı kullanılarak PZR çalışması yapıldı. Her bir çalışma için kullanılan malzemeler, final konsantrasyonları ve PZR çalışma koşulları Tablo 3-7 ve 3-8'de verildi.

Tablo 3-7: PZR çalışması için kullanılan malzemeler ve final konsantrasyonları

Malzemeler	Final konsantrasyonları
10X (NH ₄) ₂ SO ₄ tampon solüsyonu (Hibrogen)	1X
25 mM MgCl ₂ (Hibrogen)	2 mM
25 µM dNTP (Invitrogen 100 mM dNTP setten hazırlanmış)	0.2 mM
2 µM İleri ve geri primerler (Sentebiolab, Sentromer)	0,2 µM
500 U (5 U/µl) Taq polimeraz enzimi (Hibrogen)	0,1-0,2 µl
DMSO	% 0-10 olacak şekilde

(Biomatik)	(G-C oranına göre)
Distile su	25 µl'ye tamamlanacak şekilde
DNA	100-200 ng/g
Final konsantrasyon	25 µl

Tablo 3-8: PZR çalışma koşulları

Denatürasyon	94°C	10 dakika	x1 döngü
Denatürasyon	94°C	30 saniye	x10 döngü
Bağlanma	Primer bağlanma ısısı	30 saniye	
Uzama	72°C	45 saniye-1,5 dakika	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	x30 döngü
Bağlanma	Primer bağlanma ısısı	30 saniye	
Uzama	72°C	45 saniye-1,5 dakika	
Uzama	72°C	10 dakika	x1 döngü
Bekleme	4°C	1 saat	x1 döngü
Duraklama	10°C	∞	x1 döngü

Çalışmanın özgünlüğü ve bant boylarının hedeflenen bç ile aynı olduğunun gösterilmesi için, 5 µl PZR ürünü ile 2 µl Gel Red boyası karıştırılarak 1X TBE tamponu içindeki %2'lik agaroz jele yüklendi. 120 Voltta, 50 bç'lik merdiven işaretleyicisi (Sigma) ile 30 dk yürütülerek PZR ürünleri boyutlarına göre ayrıldı. Elektroforez işlemi sonrasında jeldeki ürünler Vilber Lourmat Infinity cihazı aracılığıyla ultraviyole ışık altında görüntülendi. Özgünlüğü doğrulanmış PZR ürünlerinin saflaştırılması Thermo Scientific Exonuclease-I 20 U/µl ve Alkaline Phosphatase 1 U/µl ile protokole uygun şekilde yapıldı.

3.8. Sanger Dizi Analizi ile Varyantın İncelenmesi ve Biyoinformatik Analizi

3.8.1. Dizi PZR Çalışması

Tablo 3-9'da verilmiş olan malzemeler ile final hacim 10 µl olacak şekilde karışım hazırlandı ve 96 örneklik plak (The Applied Biosystems, MicroAmp Optical 96-well reaction plate) üzerindeki her kuyucukta bir örnek olacak şekilde örnekler aktarıldı ve Tablo 3-10'da belirtilen koşullar ile termal döngü cihazında çalışma gerçekleştirildi.

Tablo 3-9: Dizi PZR çalışması için kullanılan malzemeler

5X BigDye dizileme tamponu
BigDye Terminator v3.1 reaksiyon karışımı
Primer (ileri/geri veya her ikisi)
Saflaştırılmış PZR ürünü
Distile su

Tablo 3-10: Dizi PZR çalışma protokolü

Denatürasyon	96°C	10 saniye	x25 döngü
Bağlanma	50°C	5 saniye	
Uzama	60°C	4 dakika	
Sonlanma	4°C	∞	x1 döngü

Dizi PZR işlemi sonrasında arta kalan primer ve diğer reaktiflerin temizlenmesi amacıyla plaktaki her bir kuyucuğa 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 etanol eklenerek plak alüminyum koruyucu yapışkan bantla kapatıldı ve 15 dakika oda ısısında tutuldu, ardından 3.810 rpm’de 45 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlemten sonra plak üzerindeki bant kaldırıldı, kuyucuk ağızları üstte kalacak şekilde ters çevrildi, 1.100 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı. Sonrasında kuyucuklara 35 µl %70’lik etanol ilave edildi. Plak tekrar bant ile kapatıldı ve 3.460 rpm’de 20 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Plakın üstü tekrar açıldı ve 1.170 rpm’de 60 saniye santrifüj edildi. Ardından kuyucuklara tek tek 10 µl HiDi formamid (Highly Deionized formamid, enjeksiyon tampon çözeltisi) ilave edildi. Plaktaki ürünler 95°C’de 5 dakika denatüre edildikten sonra 2 dakika buz üzerinde bekletildi ve The Applied Biosystems (ABI) 3500 Genetic Analyzer cihazına yüklendi.

3.8.2. Kapiller Elektroferez

Kapiller elektroferez (KE) sistemi ile çalışan ABI-3500 cihazı 8 kapillerli dizi sistemi ve polimeri içerir, DNA sekanslama ve/veya fragman analizi imkanı sunar. Elektrokinetik bir ayırım yaparak, yüksek voltaj ile akım verilir, moleküllere elektrik yüklenerek hareketlenmeleri sağlanır ve anot ucunda yerleştirilmiş hassas sensörler ile izlenirler. Çok az miktarda ürün kullanılarak hassas ve otomatize bir sistem ile diziler okunur.

Plak cihaza yerleştirildikten sonra bilgisayar aracılığı ile daha önceden kalibre edilmiş boya seti seçildi ve Tablo 3-11’deki koşullar ile yürütme yapıldı.

Tablo 3-11: Kapiller elektroferez yürütme koşulları

Yürütme voltajı	13,4 kVolt
Ön yürütme voltajı	15 kVolt
Enjeksiyon voltajı	1,6 kVolt
Yürütme süresi	2,52 saniye
Ön yürütme süresi	180 saniye
Enjeksiyon zamanı	8 saniye
Veri gecikmesi	250 saniye

3.8.3. Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Biyoinformatik Analizi

Kapiller elektroforez ile yürütülen ürünlerden elde edilen dizi verileri Seq Scape v3 ve Chromas v2.6.6 analiz programları ile bilgisayar ortamında incelendi.



4. BULGULAR

4.1. Gebelik Öyküsüne Göre Oluşturulan Olgu Grupları

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK): En az 2 gebelik kaybının 20. GH öncesi veya fetal ağırlığının <500 gr olan çiftler

Kötü obstetrik öykü (KOÖ): En az 2 gebelik öyküsünde intrauterin gelişme geriliği (İUGG), fetal ultrasonografide anomali saptanmış (PAT-USG), erken doğum, yenidoğan ölümleri veya çoklu konjenital anomali/bilişsel yetersizlik öykülü genetik tanı almamış çocuk sahibi olan çiftler

Primer infertilite öyküsü (Pİ): Herhangi bir doğum kontrol yöntemi uygulamaksızın düzenli ilişkiye rağmen en az bir yıl boyunca gebelik oluşturamayan çiftler

Başarısız yardımcı üreme tekniği denemeleri: En az 2 kez YÜT denenmesine rağmen gebelik oluşmayan çiftler

İlk aşama olarak yapılan dosya incelemesi sonucunda 973 olgu çalışmaya dahil edildi. Bu olguların gebelik öyküsüne göre oluşturulan gruplara dağılımı ve bu gruplardaki çiftler arasındaki akrabalık oranları Tablo 4-1’de gösterildi.

Tablo 4-1: Olguların gebelik öyküsüne göre gruplara dağılımı ve gruplardaki akrabalık oranları

Gebelik öyküsü	Olgu sayısı n (%)	Akraba evliliği n (%)
Tekrarlayan gebelik kaybı (≥ 2)	325 D + 325 E (66,8) n= 650	78 (24)
Kötü obstetrik öykü	79 D + 79 E (16,2) n= 158	29 (36,7)
Primer/sekonder infertilite	31 D + 42 E (7,5) n= 73	7 (15,2)
Başarısız yardımcı üreme tekniği denemeleri (≥ 2)	46 D + 46 E (9,4) n= 92	7 (15,2)
Toplam	973	%24,3

Olgu serisinin en büyük grubunu TGK grubu oluştururken, en yüksek akraba evliliği oranı KOÖ grubunda gözlemlendi.

4.2. Sitogenetik analiz sonuçları

496 çiftte ait dosya incelemesinde 31 dişi ve 21 erkek olgunun sitogenetik analizlerinin dış merkezde yapıldığı saptandığından bu bireylere ait sitogenetik bulgular çalışmaya dahil edilmedi. Toplam 481 dişi ve 492 erkek olgu ile bu çiftlerin 105 gebelik ürününe ait sitogenetik bulgular değerlendirildi ve kromozom analizi sonuçları olgu gruplarına göre Tablo 4-2-Tablo 4-6’da verildi.

Tablo 4-2: TGK olgu grubunda (n= 650 olgu) kromozom analiz sonuçları

Karyotip	Öykü	Maternal n (%)	Paternal n (%)	n %
Normal	TGK	312 (96)	317 (97,5)	629 96,7
İnversiyon	G8P2A6	inv(9)(p12q21.2)	N	8
	G2A2	inv(9)(p13q13)	N	
	G3P1A2	inv(9)(p12q13)	N	
	G2A2	inv(9)(p12q21)	inv(9)(p12q21)	
	G3A3	N	inv(9)(p13q13)	
	G3A2TT1	N	inv(9)(p12q13)	
	G10P2A7 IUFÖ1	inv(10)(p13q22.1)	N	
Robertsonian translokasyon	G3A3	N	der(13;14)(q10;q10)	2
	G7P2A5	der(13;14)(q10;q10)pat	N	
Resiprokal translokasyon	G3A3	t(3;4)(q21;q24?)	N	10
	G4P1A2 TT1	t(3;8)(q27.3;q24.1)	N	
	G3A3	t(3;18)(q25.3;q22.3)	N	
	G3A3	t(5;18)(q23.2;q22.3)	N	
	G4A4	t(6;8)(p23;q22.3)	N	
	G2A2	t(6;10)(q13.1;p24.3)	N	
	G7P2A5	N	t(5;11)(p15.3;p13)	
	G2A2	N	t(11;16)(p15.1;p13.1)	
	G3A3	N	t(11;17)(q24.2;q21)	
	G3A3	N	t(11;22)(q11.22;q24.1)	
Markır kromozom	G4P1A3 C0	47,+mar	N	1
Toplam kromozom anomalisi		13 (4)	8 (2,5)	21 (3,2)

Tablo 4-3: KOÖ olgu grubunda (n= 158) kromozom analiz sonuçları

Karyotip	Öykü	Maternal n (%)	Paternal n (%)	n (%)
Normal	KOÖ	76	76	152 96,2
İnversiyon	G6P3A2IUFÖ2	N	inv(2)(p11.2;q13)	1

	G7P3A2IUFO1	N	inv(9)(p13q21.32)	2
	G4P1A2TT1	inv(9)(q34.2q34.3)	N	
Resiprokal translokasyon	G2A1TT1	t(9;15)(q22.1;q26.3)	N	1
	G1TT1	t(10;13)(q26.2;q22)	N	1
	G4P1A1TT1	N	t(8;15)(q11.2;q11.1)	1
Toplam kromozom anomalisi		3 (3,8)	3 (3,8)	6 (3,8)

Tablo 4-4: Pİ olgu grubunda (n= 73) kromozom analiz sonuçları

Karyotip	Öykü	Maternal n (%)	Paternal n (%)	n %
Normal	infertilite	29	30	59 (80,8)
İnversiyon	G0	inv(9)(p12q21.2)	N	1
	G0	N	inv(9)(p22q22)	1
İnsersiyonal translokasyon	G0	-	ins(18;2)(q11.2;q13q22)	1
Ring kromozom	azospermi	-	r(21)(p13q22.3?) (D21S1446-)	2
X ve Y yapısal anomalileri	G0	-	46,XX.ishYp11.2(SRYx1)	1
	G0	-	idic(Y).ish idic(Y)(q11.2) idic(Y).ish idic(Y)(q11.2)	2
	G0	-	45,X/46,X,idic(Y)(q11.2) (SRYx2)	1
	G0	-	idic(Y)(q11.2)(SRYx2)	1
	G0	-	46,XX[42]/45,X[4].ishder (X)t(X;Y)(p22.3;p11.3) (SRY+)	1
45,X mozaizmi	G0	47,XXX[1]/45,X [3]/46,XX[56] .nuc ish (DXZ1x1[7]/DXZ 1x3[15]/DXZx2 [78])	N	1
+markır kromozom	G0	-	47,+mar.ishidic(15)(q11.2) (D15Z4++,PWS/AS-)	2
	G0	N	47,+mar.ishder(14/22)	
Toplam kromozom anomalisi		2 (6,5)	12 (28,6)	14 (19,2)

Tablo 4-5: Başarısız YÜT uygulaması olan (n= 92) olgu grubunda kromozom analiz sonuçları

Karyotip	Öykü	Maternal n (%)	Paternal n (%)	n (%)
Normal		45	45	90 (97,8)
Robertsonian translokasyon	G0	45,der(14;15)(q10;q10)pat	N	1

Resiprokal translokasyon	G0	N	t(8;11)(p23.1;q13.4)	1
Toplam kromozom anomalisi		1 (2,2)	1 (2,2)	2 (2,2)

Tablo 4-6: Olgu grubundaki çiftlerin gebelik ürünlerinde (n= 105) kromozom analiz sonuçları

Öykü	Parental karyotip	Gebelik ürünü/fetal Karyotip	n
-	N	Normal	56
G4P1A2TT1	46,XX,inv(9)(q34.2q34.3)	9qter?	1
G6P3A2IUFÖ1	46,XY,inv(2)(p11.2q13)	inv(2)(p11.2q13)pat	1
G8P2A6	46,XX,inv(9)(p12q21.2)	inv(9)(p12q21.2)mat	1
G1TT1	46,XX,t(10;13)(q26.2;q22)	t(10;13)(q26.2;q22)mat	1
G2A1TT1	46,XX,t(9;15)(q22.1;q26.3)	47,+der(9)t(9;15)(q22.1;q26.3)mat	1
G3A3	N	del(8)(p11.2?).ish subtel(41x2)	1
G2A2	N	t(2q;13q)dn	1
G4P2IUFÖ1A1	N	47,+der(12).ishi(3)(q11.2), der(12)(12pter→12q11::3q11.2→3 q ter)	1
G3P1A1TT1	N	der(13;14)(q10;q10)+13 dn	1
G2TT1A1	-	47,+8[30]/47,+12[17]/46,[3]	1
G2A2, G2IUFÖ2	N	47,+2	2
G2A2	N	47,+7	1
G2A2, G4P2A2C1, G5P1A4	N	47,+9	3
G4P1A2	N	47,+i(12)(p10)	1
G4P1A2	N	47,+13	1
G2A2,G11A11	N	47,+15	2
G1A1, G7A7, G3A1TT2 (x2), G5A5, G3A3 (x2)	N	47,+16	7
G5A4TT1, G3A2TT1, G3A3, G3A2TT1, G2A2, G5P1A3TT1	N	47,+18	6
G2A2(x2), G3A2IUFÖ1, G4P1A3(x2), G3A1TT2	N	47,+21	6
G2A2 (x2)	N	47,+22	2
G3A3, G2A1TT1	N	69,XXX	2
G4P1A3, G3P2A1,G2A2, G6P1A5, G8A5SEK3, G3P2A1C1	N	69,XXY	6
Toplam kromozom anomalisi olan olgu sayısı			49

4.3. Moleküler Analiz Sonuçları

Kromozom anomalisi ya da bilinen başka bir etiyolojik faktör saptanmamış olgulardan seçilen 35 dişi olgu TED analizi ile incelendi. Sonuçların değerlendirilmesi sonrasında aile segregasyon çalışmaları amacıyla 2 fetus, 4 ebeveyn ve 8 eş (erkek olgu) çalışmaya dahil edildi.

4.3.1. TED Analiz Sonuçları ve Olgu Sunumları

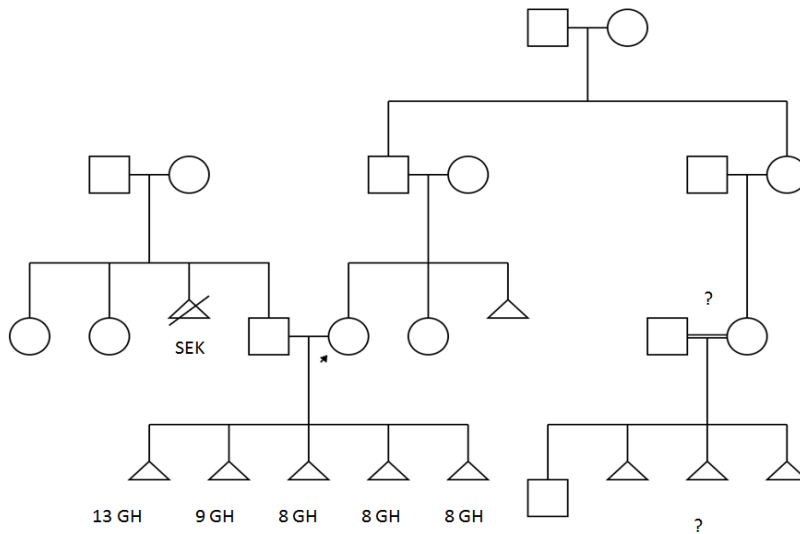
Olgulara ait TED verilerinin biyoinformatik analizi sonucu tespit edilen tüm varyantlar, varyant sınıflandırılmasına göre Tablo 4-7’de belirtildi. Olgu 10’da TKG veya TİK fenotipi ile ilişkili olabilecek herhangi bir gen varyantı bulunamadı.

Tablo 4-7: Olguların TED verilerinin biyoinformatik analizlerinde saptanan varyantların genel varyant sınıflamasına göre dağılımı

Varyant sınıflaması	Olgu sayısı	Varyant sayısı
Patojenik	10 (%28)	11
Olası patojenik	8 (%22,8)	13
VUS	33 (%94)	67
Olası zararsız	1 (%2)	1
Zararsız	1 (%2)	1
Toplam		93

4.3.1.1. Olgu 1

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-1’de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-8’de, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) biyoinformatik analizi sonucunda elde edilen varyant sayıları Tablo 4-9’da ve fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-10’da gösterildi.



Şekil 4-1: Olgu 1’e ait aile ağacı

Tablo 4-8: Olgu 1'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	31
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	20
Gebelik öyküsü	G5A5
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	Anne: G3P2A1; hala kızı: G4P1A3
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 13. GH, A2: 9. GH, A3-5: 8. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	A3: 46,XX
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	G4 ve G5'te düşük moleküler ağırlıklı heparin ve asetil salisilik asit
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-9: Olgu 1'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	80.540
Zararsız varyant sayısı	3.626
Olası zararsız varyant sayısı	946
VUS varyant sayısı	75.949
Olası patojenik varyant sayısı	4
Patojenik varyant sayısı	15
Homozigot varyant sayısı	25.064
Heterozigot varyant sayısı	55.476
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	75.716

Tablo 4-10: Olgu 1'e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar

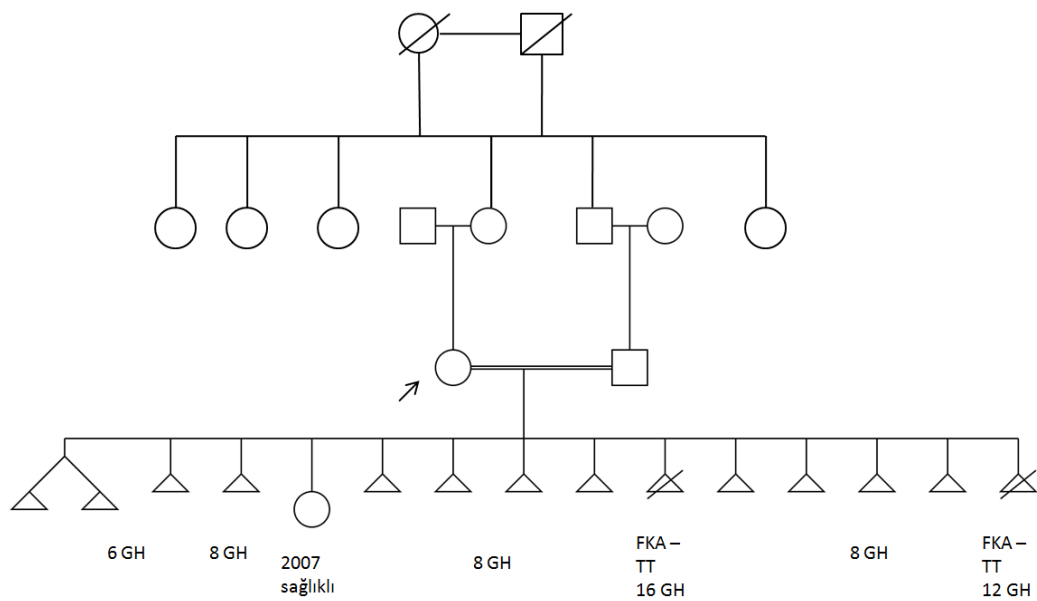
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>MCM8</i> (NM_001281521.1)	OR	c.2132G>T p.G671V heterozigot	rs150257637 0,0004207	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

<i>HFM1</i> (NM_001017975.4)	OR	c.2521C>T p.R841W heterozigot	rs775049733 0,00001244	VUS (ACMG) patojenik (MutationTaster, SIFT)
<i>WNT4</i> (NM_030761.4)	OD, OR	c.896C>T p.T299M heterozigot	rs1264065222 0,000003983	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>TUBB8</i> (NM_177987.2)	OD, OR	c.314A>G p.H105L heterozigot	rs9329307 0,03155	zararsız (ACMG) olası patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 1’de daha önce POY ile ilişkilendirilmiş *HFM1* ve *MCM8*, müllerian kanal gelişiminde aktif *WNT4* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarında patojenik olarak değerlendirilen üç; OOMD ile ilişkilendirilmiş *TUBB8* geninde ise ACMG kriterlerine göre zararsız, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre olası patojenik olarak sınıflandırılmış bir varyant saptandı.

4.3.1.2. Olgu 2

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-2’de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-11’de, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) biyoinformatik analizi sonucunda elde edilen varyant sayıları Tablo 4-12’de ve fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-13’te gösterildi.



Şekil 4-2: Olgu 2’ye ait aile ağacı

Tablo 4-11: Olgu 2'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	37
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	22
Gebelik öyküsü	G14P1A13
Akrabalık	Eşiyle 1.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-2: 6. GH, A3-7,9-12: 8. GH, A8: 16. GH, A13: 12. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	A13: 46,XY; arr(1-22)x2,(X,Y)x1
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	G14(A13): Posterior fossada kistik genişleme (8,9x7 mm)
Ek hastalık öyküsü	Aritmi
Varsa ilaç tedavisi	Diltiazem HCl tablet 1x1
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-12: Olgu 2'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	67.330
Zararsız varyant sayısı	3.446
Olası zararsız varyant sayısı	800
VUS varyant sayısı	63.025
Olası patojenik varyant sayısı	51
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	24.727
Heterozigot varyant sayısı	42.603
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	62.912

Tablo 4-13: Olgu 2'ye ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar

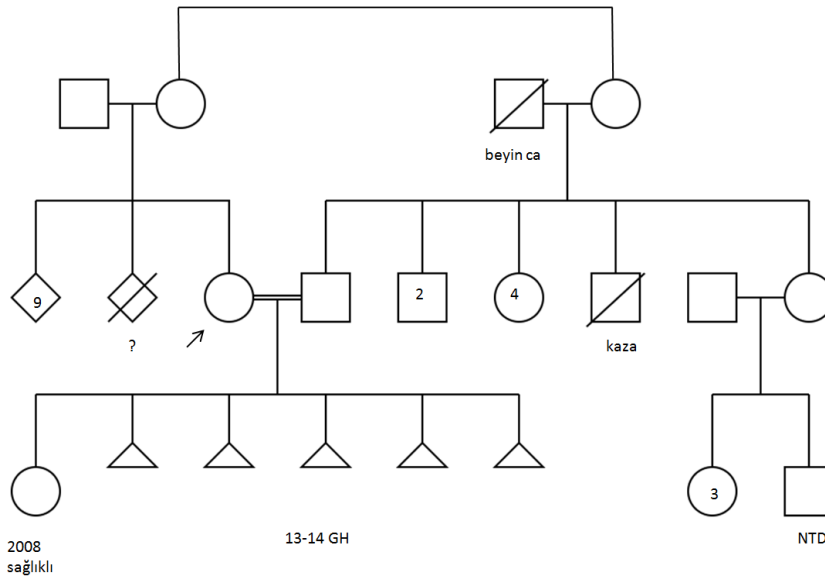
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PLG</i> (NM_000301.3)	OR	c.1848G>C p.W616C heterozigot	rs121918031 0,000003977	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 2'de plazminojen eksikliği ile ilişkilendirilmiş *PLG* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarında patojenik olarak

sınıflandırılmış bir varyant bulundu. Olgunun A13 gebelik ürünündeki fenotip bu gen ile uyumlu olabileceğinden, eşinde ve A13'e ait DNA örneğinde PZR ve Sanger dizileme çalışmaları yapıldı. Olgunun eşinin bu varyantı taşımadığı, fetusun ise heterozigot olarak taşıdığı tespit edildi. Çiftin 1.° kuzen olması nedeniyle genin diğer bölgeleri incelenmedi.

4.3.1.3. Olgu 3

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-3'te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-14'te, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) biyoinformatik analizi sonucunda elde edilen varyant sayıları Tablo 4-15'te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-16'da gösterildi.



Şekil 4-3: Olgu 3'e ait aile ağacı

Tablo 4-14: Olgu 3'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	36
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	24
Gebelik öyküsü	G6P1A5
Akrabalık	Eşiyle 1.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-4: <13. GH, A5: 13. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	A5: 46,XY; arr(1-22)x2,(X,Y)x1
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	G6(A5): Kistik higroma (14,1 mm),

	generalize cilt ödemi, hipoplazik nazal kemik
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	HSG: Gebelik kayıplarına sekonder uterin sineşiler, tuba uterina açık

Tablo 4-15: Olgu 3'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	77.015
Zararsız varyant sayısı	3.511
Olası zararsız varyant sayısı	923
VUS varyant sayısı	72.622
Olası patojenik varyant sayısı	2
Patojenik varyant sayısı	8
Homozigot varyant sayısı	23.939
Heterozigot varyant sayısı	53.076
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	72.371

Tablo 4-16: Olgu 3'e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar

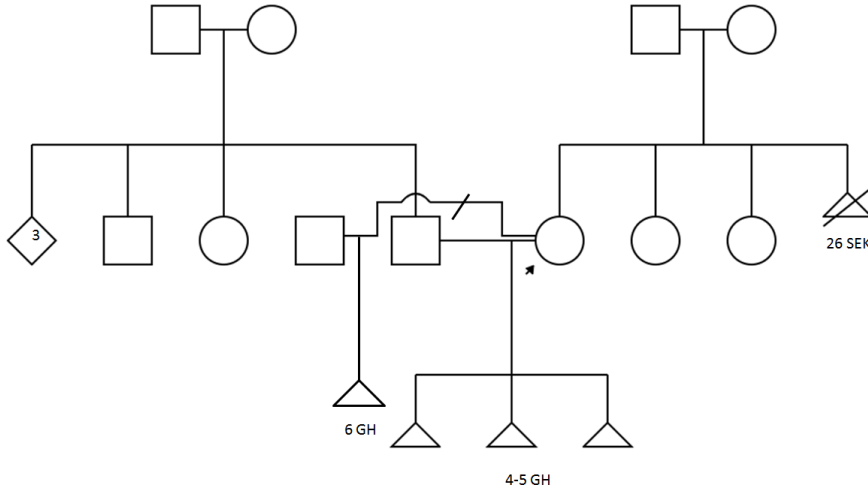
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>NOP14</i> (NM_003703.2)	?	c.2255C>T p.P752L heterozigot	rs13106867 0,006014	VUS (ACMG) olası patojenik (Polyphen) zararsız (SIFT)

Sonuç: Olgu 3'te, TKG etiolojisinde yer aldığı öne sürülen *NOP14* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen tahmin aracına göre olası patojenik ve SIFT tahmin aracına göre zararsız olarak sınıflandırılmış bir varyant saptandı. Olguya ait fetal DNA örneği ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmasında fetusun bu varyantı heterozigot olarak taşıdığı belirlendi.

4.3.1.4. Olgu 4

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-4'te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-17'de, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) biyoinformatik analizi sonucunda elde edilen varyant

sayıları Tablo 4-18’de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-19’da gösterildi.



Şekil 4-4: Olgu 4’e ait aile ağacı

Tablo 4-17: Olgu 4’e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	39
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	29
Gebelik öyküsü	G4A4
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH’sı	A1: 6. GH, A2-4: 4-5. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USGbulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	HSG: Sağ tubada ampüler segment düzeyinde oklüzyon

Tablo 4-18: Olgu 4’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	64.569
Zararsız varyant sayısı	3.248
Olası zararsız varyant sayısı	887
VUS varyant sayısı	60.421
Olası patojenik varyant sayısı	3

Patojenik varyant sayısı	13
Homozigot varyant sayısı	23.393
Heterozigot varyant sayısı	41.176
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	54.072

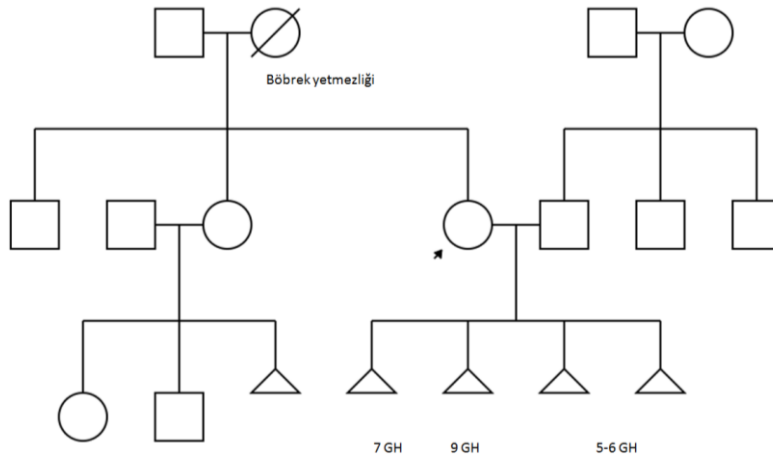
Tablo 4-19: Olgu 4’e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PIBF1</i> (NM_006346.2)	OR	c.1214G>A p.R405Q heterozigot	rs17089782 0,01362	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 4’te, daha önce siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *PIBF1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre ise patojenik olarak değerlendirilen bir varyant saptandı.

4.3.1.5. Olgu 5

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-5’te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-20’de, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) biyoinformatik analizi sonucunda elde edilen varyant sayıları Tablo 4-21’de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-22’de gösterildi.



Şekil 4-5: Olgu 5’e ait aile ağacı

Tablo 4-20: Olgu 5’e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	34
Pubertal gelişim	normal

İlk gebelik yaşı	25
Gebelik öyküsü	G4A4
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 7. GH, A2: 9. GH, A3-4: 5-6. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	A4: 46,XY
Geç fetal kayıp	-
Fetal bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-21: Olgu 5'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	75.206
Zararsız varyant sayısı	3.381
Olası zararsız varyant sayısı	894
VUS varyant sayısı	70.919
Olası patojenik varyant sayısı	3
Patojenik varyant sayısı	9
Homozigot varyant sayısı	23.921
Heterozigot varyant sayısı	51.285
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	70.705

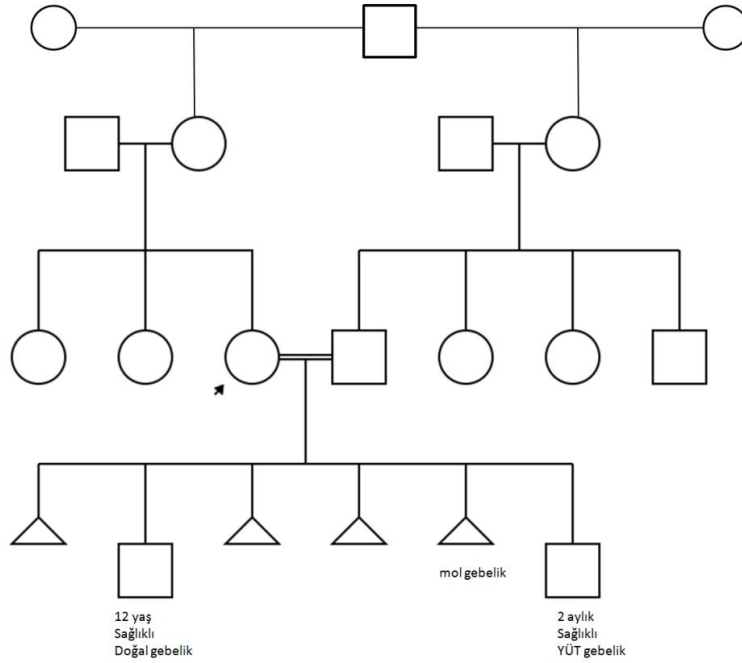
Tablo 4-22: Olgu 5'e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>BUB1B</i> (NM_001211.5)	OD, OR	c.485A>G p.Y162C heterozigot	rs1555381180 -	VUS (ACMG) patojenik (MutationTaster, SIFT)

Sonuç: Olgu 5'te, daha önce erken kromatid ayrılması ile ilişkilendirilmiş olan *BUB1B* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, MutationTaster ve SIFT tahmin araçlarına göre ise patojenik olarak değerlendirilen bir varyant saptandı.

4.3.1.6. Olgu 6

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-6'da, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-23'te, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-24'te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-25'te gösterildi.



Şekil 4-6: Olgu 6'ya ait aile ağacı

Tablo 4-23: Olgu 6'ya ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	33
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	16
Gebelik öyküsü	G6P2A4
Akrabalık	Eşiyle 1,5.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız (x1) ve başarılı YÜT (x1)
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 4. GH, A2-3: 6-7. GH, A4: parsiyel mol
Fetal/abortus karyotip analizi	A4(G5): 69,XXY
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik özellik	-

Tablo 4-24: Olgu 6'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	76.515
Zararsız varyant sayısı	3.440
Olası zararsız varyant sayısı	927
VUS varyant sayısı	72.136
Olası patojenik varyant sayısı	2
Patojenik varyant sayısı	10
Homozigot varyant sayısı	23.934
Heterozigot varyant sayısı	52.581
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	71.932

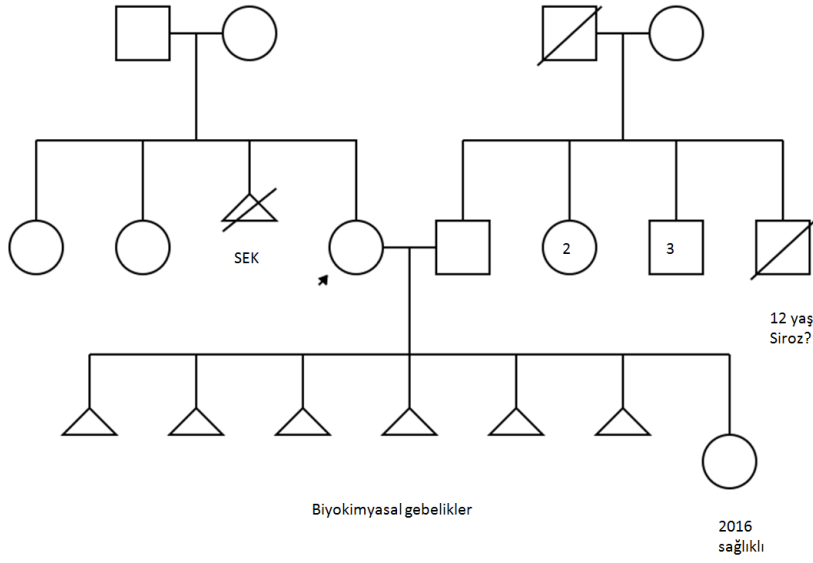
Tablo 4-25: Olgu 6'ya ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>KIF7</i> (NM_198525.2)	OR	c.3409T>C p.W1137R heterozigot	rs745809521 0,000004013	VUS (ACMG) patojenik (MutationTaster)
<i>ZAR1</i> (NM_175619.2)	?	c.1257C>G p.S419R heterozigot	rs150750718 0,0003783	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 6'da siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş olan *KIF7* geninde ve oositlerde aktif bir gen olan *ZAR1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant saptandı. *KIF7* genindeki varyant, olgunun 1,5.° kuzeni olan eşinde Sanger dizileme ile araştırıldı ve eşin de bu varyantı heterozigot olarak taşıdığı tespit edildi. *ZAR1* geni maternal etkili bir gen olduğundan eşinde ilgili gen varyantı incelenmedi.

4.3.1.7. Olgu 7

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-7'de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-26'da, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) ile yapılan biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-27'de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-28'de gösterildi.



Şekil 4-7: Olgu 7'ye ait aile ağacı

Tablo 4-26: Olgu 7'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	41
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G7P1A6
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	Bilinmiyor, biyokimyasal gebelikler
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	Hashimoto trioiditi
Varsa ilaç tedavisi	Trioid hormon replasmanı altında
Ek klinik özellik	-

Tablo 4-27: Olgu 7'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	71.087
Zararsız varyant sayısı	3.289
Olası zararsız varyant sayısı	834
VUS varyant sayısı	66.953
Olası patojenik varyant sayısı	3
Patojenik varyant sayısı	8
Homozigot varyant sayısı	22.667

Heterozigot varyant sayısı	48.420
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	66.769

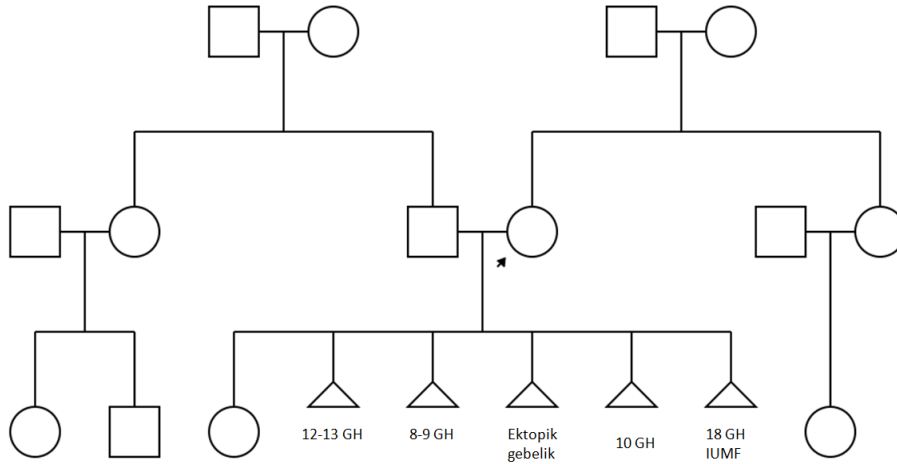
Tablo 4-28: Olgu 7'ye ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>HTRA4</i> (NM_153692.3)	?	c.1333G>C p.D445H heterozigot	rs139374339 0,001382	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 7'de daha önce preeklampsi ve plasenta gelişimi ile ilişkilendirilmiş *HTRA4* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılan bir varyant tespit edildi.

4.3.1.8. Olgu 8

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-8'de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-29'da, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-30'da ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-31'de gösterildi.



Şekil 4-8: Olgu 8'e ait aile ağacı

Tablo 4-29: Olgu 8'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	44
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	24
Gebelik öyküsü	G6P1A4Ektopik1

Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 12-13. GH, A2: 8-9. GH, A3: 10. GH, A4: 18. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	A4: 18. GH-IUFÖ
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik özellik	-

Tablo 4-30: Olgu 8'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	76.708
Zararsız varyant sayısı	3.662
Olası zararsız varyant sayısı	947
VUS varyant sayısı	72.087
Olası patojenik varyant sayısı	1
Patojenik varyant sayısı	11
Homozigot varyant sayısı	24.382
Heterozigot varyant sayısı	52.326
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	71.891

Tablo 4-31: Olgu 8'e ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar

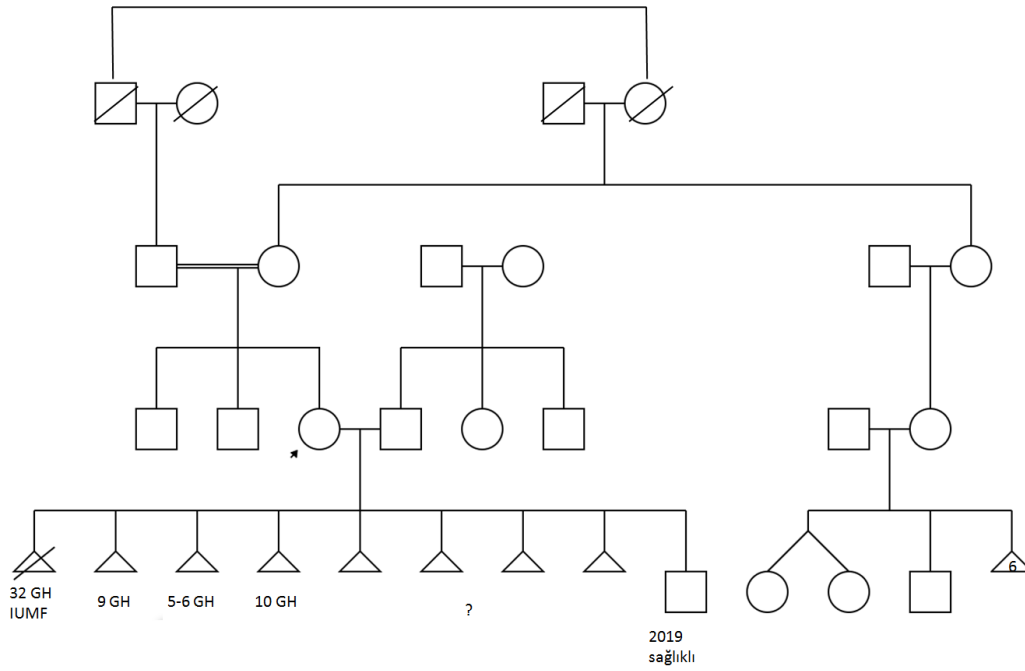
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>MMP7</i> (NM_002423.4)	?	c.55C>T p.P19S heterozigot	rs148198672 0,00006018	VUS (ACMG) olası patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 8'de doku yeniden düzenlenmesinde aktivite gösteren *MMP7* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre olası patojenik olarak sınıflandırılmış bir varyant saptandı.

4.3.1.9. Olgu 9

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-9'da, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-32'de, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Tablo 4-33'te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-34'te gösterildi.



Şekil 4-9: Olgu 9'a ait aile ağacı

Tablo 4-32: Olgu 9'a ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	35
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G9P1A7Ektopik1
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	Kuzeninde G5P1A4
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 9. GH, A2-3: 5-6. GH, A4: 10. GH, A5-7: ?
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	G1(A1): 32. GH-IUFÖ
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-33: Olgu 9'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	78.524
Zararsız varyant sayısı	3.735

Olası zararsız varyant sayısı	964
VUS varyant sayısı	73.808
Olası patojenik varyant sayısı	3
Patojenik varyant sayısı	14
Homozigot varyant sayısı	25.836
Heterozigot varyant sayısı	52.688
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	73.579

Tablo 4-34: Olgu 9’a ait TED veri analizi sonucunda saptanan fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>EIF4ENIF1</i> (NM_019843.3)	?	c.97G>A p.E33K heterozigot	rs11544091 0,003884	VUS (ACMG) olası patojenik (Polyphen) zararsız (SIFT)

Sonuç: Olgu 9’da daha önce POY ile ilişkilendirilmiş olan *EIF4ENIF1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen tahmin aracına göre olası patojenik ve SIFT tahmin aracına göre zararsız olarak değerlendirilen bir varyant bulundu.

