

FATEMEH AZHARİ ZARNAGH

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019



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

(DOKTORA TEZİ)

**TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞINDA,
DOKU VE DOLAŞIMDAKİ MİKRORNA'LARIN ETKİSİ**

FATEMEH AZHARİ ZARNAGH

**DANIŞMAN
PROF. DR. SADRETTİN PENÇE**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

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

(DOKTORA TEZİ)

**TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞINDA,
DOKU VE DOLAŞIMDAKİ MİKRORNA'LARIN ETKİSİ**

FATEMEH AZHARİ ZARNAGH

**II. DANIŞMAN
DOÇ. DR. TUBA GÜNEL**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

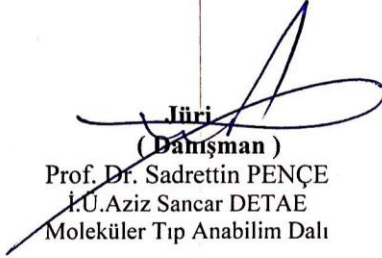
İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi **Fatemeh AZHARİ ZARNGH** tarafından **Prof. Dr. Sadrettin PENÇE**'nin danışmanlığında hazırlanan **"Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığında, Doku ve Dolaşımdaki MikroRNA'ların Etkisi"** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 20/06/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı


Jüri
(Danışman)

Prof. Dr. Sadrettin PENÇE
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı


Jüri

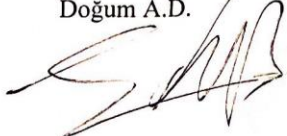
Prof. Dr. H. Arzu ERGEN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Murat APİ
İst. Zeynep Kamil Hast. Kadın ve
Çocuk Hast. A.D.

**Jüri**

Doç. Dr. Ercan BAŞTU
Acıbadem Üni. Kadın Hast. ve
Doğum A.D.



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.

Fatemeh Azhari Zarnagh



İTHAF

Aileme ve Eşime ithaf ediyorum



TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (Aziz Sancar DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, tezim süresince yardım ve desteklerini için İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sadrettin PENÇE'ye,

Doktora eğitimim süresince II. danışmanlığımı üstlenen, tezim süresince değerli bilgilerini bizlerle payşalaşan, tezimin oluşmasında büyük katkıları olan ve eğitimim süresince bilgi, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım, hiçbir zaman destek ve imkanlarını esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Tuba GÜNEL'e

Tez çalışmam süresince beni bu araştırmaya yönlendiren, bilimsel yardımları ve destekleri için ve bilgiye ulaşmamda bana rehber olan ve en zor günlerimde hep yanımda olan Eşim Dr. Mohammad Kazem HOSSEİNİ 'e

Tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim görevli olan Uzman Dr. Burçin KARAMUSTAFAOĞLU BALCI ve Acıbadem Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı görevli olan Doç.Dr.Ercan BAŞTU'e

İstanbul Üniversitesi Genetik Hastalıklar Moleküler Analiz Biriminin laboratuvarında aynı çalışma ortamını paylaştığım tüm ekipin'e

Bana her koşulda destek veren ve bugünlere gelmemde büyük payı olan anne baba ve biricik ablam hayatımdaki en değerli hazinelerim'e

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ, SEVGİ VE SAYGILARIMI SUNARIM.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 20535

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	iii
BEYAN.....	iv
İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnfertilite	4
2.1.1. İnfertilitede Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. İnfertilite Nedenleri.....	5
2.2. Açıklanamayan İnfertilite	5
2.3. İmplantasyon ve Endometrial Reseptivite	6
2.3.1. İmplantasyon.....	6
2.3.2. Endometrial Reseptivite.....	8
2.3.2.1. Endometriyel Reseptivite Üzerine Hormonların Etkisi	10
2.4. Yardımcı Üreme Tekniği (YÜT)	11
2.5. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı	12
2.6. Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığının Nedenleri.....	14
2.6.1. Morfolojik Nedenler	14
2.6.2. Anne Yaşı.....	14
2.6.3. Uterin Kalitesi	14
2.6.4. Gamet / Embriyo Faktörleri	14
2.6.4.1. Oosit Kalitesi.....	15
2.6.4.2. Sperm Kalitesi.....	15
2.6.4.3. Ebeveynlere Bağlı Kromozomal Anomaliler	15

2.6.4.4. Embriyolarda Aneoplidi.....	16
2.6.4.5. Embriyo Kalitesi	17
2.6.5. İmmunolojik Faktörler	17
2.6.6. Moleküler Belirteçler	17
2.6.6.1. Sitokinler	18
2.6.6.2. Prostaglandinler (PG).....	19
2.6.6.3. Musinler	19
2.6.6.4. Hücre Yapışma (“Adhesion”) Molekülleri (CAM)	19
2.6.7. Gen Anlatımı.....	20
2.6.7.1. MikroRNA’lar (miRNA’lar)	21
2.6.7.2. MiRNA Biogenezi Ve Salgılanması	21
2.6.7.3. MiRNA Fonksiyonu.....	23
2.6.7.4. Anormal Embriyo Gelişiminde miRNA’ların Rolü	24
2.6.7.5. Biyobelirteç Olarak MiRNA’ların Önemi	26
2.6.7.6. Embriyo-Endometriyum Etkileşiminde MiRNA’ların Rolü	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Örnek Toplama	32
3.2. Endometriyal Biyopsi ve Kan Örneklerinin Toplanması.....	32
3.3. MiRNA Anlatım Analizi.....	33
3.3.1. Serum Total RNA İzolasyonu.....	33
3.3.2. Endometriyum Dokularından Total RNA İzolasyonu	34
3.4. RT-qPCR Uygulaması	35
3.4.1. MiRNA’ların cDNA’ya Çevrilmesi.....	36
3.4.2. cDNA’ların Real-time PCR ile kantitasyonu.....	37
3.5. Hasta Ve Kontrol Gruplarının Özellikleri.....	39
3.6. İstatistiksel Analizler	39
3.7. MiRNA Ve Hedef Gen Tespitinde Omik Yaklaşımlar.....	40
3.7.1. MiRNA Hedef Tanımlama Araçlarının Ortak Özellikleri	40
3.7.1.1. Çekirdek Bölgesi	40
3.7.1.2. Serbest Enerji	40
3.7.1.3. Korunmuş Bölge	40
3.7.1.4. Bölge Erişebilirliği	41
4. BULGULAR.....	42

4.1. Nükleik Asit İzolasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	42
4.2. MiRNA Anlatım Analizi.....	43
4.2.1. Endometriyum Örneklerinde Anlatım Analizi Sonuçları	43
4.2.2. Serum Örneklerinde Anlatım Analizi Sonuçları	46
4.2.3. Aday miRNA'ların İki Farklı Fazda (PF ve SF) Anlatım Seviyelerinin Değişim Analizi.....	49
4.2.3.1. Mir-145'in PF ve SF'de Anlatım Farklılığı	49
4.2.3.2. Mir-23b'in PF ve SF'de Anlatım Farklılığı	49
4.2.3.3. Mir-30b'nin PF Ve SF'de Anlatım Farklılığı	52
4.2.3.4. Mir-31'in PF ve SF'de Anlatım Farklılığı	52
4.3. Aday MiRNA'ların Hedef Gen ve İlgili Yolakların Tespiti	53
4.3.1. “ <i>Mirò2</i> ” Veri Tabanından Hedef Genlerin Tespiti	53
4.3.2. “ <i>Mirò2</i> ” Veri Tabanından Aday miRNA'ların İlgil Yolaklarının Tespiti	55
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	71
ETİK KURUL KARARI	87
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	88
ÖZGEÇMİŞ	89

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: İnfertilite Nedenleri	5
Tablo 3.1: Deney gurubunda olan hasta ve kontrol sayısı	32
Tablo 3.2: miRNA RT reaksiyonu bileşenleri	36
Tablo 3.3: cDNA reaksiyon bileşenleri	36
Tablo 3.4: RT-PCR termal döngüsü	37
Tablo 3.5: miRNA RT reaksiyonu bileşenleri	38
Tablo 3.6: Real-time PCR termal döngü	38
Tablo 4.1: Deney grubunda bulunan hasta ve kontrol gruplarının temel özellikleri	39
Tablo 4.2: Serum ve doku örneklerinden izole edilen total RNA'ların nanodropta ölçülen konsantrasyon değerleri	42
Tablo 4.3: Aday miRNA'ların miRBase erişim ve olgun dizi bilgisi	43
Tablo 4.4: TİB ve kontrol endometriyum örneklerinde iki farklı fazda hedef miRNA'ların RT-qPCR uygulamasından elde edilen sonuçlar.....	44
Tablo 4.5: TİB ve kontrol serum örneklerinde iki farklı fazda hedef miRNA'ların RT-qPCR uygulamasından elde edilen sonuçlar.....	47
Tablo 4.6: miRò2 veri tabanına göre miR-145'in hedeflediği "pathway" listesi	56
Tablo 4.7: miRò2 veri tabanına göre miR-23b'nin hedeflediği "pathway" listesi	56
Tablo 4.8: miRò2 veri tabanına göre miR-31'in hedeflediği "pathway" listesi	57
Tablo 4.9: miRò2 veri tabanına göre miR-30b'nin hedeflediği "pathway" listesi	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: İmplantasyon aşamaları	8
Şekil 2.2: (IVF) in - vitro fertilizasyon aşamaları.....	12
Şekil 2.3: Embriyo maternal etkileşimlerine hücre dışı miRNA'lar katılmaktalar. Nukleusta miRNA'lar birincil (primary) miRNA (pri-miRNA) transkriptleri olarak sentezlenir. Pri-miRNA'lar daha sonra Drosha tarafından miRNA öncüleri (pre-miRNA) olarak bilinen nükleotid saç tokası oluşturmak için işlenir. Daha sonra, pre-miRNA'lar, nukleustan “ <i>exportin-5</i> ” tarafından sitoplazmaya aktarılır ardından “ <i>Dicer</i> ” tarafından küçük RNA dupleksine dönüştürülür. Sonunda, RNA-kaynaklı susturucu kompleksi (RISC) oluşturmak için “ <i>Argonaute</i> ” (AGO) protein ailesine yüklenir ve olgun miRNA, mRNA bölünmesine ya da translasyonel baskıya yol açar. MiRNA'lar, hücreler tarafından çeşitli biçimlerde salgılanabilir: proteinlerle ilişkili (örn. Argonaute familyası veya AGO, nükleosminzin 1), lipoproteinlere bağlı (Yüksek dansiteli lipoprotein), apoptotik cisimlere veya membrana bağlı hücre dışı keseciklere (EVs) kapsülendir. Uterin ve embriyo türevli miRNA'ların eksozomlar ve AGO1 ile ilişkili olduğu bildirilmiştir, diğer paketlenme şekillerinin endometriyal hücreler ve/veya embriyonik hücreler tarafından uygulanıp uygulanmadığı açık değildir. ORF (“ <i>Open Reading Frame</i> ”) [117].....	23
Şekil 2.4: Sitoplazmada olgun miRNA'nın oluşumu. Olgun miRNA'nın 3 şekilde hücre dışına salgılanması; birincisi Proteinlere bağlı şekilde hücre dışına salgılanması. İkincisi Olgun miRNA'nın hücre membranlarından oluşan mikrovesiküllerle hücre dışına salgılanması. Üçüncüsü eksozomlarda bulunan olgun miRNA'ların ekzositozla hücre dışına salgılanması.	29
Şekil 2.5: Canlı hücre içinde bulunan eksozom yapısı	31
Şekil 3.1: RT Real-time PCR aşamaları	35
Şekil 3.2: TaqMan MGB probun yapısı.....	37
Şekil 3.3: Real-time PCR döngülerinde gerçekleşen olaylar.....	38
Şekil 4.1: TİB ve kontrol grubu PF ve SF örneklerindeki 4 aday miRNA'nın rölatif anlatım seviyeleri. a) PF endometriyum örneklerinden elde edilen rölatif anlatım seviyeleri. b) SF endometriyum örneklerinden elde edilen rölatif anlatım seviyeleri. ...	45

Şekil 4.2: TİB ve kontrol grubu ROC eğrisi analiz sonuçları a) PF endometriyum örneklerinden elde edilen ROC eğrisi sonuçları b) PF endometriyum örneklerinden elde edilen ROC eğrisi sonuçları.....	46
Şekil 4.3: TİB ve kontrol grubu PF ve SF örneklerindeki 2 aday miRNA'nın rölatif anlatım seviyeleri ve ROC eğrisi sonuçları. a) PF endometriyum örneklerinden elde edilen rölatif anlatım seviyeleri ve ROC eğrisi. b) SF endometriyum örneklerinden elde edilen rölatif anlatım seviyeleri ve ROC eğrisi.	48
Şekil 4.4: miR-145'in TİB ve kontrol grubunun endometriyum ve serum örneklerinin iki farklı faz arasındaki anlatım ölçüm sonucu. a) miR-145'in TİB grubunun endometriyumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır, öte yandan kontrol grubunda SF'de PF'ye göre anlatım seviyesi anlamlı şekilde artmıştır. b) miR-145'in TİB endometriyum örneklerinde ve serumda sırayla AUC değerleri 1 ve 0.70 olarak elde edilmiştir. c) miR-145 kontrol grubunun endometriyumunda ve serumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır. d) miR-145'in kontrol endometriyum örneklerinde ve serum da sırayla AUC değerleri 1 ve 0.81 olarak elde edilmiştir.	50
Şekil 4.5: miR-23b'nin TİB ve kontrol grubunun endometriyum ve serum örneklerinin iki farklı faz arasındaki anlatım ölçüm sonucu. a) miR-23b'nin TİB grubunun endometriyumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır öte yandan kontrol grubunda SF'de PF'ye göre anlatım seviyesi anlamlı şekilde artmıştır. b) miR-23b'nin TİB endometriyum örneklerinde ve serumda sırayla AUC değerleri 0.82 ve 0.95 olarak elde edilmiştir. c). miR-23b kontrol grubunun endometriyumunda ve serumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır. d) miR-23b'nin kontrol endometriyum ve serum örneklerinde AUC değerleri 1 olarak elde edilmiştir.	51
Şekil 4.6: miR-30b'nin TİB ve kontrol grubunun endometriyum örneklerinin iki farklı faz arasındaki anlatım ölçüm sonucu. a) miR-30b'nin TİB grubunun endometriyumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır öte yandan kontrol grubunda SF'de PF'ye göre anlatım seviyesi anlamlı şekilde artmıştır. b) miR-30b'nin TİB ve kontrol endometriyum örneklerinde sırayla AUC değerleri 0.81 ve 1 olarak elde edilmiştir.	52
Şekil 4.7: miR-31'in TİB ve kontrol grubunun endometriyum örneklerinin iki farklı faz arasındaki anlatım ölçüm sonucu. a) miR-31'in TİB grubunun endometriyumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır fakat kontrol grubunda SF'de	

PF'ye göre anlatım seviyesi fark saptanamamıştır. b) miR-31'in TİB ve kontrol endometriyum örneklerinde sırayla AUC değerleri 0.98 ve 0.57 olarak elde edilmiştir.	53
Şekil 4.8: “ <i>miR02</i> ” veri tabanına göre miR-145'in hedeflediği ilk 10 gen listesi	54
Şekil 4.9: “ <i>miR02</i> ” veri tabanına göre miR-23b'nin hedeflediği ilk 10 gen listesi	54
Şekil 4.10: “ <i>miR02</i> ” veri tabanına göre miR-31'in hedeflediği ilk 10 gen listesi	55
Şekil 4.11: “ <i>miR02</i> ” veri tabanına göre miR-30b'nin hedeflediği ilk 10 gen listesi	55
Şekil 5.1: Menstrual döngünün iki farklı fazında (PF ve SF) aday miRNA'ların anlatım seviyelerindeki artış ve azalma; a) kontrol grubunda endometriyum örneklerinde iki faz arasında karşılaştırmada 4 aday miRNA'nın anlatımının SF'de PF'ye göre artış ve serum örneklerinde miR-145 ve miR-23b'in anlatımının SF'de PF'ye göre artış tespit edilmiştir. b) TİB endometriyum örneklerinde iki faz arasında karşılaştırmada 4 aday miRNA'nın anlatımının SF'de PF'ye göre azaldığı ve serum örneklerinde miR-145 ve miR-23b'in anlatımının SF'de PF'ye göre azaldığı tespit edilmiştir. c) TİB ve kontrol karşılaştırmasında endometriyum PF'de 4 aday miRNA'nın anlatımında artış ve SF'de azalma tespit edilmiştir. Serum örneklerinde miR-145 ve miR-23b'de her iki fazda azalma tespit edilmiştir.	62

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler

μ L

°C

Açıklamalar

: Mikro Litre

: Santigrad Derece

Kısaltmalar

Açıklama

17 β HSD-2

: “17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase”

3'UTR

: 3' Translasyona Uğramayan Bölge

Ago

: Argonat

avb3

: “Integrin alpha V beta 3”

ARIH2

: “Ariadne RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase 2”

ART

: “Assisted Reproductive Technology”

AUC

: “Area Under the Curve”

BCL6

: “B-cell CLL/lymphoma 6”

cDNA

: Komplementer DNA

cPLA2 α

: “Cytosolic Phospholipase A₂ Alpha”

CRMP1

: “Collapsin Response Mediator Protein 1”

Ct

: Eğik Döngüsü

CXCL12

: “C-X-C Motif Chemokine Ligand 12”

E

: Östrojen

E2

: Estradiol

ECM

: Hücre dışı matriks

EDN3

: “Endotelin 3”

EEC'ler

: Endometriyal Epitel Hücreler

ER-a

: “Estrogen Receptor 1”

ESM

: Ekstraselüler Matriks

ET

: Embriyo Transferi

EVs

: Ekstraselüler Vesiküller

FAP

: “Fibroblast Activation Protein”

FOXP3

: “Forkhead P3”

FXR1- iso-a

: Fragile X Mental Retardasyonu İle İlgili Protein 1

G-CSF

: “Granulocyte Colony Stimulating Factor”

GM-CSF

: “Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor”

HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HES1	: “Hes Family BHLH Transcription Factor 1”
HMG	: “Human Menopausal Gonadotropin”
HOXA10	: “Homeobox A10”
ICSI	: İntra-Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IF	: “Implantation Failure”
IGF1R	: “Insulin-like Growth Factor 1 Receptor”
IL-1	: “Interleukin-1”
IRS-1	: İnsülin reseptörü substratı-1
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
IVF-ET	: In-Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transfer
KHSRP	: “KH-Type Splicing Regulatory Protein”
KLF4	: “Kruppel-Like Factor 4”
LH	:Luteinizan Hormon
LIF	: “Leukemia Inhibitory Factor”
MET	: “MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase”
miRNA	: Mikro RNA
MIRO	: Minimum Information for Reporting an Ontology
MMP	: “Matrix metalloproteinase”
mRNA	: Haberci RNA
MUC-1	: Musin 1
NFAT5	: “Nuclear Factor Of Activated T Cells 5”
NK	: “Natural Killer”
OLFM1	: “Olfactomedin-1”
ORF	: “Open Reading Frame”
P	: Progesteron
PCO	: Polikistik Over
PGD	: Preimplantasyon Genetik Tanı
PGT	: Preimplantasyon Tanı
PLAU	: “Trophoblast cells express urokinase-type plasminogen activator”
QPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIF	: “Recurrent Implantation Failure”
RISC	: Efektör RNA Kaynaklı Susturucu Kompleksi
RM	: “Recurrent Miscarriage”

RNA	: Ribonükleoik asit
ROC	: “The Registrar of Companies”
PR-B	: Progesteron Reseptör-B
RT-PCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEPT7	: “Septin 7”
sFRP	: “Secreted Frizzled Related Protein”
SLC44A1	: “Solute Carrier Family 44 Member 1”
SOCS1	: “Suppressor Of Cytokine Signaling 1”
sPLA2-IIA	: “Group IIA Secretory Phospholipase A2”
TFF3	: “Trefoil Factor 3”
TİB	: Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı
TNF-a	: Tümör Nekroz Faktör-a
TNFα	: Tümör Nekroz Faktör α
TGFβ	: Transforme Edici Büyüme Faktörü β
ULF	: “Uterine Luminal Fluid”
uNK	: “Uterin Natural Killer”
URSA	: “Unexplained recurrent spontaneous abortion”
VEGF	: “Vascular Endothelial Growth Factor”
WOI	: “Window of Implantation”
YÜT	: Yardımcı Üreme Tekniği

ÖZET

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB), ardışık en az üç in-vitro fertilizasyon (IVF) uygulaması sonrası iyi kalitede embriyo transfer edilmesine rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmıştır. TİB, IVF uygulamasında ortaya çıkabilen en önemli sorunlardan biridir. Hastalığın gelişiminde ve fonksiyonunda önemli etkenlerden biri gen anlatımının epigenetik düzenlenmesidir ve bu olaylarda görev yapan en önemli moleküllerden biri de mikroRNA (miRNA)'lardır. Endometriyuma özgü miRNA'ların menstruasyon döngüsü sürecinde endometriyum dokusunda ve maternal serumda anlatım seviyelerinin farklı olduğu tespit edilmiştir.

miRNA'ların kantitatif olarak anlatım seviyesi değişimleri çeşitli yöntemlerle ölçülebilir; bu yöntemlerin en önemlisi qReal-Time PCR tekniğidir. Bu teknik kullanılarak biyolojik bir örnekte bulunan hedef miRNA'ların anlatım seviyesi kantitatif olarak yüksek hassasiyetle ölçülür.

Bu çalışmanın en önemli özelliği TİB hastalarının hem dokularında hem de serumlarında bulunan miRNA'ların anlatım seviyelerini araştıran ilk çalışma olmasıdır. Bu araştırmada hedeflenen ilk amaç miRNA'ların anlatım seviyelerinin istatistiksel sonuçlarından elde edilen verilerle hastalığın biyolojik sürecine dahil olan faktörlerin açığa çıkarılmasıdır. İkincisi, ileride bu hastaların potansiyel tedavisi için strateji geliştirebilme açısından temel oluşturmaktır. Son hedefimiz ise maternal serumda anlamlı şekilde anlatım seviyesi değişen miRNA'ların tanı amaçlı bir girişimsel olmayan (non-invazif) moleküler biyobelirteç olarak kullanılmasıdır.

Bu araştırmada TİB problemi olan hastalardan (n=12) ve gönüllü normal bireylerden (n=8) menstruasyon döngüsünün iki farklı fazında örnek toplanmıştır. Menstrual döngünün 7-10. günlerdeki proliferatif fazda (PF) ve 20-24. günlerdeki sekretuar fazda (SF) alınan endometriyum dokusu ve periferik kan örnekleri üzerinde çalışılmıştır. İmplantasyonla ilişkili olduğunu düşündüğümüz aday miRNA'ların (hsa-miR-31, hsa-miR-30b, hsa-miR-145 ve hsa-miR-23b) anlatım seviyeleri ve biyoinformatik analizi RT-qPCR ile gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR analiz sonucunda endometriyum örneklerinde TİB ve sağlıklı grubu karşılaştırmasında 4 aday miRNA anlatımında anlamlı şekilde ($P<0.05$) PF'de artma ve SF'de azalma tespit edilmiştir. Serum örneklerinde miR-145 ve miR-23b'de her iki fazda (PF ve SF) anlamlı şekilde anlatım azalması saptanmıştır. Anlatımlarında anlamlı şekilde değişim olan miRNA'ların hedef gen analizi güncel biyoinformatik veri tabanlarında ("Target Scan", "Miranda" ve "Pictar") gerçekleştirilmiş ve hedef genlerin ilgili yolakları ("miRò2" veri tabanı) kullanılarak test edilmiştir. Elde edilen yolakların hücrelerde çoğalma, apoptoz, invazyon, adesyon ve farklılaşma gibi önemli biyolojik süreçler ile ilgili oldukları saptanmıştır ve bu süreçlerin embriyo implantasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

ABSTRACT

Recurrent implantation failure (RIF) refers to the failure to achieve a clinical pregnancy after transfer of at least three good-quality embryos in in-vitro fertilization (IVF). RIF is a major problem encountered in IVF. An important factor in the development and function of the RIF disorder is epigenetic regulation of gene expression, in which one of the most noteworthy molecules are microRNAs (miRNAs). In the menstrual cycle, it has been identified that endometrium specific miRNAs have different expression levels in endometrial tissues and maternal serum.

Quantitative miRNAs expression level can be measured in a biological sample by different methods which the most important method is quantitative real-time PCR (qRT-PCR) technique. This technology quantitatively measures the expression of targeted miRNA in a biological sample with high sensitivity.

The significant feature of this study is that this is the first study to analyse of miRNA expression level in two different types of samples in same cases. The first aim in the study is revealing the factors involved in the biological process of disease by targeted expression of miRNAs. Second aim is to create a basis for developing a new theory for the potential treatment of RIF patients and the last aim of study is that significantly different expressed miRNAs can be used for non-invasive molecular biomarkers in early diagnosis of RIF disorder.

In this study, it was studied on 12 RIF samples and 8 samples from normal and fertile individuals which are collected as two peripheral venipunctures (5 mL) and two endometrial biopsies; one in the proliferative phase (CD 7-10) and one in the implantation phase (CD 20-24). In first step RNA was isolated from endometrium tissue and sera exosomes, Expression levels and bioinformatics analysis of candidate miRNAs (hsa-miR-31, hsa-miR-30b, hsa-miR-145 and hsa-miR-23b) which we think are related to implantation were performed. The statistical analysis showed that four selected miRNAs (hsa-miR-145, hsa-miR-23b, hsa-miR-31 and hsa-miR-30b) were significant ($P < 0.05$) up-regulated in proliferative phase and down-regulated in secretory phase of endometrium samples. In serum samples, only two miRNAs (hsa-miR-145 and hsa-miR-23b) were significantly down-regulated in both of proliferative phase and secretory phase. Target analysis for dysregulated miRNAs in different and updated target scan databases (Target Scan, Miranda and Pictar) identified important target genes. Pathway analysis of targeted genes showed critical pathways which are related to important cell functions such as proliferation, apoptosis, invasion, adhesion, and differentiation which are hypothesized to be related to the embryo implantation process.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı (TİB) 40 yaş altı bir kadında, In Vitro Fertilizasyon (IVF) yaklasımı ile en az 3 siklus ve en az 4 kaliteli embryo transferi sonrası gebelik oluşmaması olarak tanımlanmaktadır [1]. IVF başarısızlıklarının başlıca nedenleri; (i) yumurtalık uyarımına kötü yanıt, (ii) tekrarlanan döllenme başarısızlığı, (iii) tekrarlanan zor transferler ve (iv) tekrarlanan implantasyon başarısızlıklarıdır. İmplantasyon başarısızlığı, IVF için önemli bir sınırlamadır [2][3]. Embriyo implantasyonu süreci, üç fazda tanımlanmaktadır; birincisi apozisyon (hazırlık): blastokistin iç hücre kitlesinin endometriyuma teması, ikincisi adezyon: blastokistin endometriyuma yapışması, üçüncüsü invazyon: gömülme süreci [4]. İmplantasyon başarısızlığının etiyolojik nedenleri arasında embriyo kalitesi, endometrial reseptivite, immünolojik faktörler, uterus, tubal ve peritonal faktörler ile kültür ortamı yer alır (“culture media”) [5]. Uterus içine transfer edilen embriyoların yaklaşık %30'u başarılı bir gebelik ile sonuçlanmaktadır [6]. Başarılı embriyo implantasyonu için uterus ve blastosist arasında fizyolojik ve moleküler etkileşim gerekmektedir [7]. Bu süreç embriyonun kalitesine, embriyo-endometrium etkileşimine ve endometrial reseptiviteye bağlıdır. Yetersiz endometrial reseptivite, implantasyon başarısızlıklarının yaklaşık üçte ikisinden sorumludur. Başarılı implantasyondaki önemli rolü göz önüne alındığında, endometrial reseptivitenin tahmin edilmesi ve iyileştirilmesi kritiktir ve sonuçta In-Vitro Fertilizasyon sonrası Embriyo Transfer'nin (IVF-ET) gebelik başarı oranını artırabilir. Ne yazık ki, endometrial reseptiviteyi tam olarak tahmin etmek için henüz etkili bir teşhis aracı mevcut değildir [6]. TİB hastalarında reseptif faz sırasında gen ekspresyonlarında normal fertil kadınlara göre farklılıklar görülmektedir. Genomik analizler, doğal endometrium döngüsü sırasında mRNA ekspresyon değişikliklerine ışık tutmuştur [8]. TİB hastaları ile yapılan çalışmalar endometriumda anormal gen anlatımlarının olduğunu göstermiştir [9][10][11]. Bu genlerin hücre döngüsünde, Wnt sinyali ve hücresel adezyon gibi yollarda etkili olduğu gösterilmiştir. Endometriumda anormal gen ekspresyonundan etkilenen yolların TİB'e yol açtığı gözlenmiştir [3]. Gen anlatımının düzenlenmesinde etkili olan faktörlerden en önemlisi mikroRNA (miRNA)'lardır.

miRNA'lar, protein kodlamayan, çeşitli gen hedeflerinin (negatif veya pozitif) transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olarak hareket eden küçük RNA fragmentleridir (18–25 nükleotit). miRNA'lar, implantasyonda yer alan önemli biyolojik süreçlerde rol oynarlar. Bunlar; hücrel farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi süreçlerdir [6]. Bu nedenle, insanlarda endometriyal reseptivite nedenlerini araştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İnsan endometriyumunun farklı fazlarında miRNA anlatımında farklılıklar gösterilmiştir. Kuokkanen ve arkadaşları, geç proliferatif ve orta sekretuar fazlarda fertil kadınların endometriyal epitelyal hücrelerinin mRNA ve miRNA profillerini inceleyip miRNA'ların ilgili genlerin anlatımını düzenleyerek endometriyal reseptiviteyi etkilediğini göstermişlerdir [12]. Altmäe ve arkadaşları, preresepitif (LH + 2) ve reseptif endometriyumun (LH + 7) miRNA profilini fertil kadınlarda karşılaştırmış ve miR-30b, miR-30d ve miR-494'ün endometriyum reseptivitesini düzenlemedeki rollerini ortaya koymuştur [13]. Revel'in çalışmasında, TİB ve fertil kadınlar arasında endometriyumun sekretuar fazında farklı miRNA profilleri gösterilmiştir. Bu veriler, farklı popülasyonların/evrelerin miRNA anlatım profillerinin farklı olabileceğini ve bu nedenle endometriyal reseptivitenin tanısında kullanılabileceğini açıkça göstermiştir; ancak çalışma sınırlamaları nedeniyle daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir [14]. Araştırmalar miRNA'ların, embriyonun kaderini belirleyen yüzlerce kritik genleri hedeflediğini ve ilgili genlerin anlatımının artmasına yada baskılanmasına neden olabildiğini göstermiştir [15][16][17]. İmplantasyon penceresinde, kritik genlerin anlatımının gerçekleşmemesi, implantasyonun başarısız olmasına neden olmaktadır [18].