4.3.1.10. Olgu 10

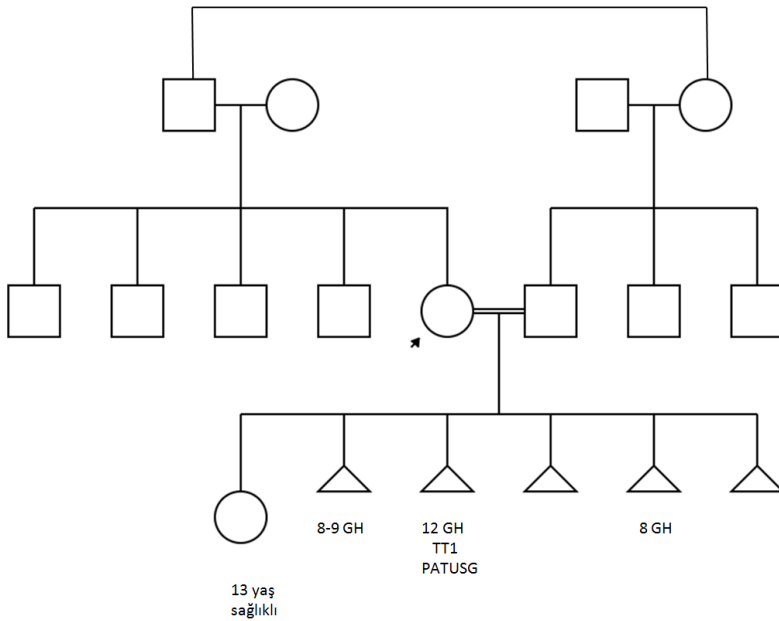
Olguya ait aile ağacı Şekil 4-10’da, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-35’te, TED verisinin (TÜBİTAK-MAM) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-36’da gösterildi.

Homozigot varyant sayısı	20.761
Heterozigot varyant sayısı	47.237
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	63.510

Sonuç: Olgu 10’da, bu çalışma kapsamında incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

4.3.1.11. Olgu 11

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-11’de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-37’de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-38’de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-39’da gösterildi.



Şekil 4-11: Olgu 11’e ait aile ağacı

Tablo 4-37: Olgu 11’e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	38
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G6P1TT1A4
Akrabalık	Eşiyle 1.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH’sı	A1, 3-5: 8-9. GH, A2: 13. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	G3(TT1): 46,--, A4(G6): 46, --
Geç fetal kayıp	-

Fetal USG bulgusu	G3(TT1): Üst ve alt ekstremitelerde distal kemikler yok, akrania, tek umbilikal arter, omfalosel, polidaktili, nazal kemik yok
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-38: Olgu 11'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	57.473
Zararsız varyant sayısı	45.632
Olası zararsız varyant sayısı	94
VUS varyant sayısı	11.713
Olası patojenik varyant sayısı	26
Patojenik varyant sayısı	8
Homozigot varyant sayısı	19.820
Heterozigot varyant sayısı	37.653
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	1.647
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	3

Tablo 4-39: Olgu 11'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>TTC21B</i> (NM_024753.4)	OD, OR	c.1546C>T p.Q516X heterozigot	rs779134983 0,00002389	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>CFTR</i> (NM_000492.3)	OD, OR	c.2476G>A p.E826K heterozigot	rs397508381 0,00002597	Olası patojenik (ACMG, Polyphen, SIFT)
<i>MCM8</i> (NM_032485.5)	OR	c.482A>G p.H161R heterozigot	rs140044814 0,001092	Olası patojenik (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>NEK4</i> (NM_003157.4)	?	c.1972C>T p.R658X heterozigot	rs765561559 0,00001591	Olası patojenik (ACMG) patojenik (MutationTaster)

<i>ALPPL2</i> (NM_031313.2)	?	c.280C>T p.P94S heterozigot	rs146482704 0,006520	VUS (ACMG) olası patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>SHBG</i> (NM_001040.5)	?	c.1126G>A p.D376N heterozigot	rs138612626 0,0003857	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 11’de yapılan analiz sonucunda ACMG kriterleri ve tahmin araçları sınıflandırmalarına göre siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *TTC21B* geninde patojenik, *CFTR* ve *NEK4* genleri ile POY etiyolojisi ile ilişkilendirilmiş olan *MCM8* geninde olası patojenik, plasentada aktivite gösteren *ALPPL2* ve anovulasyon ile ilişkilendirilmiş olan *SHBG* genlerinde ACMG kriterlerine VUS, tahmin araçlarına göre patojenik/olası patojenik olarak sınıflandırılmış toplam altı varyant bulundu. Patojenik olarak sınıflandırılmış *TTC21B* varyantının aile içi segregasyonu amacıyla eş DNA’sı ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda eşin bu varyantı heterozigot olarak taşıdığı tespit edildi. Olası patojenik olarak sınıflandırılmış *CFTR* varyantı için segregasyon çalışmaları sonucunda eşin bu varyantı taşımadığı bulundu.

4.3.1.12. Olgu 12

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-12’de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-40’ta, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-41’de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-42’de gösterildi.

Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	19.546
Heterozigot varyant sayısı	37.217
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.587
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	642

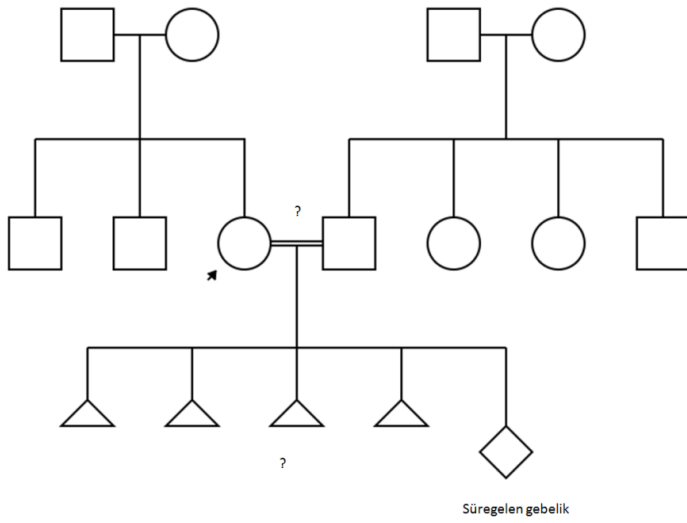
Tablo 4-42: Olgu 12'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>ZMPSTE24</i> (NM_005857.4)	OR	c.1105C>T p.R369X heterozigot	rs281875373 0,000003978	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>CFTR</i> (NM_000492.3)	OD, OR	c.2476G>A p.E826K heterozigot	rs397508381 0,00002597	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>FREM2</i> (NM_207361.5)	OR	c.5264-5T>G p.(?) heterozigot	rs375059201 0,0001703	VUS (ACMG)
<i>F5</i> (NM_000130.4)	OD, OR	c.1340C>T p.P447L heterozigot	rs368387623 0,00003184	VUS (ACMG) olası patojenik (Polyphen)

Sonuç: Olgu 12'de, ACMG kriterleri ve tahmin araçları ile yapılan analiz sonucunda daha önce letal restriktif dermati ile ilişkilendirilmiş *ZMPSTE24* geninde patojenik, siliyopatiler ile ilişkili *CFTR* geninde olası patojenik varyantlar saptanırken; embriyogenezde aktif *FREM2* ile koagülasyon kaskadında görevli *F5* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen tahmin aracına göre olası patojenik olarak sınıflandırılmış olan toplam dört varyant bulundu. Patojenik olarak sınıflandırılmış *ZMPSTE24* varyantının aile içi segregasyonu amacıyla eş DNA'sı ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda eşin bu varyantı taşımadığı tespit edildi.

4.3.1.13. Olgu 13

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-13'te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-43'te, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-44'te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-45'te gösterildi.



Şekil 4-13: Olgu 13'e ait aile ağacı

Tablo 4-43: Olgu 13'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	22
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	17
Gebelik öyküsü	G5P1A4
Akrabalık bilgisi	uzak
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-4: 8-9. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-44: Olgu 13'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.571
Zararsız varyant sayısı	44.845
Olası zararsız varyant sayısı	91
VUS varyant sayısı	11.614
Olası patojenik varyant sayısı	18
Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.685
Heterozigot varyant sayısı	36.886

Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	8.122
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	617

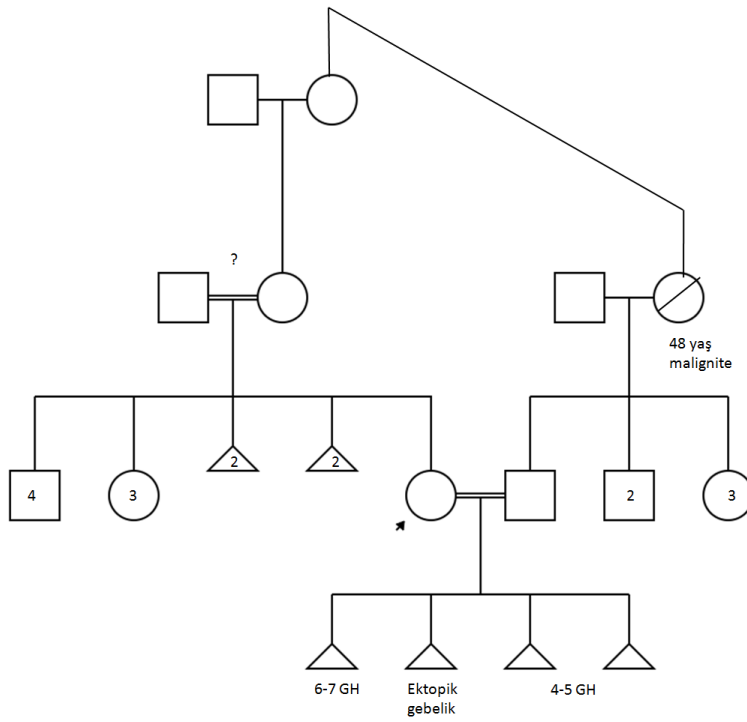
Tablo 4-45: Olgu 13'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CBS</i> (NM_000071.2)	OR	c.599C>T p.P200L heterozigot	rs758712880 0,00001603	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>COL11A1</i> (NM_001854.3)	OD, OR	c.3229C>A p.P1077T heterozigot	rs144562769 0,0001078	VUS (ACMG) patojenik (MutationTaster, SIFT)

Sonuç: Olgu 13'te, yapılan analiz sonucunda daha önce hiperhomosisteinemiye bağlı trombozlarla ilişkilendirilmiş *CBS* ve fibrokondrogenezis etiyolojisinde yer alan *COL11A1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

4.3.1.14. Olgu 14

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-14'te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-46'da, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-47'de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-48'de gösterildi.



Şekil 4-14: Olgı 14'e ait aile ağacı

Tablo 4-46: Olgı 14'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	24
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	20
Gebelik öyküsü	G4A3Ektopik1
Akrabalık	Eşiyle 1,5.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 6-7. GH, A2-3: 4-5. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	Anti CMV IgG-Toxo IgG +, AMH: 1,05 (↓)

Tablo 4-47: Olgı 14'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	55.414
Zararsız varyant sayısı	43.972

Olası zararsız varyant sayısı	82
VUS varyant sayısı	11.327
Olası patojenik varyant sayısı	31
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	20.472
Heterozigot varyant sayısı	34.942
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.565
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	624

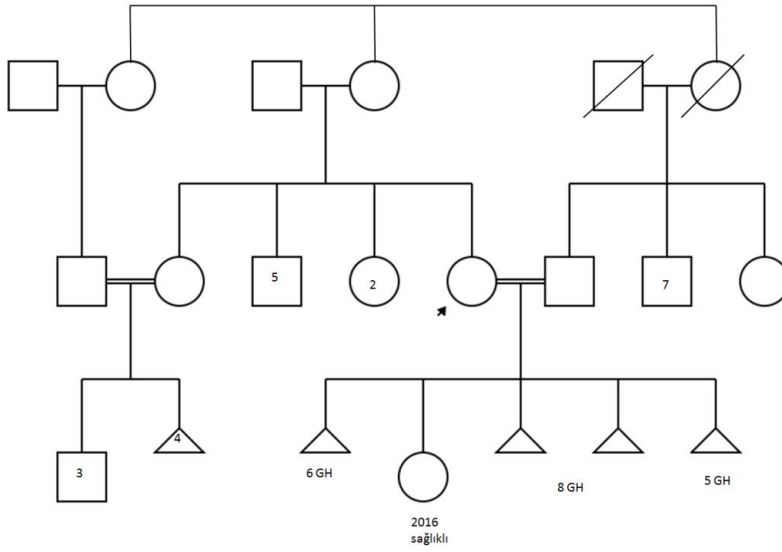
Tablo 4-48: Olgu 14'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>MMS19</i> (NM_022362.4)	?	c.484C>G p.R162G heterozigot	rs373557835 0,000003982	VUS (ACMG) olası patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>SPICE1</i> (NM_144718.3)	?	c.2508delA p.R836fs heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (GERP)
<i>UBTFL1</i> (NM_001143975.1)	?	c.99_101del p.33_34del heterozigot	- -	VUS (ACMG) zararsız (GERP)

Sonuç: Olgu 14'te yapılan analiz sonucunda, daha önce hayvan çalışmalarında susturulduğunda embriyolojik dönemde letal etki gösteren *MMS19* geninde Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre olası patojenik, hücre bölünmesinde etkin *SPICE1* geninde GERP tahmin aracına göre patojenik ve embriyogeneizde görevli *UBTFL1* geninde GERP tahmin aracına göre zararsız olarak nitelendirilen üç varyant bulundu ve bu varyantlar ACMG kriterlerine göre ise VUS olarak sınıflandırıldı.

4.3.1.15. Olgu 15

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-15'te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-49'da, TED verisinin (Enign Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-50'de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-51'de gösterildi.



Şekil 4-15: Olgu 15'e ait aile ağacı

Tablo 4-49: Olgu 15'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	36
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	30
Gebelik öyküsü	G5P1A4
Akrabalık	Eşiyle 1.° kuzen
Ailede benzer öykü	Kızkardeş: G8P3A5
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 6. GH, A2-3: 8. GH, A4: 5. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	2011 ve 2016 yılında miyomektomi öyküsü
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-50: Olgu 15'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	57.766
Zararsız varyant sayısı	45.881
Olası zararsız varyant sayısı	92
VUS varyant sayısı	11.766
Olası patojenik varyant sayısı	21
Patojenik varyant sayısı	6

Homozigot varyant sayısı	19.795
Heterozigot varyant sayısı	37.971
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	8.304
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	676

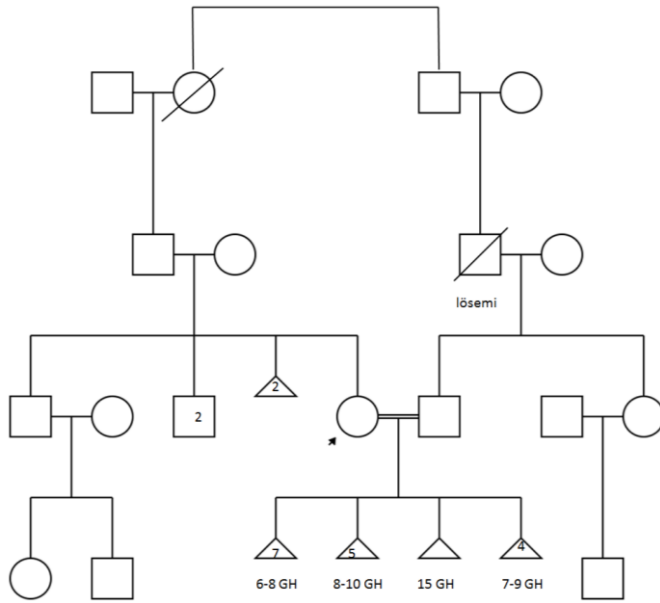
Tablo 4-51: Olgu 15'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen Transkript	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PATL2</i> (NM_001145112.1)	OR	c.839G>A p.R280Q heterozigot	rs569729547 0,00004854	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>ERCC6</i> (NM_001277059.1)	OD, OR	c.2609G>A p.R870Q heterozigot	rs200697187 0,0002349	Olası zararsız (ACMG, DANN, EIGEN, MVP, MutationTaster, REVEL, SIFT)

Sonuç: Olgu 15'te, yapılan analiz sonucunda OOMD ile ilişkilendirilmiş *PATL2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik ve OD kalıtmı POY nedeni olan *ERCC6* geninde ise ACMG kriterleri ve tahmin araçlarında olası zararsız olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

4.3.1.16. Olgu 16

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-16'da, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-52'de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-53'te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-54'te gösterildi.



Şekil 4-16: Olgu 16'ya ait aile ağacı

Tablo 4-52: Olgu 16'ya ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	39
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	24
Gebelik öyküsü	G17A17
Akrabalık	Eşiyle 2.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x2)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-12: 6-10. GH, A13: 15. GH, A14-17: 7-9. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	A12: 46,XX, A13:46,XX, A14: 46,XX
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	Gebeliklerin yarısında düşük molekül ağırlıklı heparin kullanımı
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-53: Olgu 16'ya ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	55.778
Zararsız varyant sayısı	44.460
Olası zararsız varyant sayısı	91

VUS varyant sayısı	11.198
Olası patojenik varyant sayısı	26
Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.932
Heterozigot varyant sayısı	35.846
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.355
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	661

Tablo 4-54: Olgu 16'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

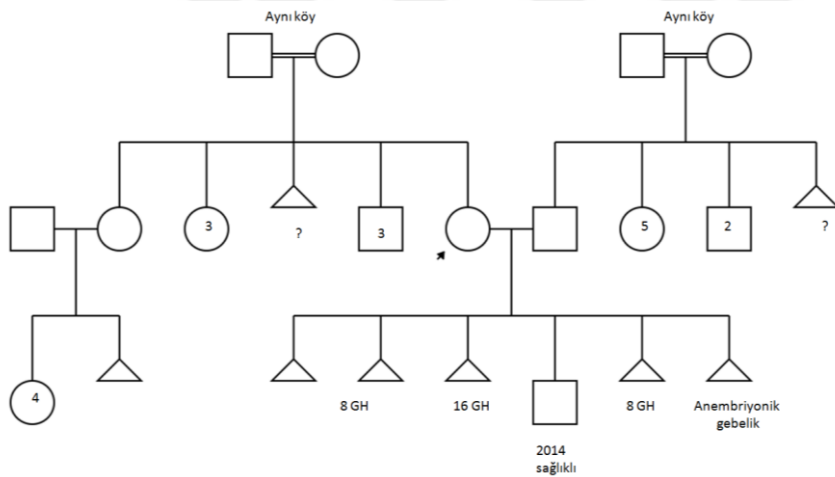
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CEP290</i> (NM_025114.3)	OR	c.7153 delA p.I2385X heterozigot	rs781310385 0,00000861	patojenik (ACMG, GERP)
<i>SLAIN1</i> (NM_001040153.3)	?	c.93G>A p.W31X heterozigot	rs550883909 0,000007437	Olası patojenik (ACMG) patojenik (MutationTaster)
<i>CCDC141</i> (NM_173648.3)	?	c.2611C>T p.Q871X heterozigot	rs764893847 0,00002217	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>HSF1</i> (NM_005526.3)	?	c.430G>A p.V144M heterozigot	rs1564620538 0,00000398	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationAssessor, MutationTaster, SIFT)
<i>LRIF1</i> (NM_018372.3)	?	c.1151C>G p.S384C heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (MutationAssessor, MutationTaster, SIFT)
<i>MMP10</i> (NM_002425.2)	?	c.497-2A>G heterozigot p.(?)	rs17860955 0,01321	VUS (ACMG) patojenik (IGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 16'da, yapılan analiz sonucunda daha önce siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *CEP290* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, embriyolojik dönemde etkin *SLAIN1* geninde olası patojenik, gamet hücrelerinin

üretimi ve plasenta gelişmesinde görevli *HSF1*, hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkili *CCDC141*, nükleer hormonların reseptör aktivitelerinin düzenlenmesinde yer alan *LRIF1* ve matriks metalloproteinazlarından kodlayan *MMP10* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam altı varyant bulundu. *CEP290* ve *SLAIN1* gen varyantlarının aile içi segregasyonu amacıyla aralarında 2.° kuzen evliliği olan eşe ait DNA ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda olgunun eşin *CEP290* c.7153delA ve *SLAIN1* c.93G>A varyantlarını taşımadığı tespit edildi.

4.3.1.17. Olgu 17

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-17’de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-55’te, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-56’da ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-57’de gösterildi.



Şekil 4-17: Olgu 17’ye ait aile ağacı

Tablo 4-55: Olgu 17’ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	31
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	23
Gebelik öyküsü	G6P1A5
Akrabalık bilgisi	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH’sı	A1-3, 5: 8. GH, A4: 16. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-

Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-56: Olgu 17'ye ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	55.715
Zararsız varyant sayısı	44.537
Olası zararsız varyant sayısı	68
VUS varyant sayısı	11.083
Olası patojenik varyant sayısı	25
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	19.391
Heterozigot varyant sayısı	36.324
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.296
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	584

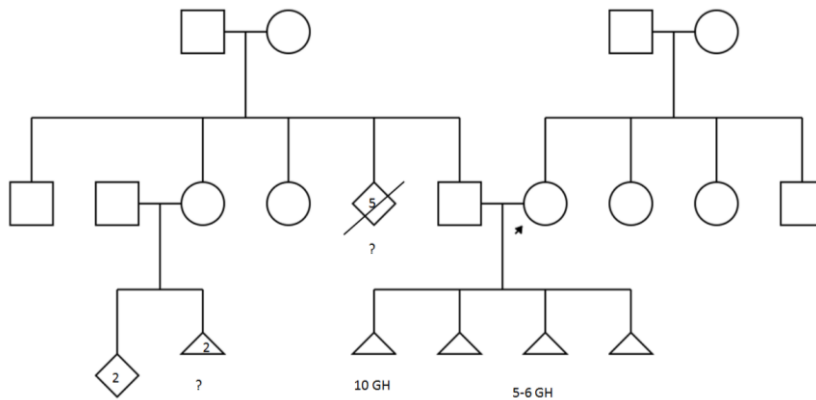
Tablo 4-57: Olgu 17'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CPT1B</i> (NM_004377.3)	?	c.1237G>A p.E413K heterozigot	rs745702877 0,00001070	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>IGSF10</i> (NM_178822.4)	?	c.352C>T p.R118X heterozigot	rs142596318 0,00006167	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 17'de, yapılan analiz sonucunda daha önce yapılmış hayvan çalışmalarında heterozigot taşıyıcılarda artmış abortus oranı ile ilişkilendirilmiş *CPT1B* ve GnRH nöronlarının embriyolojik dönemde göçünde etkin *IGSF10* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, varyant tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

4.3.1.18. Olgu 18

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-18’de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-58’de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-59’da ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-60’da gösterildi.



Şekil 4-18: Olgu 18'e ait aile ağacı

Tablo 4-58: Olgu 18'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	26
Paternal yaş	28
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	24
Gebelik öyküsü	G4A4
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 10. GH, A2-4: 5-6. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-59: Olgu 18'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	57.189
Zararsız varyant sayısı	45.214
Olası zararsız varyant sayısı	85

VUS varyant sayısı	11.853
Olası patojenik varyant sayısı	35
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	19.154
Heterozigot varyant sayısı	38.035
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	8.237
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	679

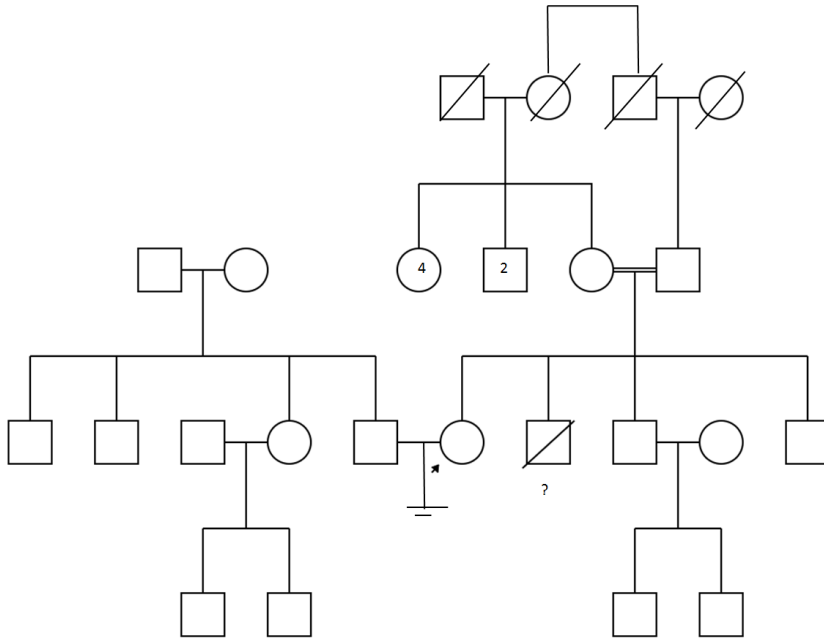
Tablo 4-60: Olgu 18'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>FLT1</i> (NM_002019.4)	?	c.3720+1G>A p.(?) heterozigot	rs1158779072 0,000003977	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>DYNC2H1</i> (NM_001377.2)	OR	c.10433C>A p.S3478Y heterozigot	rs372499560 0,00003820	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen)

Sonuç: Olgu 18'de, yapılan analiz sonucunda daha önce preeklampsisi ile ilişkilendirilmiş ve plasenta gelişiminde etkin *FLT1* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, siliyopatiler ile ilişkili *DYNC2H1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen tahmin aracına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

4.3.1.19. Olgu 19

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-19'da, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-61'de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-62'de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-63'te gösterildi.



Şekil 4-19: Olgu 19'a ait aile ağacı

Tablo 4-61: Olgu 19'a ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	31
Paternal yaş	33
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	-
Gebelik öyküsü	G0
Akrabalık	Anne ve babası 1.°kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Başarısız YÜT (x4)
Gebelik kaybı GH'sı	-
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	Boy kısalığı (-3,08 SD)
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	YÜT denemelerinde boş folikül sendromu şüphesi oluşmuş Grafide bilaretal proksimal radioulnar sinostoz, ulna hafif kısa

Tablo 4-62: Olgu 19'a ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	54.860
Zararsız varyant sayısı	43.560

Olası zararsız varyant sayısı	80
VUS varyant sayısı	11.199
Olası patojenik varyant sayısı	20
Patojenik varyant sayısı	1
Homozigot varyant sayısı	21.257
Heterozigot varyant sayısı	33.603
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.391
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	638

Tablo 4-63: Olgu 19'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>ZP1</i> (NM_207341.3)	OR	c.628C>T p.Q210X homozigot	rs776515172 0,00000851	VUS (ACMG) patojenik (MutationTaster)

Sonuç: Olgu 19'da, yapılan analiz sonucunda OOMD ile ilişkilendirilmiş *ZP1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS ve MutationTaster tahmin aracına göre patojenik olarak sınıflandırılmış bir varyant bulundu. Aile içi segregasyonu amacıyla olgunun anne ve babasına ait periferik kanlardan elde edilen DNA ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda anne ve babanın aynı varyantı heterozigot olarak taşıdığı tespit edildi.

4.3.1.20. Olgu 20

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-20'de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-64'te, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-65'te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-66'da gösterildi.

Heterozigot varyant sayısı	33.895
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.245
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	602

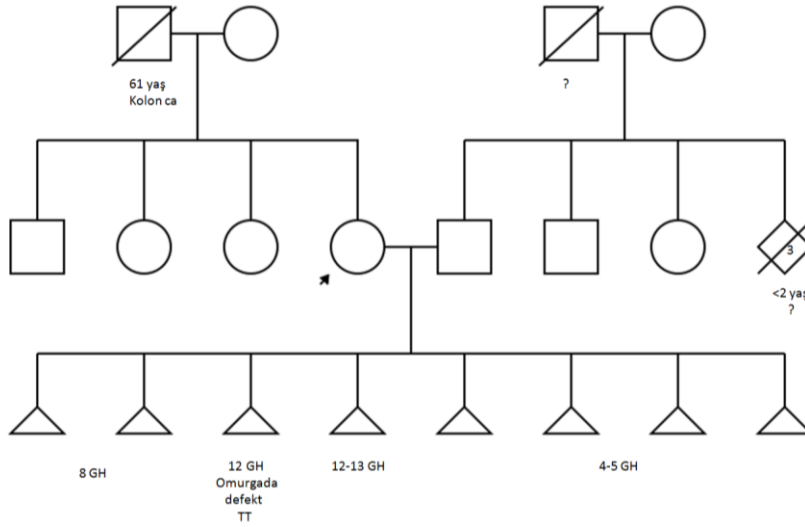
Tablo 4-66: Olgu 20'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>ACE</i> (NM_000789.3)	OR, ?	c.596C>T p.P199L heterozigot	rs553520266 0,00005326	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen)
<i>EGFR</i> (NM_005228.4)	OD, OR	c.500T>C p.I167T heterozigot	rs765416003 0,000007955	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>GLI3</i> (NM_000168.5)	OD	c.2179G>A p.G727R heterozigot	rs121917710 0,005317	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>MMP10</i> (NM_002425.2)	?	c.497-2A>G p.(?) heterozigot	rs17860955 0,01321	VUS (ACMG) patojenik (EIGEN, MutationTaster)
<i>SLC27A3</i> (NM_024330.1)	?	c.1208C>T p.S403L heterozigot	rs199984591 0,0001869	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 20'de, kan basıncının düzenlenmesinde görevli *ACE*, embriyolojik gelişmede aktif *EGFR*, siliyopatiler ilişkili *GLI3*, metalloproteinazları kodlayan *MMP10* ve yağ asidi metabolizmasında yer alan *SLC27A3* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış beş varyant bulundu.

4.3.1.21. Olgu 21

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-21'de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-67'de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-68'de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-69'da gösterildi.



Şekil 4-21: Olgu 21'e ait aile ağacı

Tablo 4-67: Olgu 21'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	36
Paternal yaş	40
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G8A8
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-2: 8. GH, A3-4: 12-13. GH, A5-A8: 4-5. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	A3(G3-TT1): 46,--, A8: 46,--
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	G3(TT1): lomber spina bifida, kifoskolyoz
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-68: Olgu 21'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.499
Zararsız varyant sayısı	44.950
Olası zararsız varyant sayısı	69
VUS varyant sayısı	11.448
Olası patojenik varyant sayısı	31

Patojenik varyant sayısı	1
Homozigot varyant sayısı	19.698
Heterozigot varyant sayısı	36.801
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.830
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	631

Tablo 4-69: Olgu 21'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

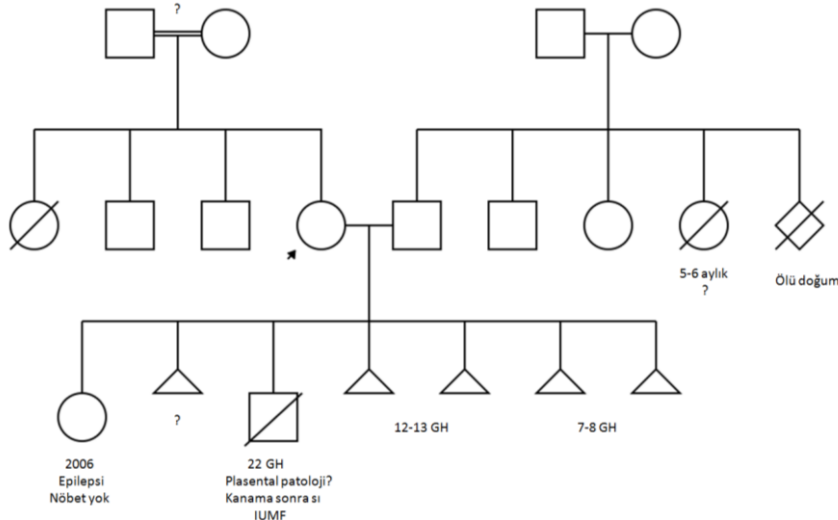
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PKHD1</i> (NM_138694.3)	OR	c.8519G>A p.R2840H heterozigot	rs373643848 0,00005336	Olası patojenik (ACMG, M-CAP)
<i>CELSR1</i> (NM_014246.1)	?	c.2110A>G p.S704G heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (DANN, MutationAssessor, MutationTaster, SIFT)
<i>MMP26</i> (NM_021801.4)	?	c.470-3C>T p.(?) heterozigot	- -	VUS (ACMG) zararsız (DANN)
<i>WNT6</i> (NM_006522.3)	?	c.208C>G p.R70G heterozigot	rs142171369 0,0007472	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 21'de, daha önce siliyer aktivite ve siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *PKHD1* geninde ACMG kriterleri ve M-CAP tahmin aracına göre olası patojenik; *CELSR1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik; metalloproteinazları kodlayan *MMP26* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, DANN tahmin aracına göre zararsız ve embriyolojik dönemde etkin *WNT6* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam dört varyant bulundu.

4.3.1.22. Olgu 22

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-22'de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-70'de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde

edilen varyant sayıları Tablo 4-71’de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-72’de gösterildi.



Şekil 4-22: Olgu 22’ye ait aile ağacı

Tablo 4-70: Olgu 22’ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	37
Paternal yaş	38
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	23
Gebelik öyküsü	G7P1A5IUFO1
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH’sı	A1: ?, A2,4: 12-13. GH, A5-6: 7-8 GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	G3: 22. GH
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-71: Olgu 22’ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	54.890
Zararsız varyant sayısı	43.722
Olası zararsız varyant sayısı	63
VUS varyant sayısı	11.063

Olası patojenik varyant sayısı	38
Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	20.818
Heterozigot varyant sayısı	34.072
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	7.267
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	610

Tablo 4-72: Olgu 22'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

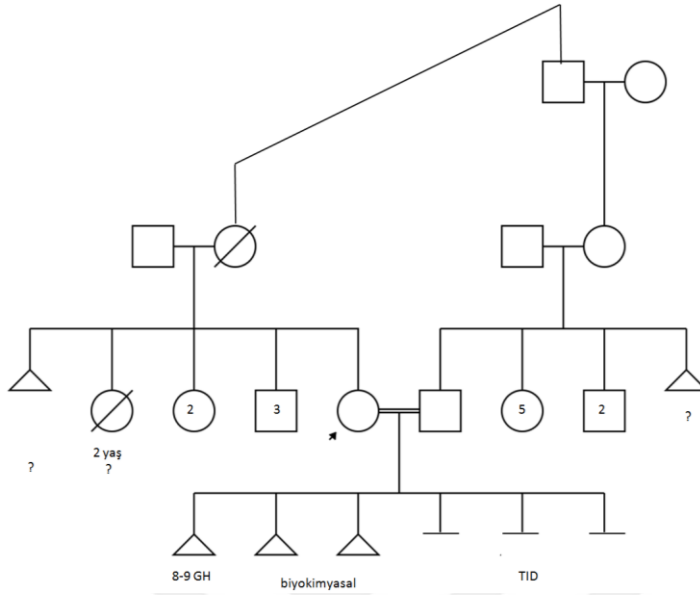
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>H6PD</i> (NM_004285.3)	OR	c.1171_1181del p.S391fs heterozigot	- -	patojenik (ACMG, GERP)
<i>ALPL</i> (NM_000478.5)	OR	c.931G>A p.E311K heterozigot	rs763457259 0,00003189	Olası patojenik (ACMG, Polyphen, SIFT)
<i>CXCL8</i> (NM_000584.3)	?	c.231T>A p.C77X heterozigot	rs536774132 0,00005997	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>HLA-DRB5</i> (NM_002125.3)	?	c.100+1G>C p.(?) heterozigot	rs79192142 0,02982	VUS (ACMG) zararsız (DANN, EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 22'de, kortizon redüktaz eksiliğine yol açan *H6PD* geninde ACMG kriterleri ve GERP tahmin aracına göre patojenik; hipofofatazya ilişkili *ALPL* geninde ACMG kriterleri, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre olası patojenik; immün sistemde aktif rol alan *CXCL8* ve *HLA-DRB5* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik ve zararsız olarak sınıflandırılmış toplam dört varyant bulundu. Olası patojenik olarak sınıflandırılmış *ALPL* varyantı, bu genin fetal letal sendromlar ile ilişkisi bilindiğinden ve elimizde tüm gen için tasarlanmış primerler olduğundan, eşe ait DNA ile tüm gen PZR ve Sanger dizileme çalışmalarının yapılması planlandı.

4.3.1.23. Olgu 23

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-23'de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-73'te, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen

varyant sayıları Tablo 4-74'te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-75'de gösterildi.



Şekil 4-23: Olgu 23'e ait aile ağacı

Tablo 4-73: Olgu 23'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	43
Paternal yaş	43
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	22
Gebelik öyküsü	G3A3
Akrabalık bilgisi	Eşiyle 1,5.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x3)
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 8-9. GH, A2-3: biyokimyasal, TİK (x3)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-74: Olgu 23'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.885
Zararsız varyant sayısı	45.155

Olası zararsız varyant sayısı	104
VUS varyant sayısı	11.593
Olası patojenik varyant sayısı	26
Patojenik varyant sayısı	7
Homozigot varyant sayısı	20.240
Heterozigot varyant sayısı	36.645
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.881
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	610

Tablo 4-75: Olgu 23'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

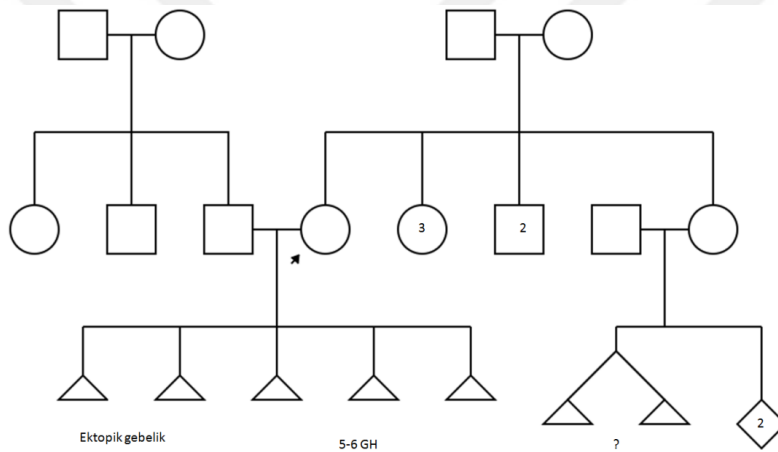
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CCNO</i> (NM_021147.4)	OR	c.481_482del p.L161fs heterozigot	rs587777503 0,000007077	patojenik (ACMG, GERP)
<i>IGF2</i> (NM_001127598.2)	OD	c.97C>T p.Q33X heterozigot	rs200441006 0,0007939	patojenik (ACMG)
<i>PKD1L1</i> (NM_138295.3)	OR	c.5515delC p.L1839fs heterozigot	- -	patojenik (ACMG, GERP)
<i>CTBP2</i> (NM_001321013.1)	?	c.9delT p.L3fs heterozigot	rs144283283 -	VUS (ACMG) patojenik (GERP)
<i>EXO1</i> (NM_006027.4)	?	c.2222_2223del p.L741fs heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (GERP)
<i>HLA-DRB5</i> (NM_002125.3)	?	c.100+1G>C p.(?) heterozigot	rs79192142 0,02982	VUS (ACMG) zararsız (DANN, EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 23'te, daha önce siliyer aktivite ve siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *CCNO* ve *PKD1L1* genleri ile embriyolojik dönemde gelişme basamaklarında etkin *IGF2* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, hücre bölünmesinde aktif *CTBP2*, DNA tamir yolağında görevli *EXO1* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik ve immün sistemde yer alan

HLA-DRB5 geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre zararsız olarak sınıflandırılmış toplam altı varyant bulundu. Patojenik olarak nitelendirilen *IGF2* varyantının konfirmasyonunun yapılmasının arkasından aile içi segregasyonu amacıyla olgunun babasına ait DNA ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda babanın da bu varyantı heterozigot olarak taşıdığı tespit edildi.

4.3.1.24. Olgu 24

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-24'te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-76'da, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-77'de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-78'de gösterildi.



Şekil 4-24: Olgu 24'e ait aile ağacı

Tablo 4-76: Olgu 24'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	34
Paternal yaş	42
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	30
Gebelik öyküsü	G5A3Ektopik2
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-A5: 5-6. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-

Ek klinik bulgu	Anti CMV IgG +, Anti Toxoplasma IgG +, Anti Rubella IgG +
-----------------	---

Tablo 4-77: Olgu 24’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.687
Zararsız varyant sayısı	45.150
Olası zararsız varyant sayısı	76
VUS varyant sayısı	11.430
Olası patojenik varyant sayısı	29
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	19.691
Heterozigot varyant sayısı	36.996
Toplum sıklığı < %0,1 olan varyant sayısı	7.517
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	605

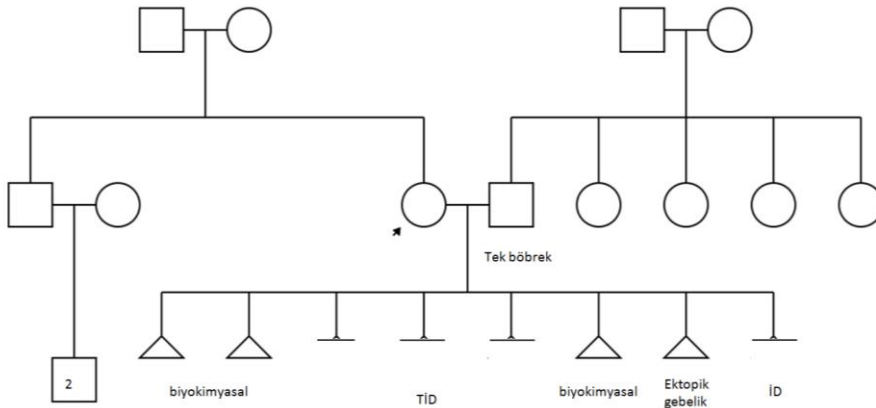
Tablo 4-78: Olgu 24’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CCDC141</i> (NM_173648.3)	?	c.2611C>T p.Q871X heterozigot	rs764893847 0,00002217	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>CPT1B</i> (NM_004377.3)	?	c.167C>T p.P56L heterozigot	rs374480938 0,00001610	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 24’te, hipogonadotropik hipogonadizm etiyolojisinde yer alan *CCDC141* ve yapılmış hayvan çalışmalarında heterozigot taşıyıcılarda artmış spontan abortus oranı ile ilişkilendirilmiş *CPT1B* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

4.3.1.25. Olgu 25

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-25’te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-79’da, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-80’de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-81’de gösterildi.



Şekil 4-25: Olgu 25'e ait aile ağacı

Tablo 4-79: Olgu 25'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	38
Paternal yaş	32
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	35
Gebelik öyküsü	G5A4Ektopik1
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x4)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-A4: biyokimyasal, TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	Eşte tek böbrek
Varsa ilaç tedavisi	Gebelikler esnasında düşük moleküler ağırlıklı heparin kullanımı
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-80: Olgu 25'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.766
Zararsız varyant sayısı	45.243
Olası zararsız varyant sayısı	101
VUS varyant sayısı	11.392
Olası patojenik varyant sayısı	26
Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	19.651
Heterozigot varyant sayısı	37.115
Toplum sıklığı < %0,1 olan varyant sayısı	7.611

Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	649
--	-----

Tablo 4-81: Olgu 25'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CCNA2</i> (NM_001237.4)	?	c.214-2insT p.(?) heterozigot	rs199853275 0,000253	VUS (ACMG) patojenik (GERP)
<i>MSH5</i> (NM_025259.5)	OR	c.1859A>G p.K620R heterozigot	rs61748589 0,005628	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>PAPLN</i> (NM_173462.3)	?	c.2077C>T p.R693W heterozigot	rs146740904 0,0001097	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>ZSCAN4</i> (NM_152677.2)	?	c.412C>T p.Q138X heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 25'te, yapılan analiz sonucunda embriyolojik dönemde etkin hücre döngüsünde görevli *CCNA2*, OR kalıtlımlı POY ile ilişkilendirilmiş *MSH5*, ayrıca embriyolojik gelişme basamaklarında yer alan *PAPLN* ve *ZSCAN4* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış dört varyant bulundu.

4.3.1.26. Olgu 26

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-26'da, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-82'de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-83'te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-84'te gösterildi.