Bu çalışmanın öne çıkan özgünlüğü, TİB ve sağlıklı vakaların hem dokusunda hem de serumunda bulunan miRNA'ların anlatım seviyelerinin araştırılan ilk çalışma olmasıdır. Bu çalışmada hedeflenen ilk amaç aday miRNA'ların toplanan örneklerde iki farklı fazda, Proliferatif Faz ve Sekretuar Faz (PF ve SF), anlatım seviyelerinin ölçülmesi ve elde edilen verilerle hastalığın biyolojik sürecine dahil olan faktörlerin açığa çıkarılmasıdır. İkincisi, ileride bu hastaların potansiyel tedavisi için teoriler geliştirebilme açısından temel oluşturmaktır. Son olarak ise maternal serumda anlamlı şekilde anlatım seviyesi değişen miRNA'ların belirlenmesi ve bu miRNA'ların infertilite problemiyle karşı karşıya olan vakalarda IVF tedavisine başlanmadan tanı amaçlı bir non-invazif biyobelirteç olarak kullanılmasıdır. Bu non-invazif ve basit tanı yöntemiyle bu grup hastaların zaman kaybı olmadan endometriyal reseptivitelevlerini

arttırmak için bir başka tedavi sürecine yönlendirilebilmeleri ya da farklı yöntemlerle çocuk sahibi olmaları sağlanabilecektir.

Bu çalışmada TİB hastalarından (n=12) ve gönüllü sağlıklı bireylerden (n=8) menstruasyon döngüsünün iki farklı fazında (7-10. günlerindeki proliferatif faz ve 20-24. günlerindeki implantasyon fazı) örnek toplanmıştır. Her vakadan hem endometriyum doku biyopsisi hem de periferik kan örnekleri alınmıştır. Önceki çalışmalarda dizileme [19], mikroyarray [14][13][12] ve RT-qPCR [20] yöntemini kullanarak elde edilen ve implantasyonla ilişkili olduğunu tespit edilmiş miRNA lardan 4 aday miRNA (hsa-miR-31, hsa-miR-30b, hsa-miR-145 ve hsa-miR-23b) seçilmiştir. 4 miRNA'nın anlatım seviyeleri RT-qPCR ile ölçülmüş ve biyoinformatik analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarında, TİB grubu ile kontrol grubunun karşılaştırmasında 4 aday miRNA'nın (miR-145, miR-23b, miR-31 ve miR-30b) endometriyum örneklerinde anlatım seviyelerinde anlamlı şekilde ($P<0.05$) PF'de artma ve SF'de azalma saptanmıştır. Serum örneklerinde TİB grubu ile kontrol grubu karşılaştırmasında 2 aday miRNA'nın (miR-145 ve miR-23b) PF ve SF'de anlatımlarının anlamlı şekilde ($P<0.05$) azaldığı saptanmıştır. Aday miRNA'ların iki faz (PF ve SF) arasındaki anlatım seviye ölçüm sonuçları, TİB grubunda kontrol grubu ile bağımsız olarak değerlendirilmiştir. Bu karşılaştırma sonucunda, 4 aday miRNA'nın TİB grubunda SF'de PF'ye göre anlatımında azalma tespit edilmiştir. TİB serum örneklerinde bu karşılaştırma sonucunda beklediğimiz gibi miR-145 ve miR-23b'nin SF'de anlatımları azalmıştır. Anlatımı anlamlı şekilde değişen aday miRNA'ların hedef genleri güncel kullanılan hedef belirleme veritabanları ("*TargetScan*", "*Miranda*" ve "*Pictar*" gibi) kullanılarak tespit edilmiştir. Aday miRNA'ların hedef genlerinin ilgili yolları istatistiksel programda ("*miRò2*" veri tabanı) belirlenmiş ve bu yollar listelenmiştir. Taramalar sonucunda elde edilen yolların TİB hastalığının biyolojik süreci ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

İnfertilite demografik, psikolojik, ekonomik ve tıbbi etkileri olan ve çiftler arasında sık görülen önemli bir durumdur [21]. 35 yaş altında olan kadınlarda korunmasız 12 ay boyunca, 35 yaş üstünde korunmasız 6 ay düzenli ilişkiye rağmen gebe kalınamaması infertilite olarak tanımlanmaktadır [22].

Reproduktif çağda olan çiftlerin %10-15'inde infertiliteye rastlanır. İnfertilitenin sıklığı ve nedenleri farklı toplumlarda değişiklik gösterir. Çiftlerin %30-40'ında erkek faktörü ve %40-50'sinde ise kadın faktörü infertiliteden sorumlu olmaktadır. Hem erkek hem kadına ait patolojilerde birlikte gözlemlenen infertilite oranı %20-25 dir. Tanısal tetkiklere rağmen bir infertilite nedeni tanımlanamayan (açıklanamayan infertilite) oranı ise %15'dir [23].

Primer infertilite bir kadının daha önce gebe kalmaması durumu, sekonder infertilite bir yada daha fazla gebelik geçirmesi durumu olarak adlandırılır.

Son yıllarda infertilite tedavisi ile ilgili yaklaşımlarda önemli gelişme sağlanmıştır. Bunlardan biri “*in-vitro fertilizasyon*” (IVF) ve üremeye yardımcı tekniklerin uygulanmasıdır. Dolayısıyla bu çalışmalar sayesinde temel üreme yöntemleri alanındaki yaklaşımlarda ilerleme sağlanmıştır.

2.1.1. İnfertilitede Epidemiyoloji

Fertiliteyi çeşitli faktörler etkilemektedir. Bunların en önemlilerinden biri yaş faktörü olarak tanımlanmıştır ve yaş ilerledikçe fertilitede ciddi azalma meydana gelir. Yaşla beraber overlerde folikül kalitesi azalmakta ve fertilize olan ovumun uterusu implantasyon şansı da azalmaktadır [24]. İnfertilite oranının, 15-24 yaş aralığındaki kadınlarda %4, 25-34 yaş aralığında %13, 40 yaşındaki kadınlarda %33 ve 45 yaşındaki kadınlarda ise %87 olduğu tespit edilmiştir [25]. Kromozomal anomalilerin insidansı ve spontan abortus oranı yaşla beraber yükselir. Abortus oranının 30 yaşa kadar %10, 30'lu yaşların sonunda %18, 40'lı yaşların başında ise %34 olduğu klinik olarak tespit edilmiştir [26]. Ayrıca 30'lu yaşlara girildiğinde endometriyozis, pelvik enfeksiyon gibi fertiliteyi etkileyebilecek bir takım hastalıkların görülme ihtimali de artar [24]. Zamanla

olumsuz çevresel faktörlere maruz kalma ihtimali yaş ilerlemesi ile birlikte artar ve bu etkenlerin fertilizasyon ve implantasyon şansını negatif etkilediği tespit edilmiştir [27].

İnfertilite oranı son yıllarda artma göstermiştir. ABD’de 1965’den beri 20-24 yaş aralığındaki kadınlarda infertilite oranının yaklaşık 3 kat arttığı gösterilmiştir [28] . Bu yükseliş tanı yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte infertilite tanısında ve nedenlerinin saptanmasında artmaya yol açmış ve potansiyel tedavi yöntemlerinin devreye girmesine neden olmuştur [29].

2.1.2. İnfertilite Nedenleri

İnfertilite nedenlerinin yaklaşık %70’i ovulatuvar bozukluğu (fallop tüpleri tıkalı veya hasar görmüş) ve erkek faktörleridir (sperm sayısının, hareketliliğinin veya morfolojisinin anomalisi). Geri kalan %30’u ise yumurtlama disfonksiyonu ve açıklanamayan infertilite gibi diğer faktörlerdir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: İnfertilite Nedenleri

Nedenler	Oran %
Tıkalı veya hasar görmüş tüpler pelvik adezyonlar veya endometriyozis	35
Erkek faktörler (sperm sayısı bozuklukları, mortalite, morfoloji)	35
Yumurtlama disfonksiyonu (nadiren veya değil)	15
Açıklanamayan infertilite	10
Ender (myomlar, polipler, uterin anomaliler)	5

İnfertilitede her faktörün sıklığı yaşla birlikte değişmektedir. Ovulasyon bozuklukları genç kadınlarda daha sık olmakla birlikte, tüplere bağlı ve peritoneal patoloji sıklıkları genç ve yaşlılarda eşit görülmektedir. Açıklanamayan infertilite ve erkek faktörü yaşlı çiftlerde daha sık görülmektedir [30].

2.2. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite, çiftler için yapılan sistematik değerlendirmeler sonucunda herhangi bir sebep saptanamaması olarak tanımlanır. İnsidansı infertil çiftlerin arasında %10 ile %30 arasında değişmektedir [31] .Temel bir değerlendirmede açıklanamayan infertilite tanısının koyulması için çok sayıda faktör vardır. Folikül

gelişimi, tüplere ulaşım sorunları, luteal faz defektleri, hafif ovulasyon fonksiyon bozuklukları ve implantasyon başarısızlığı bu faktörlerden bazılarıdır [32]. Başarılı bir implantasyon için gelişmekte olan embriyo ve alıcı endometriyum arasında hassas etkileşim gereklidir. Bu hassas etkileşim, embriyonik ve maternal dokular arasında uyumlu bir diyalog gerektirir [33].

2.3. İmplantasyon ve Endometrial Receptivite

İmplantasyon, zigotun blastokist haline döndükten sonra uterus kavitesine ulaşp endometriyum epiteli ile karşı karşıya gelmesi, tutunması ve desidual endometriyum stromasını invaze ederek maternal damar sistemine ulaşp yerleşmesi sürecine denir. Bu süreç hormonlar, büyüme faktörleri, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks proteinleri, prostoglandinler, sitokinler ve immunolojik faktörleri kapsayan karmaşık bir sistemden oluşmaktadır [34]. Bu sistemde herhangi bir aksaklık, implantasyonu engelleyebilir [35].

IVF gebelik oranlarında başarıyı etkileyen en büyük engellerden biri implantasyon başarısızlığıdır [36]. Endometriyum, fertilitiyi belirleyici faktörlerden biri olarak düşünülebilir [37]. İmplantasyon sürecinde endometriyum ve embriyo arasında uygun bir ilişki kurulması gerekmektedir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığında, reseptif endometriyum, maternal açıdan bir ön koşul gibi görülmektedir ve implantasyon başarısızlığının yaklaşık üçte ikisinden sorumludur [38]. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı IVF’de kompleks bir konudur ve tamamen anlaşılamamıştır [39].

2.3.1. İmplantasyon

İmplantasyon, gelişmekte olan embriyo ile endometriyum arasında oluşan etkileşim aracılığıyla gerçekleşmektedir. Gebeliğin başlangıcı, reseptivite kazanmış endometriyum ile blastokist haline gelmiş embriyo arasındaki iletişimin birçok morfolojik ve moleküler değişimiyle birlikte sağlanmaktadır. Endometriyum ve blastokist arasındaki iletişim bugüne kadar çok az anlaşılmıştır. Bu etkileşimi sağlayan büyüme faktörleri; adezyon ve adezyon engelleyici faktörler, prostaglandinler, sitokinler, ekstraselüler matriks proteinleri ve immünolojik faktörleri kapsayan karmaşık bir sistemden oluşmaktadır [34].

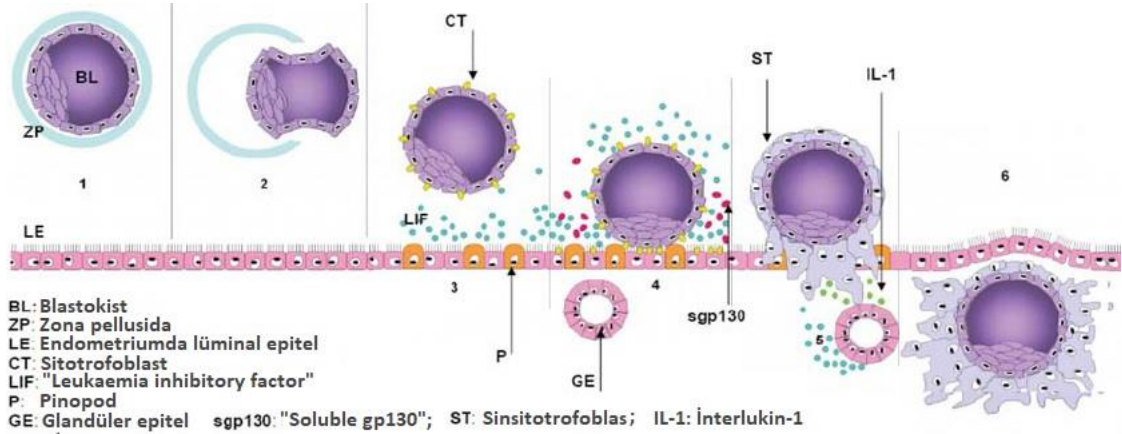
Başarılı bir implantasyon için sağlıklı blastokistin, reseptivitesi normal olan endometriyuma, doğru zamanda ulaşması gerekmektedir. Her menstrual döngüde kısa bir süre endometriyum implantasyon için uygundur. Bu sürece “implantasyon penceresi” denir. Normal bir döngünün içinde embriyo endometriyal kaviteye ovülasyondan yaklaşık 4 gün sonra girer [40]. Endometriyumun reseptivitesi ovülasyondan yaklaşık 6-8 gün sonra başlar ve yaklaşık 4 gün sürer [41].

İmplantasyon, ovulasyondan 3-4 gün sonra, menstrual siklusun 18. veya 19. gününde, döllenmiş yumurtanın uterusu girmesinden 2-3 gün, fertilizasyondan ise 7-8 gün sonra başlamaktadır.

İmplantasyon 3 aşamada gerçekleşmektedir.

- 1) Apozisyon (hazırlık): Blastokistin iç hücre kitlesinin endometriyuma teması
- 2) Adezyon: Blastokistin endometriyuma yapışması
- 3) İnvazyon: Gömülme süreci [42].

İmplantasyon süreci morulanın (embriyonun dut şeklini almış 12-16 hücreli aşaması) uterin kaviteye girmesinden 2-4 gün sonra, blastokistin uterin epiteline apozisyonu ve adezyonu ile başlamaktadır. Bu etkileşim özellikle fibronektin ve laminin gibi hücre dışı bileşen düzenleyici proteinler tarafından sitokinler ve adezyon moleküllerinin (integrinler) düzenlenmesiyle gerçekleşmektedir. İmplantasyonda membranlar arasında “*junctional*” kompleks oluşumu sitokinler, büyüme faktörleri ve reseptörleri ile ilişkili blastokist trofoblastlarının desidual (maternal) hücrelere teması sonrası gerçekleşmektedir. Blastokistin uterin epiteline adezyonu ve invazyonunun başlaması, integrinler ve selektinler gibi adezyon molekülleri, salgılanan enzimler ve ekstrasellüler-intersellüler matriks bileşenleri etkileşimiyle gerçekleşmektedir. Bu esnada embriyoblast epi ve hipoblastlara; uterin de trofoblastlarda sinsityo ve sitotrofoblastlara farklılaşmaktadır. Trofoblast hücreleri endometriyum epitel altına ve bazal membran arasına girerek, bölgesel olarak epitel hücrelerine füzyon ile; bazen de fagositoz ile invaze olmaya başlamaktadır. Bu invazyonda enzimlerin desteği ve hareketleri önem taşımaktadır [42]. İmplantasyonun son fazında ovulasyonun 14. gününde plasenta oluşmaya başlamaktadır. Bu aşamada maternal damar invazyonu spiral arter duvarları yıkılarak endovasküler trofoblastlar ile sinüzoidal sak oluşması sağlanarak plasenta yapısı oluşumu başlatılmaktadır [43].



Şekil 2.1: İmplantasyon aşamaları

2.3.2. Endometrial Reseptivite

Endometriyum, implantasyon penceresi ("window of implantation"WOI) hariç, genelde bir embriyo için reseptivitesi olmayan bir ortam olarak bilinmektedir [44]. Endometrial reseptivite, implantasyon penceresi olarak bilinen ve menstrual döngünün 19-24. günleri arasında gerçekleşen kompleks bir olay olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç boyunca endometriyum, embriyonun uterin epiteline adezyon ve invazyon edilmesine izin veren özellikler geliştirmektedir [18]. Endometriyum, ovulasyondan yaklaşık 6 gün sonra implantasyon için reseptif hale gelmekte ve bu olay yaklaşık 4 gün sürmektedir [45].

İmplantasyon penceresinin sürecindeki hücrel değişikliklerden biri endometrial stroma hücrelerinin fibroblast benzeri daha büyük ve yuvarlak desidual hücrelere dönüşmesi ve yüzeysel çıkıntıların yani pinopodların oluşmasıdır [46]. Pinopodlar, implantasyon için hazırlanan endometriyumun yüzey epitelinde görülen morfolojik parametrelerinden biri olarak bilinmektedir. Pinopodların oluşumu ve miktarı, implantasyon ve gebeliğin başlamasını etkileyen önemli bir kriter olarak düşünülmektedir [47]. Endometriyumda, blastosistle ilk karşılaşan yapının pinopodlar olduğu bilinmekte ve bu yapının endometriyumun hem fonksiyonel hem de morfolojik olarak değişimi ile ortaya çıktığı bilinmektedir [48]. İmplantasyon sürecinde, pinopodlar endometrial sıvı üzerinde etkili olmakta ve böylece adezyon ve invazyon sürecini kolaylaştırmaktadırlar [49]. Pinopod oluşumunda progesteron ve HOXA10 ("Homeobox A10") gen ekspresyonunun sorumlu olduğu düşünülmektedir. LIF

“*Leukemia inhibitory factor*” geninin de implantasyonda kritik bir öneme sahip olduğu bilinmektedir ve bu genin salınmasını pinopodların düzenlediği düşünülmektedir [1].

Son yıllarda transkriptomik analiz ve moleküler biyoloji teknolojilerindeki yeni gelişmeler sayesinde insan endometriyum gelişiminin genomiklerinin araştırılması mümkün olmaktadır [50][50][51][52]. Kritik genlerin WOI sırasında anlatım yapmaması, implantasyonun gerçekleşmesini engellemektedir. Çeşitli çalışmalar endometriyal reseptivite ile ilgili bir takım aday genleri ortaya koymaktadır. Bunlardan sadece birkaçı endometriyal reseptivite için biyomarker olarak tanımlanmaktadır ve klinik uygulamada kullanılmaktadır [18].

Endometriyal reseptivite büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, lipitler ve adezyon molekülleri gibi birçok moleküler mediatörden etkilenmekte ve bunların anlatımı östrojen (E) ve progesteron (P) hormonları tarafından düzenlenmektedir. Bu steroid hormonların, endometriyumun reseptivitesi ve proliferatif fazı için gerekli olan endometriyal gen anlatımını düzenlediği gösterilmiştir [18]. Progesteron, implantasyon penceresi sürecinde temel bir hormondur ve etkisini stromal komponentte bulunan PR-B (“*progesteron reseptör-B*”) üzerinden göstermektedir [37]. Progesteronun endometriyal bezlerin sekreter etkisini oluşturduğu, pinopod oluşumunu uyardığı, desidua oluşumunu sağladığı ve immün sistem üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [42]. Endometriyuma implante olan embriyoya, gebeliğin devamı için, maternal immün sistemin tolerans göstermesi gerekmektedir. Blastokistin endometriyuma implante olması için endometriyumda hasar oluşmaktadır. Maternal kan damarları ve trofoblastlar endotelin yerini almakta ve salgıladıkları kemokinler yardımı ile implantasyon alanına immün hücrelerin gelmesini sağlamaktadırlar. İmplantasyon ortamına gelen lökositler; NK (“*Natural Killer*”), makrofaj, dentritik ve çok az miktarda T hücrelerden oluşmaktadır [53].

İmplantasyon için gerekli olan LIF, GM-CSF (“*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*”) ve G-CSF (“*Granulocyte colony stimulating factor*”) uterusunda bulunan NK hücreleri tarafından salgılanmaktadır. NK hücrelerinde salgılanan anjiyogenik faktörler desidualizasyonda rol oynamaktadır [54]. Farelerde M-CSF veya LIF sitokinlerinin gen mutasyonu implantasyon başarısızlığına yol açmaktadır [55].

Östrojen etkisi altında, LIF tüm uterusunda salgılanmaktadır. LIF’in endometriyal reseptivite ile ilişkisinin, LIF mRNA üretiminin menstrual döngünün sekreter fazında

çok fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. LIF sekresyonunu progesteron düzenlemektedir. Blastokistin büyümesi ve yumurtlama sürecinin kontrolünde de rolü bulunmaktadır [56]. Transkripsiyon faktörlerinden olan HOXA10 ve 11 endometriyal reseptiviteden sorumlu olup stromal hücrelerden salgılanmaktadır [57]. ESM'yi (“*ekstraselüler matriks*”) parçalayan proteazlar katepsin, serin proteaz, matriks metalloproteinazlardan kollajenaz, stromelizinler ve jelatinazlardır. Bunlar invazyon esnasında ve adezyon sonrası aktifleşerek salınmaktadır [58].

2.3.2.1. Endometriyal Reseptivite Üzerine Hormonların Etkisi

Östrojen ve Progesteron

Her ne kadar doğal ve uyarılmış döngülerde endometriyal kalınlık ve serum östrojen düzeyleri arasında bir korelasyon var ise de estradiolün serum seviyeleri (E2), endometriyal olgunlaşmayı öngörmeye az bir değere sahiptir [44]. Östrojen seviyeleri, tek başına granüloza hücrelerinin aktivitesini ifade ederken, endometriyumun olgunluğunu ifade etmemektedir. Muhtemelen her bir birey için genetik olarak kodlanmış olan östrojen reseptör gelişimine bağlıdır ve bu nedenle benzer östrojen seviyeleri farklı bireylerde farklı endometriyal olgunluk seviyelerini başlatabilmektedir [59]. Aşırı östrojen uygulamasının post-ovulasyonda implantasyonu önleyebileceği bilinmesine rağmen, normal menstrual sürecinde östrojen ve progesteron düzeylerinin nasıl değiştiğine dair çok az bilgi bulunmakta, bu da reseptiviteyi etkileyebilmektedir. IVF, uyarılan döngüler sırasında dolaşımdaki östrojen ve progesteron seviyeleri hakkında büyük miktarlarda doğru endokrin verileri oluşturmaktadır. Ek olarak, alıcı döngüler embriyo transferi (ET)'nden sonra oluşan gebelikte açıkça tanımlanabilmektedir [44].

Gonadotropin Hormonları

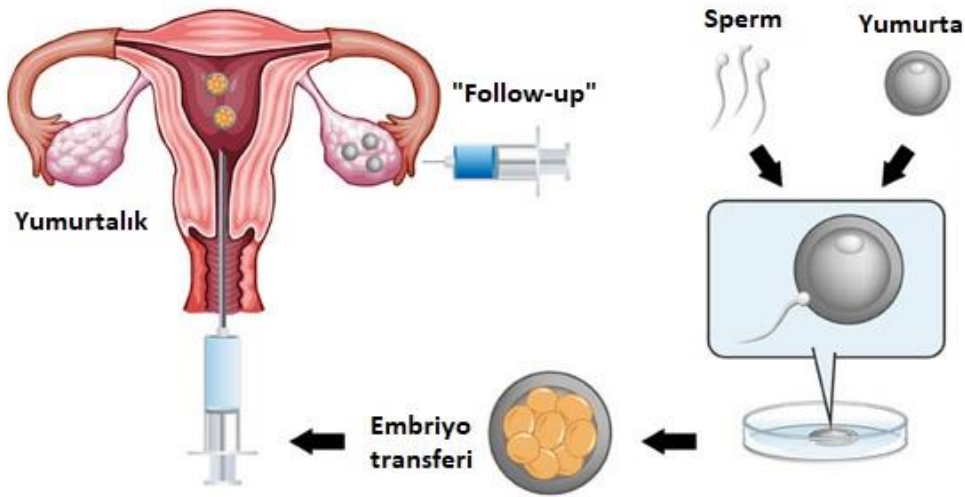
Bonnamy ve diğ. tarafından luteinizan hormon (LH) reseptörlerinin uterus konsantrasyonunun ve LH'nin doluluk (“*occupancy*”) oranının peri-implantasyon dönemde artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu, implantasyon ve sonraki desidualizasyon için endometriyal reseptivitenin belirlenmesinde LH'nin rolüne dair kanıt olarak gösterilmektedir [44].

“Gonadotropin-releasing hormone” (GnRh) ve GnRh Antagonisti

Düşük LH seviyeleri, HMG (“*human menopausal gonadotropin*”) tedavisi sonrası, GnRh (“*gonadotropin releasing hormone*”) agonist tedavisinden sonra veya GnRh-antagonist tedavisinden sonra tarif edilmektedir [44]. Bu düşük luteal LH seviyeleri yetersiz korpus luteum fonksiyonuna ve sonuç olarak, kısalmış luteal faza veya ovulasyon indüksiyonundan sonra sıklıkla tanımlanan düşük luteal progesteron konsantrasyonuna yol açabilmektedir [60]. GnRh-agonistinin veya GnRh-antagonistinin insan korpus luteumuna veya insan endometriyumu üzerine ve dolayısıyla da endometrial reseptivite üzerine doğrudan etkisi, GnRh reseptörlerinin hem agonistinde hem de antagonistinde göz ardı edilememektedir. Endometrial histoloji, çeşitli yumurtalık uyarım protokolleri sırasında bakılmaktadır. Orta luteal biyopsiler ile, GnRh-agonist sikluslarda, glandulo-stromal senkronizasyonun bozulması ve endometrial gelişimdeki gecikme, progesteron reseptörleri için endometrial bezlerin güçlü pozitifliği, pinopodların erken görünümü ile hücre adezyon molekül profillerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu değişiklikler implantasyon penceresinin ileriye doğru kaymasını önermekte ve progesteron takviyesi endometrial histolojiyi geliştirmektedir [44].

2.4. Yardımcı Üreme Tekniği (YÜT)

IVF’in yapılmaya başladığı 1978 tarihten sonra in-vitro fertilizasyon-embriyo transfer (IVF-ET) uygulamaları her geçen gün giderek artan bir kullanım alanı bulmuş ve YÜT infertilite tedavisi için uygulamaları yaygınlaşmıştır. Buna rağmen günümüzde yeni imkanlar ve tekniklerin gelişimi ile beraber YÜT’ün başarı oranı istenilen seviyeye gelememiştir [61].



Şekil 2.2: İn - vitro fertilizasyon aşamaları

Aktarılan embriyonların sadece %30'u uterusu aktarıldıktan sonra başarılı gebelikle sonuçlanmaktadır [6]. Başarılı implantasyon, embriyo kalitesi, embriyo-endometriyum etkileşimi ve endometriyal reseptiviteye bağlı olmakla birlikte yetersiz endometriyal reseptivite de implantasyon hatalarının yaklaşık üçte ikisinden sorumludur [62].

Bu konuyla ilgili her gün yeni parametreler değerlendirmeye alınmakta ve bazılarının etkisi kanıtlanırken, bazılarının da etkileri tartışmaya açık kalmaktadır. Erkek faktöründe ciddi bozukluklar, ciddi tubal hasar gibi diğer tedavilerin yetersiz kaldığı durumlarda YÜT ilk tedavi olarak uygulanmaktadır. Çoğu infertilite tedavilerinin başarısız olduğu açıklanamayan infertilite olgularında, son seçenek olarak YÜT kullanılabilir [4].

Başarılı implantasyonda endometriyumun reseptivitesinin öngörülmesi ve gelişmesi kritiktir ve sonuçta IVF-ET'in gebelik oranı başarısını yükseltmektedir. Ne yazık ki, endometriyal reseptivitenin önceden tahmin edilebilmesi için henüz bir tanı yöntemi mevcut değildir [6].

2.5. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı

İmplantasyon başarısızlığı, IVF ve embriyo transferinden sonra tedavi gören kadınlarda gebe kalamamanın en sık görülen nedenidir. İmplantasyon başarısızlığı IVF'nin yaklaşık %40'ında gerçekleşmektedir.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı 40 yaşın altındaki bir kadında, 3 denemede, kaliteli en az 4 embriyo transferi yapıldıktan sonra klinik hamilelik başarısızlığı olarak tanımlanmaktadır [63].

RIF'in ("recurrent implantation failure": tekrarlayan implantasyon başarısızlığı) kesin bir bilimsel tanımını yapmak oldukça zordur. RIF'in tanımlanmasını araştırmacılar iki kritere göre yapmaktadır; birinci transfer edilen embriyo sayısı, ikincisi gerçekleştirilen ET prosedürleri sayısıdır. Büyük bir IVF programının analizine dayanılarak RIF'in tanımı 20 yıl önce Coulam tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tanıma göre, hastalara farklı yaklaşımlarda 12'den fazla embriyo transfer edilmesine rağmen, gebelik gerçekleşmediği durumlar RIF hastalığı olarak kabul edilmiştir [64].

İngiltere'deki 65 IVF kliniğinden elde edilen bulgular RIF grubunda, 5-6 başarısız döngüsü olan hastaları ve donmuş embriyo transferleri (FET) içerdiğini göstermektedir. Aktarılan toplam embriyo transfer sayısı, ≥ 10 ve ≤ 15 , ancak FET'ten sonra düşük gebelik oranı göz önüne alınacak olursa, RIF tanımında sadece taze ET'yi içermesi önerilmektedir. Bu nedenle, merkezlerin çoğu, RIF hastalığını 3 kaliteli ET-yaklaşımından sonra gebelik oluşmaması olarak tanımlamaktadır. Bununla birlikte, ESHRE'nin özel bir grubu olan Preimplantasyon Genetik Tanı (PGD) Konsorsiyumu tarafından RIF'in tanımı, ≥ 3 yüksek kaliteli embriyo transferinden sonra başarısız transfer veya toplam ≥ 10 embriyo transferi sonrasında gebelik başarısızlığı anlamına gelmektedir. Gebeliğin varlığı veya yokluğu, 5. haftadan sonra bir ultrason muayenesi ile teşhis edilmektedir [64].

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, implantasyonun art arda başarısızlığının pelvik ultrasonografi ile tanınabilen durumuna işaret eden klinik bir vakadır. Bu konuyla ilgili birçok yayın olmasına rağmen, RIF için evrensel olarak kabul edilmiş bir tanım bulunmamaktadır [65][66][67]. Bir embriyo için başarıyla implantasyon yapma ihtimali sadece %30'dur, implantasyonun başarısız olma ihtimali yaklaşık %70'dir. Bununla birlikte, iki embriyo transferi sonrasında, her iki embriyoda implantasyonun başarısız olma ihtimali $0.702 = 0.49$ 'dur. 3, 4, 5 veya 6 embriyo transferinden sonra, tüm embriyoların implante başarısızlık ihtimalleri, sırasıyla, $0.70^3 = 0.34$, $0.70^4 = 0.24$, $0.70^5 = 0.17$ ve $0.70^6 = 0.12$ olarak bilinmektedir.

2.6. Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığının Nedenleri

İmplantasyon başarısızlığında, embriyo faktörleri veya endometriyumda bulunan faktörler etkili olabilmektedir. Bunlar; morfolojik faktörler, maternal yaş, uterin kalitesi, gamet/embriyo faktörleri, immunolojik faktörler ve moleküler belirteçler olarak bilinmektedir [1].

2.6.1. Morfolojik Nedenler

Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarının (TİB=RIF) etiyolojisi bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. RIF etiyolojisi üç grupta incelenmektedir. Bunlar; embriyo kusurları, uterus, endometriyum ve tuba uterinalara ait sorunlar ve diğer etkenler olarak bilinmektedir [68]. Yapılan çalışmalara göre implantasyon ve gebelik oranını etkileyen en önemli faktörler oosit/embriyo kalitesi ve endometriyum olarak bilinmektedir [4]. İmplantasyon başarısızlığının üreme çağında önemli bir problem olduğu ve bu durumun sorumlusunun, yetersiz endometrial reseptivite olabileceği düşünülmektedir [69].

İmplantasyonun ve gebeliğin olup olmasını belirleyen diğer temel faktörlerden biri embriyonik faktörlerdir [70]. Embriyo transferine uygun embriyoları seçmek için morfolojik ve mikroskopik olarak değerlendirilmiş embriyo kullanılmaktadır.

2.6.2. Anne Yaşı

Yapılan bir çalışmada embriyo kalitesinin maternal yaşla yakından ilişkili olduğu tespit edilmiş ve yazarlar tanımda maternal yaş sınırının 40 olması gerektiğini belirtmişlerdir [71].

2.6.3. Uterin Kalitesi

RIF'in tanımında iyi kaliteli embriyoların aktarılması bulunurken, RIF uterin faktörlerine de bağlı olabilmektedir [1].

2.6.4. Gamet / Embriyo Faktörleri

Yukarıda önerilen tanıma dayanarak, RIF öncelikle rahim faktörlerinden etkilenebilmektedir. Bununla birlikte, embriyo kalitesini değerlendirmek için kullanılan mevcut yöntemlerin öznel olduğu ve her zaman doğru olmadığı göz önüne alındığında, gamet veya embriyo faktörlerine bağlı vakaların bir kısmından da etkilenebilmektedir [1].

2.6.4.1. Oosit Kalitesi

Düşük oosit kalitesi RIF'in bir nedeni olarak görülmektedir. Bu, daha az sayıda oositin yumurtalığın uyarıldığında daha düşük yanıt vermesine neden olmasından ve yüksek oranda olgunlaşmamış oosit, azaltılmış fertilizasyon oranı ve düşük embriyo kullanım oranından kaynaklanmaktadır. Bu özelliklerin düşük antral folikül sayıları, yüksek FSH ve düşük anti-Müllerian hormonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Oosit kalitesi yaşla ilişkilidir. Yaş ilerlemesi oosit kalitesinin azalmasına, anöploid embriyolara neden olan kromozomal bozukluk artışına, mitokondriyal zar potansiyelinde azalmaya ve mitokondriyal DNA hasarında artışa neden olmaktadır [72]. Agresif yumurtalık stimülasyon protokollerinin kalitesiz oositlerin üretilmesine ve daha fazla dölleme başarısızlığına neden olabileceğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır [73][74][75].

2.6.4.2. Sperm Kalitesi

Düşük kalitede oositlerin kalitesiz embriyo üretebilmeleri gibi, kalitesiz spermatozoonların da kalitesiz embriyo üretimine neden olması mümkün görülmektedir. Geleneksel sperma analiz parametrelerinin sperm kalitesini doğru bir şekilde yansıtmadığı düşünülmektedir. Genetik testler, genom ve epigenom bütünlüğü, fertilizasyon, normal embriyo gelişimi ve başarılı implantasyon için daha faydalıdır. Sigara, genital bölge enfeksiyonu, kemoterapi veya radyoterapi de dahil olmak üzere çeşitli faktörler sperm DNA hasarına sebep olmaktadır.

Sperm DNA hasarının, zayıf embriyo gelişimiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, IVF tedavisini takiben sperm DNA hasarının gebelik oranları üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür. Sonuç olarak, son zamanlarda sperm DNA kullanımında üreme başarısızlığının değerlendirilmesinde, bütünlük testine ilgi artmaktadır. DNA fragmentasyonu, düşük riski ile ilişkili olabilir ancak RIF ile ilişkisi henüz tespit edilememiştir [1].

2.6.4.3. Ebeveynlere Bağlı Kromozomal Anomaliler

Dengeli translokasyonları olan bireylerin genellikle kromozomal sapmalara sahip gametler ürettiği ve bunun da hasarı gametogenez ile tekrarlayan spontan düşük sebebiyle çeşitli üreme başarısızlıklarına neden olabildiği bilinmektedir [1].

Stern ve ark. (1999) IVF başarısızlığının, tekrarlayan düşüklere benzer şekilde, translokasyonların prevalansının beklenenden daha yüksek olduğunu ve açıklanamayan

tekrarlayan IVF başarısızlıklarına sahip çiftlerin, kontrol popülasyonununkinden daha yüksek bir dengeli kromozomal translokasyona sahip olma şansının %2.5 olduğunu tespit etmişlerdir. Raziel ve ark. nın yaptıkları çalışmada yüksek dereceli implantasyon başarısızlıkları ve karyotiplendirme ile seçilmiş bir grup çiftte, yardımcı üreme işleminde tekrarlayan implantasyon başarısızlığına yönelik çalışmaların bir parçası olarak karyotipleme önermektedirler [76]. RIF de dahil olmak üzere üreme yetmezliğinin genetik ve epigenetik bilgisi, bilimsel çalışmaların odak noktası olarak düşünülmektedir [1].

2.6.4.4. Embriyolarda Aneoploidi

Over rezervi bilindiği üzere yaş ilerledikçe azalmaktadır. 35 yaşından sonra oosit kalitesinde de bozulmalar görülmektedir. İleri yaşlarda yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen oositlerde genişlemiş perivitellin aralığın genişlemesi, pellusida, ince zona ve aralık gibi tipik morfolojik değişiklikler görülmektedir. Rezervin azalmasının mekanizması henüz tam olarak bilinmemekte ve çevresel faktörlerin de etkisiyle, oksidatif hasar ve hormonal dengesizlik folikülü bozulmaya götürmektedir. Zarar gören yaşlı oositin hücre siklusu bozulmakta ve anöploid oositler, mayotik ayrılmama, mozaizizm, gebelik kayıpları ile sonuçlanabilmektedir. Preimplantasyon genetik tanı çalışmalarında 35-45 yaş arasındaki hastaların embriyolarında %40 oranında kromozomal anomali görülmekte ve bunların %76'sında anoploidi tespit edilmektedir [77]. İmplantasyon başarısızlığında embriyolardaki en büyük problemin genetik yapılarındaki bozuklukların olması bütün dünyanın ortak görüşü olarak kabul edilmektedir. Reprodüktif yaşlanmadaki kilit nokta oosit sayısının azalmasından ziyade kalitesinde düşüş olmasıdır. Bu etki, genç kadınlardan yaşlı kadınlara yapılan oosit donasyonu sonucu meydana gelen gebeliklerde gösterilebilmektedir [78]. Yaklaşık 35 yaşına kadar anöploid oosit sıklığı %10 iken, 40 yaşında %30, 43 yaşında %50 ve 45 yaşından sonra yaklaşık %100 olarak görülmektedir. Oosit anöploidisi primer olarak birinci mayoz sırasında eş kromatidlerin erken ayrılması sonucu oluşabilmektedir [79]. Kromatid birleşmesi ve ayrışması ile ilgili moleküler araştırmalar kardeş kromatidleri ilgi odağı haline getirmekte ve bunların eş kromatidler arasındaki birleşmelerini sağlayıp mayotik iğne oluşumunda mikrotübüllerin oluşturduğu çekme hareketini engelleyen özel bir protein olduğunu göstermektedir [80]. Sonuç olarak anöploidi tekrarlayan düşüklere ve implantasyon başarısızlıklarına yol açmaktadır.

Preimplantasyon tanı yöntemi ile (PGT) transferi yapılacak embriyolarda genetik açıdan tarama anöploidi riskini ortadan kaldırılabılır.

2.6.4.5. Embriyo Kalitesi

RIF'te embriyo kalitesi önemli bir değişkendir. Embriyo kalitesi düşükse ve başarılı implantasyon olasılığının sadece 0.1 olduğu varsayılırsa, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 embriyoların transferini takiben, tüm embriyoların implantasyon başarısızlığı ihtimalleri sırasıyla 0.81, 0.73, 0.66, 0.59, 0.53 ve 0.48 olarak görülmektedir. Başka bir deyişle, yedi embriyonun hepsinin implantasyon için başarısız olma ihtimali hala %48'dir [81]. İyi kalitede bir embriyo, gelişim gününe karşılık gelen doğru hücre sayısına sahip olması ve 5.günde embriyoların iç hücre kütlesi ve trofoektodermin genişlemesi ve kalitesine göre sınıflandırılmasıyla tanımlanmaktadır. Diğer kriterler eşit boyutta ve düzenli sitoplazmik dağılıma sahip granülasyon göstermeyen ve %10 oranında fragmentasyon içeren embriyo olmalıdır. İyi kalitede bir embriyo tanımının yanı sıra, embriyo değerlendirmesinin mevcut yöntemlerini de göz önüne almalıyız ki bu da hiçbir şekilde mükemmel olamamaktadır [1].

2.6.5. İmmunolojik Faktörler

İmplantasyon başarısızlığının moleküler ve immünolojik yönleri ilginç bir alan olarak görülmektedir. Gebeliğin başlangıcı ile devamı için kritik süreç olan endometriyal stromal hücrelerin farklılaşması, desidualizasyon olarak adlandırılır. Desidualize stromal hücreler, trofoblast invazyonunu düzenleme ve lokal maternal immün yanıtları azaltma yeteneği kazanmaktadırlar [1]. Literatürde RIF'li kadınlarla ilgili çeşitli immünolojik araştırmalar ve tedavileri hakkında çelişkili araştırmalar bulunmaktadır [82][83]. İmmünolojik incelemelerin ya da immünolojik tedavinin yararlı olup olmadığı konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır [1].

2.6.6. Moleküler Belirteçler

Son yıllarda doğal siklus [84][85][86][9] ve yumurtalık uyarımı siklusunda [87] endometriyumun pre-reseptivite ve reseptivite gen ile protein anlatım profillerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda çok sayıda biyobelirteç tanımlanmış olmasına rağmen, farklı yöntemler, teknikler, hasta özellikleri ve zamanlama nedeniyle çalışmalar arasındaki genlerde örtüşme düşük olmaktadır [88]. Günümüzde, bu faktörleri kadınlarda üreme başarısızlığı ile ilişkilendirmek veya terapötik hedef olarak

geliştirmenin zor olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, çalışmalarda önemli farklı ekspresyon profilleri tanımlanmaktadır [89].

2.6.6.1. Sitokinler

“*Uterin Natural Killer*” hücreleri (uNK), endometriyumda en fazla bulunan immün hücrelerdir. Yeterli bölgesel immün düzenleme, angiogenez, plasental gelişim ve gebeliğin sağlanması için önemli olan çeşitli sitokinleri salgılamaktadırlar. Sitokin olarak tanınan LIF'in proliferasyon, farklılaşma ve hücre sağkalımı gibi süreçlerde, otokrin ve parakrin etkilerinin tespit edilmiştir ve söz konusu sitokinin implantasyondaki rolü araştırmacılar tarafından göstermiştir. RIF hastalarında LIF gen mutasyonlarının varsayılan rolü araştırılmış, RIF ve açıklanamayan infertiliteye sahip hastalarda, insan endometriyum hücreleri tarafından LIF sekresyonu yalnızca proliferatif seviyeden sekretuar faza hafifçe yükseldiği gösterilmiştir [89].

Bununla birlikte, 2009'da yapılan ilk randomize kontrollü klinik çalışmada, rekombinant LIF'in çalışma grubunda en az iki başarısız ART (“*Assisted reproductive technology*”) siklusu olan hastalarda daha yüksek implantasyon olduğu tespit edilmiştir [90].

IL-1 (“*Interleukin-1*”) sisteminin implantasyon sürecindeki ilgisi fare deneyleriyle tespit edilmiştir ve IL-1'in endometriyal epitel hücrelerinin (EEC'ler) kültür ortamına eklenmesi, integrin $\beta 3$ ekspresyonunun ve dolayısıyla blastosist implantasyonunun artışına yol açtığı görülmüştür [89]. IL-15 ve IL-18 ekspresyonunun, başarısız implantasyonlu hastalarda, fertil kontrollerle karşılaştırıldığında farklı olduğu gösterilmiş ve her ikisinde de bölgesel uNK, angiogenez ile korelasyon göstermiştir [91].

IL-6 eksikliği farelerde implantasyon ve fertilitenin azaldığını ve ikinci fazın sonuna doğru IL-6'nın anormal ekspresyonu, tekrarlayan düşük (RM; “*Recurrent miscarriage*”) hastalarında tespit edilmiştir. IL-11 ve IL-11 α ile ilişkili çalışmalar, bu belirteçlerin anlatımının RM hastalarının endometriyal biyopsilerinde fertil kontrollerle karşılaştırıldığında daha düşük olduğunu göstermekte ve endometriyal deidüalizasyonda rol oynadığını düşündürmektedir [89].

2.6.6.2. Prostaglandinler (PG)

PG'lerin başarılı embriyo implantasyonu için kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir [92][93]. Siklooksigenazlar (COX-1 ve COX-2) çeşitli PG'lerin sentezinden sorumlu enzimlerdir ve progesteron tarafından miktarlarında artışlar olmaktadır [94]. Yapılan bir çalışmada, RIF ve cPLA2 α (“*cytosolic phospholipase A₂ alpha*”) ve COX-2 seviyeleri düşük olan hastalar kontrollerle karşılaştırılmış ve eksikliğe yanıt olarak, sPLA2-IIA'nın (“*group IIA secretory phospholipase A₂*”) aşırı eksprese edildiği bulunmuştur [95]. Prostaglandin sentezi, tekrarlayan IVF başarısızlığı olan hastalarda fertil kontrollere kıyasla bozulmaya neden olmaktadır. Açıklanamayan tekrarlayan düşük ve düşük VEGF (“*Vascular endothelial growth factor*”) seviyesi olan hastalarda azalmış COX-2 ve birkaç prostaglandin seviyesi de tespit edilmiştir. COX türevi sinyal yolağı başarılı embriyo implantasyonunda önemli bir rol oynamaktadır [89].

2.6.6.3. Musinler

Endometriyumda, MUC-1-glikoprotein lümen epitelyal endometrial tabakadaki glikokalizin ötesine uzanmakta ve implantasyon için bir bariyer görevi görmektedir. İnsan *in-vitro* implantasyon modelleri MUC-1 anlatımının implantasyon penceresi sırasında arttığını ve embriyonun tutunduğu alanda kaybolduğunu göstermektedir. Tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda endometrial MUC-1, normal bir hasta grubu ile karşılaştırıldığında anlatımında azalma görülmektedir [89]. MUC-1, oldukça polimorfik bir gendir. MUC-1'in allel büyüklüğü ile implantasyon başarısızlığı arasında ilişki 2001'de yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [96]. 2004 yılında yapılan başka bir çalışmada ise implantasyon başarısızlığı olan 10 kadın ve kontrol grubu olarak 10 fertil kadının MUC-1 genotipi karşılaştırılıp ilişki bulunmadığı tespit edilmiş ve tekrarlayan düşük öyküsü olan hastalarda hiçbir ilişki bulunamamıştır [89].

2.6.6.4. Hücre Yapışma (“*Adhesion*”) Molekülleri (CAM)

CAM ailesi integrinler, selektinler, kadherinler ve immünoglobülinler olmak üzere dört üyeden oluşmaktadır. Bu yüzey ligandları, genellikle karbonhidrat glikoproteinleri, hücre-hücre yapışmasına aracılık etmektedir. AV β 3 integrin ve ligand osteopontininin anlatımı, WOI'nin açılması ile çakışır; endometrial luminal epitelyal yüzey üzerindeki immünohistokimyasal yöntemle ortaya çıkmakta ve ilk olarak trofoblastla karşılaşmaktadır. Anormal α V β 3 integrin ekspresyon paterni,

açıklanamayan infertilite [97], endometriyoz [98] ve polikistik over sendromu [99] gibi diğer jinekolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. 21. gündeki düşük integrin mRNA düzeyi, normal seviyelere kıyasla %50 daha düşük implantasyon oranı ile ilişkili görülmüştür [100]. Diğer luminal kısımlar, embriyonal L-selektin'e tutunan luminal epitelyal hücreler üzerinde bulunan oligosakarit ligandlarını içermekte ve selektinlerin de embriyo-maternal etkileşimlerin erken olaylarına katkıda bulunduğu görülmektedir. “*E-cadherin*”, hücre-hücre yapışması fonksiyonu ile ilişkili olarak en fazla çalışılan kadherin tipidir. Kalsitonin anlatımı ile ilişkili olan progesteron anlatımının azalmasının muhtemelen embriyo invazyonunda rolü bulunmaktadır. Normalde tekrarlayan implantasyon başarısızlığına bağlı selektinlerin veya kadherin anlatımının rolü tam olarak anlaşılamamıştır [89].

2.6.7. Gen Anlatımı

RIF hastalarının, kontrollere kıyasla reseptif faz esnasında gen anlatımlarında normal fertil kadınlara göre farklılıklar görülmektedir. Bu genlerin, hücre döngüsünün Wnt sinyali ve hücresel adesyon gibi yollarında etkili olduğu gösterilmiştir. Hematolojik sistemdeki DNA transkripsiyonu ve faktörlerinin farklılık gösteren genlerin yollarında etkili olduğu tespit edilmiştir. IF “*Implantation Failure*” örneklerinde hücre aracılı immün yanıt ve sinir sistemi gelişiminde gen anlatımının, yüksek derecede anlatım değişikliği gösterdiği tespit edilmiştir. RM, humoral bağışıklık yanıtı organ ve kas gelişiminde anormal gen anlatımı göstermektedir [89]. Diaz-Gimeno ve ark. endometriyal reseptivite için ön belirleyici olarak bir biyobelirteç seti geliştirmişlerdir. Bu biyomarker endometriyal reseptivite için sensitif ve spesifiktir ancak RIF gibi patolojik sınıflamaları saptamak için spesifitesi yeterli görülmemektedir [9]. RIF hastalarında P53 geninin önemli ölçüde homozigot genotip gösterdiği bilinmektedir [101][102].

Farelerde MSX homeobox gen delesyonu blastosist implantasyonunu inhibe etmekte ve [103] mikrodizilim analizleri bu genlerin fare implantasyonu ile oluşanlara benzer şekilde insanlardaki reseptivite pencere sırasında anlatımlarının azaldığı gösterilmiştir. Araştırmada MSX “*knock-out*” hayvanların uterusunda implantasyonu başlatamaması ile birlikte MSX genlerinin implantasyon penceresinin başlangıcında rol oynadığını ileri sürmüştür [89].

Son bulgular, endometriyumun sekretuar fazında, bazı hücre döngüsü genlerinin anlatımını azaltan miRNA'ların rol oynadığını düşündürmektedir [12]. RIF hastalarında 13 miRNA'nın farklı şekilde anlatım yaptığı tespit edilmiş ve ilgili genlerin Wnt sinyalizasyonunda, hücre döngüsü yollarında ve adezyon moleküllerinin oluşmasında rol oynadıkları gösterilmiştir [14].

2.6.7.1. MikroRNA'lar (miRNA'lar)

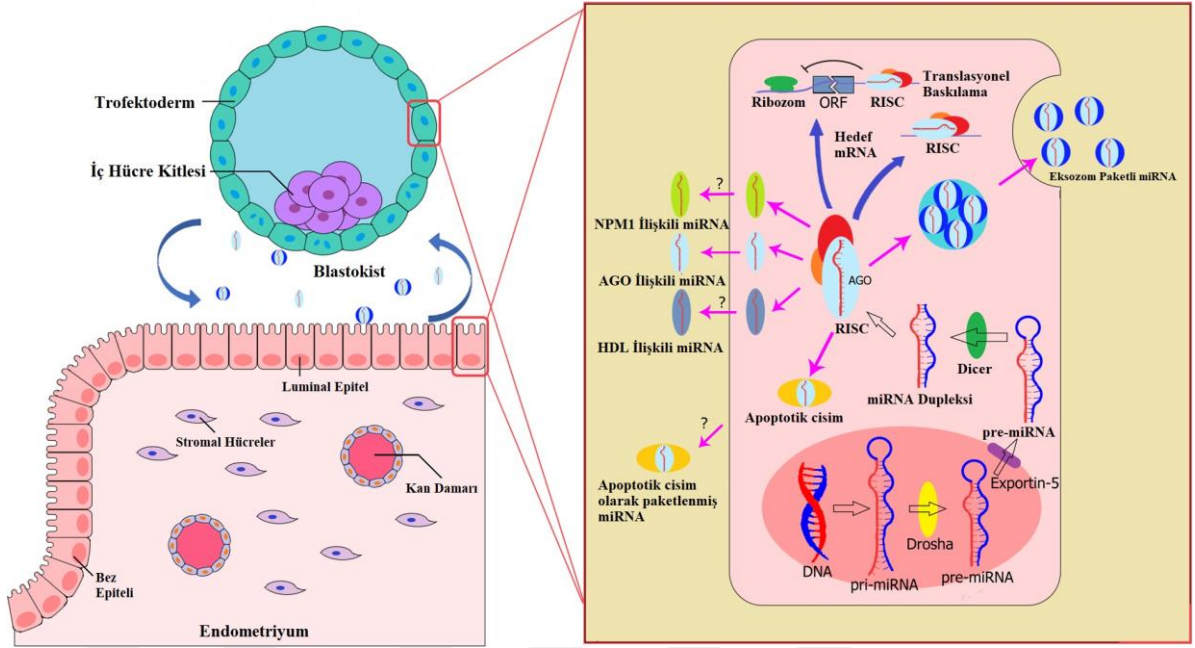
MikroRNA'lar (miRNA'lar), hedef mRNA'lara bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen ve böylece proteine translasyonu inhibe eden küçük (yaklaşık 22 nükleotid) kodlanmayan RNA olarak tanımlanmaktadır. MikroRNA'lar, erken embriyo gelişimi ve kök hücre farklılaşması başta olmak üzere geniş bir biyolojik süreçler dizisinde rol oynamaktadır [104]. MiRNA'lar, hücresel farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi bazı biyolojik süreçlerdeki implantasyonda rol oynamaktadırlar [105][106]. Bu nedenle endometrial reseptivitedeki rollerini araştırmak için çeşitli araştırmalar yapılmıştır [12]. Fertil kadınların endometrial epitel hücrelerinde mRNA ve miRNA profilleri sırasıyla proliferatif ve orta-sekresyon fazlarında incelenmiş ve miRNA'nın, ilgili genlerin ifadesini düzenleyerek endometrial reseptiviteyi etkilemede rol oynadığı tespit edilmiştir [13].