Olası patojenik varyant sayısı	21
Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	20.718
Heterozigot varyant sayısı	35.873
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	7.748
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	620

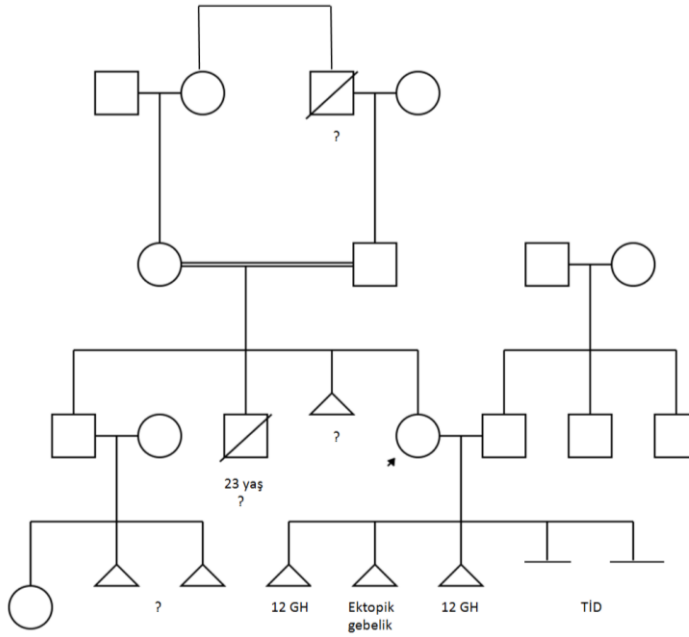
Tablo 4-84: Olgu 26'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PROKR2</i> (NM_144773.3)	OD	c.518T>G p.L173R heterozigot	rs74315416 0,002196	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 26'da, yapılan analiz sonucunda daha önce Kallmann sendromu ile ilişkilendirilmiş *PROKR2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış bir varyant bulundu.

4.3.1.27. Olgu 27

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-27'de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-85'te, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-86'da ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-87'de gösterildi.



Şekil 4-27: Olgu 27'ye ait aile ağacı

Tablo 4-85: Olgu 27'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	41
Paternal yaş	34
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	35
Gebelik öyküsü	G3A2Ektopik1
Akrabalık bilgisi	Anne ve babası 1.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x2)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-3: 12. GH, A2: 8-9. GH, TİK (x2)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	Hashimoto trioiditi 2019 yılında submüköz miyomektomi
Varsa ilaç tedavisi	Tiroid hormon replasmanı (75 mcg 1x1)
Ek klinik bulgu	Anti-TPO ve anti-TG ↑

Tablo 4-86: Olgu 27'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.781
-----------------------	--------

Zararsız varyant sayısı	45.010
Olası zararsız varyant sayısı	79
VUS varyant sayısı	11.667
Olası patojenik varyant sayısı	23
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	19.936
Heterozigot varyant sayısı	36.845
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	8.298
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	673

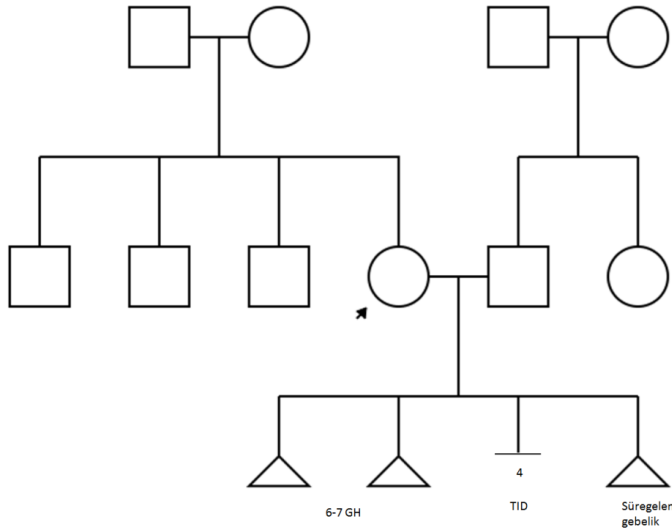
Tablo 4-87: Olgu 27'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CBS</i> (NM_000071.2)	OR	c.1105C>T p.R369C heterozigot	rs117687681 0,003011	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>NOP14</i> (NM_003703.2)	?	c.376G>A p.E126K heterozigot	rs777356082 0,00003602	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>SLC5A5</i> (NM_000453.2)	OR	c.1225G>A p.G409R heterozigot	rs779236022 0,00003980	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 27'de, yapılan analiz sonucunda, hiperhomosisteinemiye bağlı tromboz ile ilişkili *CBS*, daha önce yapılmış çalışmalarda TGK ile ilişkili olabileceği öne sürülmüş *NOP14*, OR kalıtlı tiroid dishormonogezisi ile ilişkili *SLC5A5* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış üç varyant bulundu.

4.3.1.28. Olgu 28

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-28'de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-88'de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-89'da ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-90'da gösterildi.



Şekil 4-28: Olgı 28'e ait aile ağacı

Tablo 4-88: Olgı 28'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	32
Paternal yaş	39
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G3A2Süregelen1
Akrabalık bilgisi	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	YÜT (x7)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-2: 6-7 GH, TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	G3(süregelen gebelik): 46,--.arr[GRCh37]Xp22.11 (23755758_24259891)x0
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	Ense kalınlığında artış (3,8 mm)
Ek hastalık öyküsü	PKOS
Varsa ilaç tedavisi	Tiroid hormon replasmanı (75 mcg 1x1)
Ek klinik bulgu	Anti-TPO ve anti-TG ↑

Tablo 4-89: Olgı 28'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.489
Zararsız varyant sayısı	45.119
Olası zararsız varyant sayısı	85
VUS varyant sayısı	11.262
Olası patojenik varyant sayısı	20

Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.368
Heterozigot varyant sayısı	37.121
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.508
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	573

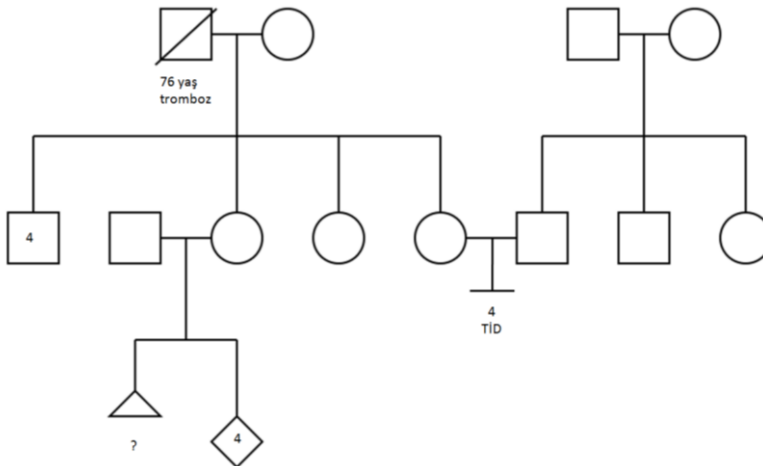
Tablo 4-90: Olgu 28'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PROKR1</i> (NM_138964.3)	OD	c.886T>C p.C296R heterozigot	rs200892456 0,00003181	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>TPO</i> (NM_000547.5)	OR	c.512C>T p.T171M heterozigot	rs139312937 0,00002829	VUS (ACMG) patojenik (SIFT)

Sonuç: Olgu 28'de, Kallmann sendromu ile ilişkilendirilmiş *PROKR1* ve OR kalıtmı tiroid dishormonogezine yol açan *TPO* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

4.3.1.29. Olgu 29

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-29'da, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-91'de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-92'de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-93'te gösterildi.



Şekil 4-29: Olgu 29'a ait aile ağacı

Tablo 4-91: Olgu 29'a ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	43
Paternal yaş	45
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G0
Akrabalık bilgisi	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Başarısız YÜT (x4)
Gebelik kaybı GH'sı	TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	Testis biyopsisi: spermatid düzeyinde duraklayan spermatogenez

Tablo 4-92: Olgu 29'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.542
Zararsız varyant sayısı	44.912
Olası zararsız varyant sayısı	88
VUS varyant sayısı	11.511
Olası patojenik varyant sayısı	30
Patojenik varyant sayısı	1
Homozigot varyant sayısı	19.720
Heterozigot varyant sayısı	36.822
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.700
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	590

Tablo 4-93: Olgu 29'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

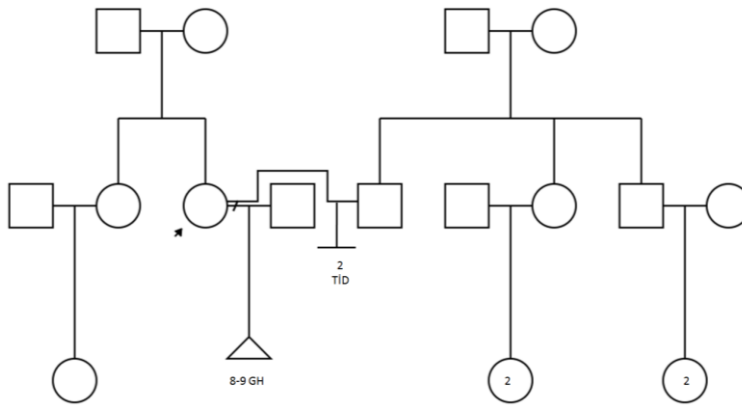
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CYP17A1</i> (NM_000102.3)	OR	c.1487G>A p.R496H heterozigot	rs763398879 0,000008281	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)

<i>ACE</i> (NM_000789.3)	OR	c.1739C>A p.P580H heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (DANN, MutationAssessor, MutationTaster, PrimateAI, SIFT)
<i>ALPPL2</i> (NM_031313.2)	?	c.68-1G>C p.(?) heterozigot	rs201675300 0,00008754	VUS (ACMG)

Sonuç: Olgu 29’da, 17 α hidroksilaz eksikliğine yol açan *CYP17A1* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre olası patojenik, kan basıncı düzenlenmesinde görevli *ACE* ve plasental alkalen fosfataz enzimini kodlayan *ALPPL2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam üç varyant bulundu.

4.3.1.30. Olgu 30

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-30’da, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-94’te, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-95’te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-96’da gösterildi.



Şekil 4-30: Olgu 30’a ait aile ağacı

Tablo 4-94: Olgu 30’a ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	42
Paternal yaş	43
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	30
Gebelik öyküsü	G1A1
Akrabalık	yok

Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x5)
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 8-9. GH, TİK (x2)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	Spermiyogram: az hareketli spermiler

Tablo 4-95: Olgu 30'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.343
Zararsız varyant sayısı	44.920
Olası zararsız varyant sayısı	79
VUS varyant sayısı	11.305
Olası patojenik varyant sayısı	38
Patojenik varyant sayısı	1
Homozigot varyant sayısı	19.512
Heterozigot varyant sayısı	36.831
Toplum sıklığı < %0,1 olan varyant sayısı	7.675
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	551

Tablo 4-96: Olgu 30'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

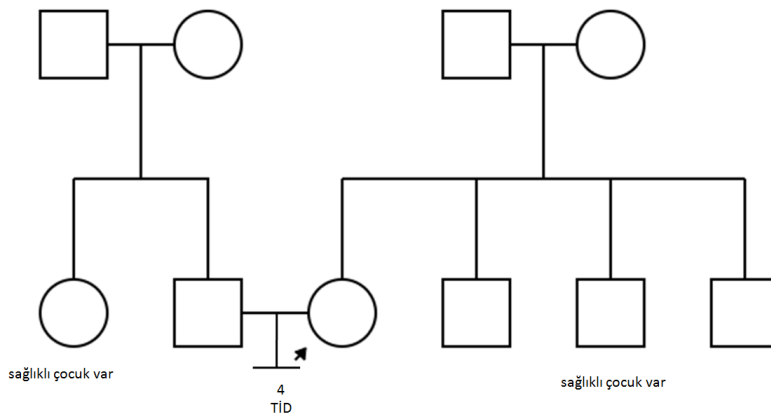
Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CEP290</i> (NM_025114.3)	OR	c.5493delA p.K1831fs heterozigot	rs386834158 0,00002236	patojenik (ACMG, GERP)
<i>DUOX2</i> (NM_014080.4)	OR	c.1825C>T p.P609S heterozigot	rs201221237 0,00007665	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>FBN3</i> (NM_032447.4)	?	c.2957-2A>T p.(?) heterozigot	rs767566930 0,00002122	VUS (ACMG) patojenik (EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 30'da, yapılan analiz sonucunda siliyopatiler ile ilişkili *CEP290* geninde ACMG kriterleri ve GERP tahmin aracına göre patojenik, OR kalıtmıli tiroid dishormonogenezine yol açan *DUOX2* geninde ACMG kriterleri ile SIFT ve Polyphen

tahmin aracına göre olası patojenik ve PKOS ile ilişkisi olduğu öne sürülmüş *FBN3* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, EIGEN ve MutationTaster tahmin araçlarında patojenik olarak sınıflandırılmış toplam üç varyant bulundu.

4.3.1.31. Olgu 31

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-31’de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-97’de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-98’de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-99’da gösterildi.



Şekil 4-31: Olgu 31’e ait aile ağacı

Tablo 4-97: Olgu 31’e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	43
Paternal yaş	43
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	-
Gebelik öyküsü	G0
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Başarısız YÜT (x4)
Gebelik kaybı GH’sı	TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-98: Olgu 31’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.570
-----------------------	--------

Zararsız varyant sayısı	45.263
Olası zararsız varyant sayısı	75
VUS varyant sayısı	11.203
Olası patojenik varyant sayısı	25
Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	19.711
Heterozigot varyant sayısı	36.859
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.573
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	528

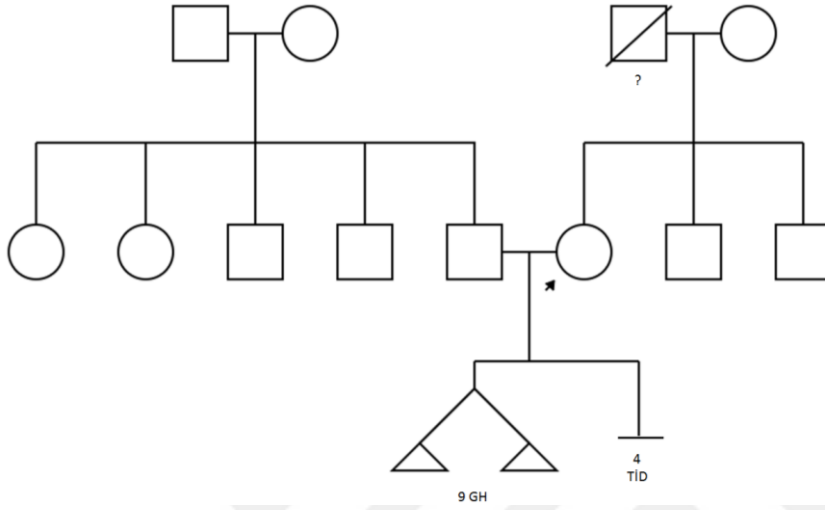
Tablo 4-99: Olgu 31'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>MTOR</i> (NM_004958.3)	OD	c.307C>T p.R103X heterozigot	rs768374086 0,000003999	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>DUOX2</i> (NM_014080.4)	OR	c.1126C>T p.R376W heterozigot	rs119472029 0,00008131	Olası patojenik (ACMG, SIFT, polyphen)
<i>NOBOX</i> (NM_001080413.3)	OD	c.1067G>A p.R356Q heterozigot	rs749172175 0,00001209	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>VEGFA</i> (NM_001025366.2)	?	c.100C>T p.P34S heterozigot	rs749282093 0,000009305	VUS (ACMG) patojenik (SIFT)

Sonuç: Olgu 31'de, yapılan analiz sonucunda daha önce hücre döngüsünde etkin *MTOR* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, OR kalıtmıli tiroid dishormonogenezine yol açan *DUOX2* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre olası patojenik, OD kalıtmıli POY etiyolojisinde yer alan *NOBOX* geni ve anjiyogenezde rol oynayan temel genlerden *VEGFA* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam dört varyant bulundu.

4.3.1.32. Olgu 32

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-32’de, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-100’de, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-101’de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-102’de gösterildi.



Şekil 4-32: Olgu 32’ye ait aile ağacı

Tablo 4-100: Olgu 32’ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	61
Paternal yaş	63
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	31
Gebelik öyküsü	G1A2
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	YÜT (x5)
Gebelik kaybı GH’sı	A1-2: 9. GH, TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-101: Olgu 32’ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	55.998
Zararsız varyant sayısı	44.791
Olası zararsız varyant sayısı	83
VUS varyant sayısı	11.108

Olası patojenik varyant sayısı	13
Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.506
Heterozigot varyant sayısı	36.492
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.338
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	531

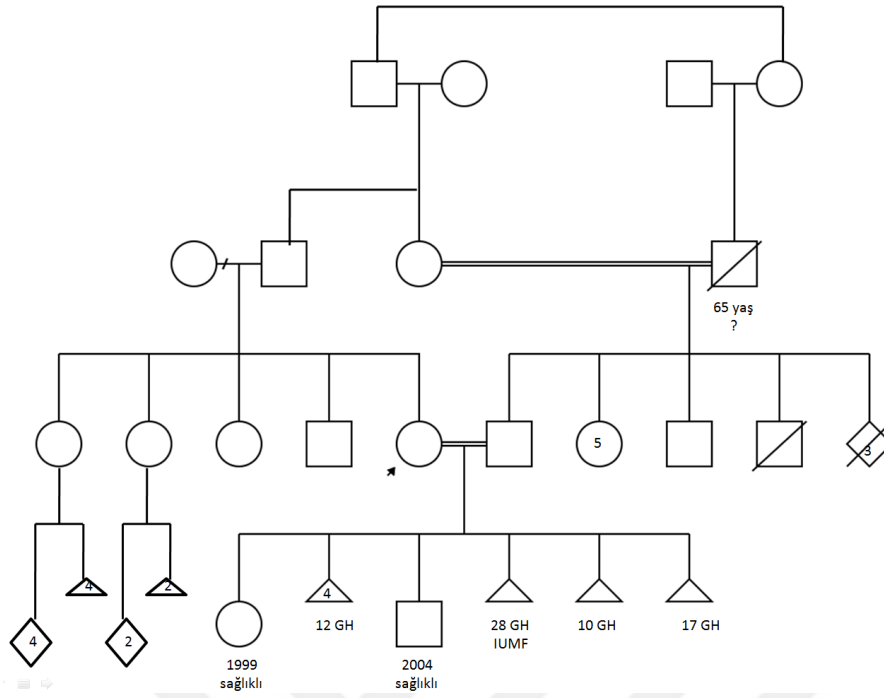
Tablo 4-102: Olgu 32'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>KIF13A</i> (NM_001105566.2)	?	c.932G>A p.W311X heterozigot	- -	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>MAT1A</i> (NM_000429.2)	OD, OR	c.125T>C p.L42P heterozigot	rs1484187055 0,000003976	VUS (ACMG) patojenik (SIFT, Polyphen)

Sonuç: Olgu 32'de, yapılan analiz sonucunda siliyer aktivitede rol oynayan *KIF13A* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, hipermetiyoninemiye yol açan *MAT1A* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam iki varyant bulundu.

4.3.1.33. Olgu 33

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-33'te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-103'te, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-104'te ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-105'te gösterildi.



Şekil 4-33: Olgu 33'e ait aile ağacı

Tablo 4-103: Olgu 33'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	46
Paternal yaş	45
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	25
Gebelik öyküsü	G9P2A7
Akrabalık	1.° kuzen
Ailede benzer öykü	Kızkardeş: G8P4A4, Kızkardeş: G4P2A2
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-4: 12. GH, A5: 28. GH, A6: 10. GH, A7: 17. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	G7: 28 GH
Fetal USG bulgusu	A7(G9): 17 GH erkek fetus, majör anomali yok, sendromik bulgu yok
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-104: Olgu 33'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	57.345
Zararsız varyant sayısı	45.309
Olası zararsız varyant sayısı	87

VUS varyant sayısı	11.914
Olası patojenik varyant sayısı	32
Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.600
Heterozigot varyant sayısı	37.745
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	8.095
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	625

Tablo 4-105: Olgu 33’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CFTR</i> (NM_000492.3)	OD, OR	c.3154T>G p.F1052V heterozigot	rs150212784 0,0006282	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>ANXA6</i> (NM_001155.4)	?	c.1117C>T p.R373W heterozigot	rs1249929192 -	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 33’te, kistik fibroz etkeni olan *CFTR* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre olası patojenik ve prostaglandin sekresyonunda yer alan *ANXA6* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam iki varyant bulundu.

4.3.1.34. Olgu 34

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-34’te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-106’da, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-107’de ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-108’de gösterildi.

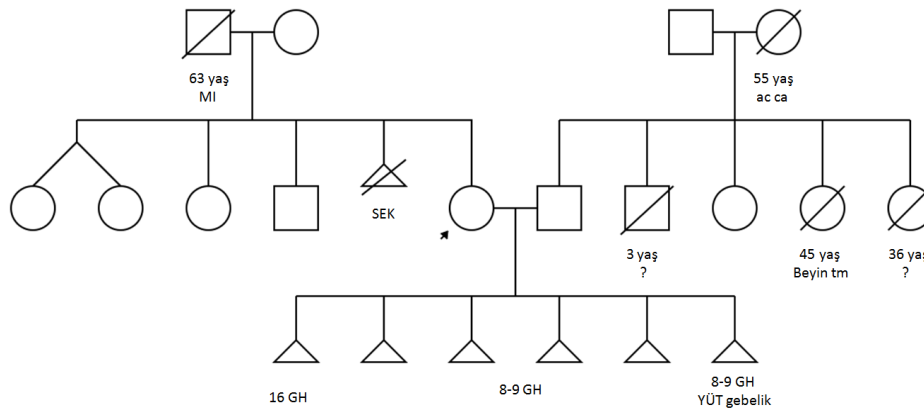
Tablo 4-108: Olgu 34'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>EGFR</i> (NM_005228.4)	OD, OR	c.2884C>T p.R962C heterozigot	rs17337451 0,00008484	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>GNRHR</i> (NM_000406.2)	OR	c.317A>G p.Q106R heterozigot	rs104893836 0,002749	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>MMP11</i> (NM_005940.4)	?	c.232C>T p.P78S heterozigot	rs61752251 0,0008988	VUS (ACMG) patojenik (SIFT, Polyphen)
<i>PRLR</i> (NM_000949.6)	OD, OR	c.508A>C p.I170L heterozigot	rs72478580 0,01884	VUS (ACMG) zararsız (SIFT, Polyphen)

Sonuç: Olgu 34'te, embriyolojik dönemde etkin *EGFR* ve hipogonadotropik hipogonadizm etiyolojisinde yer alan *GNRHR* genlerinde ACMG kriterleri ve varyant tahmin araçlarına göre olası patojenik, metalloproteinazları kodlayan *MMP11* ve hiperprolaktinemi nedenlerinden *PRLR* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre ise patojenik ve zararsız olarak sınıflandırılmış toplam dört varyant bulundu.

4.3.1.35. Olgu 35

Olguya ait aile ağacı Şekil 4-35'te, klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 4-109'da, TED verisinin (Engin Tıp, Berry Genomics) biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları Tablo 4-110'da ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar Tablo 4-111'de gösterildi.



Şekil 4-35: Olgu 35'e ait aile ağacı

Tablo 4-109: Olgu 35'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	46
Paternal yaş	55
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	24
Gebelik öyküsü	G6A6
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, YÜT (x1)
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 16. GH, A2-6: 8-9. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 4-110: Olgu 35'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	57.748
Zararsız varyant sayısı	45.569
Olası zararsız varyant sayısı	76
VUS varyant sayısı	12.070
Olası patojenik varyant sayısı	27
Patojenik varyant sayısı	6
Homozigot varyant sayısı	19.876
Heterozigot varyant sayısı	37.872
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	8.573
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	669

Tablo 4-111: Olgu 35'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP	Varyant sınıflaması
<i>CEP131</i> (NM_014984.3)	?	c.2120-3C>A p.(?) heterozigot	rs773820319 0,00006460	VUS (ACMG) zararsız (DANN)
<i>MCM2</i> (NM_004526.3)	OD	c.1670C>G p.T557R heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationAssessor, MutationTaster, PrimateAI, REVEL, SIFT)
<i>MCM4</i>	OR	c.1970C>T	-	VUS (ACMG)

NM_005914.3		p.A657V heterozigot	-	
-------------	--	------------------------	---	--

Sonuç: Olgu 35'te, yapılan analiz sonucunda daha önce mitotik hücre döngüsünde görevli olduğu tespit edilmiş *CEP131*, *MCM2* ve *MCM4* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre ise zararsız ve patojenik olarak sınıflandırılmış toplam üç varyant bulundu.

4.4. Saptanan Varyantların Yolaklarına Göre Sınıflandırılması

Biyoinformatik analizler sonucunda 34 olguda saptanmış olan genlerin aktif oldukları yolaklara, varyantların saptanma sayılarına ve ACMG kriterlerine göre sınıflandırılması Tablo 4-112'de verildi.

Tablo 4-112: Yolaklarına göre saptanan genler ve varyantlar

Gen	Saptanma sayısı (n)	Varyantın sınıflandırılması
Siliyer aktivite ve siliyopati ilişkili genler		
<i>CCNO</i> c.481_482del	1	patojenik
<i>CELSR1</i> c.2110A>G	1	VUS
<i>CEP131</i> c.2120-3C>A	1	VUS
<i>CEP290</i> c.5493delA	1	patojenik
c.7153delA	1	patojenik
<i>CFTR</i> c.2476G>A	1	olası patojenik
c.3154T>G	1	olası patojenik
<i>DYNC2H1</i> c.10433C>A	1	VUS
<i>GLI3</i> c.2179G>A	1	VUS
<i>KIF13A</i> c.932G>A	1	patojenik
<i>KIF7</i> c.3409T>C	1	VUS
<i>NEK4</i> c.1972C>T	1	olası patojenik
<i>PIBF1</i> c.1214G>A	1	VUS
<i>PKD1L1</i> c.5515delC	1	patojenik
<i>PKHD1</i> c.8519G>A	1	olası patojenik
<i>TTC21B</i> c.1546C>T	1	patojenik
<i>TUBB8</i>		

c.314A>G	1	zararsız
Metabolik yollarda görevli genler		
<i>ACE</i> c.596C>T c.1739C>A	1 1	VUS VUS
<i>ALPL</i> c.931G>A	1	olası patojenik
<i>ALPPL2</i> c.280C>T c.68-1G>C	1 1	VUS VUS
<i>ANXA6</i> c.1117C>T	1	VUS
<i>CBS</i> c.599C>T c.1105C>T	1 1	VUS VUS
<i>COL11A1</i> c.3229C>A	1	VUS
<i>CPT1B</i> c.167C>T c.1237G>A	1 1	VUS VUS
<i>CYP17A1</i> c.1487G>A	1	olası patojenik
<i>DUOX2</i> c.1126C>T c.1825C>T	1 1	olası patojenik olası patojenik
<i>H6PD</i> c.1171_1181del	1	patojenik
<i>MAT1A</i> c.125T>C	1	VUS
<i>MMS19</i> c.484C>G	1	VUS
<i>PLG</i> c.1848G>C	1	VUS
<i>SLC27A3</i> c.1208C>T	1	VUS
<i>SLC5A5</i> c.1225G>A	1	VUS
<i>TPO</i> c.512C>T	1	VUS
<i>ZMPSTE24</i> c.1105C>T	1	patojenik
Hücre döngüsü, mitoz/mayoz bölünmede görevli genler		
<i>BUB1B</i> c.485A>G	1	VUS
<i>CCNA2</i> c.214-2insT	1	VUS
<i>HFM1</i> c.2521C>T	1	VUS
<i>MCM2</i> c.1670C>G	1	VUS
<i>MCM4</i> c.1970C>T	1	VUS
<i>MCM8</i>		

c.482A>G c.2132G>T	1 1	olası patojenik VUS
MSH5 c.1859A>G	1	VUS
PATL2 c.839G>A	1	VUS
SPICE1 c.2508delA	1	VUS
Embriyolojik dönemde aktif genler		
CCDC141 c.2611C>T	2	VUS
CTBP2 c.9delT	1	VUS
IGSF10 c.352C>T	1	VUS
NOBOX c.1067G>A	1	VUS
PAPLN c.2077C>T	1	VUS
SLAIN1 c.93G>A	1	olası patojenik
UBTFL1 c.99_101del	1	VUS
WNT4 c.896C>T	1	VUS
WNT6 c.208C>G	1	VUS
ZAR1 c.1257C>G	1	VUS
ZSCAN4 c.412C>T	1	VUS
İmmün yolaklarda aktif genler		
CXCL8 c.231T>A	1	VUS
HLA-DRB5 c.100+1G>C	2	VUS
DNA tamir mekanizmaları yolak genleri		
ERCC6 c.2609G>A	1	olası zararsız
EXO1 c.2222_2223del	1	VUS
RET yolağında aktif genler		
EGFR c.500T>C c.2884C>T	1 1	VUS olası patojenik
GNRHR c.317A>G	1	olası patojenik
MTOR c.307C>T	1	patojenik
PROKR1 c.886T>C	1	VUS
PROKR2 c.518T>G	1	VUS

ERK yolağında aktif genler		
<i>FBN3</i> c.2957-2A>T	1	VUS
<i>FLT1</i> c.3720+1G>A	1	patojenik
<i>IGF2</i> c.97C>T	1	patojenik
Hücre içi kontrol yollarında görevli genler		
<i>EIF4ENIF1</i> c.97G>A	1	VUS
<i>FREM2</i> c.5264-5T>G	1	VUS
<i>HSF1</i> c.430G>A	1	VUS
<i>LRIF1</i> c.1151C>G	1	VUS
<i>NOP14</i> c.376G>A c.2255C>T	1 1	VUS VUS
Anjiyogenez ve koagülasyonda etkin genler		
<i>F5</i> c.1340C>T	1	VUS
<i>HTRA4</i> c.1333G>C	1	VUS
<i>VEGFA</i> c.100C>T	1	VUS
Matriks yeniden düzenlenmesinde yer alan genler		
<i>MMP10</i> c.497-2A>G	2	VUS
<i>MMP11</i> c.232C>T	1	VUS
<i>MMP26</i> c.470-3C>T	1	VUS
<i>MMP7</i> c.55C>T	1	VUS
Hormonal ileti yollarında aktif genler		
<i>PRLR</i> c.508A>C	1	VUS
<i>SHBG</i> c.1126G>A	1	VUS
Fertilizasyonda etkin genler		
<i>ZP1</i> c.628C>T	1	VUS

5. TARTIŞMA

İlk trimester gebelik kayıplarının en az %50'sinin nedeninin kromozom anomalileri olduğu göz önüne alındığında, iki adet gebelik kaybı öyküsü olan olgularla yapılan çalışmalarda kromozomal anomalili konseptus saptama oranı yaklaşık $0,50 \times 0,50 = \%25$ olacaktır (260, 261). Abortus materyallerinde saptanan kromozom anomalilerinin %95'i, ilk defa o gebelikte oluşan ve tekrarlama riskleri toplum riski kadar olan triploidi, tetraploidi ve X monozomisi veya tekrarlama riski %1 kadar olan trizomilerdir. Olguların yaklaşık %5'inde ailevi dengeli kromozomal anomalileri nedeniyle oluşan dengesiz gebelik ürünleri gözlenir. Abortus materyalinde saptanan dengesiz üründen ya da tekrarlayan gebelik kayıplarından yola çıkarak parental kromozom analizi sonrasında saptanan dengeli taşıyıcılıklar genetik danışma açısından son derece önemlidir, çünkü bu çiftlerin tüm gebeliklerinde dengesiz ürün oranı çok yüksektir ve prenatal tanı veya preimplantasyon tanı, ayrıca taşıyıcı bireylerin 1. dereceden akrabalarından başlanarak kromozom analizi yapılması önerilir. Tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde dengeli taşıyıcılık saptama oranı %5-8'dir. Yani, bu çiftlerin büyük bir kısmında kromozomal bir faktör bulunmamaktadır. Bu olgularda maternal, fetal diğer genetik faktör/faktörlerin olduğu açıktır. Bu nedenle tez kapsamında kromozom anomalisi ve bilinen genetik/nongenetik faktörlerin dışlandığı 3 veya daha fazla fetal kayıp öyküsü bulunan kadınlarda TED yöntemi ile olası monogenik kalıtmı genlerin rolü araştırıldı.

Gebelik kaybı veya infertilite ile başvurmuş olgularda ilişkili olabilecek genin saptanabilmesi, varsa nedene yönelik tedavinin ve yardımcı üreme tekniklerinde daha etkin tedavi seçeneklerinin uygulanabilmesine, bebek sahibi olabilmelerine ve ailedeki olası diğer taşıyıcıların saptanabilmesine yardımcı olabilir. Gebelik kaybı olgularında pozitif aile öyküsü özellikle kız kardeşlerde varsa, bu bireyler mutlaka çalışmaya dahil edilmelidir. Sebebi açıklanamayan olgu grubu hem büyüklüğü hem de olası nedene yönelik tedavi şansı bulamadığı için bu konuda bilimsel çalışma yapılmasını haklı kılmaktadır. Ancak, yakın geçmişe kadar Sanger dizileme ile yapılan çalışmalar gebeliğin oluşumu ve devamında etkin gen/yolakların çokluğu nedeniyle yetersiz kalmaktaydı, çünkü çalışmalar sadece belli bir gen/gen bölgesi ile sınırlı olmaktadır. YND yöntemleri ile çoklu gen/gen bölgeleri, genlerin anlatım düzeyleri ve fonksiyonel

çalışmalar yapılabilirmekte olup, her geçen gün artarak kullanımıyla pek çok hastalıkta olduğu gibi tekrarlayan fetal kayıp ya da infertilite sorununda etiyolojik etkenlerin aydınlatılmasına ve olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek ve ailelere çocuk sahibi olma imkanı sunabilecek güçtedir.

Literatür göz önüne alındığında, TKG olgu grubunda etiyolojiyi aydınlatmak için yapılan tüm ekzom dizileme çalışmalarında 4 ana olgu inceleme yolu izlendiği görülmektedir (262). En çok tercih edilen çalışma yöntemi, fetal materyallerde letal etkili varyant/ları araştırmak amacıyla, fetus ile anne ve babayı eş zamanlı incelemeyi hedefleyen üçlü TED analizleridir. Fetal materyal olmadan, anne ve baba adayında heterozigot patojenik varyantları hedefleyen ikili çalışmalar da mevcuttur. Embriyonik gelişim basamaklarını etkileyen genetik faktörleri gebelik ürününe olası etkileri açısından araştırmayı ele alan bu çalışma modelinin dışında, literatürde sadece anne adaylarının incelendiği, TKG ve/veya infertilite etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünülen genlerin Sanger dizileme ya da panel-gen testleri ile incelendiği çalışma modelleri de bulunmaktadır. Çalışma grubunu TKG öykülü dişi olgulardan oluşturarak yapılmış ilk TED çalışması, farklı ülkelerden 49 dişi olgu ile yapılmış olan 2017 yılında yayınlanan Quintero-Ronderos ve arkadaşlarının çalışmasıdır. Mayıs 2020’de 61 TKG ve 14 dişi infertilite olmak üzere toplam 75 olgu ile yapılan ikinci bir TED analiz çalışmasının sonuçları yayınlanmıştır (263). İlgili çalışma olgu seçim kriterleri açısından bizim çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda en az 3 gebelik kaybı veya YÜT denemesi öyküsü olmasına dikkat edilmiş, ailelerin çocuk sahibi olması, olası OR kalıtmalı genlerin tespitinde fayda sağlayabileceği için dışlama kriteri olmamıştır. Bugüne kadar TED analizleri ile tekrarlayan fetal kayıp ve infertilite etiyolojisinin aydınlatılmasına yönelik çalışmaların yetersizliği açıktır. Bu tez çalışması, bu konuya bilimsel katkı sağlaması, ciddi olgu seçim kriterleri ve sadece Türkiye’den olgular seçilerek yapılmış olması nedeniyle ülkemizde yapılan ilk çalışmadır.

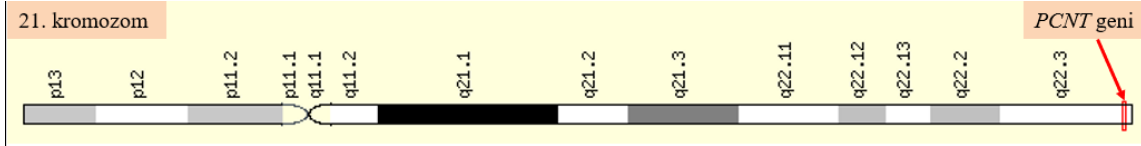
5.1. Sitogenetik Analiz Sonuçları

TED analizleri öncesinde olgu seçim kriterleri arasında parental kromozom anomalilerinin olmaması bulunmaktaydı. Bu nedenle, ilk aşamada bilinen diğer etiyolojik faktörleri dışlanmış, tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü bulunan ve İTF Tıbbi Genetik AD’ye yönlendirilmiş 481 çift - 973 olgunun ve bu çiftlere ait 105 gebelik ürününün Sitogenetik Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiş karyotip analizi sonuçları ve

olgulara ait dosyalar retrospektif olarak değerlendirildi. Tüm seride kromozom anomalisi saptanma oranı %4,4 idi. Tüm olgu grubunda en sık görülen kromozom anomalisi resiprokal translokasyonlardı. Bunu inversiyonlar takip ederken, en sık 9. kromozom inversiyonları saptandı.

TGK olgu grubunda ise (n=650) en sık saptanan kromozom anomalisi resiprokal translokasyonlardı (n=10) ve bunu inversiyonlar takip etti (n=7). Olgu grubumuzda saptanan %3,2 kromozom anomali oranı daha önce literatürde %1-5 arasında bildirilen oran ile uyumlu idi (110, 117, 122).

TGK olgu grubunda hemen her zaman otozomal kromozomların yapısal anomalileri saptanmakta iken, infertilite olgu grubunda sıklıkla cinsiyet kromozom anomalileri, özellikle sayısal anomalileri (örneğin erkekte azospermi varlığında 47,XXY anomalisi) saptanır. İnfertilite grubunda otozomal yapısal kromozom anomalileri daha çok oligoastenoteratozoospermili erkek olgularda dikkati çeker. Çalışma grubumuzda, azospermi öyküsü ile gelen fenotipik olarak normal iki farklı olguda nadir görülen bir ring 21. kromozom (r(21)(p13q22.3?)(D21S1446-)) saptandı. Bu kromozom anomalisinin konjenital anomali ya da bilişsel eksikliğe yol açmadan sadece azospermi ve erkek infertilitesine yol açabildiğine dair literatürde az da olsa birkaç yayın bulunmaktadır (264-267). 21. kromozomun q telomer bölgesinde ring oluşumu sırasında fonksiyon değişikliği olabilecek ve spermatogenezi etkileyebilecek bir gen henüz tanımlanmamıştır, altta yatan patogenezin mayoz bölünme kontrol noktalarında anomalili genetik materyali taşıyan gametler nedeniyle spermatogenezin duraklaması ve apoptoz olabileceği düşünülmektedir (267, 268). Bu ilişkiyi açıklayabilmek için 21. kromozomda ilgili bölgedeki genler incelendiğinde 21q22.3 (GRCh38:21:46,324,121-46,445,768) genomik yerleşimli *PCNT* geninin aday olabileceği düşünüldü (Şekil 5-1). Bu gen ürünü olan perisentrin (kendrin) proteini, sentrozomların yapısında bulunan ve gama tubulin ile etkileşime giren bir proteindir (269). Biallelik patojenik gen varyantları Mikrosefalik osteodisplastik primordiyal cücelik tip-II ile ilişkilendirilmiş olup (MIM #210720), erkek olgularda hipospadias ve erken puberte de bildirilmiştir.



Şekil 5-1: 21. kromozom ve PCNT geni yerleşimi (GeneCards (270)'tan değiştirilerek)

PCNT geni siliyopati ilişkili genlerden biridir ve siliyogenezde önemli yere sahiptir. Farelerde yapılan çalışmalarda retinada, beyinde ve iskelet sisteminde aktif anlatımının olduğu gösterilmiştir (271). Üreme sistemindeki fonksiyonlarını tespit etmek için fare oositleri ile yapılan bir çalışmada genin susturulması ile mayoz bölünme esnasında kromozomların hizalanmasının bozulduğu tespit edilmiştir (272). PCNT geni ile spermiler ve erkek üreme sistemi üzerine yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Siliyopatilerin, spermatogenez ve erkek infertilitesi ile ilişkisi gayet iyi bilinmektedir (273). Siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş ve üreme sisteminde etkili bu genin insanda aktif olduğu dokular 'The Human Protein Atlas' veri tabanı aracılığıyla incelendiğinde (274) iskelet kaslarından sonra en çok anlatımının olduğu dokulardan birinin de testis olduğu görülmektedir ki; bu da genin infertilite ilişkisinin güçlü bir göstergesidir. Her iki olgu da, bu ilişkinin aydınlatılmasına katkı sağlayabilir. Bu nedenle anne ve babalara, varsa ya da etkilenmiş kız ve erkek kardeşlere kromozom analizi ve ardından yüksek çözünürlükte mikroyarray/a-CGH çalışması yapılmalıdır. Ayrıca gen aktivitesinin değerlendirilmesi için q-PZR çalışması da planlanabilir.

İncelenen gebelik ürünlerinde yüksek oranda kromozom anomalisi saptanmasının (49/105, %46,7), olguların patolojik ultrason bulgusu, postmortem fetal ya da postnatal muayenede fenotipik bulguların kromozom anomali sendromlarını düşündürmesi nedeniyle seçici olarak incelenmiş olma ihtimali ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Olguların sadece 5'inde parental kromozom anomalisi bulunmaktaydı (%10,2), diğer olgulardaki anomaliler ise *de novo* veya olası gonadal mozaizmler sonucu oluşabilecek anomalilerdi. 32 olguda serbest trizomi (T) (%42,8) saptandı. En sıklıkla saptanan trizomiler sırasıyla; yedi olguda abortus materyallerinde en sık saptanan serbest trizomi olan ve yaşam ile bağdaşmayan T16 (7/32; %21,8); altı olguda T21 (6/32; %18); altı olguda T18 (6/32; %18) ve bir olguda T13 (1/32; %3,1) idi.

5.2. Moleküler Analiz Sonuçları

Bu çalışma, şu anki bilgimize göre, sebebi açıklanamayan TGK ve TİK olgularında maternal genetik faktörlerin TED yöntemi kullanılarak araştırıldığı

Türkiye'deki ilk, dünyadaki üçüncü seri çalışmasıdır. Çalışma kapsamında, 35 dişi olguya ait tüm ekzom dizileme verilerinin biyoinformatik analizlerinde saptanan varyantlar ayrıntılı olarak irdelendi ve 34 olguda fenotip ile ilişkili olabilecek yolak genlerinde 93 varyant tespit edildi. Bir olguda ise aday bir gende varyant saptanmadı. Yapılan analizler sonucunda TKG etiyojisi ile ilişkili olabileceği düşünülen aday genler, etkili oldukları yollara ve görevlerine göre aşağıda ayrıntılı bir şekilde incelenerek tartışıldı ve yeni hipotezler oluşturuldu.

5.2.1. Metabolik Yolaklarda Görevli Genler

Metabolik yolaklarda 14 olguda 15 gende ACMG sınıflandırmasına göre VUS olarak nitelendirilen 11 varyant ile 5 patojenik ve 1 zararsız varyant saptanmıştı. Bu genler şunlardır; **PLG** (Olgu 2), **CBS** (Olgu 13), **COL11A1** (Olgu 13), **CPT1B** (Olgu 17 ve 24), **SLC27A3** (Olgu 20), **ALPL** (Olgu 22), **H6PD** (Olgu 22), **ALPPL2** (Olgu 11 ve 29), **CYP17A1** (Olgu 29), **MAT1A** (Olgu 32), **PRLR** (Olgu 34), **SLC5A5** (Olgu 27), **TPO** (Olgu 28), **DUOX2** (Olgu 30 ve 31), **ZMPSTE24** (Olgu 12).

PLG geninin biallelik patojenik varyantları (OR) Plazminojen eksikliği Tip-1 ve Displazminojenemi ile ilişkilendirilmektedir. Hastalıkta, travma sonrası veya solunum yollarında spontan psödomembran oluşumları, hidrocefali ve Dandy-Walker malformasyonları gibi santral sinir sistemi anomalileri ve artmış trombovasküler risk benzeri multisistemik bulgular tanımlanmaktadır (275). Olgumuzdaki (Olgu 2) varyant, ACMG sınıflandırmasına göre VUS olarak değerlendirilmesine karşın, hastalık ile ilişkili olduğuna dair de bir yayın bulunmaktadır (276). Bu olguda fetal USG'de posterior fossa anomalileri saptandığı ve fetusuna ait DNA materyali bulunduğundan bu varyant açısından incelendi. Ancak, ilişkili varyant fetusta tek allelde saptandı. Genin diğer ekzonları incelenmediğinden ve alleldeki dizi analizi ile gösterilemeyen değişimler dışlanamadığından genetik etiyojisi tam olarak açıklanamamıştır.