2.6.7.2. MiRNA Biogenezi Ve Salgılanması

MiRNA üretimi, nükleusta, RNA polimeraz II aracılı transkripsiyon ile başlayıp saç tokası şeklinde pri-miRNA oluşumu ile devam etmektedir. Saç toka yapısı her iki taraftan Drosha (RNAaz III endonükleaz) ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından kesilip 70-90 nükleotidden oluşan pre-miRNA'ya dönüştürülmektedir. Pre-miRNA, nükleer eksportin faktörü “*exportin-5*”e bağlanıp GTP hidrolizi ile sitoplazmaya aktarılabilir ve sitoplazmada başka bir RNAaz III enzimi olan “*Dicer*” tarafından yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda çift iplikli miRNA'ya kesilmektedir [107]. Bu dubleksin olgun diziye kesilmesi ile gereken iplik, onu hedef mRNA'ya yönlendiren RISC (ribonükleoprotein kompleksi olan RNA-indüklenmiş susturucu kompleks) Argonaute'a yüklenmektedir [108]. RISC kompleksinin şekillenmesi için PACT, TRBP ve “*Argonaute*” (Ago) proteinlerinin bir araya toplanması gerekmektedir. “*Dicer*” enzimi bu kompleksi başlatan enzimdir. Olgun miRNA ve hedef mRNA'nın bir araya gelmesi için RISC kompleksi gerekli olmaktadır [109]. Bir miRNA ve mRNA hedefinin 3'UTR arasındaki baz eşleşmesi, esas olarak, çekirdek dizisi olarak adlandırılan,

miRNA'nın 5'-ucundaki 6-8 nükleotid dizisi ile belirlenmektedir. Yüklü miRNA'nın 5' m-çekirdek bölgesi arasındaki hedef mRNA 3'UTR değeri ile dizi tamamlayıcılığı, mRNA susturma mekanizmasını belirlemektedir (Şekil 2.3). Doğru baz eşleştirme homolojisi genellikle mRNA bölünmesine ve bozulmasına yol açarken, kusurlu baz eşleşmesi protein çevirisinin baskılanmasına yol açmaktadır. Tek bir miRNA, çeşitli mRNA'ları hedefleyebilmekte ve tek bir miRNA'nın yanlış sentezlenmesi yüzlerce proteinin anlatımını bozup bu yüzden tümör ilerlemesini teşvik edebilmektedir [110]. Yani miRNA'lar hedef mRNA'ya tam ve ya kısmi bağlanabilmektedir [111][112]. Eşleşmenin tam olması durumunda hedef mRNA'yı RISC yıkarken, kısmi olması durumunda ise hedef mRNA translasyonu baskılanmaktadır [113].

Hücre ve dokularda yaygın olarak bulunan miRNA'lar çeşitli biyolojik süreçlerde yer almaktadır. Birçok çalışma ile üremede miRNA'ların rolü tespit edilmiştir ve miRNA'ların oogeneze, döllerme, implantasyon ve plasenta düzenlenmesinde rol oynadığı görülmüştür. MiRNA'ların düzensizliğinin polikistik over sendromu [114] ve endometriyozis gibi üreme bozuklukları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [115]. MiRNA'lar periferik kanda ve anne sütü, tükürük, idrar, semen ve ULF “*uterine luminal fluid*” gibi diğer biyo-sıvılarda bulunmuştur. Son çalışmalar ile miRNA'ların hücre dışına da salındığını gösterilmiş ve bu hücre dışı miRNA'ların stabil şekilde kalıp endojen RNazlardan korunduğunu, bunun da kanserler dahil olmak üzere patolojik durumların tespiti ve tanısı için invaziv olmayan biyo-belirteç olma fizibilitesi olduğu tespit edilmiştir [116].



Şekil 2.3: Embriyo maternal etkileşimlerine hücre dışı miRNA'lar katılmaktalar. Nukleusda miRNA'lar birincil (primary) miRNA (pri-miRNA) transkriptleri olarak sentezlenir. Pri-miRNA'lar daha sonra Drosha tarafından miRNA öncüleri (pre-miRNA) olarak bilinen nükleotid saç tokası oluşturmak için işlenir. Daha sonra, pre-miRNA'lar, nukleustan “*exportin-5*” tarafından sitoplazmaya aktarılır ardından “*Dicer*” tarafından küçük RNA dupleksine dönüştürülür. Sonunda, RNA-kaynaklı susturucu kompleksi (RISC) oluşturmak için “*Argonaute*” (AGO) protein ailesine yüklenir ve olgun miRNA, mRNA bölünmesine ya da translasyonel baskıya yol açar. MiRNA'lar, hücreler tarafından çeşitli biçimlerde salgılanabilir: proteinlerle ilişkili (örn. Argonaute familyası veya AGO, nükleosminzin 1), lipoproteinlere bağlı (Yüksek dansiteli lipoprotein), apoptotik cisimlere veya membrana bağlı hücre dışı keseciklere (EVs) kapsülendir. Uterin ve embriyo türevli miRNA'ların eksozomlar ve AGO1 ile ilişkili olduğu bildirilmiştir, diğer paketlenme şekillerinin endometriyal hücreler ve/veya embriyonik hücreler tarafından uygulanıp uygulanmadığı açık değildir. ORF (“*Open Reading Frame*”) [116].

2.6.7.3. MiRNA Fonksiyonu

MikroRNA'lar işlevlerini kendi nükleotid dizilerine tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliği ile gerçekleştirmektedirler. Olgun miRNaya bağlı bulunan RISC kompleksi sayesinde hedef mRNA'ya baz eşleşme özeliği sayesinde bağlanmaz. Bunun sonucunda hedef mRNA'nın protein translasyonu durmakta ya da mRNA yıkıma uğramaktadır. Olgun miRNA'lar hedef mRNA'ların 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesine (UTR) ya da ORF (“*Open Reading Frame*”) bölgesine bağlanarak fonksiyonunu gerçekleştirmektedir. 3'UTR bölgesine bağlanma tam olarak gerçekleşmediği durumda translasyon baskılanmaktadır (Şekil 2.3a ve 2.3b). ORF bölgesine bağlanma tam tamamlayıcılık gösterip Ago2 tarafından mRNA'nın yıkımı ile

sonuçlanmaktadır (Şekil 2.3c). Hedef mRNA'nın tespiti miRNA'ların 5' ucunda 2-7 nt (genelde 6 nt) uzunluğunda çekirdek dizi tarafından gerçekleşmektedir [117].

Vasudean ve ark.'nın çalışmasında miRNA'ların genel olarak belirlenen bu fonksiyonlarından başka bazı durumlarda hedef mRNA'ların anlatımlarının artmasına neden olduğu tespit edilmiştir [118]. Araştırmalarda Ago2'ye bağlı olgun miRNA'ların "*fragile X mental retardasyonu ile ilgili protein 1*" (FXR1- iso-a) proteinleri ile birlikte hedef mRNA'nın AU-zengin elementlerine bağlanarak ilgili mRNA'nın anlatımının arttığı saptanmıştır. Araştırmalarda memeli hücrelerinde miR-369-3p ve miR-206 sırayla tümör nekroz faktör α (TNF α) ve "*Kruppel-Like Factor 4*" (KLF4) genlerinin 3'UTR bölgesine AU-zengin elementlerine bağlanarak bu genlerin anlatımının artmasına neden olduğu tespit edilmiştir [118][119][120]. Her miRNA'nın birden fazla bazen de yüzlerce mRNA'yı düzenleme özelliğine sahip olduğu, bu sebeple de çoğu genlerin düzenlemesinde etkili oldukları tespit edilmiştir [121][117]. MiRNA'lar ve hedefledikleri genlerin şaşırtıcı şekilde evrimsel olarak korunduğu görülmüştür [117].

2.6.7.4. Anormal Embriyo Gelişiminde miRNA'ların Rolü

Son 30 yılda biyoteknolojideki gelişmeler ile IVF laboratuvarındaki sonuçlarda büyük ölçüde gelişmeler görülmüştür. Bu gelişmelerin bazılarını intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), geliştirilmiş kültür ortamı, yeni oositler ve embriyo dondurma teknikleri ve preimplantasyon genetik tanı oluşturmaktadır. IVF başarısızlığının en sık nedenlerinden birinin kromozomdan kaynaklandığı bilinmekte ve kromozom anormalliklerinin anormal embriyolara ve sonuç olarak kötü klinik sonuçlara yol açtığı görülmüştür [18]. Yang ve ark.'nın çalışmasında [2] sadece morfolojiye göre seçilen blastosistlerde, embriyo taraması için genetik araçların önemini vurgulayarak %44,9 anöploidi olduğunu tespit edilmiştir.

İyi prognozu olan ve yasal veya ekonomik nedenlerden dolayı PGS yapılamadığı durumlarda, hızlandırılmış teknolojiyle [122] embriyo seçimi, hali hazırda kromozomal olarak normal embriyoların seçilmesi için invazif olmayan bir alternatifi temsil etmektedir [123]. Ayrıca, proteomik, metabolomik ve sekretomik gibi yeni teknolojilerin kullanımı ile birlikte embriyo gelişimiyle ilgili artan bilgi, ART'deki klinik sonuçların iyileştirilmesi amacıyla, kaliteli embriyoların potansiyel yeni biyobelirteçlerinin belirlenmesine yol açmıştır. Bu bağlamda, miRNA'ların embriyo gelişimi için noninvaziv biyobelirteçler olduğunu göstermektedirler. Bazı çalışmalar,

miRNA'nın embriyo gelişimi ve çeşitli türlerde kök hücre farklılaşmasında kritik bir rol oynadığını ortaya koymuş olsa da sadece birkaç çalışma insan embriyolarında miRNA'ların anlatımını analiz etmiştir [18].

Daha önce hem fare embriyolarında [124][125][126] hem insan embriyonik kök hücrelerinde bulunan 12 miRNA'lık bir dizi için insan dondurulmuş blastosistlerinde qPCR yapılmış ve [127] (RNU48, hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7g, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-21, hsa-miR-24, hsa-miR-34b, hsa-miR-92, and hsa-miR-93) araştırmacılar, ilk olarak, erkek faktörü infertilitesi ve polikistik over (PCO) hastalarından elde edilen blastosistlerin anormal miRNA profilleri sunduklarını gözlemlemişlerdir [18]. Daha spesifik olarak, fertil kontrol blastosistleri ile karşılaştırıldığında, erkek faktörü infertilitesi olan hastalarda, iki miRNA'da (hsa-let-7a ve hsa-miR-24) anlamlı bir düşüş görülürken, PCO'lu hastalarda her 6 miRNAda da anlatımın azaldığı bulunmuştur (hsa-let-7a, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-24, hsa-miR-92 ve hsa-miR-93). Bu bulgular, benzer kalitede embriyoların, implantasyon başarısızlığına katkıda bulunan embriyolarda anlatımı olan anormal miRNA profillerine bağlı olabilen farklı klinik sonuçlara yol açabileceğini göstermektedir. Bu da farklı olarak ifade edilen miRNA'ların gen hedefleri, gen ontolojisi biyolojik süreçleri ve hücre büyümesi ve transkripsiyonu veya nükleik asit bağlanması gibi moleküler fonksiyonlarla ilişkili olarak görülmektedir. Örneğin, hsa-miR-19a ve hsa-miR-19b'nin gen hedefleri, interleukin-6 (IL-6) büyüme sinyalinin inhibisyonunda rol oynayan “*suppressor of cytokine signaling 1*” (SOCS1)'in negatif düzenlenmesini göstermektedir [18]. Daha önce belirtildiği gibi, miRNA'lar, gen ifadesinin negatif veya pozitif düzenleyicileri olabilmekte ve miRNA anlatımında azalma, gen anlatımının düzenlenmesinde yer alan belirli mekanizmalara bağlı olarak bir hedef gen anlatımında artışa veya azalmaya yol açabilmektedir [128]. MiRNA'ya ait olduğu tahmin edilen üç hedef genin, ARIH2 (“*Ariadne RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase 2*”), KHSRP (“*KH-Type Splicing Regulatory Protein*”) ve NFAT5 (“*Nuclear Factor Of Activated T Cells 5*”) anlatımının, fertil hastalarla karşılaştırıldığında erkek faktör infertilitesi veya PCO hastalarından elde edilen embriyolarda değiştirildiği gösterilmiştir. Değiştirilmiş miRNA anlatım profiline bağlı olarak ARIH2 ve KHSRP'nin anlatımının arttığı ve blastosistlerde NFAT5'in anlatımının azaldığı saptanmış, dolayısıyla miRNA anlatım değişikliği miRNA hedef genlerinin değiştirilmiş ifadesiyle sonuçlanabileceğini düşündürmüştür [18].

Rosenbluth ve arkadaşları, kadın ve erkek embriyolarında anlatımı yapılan yedi miRNA'nın yanı sıra öploid ve anöploidi embriyolar üzerinde çalışmıştır. MiR-141, miR-27b, miR-339-3p ve miR-345 dahil olmak üzere bazı miRNA'nın, anöploid embriyolara karşı öploidde farklı şekilde anlatım yaptığı gözlemlenmiştir [129]. Bu, miRNA'lar, insan embriyolarının gebeliğin başlangıcından itibaren prognozunun erken bir göstergesi olarak kabul edilebilmektedir. Ayrıca, son zamanlarda IVF kültür ortamındaki miRNA'ların diferansiyel anlatımının, IVF başarısının potansiyel bir göstergesi olarak kullanılabileceği gösterilmektedir. Aslında, IVF örneklerinde salgılanmış miRNA'ların embriyonik anöploidi ile ilişkili olduğu, bunun da embriyo transferi öncesi kromozomal durumun belirlenmesine yardımcı olup bu sayede gebelik sonuçlarını iyileştirdiği gözlemlenmektedir [130].

Bu aşamada embriyonik miRNA'ların hedefleri, gelişmeyi, hücre çoğalmasını ve farklılaşmayı düzenlemek için gerekli görülmektedir. Cinsiyete veya ploidi durumuna göre farklı miRNA'ların ifadesini gösteren bu veriler, miRNA'ları insan embriyonun potansiyelinin ümit verici belirteçleri olarak daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, miRNA'lar ve kodlama genleri arasındaki çapraz düzenlemeyi bilmek, belirli klinik durumlara veya prognostiklere özgü profilleri tanımlamaya yardımcı olabilmektedir [18].

2.6.7.5. Biyobelirteç Olarak MiRNA'ların Önemi

MikroRNA'ların hedef gen anlatımını değiştirmesinin yanı sıra biyobelirteçleri de temsil ettiği bilinmektedir. Primer tümörlerde miRNA anlatım profillerinin incelenmesi, mikroRNA profillerinin gelişimsel soyu ve farklılaşma durumunu yansıttığını ve mikroRNA profillerinin daha önce kullanılan mRNA profillerine göre orjini bilinmeyen tümörlerin sınıflandırılmasında daha doğru olduğunu göstermektedir. Yakın zamanlarda, mikroRNA'ların primer tümörden sirkülasyona salındığı görülmüş ve bu hücre içermeyen miRNA'ların tüm kan, serum, plazma, idrar ve tükürük dahil olmak üzere hemen hemen tüm vücut sıvılarında bulunduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların sert koşullar altında oldukça stabil olduğu ve yüksek sıcaklıklar, aşırı pH ve RNaz aktivitesine dayanıklı olduğu gösterilmiştir [110]. Bu durum vücut sıvılarındaki mikroRNA'ların stabilitesi, Ago proteinleri, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile birleşme ve ekzozomlara paketlenme ile kompleks haline getirilip RNaz bozunmasından korunmuş olmaları ile açıklanabilmektedir [131]. Kanserde sık sık

düzensizlik olduğu göz önüne alındığında, dolaşımdaki miRNA'ların dokuya özgü ifade şekilleri ve vücut sıvılarında yüksek stabiliteleri, hastalıkları teşhis etmek, prognozu öngörmek ve terapötik yanıtı ölçmek için invaziv olmayan biyobelirteçler olarak ideal aday olduklarını düşündürmektedirler [110].

2.6.7.6. Embriyo-Endometriyum Etkileşiminde MiRNA'ların Rolü

Embriyo ve endometriyum arasındaki senkronize gelişim, başarılı bir implantasyon için gerekli görülmekte ve belirli bir zaman aralığının ötesinde embriyo-endometriyum uyumsuzluğuna ve implantasyon oranının azalmasına neden olmaktadır [132]. Östrojen ve progesteronun düzenlenmesinin yanı sıra hem embriyo hem de endometriyum, bir taraftan diğer tarafa bilgi vermek ve gelişimlerinin aşamasını ayarlamak için sinyaller salgılayabilmektedirler [116].

Çift yönlü iletişimin gerçekleştiği mikroçevrenin incelenmesine yönelik ilgi artmaktadır. Uterus kavitesinde, luminal ve glandüler epitelyum tarafından salgılanan ve embriyo ve endometriyal epitelyum ile yakın temasta bulunan ULF “*uterine luminal fluid*”nin embriyo gelişimi ve implantasyonu için gerekli olduğu düşünülmektedir [133]. ULF'nin salgılanması profillerinin endometriyumun alıcı durumunu yansıttığı düşünülmekte ve bu yüzden ULF'nin invazyon olmayan bir biyobelirteç kaynağı olduğu düşünülmektedir. Eksozomlar/mikro-tanecikler içinde bulunan miRNA'lar, türler arasında ULF ve uterus aspiratlarında tespit edilmiştir ve implantasyon sırasında embriyo-maternal etkileşimlerde rol oynayabilecekleri ileri sürülmüştür [116].

Dokuda miRNA'lar

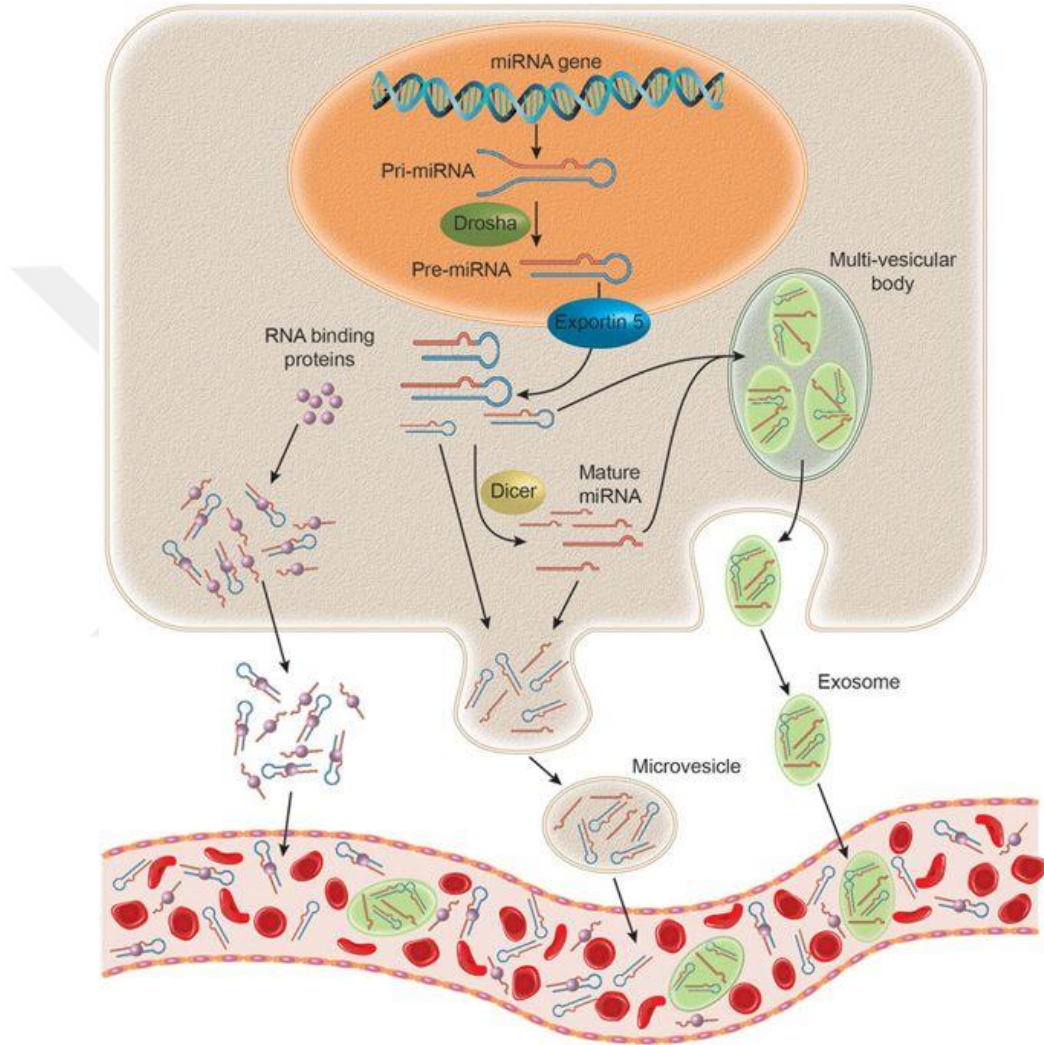
Farklı dokulardaki bulunan miRNA'lar çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir ve bu çalışmalardan en kapsamlı analizi ilk kez Landgraf ve ark. tarafından dizilemeye dayalı yöntem kullanarak 2007'de yapılmıştır ve sonuçta 26 farklı organda 340 miRNA tespit edilmiştir [134]. Devamındaki çalışmalarda dokulara özgü miRNA'lar saptanmıştır. 2007 yılında Pan ve ark. tarafından yapılan çalışmada endometriyal dokularda miRNA anlatımını değerlendirmek için, menstrual döngünün erken ve orta sekretuar fazındaki kadınlardan, stromal ve epitelyal birincil hücre kültürlerinde izole edilmiş miRNA'ların anlatımı karşılaştırılmış ve farklı ifade edilen 32 miRNA saptanmıştır. Endometriyuma özgü miRNA anlatımı, hücre tipi bağımlı olarak ortaya çıkmıştır ve endometriyal hücreler arasında miRNA aracılı “*cross-talk*” olasılığını arttırmıştır. Anlatımı farklı olan miRNA'lar, transforme edici büyüme faktörü

β (TGF β), TGF β reseptörleri, östrojen reseptörleri, progesteron reseptörleri ve aromataz (CYP19A1) dahil olmak üzere birçok endometrial fonksiyonda kritik rol oynadığı bilinen hedef genleri etkilediği tespit edilmiştir [135]. Petracco ve ark, 2011 yılında menstrual döngüye özgü endometrial anlatım modelleri kullanarak miR-135a ve miR-135b'nin erken sekretuar endometrial dokularda anlatımlarının azaldığını göstermiştir ve bu nedenle transkripsiyon faktörü olan Homeobox A10'un (HOXA10) anlatımının doğrudan baskılandığını tespit etmişlerdir. İnsan endometriyumunda, implantasyon penceresi sırasında endometrial reseptivite için gerekli olan çeşitli hücre adezyon molekülleri ve sinyal transdüksiyon faktörleri HOXA10 tarafından düzenlenmektedir [136].

Serumda miRNA'lar

Klinikte tanı yöntemlerinde, miRNA'ların hastalıkların prognozu ve tedaviye yanıtta önemli yararları olduğu bilinmektedir. Fakat invaziv yöntemler ile örnek eldesi (cerrahi yada biyopsi) hastalar için rahatsız edici bir durum olduğundan dolayı çalışmalar dolaşımda (plazma/serum, idrar veya tükürük) bulunan miRNA'ların araştırılmasına odaklanmaktadır [137][138]. Serum miRNA'larının izolasyonu ve güvenilir bir şekilde belirlenebilme durumu ilk kez Lawrie ve ark. nın yaptıkları bir çalışmada tespit edilmiştir [139]. Günümüzde serumda bulunan miRNA'ların kanser ve reproduktif hastalıklar gibi durumların klinik taranmasında birçok avantajı vardır. Bu avantajların birincisi, seruma dayalı biyobelirteç olması, biyopsi veya cerrahi gibi invazif prosedürler gerektirmeden vakalardan alınan örneklerin kapsamlı analizine izin vermesi, ikincisi serumdan miRNA analizinin maliyetinin düşük olması, örnek toplamanın basit olması ve işleme dahil olmak üzere kolay bir yaklaşım sürecine sahip olması, üçüncüsü serum miRNA bazlı bir test ile tek bir miRNA yerine bir kanserin saptanması için belirteç olarak bir miRNA panelinin taranmasıdır. MiRNA paneli, tümör oluşumunun çeşitli yönlerini yansıttığından, bu miRNA'ların kombinasyonu, geleneksel tek protein veya karbohidrat moleküllü biyobelirteçlerle kıyasla tümör tespiti için daha spesifik bir gösterge oluşturmaktadır [140]. Dolaşımda bulunan miRNA'ların stabilite ve kökeni için en az iki hipotez bulunmaktadır (Şekil 2.4). Bu hipotezlerin birincisi; doku hasarı sırasında pasif salınımının meydana gelmesidir. Örneğin miRNA-208'in kalbe özel olarak anlatım yaptığı ve kalp dokusu hasarı sonrası serumda miktarının arttığı tespit edilmiştir [141]. Tümörlerde yüksek oranda proliferasyon ve

hücre parçalanmasının kan dolaşımında miRNA'ların artmasına neden olmaktadır. Hipotezin ikincisi; miRNA'ların küçük parçacıklar halinde bulunması ve bu nedenle RNaz aktivitesine karşı korunmasıdır. Son zamanlarda, hücreler arasında mRNA ve miRNA transferinin mikrovезiküller yoluyla gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir [142].



Şekil 2.4: Sitoplazmada olgun miRNA'nın oluşumu. Olgun miRNA'nın 3 şekilde hücre dışına salgılanması; birincisi proteinlere bağlı şekilde hücre dışına salgılanması. İkincisi olgun miRNA'nın hücre membranlarından oluşan mikrovезiküllerle hücre dışına salgılanması. Üçüncüsü eksozomlarda bulunan olgun miRNA'ların ekzositozla hücre dışına salgılanması.

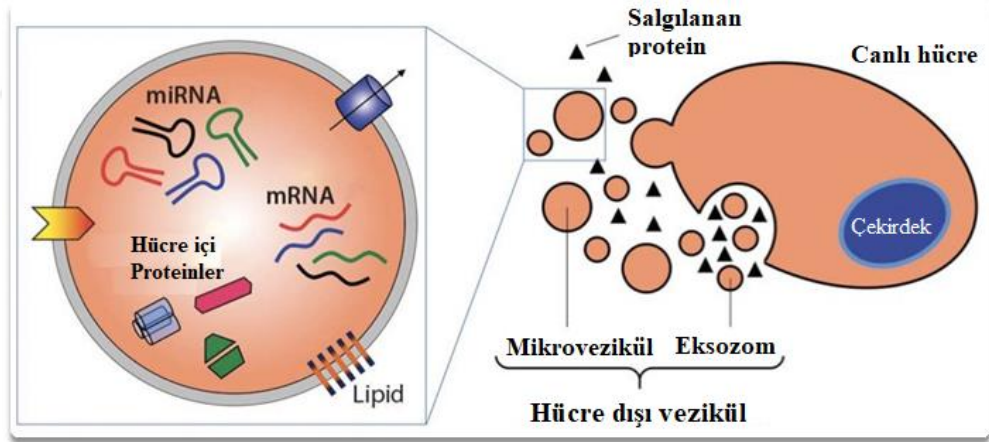
Eksozomlar:

Hücre dışı miRNA'ların ana formlarının; proteinler (örn., AGO ailesi, Nukleophosmin 1), lipoproteinlere bağlı (yüksek dansiteli lipoprotein), apoptotik

cisimciklere kapsüllenmiş veya membrana bağlı ekstraselüler vesiküller (EVs); mikro-tanecik ve eksozomlar olarak bilinmektedir (Şekil 2.4). Bu formlar arasında, proteine bağlı miRNA'lar hücre dışı plazma ve hücre kültürü ortamında hücre dışı miRNA'ların en büyük kısmını oluşturmaktadır [116]. EVs'ler, hücreler tarafından salınan zar vesikülleridir ve miRNA'lar dahil olmak üzere lipid, proteinler ve nükleik asitleri taşıyan araçlar olarak işlev görmektedirler [143]. EVs ile ilişkili miRNA konsantrasyonu diğer hücre dışı miRNA'larla karşılaştırıldığında çok düşük olmasına rağmen, seçici olarak zenginleştirilebilen, hücreler tarafından aktif olarak salınabilen ve biyolojik işlevleri yerine getirebilen en yaygın miRNA formu olarak bilinmektedir [116]. Yapılan çalışmalar ile salgılanan EVs'de tek tek proteinlerin ve RNA'ların seçici paketlenildiği ve zenginleştirildiği gösterilmiştir [144]. Bu da belirli EVs salınmasının vücut koşulları ile yakından ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Ancak seçici paketlenme mekanizması iyi anlaşılmamıştır. EVs'in çoklu fizyolojik ve patolojik süreçlere katıldığı bilinmektedir. EVs'in tümör oluşumu, yayılabilirliği ve metastazdaki rolünü araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır [145] Yapılan bir çalışmada kanserden türetilmiş EVs'in tümör hücrelerinin invaziv yeteneklerini modifiye ettiği ve yayılmasını teşvik ettiği gösterilmiştir [146].

EVs'ler, mikro-tanecik (çap olarak 100- 1000 nm) ve eksozom (çap olarak 150 nm'den küçük) olarak iki grupta incelenmektedirler [116](Şekil 2.5). Eksozomların yüzeyinde spesifik moleküller, alıcı hücrelerin hedeflenmesini sağlamak için bulunmaktalar. Alıcı hücrelerine ulaştıklarında, eksozomlar içindekileri membran yüzeyi veya endositoz üzerindeki reseptörlere bağlayarak ya da doğrudan membranla kaynaşarak serbest bırakıp alıcı hücrenin işlevlerini değiştirmektedir [116]. Eksozomlar, farklı hücre tiplerinden, örn. retikülositler, dendritik hücreler, B/T hücreleri ve mast hücrelerinden salgılanmaktadırlar. Ek olarak, intestinal epitelyal hücreler ve nöroglial hücreler gibi hematopoietik olmayan hücrelerin de mikrovezikülleri serbest bırakabileceği gösterilmiştir [142]. Eksozomlar, hücreler arası iletişim için önemli olduğu düşünülmekte ve kaynaklandığı hücrelerin yüzey reseptörleri/ligandlarına sahip olma nedeni ile spesifik hedef hücrelere seçici olarak etki etme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Eksozomlar, mRNA'ları başka hücrelere yatay olarak aktarabilmekte ve bu da yeni hücrelerde fonksiyonel proteinlere dönüştürülebilmektedir. Benzer şekilde miRNA'lar eksozomlar yoluyla aktarılabilen ve alıcı hücrelerde gen anlatımını düzenleyebilmektedir [147]. Dolaşımda bulunan miRNA'ların anlatım

profilleri kanser, kardiyovasküler ve bağırsak hastalıklarının yanı sıra infertilite ve jinekolojik hastalıklarda (örnek olarak: endometriyozis ve ektopik gebelik) bir non-invaziv tanı olarak kullanılmaktadır [148]. Son yıllarda, vücut sıvılarında bulunan ekzosomal miRNA'lar, birkaç kanserin saptanması için dolaşımda bulunan biyobelirteçlerden biri olarak kullanılmakta ve eksozomlar, insan ve koyun uterus lümen sıvı (ULF) içeriklerinde gebeliğe bağlı değişikliklerin sebebi olarak tanımlanmaktadır. Eksozomların koyun ULF'nin bir bileşeni olarak tanımlanması, onların konseptüs (yeni gelişen embriyo) ile maternal etkileşimlerinin yeni araçları oldukları fikrini desteklemektedir [149]. İmplantasyon ve kanser yayılımı sırasında hücre adezyonu, göçü, invazyon ve anjiyogenez benzer hücresel mekanizmaları paylaşmaktadırlar [116]. Yapılan çalışmalarla eksozomların ve özellikle içerilerinde bulunan miRNA'ların embriyo implantasyonunda etkili bir rol oynadığı tahmin edilmektedir [150]. Menstruasyon döngüsü sırasında endometriyumdaki miRNA'ların farklı anlatımını ortaya koymakta ve miRNA'ların endometriyal farklılaşmadaki rolünü endometriyumun reseptif duruma getirdiğini göstermektedir [148].



Şekil 2.5: Canlı hücre içinde bulunan eksozom yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnek Toplama

Çalışmamız İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na sunulmuş ve 28.12.2015 tarih de 2081 sayılı kararla etik kurul onayı alınmıştır (EK.1). Örnek toplama işlemi Eylül 2016 - Mayıs 2017 tarihleri arasında, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Kliniği'nde gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında yer alan çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden 18-42 yaş arsında bireylere kadın doğum uzmanları tarafından gerekli bilgilendirme yapılmış ve aydınlatılmış hasta onam formu (EK.2) okutulup onaylatılmıştır. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubundan iki aşamada (menstrual döngünün 7-10. ve 20-24. günlerinde) örnek toplanmıştır. Vakalardan alınan örnekler her aşamada kan ve endometriyum dokusudan oluşmuştur. Hasta grubu olarak, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Kliniği'nde infertilite nedeniyle başvuran ve TİB (Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı) endikasyonu konan toplam 12 birey ve kontrol grubu olarak ise kiliniğe çeşitli başka nedenlerle başvuran ve en az bir canlı doğum yapmış 8 fertil birey seçilmiştir. Çalışmada 12 hasta bireyden alınan 24 endometriyum ve 24 venöz kan, kontrol grubundaki 8 bireyden alınan 16 endometriyum ve 16 venöz kan olmak üzere toplam 80 örnek üzerinde çalışılmıştır (Tablo 3.1)

Tablo 3.1: Deney gurubunda olan hasta ve kontrol sayısı

Grup	Örnek	PF	SF	Toplam
Hasta	Serum	12	12	24
	Doku	12	12	24
Kontrol	Serum	8	8	16
	Doku	8	8	16
				80

3.2. Endometriyal Biyopsi ve Kan Örneklerinin Toplanması

Endometriyal biyopsi ve kan örnekleri, menstrual döngünün 7-10. ve 20-24. günlerinde tüm vakalardan alındı. Endometriyum dokusu pipel aracıyla ile jinekolog tarafından alındı ve “RNAlater” içeren özel tüpe (“cryo tube”) aktarıldı. Alınan dokular 24 saat +4°C’de bekletildikten sonra izolasyon aşamasına kadar -80°C’de saklandı.

Vakalardan alınan 10 ml'lik periferik kan örnekleri santrifüj ile (1300 rpm'de 15dk) serumu ayrıldı. Toplanan serumlar analiz gününe kadar -80°C'de bekletildi.

3.3. MiRNA Anlatım Analizi

3.3.1. Serum Total RNA İzolasyonu

Serumdan total RNA izolasyonu; serumdan eksozom ekstraksiyonu ve elde edilen eksozomlardan total RNA izolasyonu olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır.

Serumdan eksozom ekstraksiyonu aşamasında “Invitrogen” firmasına ait “*Total Exosome Isolation Reagent*” solüsyonu kullanılmıştır ve çalışmanın her aşamasında firmanın önerdiği protokol takip edilmiştir. İlk aşamada -80°C'de bulunan serum örnekleri 25°C'daki su banyosunda hemojenize edildikten sonra 2000xg'de 30dk santrifüj edilmiş ve üst fazı yeni tüpe aktarılmıştır. 200 µl'lik serum için 40 µl “*Exosome Isolation Reagent*” Solüsyonu eklenip vorteks yapılarak solüsyon bulut şekline getirilmiş ve 2-8 °C'de 30 dk bekletilmiştir. Bekleme aşamasından sonra 10000xg'de 10dk oda sıcaklığında santrifüj edilip üst fazı atılmıştır. Çöktürülmüş eksozomlara 50-100 µl 1X PBS (“*Phosphate-buffered saline*”) eklenip pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Elde edilen eksozomlardan bir hafta içinde RNA izolasyonu yapılması durumunda +4°C'de bekletilmesi, bir haftadan uzun bir süre RNA izolasyonu yapılmaması durumunda ise -20°C'de saklanması gerekmektedir.

Eksozomlardan total RNA izolasyonu Invitrogen firmasına ait “*Total exosome RNA isolation kit*” kullanılarak firmanın önerdiği protokol takip edilmiş ve RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Serumdan elde edilen eksozomlara (200 µL 1x PBS de bulunan eksozomlar) aynı miktarda (200 µl) 2X denatüre edici solüsyon eklenip karıştırılmıştır. Bu aşamada normalizasyon ve izolasyon kontrolü olarak kullandığımız miR-39'dan (“*Workin Solution*”) 2 µl karışıma eklenmiştir. 5dk buzda bekletildikten sonra 400 µl asit fenol kloroform eklenmiştir. Daha sonra 30-60 saniye vorteks yapılmış ve 12000xg'de 5dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda 3 faz elde edilmiştir. Üst fazda (RNA içeren faz) bulunan şeffaf kısım alınmış elde edilen şeffaf fazın 1.25 katı kadar %100 etanol eklenmiştir ve toplama tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra 12000xg'de 15 saniye santrifüj yapılmıştır. Altta kalan sıvı atılıp, toplama tüpü tekrar kullanılarak işleme tüm örnek aktarılan kadar devam edilmiştir. RNA yıkama solüsyonundan (WS1), 700 µL toplama tüpüne eklendikten sonra 12000xg'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. RNA yıkama solüsyonu WS2\3'den 500 µL toplama tüpüne eklenip

12000xg'de 15 saniye santrifüj edilmiş ve bu aşama tekrarlanmıştır. Toplama tüpü boş olarak 1 dk maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü yeni bir 1.5 mL'lik tüpe aktarıldıktan sonra nükleaz içermeyen çözücü tampondan 50 µL (95°C) filtreye dokunulmadan dikkatlice filtreye yayılıp maksimum hızda 30 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra filtreler atılıp miRNA içeren 1.5 mL'lik tüpler -80°C'de saklanmıştır. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyonu nanodrop cihazında ("Thermo 2000c") ölçülüp sonuçlar kaydedilmiştir. Örneklerin konsantrasyonları 1.5-10 ng/µL aralığında saptanmıştır.

3.3.2. Endometriyum Dokularından Total RNA İzolasyonu

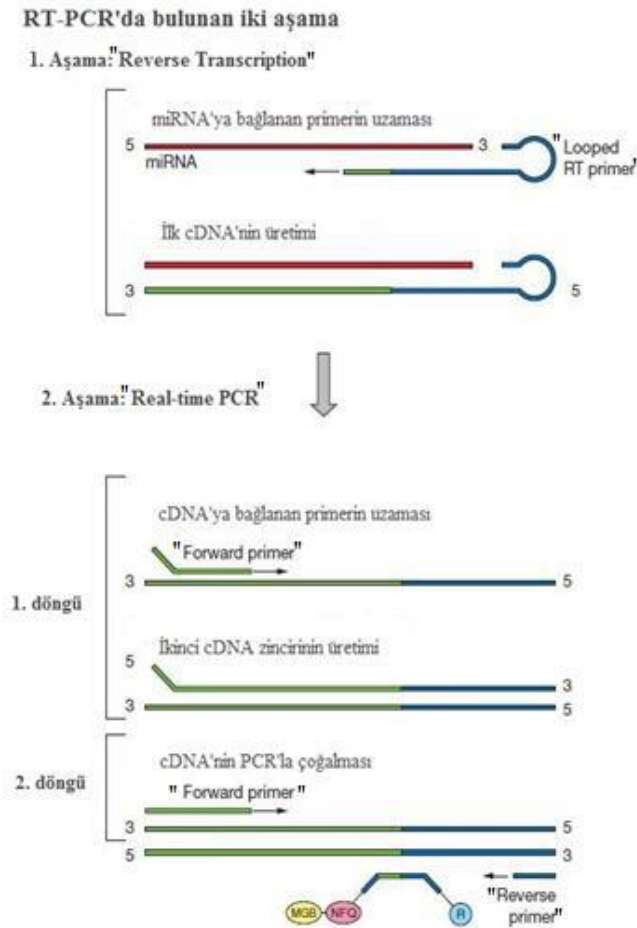
Endometriyum dokularında "Hibrigen" total RNA izolasyon kiti (dokudan) kullanılarak firmanın önerdiği protokol takip edilerek izolasyon gerçekleştirilmiştir. -80°C'da bulunan endometriyum doku örnekleri buz içerisinde çözündürüldükten sonra dokulardan 50-100 mg alınarak, sıvı azot içerisinde küçük parçalara ezilmiştir yeni bir 1.5'lik ependrof tüplere aktarılıp üzerlerine 1000 µL lizis solüsyonu (RL) eklenmiştir. Daha sonra homojenize olması için vortekslenip oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Tüplerdeki doku örneklerine 200 µl kloroform eklenip 15 saniye vortekslenmiştir. Ardından 3 dk buzda bekletilip, 12000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmış ve santrifüjden sonra 3 faz elde edilmiştir. Üst fazda bulunan şeffaf kısım alınıp 0.5 volümü kadar %100 etanol ile karıştırıldıktan sonra toplama tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı atılıp toplama tüpleri tekrar kullanılarak işleme tüm örnekler bitene kadar devam edilmiştir. RNA yıkama solüsyonu (RPI)'nden 500 µl toplama tüpüne eklendikten sonra 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. RNA yıkama solüsyonu RW'den 500 µl toplama tüpüne eklenip 1dk bekletilmiştir. Daha sonra 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilip bu aşama tekrarlanmıştır. Toplama tüpü içi boş olarak 2 dk maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü yeni 1.5 mL'lik bir tüpe aktarıldıktan sonra nükleaz içermeyen çözücü tampondan 100 µl filtreye dokunulmadan dikkatlice filtreye yayılmıştır ve 2dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Maksimum hızla 2 dk santrifüj edilmiştir. Filtreler atılıp miRNA içeren 1.5 mL'lik tüpler -80°C'da saklanmıştır.

Elde edilen total RNA'ların konsantrasyonu nanodrop cihazında ölçülüp sonuçlar kaydedilmiştir. "NanoDrop" ölçümleri dokudan elde edilen total RNA'ların saflığı ve konsantrasyonunu tespit etmek için yapılmaktadır. Her bir örnekten 1.5 µL'lik

hacimlerde alınarak 24 dokuya ait RNA ölçümü yapılmıştır. Bütün örneklerde de dokulara ait RNA'ların A260/A280 oranları 1.85 – 2.1 aralığında ve konsantrasyonları 250–800 ng/μL aralığında saptanmıştır.

3.4. RT-qPCR Uygulaması

İzolasyondan elde edilen total RNA'lardan aday miRNA'ların anlatım seviyeleri RT-qPCR uygulaması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef miRNA'lar RT-qPCR yönteminde iki aşamada anlatım seviyeleri ölçülmektedir. Birincisinde hedef miRNA'nın DNA'ya dönüşmesi, bu aşamada “Taqman mikroRNA Ters Transkripsiyon kiti” kullanarak işlem gerçekleştirilmiştir. İkincisi Real-time PCR'la elde edilen cDNA'ları kantitatif olarak ölçülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: RT Real-time PCR aşamaları

3.4.1. MiRNA'ların cDNA'ya Çevrilmesi

Olgun miRNA'ya özgü saç tokası şeklinde primerler kullanarak miRNA'ların cDNA'ya dönüşümü sağlanmıştır. Bu aşamada “*TaqMan*” miRNA ters transkripsyon kiti (“*Taqman® MicroRNA Reverse Transcription Kit*”) kullanılıp firmanın önerdiği protokol takip edilmiştir. Aday miRNA'ların her biri için doku ve serum örneklerinde iki farklı cDNA seti hazırlanmıştır. cDNA reaksiyon bileşenlerinin total hacmi 15 µl olmak üzere tablo 3.3'de belirleten şekilde master mix hazırlanmıştır. Tablo 3.2'de belirlenen şekilde hazırlanan bileşen hacmi toplam 7 µl olup ve her tüpe 3 µl “*Taqman*” 5X primer eklenmiştir. Total hacmi 10 µl olan bileşene izolasyonları yapılmış RNA'lardan 5 er µl eklenip toplam reaksiyon hacmi 15 µl'ye tamamlanmıştır. cDNA aşamasında doku ve serum örneklerinin hedef miRNA'nın primerleri eklenerek RT reaksiyonu hazırlanmıştır. Ayrıca aynı deneyde farklı PCR tüplerinde, “*RNU6B (U6)*” miRNA primeri doku örneklerinde normalizasyon için ve serum örneklerinde miR-39 miRNA primerleri “*spike-in*” ve normalizasyon için kullanılmıştır. Hazırlanan reaksiyon tüpleri cDNA elde etmek için PCR cihazına yerleştirilip tablo 3.4'de belirlenen sıcaklık profilindeki gibi bekletilmiştir. Örneklerin cDNA'ya çevrilme işlemleri tamamlandıktan sonra aynı gün Real-time uygulamasına geçilebilmekte ya da daha sonra kullanılmak üzere cDNA'lar -20 °C'de uzun süre bekletilebilmektedirler.

Tablo 3.2: miRNA RT reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	1 örnek için
100mM dNTPs	0.15 µL
“MultiScribe™Reverse Transcriptase”, 50 U/µL	1.00 µL
10× “Reverse Transcription Buffer”	1.50 µL
“RNase Inhibitor”, 20 U/µL	0.19 µL
Nükleaz içermeyen distile su	4.16 µL
Toplam miktar	7.00 µL

Tablo 3.3: cDNA reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	1 örnek için
RT reaksiyon “master mix”	7.00 µL
“TaqMan Stem-loop primer”	3.00 µL
Total RNA	5.00 µL
Toplam miktar	15.00 µL

Tablo 3.4: RT-PCR termal döngüsü

Aşama	Sure	Sıcaklık
Bekleme	30 dk	16 �C
Bekleme	30 dk	42 �C
Bekleme	5 dk	85 �C
Bekleme	�	4 �C

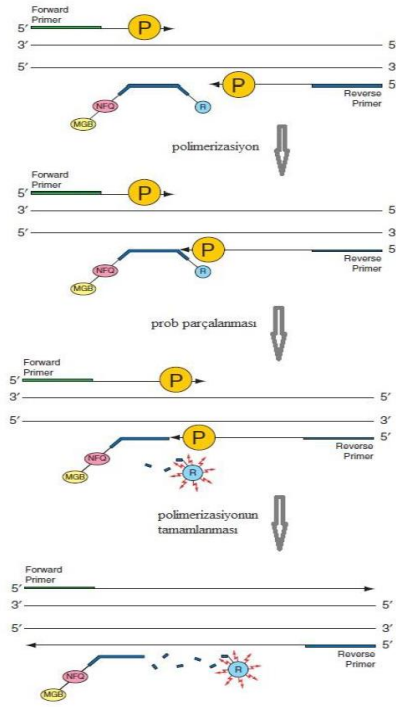
3.4.2. cDNA'ların Real-time PCR ile kantitasyonu

Elde edilen cDNA'ların kantitasyonu yapılmak üzere PCR'la çoğaltılmıştır. Real-time PCR  l  m nde hasta grubu ve kontrol gruplarının arasında “housekeeping” i  kontrolü kullanarak gruplar arasında miRNA anlatım seviyesi karşılaştırması yapılmıştır. RT-PCR'da kullanılan prob  eşidi TaqMan  MGB probudur (şekil 3.2).

**şekil 3.2:** TaqMan MGB probun yapısı

TaqMan RT-PCR reaksiyonunda her döngü başlangı ında “forward” ve “reverse” primer bağlanması gerçekleşmekte ve bu primerlerin bağlanma noktasının arasında bulunan proba spesifik bir tamamlayıcı bölgeye bulunmaktadır. Prob her döngüde bu bölgeye bağlanmakta ve her döngüde bu şekilde tekrarlanmaktadır. Her polimerizasyonda gerçekleştiğinde bağlanan proplar parçalanır ve ışıma oluşmaktadır (şekil 3.3).

RT-PCR reaksiyonunda “TaqMan Universal PCR Master Mix” ve “TaqMan” primer ve proplar kullanılmıştır. Reaksiyon Kit protokolünde önerilen miktarlarda ve termal döngüde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenlerin miktarları tablo 3.4'de görüldüğü üzere toplam 20  l hacim olarak hazırlanmıştır. Tablo 3.5'de belirtilen termal döngüde ise RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3: Real-time PCR döngülerinde gerçekleşen olaylar

Tablo 3.5: miRNA RT reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	1 örnek için
“TaqMan® Universal PCR Master Mix II” (2X)	10 µL
“Nuclease-free” distile su	7.67 µL
“TaqMan® Small RNA Assay (20X)”	1.00 µL
cDNA	1.33 µL
Toplam miktar	20.00 µL

Tablo 3.6: Real-time PCR termal döngü

Aşama	Optimal yapılabilir	Enzim aktivasyonu	PCR	
Bekleme	Bekleme	Bekleme	40 döngü	
			Denatürasyon	Bağlanma
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Süre	2 dakika	10 dakika	15 saniye	60 saniye

3.5. Hasta Ve Kontrol Gruplarının Özellikleri

Bu araştırmada kullanılan uygun örnekler İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan kadın doğum uzmanları tarafından elde edilmiştir. Hasta ve kontrol grubundan iki aşamada (menstrual döngünün 7-10. ve 20-24. günlerinde) elde edilen örnekler, her aşamada kan ve endometriyum dokusundan oluşmuştur. TİB endikasyonu koyulan toplam 12 birey hasta grubu olarak ve kiliniğe çeşitli başka nedenlerle başvuran ve en az bir canlı doğum yapmış 8 fertil birey kontrol grubu olarak seçilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda yer alan her bireyden PF ve SF'de kan ve doku örnekleri alınarak toplamda 80 örnek elde edilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda yer alan vakaların yaşı, hasta grubunda daha önceki başarısız IVF sayısı ve kontrol grubunda önceki canlı doğum sayısı, hormon seviyeleri ve diğer kriterler tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 3.7: Deney grubunda bulunan hasta ve kontrol gruplarının temel özellikleri

Grup	Yaş (ortalama)	Başarısız IVF Sayısı (ortalama)	Önceki Canlı Doğum (ortalama)	BIM (ortalama)	E2	Prolaktin	FSH
RIF (hasta grubu)	31,63	3,2	0	21	29,7	12,35	6,55
Fertil (kontrol grubu)	33,43	0	2	22	29,35	14,45	7,6

3.6. İstatistiksel Analizler

RT-PCR analizlerle elde edilen sonucular $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile C_t değerlerini baz alarak değerlendirilmiştir ve hedef miRNA'ların anlatım değişikliği belirlenmiştir. İstatistiksel analizler “*Graphpad Prism version 7.0*” programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef miRNA 'ların anlatım seviyeleri hasta ve kontrol grupların arasında karşılaştırma yöntemi (“*Relative quantification*”) kullanarak gerçekleştirilmiştir.

miRNA'ların istatistiksel analizlerinde P değerleri 0.05 altında (“*T test: corrected p-value cut-off < 0.05*”) olan miRNA'lar seçilmiştir. ROC “Receiver Operating Characteristics” (Onanma Olasılığı) eğrisi analizleri testlerin seçicilik ve duyarlılıklarını ölçmede kullanılır; ayrıca hasta ve kontrol bireyleri ayırt etmede kullanılan, değişkenlere ne ölçüde güvenebileceğimizi gösteren bir istatistik metodudur. ROC eğrileri ayrıca duyarlılık ve özgüllüğü belirlemek için ROC eğrisi altında kalan alan (AUC) “*Area Under the Curve*” hesaplanmıştır. AUC en küçük 0.50, en büyük 1

değerini alır. 1 değerine ne kadar yakın olursa sonuçların doğruluğu o kadar yüksek olur.

3.7. MiRNA Ve Hedef Gen Tespitinde Omik Yaklaşımlar

MiRNA'lar mRNA transkriptlerindeki hedeflediği bölge genel olarak 3' kodlanmayan bölgede (3'UTR) bulunan bu dizi tamamlayıcı dizileri içerir. MiRNA'nın mRNA'ya bağlanarak hedef genin kodlanmasını inhibe eder veya genin yıkımına neden olarak gen anlatımının düzenlenmesinde rol alır. Genom boyunca her miRNA için çok fazla sayıda potansiyel hedef gen bulunur. Laboratuvar ortamında potansiyel bir miRNA hedefinin validasyon süreci oldukça maliyetli ve zaman alıcıdır. Dolayısıyla miRNA'ların potansiyel hedeflerin deneysel doğrulama sürecini kolaylaştırmak için miRNA hedeflerinin tahmin edilmesine yönelik yapılan biyoinformatik yaklaşımlar günümüzde yaygın şekilde kullanılır [151].

3.7.1. MiRNA Hedef Tanımlama Araçlarının Ortak Özellikleri

MiRNA hedef tahmin algoritmaları için yaygın olarak dört özellik kullanılır. Bunlar; çekirdek bölgesi, serbest enerji, kornan bölge ve bölge erişilebilirliğidir [151].

3.7.1.1. Çekirdek Bölgesi

Her miRNA'nın çekirdek bölgesi, 2-8 nükleotid uzunluğunda bir dizidir bu dizi 5' ucundan başlayarak 3' ucuna doğrudur. MiRNA-mRNA arasında kurulan bağ Watson-Crick (WC) tarafından açıklanan eşleşme kuralına tabidir. Söz konusu eşleşmede, Adenozin (A) Urasil (U) ile ve Guanin (G) Sitozin (C) ile çiftleşir. Mükemmel eşleşme gerçekleşmesi için bu eşleşmenin boşluksuz olması gerekir [152].

3.7.1.2. Serbest Enerji

Serbest enerji (veya Gibbs serbest enerjisi), bir biyolojik sistemin stabilitesinin bir ölçüsü olarak kullanılabilir. Bir miRNA'nın bir hedef mRNA'ya bağlanmasının stabil olduğu tahmin edilirse, miRNA'nın gerçek bir hedefi olması daha muhtemeldir. MiRNA-mRNA bağlanmasında ortaya çıkan enerji ne kadar az olursa, bu durum miRNA ile hedef mRNA bağının o kadar güçlü olduğu şeklinde değerlendirilir [153].

3.7.1.3. Korunmuş Bölge

Korunan bölge, bir dizinin türler boyunca aynı şekilde korunması olarak ifade edilir. Korunan dizilerin analizinde, mRNA'ların 3'UTR, 5'UTR bölgelerine ve

miRNA'ya yada bu üçünün kombinasyonlarına odaklanabilir. Korunmuş diziler genel olarak miRNA'ların çekirdek bölgesinde, diğer bölgelere göre daha yüksek oranda bulunur [152].

3.7.1.4. Bölge Erişebilirliği

Transkripsiyon aşamasından sonra ortaya çıkan mRNA'nın sekonder yapısı miRNA'nın hedef bölgesine eşleşmesini engelleyebilir. Dolayısıyla miRNA hedef mRNA'ya iki aşamada bağlanır. İlk aşamada mRNA'nın kısa ve ulaşılabilir dizisi ile eşleşir ardından hedefe bağlanmanın tamamının eşleşmesi gerçekleşir. Bölge erişilebilirliği, miRNA'nın hedefini, mRNA üzerindeki bir bölge aracılığıyla ne kadar kolay belirleyebildiği ve eşleşebildiğinin bir ölçüsüdür [151].



4. BULGULAR

4.1. Nükleik Asit İzolasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kan örneklerinden elde edilen serumlardan eksozom izolasyonu ve ardından eksozomlarda bulunan total RNA'ların saflığı ve konsantrasyonu “*NanoDrop*” ölçümleri ile tespit edildi. Aynı şekilde dokudan elde edilen total RNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirildi. Hasta ve kontrol grubunda bulunan her bir örnekten 1.5 µL alınarak konsantrasyonun belirlenmesi için ölçüm yapıldı. Elde edilen miktarlar 2–14 ng/µL aralığında (Tablo 4.2) bulundu. Hasta ve kontrol grubunda bulunan doku örneklerinden elde edilen total RNA'ların A260/A280 oranlarının 1.85–2.1 aralığında ve RNA miktarlarının 50–934 ng/µL aralığında olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.1: Serum ve doku örneklerinden izole edilen total RNA'ların NanoDrop'ta ölçülen konsantrasyon değerleri

Hasta grubu	Serum ng/µl	Doku ng/µl	Kontrol Grubu	Serum ng/µl	Doku ng/µl
1. Hasta 1. geliş	3.7	474	1. Kontrol 1. geliş	5.8	404
2. Hasta 1. geliş	4.2	864	2. Kontrol 1. geliş	5.2	102
3. Hasta 1. geliş	4.5	902	3. Kontrol 1. geliş	8.4	454
4. Hasta 1. geliş	2.5	442	4. Kontrol 1. geliş	8.4	568
5. Hasta 1. geliş	3.0	604	5. Kontrol 1. geliş	8.5	228
6. Hasta 1. geliş	5.5	492	6. Kontrol 1. geliş	6.1	670
7. Hasta 1. geliş	9.9	382	7. Kontrol 1. geliş	3.9	455
8. Hasta 1. geliş	9.8	412	8. Kontrol 1. geliş	0	0
9. Hasta 1. geliş	2.3	610	9. Kontrol 1. geliş	0	0
10. Hasta 1. geliş	4.4	468	1. Kontrol 2. geliş	14.0	74
11. Hasta 1. geliş	6.0	172	2. Kontrol 2. geliş	13.2	452
12. Hasta 1. geliş	31	776	3. Kontrol 2. geliş	2.1	682
1. Hasta 2. geliş	4.1	350	4. Kontrol 2. geliş	2.5	98
2. Hasta 2. geliş	4.9	217	5. Kontrol 2. geliş	0	0
3. Hasta 2. geliş	5.3	350	6. Kontrol 2. geliş	5.4	511
4. Hasta 2. geliş	2.2	50	7. Kontrol 2. geliş	3.3	650
5. Hasta 2. geliş	3.9	884	8. Kontrol 2. geliş	1.5	197

6. Hasta 2. geliş	3.4	480	9. Kontrol 2. geliş	2.2	553
7. Hasta 2. geliş	2.0	136			
8. Hasta 2. geliş	23	934			
9. Hasta 2. geliş	3.0	338			
10. Hasta 2. geliş	6.1	374			
11. Hasta 2. geliş	2.4	665			
12. Hasta 2. geliş	0	0			

4.2. MiRNA Anlatım Analizi

Hasta ve kontrol gruplarının doku ve serum örneklerinde tablo 4.3 de bilgileri verilen 4 aday miRNA'nın anlatım analizi gerçekleştirildi. Örneklerle ait Ct değerleri ve logaritmik kat değişimi Stratagene Mx3000P cihazından elde edildi. Ct değerleri $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile “*Relative Quantification*” şeklinde değerlendirilerek anlatım katsayıları belirlendi [154]. $\Delta\Delta Ct$ değerlerinden, parametrik olmayan istatistiksel bir metot olan “*Wilcoxon test*” ile p değerleri hesaplandı.