Olgu 13'te farklı metabolik yolaklarda aktif **CBS** ve **COL11A1** genlerinde VUS kategorisinde iki varyant saptandı. Sistatyonin beta sentaz enzimini kodlayan **CBS** geni, homosistein ve serin aminoasitlerini birleştirerek sistatyonini oluşturur. OR kalıtlı hiperhomosisteinüri ve hiperhomosisteinemiye bağlı trombozlar ile (MIM #236200) ilişkilendirilmiştir. Homosistein yüksekliğinin gebelik kaybı, preeklampsi, IUGG ve nöral tüp defektleri gibi fetus ve gebelik üzerine olumsuz etkileri bilindiğinden TKG etiyojisini açıklamaya yönelik olarak homosistein düzeyi ölçülmektedir. Fare

çalışmalarında embriyolojik dönemde kalp, karaciğer, iskelet ve sinir sisteminde anlatımının olduğu gösterilmiş (277), biallelik olarak susturulduğunda ağır gelişme geriliği ve postnatal ilk birkaç gün içinde ölüm gözlenmiştir (278). Ayrıca birçok genin anlatımını etkileyerek implantasyon aşamasında desidualizasyonu bozduğu (279) ve uterin hücrelerde endoplazmik retikulum stresini arttırarak infertiliteye yol açtığı (280) gösterilmiştir. Uzak akraba evliliği olan çiftimizin, eşte de bu varyant/gen için incelenmesi, olgumuzda homosistein düzeyinin ölçülerek ve VUS olarak değerlendirilen varyantın gen anlatımını etkileyip etkilemediğinin ve monoallelik etkisinin araştırılması planlandı. Aynı olgudaki diğer VUS varyantın bulunduğu kollajen tip 11'i kodlayan **COL11A1** geni büyüme plağındaki kondrositlerin farklılaşması ve gelişiminde etkindir. Patojenik varyantları lumbar disk hernisine yatkınlık, OD kalıtlı sağırılık tip-37, Marshall sendromu, Stickler sendromu tip-2 ve OR kalıtlı fibrokondrojeniz tip-1 ile ilişkilendirilmiştir. Fibrokondrojeniz (MIM #228520), fasiyal dismorfizm, rizomelik cücelik, çan şeklinde dar bir toraksın görüldüğü intrauterin dönemde ya da hayatın ilk günlerinde letalite ile sonuçlanan bir sendromdur (281). Olgunun eşinde monoallelik ve abortus materyalinde biallelik yapının gösterilmesi durumunda, VUS olarak tanımlanan varyantın değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

İki olgumuzda 2 farklı VUS varyantı saptadığımız **CPT1B** geni (Olgu 17 ve 24), mitokondriyal yağ asidi β oksidasyon yolağında etkindir ve patojenik varyantlar, asemptomatik klinikten ani ölüme giden bir yelpazede değişken etki gösterebilir. Genin susturulduğu fare çalışmalarında, embriyoların daha preimplantasyon döneminde iken bu enerji yolağının yokluğunu tolere edemedikleri ve öldükleri bulunmuştur (282). Bu iki olgunun eşlerinde genin monoallelik ve/veya abortus materyalinde biallelik değişimlerin gösterilmesi, VUS olarak tanımlanan varyantın değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

SLC27A3 gen ürünü, bir hücre membran proteinidir ve uzun zincirli yağ asitlerinin transferinde görev alır. Fare plasentaları ile yapılan çalışmalarda aktif anlatımının olduğu ve maternal obezite ile anlatımının değişebildiği gösterilmiştir (283). İnsan plasentaları ile yapılan transkriptom çalışmasında **SLC27A** (**FATP**) grubu genlerinin yüksek anlatımının olduğu tespit edilmiştir (284). Olgumuzun VUS

kategorisindeki varyantın (Olgu 20), kontrol grubu ile yapılacak fonksiyon çalışmaları ile gen anlatımına etkisinin tespit edilebileceği düşünüldü.

ALPPL2 geni (OR), alkalen fosfatazın plasenta için spesifik formunu kodlar. Fonksiyonları hala tam olarak bilinmemekle birlikte, pankreas kanseri için belirteç olarak değerlendirilmektedir (285). Mart 2020’de yayınlanan bir çalışmada, hem insan hem de fare embriyolarının pluripotent kök hücre yüzey belirteçlerini belirlemek ve embriyogenezin önemli yollarını açıklamak için gen anlatımları incelenmiş, **ALPPL2** her iki canlıda en yüksek anlatımı olan gen olarak tespit edilmiştir. Fare embriyolarında gen susturulduğunda hücre yapısının bozulduğu, hücre gelişimi, membran düzenlenmesi ve temel metabolik yollarda aktif genlerin anlatımlarının düzensizleştiği görülmüştür (286). Olgu grubumuzla ilişkili olabilecek bu genin kalıtım modeli ve olası fenotipik etkileri üzerine yeterli çalışmalar henüz bulunmamaktadır. İki olgumuzda (Olgu 11 ve 29) monoallelik saptanan varyantlar VUS olarak tanımlanmış olsa da, olguların eşlerinde aynı gen için dizi analizi ve ailede segregasyon analizi yapılması ve taşıyıcıların gebelik plasentalarında alkalen fosfataz düzeylerinin incelenmesinin varyantın etkisinin araştırılmasına katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Olgu 32’de VUS kategorisinde varyantını saptadığımız metabolik yolak geni **MAT1A** (10q22.33), metiyonin ve ATP’den adenosilmetiyonin sentezinde görevli, S-adenosilmetiyonin sentetaz olarak da bilinen metiyonin adenosiltransferaz enzimini kodlar. Adenosilmetiyonin, birçok transmetilasyon reaksiyonunda önemli bir metil grubu sağlayıcısıdır. Patojenik varyantların OD veya OR kalıtlı hipermetiyoninemi ve metiyoninasetil transferaz eksikliğine yol açtığı bildirilmiştir (MIM #250850). Çoğu hasta klinik olarak bulgu vermez, artmış serum metiyonin düzeyi ile fark edilebilir. 2018 yılında fareler ile yapılan bir çalışmada, maternal hipermetiyonineminin fetal gelişim esnasında nöron sayısı, apoptoz, sinir büyüme faktörü ve nörotrofik faktör düzeyleri; metabolik enerji yolağı (süksinat dehidrojenaz, kompleks II ve sitokrom c oksidaz), Na⁺/K⁺ ATPaz anlatımı; ödem oluşumu ve inflamatuvar belirteçler (tümör nekroz faktörü-alfa ve interlökin-6) ile fetal ensefalondaki mitokondriyal hidrojen peroksit düzeylerini etkileyerek beyin hasarı ile ilişkili olabileceği söylenmiştir (287). OD kalıtım olasılığı da göz önünde bulundurularak olgumuzda saptanan henüz VUS olarak değerlendirilen varyant için aile içindeki diğer olası taşıyıcıların gebelik

öykülerinin değerlendirilmesi ve metiyonin düzeyinin araştırılmasının varyantın klinik etkisine önemli katkı sağlayabileceği düşünüldü.

PRLR geni, plasental laktojen, prolaktin ve büyüme hormonu tarafından kullanılan aynı prolaktin reseptörünü (PRLR) kodlar. Gen, OD ve OR kalıtmıli hiperprolaktinemi ile ilişkilendirilmiştir (MIM #615555). Prolaktin düzeyi, korpus luteumun devamlılığında rol oynar ve 100 ng/ml gibi yüksek oranları progesteron sentezini durdurarak luteal faz defektine yol açar (288). *Prlr* geninin biallelik olarak susturulduğu fare çalışmalarında, fertilizasyon sonrasında embriyonal gelişmenin durduğu, nadiren blastosist aşamasına geldikleri fakat implante olamadıkları görülmüştür (289). Ekzojen progesteron tedavisinin başarılı olması üzerine, patolojinin *Prlr* aracılığıyla uyarılan progesteron sentezinin yetersiz olması, implantasyon gerçekleştiğinde de desidual *Prlr* yokluğunun gebelik kaybına yol açması olduğu ileri sürülmüştür (290). Olgumuzdaki (Olgu 34) monoallelik varyantın zararsız olarak nitelendirilmesi etiyolojiyi açıklamakta yetersiz kalmakta ancak, YND çalışmasında tüm genin kapsanıp kapsanmadığı varsa kapsanmayan bölgelerin araştırılması ve patojenik bir varyant saptanması durumunda varyantın etkisi yatkınlık ilişkili polimorfizm olarak yeniden tartışılabilir.

Çalışmamızda 4 olguda Tiroid Dishormonogezi (OR) ile ilişkilendirilmiş *SLC5A5* (Olgu 27), *TPO* (Olgu 28), *DUOX2* (Olgu 30 ve 31) genlerinde varyant tespit edilmişti. *TPO* gen polimorfizmlerinin otoimmün tiroid hastalıkları veya hipotiroidi ile ilişkisinin incelendiği çalışmalar bulunmakla birlikte (291), yetişkin gruptaki etkilerinin değerlendirildiği kapsamlı bilimsel çalışmalar bulunmamaktadır. Tiroid hormonu ile ilişkili patolojilerin gebelik kayıplarındaki yeri çok iyi bilinmektedir. Örneğin, TGK etiyolojisinde sıkça çalışılan genlerden biri *CTLA4* geni OD kalıtmıli Hashimoto tiroiditi ile ilişkilidir (292). Bu nedenle tiroid patolojilerine yol açan diğer genlerin monoallelik varyantlarının tiroid hormonları ve fonksiyonları üzerine etkisinin değerlendirilmesi de düşünülmelidir. ***SLC5A5*** ve ***TPO*** genlerinde saptanan varyantlarımız VUS kategorisinde kaldığı için etiyolojiyi açıklamada yetersiz kalmaktadır. TİK öykülü Olgu 30 ve 31’de klinik olarak hipotiroidi tespit edilmemiş olmakla birlikte olgularda saptanan olası monoallelik ‘olası patojenik’ varyantların klinik ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyantlar için aile içi ve daha yüksek sayıda olgu ve populasyon çalışmaları ile ***DUOX2*** geninin monoallelik varyantlarının

incelenmesi ile henüz ‘olası patojenik’ olarak değerlendirilen varyantların ‘patojenik’ olarak değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

ZMPSTE24 genindeki biallelik patojenik varyantlar (OR) fasiyal dismorfizm, letal genodermatoz, eklem ankilozlarının görüldüğü intrauterin ya da doğumdan sonraki ilk haftada letal seyirli bir sendrom olan letal restriktif dermopati (MIM #275210) ve tip-B lipodistrofili mandibuloakral displazi (MIM #608612) ile ilişkilendirilmektedir. Saptadığımız gen varyantı, ACMG sınıflandırmasına göre ‘patojenik’ olarak nitelenmiştir. Akriba evliliği nedeniyle olgunun eşinde aynı varyant araştırılmış ve saptanamamış, ancak tüm gen dizi analizi yapılmadığından diğer olası varyantlar dışlanmamıştır ve bu olguda genetik etiyoloji açıklanamamıştır.

ALPL geni, alkalen fosfataz enzimini kodlar ve patojenik gen varyantları OR hipofosfatazya (ağır prenatal letal, infantil, çocukluk, yetişkin) ve odontohipofosfatazya ilişkilidir. Infantil hipofosfatazya (MIM #241500), hiperkalsemi ve kemiklerin yetersiz mineralizasyonu nedeniyle ağır iskelet deformitelerinin görüldüğü, intrauterin dönemde ölümcül bir hastalıktır (293). Olgumuzda saptanan patojenik gen varyantı, fetusta biallelik olması durumunda genetik etiyolojiyi açıklayabileceğinden olgunun eşinde tüm gen Sanger dizileme yapılması planlandı. Ayrıca bu patojenik varyant için aile içindeki heterozigot taşıyıcılarının ve gebelik öykülerinin araştırılması uygun olacaktır. Bu olgumuzda patojenik olarak nitelendirilen ikinci bir varyant **H6PD** geninde saptanmıştır. Bu gen heksoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimini kodlar ve biallelik patojenik varyantları kortizon redüktaz eksikliği tip-1 (MIM #604931) ile ilişkilidir. Kortizon redüktaz eksikliği, 11 β hidroksteroide dehidrojenaz (HSD11B1) enzimi ile kortizondan aktif glukokortikoid kortizolün üretilmemesi nedeniyle oluşur. Kortizol döngüsünün yetersizliği sonucunda ACTH aracılı adrenal hiperandrojenizm oluşur, erkeklerde psödupuberte prekoks; dişilerde hirsutizm, oligomenore ve infertilite görülür (294). Bu varyantın olgumuzda monoallelik olması fenotipi açıklamada yetersizdir ancak YND tekniğinin limitlerinden olan kapsanmayan bölge ya da diğer alleldeki olası gen delesyonları olasılığı nedeniyle bu incelemelerin uygulanması planlandı. Ayrıca enzim aktivitesinin değerlendirilmesi ve yolak üzerine etkilerinin görülmesi amacıyla fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu görüldü.

Konjenital adrenal hiperplazi ile ilişkilendirilmiş (MIM #202110) **CYP17A1** geni, patojenik varyantları kısmi ya da tam 17 hidrosilaz/17-20 liyaz eksikliği oluşur

ve gen mutasyonları olguların %2'den azından sorumludur. Steroidogenez basamaklarında etkin genlerin, TKG etiyolojisindeki yerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada *CYP17A1* polimorfizmleri incelenmiş; yaştan ve düşük sayısından bağımsız, hem heterozigot hem de homozigot formdaki varyantların gen-doza etkisine bağlı olarak artmış risk ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (295). Olgu 29'da saptanmış olduğumuz heterozigot varyantın (c.1487G>A) incelendiği bir çalışmada, monoallelilik olgularda enzim aktivitesinin yaklaşık %30 azaldığı, gonad dokularında etkinin daha yüksek olabileceği belirtilmiştir (296). Bu nedenle, olgumuzda saptanan patojenik bu varyantın fenotip ile ilişkili olabileceği, ayrıca olguda saptanan *ACE* geninde de varyant saptanmış olması multigenik kalıtım olasılığının etiyolojide etkin olabileceği düşünüldü.

5.2.2. İmplantasyonda Etkin Genler

TKG ve TİK olgularıyla yapılan çalışmalarda incelenmiş ve etiyopatogeneze etkili olduğu ortaya konmuş implantasyon aşamasında etkin 6 gen ve varyantlarını 7 olgumuzda saptadık. Bu genlerin özellikleri ve yapılmış çalışmalar ayrıntılı olarak Tablo 5-1'de gösterildi.

Tablo 5-1: Çalışma kapsamında saptanan implantasyon ile ilişkili genler

Gen	Olgu	Etkin olduğu yollar	İlişkili fenotipler	Model organizma ve transkripsiyon çalışmaları	Fenotip ile ilişkisi
<i>ANXA6</i> (5q33.1)	33	Miyometriyal aktivite, fibroblast göçü, endozom oluşumu, ekzositoz (297) Endometriyal reseptivitede kilit rol (298)	-	TİK'te anlatım ↑ (299)	Güçlü bir aday gen; aynı protein ailesinden <i>ANXA5</i> OD kalıtmalı TKG ile ilişkili (MIM #614391)
<i>GNRHR</i> (4q13.2)	34	Santral hormon düzenlenmesi, üreme fonksiyonlarının kontrolü	Hipogonadotropik hipogonadizm tip-7 (OR) (MIM #146110)	İlk trimesterde sitotrofoblast, sinsityotrofoblast, ekstrasvillöz trofoblast hücreleri; desidua ve plasenta (300-306)	Monoallelilik ve VUS varyant; etiyolojiyi açıklamada yetersiz

<i>MMP7</i> (11q22.2)	8	Blastosist endometriyal kavite ile temas ettiğinde salınır (307); implantasyon (308)	Preeklampsi, endometriyozis, adenomiyozis, jinekolojik maligniteler (-181A>G) (309-313)	Erken dönemde sinsityo ve sitotrofoblasttan, üçüncü trimesterde ise sadece sitotrofoblastlarda salınır (314)	Monoallelik ve VUS varyant; tek başına etiyolojiyi açıklamada yetersiz
<i>MMP10</i> (11q22.2)	16 20	Ekstraselüler matriks ve bazal membran yeniden düzenlenmesi	Epidermolizis bülloza distrofi, TKG (c.595G>A) (220)	Geç sekretuvar fazda anlatımı ↑ (315); Sebebi açıklanamayan infertilite olgularında anlatımı ↓ (31)	Monoallelik ve VUS varyant (c.497-2A>G); tek başına etiyolojiyi açıklamada yetersiz
<i>MMP11</i> (22q11.23)	34	Ekstraselüler matriks yeniden düzenlenmesi embriyogenez, doku tamiri	Dermatofibrom (316)	Gebelik boyunca uterusu aktif (317); preeklampside anlatımı ↓ (318)	Tek başına etiyolojiyi açıklamada yetersiz
<i>MMP26</i> (11p15.4)	21	GDF15 ile birlikte plasantasyon (319), implantasyon (320)	Sebebi açıklanamayan infertilite olgularında anlatımı ↓ (31)	PKOS'ta implantasyon penceresinde anlatımı ↓ (321)	Tek başına etiyolojiyi açıklamada yetersiz

Anneksinler; membran hareketleri, proliferasyon, apoptoz gibi çok sayıda hücre içi faaliyetlerde görevli, Ca^{+2} iyonu ile regüle edilen fosfolipid ve membran bağlayıcı proteinlerdir (322). Desidualize endometriyal stroma hücreleri, implantasyonun gerçekleşeceği bölgede hareket halindedirler; bu hareketin bozulmasının implantasyon hatasına neden olduğu ileri sürülmüştür (323) ve bir çalışmada TKG olgu grubunda bu hareketliliğin oldukça artmış olduğu gösterilmiştir (324). **ANXA6** geninde (Olgu 33) saptanan varyant (rs1249929192) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, in siliko varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak nitelendirilmekte ve gnomAD veri tabanında 248.132 bireyin genom çalışmasında hiç saptanmamış olması bu olasılığı desteklemektedir. **ANXA6** geninde saptanan bu varyantın etiyolojiyi açıklayabileceği kararına varıldı. Olgunun benzer gebelik kaybı öyküsü olan iki kız kardeşinin de bu varyant açısından incelenmesi planlandı. Bu kardeşlerde aynı varyantın saptanması varyantın ‘patojenik’ etkisini destekleyecektir.

Trofoblastik hücre topluluklarında *GNRH* ve *GNRHR* genlerinin anlatımının yüksek bulunması üzerine bu gen ürünlerinin otokrin ve/veya parakrin etkilerle hücrelerin davranışlarını düzenleyici etki gösterdiği hipotezi geliştirilmiştir (325).

MMP'ler (matriks metalloproteinaz) ile sıkı etkileşim içinde olan GNRH ve GNRHR proteinlerinin plasental anlatımları 6 ila 12. GH arasında en yüksek düzeylerde ve ilk trimester boyunca yüksek seyrederek (326-328). Deskuamasyonda etkin matriks metalloproteinazlarından -1, -3 ve -10 menstrüal fazda artarken; -26 (endometaz) proliferatif fazda, implantasyon penceresinde artış gösteren tek MMP'dir ve bu doku yeniden düzenlenmesinde ve implantasyonda yer aldığının belirteçidir (329). Çalışmamızda saptanan *GNRHR* ve *MMP*- gen varyantlarının monoallelilik olmaları nedeniyle etiyojolojiyi açıklamakta yetersiz kaldığı görüldü. Ancak, diğer allellerin kapsanmayan bölge ve olası gen delesyonları ya da multigenik etkiler bu aşamada dışlanamadığından olguların çalışması henüz tamamlanmamıştır.

5.2.3. Plasentasyon, Anjiyogenez ve Koagülasyonda Etkin Genler

Gebeliğin oluşumu ve devamı için gerekli olan basamaklardan biri de damarların oluşumu, plasentanın gelişmesi ve fetal dolaşımın sağlanmasıdır. Bu yolakta 8 olguda, 8 gende 1 patojenik ve 8 VUS olarak nitelendirilmiş varyant saptadık.

Kalıtsal trombofili etiyojijisinde yer alan ve iyi bilinen genlerden *F5*'in TKG etiyojijisindeki yerini tespit etmek amacıyla *FVL* p.R506Q mutasyonunun sıkça incelendiğı, OD kalıtlı TKG (MIM #614389) ile ilişkilendirildiğı ve monoallelilik formda ~%4 sıklıkla görüldüğü bilinmektedir (330). Toplum sıklığı <%1 olan varyantları değerlendirdiğimiz bu çalışmada saptadığımız ve veri tabanlarında VUS olarak nitelendirilmiş varyantlardan biri bu gende idi (Olgu 12). Trombofili ile ilişkili genlerin 20. GH sonrasındaki fetal kayıplarla ilişkili olduğundan ve <10. GH kayıplar ile ilişkisi henüz bilinmediğinden daha fazla olguya ait sonucun bilinmesi gerekmektedir. Olgunun kız kardeşinin de 4 gebelik kaybı bulunduğundan, onda bu varyantın araştırılmasının çalışmaya katkısı olabileceğı düşünöldü. Akraba evliliğı olan olgunun 3 farklı gende daha 3 varyant (2 patojenik, 1 VUS) için heterozigot taşıyıcı olması nedeniyle bu varyantlar için de değerlendirilmesinin uygun olacağı kararına varıldı.

HTRA4 geni, serin proteaz HtrA ailesinin dört üyesinden biri olan ve hatalı sekrete edilmiş proteinlerin parçalanmasında görevli ligomerik şaperon proteaz kodlar (331). Preeklampsii öyküli kadınların plasentalarında artmış *HTRA4* gen anlatımı tespit edilmiştir (332). *HTRA4* geninde (Olgu 7) saptanan varyant (rs139374339), ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olsa da, *in siliko* varyant değerlendirme

tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmekte ve GnomAD veri tabanında 13.898 bireyin genom çalışmasında sadece 6 bireyde heterozigot olarak (allel frekansı 0,000432) saptanmış olması patojenik olma olasılığı desteklemektedir. *HTRA4* geninde saptanan bu varyantın etiyoloji ile ilişkili olabileceğini kanıtlanabilmesi için mRNA düzeyinde fonksiyonel çalışmalarının yapılması ve mümkünse hayvan modelleme ile patojenik etkinin gösterilmesinin ve aile içi diğer olası taşıyıcıların gebelik öykülerinin araştırılması gerekmektedir.

Anjiyotensin-I dönüştürücü enzim (ACE) anjiyotensin-I’i anjiyotensin-II’ye dönüştüren, vasküler homeostaz, inflamasyon ve anjiyogeneze etkin bir çinko metallopeptidazdır (333). Yapılan çalışmalarda embriyo implantasyonunda etkin olan plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) aktivitesi ile etkileşimde olduğu tespit edilmiştir (334). Olgu 20 ve 29’da VUS olarak nitelendirilmiş iki farklı varyantını tespit ettiğimiz **ACE** geni, intron 16’daki 287 bp’lik insersiyon/delesyon (I/D) polimorfizmi ile TGK etiyolojisinde aday gen varyantlarından biri olarak değerlendirilmektedir (335, 336). Olgu 29’da hormonal aktiviteleri ile bilinen *CYP17A1* (patojenik) ile plasenta gelişiminde etkin *ALPPL2* (VUS) ve *ACE* genlerinin birlikte etki göstererek etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Bu üç genin birlikte etkisinin fonksiyonel çalışmalar ile gösterilmesi kararlaştırıldı.

Plasantasyon ve anjiyogeneze etkin **EGFR** gen ürünü, plasentada en çok saptanan büyüme hormonlarından olup, trofoblastik çoğalma ve invazyonunu uyararak bir epiteliyal mitojendir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada erken gebeliğin devamında önemli yere sahip olduğu ve susturulduğunda 3.000’e yakın genin anlatımının bozulduğu gösterilmiştir (337). EGFR proteini, EGF, TGF- α , heparin bağlayıcı EGF, amfirogulin, betasellulin, epiregulin gibi immün hücrelerden salınan proteinler için reseptör görevi görür ve maternal immün toleransta etkindir (338, 339). Spontan abortus dokularıyla yapılan çalışmalarda desidual hücrelerdeki yüksek *EGFR* anlatımının invazyonu bozacak şekilde ekstrasvillöz trofoblastların uyarılmasına, agresif ve tahrip edici invazyona yol açarak düşüğe sebep olabileceği ileri sürülmüştür (340). Olgu 20’de etkileşimli genler olmasalar da implantasyon ve plasenta gelişiminde etkin olan *MMP10* (VUS), *EGFR* ve *ACE* varyantlarının birlikte etki ederek etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Birlikte poligenik etkilerinin gösterilebilmesi için fonksiyonel çalışmalar yapılması kararlaştırıldı.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ailesi plasental vaskülogenez ve anjiyogenezde temel işleve sahip proteinlerdir (61). Bu protein ailesinden VEGFA, VEGFB ve PIBF, VEGFR1 olarak da bilinen FLT1'e bağlanırlar. FLT1 sinsityotrofoblastlarda ve plasental villus endotel hücrelerinde bulunur (341). Villöz trofoblastların yüksek düzeylerde VEGFA ve reseptörü FLT1 anlatımı yaptıkları gösterilmiştir (342). Progesteron, östrojen ve androjenler; VEGFA anlatımını aktive eder (343-345). VEGFA, vazodilatasyon, anti-apoptoz ve damar geçirgenliğinin artması etkileriyle iyi bilinen anjiyogenik faktörlerdendir (346). Reseptörleri ile oosit gelişimi, implantasyon, fetal gelişme ve plasantasyon aşamalarında **FLT1** geni ile birlikte görev alır (347). Genin fonksiyon kayıplarında gebelik kayıpları, intrauterin fetal ölüm ve büyüme geriliği ile preeklampsi görülebilir (348, 349). *FLT1* geninde (Olgu 18) saptanan varyant (rs1158779072) ACMG kriterlerine göre patojenik olarak nitelendirilmiş ve gnomAD veri tabanında 115.552 bireyin genom çalışmasında sadece 1 erkek bireyde heterozigot olarak saptanmıştır. *FLT1* geninde saptanan bu varyantın etiyolojiyi açıklayabileceği düşünülerek benzer öyküsü bulunan kızkardeşte aynı varyantın çalışılması kararlaştırıldı. Olgu 31'de saptanan **VEGFA** gen varyantı henüz VUS olarak nitelendirilmiş olup, tek başına etiyolojiyi bu aşamada açıklayamamaktadır.

VEGF protein ailesi, tüm bu işlemleri yerine getirirken PROKR1 ve PROKR2 ile de etkileşimdedir (350). Prokinesitin denen peptid ailesi PROK1, PROK2 ve PK2L olmak üzere 3 üye içerir. PROK1, anjiyogenik mitojendir ve fetomaternal kan dolaşımının sağlanmasında görevlidir (350), PROK2 ise olfaktör çıkıntının gelişmesinde etkindir (351). PROKR1 ve PROKR2, bu proteinlerin reseptörleri olarak tüm yolaklarda birlikte çalışır. PROKR2 beyin ve testislerde; PROKR1 dalak, prostat, kalp ve damar hücreleri gibi periferik dokularda yerleşirken; dişi üreme sisteminde, overler ve plasentada birlikte çalışarak gebeliğin devamında rol oynarlar (352). PROK1 overlerde hCG, östrojen ve FSH ile düzenlenir (353), plasental faaliyetleri hCG, PPAR γ ve hipoksi tarafından sağlanır (350, 354, 355). PROK2 ise santral sinir sisteminde sirkadiyen ritmin etkisi altındadır (356). PROK2 ve PROKR2 yolağının üreme sistemi üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan fare çalışmalarında genler susturulduğunda insandaki Kallmann sendromu (KS) benzeri fenotip olduğu görülmüş (357), embriyolojik dönemde overlerde foliküllerin gelişimindeki kusurlar nedeniyle siklus bozuklukları olduğu tespit edilmiştir (358). PROK1 ve PROKR sistemi erken gebelikte embriyonun implantasyonunda önemli bir yere sahiptir (359) ve implantasyon

penceresi döneminde anlatımları artmaktadır (360). İlk trimesterde PROK1'in etkisi ve PROKR2 aracılığı ile ekstrasvillöz trofoblastik hücrelerin göçü, invazyonu ve spiral arterlerin yeniden düzenlenmesi sonucu kan dolaşımı sağlanır (361). *PROK1*, *PROKR1* ve *PROKR2* genlerinin gebelik kayıplarıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (362-364). Ayrıca 98 TKG öykülü kadın ve 142 kontrol ile yapılan bir çalışmada *PROKR2* geni V331M polimorfizminin artmış gebelik kaybı riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (365). ***PROKR1*** geninde (Olgu 28) saptanan varyant (rs200892456) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmasına rağmen, *in silico* varyant değerlendirme tahmin araçlarında 'patojenik' olarak değerlendirilmekte ve gnomAD veri tabanında 115.562 bireyin genom çalışmasında sadece 5 dişi bireyde saptanmış olması (allel frekansı 0,0000433) bu olasılığı desteklemektedir. *PROKR1* geninde saptanan bu varyantın etiyolojiyi açıklayabileceği kararına varıldı.

PROKR2 geni monoallelik patojenik varyantları Anosmili veya anosmisiz hipogonadotropik hipogonadizm tip-3 ile ilişkilendirilmekte olup (MIM #244200), digenik kalıtım (*KAL1* ile) veya eksik penetrans gibi özellikler gösterebilmektedir (366). *PROKR2* geninde (Olgu 26) saptanan varyant (rs74315416) ACMG kriterlerine göre zararsız olarak nitelendirilmiş olmasına rağmen, varyant değerlendirme tahmin araçlarında 'patojenik' olarak değerlendirilmekte ve gnomAD veri tabanında dişi bireylerdeki allel frekansının 0,00219 olarak verilmesi bu olasılığı desteklemektedir. Olgumuzun sendrom ile ilişkili bulguları bulunmamaktaydı; ancak, aynı varyantın ekspresivite değişkenliği örneklerinin olması (367) ve hipotalamik amenore ile ilişkilendirilmesi (368), ayrıca TKG etiyolojisinde incelenmekte olan aday varyantlardan biri olması nedeniyle bu çalışmada değerlendirildi. 2012 yılında yayınlanan bir çalışmada, antik dönemlerden beri aktarılan kurucu etkisi ('founder effect') olan bir varyant olduğu, üreme fonksiyonları üzerine olası etkileri ve santral sinir sisteminde embriyolojik dönemde etkin bir gen olmasına rağmen; ekspresivite değişkenliği ve digenik/oligogenik kalıtım kalıbında olduğunda tam fenotipik özelliklerini gösterebilmesi sayesinde korunarak aktarıldığı ileri sürülmüştü (369). Tüm bu çalışmalar ile *PROKR2* geninde saptanan bu varyantın gebelik kaybı öyküsü olmayan kızkardeş ve annede incelenmesinin literatüre katkı sağlayabileceği düşünüldü.

5.2.4. Embriyogenezde Etkin Genler

Fertilizasyon sonrası zigotik aşamadaki blastomerler ile yürütülen çalışmalarda, erken embriyogenezde paternal genom yerine maternal genomun daha etkili olduğu (370, 371), preimplantasyon aşamasında oosit içindeki maternal gen ürünlerinin ~%10 kadarının blastosist aşamasına kadar aktif kaldığı ve embriyonik gen aktivasyonu aşamasına geçişte kritik rollerinin bulunduğu gösterilmiştir (372, 373). YÜT denemelerindeki implantasyon başarısında da maternal etkili genlerin önemi ön plana çıkmaktadır (374). Embriyolojik gelişim basamaklarında aktif genlerden 12 olguda, 13 gende 13 VUS ve 1 patojenik olarak nitelendirilmiş varyant saptadık.

Hayvan deneylerinde *Mater*, *Zar1* ve *Npm2* genlerinin fonksiyon kayıplarının embriyonik genomun aktive olmasından hemen önce, embriyonun gelişiminde duraklamaya yol açtığı gösterilmiştir (375-377). *ZAR1*, intrauterin dönemde oositlerin gelişiminde ve embriyogenezde etkin olduğu bilinen, oositlere spesifik maternal etkili genlerden biridir. Genin susturulduğu fare çalışmalarında heterozigot veya homozigot embriyolarda histolojik herhangi bir bulgu olmadığı, fakat homozigot dişilerin infertil oldukları gösterilmiş ve iki hücreli embriyo aşamasında genin yüksek miktarda anlatımının olduğu söylenmiştir (376). **ZAR1** geninde (Olgu 6) saptanan varyant (rs150750718) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, *in silico* varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmektedir ve gnomAD veri tabanında allel frekansının 0,000359 olarak verilmesi bu olasılığı desteklemektedir. *ZAR1* geninde saptanan bu varyantın etiyolojiyi açıklayabildiği kararına varıldı. Olgunun akraba evliliği öyküsü olması ve fenotipik olarak normal iki çocuğunun bulunması nedeniyle OR kalıtım modelini düşündürdüğünden aile üyelerinin de bu varyant açısından incelenmesi planlandı. Eşte aynı varyantın saptanması ve çocuklarında heterozigot olarak bulunması varyantın ‘patojenik’ etkisini destekleyecektir.

Fertilizasyon sonrasında, oositte depolanmış maternal RNA ve proteinler, embriyonun kendi genomu aktifleşene kadar görev yapar ve bu süreç ‘zigotik genom aktivasyonu (ZGA)’ olarak adlandırılır (378). ZGA’da aktif anlatımı olduğu en iyi bilinen genlerden biri **ZSCAN4**’tür ve insan trofoektoderm hücrelerinin transkriptom analizinde erken embriyolojik dönemdeki etkin genlerden biri olduğu tespit edilmiştir (379). Fare çalışmalarında embriyonun 2 hücreli aşamadan 4 hücreli aşamaya geçişinde

aktif olduğu bulunmuş, yokluğunda ise blastosistin büyümesinin durduğu ve implante olamadığı gösterilmiştir (380). Ayrıca gen ürününün bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğü, preimplantasyon aşamasında embriyo gelişiminde genlerin aktivasyonu için anahtar rolü olduğu düşünülmektedir (381). *ZSCAN4* geninde (Olgu 25) saptanan varyant daha önce tanımlanmamıştır. ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmesi, ‘novel’ bir varyant olması ve anlamsız mutasyona yol açarak protein seviyesinde terminasyona yol açmasıyla etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Aynı olguda perimplantasyon dönemdeki embriyoda aktif olan *PAPLN* geni varyantı saptanmıştır. Bu gen papilin proteinini kodlamaktadır ve fonksiyonları *Drosophila* çalışmalarında keşfedilmiş; gastrulasyon aşamasında ince matriks tabakaları içerisinde bulunan, fagositik hemositlerin göçü ve bazal membranların gelişiminde etkin bir hücre dışı matriks glikoproteini olduğu gösterilmiştir. Genin susturulduğu model organizmaların da embriyolojik dönemde iken öldüğü görülmüştür (382). Bu varyant (rs146740904), varyant değerlendirme tahmin araçlarıncı ‘patojenik’ olarak değerlendirilmekle birlikte, aynı gende allel frekansının (0,0000866) daha az olduğu farklı varyantların (0,000119) zararsız olarak tespit edilmesi nedeniyle VUS olarak nitelendirilmiştir. Tek başına etiyolojiyi açıklamamakla birlikte *ZSCAN4* ile bir arada iken fenotipe etki edebileceği düşünüldü. İki fenotipik açıdan normal çocuğu olan kızkardeşte de *ZSCAN4* varyantının araştırılması ve aralarında akrabalık olmayan eşinde *ZSCAN4* ve *PAPLN* tüm gen dizi yapılması planlandı.

NOBOX geni, embriyonik genomun aktivasyonu ve blastosist gelişiminde önemli bir role sahiptir. Foliküllerin gelişiminde direkt ve *FOXL2* ile işbirliği içerisinde diğer genlerin anlatımlarını düzenleyerek indirekt etkilidir (383, 384). Germ hücre kistlerinde ve büyümekte olan primordiyal foliküllerde yüksek oranlarda anlatımı olur. Fare embriyoları ile yapılan çalışmalarda *Nobox*, *Zar1* ve *Dnmt1* gibi erken embriyogenezde etkin kritik öneme sahip genlerin anlatımını etkilediği gösterilmiştir (385). Ayrıca *NOBOX*, POY etiyolojisinde yeri YND teknikleri sayesinde tespit edilmiş genlerden biridir (386). Olgu 31’de saptanan varyant (rs749172175) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmesine karşın, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmekte ve gnomAD veri tabanında allel frekansının 0,00000881 olarak verilmesi bu olasılığı desteklemektedir. Olgunun tartışması POY ile ilişkili genler başlığı altında verilmiştir.

NOP14 geni ile herhangi bir hastalık/sendrom ilişkilendirilmemiş, fakat TKG öykülü bir çiftin gebelik kaybı ürününe yapılan TED analizinde homozigot patojenik varyantı saptanmıştır (344). Ökaryotlar arasında evrimsel olarak korunmuş olan bu gen, 18S ribozomal RNA'nın işlenmesinde ve 40S ribozom alt biriminin oluşmasında etkindir (387). Zebra balığı çalışmalarında fonksiyon kaybına yol açan homozigot mutasyonların anomalilere yol açarak letal olduğu gösterilmiş ve embriyolojik gelişmede etkin olabileceği düşünülmüştür (388). **NOP14** geninin VUS kategorisinde iki farklı varyantı iki olguda saptandı (Olgu 3 ve 27). Olgu 3'e ait gebelik kaybı ürününden fetal DNA örneği elimizde bulunduğundan anne ile birlikte saptanan varyant için dizilendi. Fetusun bu varyantı monoallelilik taşıması ve allel sıklığının $\sim 1/273$ (0,00366) olması nedeniyle ilişkili gebelik kaybının etiyolojisini açıklayamayacağı düşünüldü. Olgu 27'de tespit edilen varyantın (rs777356082) allel frekansının 0,0000261 olması ve varyant değerlendirme tahmin araçlarında 'patojenik' olarak değerlendirilmesi nedeniyle etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Varyantın etkisinin gösterilebilmesi için aralarında akrabalık olmaması nedeniyle eşinde **NOP14** tüm gen dizileme yapılmasının ve gebelik ürünlerinin değerlendirilmesinin tanıya katkı sağlayabileceği kararlaştırıldı.

Son yıllardaki model organizmalardaki fonksiyonel çalışmalar ile keşfedilen genlerden biri olan **CTBP2**, farelerde başta serebral korteks gelişimi olmak üzere embriyolojik dönemde aktiftir (389, 390). Bu gende (Olgu 23) saptanan varyant (rs150750718) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, *in silico* varyant değerlendirme tahmin araçlarında 'patojenik' olarak değerlendirilmekte ve gnomAD veri tabanına göre hiç saptanmamış olması bu olasılığı desteklemektedir. Olgunun eşi ile akraba olması OR kalıtım modelini düşündürdüğünden eşinin de bu varyant açısından incelenmesi planlandı. Eşte aynı varyantın saptanması varyantın 'patojenik' etkisini destekleyecektir.

FREM2 geninin patojenik varyantları OR kalıtlı Fraser sendromu tip-2 (MIM #617666) ve izole kriptoftalmi (MIM #123530) ile ilişkilidir. Fraser sendromu, genito-üriner sistem anomalileri, sindaktili ve fasiyal dismorfizm ile karakterizedir (391) ve intrauterin ölüm ile sonuçlanmış gebelikler de bildirilmiştir (392). İlk dört gebelik kaybı sonrasında septat uteri saptanarak opere edilen Olgu 12'de operasyon sonrasında da 8 gebelik kaybı yaşanması nedeniyle olgu çalışmaya dahil edilmişti. Saptadığımız varyant

(rs375059201) ACMG sınıflandırmasına göre VUS, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ise ‘zararsız’ olarak değerlendirilmekteydi. Olguda diğer 3 gende biri patojenik, biri olası patojenik ve biri VUS varyant bulunması TGK etiyojisi ile ilişkili olabilir ancak, *FREM2* geninin OR olması nedeniyle eşinin de bu gen için incelenmesine ve taşıyıcılık varsa gen ürünlerinin moleküler ve klinik olarak değerlendirilmesinin varyant değerlendirmesine katkı sağlayacağı düşünüldü.

UBTFL1, erken embriyolojik gelişim evreleri, implantasyon ve embriyonik kök hücrelerde etkin bir gendir ve preimplantasyon dönemde anlatılmaktadır (393, 394). *UBTFL1* geninde (Olgu 14) saptanan varyant (rs150750718) ACMG kriterlerine göre daha önce tanımlanmamış bir varyant olması nedeniyle VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, *in silico* varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘zararsız’ olarak değerlendirilmiştir. Bu veriler ışığında saptanan varyantın etiyojisi açıklamakta yetersiz olduğu düşünüldü ve dışlandı.

HSF1 geni oogenez, spermatogenez ve plasenta gelişiminde etkin ısı şok proteinlerini uyarıcı etki yapan ısı şok transkripsiyon faktörü-1’i kodlar (395). Geni susturulmuş dişi farelerin ovumlarının fertilize olabilmelerine rağmen, embriyolarının zigot aşamasından ileri gidemedikleri gösterilmiş, yabancı tip varyant taşıyan spermilerin de bu durumu değiştirmemesi üzerine maternal etki gösteren genlerden biri olduğu anlaşılmıştır (396). *HSF1* geninde saptanan varyant (rs1564620538) (Olgu 16) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmesi ve gnomAD veri tabanında verilen genomik verilerde 115.434 dişi bireyde sadece bir adet saptanmış olması (allel frekansı 0,00000866) bu olasılığı desteklemektedir. Aynı olguda patojenik bir varyant *SLAIN1* geninde saptanmıştır. Bu gen ile ilişkili prenatal ya da postnatal henüz herhangi bir hastalık bildirilmemiş olmakla birlikte, yapılmış çalışmalarda, fare ve insanda embriyonik kök hücrelerde ve embriyolojik gelişmede aktif ve hipokampal nöronlar başta olmak üzere beyinde aksonların gelişiminde etkin olduğu gösterilmiştir (397). Aralarında 2.° kuzen evliliği olan çiftimizde, eş **SLAIN1** gen varyantı için dizilendi ve varyantı taşımadığı görüldü. Genetik etiyojinin açıklanmasında *HSF1* geninin dışlanması için olgunun kızkardeşi ve annesinin de gebelik öyküleri göz önüne alınarak dizilenmesi ve eşte saptanmayan ve ilgili bölümde tartıştığımız siliyopati ile ilişkili *CEP290* ve *SLAIN1* genleri için tüm gen dizilenmesi tanıya katkı sağlayacaktır.

IGSF10 geni embriyolojik dönemde gonadotropin aksının gelişiminde etkindir. Monoallelik patojenik varyantlarının gecikmiş puberte ile ilişkili olduğu ve zebra balıkları ile yapılan fonksiyonel çalışmalarda susturulduğunda GnRH nöronlarının göçünün bozulduğu tespit edilmiştir (398). POY etiolojisinin açıklanması için yapılan TED analizlerinde, hem OD hem de OR kalıtım kalıbına uyan ovaryan yetmezlik ile ilişkili bulunmuş iken, Kallmann fenotipi gösteren bir olguda biallelik anlamsız gen mutasyonu saptanmıştır (399). *IGSF10* geninde (Olgu 17) saptanan varyant (rs150750718) ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmiş olmakla birlikte, anlamsız mutasyona yol açarak varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmesi ve gnomAD veri tabanında allel frekansının 0,0000669 olarak verilmesi bu olasılığı desteklemektedir. Kızkardeşte ve annede de gebelik kaybı öyküsü olduğundan *IGSF10* geninde saptanan bu varyant için onların da incelenmesinin varyantın değerlendirmesine katkı sağlayabileceği düşünüldü.