Tablo 4.2: Aday miRNA'ların miRBase erişim ve olgun dizi bilgisi

MiRNA	MiRBase Erişimi	Olgun Dizi
hsa-miR-145	MIMAT0000437	5' GUCCAGUUUUUCCCAGGAAUCCCU 3'
hsa-miR-30b	MIMAT0000420	5'UGUAAACAUCUACACUCAGCU 3'
hsa-miR-31	MIMAT0000089	5'AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU 3'
hsa-miR-23b	MIMAT0000418	5'AUCACAUUGCCAGGGAUUACCAC 3'

4.2.1. Endometriyum Örneklerinde Anlatım Analizi Sonuçları

Endometriyum örneklerinde 4 aday miRNA'nın anlatım seviyelerinin belirlenebilmesi için her bir miRNA'ya spesifik “*stem-loop primer*” ve “*Taqman prob*” kullanıldı. Normalizasyon için ise U6 miRNA kullanıldı (U6'nın, farklı dokularda ve hücre tiplerinde tutarlı bir şekilde eksprese edildiği ve hücre kültürü veya doku bazlı miRNA'ların normalleştirilmesinde yaygın olarak kullanıldığı gösterilmiştir). Endometriyum dokularından elde edilen sonuçlarda Tablo 4.4 gösterilen şekilde PF (menstrual döngünün 7-10. günlerinde) ve SF (menstrual döngünün 20-24. günlerinde)

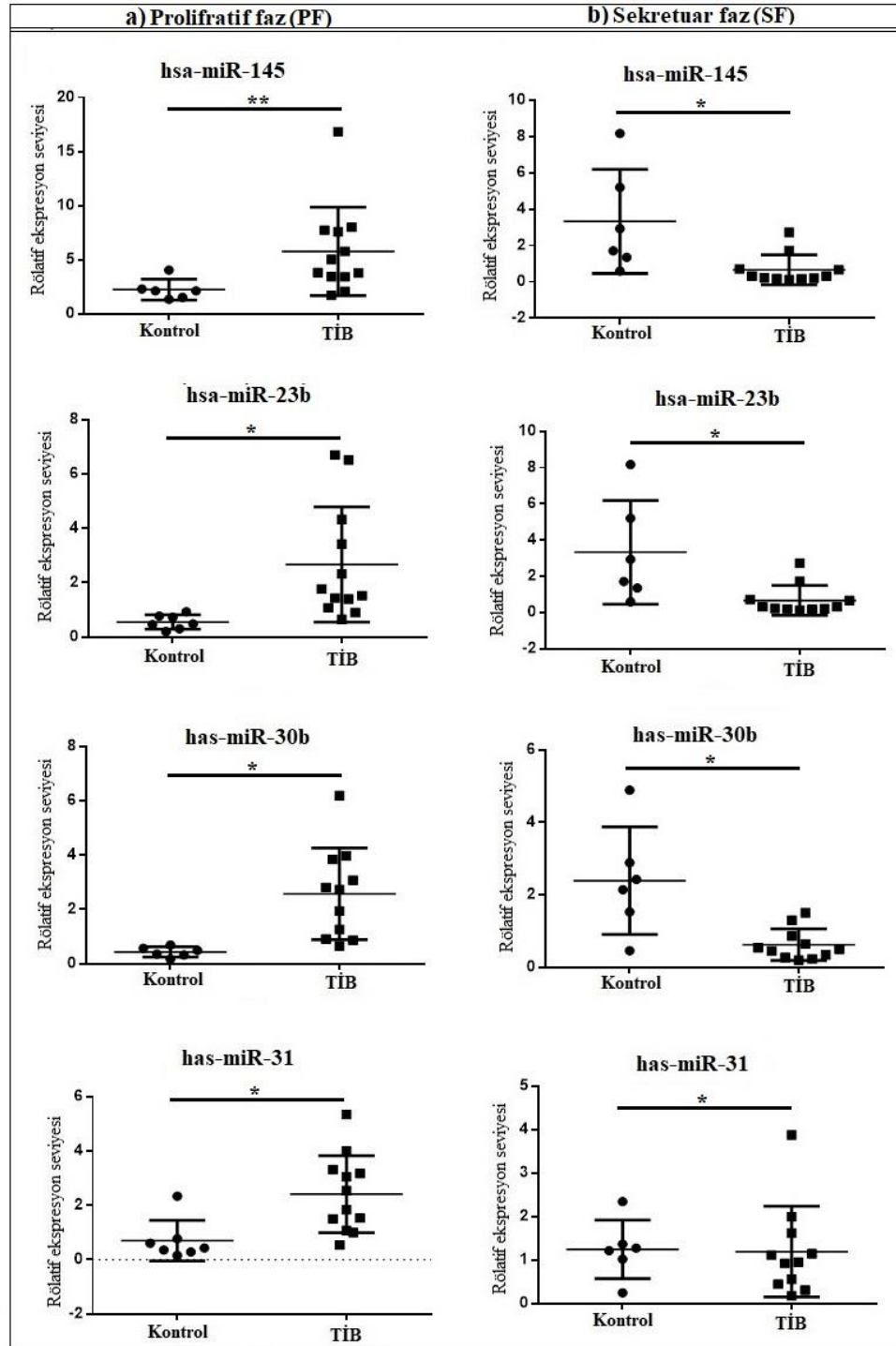
örneklerinde 4 aday miRNA'nın TİB grubunda, kontrol grubuna göre anlatım seviyelerinde anlamlı şekilde değişim tespit edildi.

Tablo 4.3: TİB ve kontrol endometriyum örneklerinde iki farklı fazda hedef miRNA'ların RT-qPCR uygulamasından elde edilen sonuçlar.

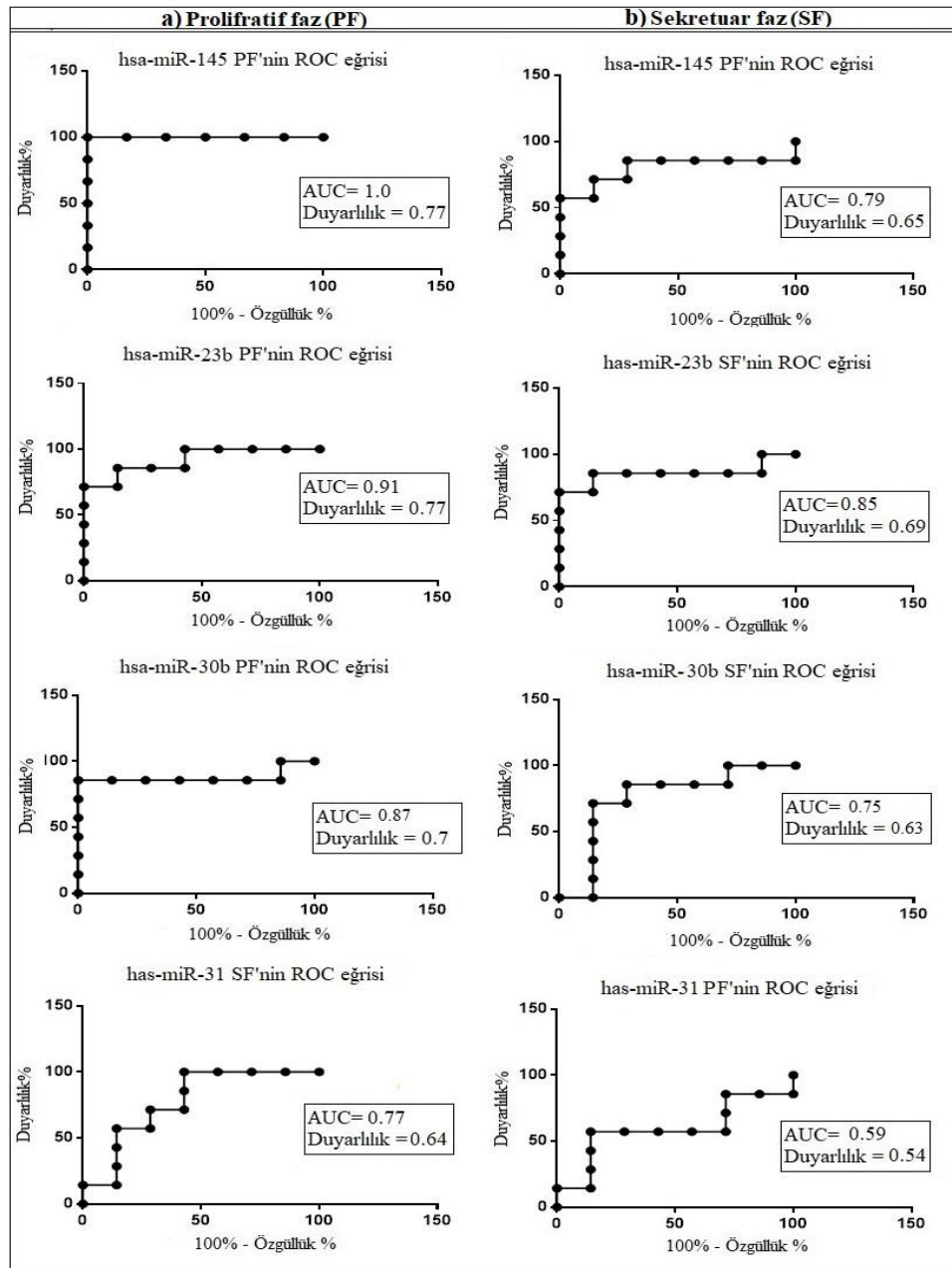
Örnek	Biyopsi Zamanı	MiRNA Adı	Anlatım	Anlatım Katı (log)	P-değeri
Endometriyum	PF	hsa-miR-145	Artan	5,77	0,005
		hsa-miR-23b	Artan	2,67	0,0302
		hsa-miR-30b	Artan	4,33	0,0458
		hsa-miR-31	Artan	2,41	0,0131
	SF	hsa-miR-145	Azalan	0,49	0,0366
		hsa-miR-23b	Azalan	0,67	0,0492
		hsa-miR-30b	Azalan	0,62	0,05
		hsa-miR-31	Azalan	0,92	0,0313

Endometriyum örneklerinde miR-145, miR-23b, miR-30b, miR-31 miRNA'larının anlatım seviyeleri hasta grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; PF'de bu 4 miRNA'nın anlatım seviyelerinin yükseldiği ve SF'de anlatım seviyelerinin azaldığı tespit edildi. Anlatım seviyesindeki farklılık parametrik olmayan “*MannWhitney Test*” ile değerlendirildiğinde, endometriyum örneklerinde PF ve SF'den elde edilen rölatif karşılaştırma analiz sonuçlarında P değerleri 0.05 altında saptandı (Tablo 4.4). Şekil 4.1'de 4 aday miRNA'nın PF ve SF'de rölatif anlatım seviyeleri gösterilmiştir. Endometriyum örneklerinde PF'de rölatif karşılaştırma analizi sonucu 4 aday miRNA'nın da anlatım seviyelerinin aynı şekilde TİB hasta grubunda kontrol grubuna göre arttığı (Şekil 4.1a) ve SF'de anlatım seviyelerinin azaldığı gösterildi (Şekil 4.1b).

Endometriyum örneklerinde 4 aday miRNA'nın anlatım analiz sonuçlarından elde edilen duyarlılık ve seçicilik arasındaki ilişki “ROC” (“*Receiver Operating Characteristic*”) eğrisi olarak gösterildi ve bu grafiksel sonuç hedef miRNA'nın tanı için uygun olduğunu ve yapılan analizlerin doğruluğunu göstermektedir. Eğri altında kalan alan (“*Area Under the Curve*”, AUC) TİB grubu için endometriyum PF'de elde edilen sonuç şekil 4.2a ve endometriyum SF'den elde edilen sonuçlar Şekil 4.2b'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda AUC değerleri, 1 ve bire yakın olarak yüksek güvenilir bir değer bulundu.



Şekil 4.1: TİB ve kontrol grubu PF ve SF örneklerindeki 4 aday miRNA'nın rölatif anlatım seviyeleri. **a)** PF endometriyum örneklerinden elde edilen rölatif anlatım seviyeleri. **b)** SF endometriyum örneklerinden elde edilen rölatif anlatım seviyeleri.



Şekil 4.2: TİB ve kontrol grubu ROC eğrisi analiz sonuçları **a)** PF endometriyum örneklerinden elde edilen ROC eğrisi sonuçları **b)** PF endometriyum örneklerinden elde edilen ROC eğrisi sonuçları

4.2.2. Serum Örneklerinde Anlatım Analizi Sonuçları

Serum örneklerinde 4 aday miRNA'nın anlatım seviyelerinin belirlenebilmesi için her bir miRNA'ya spesifik "stem-loop primer" ve "Taqman prob", normalizasyon için ise miR-39 sentetik miRNA kullanıldı. Elde edilen serum sonuçlarında Tablo 4.5 gösterilen şekilde PF ve SF örneklerinde 4 aday miRNA'dan iki miRNA'nın anlatım seviyelerinde anlamlı şekilde anlatım değişimi tespit edildi.

Tablo 4.4: TİB ve kontrol serum örneklerinde iki farklı fazda hedef miRNA'ların RT-qPCR uygulamasından elde edilen sonuçlar.

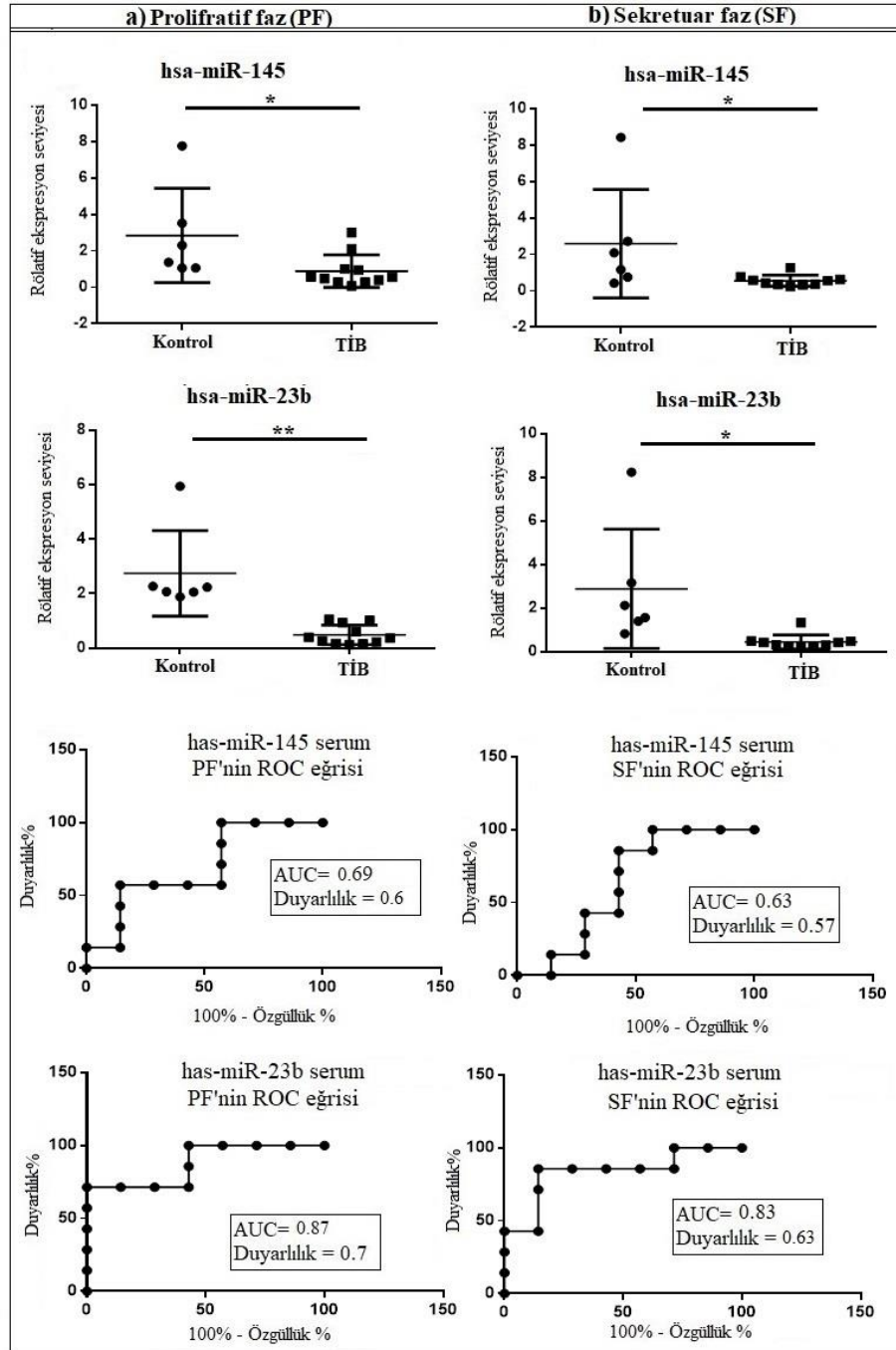
Örnek	Örnek Toplama Zamanı	MiRNA Adı	Anlatım	Anlatım Katı	P-değeri
Serum	PF	hsa-miR-145	Azalan	0,887	0,0313
		hsa-miR-23b	Azalan	0,48	0,0039
	SF	hsa-miR-145	Azalan	0,552	0,0334
		hsa-miR-23b	Azalan	0,439	0,0111

Serum örneklerinde miR-145, miR-23b, miR-30b, miR-31 anlatım seviyeleri PF'de TİB hasta grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldı; sonuçlarda 4 aday miRNA'dan miR-145 ve miR-23b' den anlamlı sonuç alındı. PF ve SF fazlarında iki miRNA'nın anlatım seviyesindeki farklılık parametrik olmayan "*MannWhitney Test*" ile değerlendirildiğinde TİB grubunda kontrol grubuna göre düşük olarak tespit edildi. Serum örneklerinde PF ve SF'den elde edilen rölatif karşılaştırma analiz sonuçlarında P değerleri 0.05 altında saptandı (Şekil 4.3). Şekil 4.3a'da serum örneklerinde PF'de rölatif karşılaştırma analizi sonucu 2 aday miRNA'da TİB hasta grubunda kontrol grubuna göre anlatımın azaldığı ve ROC eğri sonuçlarının bire yakın olduğu tespit edildi. Şekil 4.3b'de SF'de 2 aday miRNA'nın anlatım seviyeleri aynı şekilde azalmıştır ve ROC eğri sonuçları bire yakın olarak tespit edildi.

TİB ve kontrol endometriyum ve serum örneklerinde 4 aday miRNA için elde edilen sonuçlar tablo 4.6 göstermiştir.

Tablo 4.5: TİB ve kontrol gruplarında endometriyum ve serum örneklerinde iki farklı fazda hedef miRNA'ların RT-qPCR uygulamasından elde edilen sonuçlar

MiRNA adı	Endometriyum		Serum	
	PF	SF	PF	SF
hsa-miR-145	Artan	Azalan	Azalan	Azalan
hsa-miR-23b	Artan	Azalan	Azalan	Azalan
hsa-miR-30b	Artan	Azalan		
hsa-miR-31	Artan	Azalan		



Şekil 4.3: TİB ve kontrol grubu PF ve SF örneklerindeki 2 aday miRNA'nın rölatif anlatım seviyeleri ve ROC eğrisi sonuçları. **a)** PF endometriyum örneklerinden elde edilen rölatif anlatım seviyeleri ve ROC eğrisi. **b)** SF endometriyum örneklerinden elde edilen rölatif anlatım seviyeleri ve ROC eğrisi.

4.2.3. Aday miRNA'ların İki Farklı Fazda (PF ve SF) Anlatım Seviyelerinin Değişim Analizi

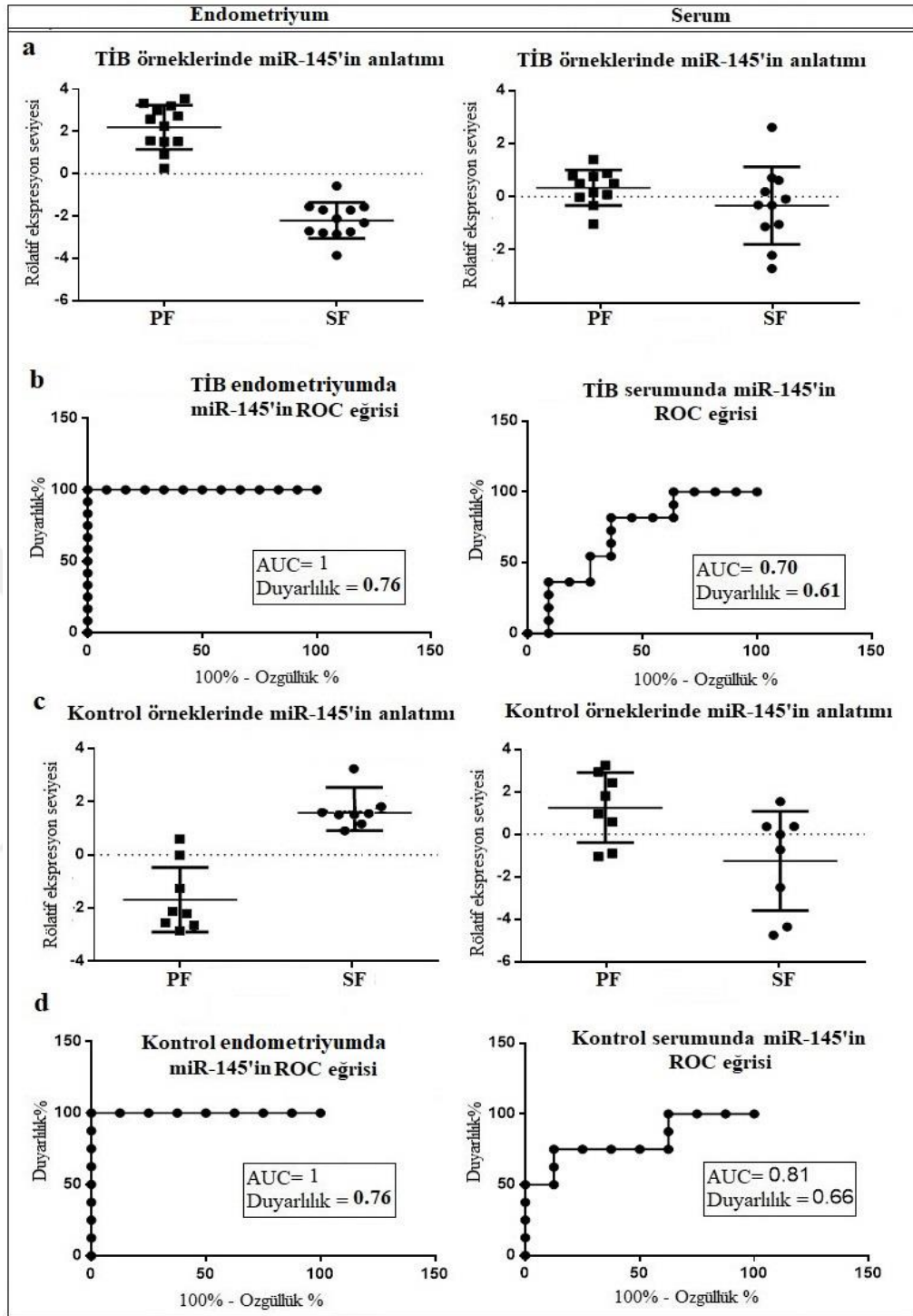
Bu değerlendirmede aday miRNA'ların önceki değerlendirmeden farklı şekilde tek tek bağımsız olarak hasta grubunda iki farklı fazda ve aynı şekilde kontrol grubunda iki farklı fazda anlatım seviyeleri ölçülmüştür. Bu değerlendirmede amaç aday miRNA'ların anlatımlarının fazlar arasındaki farkını hasta ve kontrol gruplarında bağımsız olarak değerlendirmektir.

4.2.3.1. Mir-145'in PF ve SF'de Anlatım Farklılığı

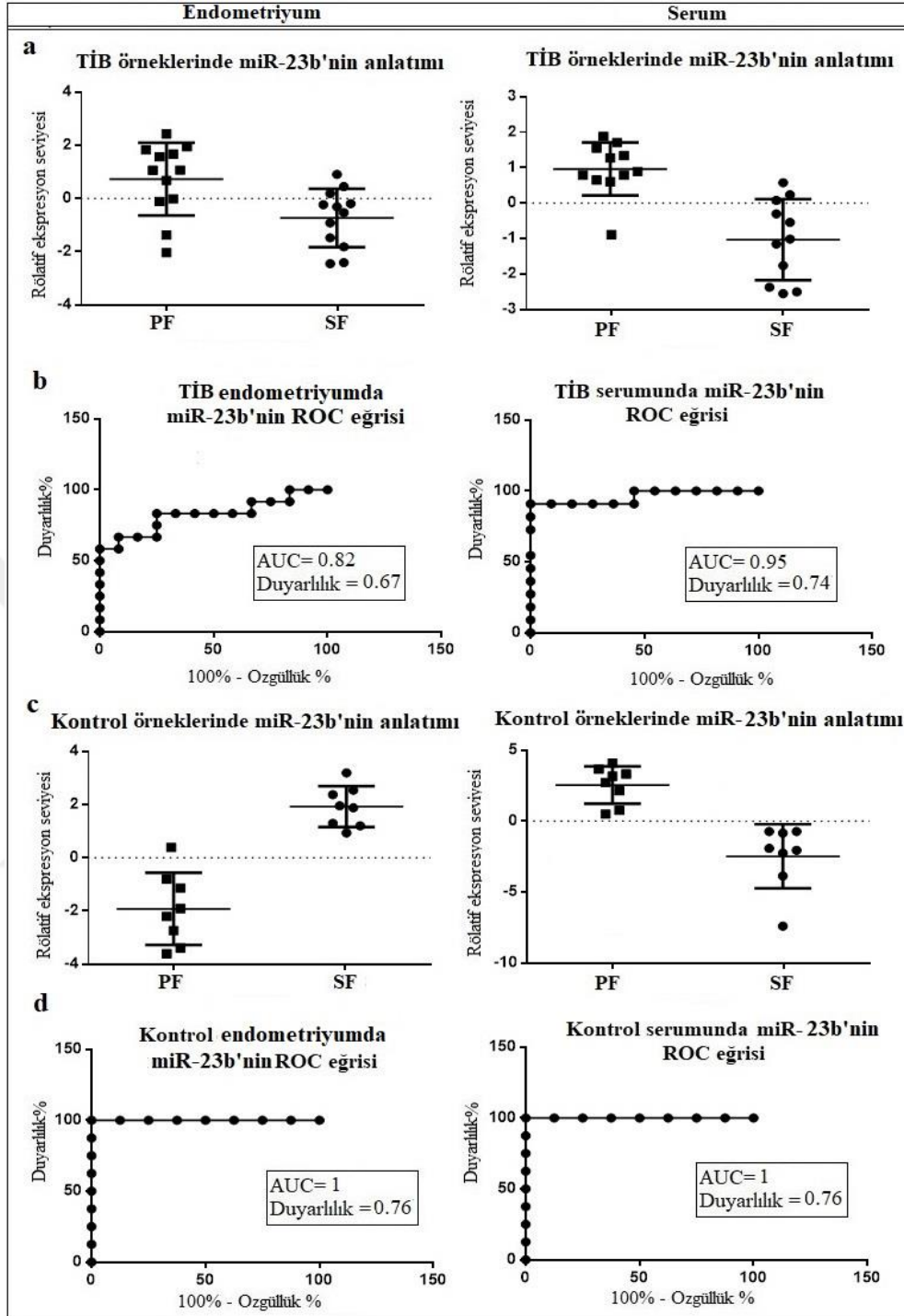
TİB grubunun endometriyum örneklerinin iki farklı fazı arasındaki miR-145 anlatım ölçümü sonucunda; miR-145'in anlatımının SF'de PF'ye göre anlamlı şekilde azaldığı, öte yandan kontrol grubunda ise SF'de PF'ye göre anlatım seviyesinin anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde serum örneklerinde miR-145'in anlatım seviyesi TİB grubu ve kontrol grubunda SF'de PF'ye göre azalmıştır (Şekil 4.4).