WNT gen ailesi evrimsel olarak çok iyi korunmuş bir gelişimsel gen topluluğunu oluşturur ve embriyogeneizde aktiftir. Bu yolla aktif genlerden **WNT4** gen ürünü, böbrek ve üriner sistem, adrenal, meme bezleri, hipofiz ve dişi üreme sisteminin gelişimi ve organogenezinde aktif embriyolojik bir faktördür. Müllerian dokuların gelişiminde baş düzenleyici olarak kabul edilir (400). Bu rolünü gerçekleştirirken dişi yönde gelişimi organize eder, dişi tipi kan dolaşımının oluşumu için anjiyogenezi uyarır ve testiküler hormonlar olan androjenlerin yüksek oranlarda sentezlenmesini engeller (401). Postnatal hayatta oositlerin yaşam süresinin, endokrin ve parakrin yolların düzenlenmesini sağlar (402). *Wnt4* geninin susturulduğu farelerde, oosit sayılarının ciddi oranda azaldığı gözlenmiştir (403). Oositlerin hayatta kalışını NOBOX ve FIGα aracılığıyla oositlerin apoptozunu engelleyerek sağlar (385, 404). Over metabolizmasında görevli *BMP15* ve *GDF9*’u kontrol eder (405, 406). Biallelik patojenik varyantları SERKAL sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Heterozigot formdaki mutasyonlarının da dominant negatif etki ile steroidogenezi bozarak ya da normal düzeylerin altında kalmasına yol açarak fenotipik bulgular verebileceği, aynı zamanda ovulasyonun düzensizleşmesi ile subfertilite görülebileceği söylenmektedir (402). *WNT4* geninde (Olgu 1) saptanan varyant (rs1264065222) ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmiş olmakla birlikte, *in siliko* varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmekte ve gnomAD veri tabanında 115.230

dişi bireyde hiç tespit edilmeyişi de bu olasılığı desteklemektedir ve bu veriler ile etiyolojide yeri olabileceği düşünülmektedir.

WNT6 geninin endometriyumun desidualizasyonunda (407) ve embriyo 8 hücreli aşamada iken anlatım yaptığı gösterilmiş (408), Çin’de TKG öykülü 100 kadın ile yapılan bir çalışmada *WNT6* gen varyantlarının etiyoloji ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (247). *WNT6* geninde (olgu 21) saptanan varyant (rs142171369) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmektedir. Varyantın patojenitesinin değerlendirilmesinde olgunun kızkardeşlerinin ve annesinin de incelenmesi katkı sağlayabilecektir.

5.2.5. Epigenetik Mekanizma ile Düzenlenen Genler

Embriyogenezde, paternal ya da maternal genetik materyalin seçici olarak baskılandığı (‘imprinting’) genomik bir denge vardır. Embriyonun temel gelişiminde maternal, ekstraembriyonik dokuların farklılaşmasında ve gelişmesinde ise paternal genler aktiftir. Maternal genom, embriyonun büyümesini annenin kendisine zarar vermeyecek şekilde düzenleme eğiliminde iken, paternal genom sürekli büyümeyi teşvik eder (409). Plasental dokuların farklılaşması, hormonlar ve büyüme faktörleri aracılığıyla metabolizmanın düzenlenmesi de bu mekanizmayla kontrol edilir (410). Çalışmamızda, bir olguda (Olgu 23) aktivitesi epigenetik mekanizma ile kontrol edilen *IGF2* geninde patojenik bir varyant saptadık.

IGF2, genomik baskılanma mekanizması ile maternal allelin susturulduğu ve paternal allelin aktif kaldığı genlerdendir. Genin metilasyonunda bozulma olduğunda Beckwith-Wiedemann sendromu ortaya çıkar (MIM #130650). *IGF2*, granüloza hücrelerini apoptozdan koruyan ve düzgün bir mikroçevre oluşmasını sağlayan faktörlerden biridir (411). *IGF2*’nin, insan luteinize granüloza hücrelerinin proliferasyonunu, östradiol ve progesteron üretimini uyardığı gösterilmiştir (412-414). Öne sürülen hipotezlerden biri de gebelik esnasında endometrial LIF anlatımı düzenlenmesinde *IGF1* ve *IGF2*’nin hCG benzeri etki gösterdiğidir (415). 38 gebelik kaybı materyalinde yapılan bir çalışmada *IGF2*, *PEG10*, *PHLDA2* ve *CDKN1C* gibi parental kökene göre baskılanan genlerin ekspresyonlarının normal gebeliklere göre farklılık olduğu gösterilmiştir (416). Gebelik kayıplarında sıklıkla maternal allellerin baskılanması gereken genlerde yüksek oranlarda hipometilasyona olduğu tespit

edilmiştir (409). Ayrıca fare plasentalarında azalmış *Igf2* gen anlatımı küçük plasenta ve intrauterin gelişme geriliği ile ilişkilendirilmiştir (417). Büyümeyi sağlayan *IGF2* geninde, baskılanma defekti ile maternal allelin aktif kalmasının, ya da maternal alleldeki fonksiyon kaybına yol açan bir varyantın fetal gelişimi engelleyici etki göstereceği düşünülebilir. IVF uygulanan kadınların foliküler sıvısında yüksek düzeyde *IGF2* bulunmasının oosit olgunlaşması ve erken embriyo gelişimi için iyi prognoz göstergesi olduğu gösterilmiştir (418). FSH ile birlikte *CYP19A1* geninin aktivasyonunu sağlar. *IGF2* olmadığında bu aktivasyonu gerçekleştiremeyen ve LH salınımına cevap olarak yeterli östrojen üretemeyen granüloza hücreleri, korpus luteumun devamlılığını da sağlayamaz. FSH ve *IGF2* arasındaki birliktelik insan granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması için kritik ve gebeliğin devamlılığında gerekli olduğu düşünülebilir (419). Olgumuzda *IGF2* geni, HGMD veritabanında esas alınandan farklı bir transkriptinde saptanan (NM_001127598.2) ve anlamsız mutasyona yol açan varyantını aile içi segregasyon analizinde, olgunun babasının da monoallel olarak taşıdığı tespit edildi. Paternal allelin aktif anlatım yapan allel olması nedeniyle olgumuzda etiyolojiyi açıklamakta güçlü bir aday olarak değerlendirildi.

5.2.6. İmmün Regülasyonda Etkin Genler

Serimizde, immün cevap ve yolaklarında etkin 3 gende 3 varyant 3 olguda saptanmıştı; ***PIBF1*** (Olgu 4), ***CXCL8*** ve ***HLA-DRB5*** (Olgu 22) ile ***HLA-DRB5*** (Olgu 23) varyantlarıdır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ***PIBF1*** gen ürününün progesteron hormonuna cevap olarak gebelik boyunca progesteron reseptörü (PR) pozitif T lenfositlerden salındığı, NK hücrelerinden perforinin salınmasını engellediği ve maternal immün cevabın baskılanmasında progesteron ile birlikte çalıştığı gösterilmiştir (420). TKG öykülü ve preterm eylem riski taşıyan olgularda periferik lenfositlerin PR ve ***PIBF*** miktarlarının daha az olduğu görülmüş (421, 422) ve tedavi amaçlı paternal lökosit immünizasyonu yapılmış TKG öykülü kadınların lenfositlerinde PR sayılarının arttığı tespit edilmiştir (420). Perinükleer yerleşimli ve perisentriyolar satellitlerin yapısına katılan ***PIBF1*** geninin hücre siklusunda da aktif olduğu düşünülmektedir (423). Biallelik patojenik varyantları, siliyopati grubundan santral sinir sistemi patolojilerine bağlı olarak fenotipik bulguların görüldüğü Joubert sendromu tip-33 ile ilişkilidir (424). Serimizde ***PIBF1*** geninde saptanan varyant (rs17089782), ACMG sınıflandırmasına

göre VUS nitelendirilmiştir. *In silico* tahmin araçlarında ‘patojenik’ etkili olacağı öngörülmekle birlikte allel frekansının 0,0182 olması nedeniyle tek başına etiyolojiyi açıklamakta yetersiz olduğu düşünüldü. Olgunun gebelik kaybı öyküsünün iki ayrı partnerden olması nedeniyle maternal faktör olasılığı üzerinde durulduğundan olgunun gebelik öyküsü göz önüne alınarak kız kardeşlerinde de bu varyantın araştırılması planlandı.

Olgu 22’de bulunan immünite ile ilişkili 2 genden biri olan **CXCL8 (IL8)** oldukça iyi bilinen bir sitokin olan IL8’i kodlar. Sebebi açıklanamayan TKG olgu grubunda gen anlatımındaki farkların etkili olduğu düşünülmektedir (425). Serimizde **CXCL8** geninde saptanan varyant (rs536774132) VUS olarak sınıflandırılmış olmasına rağmen gnomAD veri tabanında 0,00000872 allel frekansı ile nadir görülen bir varyant olarak belirtilmekte ve *in silico* tahmin araçlarında patojenik etki beklenmektedir. Bu varyantın klinik etkisi için daha fazla olguda saptanması beklenmelidir.

HLA-DRB5 geninde 2 olguda aynı kırılma bölgesi varyantı (rs79192142) saptandı. Otoimmüniteye yatkınlık ve otoimmün tiroid hastalıkları ile ilişkilendirilmekte olan bu genin, artmış anlatımı ve varyantlarının TKG etiyolojisinde yeri olabileceği belirtilmiştir (426, 427). Bu varyant ACMG kriterlerine göre VUS olarak sınıflandırılmakta, fakat tahmin araçlarında ‘zararsız’ olarak nitelendirilmekte olduğundan Olgu 23’teki etiyolojiyi tek başına açıklayamayacağı düşünüldü. Olgu 22’de ise **CXCL8** ve **HLA-DRB5** gen varyantlarının birlikte görüldüğünden direkt etkileşimleri olmamasına rağmen aynı yolak üzerine etki gösterdikleri göz önüne alınarak etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Eldeki bu veriler bugün için yetersiz olarak değerlendirildi.

5.2.7. Hücre Bölünmesi / Döngüsünde Etkin Genler

Hücrelerin büyüme ve çoğalma için izledikleri 4 aşamadan oluşan bir hücre döngüsü örüntüsü vardır; esas bölünme evresi (M fazı), DNA replikasyonu evresi (S fazı), hücrenin RNA, protein gibi materyallerini sentezlediği ve büyüdüğü G1 fazı ile hücre bölünmesine hazırlandığı G2 fazı. Bu aşamalarda sürecin düzgün işleyip işlemediğinin değerlendirildiği birçok kontrol noktası vardır. Siklinler ve siklin bağımlı protein kinazlar tarafından kontrol edilen döngü **RB1**, **TP53**, **CDKN2A** genlerinin aktif olduğu G1/S kontrol noktası; hücre boyutu, DNA tamiri ve replikasyonun değerlendirildiği G2/M kontrol noktası ve tüm kromozomların tubulin içciklerine

tutunup tutunmadığı ya da metafaz-anafaz geçişinin temel alındığı M fazı kontrol noktalarında denetlenir. Bölünmeyen ve stabil konuma geçen hücreler için G0 fazı terminolojisi kullanılır.

Çalışma kapsamında 6 olguda, hücre döngüsünde etkin 7 gende bir patojenik ve 6 VUS olarak nitelendirilmiş varyant saptandı. Bu genler; **BUB1B** (Olgu 5), **LRIF1** (Olgu 16), **CCNA2** (Olgu 25), **MCM2** ve **4** (Olgu 35), **MTOR** (Olgu 31) ve **SPICE1**'dir (Olgu 14).

BUB1B geni, mitoz bölünme kontrol noktası genlerinden biridir ve OD erken kromatid ayrılması (MIM #176430) ile ilişkilendirilmiştir. Sitogenetik çalışmalarda kısalmış metafaz süresi ile tespit edilebilen bu bulgu, 1983 yılında, 27 yaşındaki TKG öykülü bir kadında, radyoterapi tedavisi alan 24 yaşındaki testis seminomu öykülü bir erkekte ve 28 yaşındaki infertil bir dişi olguda gösterilmiştir (428). 1986 yılında 5 adet gebelik kaybı olan bir İspanyol kadında kromozom analizi ile erken kromatid ayrılması görülmüştür (429). 1993 yılında 3 adet gebelik kaybı öyküsü olan bir dişi olgunun lenfosit kültürü ile yapılan sitogenetik incelemede, sentromerlerin ayrılmasında oluşan bu kusurun hücre bölünmesi hatalarına yol açarak tekrarlayan düşüklere neden olabileceği öne sürülmüştür (430). Fare çalışmalarında *Bub1b* geninin de içlerinde olduğu içcik oluşumunu kontrol eden genler susturulduğunda, embriyoların yaygın hücre apoptozları nedeniyle öldükleri görülmüştür (431). Heterozigot *Bub1b* geni patojenik varyantlarını taşıyan fareler ve yavruları ile yapılan çalışmada, anormal gelişimi olan embriyoların (n=71) genotipik durumları incelenmiş, patojenik varyantın 67'sinde homozigot ve 3'ünde heterozigot olarak bulunduğu ve genin fonksiyon kaybının nokodazol ve kolşemid benzeri etki göstererek metafaz duraklamasına yol açtığı gösterilmiştir (432). Oosit veya embriyo kalitesini önceden tespit ederek YÜT denemelerinde başarı oranının artırılabilmesi amacıyla, insan oositlerinde ve kümülüs hücrelerinde gen anlatım düzeylerinin incelendiği bir çalışmada *BRCA1-2*, *ATM*, *TP53*, *RB1*, *BUB1*, *MAD2*, *APC*, *ACTB*, *BARD1*, *RBL2*, *RBBP7*, *BUB3* ve *BUB1B* gibi oosit olgunlaşmasında, hücre siklusunda ve DNA tamir yollarında etkin genlerin belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (433, 434). *BUB1B* proteini *BUB3* ve *CDC20* ile etkileşerek kontrol noktası aktivasyonunu sağlar (435). *MAD2L1* ile *CDC20/APC* inhibisyonu yaparak kardeş kromatidlerin erken ayrılmasını önler (436). Ayrıca *RBL2*, *RB1* ve *BRCA1* yollarına da etki eder (437). *BUB1B* geninde saptadığımız varyant (rs1555381180), VUS olarak sınıflandırılmış olmasına rağmen, gnomAD veri tabanında

daha önce hiç saptanmamış olması ve *in siliko* varyant tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmesi nedeniyle olgudaki etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü (Olgu 5). Bu amaçla olgunun kardeşlerinde ve annesinde varyant için segregasyon analizi yapılması, eşte *BUB1B* tüm gen dizilenmesi kararlaştırıldı.

LRIF1 geni, aynı isimli ligand bağımlı nükleer hormon reseptörü aktivatörü olan proteini kodlar. Bu gen ile ilişkilendirilmiş herhangi bir hastalık veya sendrom bulunmamakla birlikte, 2018 yılında yapılan bir çalışmada, hücre döngüsünde hücrenin seçeceği yolun kararını vermede aktif rolü olduğu ve heterokromatin protein 1 α ile birlikte mitoz bölünmede kromozomların sentromerlerden ayrılmasında görev aldığı gösterilmiştir (438). Olgu 16’da saptadığımız *LRIF1* gen varyantı ACMG sınıflandırmasıyla VUS olarak nitelenmiş, varyant tahmin araçlarında hem ‘patojenik’ hem de ‘zararsız’ olabileceği belirtilmiştir. Daha önce saptanmamış olan bu varyant ile ilişkili bilginin yetersiz olması nedeniyle tek başına genetik etiyolojiyi açıklayamayacağı düşünüldü.

CCNA2 geni siklin A2 proteinini kodlar. Siklin bağımlı kinazlar CDK1 ve CDK2’ye bağlanarak ve/veya etkileşerek G1/S ve G2/M geçişini tetikler (439). Farelerle yapılan çalışmalarda *Ccna2* geni susturulduğunda implantasyon öncesi letal etkili olduğu gösterilmiştir (440). 2019 yılında yayınlanmış başka bir çalışmada, *CCNA2* geni çalışmadığında trofoblastların göçünün durduğu, p53 yolağının aktifleştiği ve trofoblast apoptozuna giden sürecin başladığı gösterilmiş; TKG etiyolojisinde bu yolakların etkisinin olabileceği öne sürülmüştür (441). Olgu 25’te saptadığımız VUS olarak sınıflandırılmış *CCNA2* varyantı (rs199853275) için gnomAD verileri değerlendirildiğinde ‘zararsız’ olabileceği düşünüldüğünden etiyolojinin açıklanmasında yetersiz bulundu.

DNA replikasyonunu düzenleyen proteinleri kodlayan *MCM*- genleri hormonal kontrol altında endometriyal hücre döngüsü ve proliferasyonda yer alırlar (442). DNA replikasyonu, heterohekzamerik minikromozom devamlılık kompleksine (**MCM**) ve beraberinde helikaz aktivitesine ihtiyaç duyar. Bu kompleks hücre siklusunun G1 aşamasında kromatin düzenlenmesinde görevlidir, aktive olmasıyla helikaz enzimi DNA’yı açar ve replikasyon çatalı oluşur (443). Hayvan çalışmalarında *Mcm* genlerindeki biallelik patojenik varyantların prenatal veya postnatal dönemde letal etkili olduğu gösterilmiştir (444). 2019 yılında yayınlanmış *Mcm2* ve *Mcm4* genleri

susturulmuş bir çalışmada fare embriyolarının özellikle dişi embriyoların erkeklere oranla daha fazla öldüğü saptanmıştır (445). Bu cinsiyetler arasındaki dikkat çeken farklılığın dişilerde, Mcm yokluğunda cGAS-STING inflamasyon yolağının daha fazla aktif olmasının olabileceği, testosteron hormonunun anti-inflamatuvar özelliğinin erkek embriyoları nispeten koruduğu öne sürülmüştür (445, 446). Bunun yanında endometriyal stromal hücrelerin hormonlara yanıt olarak proliferasyonu ve poliploidizasyonu hücre siklusunu kontrol eden faktörlerin etkisiyle gerçekleştiği belirtilmiştir (447, 448). Fare endometriyumları ile yapılan başka bir çalışmada Mcm2-7 proteinlerinin implantasyon bölgelerinde artmış anlatımının olduğu, desidualizasyon için elzem oldukları, Mcm2'nin progesteron salınımı ile aktive olduğu gösterilmiştir (443). Olgu 35'te *MCM2* ve *MCM4* genlerinde VUS olarak nitelendirilen iki varyant tespit edildi. Aynı yolak ve kompleks içerisinde bulunan bu genlerin patolojilerinin digenik kalıtım kalıbında etkili olabileceği düşünüldü. Tanıya katkı sağlaması amacıyla olgunun kız kardeşlerinde ve annesinde ilişkili varyantların incelenmesi kararlaştırıldı.

MTOR geninin kodladığı protein kinaz ana metabolik yolakların temelinde yer alan, fizyolojik düzen içerisinde elzem moleküllerden biridir; hücre büyümesinde, glukoz metabolizması ve lipogeneze etkindir (449). mTOR, yapısal olarak farklı iki kompleks olan mTORC1 ve mTORC2'nin katalitik alt birimini oluşturur. mTORC1 hücre büyümesini ve çoğalmasını arttırırken, aktivitesi tüberoskleroz kompleks 1 ve 2 tarafından bastırılır (450). Fare çalışmalarında, mTOR aktivatörlerinin primordial (451) ve sekonder folikül büyümesini aktive ettiği (452) ve primordial folikül aktivitesinin düzenlenmesinde PI3K-AKT ve mTOR sinyal yollarının birlikte çalıştığı gösterilmiştir (453). *MTOR* geninde saptadığımız varyant, ACMG kriterlerine göre 'patojenik' olarak sınıflandırılmıştır (rs768374086). Olgu 31'de *NOBOX* geninde VUS kategorisinde değerlendirilen diğer varyant ile göz önüne alındığında, *MTOR* geninin etiyolojiyi açıklamakta daha güçlü bir aday olduğu düşünüldü. İlk aşamada olgunun ebeveynleri ve kardeşlerinde segregasyon çalışması yapılması ve eşte *MTOR* tüm gen dizilenmesi; ayrıca *NOBOX* geninin OD kalıtım ile etki göstereceği göz önüne alınarak olgunun annesinde ilişkili gen varyantının incelenmesi planlandı.

SPICE1 geni tarafından kodlanan protein, hücre siklusunda etkindir ve mitozda sentriyollerin yapısında bulunur (454). Sentriyollerin duplikasyonunda CDC52 ve CEP120 proteinleri ile birlikte çalışır (455). HeLa hücreleri ile yapılan çalışmalarda

anlatımı durdurulduğunda hücrelerde ciddi mitotik bölünme hataları olduğu gözlenmiştir (454). Çerçeve kayması mutasyonuna yol açan *SPICE1* gen varyantı, ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmesine rağmen daha önce hiç saptanmamıştır ve varyant tahmin araçlarında ‘patojenik’ etkili olacağı belirtilmektedir. Bu nedenle, varyantın Olgu 14’te etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Olgunun annesinde de gebelik kaybı öyküsü olması nedeniyle OD; hem anne ve babasının öyküsünde, hem de eşi ile arasında akraba evliliği öyküsü nedeniyle OR kalıtım gösterebileceği görüldü. Kalıtım modelinin belirlenmesi ve etiyolojideki yerinin gösterilmesi için anne, baba ve eşinde varyantın incelenmesi kararlaştırıldı.

5.2.8. DNA Hasarı Tamir Yolağı

DNA’da oluşan hasarların tamiri; direkt tamir, baz eksizyon tamiri, nükleotid eksizyon tamiri, yanlış eşleşme tamiri ve replikasyon sonrası tamir olarak farklı yollarla gerçekleşir. Yanlış eşleşme tamir yolağı, genom bütünlüğünün sağlanmasında ve devamında elzemdir, yanlış eşleşmiş bazların DNA’dan çıkarılmasını, rekombinasyonun düzenlenmesinin ve mayoz bölünmedeki kromozom segregasyonunu sağlamaktadır (456-458). Mayoz bölünme profaz I’in erken aşamalarında homolog kromozomlar arasında sinapsis denilen bir fiziksel temas meydana gelir; çift zincir DNA kırığı, parça değişimi ve ardından DNA tamiri ile homolog rekombinasyon gerçekleşir, buradaki DNA hasarı planlı ve genetik materyallerin paylaşımı açısından önemlidir. DNA hasarı tamiri yollarında 6 olguda, 6 farklı gende 6 adet VUS ve 1 adet zararsız olarak nitelendirilmiş varyant saptandı. Bu genler; **HFM1** (Olgu 1), **MCM8** (Olgu 1 ve 11), **MSH5** (Olgu 25), **EXO1** (Olgu 23), **ERCC6** (Olgu 15) ve **MMS19**’dur (Olgu 14).

HFM1 geni 39 ekzonlu, haploid gamet oluşumunda görevli, mayoz bölünmede homolog rekombinasyon aşamasında ve çift zincir kırıkları tamirinde yer alan bir DNA helikazı kodlayan gendir (459). Overlerde yüksek oranda anlatımı olur (460). *Hfm1* geni susturulmuş farelerin infertil olduğu tespit edilmiştir (461). POY etiyolojisini araştırmak amacıyla TED analizi yapılmış bir dişi olguda **HFM1** geninde heterozigot patojenik bir varyant saptanmış (c.3470G>A), bu genin OD etki ile de fenotipe yol açabileceği gösterilmiştir. Bu olgunun dikkat çekici özelliği POY teşhisi konduktan (31 yaş) sonra, 32 yaşında iken doğal yollarla gebe kalması ve bu gebeliğinin 8. GH’da kayıpla sonlanmasıdır. Genin farklı fenotipik etkiler göstermesi penetrans eksikliği ve

ekspresivite değişkenliği ile ilişkilendirilmiş, fakat TKG ile bir ilişkisi henüz bildirilmemiştir (462). *HFM1* geninde saptadığımız varyant (rs775049733), ACMG kriterlerine göre VUS olarak, fakat varyant tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak nitelendirilmiş ve allel frekansı 0,00000905 tespit edilmiştir. *MCM8* gen ürünü, MCM2-7 kompleksi gibi replikasyonun ana basamaklarından birinde rol oynamaz; MCM9 ile kompleks oluşturur, RAD51’in DNA hasarının olduğu bölgeye gelmesini sağlar ve pakiten evresinde gerçekleşen homolog rekombinasyonda ve gametogeneizde görev alır (463). Genin susturulduğu fare çalışmalarında fonksiyon kayıplarının POY ve infertiliteye yol açabileceği gösterilmiştir (464). YND teknolojilerinin kullanımıyla birlikte *MCM8* biallelik patojenik varyantları POY etiolojisi ile ilişkilendirilmiştir (465). Olgu 11’de heterozigot formda saptamış olduğumuz *MCM8* geni varyantının (c.482A>G; p.H161R) aynı genomik lokasyonda farklı nükleotit değişiminin biallelik formu (c.482A>C; p.H161P) 2017 yılında primer amenore, atrofik overler ve uterusun olduğu bir olguda bildirilmiştir (466). Olgu 11’deki varyant monoallelilik olduğundan etiyojijiyi açıklamada yetersiz bulunmuştur. Olgu 1’de saptanan *MCM8* varyantı ise VUS olarak değerlendirilmiş olmasına rağmen daha önce saptanmamış bir varyant olup, tahmin araçlarına göre patojenik etki göstermesi beklenmektedir. *MCM8*, *HFM1* ve *WNT4* genlerinin etkileşimli olmamalarına rağmen oositlerin gelişmesi ve mayoz bölünmede aktif olmalarıyla etiyojijiyi açıklayabileceği düşünüldü ve fonksiyonel çalışmalar ile poligenik etkinin incelenmesi kararlaştırıldı.

Memelilerde MutS (MSH2-6) ve MutL (MLH1 ve 3, PMS1-2) homologları tamir yolaklarında etkin protein grubunu kapsar. Mayoz bölünmenin profaz I aşamasında MSH4 ve MSH5 MutS heterodimerini oluşturur, parça değişiminin olduğu pakiten evresinde MLH1 ve MLH3’ün oluşturduğu heterodimer ile etkileşime girer (457). Fareler ile yapılan çalışmalar sonrasında, *Msh4* veya *Msh5* fonksiyon kayıplarında profaz I’in erken aşamalarında bölünmenin durduğu, homolog kromozomlar arasındaki sinapsislerin bozulduğu belirtilmiştir (467, 468). Mayoz bölünme ve homolog rekombinasyonda aktif genlerden biri olan *MSH5*’in embriyolojik dönemde overler ve adrenal bezde, yetişkinlerde granüloza hücrelerinde aktif anlatımının olduğu bulunmuş, patojenik varyantları POY ile ilişkilendirilmiştir (469). *MSH5* geninde tespit edilen varyant, VUS kategorisinde sınıflandırılmış olmasına rağmen literatürde bildirilen *MSH5* gen varyantlarının ~%96 (29/30) oranında zararsız

olduğunun gösterilmesi nedeniyle (BP1) Olgu 25'teki etiyolojiyi açıklayamayacağı düşünüldü.

MLH1-MLH3 heterodimeri ile etkileşime giren proteinler arasında *EXO1* (5'-3' ekzonükleaz) de vardır, maya ve fareler ile yapılan çalışmalarda metafaz I aşamasında etkin olduğu gösterilmiştir (470-472). Ayrıca *Exo1* geninin biallelik olarak susturulduğu dişi farelerde infertilite tespit edilmiş, fakat ekzojen gonadotropin tedavisi ile normal foliküler gelişim olabileceği öne sürülmüştür (470). 2008 yılında yapılan başka bir çalışmada, *Exo1*'in mayozdaki parça değişimi esnasında Mlh1-Mlh3 heterodimerini stabilize ettiği, bu gen susturulduğunda oositlerin yaklaşık %85'inin metafaz I aşamasında durakladığı gösterilmiştir (473). *EXO1* geninde tespit edilen varyant, ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmesine rağmen, daha önce hiç tespit edilmemiş bir varyant olması, tek nükleotid delesyonu ile proteinde erken sonlanmaya yol açması nedeniyle patojenik etkili olma olasılığının yüksek olduğu düşünüldü. Olgu 23'te *IGF2* gen varyantının paternal allelin aktif olacağı düşünüülerek ön planda tutuldu. *EXO1*'in monoallelik patojenik varyantlarının ve *IGF2* geni ile birlikte etkisinin fonksiyonel çalışmalarla incelenerek tanıya katkısının olabileceği düşünüldü.

CSB-PGBD3 olarak da bilinen ***ERCC6*** geni patojenik varyantları Cockayne sendromu ile ilişkilendirilmektedir (MIM #133540); anlatımını yaptığı protein, DNA hasar bölgelerindeki duraklayan RNA polimeraz II'yi bağlar (474), mayoz bölünme, homolog rekombinasyon ve oositlerdeki DNA hasarı tamirinde etkindir. Monoallelik varyantlarının POY etiyolojisinde rolü olduğu tespit edilmiştir (475). *ERCC6* geninde (Olgu 15) saptadığımız varyant (rs200697187), ACMG'ye göre VUS ve bazı varyant tahmin araçlarına göre de zararsız olarak nitelendirildiğinden etiyolojiyi açıklamayacağı kararlaştırıldı.

MMS19 geni nükleotid eksizyon tamiri ve RNA polimeraz II transkripsiyonunda yer alır (476). Patojenik varyantları metiyonin sentezinde kusurlara, genotoksik strese karşı hassasiyetin artmasına ve telomerlerin kısalmasına yol açar (477). Sadece nükleer DNA'nın değil ökaryotik hücreler için olmazsa olmaz enerji kaynağı olan mitokondrinin de DNA'sının tamirinde görevlidir (478). *MMS19* geninde saptanan ACMG'de VUS kategorisinde nitelendirilmiş varyant (rs373557835), tahmin araçlarında patojenik olarak belirtilmesine rağmen, literatürdeki gen varyantlarının hemen hepsinin zararsız olması nedeniyle etiyolojideki rolü netleşmemiştir. Olgu 14'te

öncelikli olarak *SPICE1* gen varyantının incelenmesi, gerek duyulduğunda *MMS19* segregasyon analizine geçilmesi planlandı.

5.2.9. Siliyopatilerle ilişkili genler

Siliyopatiler, siliya yapısının veya fonksiyonlarının etkilenmesi/bozulması ile ortaya çıkan bir grup genetik, multisistemik hastalıktır. Genellikle bilişsel yetersizlik, böbrek kistleri, retinal kusurlar ve polidaktili ile ilişkilendirilmekte olup, situs inversus olgularında da ilk akla gelen hastalık grubudur.

Siliyalar, G0/G1 ve S fazının başlangıcında, mitotik içciklerin sentriyoller tarafından düzenlenmesinden önce oluşan yapılar ile hücre siklusunda görevlidirler. CP110 proteini sentrozomların duplikasyonunda ve sitokinez aşamasında CEP97 ve CEP290 proteinleri ile etkileşerek görev alır (479, 480).

Siliyopatiler genellikle OR kalıtım modeline uyar; Shh, Wnt ve PDGF yollarında kusurlar meydana gelir (481). Hareketli siliyanın temel aksonem hareketlerinin bozulduğu hastalık Primer Siliyar Diskinezidir (PSD-Kartagener sendromu). PSD olgularında erkek infertilitesi iyi bilinmekle birlikte, fallop tüplerindeki hareketli siliya yapısının da bozulması nedeniyle subfertilite görülebileceği (482) ve progesteron etkisiyle siliyar kamçı benzeri hareket azaldığı bildirilmiştir (483). Siliyalar ile ilişkili genlerin susturularak etkilerinin gözlenmesi amacıyla yapılan hayvan çalışmalarında, büyük bir çoğunluğunun embriyolojik dönemde ölümcül olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda 12 olguda, siliya ile ilişkili 14 gende, patojenik olarak nitelendirilmiş 11 ve VUS olarak nitelendirilmiş 6 varyant saptadık. Bu genler; **KIF7** (Olgu 6), **TTC21B** (Olgu 11), **NEK4** (Olgu 11), **CEP290** (Olgu 16 ve 30), **CCDC141** (Olgu 16), **DYNC2H1** (Olgu 18), **GLI3** (Olgu 20), **PKHD1** (Olgu 21), **CELSR1** (Olgu 21), **CCNO** (Olgu 23), **PKD1L1** (Olgu 23), **KIF13A** (Olgu 32), **CEP131** (Olgu 35) ve **CFTR**'dir (Olgu 11, 12 ve 33).

KIF7 geni, 19 ekzonlu bir gen olup kinezin ailesinden siliyar motor aktivitede ve Shh yolağında aktif bir protein kodlamaktadır. Patojenik varyantları Hidroletal sendrom, Akrokallozal sendrom ve JSRD ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca heterozigot formda BBS, Meckel sendromu, Pallister-Hall sendromu ve OFD tip-6 gibi hastalıklarda da saptanmış, birçok siliyopati fenotipine yol açabileceği görülmüştür

(484, 485). Fonksiyonel aktivitesini incelemek için yapılan çalışmalarda hücre içinde siliya yapısının düzenlenmesini, sentrozom duplikasyonunu ve golgi yapısının korunmasını sağladığı; susturulduğunda farelerde polidaktili, iskelet anomalileri, ekzensefali ve erken dönemlerde ölüme yol açtığı gösterilmiştir (486). Saptanan *KIF7* varyantı (rs745809521), ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmekle birlikte, varyant tahmin araçlarına göre patojenik etkilidir ve populasyon frekansı 0,00000401 ile oldukça nadir görülmektedir. Aralarında 1.° derece kuzen evliliği olan fenotipik açıdan normal çocukları da bulunan Olgu 6 ve eşinde heterozigot formda saptanan varyantın OR kalıtım kalıbına uygun bulundu ve etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. *ZAR1* gen varyantı da saptanan olguda *KIF7* ile farklı mekanizmalar ile aktivite gösteren her iki varyantın aile bireylerinde incelenerek olgunun çözülmesi planladı.

Olgu 11’de *TTC21B*, *CFTR* ve *NEK4* olmak üzere üç farklı siliyopati ile ilişkili gen tespit ettik. *NEK4* geni, hücre siklusu ve bölünmesinin kontrolünde etkindir ve siliyopati fenotipi olan olgularda yapılan çalışmalarda saptanan aday genlerden biridir (487, 488). *TTC21B* geni 29 ekzon içermekte olup, patojenik varyantları nefronofitizis tip-12 (Joubert sendromu tip-11; OD/OR kalıtlı; MIM #613820) ve asfiks edici torasik displazi tip-4 (OR; MIM #613819) ile ilişkilendirilmiştir (489). Fragellar transport-A kompleksinde IFT139 (THM1) proteinini kodlar ve susturulduğu fare çalışmalarında, embriyoların ekstremite, göz ve beyin gelişiminde anomalilerin olduğu görülmüştür (490, 491). Her iki genin varyantı da patojenik olarak nitelendirildi. *TTC21B* geni ile ilişkilendirilmiş sendromik olgular olduğundan Olgu 11 ve eşinde ilk aşamada bu varyant incelendi (rs779134983). Eşin de aynı varyantı heterozigot olarak taşıdığı görüldü ve olgunun siliyopati bulguları taşıyan gebelik kaybı öyküsü olduğundan etiyoloji ile ilişkilendirildi. *NEK4* gen varyantı incelenemediğinden eşte de incelenmesi ve olgunun tamamlanması planlandı.

Siliyopatilerin genetik etiyopatogenezinde iyi bilinen genlerden olan *CEP290*’da, iki olgumuzda (Olgu 16 ve 30) farklı noktalarda patojenik olarak sınıflandırılmış tek nükleotid delesyonları bulundu. *CEP290* (*NPHP6*) 54 ekzonlu bir gen olup, Leber’in konjenital amarozu tip-10, Senior-Loken sendromu tip-6, Meckel sendromu tip-4, Bardet-Biedl sendromu tip-14 ve Joubert sendromu tip-5 ile ilişkilendirilmektedir. Çerçeve kayması ya da stop kodon ile sonlanan varyantların

ölümcül fenotip ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (492). Olgu 16 ve eşi arasında akrabalık olması nedeniyle ilk aşama olarak eşinde rs781310385 varyantı incelendi, fakat eşin taşımadığı tespit edildi. Sonraki aşamada genin büyüklüğü ve Sanger dizilemenin zorluğu nedeniyle olgunun eşinde de TED analizi, Olgu 30'un eşinde ise sadece *CEP290* geninin dizilenmesi planlandı. Olgu 16'da saptanan bir diğer siliya ile ilişkili gen olan ***CCDC141***'in (2q31.2) fonksiyonları tam olarak çözümlenememiş olmakla birlikte fare çalışmalarında, GnRH-olfaktör sistemin ve kortikal nöronların gelişiminde aktif olduğu ve aksonların göçünde yer aldıkları gösterilmiştir. Gen susturulduğunda hipogonadotropik hipogonadizm (Kallmann sendromu) fenotipi olduğu, GnRH nöronlarının göçünün embriyolojik dönemde *CCDC141* geninin olduğu bir yolak ile sağlandığı, eksikliğinde pulsatil GnRH salınımının bozularak üreme sistemini etkileyebileceği söylenmiştir (493). *CCDC141* geninde saptadığımız varyant (rs764893847) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelenmiş, varyant tahmin araçlarında patojenik olarak değerlendirilmesine rağmen 0,000232 ile literatürde aynı gendeki zararsız varyantların allel frekanslarına göre daha yüksek olması nedeniyle (0,000177) fenotipik etki beklenmediği belirlenmiştir. Bu nedenle etiyolojiyi açıklamakta yetersiz görülmüş ve dışlanmıştır.

DYNC2H1 geni patojenik varyantları, kısa-dar toraks ve/veya polidaktili sendromu tip-3 (Asfikte edici torasik displazi; MIM #613091) ile ilişkilendirilmiş olup, siliya ve IFT fonksiyonlarında önemli yere sahiptir ve dinein organizasyonunu düzenler (494). OR kalıtlı Asfikte edici torasik displazide toraksın kısa ve dar oluşuna bağlı solunum problemleri, böbrek anomalileri ve iskelet tutulumu sık görülen bulgular arasındadır, nadiren farklı organ anomalileri de görülebilir ve *NEK1* geni patojenik varyantları ile digenik kalıtım gösterebilir (495). Ağır tutulumlu olgularda intrauterin veya yenidoğan döneminde ölüm görülebileceği bildirilmiştir (496). *DYNC2H1* geninde (Olgu 18) saptadığımız varyant (rs372499560) VUS şeklinde değerlendirilmesine rağmen, varyant tahmin araçlarında patojenik etki beklendiği söylenmekte ve allel frekansı olarak 0,0000382 verilmektedir. Olgu 18'de *FLT1* geni etiyolojiyi açıklamakta ön planda tutuldu. Aile segregasyonu ile ilişkisi sağlanamazsa *DYNC2H1* geninin olgunun eşinde de incelenmesi planlandı.

GLI3, çinko parmak motifi içeren Shh yolağının bir parçası olan ve OD kalıtlı Greig sefalopolisindaktili (MIM #175700) ve Pallister-Hall sendromu (MIM #146510)

gibi gelişimsel bozuklukların olduğu hastalıklarla ilişkilendirilmiş bir gendir. Farelerle yapılan çalışmalarda embriyolojik dönemde iskelet gelişiminde etkin olduğu gösterilmiştir (497). *GLI3* geni anlamsız mutasyonlarının homozigot formda olduğunda embriyolojik dönemde letal etki gösterdikleri tespit edilmiştir (498). Olgu 20’de saptadığımız varyant (rs121917710) VUS olarak nitelendirilmekte, fenotip üzerine zararsız olduğunu bildiren yayın nedeniyle etiyolojiyi açıklayamayacağı düşünüldü (499).

PKHD1 geni, neonatal veya intrauterin dönemde letal olabilen OR geçişli Polikistik böbrek hastalığı ile ilişkili olup (MIM #263200), fibrosistin proteinini kodlayan 66 ekzonlu büyük bir gendir, embriyogenezde aktiftir. Aynı zamanda bölünen hücrelerde mitotik içciklerin yapısına katıldığı gösterilmiştir (500). Olgu 21’de saptanan patojenik olarak nitelendirilmiş ***PKHD1*** varyantının (rs137852944) etiyolojide yeri olabileceği düşünüldü. Aynı olguda VUS kategorisinde varyant saptadığımız ***CELSR1*** geni, embriyolojik dönemde santral sinir sisteminin geliştiği ve nöral tüp yapısının olduğu nörolasyon aşamasında aktif bir gendir. Aksonal gelişme, ventriküler ve dış granüler tabakalar başta olmak üzere nöronal öncül hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında rolü vardır (501). Bu aşamada Wnt, Shh gibi temel yolların aktif olmasının yanı sıra, hücre adezyonu, sitoskeletin düzenlenmesi ve apoptotik yollarda etkindir (502). Fareler üzerinde yapılmış yolak incelemelerinde *Celsr1* gibi genlerin susturulmasının kraniorakışı (omurga ve kafatasının konjenital fissürü) ve koklear bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir (503). Eşiyle aynı köyden olan ve akraba evliliği olasılığının yüksek olduğu düşünülen çiftimizde etiyolojide OR kalıtmı bir patolojinin üzerine durulması ve öykülerinde total spina bifidalı fetus olması nedeniyle ilk aşamada ***CELSR1*** gen varyantının ve ardından tüm genin, sonraki aşamada da ***PKHD1*** geninin incelenmesi planlandı.

CCNO geni, OR kalıtmı primer siliyar diskinezi tip-29 ile ilişkilendirilmiş olup (MIM #615872) urasil DNA glikozilaz II’yi kodlar ve hücre siklusunda etkindir. Ayrıca Mayıs 2020’de yayınlanan bir çalışmada TGK ve başarısız YÜT etiyolojisinde yer alabileceği ileri sürülmektedir (263). ***PKD1L1*** (7p12.3) geni polisistin proteinini kodlar ve bu protein embriyonik dönemde nodal gelişmeden sorumludur. Biallelik patojenik varyantları OR kalıtmı otozomal viseral heterotaksi tip-8 ile ilişkilendirilmiştir (MIM #617205) (504). Her iki gen varyantı da patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Aralarında

akraba evliliği olan ve etiyolojiyi açıklamada ön planda *IGF2* gen varyantını tuttuğumuz Olgu 23'ün eşinde *CCNO* ve *PKD1L1* varyantlarının da incelenmesi kararlaştırıldı.

KIF13A geni, endozomal tübüllerin yapısını kontrol eder ve bunu GTP bağlayan RAB11 ile etkileşime girerek saçlar ve siliya yapısında elzemdir (505). *KIF13A* geninde saptadığımız (Olgu 32) daha önce bildirilmemiş varyant, ACMG'ye göre 'patojenik' olarak sınıflandırılmış olsa da heterozigot olması ve fonksiyonel çalışmalar ile etkilerinin gösterilmesi gerektiğinden bu aşamada etiyolojiyi açıklamakta yeterli bulunmadı.

CEP131 gen anlatımı santral sinir sistemi, testis ve overlerde yüksek oranlarda yapılmaktadır; siliyar organizasyon, sentriyol duplikasyonu ve satellit oluşumlarında etkindir (506). Ayrıca mitozda sentrozomdaki görevi ile genomik stabilizasyonu sağladığı düşünülmektedir (507). Saptadığımız *CEP131* (Olgu 35) gen varyantı (rs773820319), ACMG'de VUS olarak sınıflandırılmış, varyant tahmin araçlarında 'zararsız' etkili olacağı belirtildiğinden etiyolojiyi açıklamakta yetersiz bulunmuştur.

Genel popülasyondaki taşıyıcılık oranının yüksekliğine paralel olarak olgu grubumuzda da en sık varyant saptanan genlerden biri **CFTR** idi (Olgu 11, 12 ve 33). *CFTR* (transmembran iletkenlik düzenleyici gen) cAMP ilişkili epiteliyal klor iyonu transportunu düzenleyen bir protein kodlar ve biallelik patojenik varyantları Kistik fibroz (KF) hastalığına yol açar. KF öykülü kadınların oligomenore, sekonder amenore gibi menstrüal düzensizlikler yaşadıkları bilinmektedir ve bu durum multifaktöriyel etiyoloji ile hipotalamik baskılanmaya bağlanmış olup, öne çıkan patogenezlere biri de kusurlu *CFTR* proteinini içeren bölgelerde artmış cinsiyet hormon reseptörlerinin bulunmasıdır (508, 509). KF öykülü kadınlarda subfertilite beklenmekte ve bunun servikal mukusun yapısının bozulmasıyla servikal kanalın kapanması ve spermelerin inhibe edilmesi olduğu düşünülmektedir (510). Yaşa göre yapılmış karşılaştırmalı çalışmalarda da KF'li kadınlarda azalmış over rezervi bulunduğu saptanmıştır (511, 512). Patojenik varyantlarını heterozigot olarak tespit ettiğimiz üç olgunun eşlerinde aynı varyantlar incelendi ve taşımadıkları görüldü. KF ile yapılan çalışmalar infertilite ile ilişkili olabileceği ancak TKG ile ilişkisini açıklamada yetersiz olduğu düşünülmekte, ancak OR bu genetik hastalık için çocuktaki %25 risk nedeniyle eşlerde de taşıyıcılığının tespiti gerektiğinden, eşlerde *CFTR* geninin dizilenmesi planlandı.