4.2.3.2. Mir-23b'in PF ve SF'de Anlatım Farklılığı

TİB grubunun endometriyum örneklerinin iki farklı fazı arasındaki miR-23b anlatım ölçümü sonucunda; miR-23b'nin anlatımının SF'de PF'ye göre anlamlı şekilde azaldığı, öte yandan kontrol grubunda ise SF'de PF'ye göre anlatım seviyesinin anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde serum örneklerinde miR-23b'nin anlatım seviyesi TİB grubu ve kontrol grubunda SF'de PF'ye göre azalmıştır (Şekil 4.5).



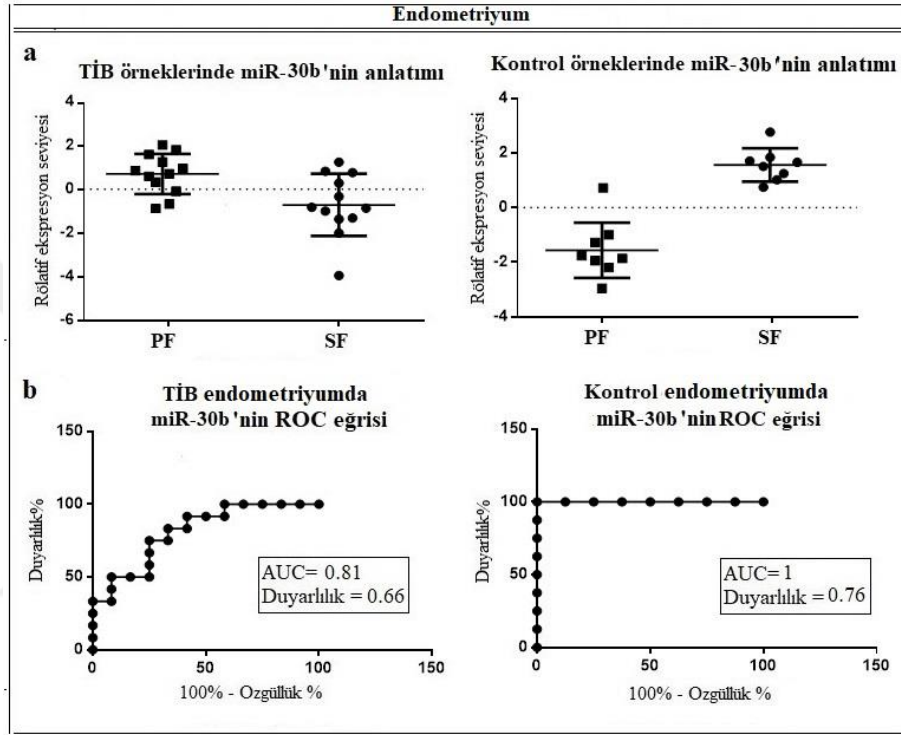
Şekil 4.4: miR-145'in TİB ve kontrol grubunun endometriyum ve serum örneklerinin iki farklı faz arasındaki anlatım ölçüm sonucu. **a)** miR-145'in TİB grubunun endometriyumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır, öte yandan kontrol grubunda SF'de PF'ye göre anlatım seviyesi anlamlı şekilde artmıştır. **b)** miR-145'in TİB endometriyum örneklerinde ve serumda sırayla AUC değerleri 1 ve 0.70 olarak elde edilmiştir. **c)** miR-145 kontrol grubunun endometriyumunda ve serumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır. **d)** miR-145'in kontrol endometriyum örneklerinde ve serum da sırayla AUC değerleri 1 ve 0.81 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.5: miR-23b'nin TİB ve kontrol grubunun endometriyum ve serum örneklerinin iki farklı faz arasındaki anlatım ölçüm sonucu. **a)** miR-23b'nin TİB grubunun endometriyumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır öte yandan kontrol grubunda SF'de PF'ye göre anlatım seviyesi anlamlı şekilde artmıştır. **b)** miR-23b'nin TİB endometriyum örneklerinde ve serumda sırayla AUC değerleri 0.82 ve 0.95 olarak elde edilmiştir. **c)** miR-23b kontrol grubunun endometriyumunda ve serumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır. **d)** miR-23b'nin kontrol endometriyum ve serum örneklerinde AUC değerleri 1 olarak elde edilmiştir.

4.2.3.3. Mir-30b'nin PF Ve SF'de Anlatım Farkılığı

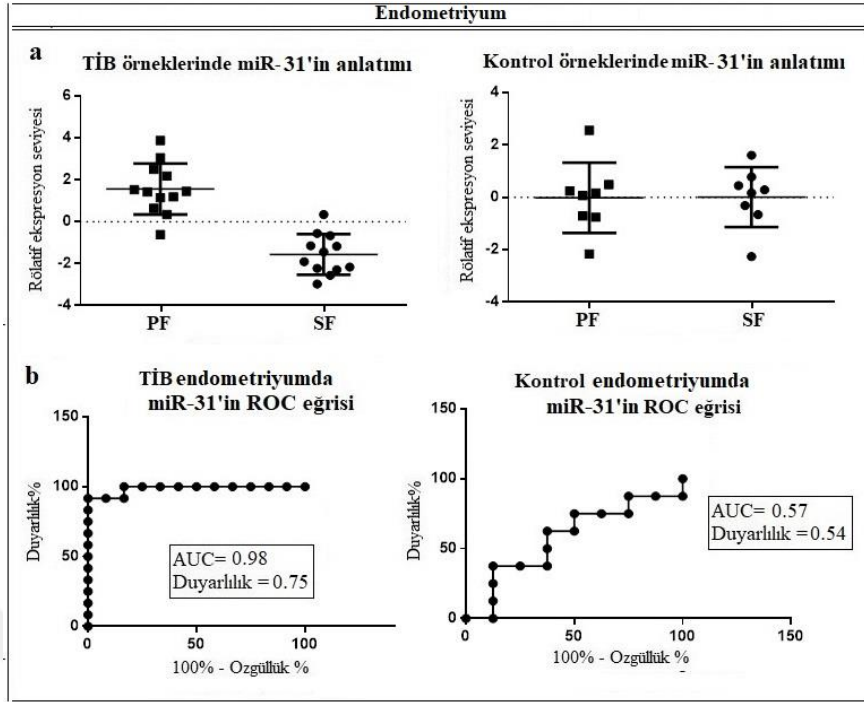
miR-30b TİB grubunun endometriyum örneklerinin iki farklı faz arasındaki anlatım ölçümü sonucunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımının azaldığı belirlenmiştir. Diğer yandan kontrol grubunda SF'de PF'ye göre anlatım seviyesi anlamlı şekilde artmıştır. Serum örneklerinde miR-30b için anlamlı sonuç alınamamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: miR-30b'nin TİB ve kontrol grubunun endometriyum örneklerinin iki farklı faz arasındaki anlatım ölçüm sonucu. **a)** miR-30b'nin TİB grubunun endometriyumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır öte yandan kontrol grubunda SF'de PF'ye göre anlatım seviyesi anlamlı şekilde artmıştır. **b)** miR-30b'nin TİB ve kontrol endometriyum örneklerinde sırayla AUC değerleri 0.81 ve 1 olarak elde edilmiştir.

4.2.3.4. Mir-31'in PF ve SF'de Anlatım Farkılığı

miR-31'in TİB grubunun endometriyum örneklerinin iki farklı fazı arasındaki anlatım ölçümü sonucunda anlatımı SF'de PF'ye göre anlamlı şekilde azalmıştır; fakat kontrol grubunun endometriyumu için bir fark saptanamamıştır. Serum örneklerinde miR-31 için anlamlı sonuç alınamamıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: miR-31'in TİB ve kontrol grubunun endometriyum örneklerinin iki farklı faz arasındaki anlatım ölçüm sonucu. **a)** miR-31'in TİB grubunun endometriyumunda anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımı azalmıştır fakat kontrol grubunda SF'de PF'ye göre anlatım seviyesi fark saptanamamıştır. **b)** miR-31'in TİB ve kontrol endometriyum örneklerinde sırayla AUC değerleri 0.98 ve 0.57 olarak elde edilmiştir.

4.3. Aday MiRNA'ların Hedef Gen ve İlgili Yolakların Tespiti

4.3.1. "Mirò2" Veri Tabanından Hedef Genlerin Tespiti

MIRO ("Minimum Information for Reporting an Ontology") yayınlanan literatürler dahil olmak üzere, ontoloji belgelerini daha yüksek düzeyde bir bütünlük ve tutarlılık ile değerlendirerek, sonuçta daha yüksek bir rapor kalitesi standardı sağlamak için kılavuzlar önermiştir [155]. "miRò2" veri tabanından yararlanılarak miR-145'in, mir-23b, mir-31 ve miR-30b'nin hedeflediği genler belirlenmiştir. Bu veri tabanında miRNA hedeflerini ve güncel farklı hedef bulma veritabanlarını ("TARGETSCAN", "MIRANDA", "PİCTAR", "MIRTARGET" ve "PITA" gibi) bir arada tarayarak istediğimiz miRNA hedef genlerine ulaşabiliriz. Bu veri tabanında miRNA'ların hedef gen taraması iki şekilde yapılmaktadır, birincisi validasyonu yapılmış hedef genler tespiti, ikincisi miRNA dizisine bağlı olarak tahmini hedef genlerin taramasıdır. Elde edilen sonuçlarda miR-145 (Şekil 4.8), miR-23b (Şekil 4.9), miR-30b (Şekil 4.10) ve miR-31'in (Şekil 4.11) ilk 10 hedef genleri belirlenmiştir.

miRó ² miRNA knowledge base		 Wexner Medical Center  UNIVERSITÀ di CATANIA									
Home	Search	Help	About	microRNA@osumc.edu							
Symbol	Description	TARGETSCAN	MIRANDA	PICTAR	MIRTARGET	PITA	RNA22	MIRIAM	MIRECORDS	MIRTARBASE	DETAILS
CLINT1	clathrin interactor 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
PPP3CA	protein phosphatase 3; catalytic subunit; alpha isoform	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
CBFB	core-binding factor; beta subunit	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
FSCN1	fascin homolog 1; actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
MUC1	mucin 1; cell surface associated	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
IRS1	insulin receptor substrate 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
PARP8	poly (ADP-ribose) polymerase family; member 8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
KRT7	keratin 7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  

Şekil 4.8: “miRò2” veri tabanına göre miR-145’in hedeflediği ilk 10 gen listesi

miRó ² miRNA knowledge base		 Wexner Medical Center  UNIVERSITÀ di CATANIA									
Home	Search	Help	About	microRNA@osumc.edu							
Symbol	Description	TARGETSCAN	MIRANDA	PICTAR	MIRTARGET	PITA	RNA22	MIRIAM	MIRECORDS	MIRTARBASE	DETAILS
MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
PLAU	plasminogen activator; urokinase	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
RB1	retinoblastoma 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
E2F1	E2F transcription factor 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
PROSC	proline synthetase co-transcribed homolog (bacterial)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
TAB3	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
GPR64	G protein-coupled receptor 64	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
GPBP1	GC-rich promoter binding protein 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
IL6R	interleukin 6 receptor	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  
SEMA6D	sema domain; transmembrane domain (TM); and cytoplasmic domain; (semaphorin) 6D	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	  

Şekil 4.9: “miRò2” veri tabanına göre miR-23b’nin hedeflediği ilk 10 gen listesi

için; miR-145 (Tablo 4.6), miR-23b (Tablo 4.7), miR-31 (Tablo 4.8) ve miR-30b (Tablo 4.9) en yüksek özgünlüğe sahip olan ilk 10 yolak gösterilmiştir.

Tablo 4.6: “miRò2” veri tabanına göre miR-145’in hedeflediği “pathway” listesi

Yolaklar	Özgünlük	P-değeri
“Transcriptional activation of cell cycle inhibitor p21”	4,02E+02	4,38E-03
“Transcriptional activation of p53 responsive genes”	4,02E+02	4,38E-03
“IRS activation”	3,21E+02	4,67E-05
“Phosphorylation of proteins involved in the G2/M transition by Cyclin A:Cdc2 complexes”	2,68E+02	6,56E-03
“Regulation of Commissural axon pathfinding by Slit and Robo”	2,01E+02	8,73E-03
“Signal attenuation”	1,46E+02	2,55E-04
“Release of eIF4E”	1,34E+02	1,31E-02
“SOS-mediated signalling”	1,07E+02	4,83E-04
“Apoptosis induced DNA fragmentation”	1,00E+02	1,74E-02
“Inactivation of Cdc42 and Rac”	1,00E+02	1,74E-02
“Activation of DNA fragmentation factor”	1,00E+02	1,74E-02
“Growth hormone receptor signaling”	8,92E+01	7,01E-04

Tablo 4.7: “miRò2” veri tabanına göre miR-23b’nin hedeflediği “pathway” listesi

Yolaklar	Özgünlük	P-değeri
“G2 Phase”	1,24E+02	2,39E-03
“Inhibition of replication initiation of damaged DNA by Rb/E2F1”	1,06E+02	1,25E-05
“Activation of NOXA and translocation to mitochondria”	9,28E+01	3,18E-03
“Activation of PUMA and translocation to mitochondria”	9,28E+01	3,18E-03
“Phosphorylation of proteins involved in G1/S transition by active Cyclin E:Cdk2 complexes”	9,28E+01	3,18E-03
“Interleukin-6 signaling”	4,64E+01	6,35E-03
“Sema4D mediated inhibition of cell attachment and migration”	4,64E+01	6,35E-03
“IRAK2 mediated activation of TAK1 complex upon TLR7/8 or 9 stimulation”	3,71E+01	7,94E-03
“IRAK2 mediated activation of TAK1 complex”	3,71E+01	7,94E-03
“Dissolution of Fibrin Clot”	3,71E+01	7,94E-03
“CDC6 association with the ORC:origin complex”	3,37E+01	8,73E-03
“E2F mediated regulation of DNA replication”	2,75E+01	2,06E-04

Tablo 4.8: “miRò2” veri tabanına göre miR-31’in hedeflediği “pathway” listesi

Yolaklar	Özgünlük	P-değeri
“Axonal growth stimulation”	1,61E+02	7,20E-03
“Axonal growth inhibition (RHOA activation)”	1,15E+02	1,01E-02
“Signaling by Rho GTPases”	1,00E+02	1,15E-02
“p75NTR regulates axonogenesis”	1,00E+02	1,15E-02
“Sema4D mediated inhibition of cell attachment and migration”	1,00E+02	1,15E-02
“G beta:gamma signalling through PI3Kgamma”	1,00E+02	1,15E-02
“S1P5 pathway”	1,00E+02	1,15E-02
“Rho GTPase cycle”	1,00E+02	1,15E-02
“a4b7 Integrin signaling”	8,92E+01	1,29E-02
“EPHA2 forward signaling”	8,45E+01	3,39E-04
“E-cadherin signaling in keratinocytes”	7,65E+01	4,15E-04
“G-protein beta:gamma signalling”	7,30E+01	1,58E-02
“Class C/3 (Metabotropic glutamate/pheromone receptors)”	6,18E+01	1,86E-02

Tablo 4.9: “miRò2” veri tabanına göre miR-30b’nin hedeflediği “pathway” listesi

Yolaklar	Özgünlük	P-değeri
“Phosphorylation of proteins involved in G1/S transition by active Cyclin E:Cdk2 complexes”	1,63E+02	4,37E-03
“Signaling by Rho GTPases”	8,15E+01	8,73E-03
“Rho GTPase cycle”	8,15E+01	8,72E-03
“Regulation of KIT signaling”	7,24E+01	9,81E-03
“Neurofascin interactions”	7,24E+01	9,81E-03
“ALK2 signaling events”	5,93E+01	1,20E-02
“Regulation of IFNG signaling”	5,02E+01	1,41E-02
“Signaling by TGF beta”	5,02E+01	1,41E-02
“CRMPs in Sema3A signaling”	4,08E+01	1,74E-02
“Growth hormone receptor signaling”	3,62E+01	1,95E-02
“Signaling events mediated by HDAC Class II”	3,43E+01	7,86E-04
“Signaling by BMP”	3,43E+01	2,06E-02

5. TARTIŞMA

Başarılı bir implantasyon için sağlıklı döllenmiş yumurtanın, reseptivitesi normal olan endometriyum ile uygun zamanda buluşması gerekmektedir. IVF (“*In Vitro Fertilization*”) teknolojisi ve yöntemlerindeki gelişmelere rağmen; birçok çift, birden fazla IVF başarısızlığı yaşamaktadır. Başarısız olan her IVF girişiminden sonra gebelik oranı azalmakta hatta üçüncü girişimden sonra gebelik oranı belirgin bir düşüşle %57'ye kadar gerilemektedir [126]. IVF başarısızlıklarının başlıca nedenleri: (i) yumurtalık stimülasyonuna zayıf yanıt, (ii) tekrarlanan dölleme başarısızlığı, (iii) tekrarlanan zor transferler ve (iv) tekrarlanan implantasyon başarısızlıklarıdır (TİB) [3].

İmplantasyondan önce reseptiviteyi sağlayan moleküler olaylar ve embriyo ile endometriyum arasındaki erken diyaloga aracılık eden mekanizmalar hakkında çok az bilgi mevcuttur. TİB'li hastaların menstrual döngünün farklı evrelerinden alınan endometriyal doku biyopsilerindeki geçici değişikliklerin analizi, endometriyal reseptiviteye aracılık eden molekülleri tanımlamada önem taşımaktadır [156]. Doğal ilerleyen endometriyum döngüsü sırasında meydana gelen mRNA anlatım değişiklikleri genomik analizlerle aydınlatılmıştır [8]. TİB hastaları ile gerçekleştirilen çalışmalar endometriyumda anormal gen anlatımlarının olduğunu göstermiştir [9][10][11]. Endometriyumda anormal gen anlatımından etkilenen yolların TİB'e yol açtığı gözlenmiştir [3]. Epigenetik etkenler, DNA metilasyonu (CpG), kromatin histon modifikasyonu ve kodlanmayan düzenleyici RNA'lar olarak tanımlanmıştır. Genetik ve genomik temelli araştırmalarda son yıllarda çok önemli epigenetik mekanizmalardan biri miRNA'lardır [157]. Uzunluğu 19-24 nükleotid olan, kodlama yapmayan küçük RNA moleküllerinden oluşan bir aile olan, miRNA'ların gen anlatımında düzenleyici rolleri vardır. MiRNA'ların protein kodlayan genlerin büyük bir kısmının anlatımını düzenlediği düşünülmektedir. Genel olarak, insan mRNA'larının yaklaşık %30'unun veya daha fazlasının miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir [158]. MiRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'UTR bölgesine bağlanarak protein translasyonunu durdurmakta ya da mRNA'nın yıkımına neden olmaktadır. İnsan genomunda bugüne kadar yaklaşık 2654 [159] olgun miRNA tanımlanmıştır ve bu miRNA'ların insan transkriptomunun en az %60'ına katkıda bulunabileceğine düşünülmektedir [158].

Anlatımı yapılmış olan miRNA'lar dokuların yanı sıra periferik dolaşımda da bir kompleks olarak proteinlere bağlı olarak veya eksozom adı verilen salgılanmış mikrovessiküller içinde de bulunur. MiRNA'lar; hücresel farklılaşma, çoğalma, proliferasyon, apoptoz ve implantasyon gibi önemli biyolojik işlemlerde rol almaktadır [6]. Elde edilen yeni bilgilerle, miRNA'ların insan preimplantasyon gelişimi sırasında gen anlatımının düzenlenmesinde, başlangıçta var olan germ hücrelerinden embriyo oluşumuna kadar olan süreçte rol oynadığı gösterilmiştir [158]. Aynı zamanda miRNA'ların maternal hormonların endometrial tepkilere aracılık edilmesinde ve proliferatif fazdan sekretuar faza geçişi düzenlemede yer aldıkları gösterilmiştir [156][14].

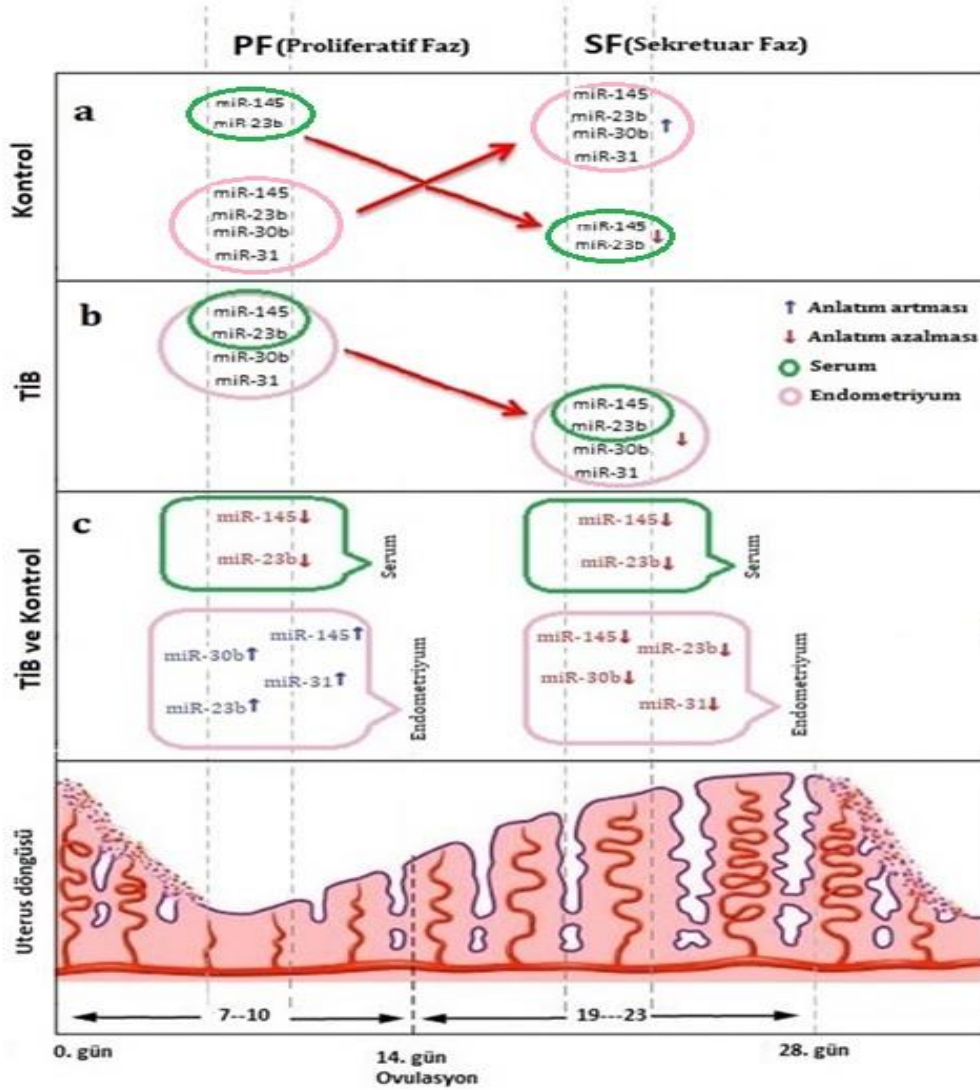
Fertil kadınlarda endometrial döngü; ovülasyondan önceyi ifade eden proliferatif faz ve postovülasyonu gösteren sekretuar faz olarak tanımlanmıştır. Proliferatif faz; hücresel proliferasyon ve farklılaşma, hücre dışı matriks “*remodeling*”, anjiyogenez ve vaskülogenez dahil olmak üzere çeşitli süreçleri içermektedir. Ayrıca, adezyon ve iyon kanalları ile ilgili genlerin anlatımının da arttığı saptanmıştır. Bu aşamadaki hücresel proliferasyon; mitotik aktivite ve DNA sentezi ile kanıtlanır [160]. Proliferatif fazda östrojen, progesteron reseptörünün anlatımını indükleyerek endometriyumun sekretuar fazda üretilen progesterona tepki göstermesine zemin oluşturur [161]. Proliferatif fazda endometrial dokunun temel özelliği, apoptotik faktörleri baskılayarak gelişmekte olan yeni dokunun beslenmesini sağlamak için aktif proliferasyon ve anjiyogenezin gerçekleşmesidir. Proliferatif fazda, doku “*remodelling*” (MMP26, TFF3; “*Trefoil Factor 3*”), hücre farklılaşması (Hoxa10, Hoxa11) ve vaskülogenez (“*Connexin-37*”, Hoxb7, sFRP; “*Secreted Frizzled Related Protein 1*”) gibi süreçlerle ilgili genlerin anlatımının arttığı saptanmıştır [160][162][163]. Bu fazda gerçekleşen gen anlatımındaki değişiklikler, sekretuar fazda meydana gelen embriyo implantasyonu için kritik mekanizmaları olumsuz etkileyebilir. İmplantasyon penceresi için gerekli temel değişimler proliferatif fazın ortasında başlatılır. Proliferatif fazda anlatımı artan genler ayrıca steroid reseptör proteinlerinin fonksiyonu ile ilgili genleri de içermektedir. Geç proliferatif faz ovülasyondan önce gelir ve bu aşamada embriyo implantasyonu için immün yanıt etkilidir. İmmün sistemin bir parçası olan doğal öldürücü hücreler embriyo tutunması için gereklidir [161]. Sekretuar fazda, endometriyumda progesteron seviyesi artar ve bu artışın ardından glikojen ve mukus salgılanması sağlanır. İmplantasyon penceresini içeren bu fazda, progesteron salgısının

en yüksek düzeye ulaşması nedeniyle daha fazla gen ekspresyonu değişikliği tespit edilmiştir [160]. Sekretuar fazda anlatımı değişen genler, temel olarak hücre döngüsü düzenleme, iyon bağlama, sinyal proteinlerinin taşınması ve immünomodülatör ailesinin üyeleri ile ilişkilidir [160][164]. Orta sekretuar fazında baskılanan genler; sFRP, PR, PR membran bileşeni 1, ER-a; “*Estrogen Receptor 1*”, MUC1, 17 β HSD-2; “*17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase*”, MMP11, “*Endotelin 3*” (EDN3) ve özellikle OLFM1; “*Olfactomedin-1*”, çalışmalarla kanıtlanmıştır [160]. İnsan endometriyumunun normal hormonal regülasyonunda yer alan moleküler mekanizmaların belirlenmesi, patolojik durumlarda meydana gelen moleküler düzensizliğin anlaşılması için önemli bir hedeftir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının, endometrial reseptivite ile ilgili moleküler ve hücresel biyolojik belirteçlerdeki bozukluklardan kaynaklandığı gösterilmiştir [165]. Bu bağlamda, b3 integrin, avb3; “*Integrin alpha V beta 3*”, E-kadherin, L-selektin gibi hücre adezyon moleküllerinin yanı sıra musinler, galektin-7 ve trofonin gibi moleküller potansiyel endometrial reseptör belirteçleri olarak tanımlanmıştır. İmplantasyon bozukluğu olan hastalarda endometriyumda bulunan avb3 integrin ekspresyonunda azalma görülmüştür [166]. Günümüzde araştırmalar fertil ve infertil kadınlarda endometriyum ve dolaşımda bulunan mRNA ve kodlanmayan RNA’ların analizine odaklanmıştır.

Bu çalışmanın amacı; TİB hastaları ve kontrol grubundaki bireylerden elde edilen menstrual döngünün proliferatif ve sekretuar fazlarındaki endometriyum ve serum örneklerindeki hedef miRNA’ların çift (iki) fazda anlatımlarını takip ederek, anlatım miktarlarının TİB ve kontrol örneklerinde karşılaştırılmasıdır. Bu sonuçlardan yola çıkarak miRNA’ların post-transkripsiyonel olarak genlerin anlatımını azaltması ya da artmasını göstermek ve böylece proliferatif ve sekretuar fazlarda endometriyum epitelindeki değişimleri göstermektir. Dolayısıyla proliferatif fazdan sekretuar faza geçiş sürecinde gerçekleşen moleküler olayları etkileyebilen düzenleyici miRNA’ları açığa çıkarmaktır. Araştırma sonuçları ileride bu hastaların potansiyel tedavisi için yeni bilimsel yaklaşımlar geliştirebilme açısından temel oluşturmaktır. Son olarak maternal serumda anlamlı şekilde ekspresyon seviyesi değişen miRNA’ların belirlenmesi ve bu miRNA’ların infertilite problemiyle karşı karşıya olan vakalarda IVF tedavisine başlanmadan tanı amaçlı bir non-invaziv biyobelirteç olarak kullanılmasıdır. Bu çalışmayı özgün yapan özellik, aynı vakalardan (TİB; n=12 ve Kontrol; n=8) iki farklı fazda (PF ve SF) endometriyum ve serum örneklerinin elde edilerek, aday miRNA

anlatımlarının ölçülmesi ile literatürde benzer hasta grubunda çalışmanın olmaması özelliğiyle ilk çalışmadır. Bu çalışmada implantasyon başarısızlığı ile ilişkili moleküler genetik çalışmalar sonucu ile elde edilmiş miRNA lar meta analiz yapılarak implantasyonla ilişkili olduğu düşünülen miRNA'ların (miR-31, miR-30b, miR-145 ve miR-23b) seçimi yapılmıştır [19][6][14][13][12][20].