5.2.10. Polikistik Over Sendromu ile İlişkili Genler

Polikistik over sendromunun fertilite üzerine olumsuz etkileri bilinmektedir. Çalışmamızda 2 olgumuzda PKOS'a yatkınlık ile ilişkilendirilmiş *SHBG* ve *FBN3* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş 2 varyant saptandı.

SHBG geni cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin proteinini kodlar, androjenik hormonların taşınmasında ve dişi üreme sisteminde hormonların üretiminde etkindir. Gen mutasyonlarının hirsutizm ve hiperandrojenizm ile ilişkili olabileceği ve PKOS öykülü olgularda etiyolojiyi açıklayabileceği bildirilmektedir (513). *SHBG* düzeylerinin yüksekliği - PKOS ilişkisi ve TGK etiyolojisindeki yeri araştırılan konulardan biridir (514). Olgu 11'de saptanan varyant (rs138612626) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirildiğinden ve allel frekansı yüksek olduğundan (0,0001), zararsız ve tek başına etiyolojiyi açıklamakta yetersiz olduğu düşünüldü.

FBN3 geni fibrilin olarak bilinen ekstraselüler matriks proteinlerinden fibrilin III'ü kodlar ve gen varyantlarının PKOS'a yatkınlık ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (515, 516). Sığırlar ile yapılan bir çalışmada fetal dönemde over ve folikül gelişiminde etkin genler arasında olduğu gösterilmiştir (517). Saptadığımız varyant (rs767566930) ACMG kriterlerine göre VUS olarak, ancak *in silico* varyant değerlendirme tahmin araçlarında patojenik olarak değerlendirilmiştir. Olgu 30'da saptanan varyantın etiyolojiyi açıklanmada yetersiz olduğu, ancak fonksiyonel çalışmalar ve ilişkili genlerin olgu serilerinde incelenmesinin katkı sağlayabileceği düşünüldü.

5.2.11. Oosit olgunlaşma Defekti ile İlişkili Genler

Oosit olgunlaşma defekti (OOMD), primer dişi infertilitesine yol açan mekanizmalardan oositlerin olgunlaşma basamaklarında meydana gelen aksaklıklar nedeniyle ortaya çıkan nadir bir durumdur (518). Bugüne kadar yedi alt tipi tanımlanmış olup, otozomal dominant veya resesif olarak kalıtılabilmektedirler (MIM #PS615774). Bu genler; *ZP1* (OR), *ZP2* (OR), *ZP3* (OD), *PANX1* (OD), *PATL2* (OR), *TUBB8* (OD/OR) ve *WEE2*'dir (OR).

Çalışmamızda 3 farklı olguda OOMD ile ilişkilendirilmiş 3 gende (*TUBB8*, *PATL2*, *ZP1*) VUS olarak nitelendirilmiş varyantlar saptadık. Mayoz bölünmede içciklerin oluşumu ve tubulinopatiler denen hastalık grubunun etiyolojisinde yer alan ***TUBB8*** geni (tubulin beta sınıf VIII; 10p15.3) son yıllarda dişi infertilitesi ile de ilişkilendirilmektedir (519-521). Çalışmalar, patojenik varyantların oositlerin

olgunlaşmasını metafaz I aşamasında durdurduğunu göstermiştir (522). Farklı varyantların bozulmuş mikrotübül davranışlarından içciklerin düzenli birleşememesi gibi etkilerinin dominant negatif etkiyle olduğu bildirilmiştir (521). Olgu 1’de *TUBB8* geninde saptanan varyant ACMG kriterlerine göre VUS ve *in siliko* varyant değerlendirme tahmin araçlarında ise ‘zararsız’ olarak değerlendirildiğinden bu aşamada etiyoloji ile ilişkili olmayacağı düşünüldü.

PATL2 geni, traslasyonel baskılayıcı özellikteki bir RNA bağlayıcı protein kodlar. *Xenopus*’lar ile yapılan çalışmalar, PATL2 proteininin ortoloğu olan P100’ün artmış anlatımının oositlerdeki mRNA translasyonunu azalttığını ve oositlerin gelişimini mayoz I aşamasında durdurduğunu göstermiştir (523). İnsanlarda *PATL2*’nin fonksiyon kaybettirici mutasyonlarının da oositlerin germinal veziküllerinde duraklamaya yol açtığı gösterilmiştir (524). YÜT uygulaması sonrasında oositlerin olgunlaşmadığı 180 dişi olgudan 5’inin (%2,78) biallelik *PATL2* mutasyonu taşıdığı gösterilmiş; az sayıda olguda oosit gelişebileceği ve döllenebilecekleri, ancak erken embriyonik aşamalarda gelişmenin duracağı belirtilerek farklı özellikteki mutasyonların farklı fenotipik etkiler gösterebileceği ileri sürülmüştür (525). Başka bir çalışmada *PATL2* mutasyonlarını heterozigot taşıyan kadınların fertil olabileceğine dikkat çekilmiştir (526). Bu gende saptadığımız varyant (rs569729547) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmekte, fakat *in siliko* varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olması öngörülmektedir. Olgu 15’in akraba evliliği öyküsü nedeniyle eşinde, 4 adet gebelik kaybı öyküsü olan ve olmayan kızkardeşlerinde bu varyantın incelenerek değerlendirilmesi kararlaştırıldı.

Çalışma kapsamında homozigot formda saptadığımız tek gen varyantı, öyküsünde başarısız YÜT denemeleri olup hiç gebelik oluşmamış olan Olgu 19’da **ZP1** genindeki anlamsız mutasyon idi. 1991 yılında Hughes ve Barratt tarafından tanımlanmış olan bu protein, diğer üç zona pellusida proteini ile birlikte oositin olgunlaşması, fertilizasyonda spermin bağlanması, akrozom reaksiyonunun başlaması, fertilizasyonun ardından polisperminin engellenmesi ve implantasyon öncesi embriyonun korunmasında etkin, kalın bir glikoprotein katman olan zona pellusidayı oluşturur (527). 11. kromozomun uzun kolunda (11q12.2) lokalize olan *ZP1* geni, 12 ekzon içerir. YÜT denemelerinin başarısız olduğu olgularda mikroskop altında yapılan incelemelerde oositlerde zona pellusida yokluğu görülmüş, YND analiziyle *ZP1*

geninde patojenik varyantlar saptanmıştır (528, 529). Bizim olgumuzda saptanan varyant (rs776515172) ACMG sınıflamasına göre VUS kategorisinde olmakla birlikte, segregasyon çalışmasında anne ve babanın heterozigot formda aynı varyantı taşıdığına tespit edilmesi ve YÜT denemeleri esnasında olgumuz boş folikül sendromu/oosit olgunlaşma defekti ön tanısı almış olması nedeniyle bu varyantın genetik etiyojolojiyi açıklayabileceği kararı güçlendi.

5.2.12. Prematür Over Yetmezliği ile İlişkili Genler

Prematür over yetmezliği (POY), anormal apoptoz, azalmış primordiyal folikül veya foliküllerin gelişmesinde bozukluk gibi mekanizmalarla ortaya çıkar ve dişi infertilitesinin nedenlerinden biridir. Bir kadının menopoza giriş yaşının ortalama 40 ila 60 yaş arasında olması beklenir, bu durum folikül sayısı ve ovulasyon aşamasında görevli olan genlerin etkisi ile değişmektedir. Tüm kadınların doğduklarında hemen hemen aynı sayıda folikül taşıdıkları (530), bu sayının erken atreziler ya da ovulasyon aşamasındaki bozukluklar nedeniyle bireylere göre değiştiği düşünülmektedir (531). Yapılan çalışmalar ile foliküler atrezi ve apoptozun; antral atrezi, bazal atrezi ve terminal farklılaşma apoptozu olmak üzere üç aşama ile düzenlendiği ortaya konmuştur (411). 40 yaşından önce menopoza girilmesi, ‘erken menopoza’ olarak adlandırılmakta olup, kadınların yaklaşık %1’ini etkilediği düşünülmektedir (532). Ooforektomi, kemoterapi/radyoterapi öyküsü, kromozom anomalileri, Turner sendromu, otoimmün hastalıklar, galaktozemi, geçirilmiş enfeksiyonlar, Frajil X sendromu ve bazı tek gen hastalıkları bilinen etiyojolojik faktörler arasındadır. Ön tanı biyokimyasal olarak östrojen gibi gonadal hormonların azalması ve LH-FSH’nın artmasıyla konur. Over rezervi testleri; FSH, E2, inhibin B ve AMH ölçümü, USG eşliğinde antral folikül sayısı ile over volümü değerlendirmesini içerir. Klinik değerlendirmede ise FSH düzeyi ölçümü, kronolojik yaştan bağımsız olarak overin biyolojik yaşının değerlendirilmesinde en sık kullanılan testtir. Artmış değerler, azalmış over rezervi ve oosit kalitesi ile ilişkili artmış anöploidi riskinin yaştan bağımsız göstergesi olarak kabul edilmektedir (533). Ayrıca azalmış AMH seviyeleri de YÜT denemelerinde overlerin uyarılmasında azalmış cevap beklentisi ve kötü oosit kalitesi ile ilişkilendirilmektedir (534).

Oosit havuzundaki folikül sayısını ve kalitesini etkileyen yollardan biri de mayoz bölünmede aktif olan *MCM8*, *MCM9*, *STAG3*, *SYCE1*, *MSH3*, *MSH4* ve *MLH3* gibi genlerdir. YND tekniklerinin kullanılmaya başlanmasıyla ovulasyon, foliküler

gelişim, granüloza hücrelerin farklılaşması ve çoğalması, metabolizma veya ekstraselüler matriks düzenlenmesi gibi farklı yolak genlerinin de POY etkeni olabileceği düşünülmektedir. Fransa’da, 69 POY öykülü olgu ile yapılan bir çalışmada, olguların %42’sinde iki veya daha fazla gende varyantlar tespit edilmiş olup, poligenik bir kalıtım kalıbının etkin olabileceği ileri sürülmüştür (252).

Azalmış over rezervi ve TGK ilişkisini ve biyokimyasal belirteçlerin araştırmak amacıyla yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır. TGK öyküsü olan ve olmayan dişi olgular ile yapılan ve FSH-AMH değerlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, maternal yaştan bağımsız olarak TGK ile azalmış over rezervi arasında bir ilişki olduğu, biyolojik over yaşının oosit kalitesi ve over rezervi üzerine etkisinin kronolojik yaştan daha etkin olduğu ileri sürülmüştür (535). Almanya’da benzer kohorttaki retrospektif bir çalışmada AMH ve östradiol düzeyleri incelenmiş, azalmış over rezervi ile TGK arasındaki ilişkinin sebebi açıklanamayan olgu grubunda, açıklanabilen olgu grubuna göre daha güçlü olduğu belirtilmiştir (536). 2015 yılında Hollanda’da anket usulü ile yapılan bir çalışmada ise, POY tanısı ile takip edilen olguların gebe kalma, gebelik kayıpları, tekrar menstrüel kanama yaşayıp yaşamadıkları gibi sorular sorularak kontrol grubuyla karşılaştırılmış, gebelik kayıpları ile POY arasında bir ilişki saptanmamıştır (537).

YÜT uygulamalarının artmasıyla birlikte, ovum kalitesinin başarılı gebelik oluşumu ve implantasyon başarısı ile orantılı olduğu daha net görülebildi. Literatürde TGK etiyojisi ile POY fenotipine yol açan genler arasında bir ilişki olabileceğine işaret eden bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile ilk defa ovaryan yetmezlik ile ilişkilendirilmiş genlerin TGK etiyojisinde de yer alabileceği ortaya kondu (Tablo 5-2).

Tablo 5-2: Çalışmada saptanmış POY ilişkili genler

Gen	Saptanan olgu	İşlevi	Fenotip	Olası kalıtım modeli	Referans
<i>HFM1</i>	1	mayoz bölünme ve DNA tamiri	POY tip 9	OD, OR	(535, 536)
<i>EIF4ENIF1</i>	9	ökaryotik translasyon faktörü	POY	OD	(247, 537)
<i>MCM8</i>	1, 11	gametogenez ve DNA tamiri	POY tip 10	OR	(538)
<i>ERCC6</i>	15	DNA tamiri	POY tip 11	OD	(472)
<i>IGSF10</i>	17	embriyolojik GNRH	-	OD, OR	(396)

		göçü			
<i>MSH5</i>	25	mayoz bölünme ve DNA tamiri	POY tip 13	OR	(466)
<i>NOBOX</i>	31	transkripsiyon faktörü (primordiyal folikül → sekonder folikül)	POY tip 5	OD	(382)

EIF4ENIF1 geni, overdeki germ hücrelerinin gelişimi ve translasyon faktörlerinin nükleusa taşınmasında görevli bir transport proteini kodlar (249, 542). Ökaryotik translasyon inisiyasyon faktörü eIF4E için bir bağlanma bölgesi içerir ve anlatımı bu şekilde baskılanır, gen ürünlerinin azalması ile mRNA stabilizasyonu artar (543). mRNA artışının, Frajil-X ilişkili POY oluşumu ile benzer bir mekanizma ile ovaryan toksisiteye yol açabileceği ya da oosit apoptozuna yol açabileceği öne sürülmüştür (247, 544). Bu gende saptadığımız varyant (rs11544091) ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmekte, fakat *in siliko* varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak nitelendirilmektedir. Varyantın değerlendirilmesinde aile içi segregasyon analizi ve klinik verilerle değerlendirilmesinin katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Olgu 1’de iki farklı POY ilişkili gen (*HFM1* ve *MCM8*) ile dişi üreme sistemi ve overler üzerine embriyolojik dönemde etkin *WNT4* gen varyantları saptadık. Birbirleri ile bilinen direkt bir etkileşimde olmasalar da aynı fenotipe yol açmaları ve yakın yollarda aktif olmaları nedeniyle poligenik kalıtım ile etiyolojinin açıklanabileceği düşünüldü. Bu üç gendeki varyantların anne ve kızkardeşte de incelenmesinin tanıya katkı sağlayacağı öngörüldü.

Olgu 11’de akraba evliliği öyküsü de olması nedeniyle ön planda siliyopatiler ile ilişkili patojenik gen varyantlarının etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Diğer varyantlar ile birlikte *MCM8* varyantının etkisinin (rs140044814) ancak model organizma çalışmaları ile görülebileceği düşünülerek etiyolojideki yeri konusunda net bir kanıya varılamadı.

Olgu 15’te *PATL2* geni, etiyoloji ile ilişkili en yakın gen olarak değerlendirildi ve aile içi segregasyon çalışmasının katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Olgu 17’de *IGSF10* geninde saptanan monoallelilik anlamsız mutasyon nedeniyle etiyolojide etkili olabileceği düşünülerek kızkardeşlerde ve annede ilgili varyantın incelenmesi kararlaştırıldı.

Olgu 25'te saptanan *MSH5* gen varyantının ise etiyolojiyi açıklayamayacağı düşünüldü. Olgu 31'de tespit edilen *NOBOX* varyantının ise etiyolojiyi açıklamada katkısı olabileceği düşünüldü. Ancak, bu varyantın VUS olarak nitelendirilmesi nedeniyle olgudaki patojenik *MTOR* varyantının daha etkin olabileceği düşünüldü. Olgunun annesinde her iki gen varyantının da incelenmesi planlandı.

Ayrıca oligogenik varyant etkilerinin in siliko değerlendirildiği 'ORVAL' tahmin aracında 4 olguda digenik etki öngörüldü (Olgu 16: *HSF1-MMP10*, Olgu 20: *ACE-MMP10* ve *EGFR-MMP10*, Olgu 31: *MTOR-VEGFA*, Olgu 34: *EGFR-GNRHR* ve *MMP11*)(545).

Bu çalışmada, 34 olguda (bir olgu hariç) etiyolojide etkin olabilecek çeşitli gen ve yolaklarda 93 varyant saptandı. İki olguda saptanan varyantlar ile (Olgu 11 ve 19) etiyoloji aydınlatıldı (%5,7). 18 olguda saptanan varyantların klinik anlamının aydınlatılabilmesi amacıyla için eşler, kız kardeş ve annelerde ilgili gen ve varyantların çalışılması kararlaştırıldı (%51,4). İleri çalışma yapılmasını gerektiğini düşündüğümüz genlerin %46,4'ü monogenik (13/28); %53,5'i ise birden fazla gen ve varyantlarıydı (15/28). 6 genin etiyoloji ile ilişkilendirilebilmesi için büyük çalışma gruplarından elde edilen veriler ışığında değerlendirilmesinin gerektiği görüldü (*SLC27A3*, *PRLR*, *DUOX2*, *F5*, *CXCL8*, *HLA-DRB5*, *FBN3*). Yedi olguda poligenik etki öngörülerek aynı ya da benzer yolaklarda aktif olan genler tespit edildi (%20). Poligenik etki öngörülen olgular da dahil olmak üzere 10 olguda saptanan genler ile ilgili fonksiyonel çalışmalar planlandı (%28,5). Çalışmamızda saptanan varyantların etkin oldukları yolak ve sistemlere göre dağılımı şöyle idi; metabolizma (n=8), siliya aktivitesi (n=8) ve embriyogenez (n=7) gibi yaşamın erken evrelerinde yaşamsal etkili, hücre bölünmesi/hücre döngüsü (n=5), oosit olgunlaşması ve gelişimi (n=6) ile gebeliğin ilk dönemlerindeki fetomaternal iletişimi (n=8) sağlayan genler/yolaklar ile ilgili aile üyelerini kapsayan segregasyon çalışmaları, birden fazla gen varyantının saptandığı olguların eşlerinde de TED analizlerinin gerekliliği ve fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu görüldü.

Gerçekleştirilen bu tez projesinde kullanılan Tüm ekzom dizileme yönteminin ilişkilendirilmiş genler dışında yeni aday genler saptanmasında oldukça başarılı olduğu görüldü. Kapsanmayan bölgeler, uzun dizilerin ve tekrarların incelenememesi ve gen/gen içi submikroskobik delesyon ve duplikasyonları tespit edememesi tekniğin

limitlerini oluşturdu. Yapılan çalışmada sebebi açıklanamayan TKG olgu grubu ile TİK olgu grubundan elde edilen veriler karşılaştırıldığında etkili olan yolakların aynı olduğu tespit edildi. Olgu 19'daki gibi herhangi bir fenotipik bulgunun olmasının, biallelik varyantların saptanmasında başarı sağladığı görüldü.

Son yıllarda gebelik kayıplarının ve yardımcı üreme tekniklerindeki başarısızlıkların altında yatan etiyolojileri açıklamak için birçok çalışma yapılmaktadır ve karşımıza multifaktöriyel etkenlerin yol açabildiği oldukça karışık ve çok etmenli heterojen bir durum çıkmaktadır. TED yöntemi, özellikle TKG gibi multifaktöriyel hastalık tanımına uyan ya da üreme sistemi ve gebelik gibi oldukça karışık ve çok sayıda yolağın i içe olduğu durumlarda hem tanı hem de araştırmalar için tercih edilebilir bir yöntemdir. Türkiye gibi akraba evliliği oranının yüksek olduğu toplumlarda OR kalıtlı nadir hastalıklara yol açabilecek varyantların bir araya gelme ihtimalinin de artmasıyla panel testleri yerine TED kullanımı avantajlı olacaktır. Ayrıca gebelik kaybı materyallerine ulaşılamadığı ve maddi yetersizlik gibi nedenlerle sebebi açıklanamayan TKG ve TİK olgu gruplarında ilk aşamada maternal genomun incelenmesi katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında sebebi açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpları ve implantasyon kusurlarının aydınlatılabilmesi açısından önemli bilgilere ulaştığımızı düşünmekteyiz. Saptadığımız aday genlerin fonksiyonel çalışmalarla daha detaylı olarak incelenmesinin önemli katkılar sağlayacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med.* 2012;**9(12)**:e1001356.
2. Datta J, Palmer MJ, Tanton C, Gibson LJ, Jones KG, Macdowall W ve ark. Prevalence of infertility and helpseeking among 15.000 womenand men. *Hum Reprod.* 2016;**31(9)**:2108-2118.
3. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. 10. ed. Çavuşoğlu H, çeviri editörü. Yüce Yayınları & Nobel Tıp Kitabevleri; 2001.
4. Smartdraw, 2016. Female Reproductive System Diagram. [resim] Bulunduğu adres: <<https://www.smartdraw.com/reproductive-system-diagram/examples/female-reproductive-system-diagram/>>
5. MindZipper. Diagram of the menstrual cycle. Wikipedia, Özgür Ansiklopedi. Çev: Hedda Gabler. Adet döngüsü diyagramı. 6 Şubat 2019. Bulunduğu adres: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MenstrualCycle2_tr.svg.
6. Biorender, 2020. Uterine Cycle. Bulunduğu adres: <<https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5e1cf7e8a8671d0087454332-uterine-cycle>>
7. Acosta AA. Process of fertilization in the human and its abnormalities: diagnostic and therapeutic possibilities. *Obstet Gynecol Surv.* 1994;**49**:567.
8. Asch R, Simerly C, Ord T, Ord VA, Schatten G. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod.* 1995;**10**:1897.
9. Nahhas F, Barnea E. Human embryonic origin early pregnancy factor before and after implantation. *Am J Reprod Immunol.* 1990;**22**:105.
10. Edwards RG. Physiological and molecular aspects of human implantation. *Hum Reprod.* 1995;**10(2)**:1.

11. Loke YW, King A. *Human Implantation: Cea Biology and Immunology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
12. Gendron RL, Paradis H, Hsieh-Li HM, Lee DW, Potter SS, Markoff E. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa11 null mice. *Biol Reprod*. 1997;**56**:1097-1105.
13. Taylor HS, Igarashi P, Olive DL, Arici A. Sex steroids mediate HOXA11 expression in the human peri-implantation endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;**84**:1129-1135.
14. Sarno JL, Kliman HJ, Taylor HS. HOXA10, Pbx2 and Meis 1 protein expression in the human endometrium: formation of multimeric complexes on HOXA10 target genes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;**90**:522-528.
15. Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature*. 1995;**374**:460-463.
16. Bagot CN, Troy PJ, Taylor HS. Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gene Ther*. 2000;**7**:1378-1384.
17. Nikas G, Aghajanova L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reprod Biol*. 2002;**4**:18-23.
18. Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Hamada T, Goto M, Higashi M ve ark. MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Res*. 2008;**68(8)**:2708-2716.
19. Gupta T, Singh S, Gupta S, Gupta N. Normal implantation, placentation and fetal development. İçinde Mehta S, Gupta B, editörler. *Recurrent Pregnancy Loss*. Springer Nature: Singapore Pte Ltd; 2018. pp.13-40.
20. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006;**12(6)**:731-746.
21. Meseguer M, Aplin JD, Caballer-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J ve ark. Human endometrial mucin MUC1 is upregulated by progesterone and downregulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod*. 2001;**64(2)**:590-601.

22. Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J ve ark. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*. 1995;**136(8)**:3639-3647.
23. Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR ve ark. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology*. 2007;**148(8)**:3814-3826.
24. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS ve ark. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*. 2003;**299(5605)**:405-408.
25. Wang B, Sheng JZ, He RH, Qian YL, Jin F, Huang HF. High expression of L-selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being. *Am J Reprod Immunol*. 2008;**60(2)**:127-134.
26. Alon R, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol*. 2002;**14(2)**:93-104.
27. Hannan NJ, Evans J, Salamonsen LA. Alternate roles for immune regulators: establishing endometrial receptivity for implantation. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011;**7(6)**:789-802.
28. Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L, Greene W, Paulson M, Meyer WR ve ark. Use of integrins to date the endometrium. *Fertil Steril*. 2000;**73(4)**:779-787.
29. Wang J, Armant DR. Integrin mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation. *Cells Tissues Organs*. 2002;**172(3)**:190-201.
30. Kaloğlu C, Onarlıoğlu B. Extracellular matrix remodelling in rat endometrium during early pregnancy: the role of fibronectin and laminin. *Tissue Cell*. 2010;**42(5)**:301-306.
31. Altmae S, Matinez-Conejero JA, Salumets A, Simon C, Horcajadas JA, Stavreus-Evers A. Endometrial gene expression analysis at the time of embryo

implantation in women with unexplained infertility. *Mol Hum Reprod.* 2010;**16(3)**:178-187.

32. Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Tamaya T. Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol.* 1996;**10(3)**:187-191.

33. 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)**:1097-1121.

34. Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;**9(5)**:683-690.

35. Koler M, Achache H, Tsafirir A, Smith Y, Revel A, Reich R. Disrupted gene pattern in patients with repeated in vitro fertilization failure. *Hum Reprod.* 2009;**24(10)**:2541-2548.

36. Shimizu Y, Kabir-Salmani M, Azadbakht M, Sugihara K, Sakai K, Iwashita M. Expression and localization of galectin-9 in the human uterodome. *Endocr J.* 2008;**55(5)**:879-887.

37. Faulk WP, Temple A. Distribution of beta-2 microglobulin and HLA in chorionic villi of human placentae. *Nature.* 1976;**262**:799.

38. Lala PK, Kerans M, Colavincenzo V. Cells of the fetomaternal interface: their role in the maintenance of viviparous pregnancy. *Am J Anat.* 1984;**170**:501.

39. Vince GS, Kohnson PM. Reproductive immunology, conception, contraception and consequences. *The Immunologist.* 1996;**4**:172-178.

40. Sunderland CA, Redman CWG, Stirrat GM. HLA-A, B, C antigens are expressed on nonvillous trophoblasts of the early human placenta. *J Immunol.* 1981;**127**:2614-2615.

41. Lala PK. Similarities between immunoregulation in pregnancy and malignancy: the role of prostaglandin E2. *Am J Reprod Immunol.* 1990;**20**:147-152.

42. Ellis SA, Sargent IL, Redman CWG, McMichael AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and choriocarcinoma cell line. *Immunology*. 1986;**56**:595.
43. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*. 1990;**1**:220.
44. Carosella ED, Dausset J, Kirszenbaum M. HLA-G revisited. *Immunology Today*. 1996;**17**:404.
45. King A, Loke YW, Chaouat G. NK cells in reproduction. *Immunology Today*. 1997;**18**:64.
46. Parhar RS, Kennedy TG, Lala PK. Suppression of lymphocyte alloactivity by early gestational human decidua. 1. Characterization of suppressor cells and suppressor molecules. *Cea Immunol*. 1998;**116**:392.
47. Parhar RS, Yagel S, Lala PK. PGE2-mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in the decidua with potential anti-trophoblast activity. *Cea Immunol*. 1989;**120**:61.
48. Lessey BA, Young SL. Homeostasis imbalance in the endometrium of women with implantation defects: the role of estrogen and progesterone. *Semin Reprod Med*. 2014;**32(5)**:365-375.
49. Gnainsky Y, Dekel N, Granot I. Implantation: Mutual activity of sex steroid hormones and the immune system guarantee the maternal-embryo interaction. *Semin Reprod Med*. 2014;**32**:337-345.
50. Spencer TE. Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Semin Reprod Med*. 2014;**32**:346-357.
51. Wooding FBP, Burton GJ. *Comparative placentation: structures, functions and evolution*. Berlin: Springer; 2008.
52. Burton GJ, Scioscia M, Rademacher TW. Endometrial secretions: creating a stimulatory microenvironment within the human early placenta and implications for the aetiopathogenesis of preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2011;**89(2)**:118-125.

53. Hempstock J, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Burton GJ. Endometrial glands as a source of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;**2**:58.
54. Roberts RM, Fisher SJ. Trophoblast stem cells. *Biol Reprod*. 2011;**84**(3):412-421.
55. Wang H, Critchley HO, Kelly RW, Shen D, Baird DT. Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod*. 1998;**4**(4):407-412.
56. Dickey RP, Hower JF. Relationship of estradiol and progesterone levels to uterine blood flow during early pregnancy. *Early Pregnancy*. 1996;**2**:113-120.
57. Maliqueo M, Echiburu B, Crisosto N. Sex steroids modulate uterine-placental vasculature: implications for obstetrics and neonatal outcomes. *Front Physiol*. 2016;**7**:152.
58. Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin (1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine*. 2002;**18**:239-245.
59. Ross GR, Yallampalli U, Gangula PRR, Reed L, Sathishkumar K, Gao H ve ark. Adrenomedullin relaxes rat uterine artery: mechanisms and influence of pregnancy and estradiol. *Endocrinology*. 2010;**151**:4485-4493.
60. Valdes G, Neves LAA, Anton L, Corthorn J, Chacon C, Germain AM ve ark. Distribution of angiotensin (1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta*. 2006;**27**:200-207.
61. Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY ve ark. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta*. 2004;**25**:560-572.
62. Werler MM, Pober BR, Holmes LB. Smoking and pregnancy. İçinde Sever JL, Brent RL, editörler. *Teratogen Update. Environmentally Induced Birth Defect Risks*. New York: Alan R Liss; 1986.
63. James JL. Stem cells and pregnancy disorders: from pathological mechanisms to therapeutic horizons. *Semin Reprod Med*. 2016;**34**:17-26.

64. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol.* 1953;**44**:320-338.
65. Piccinni MP, Scaletti C, Mavilia C, Lazzeri E, Romagnani P, Natali I ve ark. Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development. *Eur J Immunol.* 2001;**31(8)**:2431-2437.
66. Barnea ER. Chapter 2: Signalling between and mother in early pregnancy: basis for development of tolerance. İçinde Carp HJA, editör. *Recurrent pregnancy loss: causes, controversies and treatment.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group; 2015. pp.17-28.
67. Hunt JS. Stranger in a strange land. *Immunol Rev.* 2006;**213**:36-47.
68. Fuzzi B, Ruzzi R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B ve ark. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol.* 2002;**32(2)**:311-315.
69. Criscuoli L, Rizzo R, Fuzzi B, Melchiorri L, Menicucci A, Cozzi C ve ark. Lack of histocompatibility leukocyte antigen-G expression in early embryos is not related to germinal defects or impairment of interleukin-10 production by embryos. *Gynecol Endocrinol.* 2005;**20(5)**:264-269.
70. Kulshrestha V. Normal immune function: journey of the fetus. Mehta S, Gupta B, editörler. *Recurrent Pregnancy Loss.* Springer Nature Singapore Pte Ltd; 2018. pp.41-50.
71. Nair S, Salomon C. Extracellular vesicles and their immunomodulatory functions in pregnancy. *Semin Immunopathol.* 2018;**40**:425-437.
72. Ramu S, Stamatkin C, Timms L, Ruble M, Roussev RG, Barnea ER. Preimplantation factor (PIF) detection in maternal circulation in early pregnancy correlates with live birth (bovine model). *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;**11**:105.
73. Schjenken JE, Tolosa JM, Paul JW, Clifton VL, Smith R. Mechanisms of maternal immune tolerance during pregnancy. İçinde Zheng J, editör. *Recent advances in research on the human placenta.* Croatia: In Tech; 2012. pp.211-242.

74. Szekere-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol*. 2002;**21(6)**:471-495.
75. Druckmann R, Druckmann MA. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;**97(5)**:389-396.
76. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immunosuppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol*. 2012;**3**:30.
77. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;**161**:177-181.
78. Gubbay O, Critchley HO, Bowen JM, King A, Jabbour HN. Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56(+) natural killer cells of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;**87(5)**:2329-2335.
79. Gupta M. Immunology and Pregnancy loss. İçinde Mehta S, Gupta B, editörler. *Recurrent Pregnancy Loss*. Springer Nature Singapore Pte Ltd; 2018. pp.53-65.
80. Kalantaridou SN, Zoumakis E, Makrigiannakis A, Godoy H, Chrousos GP. The role of corticotropin-releasing hormone in blastocyst implantation and early fetal immunotolerance. *Horm Metab Res*. 2007;**39(6)**:474-477.
81. Casikar I, Reid S, Rippey J, Condous G. Redefining first trimester miscarriage. *Aust NZJ Obstet Gynaecol*. 2012;**52(6)**:5978.
82. Jurkovic D, Overton C, Bender-Atik R. Diagnosis and management of first trimester miscarriage. *BMJ*. 2013;**19**:346.
83. Pandya P, Snijders RJM, Psara N, Hibert L, Nicolaides KH. The prevalence of non-viable pregnancy at 10-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1996;**7**:1703.
84. Silver RM, Branch DW, Goldenberg R, Iams JD, Klebanoff MA. Nomenclature for pregnancy outcomes: time for a change. *Obstet Gynecol*. 2011;**118(6)**:14028.
85. Malpas P. Study of abortion sequences. *BJOG*. 1938;**45**:932-949.

86. Rock JA, Zacur HA. The clinical management of repeated early pregnancy wastage. *Fertil Steril*. 1983;**39**:123-140.
87. Ansari AH, Kirkpatrick B. Recurrent pregnancy loss: an update. *J Reprod Med*. 1998;**43**:806.
88. Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to number of previous miscarriages. *Fertil Steril*. 2000;**73**:300-304.
89. Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü. 2013 Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması. Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü, T.C. Kalkınma Bakanlığı ve TÜBİTAK, Ankara, Türkiye. 2014.
90. Kolte AM, Bernardi LA, Christiansen OB, Quenby S, Farquharson RG, Goddijn M ve ark. Terminology for pregnancy loss prior to viability: A consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Hum Reprod*. 2015;**30**:495-498.
91. Daher S, Torloni MR, Mattar R. Cytokines and cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss. İçinde Christiansen OB, editör. *Recurrent Pregnancy Loss*. John Wiley&Sons Ltd; 2014.
92. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol*. 1996;**35**(4):376-382.
93. Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod*. 2006;**12**(5):301-308.
94. Kwiatek M, Geca T, Krzyzanowski A, Malec A, Kwasniewska A. Peripheral dendritic cells and CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the first trimester of normal pregnancy and in women with recurrent miscarriage. *PLoS One*. 2015;**10**(5):e0124747.
95. Liu YS, Wu L, Tong XH, Wu LM, He GP, Zhou GX ve ark. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 2011;**65**:503-511.

96. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;**63**:601.
97. Daher S, Mattar R, Gueuvoghlian-Silva BY, Torloni MR. Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge. *Am J Reprod Immunol*. 2012;**67**:341-347.
98. Meuleman T, Lashley LEO, Dekkers OM, van Lith JMM, Claas FHJ, Bloemenkamp KWH. HLA associations and HLA sharing in recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum Immunol*. 2015;**76**:362-373.
99. Porter TF, LaCousiere Y, Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;**19**:CD000112.
100. Ata B, Tan SL, Shehata F, Holzer H, Buckett W. A systematic review of intravenous immunoglobulin for treatment of unexplained recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2011;**95**:1080-1085.
101. Wong LF, Porter TF, Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;**10**:CD000112.
102. Opatrny L, David M, Kahn SR, Shrier I, Rey E. Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a metanalysis. *J Rheumatol*. 2006;**33**:2214-2221.
103. Chaturvedi S, Braunstein EM, Yuan X, Yu J, Alexander A, Chen H ve ark. Complement activity and complement regulatory gene mutations are associated with thrombosis in APS and CAPS. *Blood*. 2019. doi:10.1182/blood.2019003863.
104. Jong PF, Boogaard E, Kowalik CR, Vissenberg R, Middeldorp S, Goddijn M. Which investigations are relevant? İçinde Christiansen OB, editör. *Recurrent Pregnancy Loss*. John Wiley&Sons Ltd; 2014.
105. Agarwal N, Kulshrestha V. Hormones in recurrent pregnancy loss. İçinde Mehta S, Gupta B, editörler. *Recurrent Pregnancy Loss*. Springer Nature Singapore Pte Ltd; 2018. pp.79-88.
106. Arck PC, Rucke M, Rose M, Szekeres-Bartho J, Douglas AJ, Pritsch M ve ark. Early risk factors for miscarriage: A prospective cohort study in pregnant women. *Reprod Biomed Online*. 2008;**17**:101-113.

107. Li TC, Spuijbroek MD, Tuckerman E, Anstie B, Loxley M, Laird S. Endocrinological and endometrial factors in recurrent miscarriage. *BJOG*. 2000;**107**(12):1471-1479.
108. Ke RW. Endocrine basis for recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2014;**41**:103-112.
109. Brezina PA, Kutteh WH. Classic and cutting edge strategies for the management of early pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2014;**41**:1-18.
110. Regan L, Backos M, Rai R. Green-top guideline No 17. The investigation and treatment of couples with recurrent first trimester and second trimester miscarriage. *RCOG*. 2011.
111. Practice Committee Opinion of the American Society of Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;**98**:1103-1111.
112. Stern JJ, Dorfmann AD, Gutiérrez-Najar AJ, Cerrillo M, Coulam CB. Frequency of abnormal karyotype among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*. 1996;**65**:250-253.
113. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*. 2002;**17**:446-451.
114. Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, Porter TF, Branch DW. Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol*. 2004;**104**:784-788.
115. Pflueger SMV. The Cytogenetics of Spontaneous Abortion. İçinde Gersen SL, Keagle MB, editörler. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. New York: Springer Science+Business Media; 2013. pp. 275-292.
116. Schmidt WA. Familial chromosome abnormality associated with repeated abortions. *Cytogenetics*. 1962;**1**:199-209.
117. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod*. 1990;**5**:519-528.

118. Kavalier F. Investigation of recurrent miscarriages: a successful pregnancy is the most likely outcome. *BMJ*. 2005;**331(7509)**:121-122.
119. Fryns JP, van Buggenhout G. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998;**81**:171-176.
120. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson&Thompson Genetics in Medicine*. 8th ed. Elsevier; 2016.
121. Martin RH, Chernos JE, Lowry RB, Pattinson HA, Barclay L, Ko E. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet*. 1994;**93**:135-138.
122. Sheth FJ, Liehr T, Kumari P, Akinde R, Sheth HJ, Sheth JJ. Chromosomal abnormalities in couples with repeated fetal loss: an Indian retrospective study. *Indian J Hum Genet*. 2013;**19**:415-422.
123. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*. 1992;**69**:799-808.
124. Byrne JLB, Ward K. Genetic factors in recurrent abortion. *Clin Obstet Gynecol*. 1994;**37**:693-704.
125. Hyde KJ, Schust DJ. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;**5**:a023119.
126. Dell'edera D, L'episcopia A, Simone F, Lupo MG, Epifania AA, Allegretti A. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Biomedical Reports*. 2018;**8**:172-175.
127. Stefanski AL, Specker C, Fischer-Betz R, Henrich W, Schleussner E, Dörner T. Maternal thrombophilia and recurrent miscarriage – is there evidence that heparin is indicated as prophylaxis against recurrence? *GebFra Science*. 2018;**78**:274-282.

128. Dziadosz M, Baxi LV. Global prevalence of prothrombin gene mutation G20210A and implications in women's health: a systematic review. *Blood Coagul Fibrin*. 2016;**27**:481-489.
129. Bricker L, Farquharson RG. Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice. *Hum Reprod*. 2002;**17**:1345-1350.
130. Yamamoto-Tabata T, McDonagh S, Chang HT, Fisher S, Pereira L. Human cytomegalovirus interleukin-10 downregulates matrix metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness in vitro. *J Virol*. 2004;**78**:2831-2840.
131. Sing N, Rastogi K. Microbiology of recurrent pregnancy loss. İçinde Mehta S ve Gupta B, editör. *Recurrent Pregnancy Loss*. Springer Nature Singapore Pte Ltd; 2018. pp.129-136.
132. Kitakaya K. Prevalence of chronic endometritis in recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2011;**95**(3):1156-1158.
133. McQueen DB, Perfetto CO, Hazard FK, Lathi RB. Pregnancy outcomes in women with chronic endometritis and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2015;**104**(4):927-931.
134. Hachem HE, Crepau V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet PE. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J W Heal*. 2017;**9**:331-345.
135. Chiang C, Mahalingam S, Flaws JA. Environmental contaminants affecting fertility and somatic health. *Semin Reprod Med*. 2017;**35**:241-249.
136. Lathi RB, Liebert CA, Brookfield KF, Taylor JA, vom Saal FS, Fujimoto VY ve ark. Conjugated bisphenol A in maternal serum in relation to miscarriage risk. *Fertil Steril*. 2014;**102**(01):123-128.
137. Shen Y, Zheng Y, Jiang J, Liu Y, Luo X, Shen Z ve ark. Higher urinary bisphenol A concentration is associated with unexplained recurrent miscarriage risk: evidence from a case-control study in eastern China. *PLoS One*. 2015;**10**(05):e0127886.

138. Yuan M, Bai MZ, Huang XF, Zhang Y, Liu J, Hu MH ve ark. Preimplantation exposure to bisphenol A and triclosan may lead to implantation failure in humans. *BioMed Res Int*. 2015;**2015**:184845.
139. Weinberger B, Vetrano AM, Archer FE, Marcella SW, Buckley B, Wartenberg D ve ark. Effects of maternal exposure to phthalates and bisphenol A during pregnancy on gestational age. *J Mat Fet Neo Med*. 2014;**27(04)**:323-327.
140. Peretz J, Vrooman L, Ricke WA, Hunt PA, Ehrlich S, Hauser R ve ark. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. *Environ Health Perspect*. 2014;**122(08)**:775-786.
141. Ziv-Gal A, Flaws JA. Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007-2016). *Fertil Steril*. 2016;**106(04)**:827-856.
142. Annamalai J, Namasivayam Y. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: their effects on humans and wildlife. *Environ Int*. 2015;**76**:78-97.
143. Chevrier C, Warembourg C, Gaudreau E, Monfort C, Le Blanc A, Guldner L ve ark. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, seafood consumption and time to pregnancy. *Epidemiology*. 2013;**24(02)**:251-260.
144. Balise VD, Meng CX, Cornelius-Green JN, Kassotis CD, Kennedy R, Nagel SC. Systematic review of the association between oil and natural gas extraction processes and human reproduction. *Fertil Steril*. 2016;**106(4)**:795-819.
145. Webb E, Bushkin-Bedient S, Cheng A, Kassotis CD, Balise V, Nagel SC. Developmental and reproductive effects of chemicals associated with unconventional oil and natural gas operations. *Rev Environ Health*. 2014;**29(04)**:307-318.
146. Ajayi OO, Charles-Davies MA, Arinola OG. Progesterone, selected heavy metals and micronutrients in pregnant Nigerian women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Afr Health Sci*. 2012;**12**:153-159.
147. Khatuja R, Chawla L. Male factor in recurrent pregnancy loss. İçinde Mehta S, Gupta B, editörler. *Recurrent Pregnancy Loss*. Springer Nature Singapore Pte Ltd; 2018. pp.137-147.

148. Hill JA, Abbott AF, Politch JA. Sperm morphology and recurrent abortion. *Fertil Steril*. 1994;**61(4)**:776-778.
149. Wang R, Hongli Z, Zhihong Z, Rulin D, Dongfeng G, Ruizhi L. The impact of semen quality, occupational exposure to environmental factors and lifestyle on recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*. 2013;**30**:1513-1518.
150. Saxena P, Misro MM, Roy S, Chopra K, Sinha D, Nandan D ve ark. Possible role of male factors in recurrent pregnancy loss. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2008;**52(3)**:274-282.
151. Martin RH. Cytogenetic determinations of male infertility. *Hum Reprod Update*. 2008;**14**:379-390.
152. Bronson R. The male factor in recurrent pregnancy loss and embryo implantation failure. İçinde Carp HJA, editör. *Recurrent Pregnancy Loss. Causes, controversies and treatment*. 2. ed. CRC Press; 2015. pp.301-312.
153. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Caazadore C, Selice R, Garolla A ve ark. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10 year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;**92**:762-770.
154. Agarwal S, Agarwal A, Khanna A, Singh K. Microdeletion of Y chromosome as a cause of recurrent pregnancy loss. *J Hum Reprod Sci*. 2015;**8(3)**:159-164.
155. Dewan S, Puscheck EE, Coulam CB, Wilcox AJ, Jeyendran RS. Y chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2006;**85**:441-445.
156. Ghorbian S, Saliminejad K, Sadeghi MR, Javadi G. The association between Y chromosome microdeletion and recurrent pregnancy loss. *Iran Red Crescent Med J*. 2012;**14(6)**:358-362.
157. Aitken RJ, Bronson R, Smith TB, de Iuliis GN. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; A commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod*. 2013;**19(8)**:475-485.

158. Youssef A, Vermeulen N, Lashley EEO, Goddijn M, van der Hoorn MLP. Comparison and appraisal of international recurrent pregnancy loss guidelines. *RBMO*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.04.008>.
159. Ewington LJ, Tewary S, Brosens JJ. New insights into the mechanisms underlying recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018. <https://doi.org/10.1111/jog.13837>.
160. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*. 2014;**35**:851-905.
161. Macklon NS, Brosens JJ. The human endometrium as a sensor of embryo quality. *Bio Reprod*. 2014;**91**:98.
162. Teklenburg G, Salker M, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T ve ark. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. *PloS One*. 2010;**5**:e10258.
163. Koot YEM, Teklenburg G, Salker MS, Brosens JJ, Macklon NS. Molecular aspects of implantation failure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;**1822**:1943-1950.
164. Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS, Van OD, Schuring-Blom GH, Krijtenburg PJ ve ark. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of day 4, 5 and 8 human embryos. *Hum Reprod*. 2010;**25**:1916-1926.
165. Prianishnikov VA. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. *Contraception*. 1978;**18**(3):213-223.
166. Padykula HA, Coles LG, Okulicz WC, Rapaport SI, McCracken JA, King NW ve ark. The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment. *Biol Reprod*. 1989;**40**(3):681-690.
167. Padykula HA, Coles LG, McCracken JA, King NW, Longcope C, Kaiserman-Abramof IR A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus endometrium during estrogen surge. *Biol Reprod*. 1984;**31**(5):1103-1118.
168. Cho NH, Park YK, Kim YT, Yang H, Kim SK. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril*. 2004;**81**(2):403-407.

169. Gargett CE, Healy DL. Generating receptive endometrium in Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 2011;**4(1)**:49-52.
170. Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod.* 2004;**70(6)**:1738-1750.
171. Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA.* 2004;**292(1)**:81-85.
172. Nagori CB, Panchal SY, Patel H. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's Syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 2011;**4(1)**:43-48.
173. Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanpong T ve ark. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disabled embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One.* 2010;**5(4)**:e10287.
174. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;**19(1)**:92-105.
175. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM ve ark. A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell.* 2006;**126(6)**:1203-1217.
176. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: a tool for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008;**36**:D154-D158.
177. Qian K, Hu L, Chen H, Li H, Liu N, Li Y ve ark. Hsa-miR-222 is involved in differentiation of endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology.* 2009;**150(10)**:4734-4743.
178. Hu Y, Liu CM, Qi L, He TZ, Shi-Guo L, Hao CJ ve ark. Two common SNPs in pri-miR-125a alter the mature miRNA expression and associate with recurrent pregnancy loss in a Han Chinese population. *Rna Biol.* 2011;**8(5)**:861-872.
179. Jeon YJ, Choi YS, Rah H, Kim SY, Choi DH, Cha SH ve ark. Association study of microRNA polymorphisms with risk of idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women. *Gene.* 2012;**494(2)**:415-424.

180. Revel A, Achache H, Stevens J, Smith Y, Reich R. MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Hum Reprod.* 2011;**26(10)**:2830-2840.
181. Söber S, Rull K, Reiman M, Ilisson P, Mattila P, Laan M. RNA sequencing of chronic villi from recurrent pregnancy loss patients reveals impaired function of basic nuclear and cellular machinery. *Sci Rep.* 2016;**6(1)**:38439.
182. Wang JM, Gu Y, Zhang Y, Yang Q, Zhang X, Yin L et al. Deep-sequencing identification of differentially expressed miRNAs in decidua and villus of recurrent miscarriage patients. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;**293(5)**:1125-1135.
183. Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet.* 2001;**2**:342.
184. Jansen RP, de Boer K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;**145**:81-88.
185. Azadi A, Seo DJ, Sasansara HJ, van Haute M. Mitochondrial DNA variations are associated with recurrent pregnancy loss. *Mit DNA Part A*, 2017. <https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1350854>.
186. Deng X, Berletch JB, Nguyen DK, Distèche CM. X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease. *Nat Rev Genet.* 2014;**15(6)**:367-378.
187. Sui Y, Chen Q, Sun X. Association of skewed X chromosome inactivation and idiopathic recurrent spontaneous abortion: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Bio Med Online.* 2015;**31**:140-148.
188. Mulley JF. Greater loss of female embryos during human pregnancy: a novel mechanism. *Bio Essays.* 2019;**41**:1900063.
189. Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM, Leese HJ. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favor in viability. *Mol Reprod Dev.* 2007;**74**:1345-1353.
190. De Koning AP, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PloS Genet.* 2011;**7(12)**:e1002384.

191. Xing J, Zhang Y, Han K, Salem AH, Sen SK, Huff CD ve ark. Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome Res.* 2009;**19(9)**:1516-1526.
192. Hancks DC, Kazazian HH. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA.* 2016;**7(1)**:1.
193. Feuiser J, Watkins WS, Thomas J, Farrell A, Witherspoon DJ, Baird L ve ark. Pedigree-based estimation of human mobile element retrotransposition rates. *Genome Res.* 2019;**29(10)**:1567-1577.
194. He ZM, Li J, Hwa YL, Brost B, Fang Q, Jiang SW. Transition of LINE-1 DNA methylation status and altered expression in first and third trimester placentas. *PloS One.* 2014;**9(5)**:e96994.
195. Perrin D, Ballestar E, Fraga MF, Frappart L, Esteller M, Guerin JF ve ark. Specific hypermethylation of LINE-1 elements during abnormal overgrowth and differentiation of human placenta. *Oncogene.* 2007;**26(17)**:2518-2524.
196. Lou C, Goodier JL, Qiang R. A potential new mechanism for pregnancy loss: considering the role of LINE-1 retrotransposons in early spontaneous miscarriage. *Reprod Bio Endoc.* 2020;**18**:6.
197. Goodier JL, Kazazian HH. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell.* 2008;**135(1)**:23-35.
198. Mita P, Boeke JD. How retrotransposons shape genome regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 2016;**37**:90-100.
199. Bailey JA, Liu G, Eichler EE. An Alu transposition model the origin and expansion of human segmental duplications. *Am J Hum Genet.* 2003;**73(4)**:823-834.
200. Wen J, Hanna CW, Martell S, Leung PCK, Lewis SME, Robinson WP ve ark. Functional consequences of copy number variants in miscarriage. *Mol Cytogenet.* 2015;**8**:6.
201. Su MT, Lin SH, Chen YC. Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2011;**17**:803-812.

202. Zhang S, Wang J, Wang B, Ping Y, Ma X. Strong association between angiotensin I-converting enzyme I/D polymorphism and unexplained recurrent miscarriage of Chinese women—a case-control study. *Reprod Sci*. 2011;**18(08)**:743-746.
203. Misra MK, Misra A, Phadke SR, Agrawal S. Association of functional genetic variants of CTLA4 with reduced serum CTLA4 protein levels and increased risk of idiopathic recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2016;**106(5)**:1115-1126.
204. Kamali M, Hantoushzadeh S, Borna S, Neamatzadeh H, Mazaheri M, Noori-Shadkam M ve ark. Association between thrombophilic genes polymorphisms and recurrent pregnancy loss susceptibility in th Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *Iran Biomed J*. 2018;**22(2)**:78-89.
205. Zidan HE, Abdul-Maksoud RS, Mowafy HE, Elsayed WSH. The association of IL-33 and Foxp3 gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Egyptian women. *Cytokine*. 2018;**108**:115-119.
206. Yazdani N, Khaniani MS, Bastami M, Ghasemnejad T, Afkhami F, Derakhshan M. HLA-G regulatory variants and haplotypes with susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Int J Immunogenet*. 2018;1-9.
207. Quintero-Ronderos P, Laissue P. Genetic variants contributing to early recurrent pregnancy loss etiology identified by sequencing approaches. *Reprod Sci*. 2019;1933719119831769.
208. Trifonova EA, Swarovskaya MG, Ganzha OA, Voronkova OV, Gabidulina TV, Stepanov VA. The interaction effect of angiogenesis and endothelial dysfunction-related gene variants increases the susceptibility of recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01403-2>.
209. Jung YW, Jeon YJ, Rah HC, Kim JH, Shin JE, Choi DH ve ark. Genetic variants in MicroRNA machinery genes are associate with idiopathic recurrent pregnancy loss risk. *PloS One*. 2014;**9(4)**:e95803.
210. Wang L, Wang ZC, Xie C, Liu XF, Yang MS. Genome-wide screening for risk of idiopathic recurrent miscarriage in a Han Chinese population: a pilot study. *Reprod Sci*. 2010;**17(6)**:578-584.

211. Kolte AM, Nielsen HS, Moltke I, Degn B, Pedersen B, Sunde L ve ark. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage. *Mol Hum Reprod.* 2011;**17(6)**:379-385.
212. Perez N, Ostojic S, Kapovic M, Peterlin B. Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril.* 2017;**107(1)**:150-159.
213. Patel B, Parets S, Akana M, Kellogg G, Jansen M, Chang C ve ark. Comprehensive genetic testing for female and male infertility using next-generation sequencing. *J Ass Rep Gen.* 2018;**35(8)**:1489-1496.
214. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Simón C. The genomics of the human endometrium. *Biochim Biophys Acta.* 2012;**1822(12)**:1931-1942.
215. Krieg SA, Fan X, Hong Y, Sang QX, Giaccia A, Westphal LM ve ark. Global alteration in gene expression profiles of deciduas from women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod.* 2012;**18**:442-450.
216. Othman R, Omar MH, Shan LP, Shafiee MN, Jamal R, Mokhtar NM. Microarray profiling of secretory-phase endometrium from patients with recurrent miscarriage. *Reprod Biol.* 2012;**12**:183-199.
217. Koler M, Achache H, Tsafir A, Smith Y, Revel A, Reich R. Disrupted gene pattern in patients with repeated in vitro fertilization (IVF) failure. *Hum Reprod.* 2009;**24(10)**:2541-2548.
218. Koot YEM, van Hooff SR, Boomsma CM, van Leenen D, Koerkamp MJAG, Goddijn M ve ark. An endometrial gene expression signature accurately predicts recurrent implantation failure after IVF. *Nat Sci Rep.* 2016;**6**:19411.
219. Ace CI, Okulicz WC. Microarray profiling of progesterone-regulated endometrial genes during the rhesus monkey secretory phase. *Reprod Biol Endoc.* 2004;**2**:54.
220. Quintero-Ronderos P, Mercier E, Fukuda M, Gonzalez R, Suarez CF, Patarroyo MA ve ark. Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. *PLoS One.* 2017;**12**:e0186149.

221. Qiao Y, Wen J, Tang F, Martell S, Shomer N, Leung PCK ve ark. Whole exome sequencing in recurrent early pregnancy loss. *Mol Hum Reprod.* 2016;**22**(5):364-372.
222. Reilly ML, Stokman MF, Magry V, Jeanpierre C, Alves M, Paydar M ve ark. Loss-of-function mutations in KIF14 cause severe microcephaly and kidney development defects in humans and zebrafish. *Hum Mol Genet.* 2019;**28**(5):778-795.
223. Lopez-Carrasco A, Oltra S, Monfort S, Mayo S, Roselló M, Martínez F, Orellana C. Mutation screening of AURKB and SYCP3 in patients with reproductive problems. *Mol Hum Reprod.* 2013;**19**:102-108.
224. Huang J, Qin H, Yang Y, Chen X, Zhang J, Laird S ve ark. A comparison of transcriptomic profiles in endometrium during window of implantation between women with unexplained recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproduction.* 2017;**153**(6):749-758.
225. Huang JY, Su M, Lin SH, Kuo PL. A genetic association study of NLRP2 and NLRP7 genes in idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2013;**28**:1127-1134.
226. Parry DA, Logan CV, Hayward BE, Shires M, Landolsi H, Diggle C ve ark. Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate c6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. *Am J Hum Genet.* 2011;**89**:451-458.
227. Bondeson ML, Ericson K, Gudmundsson S, Ameer A, Pontén F, Wesström J ve ark. A nonsense mutation in CEP55 defines a new locus for a Meckel-like syndrome, an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy. *Clin Genet.* 2017;**92**:510-516.
228. Shamseldin HE, Swaid A, Alkuraya FS. Lifting the lid on unborn lethal Mendelian phenotypes through exome sequencing. *Genet Med.* 2013;**15**:307-309.
229. Shamseldin HE, Tulbah M, Kurdi W, Nemer M, Alsahan N, Mardawi EA ve ark. Identification of embryonic lethal genes in humans by autozygosity mapping and exome sequencing in consanguineous families. *Genome Biol.* 2015;**16**:116.

230. Stouffs K, Vandermaelen D, Tournaye H, Liebaers I, Lissens W. Mutation analysis of three genes in patients with maturation arrest of spermatogenesis and couples with recurrent miscarriages. *Reprod Biomed Online*. 2011;**22**:65-71.
231. Ellard S, Kivuva E, Turnpenny P, Stals K, Johnson M, Xie W ve ark. An exome sequencing strategy to diagnose lethal autosomal recessive disorders. *Eur J Hum Genet*. 2015;**23**:401-404.
232. Dohrn N, Le VQ, Petersen A, Skovbo P, Pedersen IS, Ernst A ve ark. ECEL1 mutation causes fetal arthrogryposis multiplex congenita. *Am J Med Genet A*. 2015;**167a**:731-743.
233. Rae W, Gao Y, Bunyan D, Holden S, Gilmour K, Patel S ve ark. A novel FOXP3 mutation causing fetal akinesia and recurrent male miscarriages. *Clin Immunol*. 2015;**161**:284-285.
234. Bendroth-Asmussen L, Aksglaede L, Gernow AB, Lund AM. Glycogen storage disease type IV: a case with histopatologic findings in first trimester placental tissue. *Int J Gynecol Pathol*. 2016;**35**:38-40.
235. Nagirnaja L, Palta P, Kasak L, Rull K, Christiansen OB, Nielsen HS ve ark. Structural genomic variation as risk factor for idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Mutat*. 2014;**35**:972-982.
236. Zheng HY, Tang Y, Niu J, Li P, Ye DS, Chen X ve ark. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in human spontaneous abortions after assisted reproduction techniques and natural conception. *Hum Reprod*. 2013;**28**:265-273.
237. Bhuiyan ZA, Momenah TS, Gong Q, Amin AS, Ghamdi SA, Carvalho JS ve ark. Recurrent intrauterine fetal loss due to near absence of HERG: clinical and functional characterization of a homozygous nonsense HERG Q1070X mutation. *Heart Rhythm*. 2008;**5**:553-561.
238. Tsurusaki Y, Yonezawa R, Furuya M, Nishimura G, Pooh RK, Nakashima M ve ark. Whole exome sequencing revealed biallelic IFT122 mutations in a family with CED1 and recurrent pregnancy loss. *Clin Genet*. 2014;**85**:592-594.

239. Andreassen L, Christiansen OB, Niemann I, Bolund L, Sunde L. NLRP7 or KHDC3L genes and the etiology of molar pregnancies and recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod.* 2013;**19**:773-781.
240. Filges I, Nosova E, Bruder E, Tercanli S, Townsend K, Gibson WT ve ark. Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal lethal fetal ciliopathy phenotype. *Clin Genet.* 2014;**86**:220-228.
241. Wilbe M, Ekvall S, Eurenus K, Ericson K, Casar-Borota O, Klar J ve ark. MuSK: a new target for lethal fetal akinesia deformation sequence (FADS). *J Med Genet.* 2015;**52**(3):195-202.
242. Docherty LE, Rezwan FI, Poole RL, Turner CLS, Kivuva E, Maher ER ve ark. Mutations in NLRP5 are associated with reproductive wastage and multilocus imprinting disorders in humans. *Nat Commun.* 2015;**6**:8086.
243. Deveau C, Qian JH, Chebaro W, Ao A, Gilbert L, Mehio A ve ark. NLRP7 mutations in women with diploid androgenetic and triploid moles: a proposed mechanism for mole formation. *Hum Mol Genet.* 2009;**18**:888-897.
244. Suzuki T, Behnam M, Ronasian F, Salehi M, Shiina M, Koshimizu E ve ark. A homozygous NOP14 variant is likely to cause recurrent pregnancy loss. *J Hum Genet.* 2018;**63**:425-430.
245. McKie AB, Alsaedi A, Vogt J, Stuurman KE, Weiss MM, Shakeel H ve ark. Germline mutations in RYR1 are associated with fetal akinesia deformation sequence/lethal multiple pterygium syndrome. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;**2**:148.
246. Cristofoli F, De Keersmaecker B, De catte L, Vermeesch JR, Van Esch H. Novel STIL compound heterozygous mutations cause severe fetal microcephaly and centriolar lengthening. *Mol Syndromol.* 2017;**8**:282-293.
247. Zhang Y, Li G, Fan Y, Cui Y, Huang S, Ma J ve ark. Novel missense mutation in WNT6 in 100 couples with unexplained recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2015;**30**:994-999.
248. Qian J, Nguyen NMP, Rezaei M, Huang B, Tao Y, Zhang X ve ark. Biallelic PADI6 variants linking infertility, miscarriages, and hydatidiform moles. *Eur J Hum Genet.* 2018;**26**(7):1007-1013.

249. Kasippillai T, MacArthur DG, Kirby A, Thomas B, Lambalk CB, Daly MJ ve ark. Mutations in eIF4ENIF1 are associated with primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;**98(9)**:E1534-1539.
250. Fauser BCJM, Diedrich K, Bouchard P, Domínguez F, Matzuk M, Franks S ve ark. Contemporary genetic technologies and female reproduction. The Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2010. *Hum Reprod Update.* 2011;**17(6)**:829-847.
251. Guerri G, Maniscalchi T, Barati S, Gerli S, Renzo GCD, Morte CD ve ark. Non-syndromic monogenic female infertility. *Acta Biomed.* 2019;**90(10)**:68-74.
252. Patino LC, Beau I, Carlosama C, Buitrago JC, González R, Suárez CF ve ark. New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Hum Reprod.* 2017;**32(7)**:1512-1520.
253. Uyguner ZO. Prematür over yetmezliğine yol açan tek gen defektleri. İçinde Çefle K, Öztürk Ş, editörler. *İnfertilite ve Genetik Yönü*. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2019. pp.43-56.
254. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P ve ark. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;**106**:19096-19101.
255. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL ve ark. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med.* 2013;**15**:565-574.
256. Byron SA, Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, Carpten JD, Craig DW. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nat Rev Genet.* 2016;**17(5)**:257-271.
257. Costa V, Aprile M, Esposito R, Ciccodicola A. RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives. *Eur J Hum Genet.* 2013;**21(2)**:134-142.
258. LeBlanc VG, Marra MA. Next generation sequencing approaches in cancer: where have they brought us and where will they take us? *Cancers.* 2015;**7(3)**:1925-1958.

259. Sue R, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J ve ark. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;**17**(5):405-424.
260. Creasy R. The cytogenetics of spontaneous abortion in humans. İçinde Beard RW, Sharp F, editörler. *Early Pregnancy Loss: Mechanisms and treatment*. London: Springer Verlag; 1988. pp.293-304.
261. Christiansen OB. The epidemiology of recurrent pregnancy loss. İçinde Carp HJA, editör. *Recurrent Pregnancy Loss. Causes, controversies and treatment*. CRC Press. 2015. pp.1-15.
262. Rajcan-Separovic E. Next generation sequencing in recurrent pregnancy loss-approaches and outcomes. *EJMG*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.04.001>.
263. Maddirevula S, Awartani K, Coskun S, AlNaim LF, Ibrahim N, Abdulwahab F ve ark. A genomics approach to females with infertility and recurrent pregnancy loss. *Hum Genet*. 2020;**139**(5):605-613.
264. Huret JL, Leonard C, Kanoui V. Ring chromosome 21 in a phenotypically normal but infertile man. *Clin Genet*. 1985;**28**:541-545.
265. Dallapiccola B, De Filippis V, Notarangelo A, Perla G, Zelante L. Ring chromosome 21 in healthy persons: different consequences in females and in males. *Hum Genet*. 1986;**73**:218-220.
266. Hammoud I, Gomes DM, Bergere M, Wainer R, Selva J, Vialard F. Sperm chromosome analysis of an infertile patient with a 95% mosaic r(21) karyotype and normal phenotype. *Fertil Steril*. 2009;**91**:930.e13-15.
267. Çetin Z, Altıok-Clark O, Sevuk M, Karaüzüm B. Ring chromosome 21 and monosomy 21 mosaicism in a patient with azoospermia. *Andrologia*. 2015;**47**:112-115.
268. Roeder GS, Bailis JM. The pachytene checkpoint. *Trends Genet*. 2000;**16**:395-403.

269. Flory MR, Moser MJ, Monnat RJ, Davis TN. Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proc Nat Acad Sci*. 2000;**97**:5919-5923.
270. GeneCards, 2020. PCNT gene. Bulunduğu adres: <<https://genecards.weizmann.ac.il/v3/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PCNT>>
271. Falk N, Kessler K, Schramm SF, Boldt K, Becirovic E, Michalakis S ve ark. Functional analyses of Pericentrin and Syne-2 interaction in ciliogenesis. *J Cell Sci*. 2018;**131**(16):jcs218487.
272. Ma W, Viverios MM. Depletion of pericentrin in mouse oocytes disrupts microtubule organizing center function and meiotic spindle organization. *Mol Reprod Dev*. 2014;**81**:1019-1029.
273. Sironen A, Shoemark A, Patel M, Loebinger MR, Mitchison HM. Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility. *Cell Mol Life Sci*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03389-7>.
274. Uhlen M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A ve ark. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;**347**(6220):1260419. Bulunduğu adres: <https://www.proteinatlas.org/>.
275. Tefs K, Gueorguieva M, Klammt J, Allen CM, Aktas D, Anlar FY ve ark. Molecular and clinical spectrum of type I plasminogen deficiency: A series of 50 patients. *Blood*. 2006;**108**(9):3021-3026.
276. Schuster V, Mingers AM, Seidenspinner S, Nüssgens Z, Pukrop T, Kreth HW ve ark. Homozygous mutations in the plasminogen gene of two unrelated girls with ligneous conjunctivitis. *Blood*. 1997;**90**(3):958-966.
277. Robert K, Vialard F, Thierry E, Toyama K, Sinet PM, Janel N ve ark. Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. *J Histochem Cytochem*. 2003;**51**:363-371.
278. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR ve ark. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Nat Acad Sci*. 1995;**92**:1585-1589.

279. Nuno-Ayala M, Guillén N, Arnal C, Lou-Bonafonte JM, de Martino A ve ark. Cystathionine β -synthase deficiency causes infertility by impairing decidualization and gene expression networks in uterus implantation sites. *Physiol Genomics*. 2012;**44**:702-716.
280. Guzman MA, Navarro MA, Carnicer R, Sarriá AJ, Acín S, Arnal C ve ark. Cystathionine b-synthase is essential for female reproductive function. *Hum Mol Genet*. 2006;**15**(21):3168-3176.
281. Thompson SW, Bacino CA, Safina NP, Bober MB, Proud VK, Funari T ve ark. Fibrochondrogenesis results from mutations in the COL11A1 type XI collagen gene. *Am J Hum Genet*. 2010;**87**:708-712.
282. Ji S, You Y, Kerner J, Hoppel CL, Schoeb TR, Chick WSH ve ark. Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab*. 2008;**93**:314-322.
283. Hirschmugl B, Desoye G, Catalano P, Klymiuk I, Scharnagl H, Payr S ve ark. Maternal obesity modulates intracellular lipid turnover in the human term placenta. *Int J Obes*. 2017;**41**:317-323.
284. Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM, Sadovsky Y ve ark. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocr Metab*. 2005;**90**(7):4267- 4275.
285. Dua P, Kang HS, Hong SM, Tsao MS, Kim S, Lee DK. Alkaline phosphatase ALPPL-2 is a novel pancreatic carcinoma-associated protein. *Cancer Res*. 2013;**73**:1934-1945.
286. Bi Y, Tu Z , Zhang Y , Yang P , Guo M , Zhu X ve ark. Identification of ALPPL2 as a naive pluripotent state-specific surface protein essential for human naive pluripotency regulation. *Cell Reports*. 2020;**30**:3917-3931.
287. Schweinberger BM, Rodrigues AF, Turcatel E, Pierozan P, Pettenuzzo LF, Grings M ve ark. Maternal hypermethioninemia affects neurons number, neurotrophins levels, energy metabolism, and Na⁺,K⁺-ATPase expression/content in brain of rat offspring. *Mol Neurobiol*. 2018;**55**:980-988.

288. Frasor J, Park K, Byers M, Telleria C, Kitamura T, Yu-Lee LY ve ark. Differential roles for signal transducers and activators of transcription 5a and 5b in PRL stimulation of ER alpha and ER beta transcription. *Mol Endocrinol*. 2001;**15**:2172-2181.
289. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H ve ark. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev*. 1997;**11**:167-178.
290. Binart N, Helloco C, Ormandy CJ, Barra J, Clément-Lacroix P, Baran N ve ark. Rescue of preimplantatory egg development and embryo implantation in prolactin receptor-deficient mice after progesterone administration. *Endocrinology*. 2000;**14**:2691-2697.
291. Tomari S, Watanabe M, Inoue N, Mizuma T, Yamanaka C, Hidaka Y ve ark. The Polymorphisms in the Thyroid Peroxidase Gene Were Associated With the Development of Autoimmune Thyroid Disease and the Serum Levels of Anti-Thyroid Peroxidase Antibody. *Endocr J*. 2017;**64**(10):1025-1032.
292. Song Y, Chen Y, Xu Q. Association among cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene, rs231775 polymorphism, and recurrent pregnancy loss risk. *Biosci Rep*. 2019;**39**(2). pii:BSR20181760.
293. Wolff C, Zabransky S. Hypophosphatasia congenita letalis. *Europ J Pediat*. 1982;**138**:197-199.
294. Lavery GG, Walker EA, Tiganescu A, Ride JP, Shackleton CHL, Tomlinson JW ve ark. Steroid biomarkers and genetic studies reveal inactivating mutations in hexose-6-phosphate dehydrogenase in patients with cortisone reductase deficiency. *J Clin Endocr Metab*. 2008;**93**:3827-3832.
295. Sata F, Yamada H, Yamada A, Kato EH, Kataoka S, Saijo Y ve ark. A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*. 2003;**9**(11):725-728.
296. Biason-Lauber A, Kempken B, Werder E, Forest MG, Einaudi S, Ranke MB ve ark. 17a-Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency as a Model to Study Enzymatic Activity Regulation: Role of Phosphorylation. *J Clin End Metab*. 1999;**85**(3):1226-1231.

297. Grewal T, Hoque M, Conway JRW, Reverter M, Wahba M, Beevi SS ve ark. Annexin A6-A multifunctional scaffold in cell motility. *Cell Adh Migr*. 2017;**11**:288-304.
298. Garrido-Gomez T, Quiñonero A , Antúnez O, Díaz-Gimeno P , Bellver J, Simón C ve ark. Deciphering the proteomic signature of human endometrial receptivity. *Hum Reprod*. 2014;**29**(9):1957-1967.
299. Dhaenens L, Lierman S, de Clerck L, Govaert E, Deforce D, Tilleman K ve ark. Endometrial stromal cell proteome mapping in repeated implantation failure and recurrent pregnancy loss cases and fertile women. *Reprod Biomed Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.022>.
300. Cheng CK, Leung PC. Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev*. 2005;**26**:283-306.
301. Wolfahrt S, Kleine B, Rossmanith WG. Detection of gonadotropin releasing hormone and its receptor mRNA in human placental trophoblasts using in situ reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol Hum Reprod*. 1998;**4**:999-1006.
302. Casan EM, Raga F, Kruessel JS, Wen Y, Nezhat C, Polan ML. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone expression in cycling human endometrium of fertile patients. *Fertil Steril*. 1998;**70**:102-106.
303. Peng B, Zhu H, Leung PC. Gonadotropin-releasing hormone regulates human trophoblastic cell invasion via TWIST-induced N-cadherin expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;**100**:E19-29.
304. Chou CS, Beristain AG, MacCalman CD, Leung PC. Cellular localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II in first-trimester human placenta and decidua. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;**89**:145-1466.
305. Lee HJ, Snegovskikh VV, Park JS, Foyouzi N, Han KT, Hodgson EJ ve ark. Role of GnRH-GnRH receptor signaling at the maternal-fetal interface. *Fertil Steril*. 2010;**94**:2680-2687.

306. Sengupta A, Sridaran R. Expression and localization of gonadotropin releasing hormone receptor in the rat oviduct during pregnancy. *J Histochem Cytochem.* 2008;**56**:25-31.
307. Zhang X, Nothnick WB. The role and regulation of the uterine matrix metalloproteinase system in menstruating and non-menstruating species. *Front Biosci.* 2005;**10**:353-366.
308. Wilson CL, Matrisian LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;**28**:123-136.
309. Li Y, Jia JH, Kang S, Zhang XJ, Zhao J, Wang N ve ark. Polymorphisms in the promoter regions of the matrix metalloproteinases-1, -3, -7, and -9 and the risk of epithelial ovarian cancer in China. *Gynecol Oncol.* 2006;**101**:92-96.
310. Yi YC, Chou PT, Chen LY, Kuo WH, Ho ES, Han CP ve ark. Matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) polymorphism is a risk factor for endometrial cancer susceptibility. *Clin Chem Lab Med.* 2010;**48**:337-344.
311. Singh H, Jain M, Mittal B. MMP-7 (-181A>G) promoter polymorphisms and risk for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;**110**:71-75.
312. Shan K, Lian-Fu Z, Hui D, Wei G, Na W, Xia J ve ark. Polymorphisms in the promoter regions of the matrix metalloproteinases-7, -9 and the risk of endometriosis and adenomyosis in China. *Mol Hum Reprod.* 2006;**12**:35-39.
313. Rahimi Z, Kazemian L, Malek-Khosravi S, Najafi F, Rahimi Z. Matrix metalloproteinase-7A-181G and its interaction with matrix metalloproteinase-9C-1562T polymorphism in preeclamptic patients: association with malondialdehyde level and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2015;**291**:45-51.
314. Vettraino IM, Roby J, Tolley T, Parks WC. Collagenase-I, stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta.* 1996;**17**:557-563.
315. Critchley HO, Robertson KA, Forster T, Henderson TA, Williams AR, Ghazal P. Gene expression profiling of mid to late secretory phase endometrial biopsies from women with menstrual complaint. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;**195**:406.e1-406.16.

316. Kim HJ, Lee JY, Kim SH, Seo YJ, Lee JH, Park JK ve ark. Stromelysin-3 expression in the differential diagnosis of dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans: comparison with factor XIIIa and CD34. *Brit J Dermat.* 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08033.x>.
317. Nguyen TT-TN, Shynlova O, Lye SJ. Matrix metalloproteinase expression in the rat myometrium during pregnancy, term labor, and postpartum. *Biol Reprod.* 2016;**95**(1):24,1-14.
318. Kim MS, Yu JH, Lee MY, Kim AL, Jo MH, Kim MG ve ark. Differential expression of extracellular matrix and adhesion molecules in fetal-origin amniotic epithelial cells of preeclamptic pregnancy. *PLoS One.* 2016;**11**(5):e0156038.
319. Li S, Wang Y, Cao B, Wu Y, Ji L, Li YX, Liu M ve ark. Maturation of growth differentiation factor 15 in human placental trophoblast cells depends on the interaction with Matrix Metalloproteinase-26. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;**99**(11):E2277-2287.
320. Mardona HJ, Bagchib MK, Bagchic IC, Pengd C, Karpovicha N, Wange Y. Hormonal and paracrine regulation of embryonic implantation: A workshop report. *Placenta.* 2007;**28**:S82-S84.
321. Qiao J, Wang L, Li R, Zhang X. Microarray evaluation of endometrial receptivity in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online.* 2008;**17**(3):425-435.
322. Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cell Mol Life Sci.* 2009;**66**:2623-2642.
323. Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardo HJ. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;**105**:16189-16194.
324. Weimar CH, Kavelaars A, Brosens JJ, Gellersen B, de Vreeden-Elbertse JMT, Heijnen CJ ve ark. Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high- and low-quality human embryos. *PLoS One.* 2012;**7**:e41424.

325. Sasaki K, Norwitz ER. Gonadotropin-releasing hormone/gonadotropin-releasing hormone receptor signaling in the placenta. *Curr Opin Endocrinol Diab Obes*. 2011;**18**:401-408.
326. Lin LS, Roberts VJ, Yen SS. Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;**80**:580-585.
327. Siler-Khodr TM, Khodr GS. Content of luteinizing hormone-releasing factor in the human placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;**130**:216-219.
328. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;**2**:59.
329. Punyadeera C, Dassen H, Klomp J, Dunselman G, Kamps R, Dijcks F ve ark. Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium. *Cell Mol Life Sci*. 2005;**62**:239-250.
330. Lucotte G, Mercier G. Population genetics of factor V leiden in Europe. *Blood Cell Mol Dis*. 2001;**27(2)**:362-367.
331. Clausen T, Kaiser M, Huber R, Ehrmann M. HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;**12**:152-162.
332. Inagaki A, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inuzuka H, Miyamura H ve ark. Upregulation of Htra4 in the placentas of patients with severe pre-eclampsia. *Placenta*. 2012;**33**:919-926.
333. Guimarães PB, Alvarenga EC, Siqueira PD, Paredes-Gamero EJ, Sabatini RA, Morais RLT, Reis RI ve ark. Angiotensin II binding to angiotensin I-converting enzyme triggers calcium signaling. *Hypertension*. 2011;**57(5)**:965-972.
334. Zhang S, Wang J, Wang B, Ping Y, Ma X. Strong association between angiotensin I-converting enzyme I/D polymorphism and unexplained recurrent miscarriage of Chinese women—a case-control study. *Reprod Sci*. 2011;**18(08)**:743-746.
335. Shakarami F, Akbari MT, Zare Karizi S. Association of plasminogen activator inhibitor-1 and angiotensin converting enzyme polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Iranian women. *Iran J Reprod Med*. 2015;**13(10)**:627-632.

336. Aslbahar F, Neamatzadeh H, Tabatabaiee RS, Karimi-Zarchi M, Javaheri A, Mazaheri M, Foroughi E ve ark. Association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism with recurrent pregnancy loss: a meta-analysis of 26 case-control studies. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2018;**40**:631-641.
337. Large MJ, Wetendorf M, Lanz RB, Hartig SM, Creighton CJ, Mancini MA, Kovanci E ve ark. The epidermal growth factor receptor critically regulates endometrial function during early pregnancy. *PloS Genet.* 2014;**10**:e1004451.
338. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 2002;**2**:656-663.
339. Tabiasco J, Rabot M, Aguerre-Girr M, El Costa H, Berrebi A, Parant O ve ark. Human decidual NK cells: Unique phenotype and functional properties-a review. *Placenta.* 2006;**27**:S34-39.
340. Balcı M, Özdemir G. Differential expression of EGFR-1, MMP-3 and MMP-9 in spontaneous abortions, induced abortion, and tubal pregnancies. *Turk Patoloji Derg.* 2019;**35**:1-8.
341. Helske S, Vuorela P, Carpen O, Hornig C, Weich H, Halmesmaki E. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol Hum Reprod.* 2001;**7**:205-210.
342. Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Blacher S, Berndt S, Frankenne F ve ark. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. *Hum Reprod.* 2008;**23**:1407-1415.
343. Corcoran JJ, Nicholson C, Sweeney M, Charnock JC, Robson SC, Westwood M ve ark. Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17beta-estradiol and estrogen-receptor-specific agonists. *Mol Hum Reprod.* 2014;**20**:433-441.
344. Dietrich W, Gaba A, Zhegu Z, Bieglmayer C, Mairhofer M, Mikula M ve ark. Testosterone dependent androgen receptor stabilization and activation of cell proliferation in primary human myometrial microvascular endothelial cells. *Fertil Steril.* 2011;**95**:1247-1255.

345. Goddard LM, Murphy TJ, Org T, Enciso JM, Hashimoto-Partyka MK, Warren CM ve ark. Progesterone receptor in the vascular endothelium triggers physiological uterine permeability preimplantation. *Cell*. 2014;**156**:549-562.
346. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;**9**:669-676.
347. Zygmuni M, Herr P, Munstedt K, Lang U, Liung OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;**110**:S10-18.
348. Vuorela P, Carpen O, Tulppala M, Halmesmaki E. VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod*. 2000;**6**:276-282.
349. Semezuk M, Borczynska A, Bialas M, Rozwadowska N, Semczuk-Sikora A, Malche A ve ark. Expression of genes coding for proangiogenic factors and their receptors in human placenta complicated by preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;**13**:133-138.
350. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokinectin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinol*. 2006;**147**:1675-1684.
351. Masumoto KH, Nagano M, Takashima N, Hayasaka N, Hiyama H, Matsumoto Sİ ve ark. Distinct localization of prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. 2006;**23**:2959-2970.
352. Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;**23**:501-508.
353. Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;**18**:66-72.
354. Garnier V, Traboulsi W, Salomon A, Brouillet S, Fournier T, Winkler C ve ark. PPARgamma controls pregnancy outcome through activation of EG-VEGF: new insights into the mechanism of placental development. *Am J Physiol Endoc Metab*. 2015;**309**:E357-369.

355. Brouillet S, Hoffmann P, Chauvet S, Salomon A, Chamboredon S, Sergent F ve ark. Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell Mole Life Sci*. 2012;**69**:1537-1550.
356. Li JD, Hu WP, Zhou QY. The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei. *Prog Brain Res*. 2012;**199**:119-127.
357. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto K, Nagano M, Naito M, Soga T ve ark. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;**103**:4140-4145.
358. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW ve ark. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;**104**:17447-17452.
359. Evans J, Catalano RD, Morgan K, Critchley HO, Millar RP, Jabbour HN. Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology*. 2008;**149**:2877-2887.
360. Battersby S, Critchley HO, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;**89**:2463-2469.
361. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C ve ark. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med*. 2009;**13**:2224-2235.
362. Su MT, Lin SH, Chen YC, Wu LW, Kuo PL. Prokineticin receptor variants (PKR1-I379V and PKR2-V331M) are protective genotypes in human early pregnancy. *Reproduction*. 2013;**146**:63-73.
363. Traboulsi W, Brouillet S, Sergent F, Boufettal H, Samouh N, Aboussaouira T ve ark. Prokineticins in central and peripheral control of human reproduction. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 2015;**24(7)**:73-81.
364. Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T ve ark. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium

disabled embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One*. 2010;**5**(4):e10287.

365. Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL. Gene-gene interactions and gene polymorphisms of VEGFA and EG-VEGF gene systems in recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*. 2014;**31**:699-705.

366. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML ve ark. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet*. 2006;**2**(10):e175.

367. Reynaud R, Jayakody SA, Monnier C, Saveanu A, Bouligand J, Guedj AM ve ark. PROKR2 variants in multiple hypopituitarism with pituitary stalk interruption. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;**97**(6):E1068-E1073.

368. Caronia LM, Martin C, Welt CK, Sykiotis GP, Quinton R, Thambundit A ve ark. A genetic basis for functional hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med*. 2011;**364**(3):215-225.

369. Stefaniya MA, Jeanpierre M, Sykiotis GP, Young J, Quinton R, Abreu AP ve ark. An ancient founder mutation in PROKR2 impairs human reproduction. *Hum Mol Genet*. 2012;**21**(19):4314-4324.

370. Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol*. 2000;**195**:1-65.

371. Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development*. 2010;**137**:859-870.

372. Bell CE, Calder MD, Watson AJ. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. *Mol Hum Reprod*. 2008;**12**:691-701.

373. Jiao ZW, Wooruff TK. Detection and quantification of maternal-effect gene transcripts in mouse second polar bodies: potential markers of embryo developmental competence. *Fertil Steril*. 2013;**99**(7):2055-2061.

374. Patrizio P, Fragouli E, Bianchi V, Borini A, Wells D. Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reprod Biomed Online*. 2007;**15**:346-353.

375. Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA ve ark. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet.* 2000;**26**:267-268.
376. Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet.* 2003;**33**:187-191.
377. Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE ve ark. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science.* 2003;**300**:633-636.
378. DePamphillis ML, Kaneko KJ, Vassilev A. Activation of zygotic gene expression in mammals. İçinde Depamphillis ML, editör. *Advances in developmental biology and biochemistry.* Elsevier Science BV. 2002; pp.56-84.
379. Assou S, Boumela I, Haouzi D, Monzo C, Dechaud H, Kadoch IJ ve ark. Transcriptome analysis during human trophectoderm specification suggests new roles of metabolic and epigenetic genes. *PloS One.* 2012;**7(6)**:e39306.
380. Falco G, Lee SL, Stanghellini I, Bassey UC, Hamatani T, Ko MSH ve ark. Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol.* 2007;**307**:539-550.
381. Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MSH ve ark. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell.* 2004;**6**:117-131.
382. Kramerova IA, Kawaguchi N, Fessler LI, Nelson RE, Chen Y, Kramerov AA ve ark. Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development.* 2000;**127**:5475-5485.
383. Bouilly J, Veitia RA, Binart N. NOBOX is a key FOXL2 partner involved in ovarian folliculogenesis. *J Mol Cell Biol.* 2014;**6**:175-177.
384. Tripurani SK, Lee KB, Wang L, Wee G, Smith GW, Lee YS ve ark. A novel functional role for the oocyte-specific transcription factor newborn ovary homebox (NOBOX) during early embryonic development in cattle. *Endocrinology.* 2011;**152**:1013-1023.

385. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*. 2004;**305**(5687):1157-1159.
386. Bouilly J, Beau I, Barraud S, Bernard V, Azibi K, Fagart J ve ark. Identification of multiple gene mutations accounts for a new genetic architecture of primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;**101**(12):4541-4550.
387. Liu PC, Thiele DJ. Novel stress-responsive genes EMG1 and NOP14 encode conserved, interacting proteins required for 40S ribosome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 2001;**12**:3644-3657.
388. Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;**101**:12792-12797.
389. Karaca E, Li X, Lewicki J, Neofytou C, Guérout N, Barnabé-Heider F ve ark. The corepressor CtBP2 is required for proper development of the mouse cerebral cortex. *Mol Cell Neurosci*. 2020;**104**:103481.
390. Wang H, Xiao Z, Zheng J, Wu J, Hu XL, Yang X ve ark. ZEB1 Represses Neural Differentiation and Cooperates with CTBP2 to Dynamically Regulate Cell Migration during Neocortex Development. *Cell Rep*. 2019;**27**(8):2335-2353.e6.
391. van Haelst MM, Maiburg M, Baujat G, Jadeja S, Monti E, Bland E ve ark. Molecular study of 33 families with Fraser syndrome: new data and mutation review. *Am J Med Genet*. 2008;**146A**:2252-2257.
392. Shafeghati Y, Kniepert A, Vakili G, Zenker M. Fraser syndrome due to homozygosity for a splice site mutation of FREM2. *Am J Med Genet*. 2008;**146A**:529-531.
393. Suzuki S. CHD1 acts via the Hmgpi pathway to regulate mouse early embryogenesis. *Development*. 2015;**142**(13):2375-2384.
394. Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y ve ark. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet*. 2010;**19**(3):480-493.

395. Inouye S, Izu H, Takaki E, Suzuki H, Shirai M, Yokota Y ve ark. Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. *J Biol Chem*. 2004;**279**:38701-38709.
396. Christians E, Davis AA, Thomas SD, Benjamin IJ. Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature*. 2000;**407**:693-694.
397. van der Vaart B, Franker MAM, Kuijpers M, Hua S, Bouchet BP, Jiang K ve ark. Microtubule Plus-End Tracking Proteins SLAIN1/2 and ch-TOG Promote Axonal Development. *J Neurosci*. 2012;**32(42)**:14722-14728.
398. Howard SR, Guasti L, Ruiz-Babot G, Mancini A, David A, Storr HL ve ark. IGSF10 mutations dysregulate gonadotropin-releasing hormone neuronal migration resulting in delayed puberty. *EMBO Mol Med*. 2016;**8(6)**:626-642.
399. Jolly A, Bayram Y, Turan S, Aycan Z, Tos T, Abali ZY ve ark. Exome Sequencing of a Primary Ovarian Insufficiency Cohort Reveals Common Molecular Etiologies for a Spectrum of Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;**104(8)**:3049-3067.
400. Bernard P, Harley VR. Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;**39**:31-43.
401. Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B ve ark. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by Wnt4 in the developing mammalian gonad. *Development*. 2003;**130**:3663-3670.
402. Pellegrino M, Maiorino R, Schonauer S. WNT signaling in female gonadal development. *Endoc Metab Immune Dis Drug Targ*. 2010;**10**:168-174.
403. Merchant H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol*. 1975;**44**:1-21.
404. Liang L, Soyal SM, Dean J. FIGalpha, a germ cell -specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development*. 1997;**124**:4939-4947.
405. De LA, Kerr B, Paredes A, Merchant-Larios H, Méndez JP, Ojeda SR ve ark. Fbxw15/Fbxo12J is a F-box protein encoding gene selectively expressed in oocytes of the mouse ovary. *Biol Reprod*. 2008;**78**:714-725.

406. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein 15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet.* 2004;**75**:106–111.
407. Wang Q, Lu J, Zhang S, Wang S, Wang W, Wang B ve ark. Wnt6 is essential for stromal cell proliferation during decidualization in mice. *Biol Reprod.* 2013;**88**(1):5,1-9.
408. Vlismas A, Bletsas R, Mavrogianni D, Mamali G, Pergamali M, Dinopoulou V ve ark. Microarray analyses reveal marked differences in growth factor and receptor expression between 8-cell human embryos and pluripotent stem cells. *Stem Cell Dev.* 2016;**25**(2):160-177.
409. Lebedev IN. Genomic imprinting and human reproduction. *Epigenet Epigenom.* 2014. <http://dx.doi.org/10.5772/57241>.
410. Tycko B, Morison IM. Physiological functions of imprinted genes. *J Cell Physiol.* 2002;**192**(3):245-258.
411. Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Leung Y, Arfuso F, Dharmarajan A. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle-A changing view. *Front Endoc.* 2018;**9**:1-10.
412. Devoto L, Christenson LK, McAllister JM, Makrigiannakis A, Strauss JF. 3rd Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosa-lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression. *Mol Hum Reprod.* 1999;**5**:1003-1010.
413. Kamada S, Kubota T, Taguchi M, Ho WR, Sakamoto S, Aso T. Effects of insulin-like growth factor-II on proliferation and differentiation of ovarian granulosa cells. *Horm Res.* 1992;**37**:141-149.
414. Bøtkjær JA, Pors SE, Petersen TS, Kristensen SG, Jeppesen JV, Oxvig C ve ark. Transcription profile of the insulin-like growth factor signaling pathway during human ovarian follicular development. *J Assist Reprod Genet.* 2019;**36**:889-903.
415. d'Hauterive SP, Charlet-Renard C, Berndt S, Dubois M, Munaut C, Goffin F ve ark. Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-

endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. *Hum Reprod.* 2004;**19**:2633-2643.

416. Doria S, Sousa M, Fernandes S, Ramalho C, Brandão O, Matias A ve ark. Gene expression pattern of IGF2, PHLDA2, PEG10 and CDKN1C imprinted genes in spontaneous miscarriages or fetal death. *Epigenetics.* 2010;**5**(5):444-450.

417. Guo L, Choufani S, Ferreira J, Smith A, Chitayat D, Shuman C ve ark. Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. *Dev Biol.* 2008;**320**:79-91.

418. Wang TH, Chang CL, Wu HM, Chiu YM, Chen CK, Wang HS. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil Steril.* 2006;**86**:1392-1401.

419. Baumgarten SC, Convissar SM, Zamah AM, Fierro MA, Winston NJ, Scoccia B ve ark. FSH regulates IGF-2 expression in human granulosa cells in an AKT-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;**100**(8):E1046-E1055.

420. Szekeres-Bartho J, Sucurovic S, Mulac-Jericevic B. The role of extracellular vesicles and PIBF1 in embryo-maternal immune-interactions. *Fron Immunol.* 2018;**9**:2890.

421. Szekeres-Bartho J, Szekeres GY, Debre P, Autran B, Chaouat G. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 1990;**125**:273-283.

422. Polgár B, Nagy E, Mikó E, Varga P, Szekeres-Bartho J. Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod.* 2004;**71**:1699-1705.

423. Chiu L, Nishimura M, Ishii Y, Nieda M, Maeshima M, Takedani Y ve ark. Enhancement of the expression of progesterone receptor on progesterone -treated lymphocytes after immunotherapy in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 1996;**35**:552-557.

424. Kim K, Rhee K. The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *J Cell Sci.* 2011;**124**:338-347.

425. Huang Z, Du G, Huang X, Han L, Han X, Xu B ve ark. The enhancer RNA Inc-SLC4A1-1 epigenetically regulates unexplained recurrent pregnancy loss (URPL) by activating CXCL8 and NF-kB pathway. *EBio Medicine*. 2018;**38**:162-170.
426. Smith JB, Cowchock FS, Hankinson B, Iftekhar A. Association of HLA-DR5 with recurrent spontaneous abortion in women treated with paternal leukocytes. Possible subclinical autoimmune disease. *Arthritis Rheum*. 1989;**32(12)**:1572-1576.
427. Sbracia M, Mastrone M, Scarpellini F, Grasso JA. Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion couples and on their reproductive performances. *Am J Reprod Immunol*. 1996;**35(2)**:85-92.
428. Rudd NL, Teshima IE, Martin RH, Siskin JE, Weksberg R. a dominantly inherited cytogenetic anomaly: a possible cell division mutant. *Hum Genet*. 1983;**65**:117-121.
429. Gabarron J, Jimenez A, Glover G. Premature centromere division dominantly inherited in a subfertile family. *Cytogenet Cell Genet*. 1986;**43**:69-71.
430. Bajnoczky K, Gardo S. Premature anaphase in a couple with recurrent miscarriages. *Hum Genet*. 1993;**92**:388-390.
431. Jeganathan K, Malureanu L, Baker DJ, Abraham SC, van Deursen JM. Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J Cell Biol*. 2007;**179**:255-267.
432. Tian Q, Newell AEH, Wang Y, Olson SB, Fedorov LM. Complex cytogenetic analysis of early lethality mouse embryos. *Chrom Res*. 2011;**19**:567-574.
433. Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Thornhill AR, Walker DL, Malter H ve ark. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum Reprod*. 2005;**20(5)**:1339-1348.
434. Gasca S, Pellestor F, Assou S, Loup V, Anahory T, Dechaud H, de Vos J ve ark. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online*. 2007;**14(2)**:175-183.
435. Tang Z, Bharadwaj R, Li B, Yu H. Mad2-dependent inhibition of APC Cdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell*. 2001;**1(2)**:227-237.

436. Fang G. Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell*. 2002;**13(3)**:755-766.
437. Assou S, Anahory T, Pantesco V, le Carrouer T, Pellestor F, Klein B ve ark. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod*. 2006;**21(7)**:1705-1719.
438. Akram S, Yang F, Li J, Adams G, Liu Y, Zhuang X ve ark. LRIF1 Interacts With HP1 α to Coordinate Accurate Chromosome Segregation During Mitosis. *J Mol Cell Biol*. 2018;**10(6)**:527-538.
439. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J*. 1992;**11**:961-971.
440. Murphy M, Stinnakre MG, Senamaud-Beaufort C, Winston NJ, Sweeney C, Kubelka M ve ark. Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet*. 1997;**15**:83-86.
441. Li X, Ma XL, Tian FJ, Wu F, Zhang J, Zeng WH ve ark. Downregulation of CCNA2 disturbs trophoblast migration, proliferation, and apoptosis during the pathogenesis of recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2019;**82**:e13144.
442. Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Beanrd L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrial. *Biol Reprod*. 2010;**82**:791-801.
443. Kong S, Han X, Cui T, Zhou C, Jiang Y, Zhang H ve ark. MCM2 mediates progesterone-induced endometrial stromal cell proliferation and differentiation in mice. *Endocrine*. 2016. DOI:10.1007/s12020-016-0894-9.
444. Chuang CH, Wallace MD, Abratte C, Southard T, Schimenti JC. Incremental genetic perturbations to MCM2-7 expression and subcellular distribution reveal exquisite sensitivity of mice to DNA replication stress. *PloS Genet*. 2010;**6**:e1001110.
445. McNairn AJ, Chuang CH, Bloom JC, Wallace MD, Schimenti JC. Female-biased embryonic death from genomic-instability induced inflammation. *Nature*. 2019;**567(7746)**:105-108.

446. Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ ve ark. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*. 2017;**548**:461-465.
447. Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H ve ark. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med*. 2013;**34**:939-980.
448. Zhang S, Kong S, Lu J, Wang Q, Chen Y, Wang W ve ark. Deciphering the molecular basis of uterine receptivity. *Mol Reprod Dev*. 2013;**80**:8-21.
449. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev*. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>.
450. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2009;**122**:3589-3594.
451. Sun X, Su Y, He Y, Zhang J, Liu W, Zhang H ve ark. New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. *Cell Cycle*. 2015;**14**:721-731.
452. Cheng Y, Kim J, Li XX, Hsueh AJ. Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: synergistic effects of AKT stimulators. *PLoS One*. 2015;**10**:e0117769.
453. Adhikari D, Liu K. mTOR signaling in the control of activation of primordial follicles. *Cell Cycle*. 2010;**9**:1673-1674.
454. Archinti M, Lacasa C, Teixidó-Travesa N, Lüders J. SPICE: a previously uncharacterized protein required for centriole duplication and mitotic chromosome congression. *J Cell Sci*. 2010;**123**(18):3039-3046.
455. Hutchins JRA, Toyoda Y, Hegemann B, Poser I, Hériché JK, Sykora MM ve ark. Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science*. 2010;**328**:593-599.
456. Kuntel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*. 2005;**74**:681-710.

457. Kolas NK, Cohen PE. Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination. *Cytogenet Genome Res.* 2004;**107**:216-231.
458. Surtees JA, Argueso JL, Alani E. Mismatch repair proteins; key regulators of genetic recombination. *Cytogenet Genome Res.* 2004;**107**:146-159.
459. Page SL, Hawley RS. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science.* 2003;**301**:785-789.
460. Tanaka K, Miyamoto N, Dhouguchi-Miyata J, Ikeda JE. HFM1, the human homologue of yeast Mer3, encodes a putative DNA helicase expressed specifically in germ-line cells. *DNA Seq.* 2006;**17**:242-246.
461. Guiradelli MF, Eyster C, Wilkerson JL, Dresser ME, Pezza RJ. Mouse HFM1/Mer3 is required for crossover formation and complete synapsis of homologous chromosomes during meiosis. *PloS Genet.* 2013;**9**:e1003383.
462. Zhe J, Chen S, Chen X, Liu Y, Li Y, Zhou X ve ark. A novel heterozygous splice-altering mutation in HFM1 may be a cause of premature ovarian insufficiency. *J Ovar Res.* 2019;**12**:61(1-9).
463. Park J, Long DT, Lee KY, Abbas T, Shibata E, Negishi M ve ark. The MCM8-MCM9 complex promotes RAD51 recruitment at DNA damage sites to facilitate homologous recombination. *Mol Cell Biol.* 2013;**33**(8):1632-1644.
464. Lutzmann M, Grey C, Traver S, Ganier O, Maya-Mendoza A, Ranisavljevic N ve ark. MCM8- and MCM9- deficient mice reveal gametogenesis defects and genome instability due to impaired homologous recombination. *Mol Cell.* 2012;**47**(4):523-534.
465. Murray A, Bennett CE, Perry JRB, Weedon MN, Jacobs PA, Morris DH ve ark. Common genetic variants are significant risk factors for early menopause: results from the Breakthrough Generations Study. *Hum Mol Genet.* 2011;**20**:186-192.
466. Bouali N, Francou B, Bouligand J, Imanci D, Dimassi S ve ark. New MCM8 mutation associated with premature ovarian insufficiency and chromosomal instability in a highly consanguineous Tunisian family. *Fertil Steril.* 2017;**108**(4):694-702.

467. Milano CR, Holloway JK, Zhang Y, Jin B, Smith C, Bergman A ve ark. Mutation of the ATPase domain of MutS Homolog-5 (MSH5) reveals a requirement for a functional MutSy complex for all crossovers in mammalian meiosis. *Genes Genomes Genetics*. 2019;**9**:1839-1850.
468. Kneitz B, Cohen PE, Avdievich E, Zhu L, Kane MF, Hou Jr H ve ark. MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev*. 2000;**14**:1085-1097.
469. Guo T, Zhao S, Zhao S, Chen M, Li G, Jiao X ve ark. Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet*. 2017;**26**(8):1452-1457.
470. Wei K, Clark AB, Wong E, Kane MF, Mazur DJ, Parris T ve ark. Inactivation of exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Dev*. 2003;**17**:603-614.
471. Tsubouchi H, Ogawa H. Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2000;**11**:2221-2233.
472. Khazanehdari KA, Borts RH. EXO1 and MSH4 differentially affect crossing-over and segregation. *Chromosoma*. 2000;**109**:94-102.
473. Kan R, Sun X, Kolas NK, Avdievich E, Kneitz B, Edelmann W ve ark. Comparative analysis of meiotic progression in female mice bearing mutations in genes of the DNA mismatch repair pathway. *Biol Reprod*. 2008;**78**:462-471.
474. Svejstrup JQ. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;**3**:21-29.
475. Qin Y, Guo T, Li G, Tang TS, Zhao S, Jiao X ve ark. CSB-PGBD3 mutations cause premature ovarian failure. *PLoS Genet*. 2015;**11**(7):1-14.
476. Lombaerts M, Tijsterman M, Verhage RA, Brouwer J. *Saccharomyces cerevisiae* mms19 mutants are deficient in transcription-coupled and global nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res*. 1997;**25**(20):3974-3979.
477. Stehling O, Vashisht AA, Mascarenhas J, Jonsson ZO, Sharma T, Netz DJ ve ark. MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science*. 2012;**337**(6091):195-199.

478. Wu R, Tan Q, Niu K, Zhu Y, Wei D, Zhao Y ve ark. MMS19 localizes to mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative damage. *Biochem Cell Biol.* 2018;**96**:44-49.
479. Spektor A, Tsang WY, Khoo D, Dynlacht BD. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell.* 2007;**130**:678–690.
480. Tsang WY, Bossard C, Khanna H, Peränen J, Swaroop A, Malhotra V ve ark. CP110 suppresses primary cilia formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease. *Dev Cell.* 2008;**15**:187–197.
481. Santos N, Reiter JF. Building it up and taking it down: The regulation of vertebrate ciliogenesis. *Dev Dyn.* 2008;**237**:1972–1981.
482. Lyson RA, Sarıdoğan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update.* 2006;**12**:363-372.
483. Bylander A, Lind K, Goksör M, Billig H, Larsson DJ. The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;**11**:33.
484. Dafinger C, Liebau MC, Elsayed SM, Hellenbroich Y, Boltshauser E, Korenke GC ve ark. Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. *J Clin Invest.* 2011;**121**:2662-2667.
485. Putoux A, Thomas S, Coene KL, Davis EE, Alanay Y, Ogur G ve ark. KIF7 mutations cause fetal hydroletharus and acrocallosal syndromes. *Nat Genet.* 2011;**43**:601-606.
486. Liem KF, He M, Ocbina PJ, Anderson KV. Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;**106**:13377-13382.
487. Coene KL, Mans DA, Boldt K, Gloeckner CJ, van Reeuwijk J, Bolat E ve ark. The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase. *Hum Mol Genet.* 2011;**20(18)**:3592-3605.
488. Shaheen R, Szymanska K, Basu B, Patel N, Ewida N, Fageih E ve ark. Characterizing the morbid genome of ciliopathies. *Genome Biol.* 2016;**17**:242.

489. Davis EE, Zhang Q, Liu Q, Diplas BH, Davey LM, Hartley J ve ark. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the the ciliopathy spectrum. *Nat Genet.* 2011;**43**:189-196.
490. Stottmann R.W., Tran P.V., Turbe-Doan A., Beier D.R. Ttc21b is required to restrict sonic hedgehog activity in the developing mouse forebrain. *Dev Biol.* 2009;**335**:166-178.
491. Tran PV, Haycraft CJ, Besschetnova TY, Turbe-Doan A, Stottmann RW, Herron BJ ve ark. THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat Genet.* 2008;**40**:403-410.
492. Zhang R, Chen S, Han P, Chen F, Kuang S, Meng Z ve ark. Whole exome sequencing identified a homozygous novel variant in CEP290 gene causes Meckel syndrome. *J Cell Mol Med.* 2019;**00**:1-11.
493. Hutchins BI, Kotan LD, Taylor-Burds C, Ozkan Y, Cheng PJ, Gurbuz F ve ark. CCDC141 mutation identified in anosmic hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann Syndrome) alters GnRH neuronal migration. *Endocrinol.* 2016;**157**(5):1956-1966.
494. Schmidts M, Vodopiutz J, Christou-Savina S, Cortés CR, McInerney-Leo AM ve ark. Mutations in the gene encoding IFT dynein complex component WDR34 cause Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2013;**93**:932-944.
495. Thiel C, Kessler K, Giessl A, Dimmler A, Shalev SA, von der Haar S ve ark. NEK1 mutations cause short-rib polydactyly syndrome type Majewski. *Am J Hum Genet.* 2011;**88**:106-114.
496. Badiner N, Taylor SP, Forlenza K, Lachman RS, University of Washington Center for Mendelian Genomics, Bamshad M ve ark. Mutations in DYNC2H1, the cytoplasmic dynein 2, heavy chain 1 motor protein gene, cause short-rib polydactyly type I, Saldino-Noonan type. *Clin Genet.* 2017;**92**:158-165.
497. Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature.* 2002;**418**:979-983.

498. Matera I, Watkins-Chow DE, Loftus SK, Hou L, Incao A, Silver DL ve ark. A sensitized mutagenesis screen identifies Gli3 as a modifier of Sox10 neurocristopathy. *Hum Mol Genet.* 2008;**17**:2118-2131.
499. Siavrienė E, Mikštienė V, Radzevičius D, Maldžienė Ž, Rančelis T, Petraitytė G ve ark. Novel GLI3 variant causes Greig cephalopolysyndactyly syndrome in three generations of a Lithuanian family. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;**7(9)**:e878.
500. Zhang J, Wu M, Wang S, Shah JV, Wilson PD, Zhou J. Polycystic kidney disease protein fibrocystin localizes to the mitotic spindle and regulates spindle bipolarity. *Hum Mol Genet.* 2010;**19(17)**:3306-3319.
501. Tissir F, De-Backer O, Goffinet AM, Lambert de Rouvroit C. Developmental expression profiles of Celsr (Flamingo) genes in the mouse. *Mechan Dev.* 2002;**112**:157-160.
502. Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet.* 2003;**4**:784-793.
503. Torban E, Patenaude AM, Leclerc S, Rakowiecki S, Gauthier S, Andelfinger G ve ark. Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;**105**:3449-3454.
504. Vetrini F, D'Alessandro LC, Akdemir ZC, Braxton A, Azamian MS, Eldomery MK ve ark. Bi-allelic mutations in PKD1L1 are associated with laterality defects in humans. *Am J Hum Genet.* 2016;**99**:886-893.
505. Delevoye C, Miserey-Lenkei S, Montagnac G, Gilles-Marsens F, Paul-Gilloteaux P, Giordano F ve ark. Recycling endosome tubule morphogenesis from sorting endosomes requires the kinesin moto KIF13A. *Cell Rep.* 2014;**6(3)**:445-454.
506. Denu RA, Sass MM, Johnson JM, Potts GK, Choudhary A, Coon JJ ve ark. Polo-like kinase 4 maintains centriolar satellite integrity by phosphorylation of centrosomal protein 131 (CEP131). *J Biol Chem.* 2019;**294(16)**:6531-6549.
507. Staples CJ, Myers KN, Beveridge RD, Patil AA, Lee AJ, Swanton C ve ark. The centriolar satellite protein Cep131 is important for genome stability. *J Cell Sci.* 2012;**125(Pt 20)**:4770-4779.

508. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Current evaluation of amenorrhea. *Fertil Steril*. 2008;**90**:5219-5225.
509. Maczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Warenik-Szymankiewicz A, Genazzani AR. Functional hypothalamic amenorrhea: current view on neuroendocrine aberrations. *Gynecol Endocrinol*. 2008;**24**:4-11.
510. Tizzano EF, Silver MM, Chitayat D, Benichou JC, Buchwald M. Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissues. Clues for the infertility in patients with cystic fibrosis. *Am J Pathol*. 1994;**144**:906-914.
511. Hampi R, Snajderova M, Mardesic T. Antimüllerian hormone (AMH) not only a marker for prediction of ovarian reserve. *Physiol Res*. 2011;**60**:217-223.
512. Schram CA, Stephenson AL, Hannam TG, Tullis E. Cystic fibrosis (CF) and ovarian reserve: a cross-sectional study examining serum anti-müllerian hormone (AMH) in young women. *J Cyst Fibros*. 2015;**14**:398-402.
513. Xita N, Tsatsoulis A, Chatzikiyiakidou A, Georgiou I. Association of the (TAAAA)_n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;**88**(12):5976-5980.
514. Asanidze E, Kristesashvili J, Andguladze S. Correlation between levels of homocysteine, anti-müllerian hormone and insulin resistance in PCOS patients with recurrent miscarriage. *Georgian Med News*. 2019;**290**:25-29.
515. Urbanek M, Sam S, Legro RS, Dunaif A. Identification of a Polycystic Ovary Syndrome Susceptibility Variant in Fibrillin-3 and Association with a Metabolic Phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;**92**(11):4191-4198.
516. Hatzirodos N, Bayne RA, Irving-Rodgers HF, Hummitzsch K, Sabatier L, Lee S ve ark. Linkage of regulators of TGF- β activity in the fetal ovary to polycystic ovary syndrome. *FASEB J*. 2011;**25**(7):2256-2265.
517. Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Breen J, Perry VEA, Anderson RA ve ark. Transcript abundance of stromal and thecal cell related genes during bovine ovarian development. *PLoS One*. 2019;**14**(3):e0213575.

518. Beall S, Brenner C, Segars J. Oocyte maturation failure: a syndrome of bad eggs. *Fertil Steril*. 2010;**94**:2507-2513.
519. Breuss M, Keays DA. Microtubules and neurodevelopmental disease: the movers and the makers. İçinde Nguyen L, Hippenmeyer S, editörler. *Cellular and molecular control of neuronal migration*. Springer Science Business Media. Dordrecht: 2014. pp.75-96.
520. Bahi-Buisson N, Poirier K, Fourniol F, Saillour Y, Valence S, Lebrun N ve ark. The wide spectrum of tubulinopathies: what are they key features for the diagnosis? *Brain*. 2014;**137**:1676-1700.
521. Feng R, Yan Z, Li B, Yu M, Sang Q, Tian G ve ark. Mutations in TUBB8 cause human oocyte meiotic arrest. *New Eng J Med*. 2016;**374**:223-232.
522. Huang L, Tong X, Luo L, Zheng S, Jin R, Fu Y ve ark. Mutation analysis of the TUBB8 gene in nine infertile women with oocyte maturation arrest. *Reprod Biomed Online*. 2017;**35**:305-310.
523. Nakamura Y, Tanaka KJ, Miyauchi M, Huang L, Tsujimoto M, Matsumoto K. Translational repression by the oocyte-specific protein P100 in *Xenopus*. *Dev Biol*. 2010;**344**:272-283.
524. Maddirevula S, Coskun S, Alhassan S, Elnour A, Alsaif HS, Ibrahim N ve ark. Female infertility caused by mutations in the oocyte-specific translational repressor PATL2. *Am J Hum Genet*. 2017;**101**:603-608.
525. Chen B, Zhang Z, Sun X, Kuang Y, Mao X, Wang X ve ark. Biallelic mutations in PATL2 cause female infertility characterized by oocyte maturation arrest. *Am J Hum Genet*. 2017;**101**:609-615.
526. Huang L, Tong X, Wang F, Luo L, Jin R, Fu Y ve ark. Novel mutations in PATL2 cause female infertility with oocyte germinal vesicle arrest. *Hum Reprod*. 2018;**33**(6):1183-1190.
527. Hugges DC, Barratt CLR. Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida. *Biochim Biophys Acta*. 1999;**1447**:303-306.

528. Huang HL, Lv C, Zhao YC, Li W, He XM, Li P ve ark. Mutant ZP1 in familial infertility. *New Eng J Med*. 2014;**370**:1220-1226.
529. Zhou Z, Ni C, Wu L, Chen B, Xu Y, Zhang Z ve ark. Novel mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation. *Hum Genet*. 2019;**138**:327-337.
530. Gosden RG, Faddy MJ. Ovarian aging, follicular depletion, and steroidogenesis. *Exp Gerontol*. 1994;**29**(3-4):265-274.
531. Gosden RG, Faddy MJ. Biological bases of premature ovarian failure. *Reprod Fertil Dev*. 1998;**10**(1):73-78.
532. Conway GS. Premature ovarian failure. *Br Med Bull*. 2000;**56**(3):643-649.
533. Lenton EA, Sexton L, Lee S, Cooke ID. Progressive changes in LH and FSH: FSH ratio in women throughout reproductive life. *Maturitas*. 1998;**10**:35-43.
534. Committee on Gynecologic Practice. Committee opinion no. 618. Ovarian reserve testing. *Obstet Gynecol*. 2015;**125**:268-273.
535. Atasever M, Soyman Z, Demirel E, Gençdal S, Kelekçi S. Diminished ovarian reserve: is it a neglected cause for assessment recurrent miscarriage. A cohort study. *Fertil Steril*. 2016:0015-0282.
536. Pils S, Promberger R, Springer S, Joura E, Ott J. Decreased ovarian reserve predicts inexplicability of recurrent miscarriage? A retrospective analysis. *PloS One*. **11**(9):e0161606.
537. Daan NM, Hoek A, Corpeleijn E, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, Fauser BC ve ark. Reproductive characteristics of women diagnosed with premature ovarian insufficiency. *Reprod Biomed Online*. 2016;**32**:225-232.
538. Zhe J, Chen S, Chen X, Liu Y, Li Y, Zhou X ve ark. A novel heterozygous splice-altering mutation in HFM1 may be a cause of premature ovarian insufficiency. *J Ovar Res*. 2019;**12**:61(1-9).
539. Pu D, Wang C, Cao J, Shen Y, Jiang H, Liu J ve ark. Association analysis between HFM1 variation and primary ovarian insufficiency in Chinese women. *Clin Genet*. 2016;**89**(5):597-602.

540. Zhao M, Feng F, Chu C, Yue W, Li L. A novel EIF4ENIF1 mutation associated with a diminished ovarian reserve and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing. *J Ovar Res.* 2019;**12**:119.
541. Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update.* 2015;**21**(6):787-808.
542. Villaescusa JC, Allard P, Carminati E, Kontogiannia M, Talarico D, Blasi F et al. Clast4, the murine homologue of human eIF4E-transporter, is highly expressed in developing oocytes and post-translationally modified at meiotic maturation. *Gene.* 2006;**367**:101-109.
543. Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR, Sonenberg N. A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J Cell Biol.* 2005;**170**:913-924.
544. Sullivan SD, Welt C, Sherman S. FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med.* 2011;**29**:299-307.
545. Renaux A, Papadimitriou S, Versbraegen N, Nachtegaal C, Boutry S, Nowé A et al. ORVAL: A novel platform for the prediction and exploration of disease-causing oligogenic variant combinations. *Nucleic Acids Research.* 2019;**47**(W1):W93-W98. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz437>.

FORMLAR

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
(tel: 0212 414 2000/ 32564-32327-35067-32347)

MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Proje Adı: Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Olan Çiftlerde İlişkili Tek Gen Mutasyonlarının Araştırılması

Gebeliğin 20. haftadan önce veya embriyo ağırlığı 500 gr'ın altında iken kaybedilmesi "abortus" olarak tanımlanır. Tekrarlayan gebelik kaybı ise aynı anne babanın üç veya daha fazla gebeliğinin spontan abortus ile sonlanmasıdır. Spontan abortus materyallerinde yapılan sitogenetik incelemelerde kullanılan tekniklere bağlı olarak kromozomal bir anomali sıklığı %50-70 saptanmaktadır. Oysa tekrarlayan gebelik kaybı olgularında bu oran daha düşüktür (~%35). Spontan abortus etiyolojisinde, anatomik, immünolojik, hormonal, trombofilik gen mutasyonları ve kromozomal nedenler dışlandığında olguların ~ %20 tekrarlayan gebelik kaybını açıklayacak bir neden bulunamamaktadır. Oluşan her 100 gebeliğin 20'si spontan abortus ile sonlanmakta ve bunun da %20'sinin etiyolojisi saptanamamaktadır. Bu proje kapsamında, tekrarlayan gebelik kayıplarında maternal anatomik, immünolojik, hormonal ve bilinen trombofilik gen mutasyonları ile parental kromozom anomalileri dışlanmış olgularda, gebeliğin implantasyon aşamasında sorunlara yol açabilecek ve gebeliğin sonlanmasına neden olabilecek parental genetik faktörlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Size ve ailenize yardımcı olmak amacıyla bu durumun tanısında kullanılan laboratuvar testlerini kendi laboratuvarımızda yaparak öncelikle size ve sizin gibi diğer hastalara kolaylıkla uygulanmasını sağlamak istiyoruz. Bu çalışmada sizin gibi sorunları olan bireylerden kan ve doku örnekleri alınarak bu dokularda testler yapmayı planlıyoruz.

Bu çalışmaya katılmaya davet edildiniz fakat karar vermeden önce çalışmanın riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu**'nu okuduktan sonra katılmayı kabul ediyorsanız formu imzalamanız gerekmektedir.

1. Projeye Katılım için Gerekli Kriterler;

Projeye katılım için en önemli kriter "Tekrarlayan Gebelik Kaybı" klinik tanısı konulmuş olmasıdır.

2. Yapılacak İşlemin tanımı:

Klinik değerlendirmede "Tekrarlayan Gebelik Kaybı" tanısı konulduğunda yaklaşık 2 ml kan örneği alınması gerekecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir ve gönüllü katılım esastır.

3. Örnek Alımının Olası riskleri:

Kan Örneği alımı;

Rutin testler amacıyla kan örnekleri alınırken K₃EDTA'lı mor kapaklı tüpe alınan örnek bu çalışma amacıyla kullanılacaktır. Bu işleme bağlı; (1) iğne-batması sırasında hafif bir acı duyulabilir, (2) iğne batması sonrasında çok nadiren de olsa enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler:

Yapılacak testler, sizin ve ailenizdeki diğer bireylerin gelecekte bu genetik hastalıktan etkileneneğini ortaya çıkarabilir ve bu bilgi sizde psikolojik sorun yaratabilir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar sizinle paylaşılacaktır. Fakat bu bilgiyi öğrenmeyi tamamen ret edebilirsiniz. Bu çalışma ile elde edilecek genetik bilgiler kesinlikle gizli kalacaktır ve başkaları ile paylaşılmayacaktır, bilginin paylaşımı sadece sizin izninizle bağlı olacaktır. Size ait kan ve doku örnekleri sadece bu çalışma için kullanılacaktır.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı sizde saptanan hastalığa neden olan genetik faktörleri öğrenmektir. Biz bu aşamada henüz yapılacak testlerin, size ve ailenize doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu çalışmalar tamamlandığında bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece hem sizlere hem de gelecekte bu tür hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizeyizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkına da sahipsiniz.

Hastanın/Katılımcının Beyanı

Sayın Dr..... tarafından..... (kurum adı, anabilim dalı adı, ünite adı vb.)’da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

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

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle oluşabilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimler ile ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; mesai saatleri içinde, Prof. Dr. Seher Başaran ve Dr. Ezgi Gizem Berkay’ı +90212 414 2000/32327-32347 nolu telefon ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’ndan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Gönüllünün Eşi Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Olan Çiftlerde Tek Gen Mutasyonlarının Araştırılması projesi kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

- Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum
- İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı

Tarih :

İmzası:

Katılımcılar:	<u>Adı Soyadı</u>	<u>Doğum tarih</u>	<u>İmza</u>
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----

*Araştırma amaçlı DNA için kan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
(tel: 0212 414 2000/ 32564-32327-35067-32347)

MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Proje Adı: Sebebi Açıklanamayan İnfertilite ile İlişkili Genlerin Araştırılması

İnfertilite, bir çiftin, düzenli, korunmasız bir yıl süreli ilişkiye rağmen doğal yollarla gebelik oluşmaması olarak tanımlanır. Yaklaşık olarak her altı çiftten birini etkileyen bu sorun sağlıklı genç çiftlerin dahi % 10-15'inde görülür. İnfertilite sorunu olan çiftlerde hormonal, anatomik, immünolojik ve kromozomal etyolojik faktörler dışlandıktan sonra herhangi bir faktör belirlenemezse durum "sebebi açıklanamayan infertilite" olarak tanımlanır. Çiftin hiç gebelik oluşturmaması "primer infertilite" olarak tanımlanır, ikiden fazla tekrarlayan spontan abortus, ölü doğum gibi spontan gebelik öyküsü olanlar da infertilite grubunda değerlendirilir. Her ovulasyonda gebelik oluşma olasılığı %20'den azdır ve gebelik oluşabilmesi için ovulasyon, fertilizasyon ve implantasyon aşamalarının sorunsuz aşılması gerekir. Bu aşamaların tümünde maternal ya da fetal genetik yapının etkin olduğu, kromozomal ya da tek gen mutasyonlarının da bu aşamaları olumsuz etkileyeceği açıktır. Bu proje kapsamında, sebebi açıklanamayan infertilite olgularında fertilitiyi etkileyen parental ve fetal tek gen mutasyonlarının yüzlerce geni eş zamanlı araştırma olanağı sağlayan yeni nesil dizileme (YND) tekniği ile araştırılması amaçlanmıştır.

Size ve ailenize yardımcı olmak amacıyla bu durumun tanısında kullanılan laboratuvar testlerini kendi laboratuvarımızda yaparak öncelikle size ve sizin gibi diğer hastalara kolaylıkla uygulanmasını sağlamak istiyoruz. Bu çalışmada sizin gibi sorunları olan bireylerden kan ve doku örnekleri alınarak bu dokularda testler yapmayı planlıyoruz.

Bu çalışmaya katılmaya davet edildiniz fakat karar vermeden önce çalışmanın riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu** okuduktan sonra katılmayı kabul ediyorsanız formu imzalamanız gerekmektedir.

1. Projeye Katılım için Gerekli Kriterler;

Projeye katılım için en önemli kriter "Sebebi Açıklanamayan İnfertilite" klinik tanısı konulmuş olmasıdır.

2. Yapılacak İşlemin tanımı:

Klinik değerlendirmede "Sebebi Açıklanamayan İnfertilite" tanısı konulduğunda yaklaşık 2 ml kan örneği alınması gerekecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir ve gönüllü katılım esastır.

3. Örnek Alımının Olası riskleri:

Kan Örneği alımı;

Rutin testler amacıyla kan örnekleri alınırken K₃EDTA'lı mor kapaklı tüpe alınan örnek bu çalışma amacıyla kullanılacaktır. Bu işleme bağlı; (1) iğne-batması sırasında hafif bir acı duyulabilir, (2) iğne batması sonrasında çok nadiren de olsa enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler:

Yapılacak testler, sizin ve ailenizdeki diğer bireylerin gelecekte bu genetik hastalıktan etkileneceğini ortaya çıkarabilir ve bu bilgi sizde psikolojik sorun yaratabilir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar sizinle paylaşılacaktır. Fakat bu bilgiyi öğrenmeyi tamamen ret edebilirsiniz. Bu çalışma ile elde edilecek genetik bilgiler kesinlikle gizli kalacaktır ve başkaları ile paylaşılmayacaktır, bilginin paylaşımı sadece sizin izninizle bağlı olacaktır. Size ait kan ve doku örnekleri sadece bu çalışmaya için kullanılacaktır.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı sizdesaptanan hastalığa neden olan genetik faktörleri öğrenmektir. Biz bu aşamada henüz yapılacak testlerin, size ve ailenize doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu çalışmalar tamamlandığında bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece hem sizlere hem de gelecekte bu tür hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizeyizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkına da sahipsiniz.

Hastanın/Katılımcının Beyanı

Sayın Dr..... tarafından..... (anabilim dalı adı, ünite adı vb.)'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

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

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle oluşabilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişiminsanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimler ile ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; mesai saatleri içinde, Prof. Dr. Seher Başaran ve Dr. Ezgi Gizem Berkay'ı +902124142000/32327-32347 nolu telefon ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Gönüllünün Eşi Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Sebebi Açıklanamayan İnfertilite ile İlişkili Genlerin Araştırılması projesi kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

- Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum
- İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı

Tarih :

İmzası:

Katılımcıların:	<u>Adı Soyadı</u>	<u>Doğum tarih</u>	<u>İmza</u>
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----

*Araştırma amaçlı DNA içinkan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Olan Çiftlerde İlişkili Tek Gen Mutasyonlarının
Araştırılması Projesi
Hasta Takip Formu

T.C.Kimlik No:
Olgu No:

Tarih:

Ad-Soyad:
D.T./ yaşı:
Cinsiyet:
Adres bilgileri:
Tel:

Protokol No:
DNA No:

Özgeçmiş:

Akrabalık:

Soygeçmiş:

Öykü:

Aile ağacı:

Fizik muayene:

Tetkikler:

Karyotip:

Moleküler analizler:

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 44
Konu: Prof. Dr. Seher BAŞARAN hk.

Tarih : 16.01.2018

Sayın Prof. Dr. Seher BAŞARAN
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgi : Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 22/12/2017 gün ve 481686 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Ezgi Gizem BERKAY' ın yürüteceği 2018/14 dosya numaralı "Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Olan Çiftlerde İlişkili Tek Gen Mutasyonlarının Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/01/2018 tarih ve 01 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 249

Tarih : 19.02.2018

Konu : Prof. Dr. Seher BAŞARAN hk.

**Sayın Prof. Dr. Seher BAŞARAN
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**

İlgi : Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 22/01/2018 gün ve 29421 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2018/204 dosya numaralı "Sebebi Açıklanamayan İnfertilite İle İlişkili Genlerin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 09/02/2018 gün ve 03 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Ekl: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI OLAN ÇİFTLERDE İLİŞKİLİ TEK GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

% 2	% 1	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
2	Submitted to Istanbul Medipol Āniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
3	Submitted to Erciyes Āniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Paula Quintero-Ronderos, Paul Laissue. "Genetic Variants Contributing to Early Recurrent Pregnancy Loss Etiology Identified by Sequencing Approaches", Reproductive Sciences, 2020 Yayın	<% 1
6	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	link.springer.com İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ezgi Gizem	Soyadı	Berkay
Doğ.Yeri	Lüleburgaz	Doğ.Tar.	05.05.1987
Email	ezgiberkay5@gmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	-	-
Lisans	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi	2011
Lisans	Anadolu Üniversitesi AÖF Tarih	devam ediyor
Lise	Lüleburgaz Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Hekim	Beşiktaş İlçe Sağlık Müdürlüğü	2011-2014
2.	Uzmanlık Öğrencisi	Haydarpaşa Numune EAH	2014-2015
3.	İşyeri Hekimi	YİSGÜM	2016-2019

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	81,25 (2010)	YDS (2015): 77,5 YÖKDİL (2019): 82,5
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf	-	
İspanyolca	Zayıf	Zayıf	Zayıf	-	
Latince	Zayıf	-	-		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2015)	81,6	79,9	67,6

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi
Unix	Orta
Photoshop	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Sertifikalar:

- Sağlık Hukuku
- İşyeri Hekimliği
- SARAT Projesi Türkiye'nin Arkeolojik Varlıklarının Korunması
- Eğiticinin Eğitimi

Ulusal Poster Bildirimleri:

-E.G. BERKAY, F. TÜRKMEN, Ö.SADİOĞLU ÇAĞDAŞ, M. GÜNEŞ, P.Z. DAVARCI, İ.B. GÜZELCE, G. YALÇIN, S. BAŞ, Z.G. KILIÇOĞLU. Sol Ventrikülde Trombüsü Olan İskemik Kardiyomiyopatili Bir Olguda Akut Renal Enfarktüs, XVII. Ulusal Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Kongresi, 2015, Antalya.

Uluslararası Poster Bildirimleri:

- **Ezgi G. Berkay**, Birsan Karaman, Guven Toksoy, Bilge Ozsait Selcuk, Zehra O. Uyguner, Seher Basaran. A case report of a rare nonsense ZP1 variant in a patient with oocyte maturation defect (P01.049.A). ESHG 2020.2 Live in Your Living Room. Virtual Conference. June 6-9, 2020.

Ulusal Derlemeler:

-E.G. Berkay, C.V. Şoroğlu, B.Vural. Hastalıklar ve Antik DNA: Dün ve Bugün, SABİAD, 2019;2(1):44-50.

-Ezgi Gizem Berkay, Seher Başaran. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Etiyolojinin Açıklanmasına Yönelik Yeni Yaklaşımlar. J Ist Faculty Med. Published online May 15, 2020. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0008.

Ulusal Sözlü Sunum:

- **Ezgi Gizem Berkay**, Leyla Elkanova, Tuğba Kalaycı, Volkan Karaman, Nilay Güneş, Güven Toksoy, Umut Altunoğlu, Ercan Mıhçı, Elifcan Taşdelen, Zuhul Bayramoğlu, Dilek Uludağ Alkaya, Banu Nur, Kıvanç Cefle, Beyhan Tüysüz, Z. Oya Uyguner. Novel RUNX2 varyantlarının moleküler tahmin araçları ile fonksiyonel etkisinin tespit edilmesi. 1. Uluslararası Katılımlı Dermatogenetik Sempozyumu, 2020, Bursa-Türkiye.

Uluslararası Sözlü Sunum:

-Ezgi Gizem Berkay, Leyla Elkanova, Tuğba Kalaycı, Volkan Karaman, Nilay Güneş, Güven Toksoy, Umut Altunoğlu, Ercan Mıhçı, Elifcan Taşdelen, Zuhul Bayramoğlu, Dilek Uludağ Alkaya, Banu Nur, Kıvanç Cefle, Şükrü Öztürk, Şükrü Palandüz, Beyhan Tüysüz, Zehra Oya Uyguner. Spectrum of Skeletal Abnormalities and Pathogenic RUNX2 Variants in 50 Cleidocranial Patients from Turkey. Balkan Congress of Human Genetics, 2019, Edirne-Turkey.

Uluslararası Yayınlarda Yer Alan Makaleler:

-Asmar Aghayeva, Hande Turan, Guven Toksoy, Aydılek Dagdeviren Cakir, **Ezgi Berkay**, Nilay Gunes, Olcay Evliyaoglu, Zehra Oya Uyguner, Munis Dunder, Beyhan Tuysuz, Oya Ercan. Clinical Phenotype and Genotype Association in Patients with 21-hydroxylase Deficiency. Horm Res Paediatr. 2019;91(suppl 1):361-362.

-**Ezgi Gizem BERKAY**, Leyla ELKANNOVA, Tuğba KALAYCI, Volkan KARAMAN, Nilay GÜNEŞ, Güven TOKSOY, Umut ALTUNOĞLU, Ercan MIHÇI, Elifcan TAŞDELEN, Zuhul BAYRAMOĞLU, Dilek Uludağ ALKAYA, Banu NUR, Kıvanç CEFLE, Beyhan TÜYSÜZ, Z. Oya UYGUNER. Determination of Functional Effect of Novel Runx2 Variants by Molecular Prediction Tools. Gazi Medical Journal. Vol 31 No 2 (2020):P34.

- Güven Toksoy, Dilek Uludağ Alkaya, Gülelendam Bagirova, Şahin Avcı, Aghariza Agayev, Nilay Güneş, Umut Altunoğlu, Yasemin Alanay, Hülya Kayserili, Seher Başaran, **Ezgi Gizem Berkay**, Birsan Karaman, Tiraje Tülin Celkan, Hilmi Apak, Beyhan Tüysüz, Z. Oya Uyguner. Clinical and Molecular Characterization of Fanconi Anemia Patients in Turkey. Molecular Syndromology. *Yayın aşamasında*

- **Ezgi Gizem Berkay**, Leyla Elkanova, Tuğba Kalaycı, Dilek Uludağ Alkaya, Umut Altunoğlu, Kıvanç Cefle, Ercan Mihçı, Banu Nur, Elifcan Taşdelen, Zuhul Bayramoğlu, Volkan Karaman, Güven Toksoy, Nilay Güneş, Şükrü Öztürk, Şükrü Palandüz, Hülya Kayserili, Beyhan Tüysüz, Z. Oya Uyguner. RUNX2-Related Skeletal Findings: Possible link to human ancestral genome. *Yayın aşamasında*

Yer Aldığı Projeler:

- Sebebi Açıklanamayan İnfertilite İlişkili Genlerin Araştırılması – İÜ Normal Araştırma Projesi – Proje No: TSA-2018-32135 – Yardımcı araştırmacı

- Osteogenezis İmperfekta hastalarında yeni nesil dizileme teknolojisi ile ilişkili genlerin taranması ve bilinmeyen genlerin araştırılması – Tübitak 1001 – Proje No: 217S378 - Bursiyer

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Tarih, Arkeoloji, Antropoloji, Müzik