Çalışmamızda seçilen; miR-31, miR-30b, miR-145 ve miR-23b, miRNA'nın anlatım seviyeleri RT-qPCR ile ölçülmüş ve biyoinformatik analizi yapılmıştır. TİB grubu ile kontrol grubunun anlatım analiz sonucunda 4 aday miRNA'nın anlatım seviyesi endometriyum örneklerinde PF'de P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı olarak arttığı ve SF'de P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Serum örneklerinde ise miR-145 ve miR-23b anlatımı PF ve SF'de P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir (Şekil 5.1c). Çalışmamıza özgünlük katan diğer değerlendirmede TİB grubunda kontrol grubundan bağımsız olarak iki faz (PF ve SF) arasında hedef miRNA'ların anlatım seviyelerindeki farkın belirlenmesidir ve sonuçlarda TİB grubu endometriyum örneklerinde SF'de PF'ye göre 4 aday miRNA'da anlatımın P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı olarak azaldığı (Şekil 5.1b) ve kontrol grubunda P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı olarak artışı (Şekil 5.1a) tespit edilmiştir. TİB serum örneklerinde fazlar arası karşılaştırma sonucunda miR-145 ve miR-23b de SF'de anlatımları P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir (Şekil 5.1b) ve kontrol grubunda P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı olarak artış tespit edilmiştir (Şekil 5.1a). Elde edilen bulgulara göre 4 aday miRNA'nın anlatım seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştiği tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların hedef genleri, güncel kullanılan hedef belirleme veri tabanları ("*TargetScan*", "*Miranda*" ve "*Pictar*" gibi) kullanılarak saptanmıştır (şekil 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11). Aday miRNA'ların hedef genlerinin ilgili yolakları, "*miRò2*" veri tabanında belirlenmiştir ve bu yollar listelenmiştir (Tablo 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9).



Şekil 5.1: Menstrual döngünün iki farklı fazında (PF ve SF) aday miRNA'ların anlatım seviyelerindeki artış ve azalma; a) kontrol grubunda endometriyum örneklerinde iki faz arasında karşılaştırmada 4 aday miRNA'nın anlatımının SF'de PF'ye göre artış ve serum örneklerinde miR-145 ve miR-23b'in anlatımının SF'de PF'ye göre artış tespit edilmiştir. b) TİB endometriyum örneklerinde iki faz arasında karşılaştırmada 4 aday miRNA'nın anlatımının SF'de PF'ye göre azaldığı ve serum örneklerinde miR-145 ve miR-23b'in anlatımının SF'de PF'ye göre azaldığı tespit edilmiştir. c) TİB ve kontrol karşılaştırmasında endometriyum PF'de 4 aday miRNA'nın anlatımında artış ve SF'de azalma tespit edilmiştir. Serum örneklerinde miR-145 ve miR-23b'de her iki fazda azalma tespit edilmiştir.

İmplantasyon aşamasında gerçekleşen moleküler mekanizmaları açığa çıkarmak için yapılan araştırmalarda, fertil vakaların menstrual döngülerinde moleküler analizler gerçekleştirilmiştir. 2010 yılında Kuokkanen ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, fertil kadınların geç proliferatif ve sekretuar fazlarında endometrial epitelyal hücrelerin mRNA ve miRNA profilleri mikroarray yöntemi ile incelenmiştir.

Bu araştırmanın sonucunda PF’de SF’ye göre 12 miRNA’nın anlatımında azalma ve 12 miRNA’nın anlatımında artma tespit edilmiştir. Bu miRNA’ların arasında, çalışmamızda sağlıklı grup arasındaki PF ve SF fazlarının miRNA’ları karşılaştırıldığında miR-30b ve miR-31’nin anlatımının Kuokkanen ve ark. yapmış olduğu çalışmayla benzer olarak miR-30b ve miR-31’nin PF’de anlatımının azaldığı tespit edilmiştir [12]. Araştırmamızda ise bu çalışmanın tersine TİB hastalarında miR-30b ve miR-31’nin PF’de kontrole göre anlatımının P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda TİB örneklerinin iki faz karşılaştırılması da yapılmış ve PF’de SF’ye göre bu miRNA’larda anlatım P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı olarak artışı tespit edilmiştir (şekil 5.1b). Kuokkanen ve ark. aynı çalışmada miR-30b ve miR-31’in hedef genlerini analiz etmiş ve hedefleri arasında hücre döngüsünde etkili olan “*cyclin-dependent kinases*” (CDKs), “*Minichromosome Maintenance Complex Component 2*” (MCM2), “*Cyclin B1*” (CCNB1), “*DBF4 Zinc Finger*” (DBF4) ve “*Transcription Factor 3*” (E2F3) genlerini tespit etmişlerdir. Bu genler proliferatif fazda meydana gelen hücre proliferasyonu yollarında etkili olduğu için bu genlerin anlatımlarının azalması hücrelerin çoğalma sürecini negatif etkileyecektir [12]. Buna bağlı olarak çalışmamızda PF’de anlatımı artmış olan miR-30b ve miR-31’in söz konusu genlerin 3’-UTR bölgesine bağlanarak anlatımını baskıladığı ve böylece hücre döngüsünü inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu da implantasyon başarısızlığının temel nedeni olarak görülen endometriyum dokusunun tutunmaya uygun hale gelmesine engel teşkil ettiği görüşü öne sürülmektedir. 2014 yılında Jessica ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada fertil kadınlarda menstrual döngünün iki farklı fazında (PF ve SF) endometriyal dokuda ve serum eksozomlarında aday miRNA’lar ve hedef genlerin analizi RT-qPCR’la yapılmıştır. Çalışma sonucunda endometrium örneklerinde miR-30b ve miR-31’in SF’de PF’ye göre anlatımının arttığı ve miR-145’in SF’de PF’ye göre anlatımının azalmış olduğu tespit edilmiştir. Serum eksozomunda ise miR-31’in endometriyum örnekleriyle benzer şekilde SF’de PF’ye göre anlatımının arttığı saptanmıştır; dolayısıyla miR-31’in her iki örnekte de anlatımının benzer şekilde değişmesi, bu miRNA’nın hedef genlerinin iki fazda (PF ve SF) anlatım değişikliklerinin analizinin yapılmasına neden olmuştur. MiR-31’in direkt olarak hedef genleri olan CXCL12 (lenfosit taşınmasında etkili olan bir kemokin) ve FOXP3 (T düzenleyici hücrelerde görev alan bir transkripsiyon faktörü) gibi immünomodülatör genlerinde her iki örnekte (endometriyum ve serum) anlatım

seviyeleri iki fazda (PF ve SF) karşılaştırılmıştır. Sonuçta endometriyum örneklerinde CXCL12 ve FOXP3'nin anlatımı SF'de PF'ye göre azalmış ve serum örneklerinde sadece FOXP3'nin anlatımı SF'de PF'ye göre azalmış olarak tespit edilmiştir. MiR-31'in SF'de endometriyum ve serumda anlatım artışı hedeflediği bu iki genin SF'de anlatımının baskılanmasına, dolayısıyla implantasyon penceresinde bu genlerin miktarlarının azalmasına sonuç olarak embriyo tutunmasında etkili olduğunu göstermiştir ve bu miRNA'nın implantasyon süreci ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür [20]. Araştırmamızda ise bu çalışmanın tersine miR-31'in TİB endometriyum örneklerinde SF'de PF'ye göre anlatımının azalması, hedefi olan bu iki immünomodülatör genin anlatımının artmasına, dolayısıyla embriyonun endometriyuma adezyonunu ve invazyonunu engelleyebileceği öngörülmüştür. 2013 yılında Altmae ve ark. 9 fertil kadında; 5 erken SF'de (LH+2) ve 4 orta SF'de (LH+7) endometriyum örneklerinde miRNA mikroarray analizi gerçekleştirmişlerdir. Araştırma sonucunda miR-30b, miR-30d, miR-494 ve miR-923'den implantasyon aşamasında (orta SF'de) miR-30b ve miR-30d'nin anlatımında artış ve miR-494 ve miR-923 anlatımında azalma saptanmışlardır. iR-30b ve miR-30d hedef gen analiz sonucunda SEPT7; “*Septin 7*”, CRMP1; “*Collapsin Response Mediator Protein 1*”, SLC44A1; “*Solute Carrier Family 44 Member 1*”, HES1; “*Hes Family BHLH Transcription Factor 1*”, FXR2 ve TNF144B genlerini hedeflediği ve bu genlerin transkripsiyon ve gen anlatımının düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında ve apoptoz gibi önemli süreçlerde rol aldıkları gösterilmiştir [13]. Bu çalışmaya benzer şekilde Sha ve ark. tarafından gerçekleştirilen araştırmada dizileme yöntemi ile normal fertil endometrium örneklerinde orta SF'de erken SF'ye göre miR-30b ve miR-31'in anlatım artışı saptanmıştır. Çalışmanın hedef gen analiz sonucunda miR-30b'nin hücre döngüsünde etkili olan genleri; CCNB; “*Cyclin B1*”, RASSF2; “*Ras Association Domain Family Member 2*” ve MMP7 ve miR-31'in FAP; “*Fibroblast Activation Protein*” genini hedeflediğini tespit etmişlerdir. Böylece bu miRNA'ların anlatım artışı söz konusu genlerin 3'-UTR bölgesine bağlanarak bu genlerin anlatımının baskılanmasına ve implantasyon sürecinde rol alabileceklerini öne sürmüşlerdir [19]. Bu çalışmaların bizim çalışmamızla örtüştüğü nokta, miR-30b ve miR-31'nin fertil endometriyumunda SF'de anlatımının artması ve bulgularımıza göre TİB örneklerinde SF'de anlatımının azalmasıdır, dolayısıyla Jessica, Altmae ve Sha çalışmalarında miR-30b'nin anlatımının fertil kadınlarda SF'de artışı bu miRNA'nın implantasyon sürecinde önemli rol almasının kanıtıdır [13][19][20].

Çalışma sonucumuzda endometriyum örneklerinde TİB grubunda kontrol grubuna göre SF’de miR-30b ve miR-31 anlatımında azalma ve TİB grubunda iki faz arasında SF’de PF’ye göre bu iki miRNA’nın anlatımlarının azaldığı, böylece bu miRNA’ların hedef genlerinin anlatımında artışa neden olabileceğini ve normal implantasyon sürecinde etkili olabilecekleri hipotezini desteklemektedir. MiR-30b ve miR-30d, MiR-30 ailesinde (8q24.22–8q24.23) bulunmaktadır. Bu miRNA ailesi; insan embriyonik kök hücre düzenlenmesi, epitelyal-mezenkimal geçiş ve miRNA tümör baskılayıcıları olarak görev yapan önemli fonksiyonel miRNA ailelerinden biridir [6]. Çalışmamızda miR-30b ve miR-31’den elde edilen hedef gen tarama sonuçlarımızda doğrulaması yapılan ve yüksek tahmin hassasiyeti olan ilk 10 gen Şekil 4.10 ve 4.11’de gösterilmiştir. Endometriyozisli kadınların ektopik endometriyumunda endometriyal BCL6; “*B-cell CLL/lymphoma 6*” anlatımı yüksek bulunmuştur. Tümör baskılayıcı proteini p53, endometriyoziste önemli ölçüde azalır. P53 anlatımı, hücresel proliferasyonla ilişkili bir nuklear baskılayıcı gen olan B hücresi CLL/lenfoma 6 (BCL6) tarafından spesifik olarak inhibe edilir [167]. MiR-30b tarafından hedeflenen BCL6’nın proliferasyonda etkili olması nedeni ile proliferatif fazda gerekli olan proliferasyonda rol alabileceği düşünülebilir. “*TargetScan*” veri tabanı tarama sonucunda miR-30b’nin hedeflediği önemli genlerden biri HOXA11 olarak saptanmıştır ve bu genin hücre farklılaşmasında önemli rol aldığı belirlenmiştir. HOXA11’in fertil kadınlarda endometriyum PF’de anlatım artışı saptanmıştır [160][163], böylece PF’de miR-30b’nin anlatımının artışı bu genin anlatımının baskıladığına ve endometriyum hücrelerinde gerekli olan farklılaşma sürecinde olumsuz etki gösterebileceği düşünülür. MiR-31; embriyo implantasyonu, gelişmesi, kemik ve kas homeostazı ve immün sistem fonksiyonunun önemli bir düzenleyicisidir. Genel olarak miR-31; hücre çoğalması, apoptoz, hücre farklılaşması ve hücre hareketliliğine dahil olan genleri hedef alarak çeşitli hücresel ve gelişimsel süreçleri düzenler. MiR-31’in, FOXP3 (“*Forkhead P3*”) ve CXCL12 (“*C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*”) gibi çeşitli immün düzenleyici faktörleri hedef aldığı bilinmektedir. Bu faktörlerin her ikisinin de endometriyal SF’de anlatımlarının anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur ve bu veriler, miR-31’in muhtemelen bir immün baskılayıcı mekanizma ile çalışan, endometriyum reseptivitesinde potansiyel bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir [20]. FOXP3’ün düzensiz anlatımı, tekrarlayan spontan düşükler (URSA), açıklanamayan infertilite ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ile ilişkilidir [168]. MiR-31’in hedefi olan MMP’ler (“*Matrix*

metalloproteinases”), hücre dışı matriksin (ECM) çeşitli bileşenlerini parçalayan proteolitik enzimlerdir. MMP'ler dokuların yeniden yapılması ve büyümesi de dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte rol almaktadır; ayrıca dokularda savunma mekanizmaları ve immün yanıtlarda rol oynamaktadır. Desidualizasyon başarılı bir implantasyon için ön koşuldur ve MMP'ler de dahil olmak üzere birçok faktör tarafından desteklenmektedir [169].

MiR-145, ilk olarak farede tespit edilmiş ve sonrasında insan kolorektal kanserinde anlatım seviyesinin önemli ölçüde azaldığı doğrulanmıştır [170][171]. MiR-145, kromozom 5 (5q32-33) üzerinde bulunup insan genomunda kırılğan bir bölgede yer almaktadır [172]. Birçok kanser türünde miR-145'in anlatımının azaldığı ve tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü öne sürülmektedir. Çalışmamızın sonucunda; her iki değerlendirmede miR-145'in TİB örneklerinde SF'de P değerleri 0.05 altında bulunarak anlatımının anlamlı şekilde azalması ve kontrol grubu SF'de P değerleri 0.05 altında bulunarak anlatımının artışı bu miRNA'nın implantasyon penceresinde önemli rol aldığına ışık tutmaktadır (Şekil 5.1a, b ve c). Kang ve ark. 2015'de miR-145'in hedeflediği IGF1R (*“Insulin-like growth factor 1 receptor”*) geninin erken implantasyondaki rolünü endometriyum örneklerinde göstermiştir. MiR-145'in endometriyal hücrelerde implantasyon aşamasında anlatımının arttığını tespit etmiştir ve bu miRNA'nın IGF1R geninin 3'UTR bölgesine bağlanarak anlatımının azalmasına, böylece implantasyon penceresindeki ilk maternal-embriyo etkileşimine adezyon sürecinin stabil hale gelmesine katkıda bulunduğunu öne sürmüştür [156]. Revel ve ark. çalışmasında TİB endometriyum örneklerinde fertil endometriyum örneklerine göre SF'de miR-145 ve miR-23b'nin anlatımının arttığını bulmuşlardır ve hedef gen analizi sonucunda SF'de miR-145'in anlatımının artışı adezyon molekülü olan iki gen; *“N-cadherin”* ve *“netrin-4”* ve hücre dongüsünde etkili olan H2AFX geninin anlatımının baskılanmasına neden olduğu tespit edilmiştir. MiR-23b'nin anlatımının artışı Wnt sinyal yolağında düzenleyici olarak rol alan sFRP-4 geninin anlatımının baskılanmasına neden olduğunu göstermişler ve bu genlerin implantasyonla ilgili olduğunu tespit etmişlerdir [14]. 2017 yılında Cheng Shi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, TİB ve kontrol gruplarından alınan endometriyum örneklerinde SF'de miRNA mikroarray uygulaması yapılmıştır. Sonuçlarda miR-145 olmak üzere 5 miRNA'nın anlatım farklılığı tespit edilmiş ve miR-145 anlatımının arttığı saptanmıştır. Bu miRNA'ların TİB hastalarında düşük endometriyal reseptivite ile ilişkili olabileceğini ve TİB

hastalarının tanı ve tedavisinde kullanabileceğini öne sürmüşlerdir [6]. Bu araştırmalardan farklı olarak çalışmamızda miR-145'in endometriyum SF'de TİB ve fertil örneklerinin karşılaştırılmasında anlatımının P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.1c), aynı şekilde TİB endometriyum örneklerinde iki farklı faz (PF ve SF) karşılaştırmasında miR-145'in P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı şekilde SF'de PF'ye göre anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.1b). Dolayısıyla her iki analiz sonucunda bu miRNA'nın SF'de anlatımının azalması bizim sonucumuzu doğrulama niteliğine sahip olabileceği düşünülmektedir ve bu miRNA'nın anlatımının azalmasının, implantasyon aşamasında etkili olan genlerin düzensiz artmasına neden olabileceği ön görülmektedir. Araştırmamızda miR-145'in hedef gen tarama sonuçlarında yüksek tahmin hassasiyeti olan toplam 51 hedef gen tespit edilmiştir. Bu listedeki ilk 10 gen Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Elde edilen hedef genlerin işlevlerinin belirlenmesi sonucunda; IGF1R, IRS-1 (*“İnsülin reseptörü substratı-1”*) ve MUC1 (*“Musin 1”*) genlerinin implantasyon süreci ile ilgili olabileceği saptanmıştır. MUC1, uterin epitelinin apikal yüzeyinde anlatımı yapılan bir transmembran müsidir; mikrobik enfeksiyon ve enzimatik saldırılar için bariyer görevi almaktadır. MUC1 üzerindeki glikoformlar fertil ve infertil kadınlarda farklılık gösterir. MUC1 anlatımı, farelerde uterusun reseptif olduğu evrede büyük ölçüde azalır. Buna karşılık, insan MUC1 anlatımı, P4 (progesteron) seviyeleri yüksek olduğunda, reseptif veya sekretuar fazda çok yüksektir. MUC1 epitel hücrelerinin apikal yüzeyi ile ilişkilidir; ayrıca implantasyon aşamasında uterus sıvısında yüksek seviyelerde saptanmaktadır [173][174]. MUC1'in implantasyon sürecinde anlatımının azalması implantasyon sürecini olumsuz etkilemektedir. “*TagetScan*” veri tabanı tarama sonucunda MMP11 geni miR-145'in hedef geni olarak saptanmıştır. MMP11'in anlatımının fertil kadınlarda PF'de arttığı ve SF'de azaldığı tespit edilmiştir. MMP11 geninin PF'de hücre “*remodelling*” de rol aldığı saptanmıştır ve implantasyon aşaması için gereken hazırlıklarda önemli rol oynamaktadır [84][160]. Böylece miR-145'in TİB örneklerinde PF'de anlatım artışı MMP11 geninin “3'UTR” bölgesine bağlanarak anlatımının baskılanmasına neden olabileceği düşüncesine ışık tutmaktadır ve bu baskılama PF'de gerekli olan hücre “*remodelling*” sürecini negatif etkilemektedir. Fertil kadınların endometriyum örneklerinde PF'de anlatımı artan ve SF'de anlatımı azalan önemli genlerden biri sFRP genidir. Bu genin PF'de vaskülogenez sürecinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [160][163]. “*Miranda*” veri tabanında yapılan tarama sonucunda

sFRP geni miR-145'in hedef geni olarak tanımlanmıştır; dolayısıyla sonuçlarımızda TİB örneklerinde PF'de miR-145'in anlatım artışı sonucunda bu geni hedef alarak baskılanmasına neden olabileceği ve PF'de hücrel vaskülogenezde olumsuz etki yaratacağı düşünülmektedir.

MiR-23b, kromozom 9 (9q22.32) üzerinde bulunup ve miR-23b, 27b ve 24-1 içeren bir “*cluster*” (küme) olarak tanımlanmaktadır. Kanseri gelişimi ile ilgili olduğu ve farklı organlarda pleiotropik düzenleyici olarak tanımlanmıştır [175]. MiR-23b'nin endometriyum hücrelerinde steroid temelli protein kodlamalarını hedefleyerek endometriyum hücrelerinin çoğalmasında etkili olduğu belirlenmiştir [136]. MiR-23b ile implantasyon arasında ilişkiyi gösteren çok az araştırma bulunmaktadır. Çalışmamızın sonucunda; miR-23b'nin endometriyum dokularında TİB ve kontrol karşılaştırmasında P değerleri 0.05 altında bulunarak anlamlı şekilde PF'de anlatımının arttığı ve SF'de anlatımının azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca serum örneklerinde PF'de ve SF'de anlatımının P değerleri 0.05 altında bulunarak anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.1c). Fazlar arası karşılaştırma sonuçlarımızda TİB grubunda miR-23b'nin SF'de PF'ye göre P değerleri 0.05 altında bulunarak anlatımında azalma ve kontrol grubunda anlatımında artma saptanmıştır (Şekil 4.5b ve 4.5a). Serum örneklerinde miR-23b'nin TİB grubunda SF'de PF'ye göre P değerleri 0.05 altında bulunarak anlatımında azalma saptanmıştır (Şekil 4.5b). MiR-145'e benzer şekilde her iki değerlendirmenin sonucunda miR-23b'nin SF'de anlatımının anlamlı şekilde azalması, bu miRNA'nın implantasyon penceresinde önemli rol alabileceğine ışık tutmuştur. Revel ve ark. çalışmasında SF'de miR-145 ve miR-23b'nin anlatımının arttığını bulmuşlardır; fakat bizim sonuçlarımızda bu iki miRNA'nın anlatımında azalma tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada miR-145, miR-23b ve miR-99a'nın endometriyozis gibi diğer endometriyal bozukluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir [14]. Çalışmamızda miR-23b'den elde edilen hedef gen tarama sonuçlarımızda, yüksek tahmin hassasiyeti olan ilk 10 gen Şekil 4.9'da listelenmiştir. PLAU “*Trophoblast cells express urokinase-type plasminogen activator*” geninin peri-implantasyon gelişimi sırasında endometriyal invazyon ve doku tamiri aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu gen miR-23b'nin hedef genlerinden biridir. Söz konusu genin önemli işlevi göz önüne alındığında, bu genin anlatımının değişmesinin implantasyonda olumsuz etki yaratabileceği düşünülebilir [176]. MiR-23b'nin hedef genlerinden bir diğeri MET “*invasive growth*” kontrolünde önemli rol oynayan tirozin kinazlardır.

Bunlar embriyonik gelişim ve organ rejenerasyonu gibi fizyolojik koşullar altında, hücrel çoğalmayı düzenlemektedir [177]. Dolayısıyla miR-23b'nin hedef geni olan MET'in implantasyonda anlatımının artması implantasyonun tutunma aşamasında negatif etki gösterebileceğini düşündürebilir. “*TargetScan*” veri tabanı tarama sonucunda miR-23b'nin HOXA11 genini hedeflediği saptanmıştır. Bu genin literatürde PF'de anlatım artışı gösterdiği saptanmıştır ve HOXA11'in PF'de hücre farklılaşmada rol aldığı gösterilmiştir [160][163]. Böylece sonuçlarımızda miR-23b'nin PF'de anlatımının artması bu miRNA'nın HOXA11 genin “3'UTR” bölgesine bağlanarak anlatımını baskılanmasına neden olabileceğini ve sonuçta PF'de gerekli olan hücrel farklılaşmayı olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir. Fertil kadınlarda PF'de anlatımı artan ve SF'de azalan öne çıkan genlerden biri sFRP dir [84][160]. Bu genin “*TargetScan*” tarama sonucunda miR-23b'nin hedef geni olduğu saptanmış, dolayısıyla miR-23b'nin PF'de anlatımının artışı bu genin PF sürecinde vaskülogenez için gerekli olan anlatımını baskılayarak bu süreci olumsuz etkileyeceği düşünülebilir. sFRP'nin fertil kadınların SF aşamasında anlatımının azaldığı araştırmalarda gösterilmiştir. Sonuçlarımızda TİB'lerde miR-23b'nin SF'de anlatımının azalması ve kontrol grubumuzda anlatımının artışı vaskülogenez sürecinde rolü bulunan sFRP genini TİB'larda anlatımının artışına neden olabileceğini düşünmektedir. Sonuç olarak miR-23b'nin hedef genlerinden olan HOXA11 ve sFRP her iki fazda fonksiyon ve anlatım farklılıkları göz önüne alındığında hastalık süreci ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada ilk amacımız aday miRNA olarak seçtiğimiz miRNA'ların TİB ve kontrol gruplarındaki anlatım seviyelerini ölçmek ve aralarındaki farklılığı belirlemektir; sonuçlarımızda bu aday miRNA'ların anlamlı şekilde ($p < 0.05$) her iki fazda (PF ve SF) anlatım değişikliği gösterdiği saptanmıştır (Şekil 5.1c). Bu değişim aday miRNA'ların TİB'lerin biyolojik süreciyle ilgili olabileceğini kanıtlar niteliktedir. Anlatımı değişen miRNA'ların hedef gen ve ilgili yolak analiz sonuçları bu miRNA'ların embriyo implantasyon süreci ile ilgili olabileceğini göstermiştir. Aday miRNA'ların anlatım farklılıklarından ve yolak analizinden yola çıkarak, bu çalışmanın bulgularının ileride bu hastaların potansiyel tedavisi için temel oluşturacak nitelikte olduğu düşünülebilir. Bunun için ileri çalışmalarda bu miRNA'ların hedef genlerine yönelik proteomik çalışmalar yapılmasının bir ihtiyaç olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmanın bir diğer amacı da aday miRNA'ların maternal serumda TİB ve kontrol grubunda anlatım farklılıklarının belirlenmesidir. Serum örneklerinden elde edilen sonuçlarda, miR-145

ve miR-23b'nin anlatımlarında her iki fazda (PF ve SF) anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Böylece bu miRNA'ların TİB'lerde potansiyel bir invazif olmayan biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür. İleriki çalışmalarda, hasta ve kontrol grubunda daha fazla serum ve doku örneği ile çalışılması, aday miRNA'larımızın TİB için biyobelirteç olma ihtimallerini destekleyecektir.



KAYNAKLAR

- [1] C. Coughlan vd., “Recurrent implantation failure: definition and management”, *Reprod. Biomed. Online*, c. 28, sayı 1, ss. 14–38, Oca. 2014.
- [2] Z. Yang vd., “Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study”, *Mol. Cytogenet.*, c. 5, sayı 1, s. 24, May. 2012.
- [3] K. D. Ly, N. Aziz, J. Safi, ve A. Agarwal, “Evidence-Based Management of Infertile Couples with Repeated Implantation Failure Following IVF”, *Curr. Womens. Health Rev.*, c. 6, sayı 3, ss. 200–218, Ağu. 2010.
- [4] L. Bahar, “Yardımcı Üreme Teknikleri Uygulamasında Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı Olan Kadınlarda Luteal Faz Endometriyumunun Otolog Kokültür Endometriyumuyla İnce Yapı Düzeyinde Karşılaştırılması”, 2008.
- [5] B. Ola ve T.-C. Li, “Implantation failure following in-vitro fertilization”, *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, c. 18, sayı 4, ss. 440–445, Ağu. 2006.
- [6] C. Shi vd., “Endometrial MicroRNA Signature during the Window of Implantation Changed in Patients with Repeated Implantation Failure.”, *Chin. Med. J. (Engl.)*, c. 130, sayı 5, ss. 566–573, 2017.
- [7] H. Haraguchi vd., “MicroRNA-200a Locally Attenuates Progesterone Signaling in the Cervix, Preventing Embryo Implantation”, *Mol. Endocrinol.*, c. 28, sayı 7, ss. 1108–1117, Tem. 2014.
- [8] Y. E. M. Koot vd., “An endometrial gene expression signature accurately predicts recurrent implantation failure after IVF”, *Sci. Rep.*, c. 6, sayı 1, s. 19411, May. 2016.
- [9] P. Díaz-Gimeno vd., “A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature”, *Fertil. Steril.*, c. 95, sayı 1, s. 50–60.e15, Oca. 2011.
- [10] T. Garrido-Gómez, M. Ruiz-Alonso, D. Blesa, P. Diaz-Gimeno, F. Vilella, ve C. Simón, “Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results”, *Fertil. Steril.*, c. 99, sayı 4, ss. 1078–1085, Mar. 2013.
- [11] S. R. Bhagwat vd., “Endometrial Receptivity: A Revisit to Functional Genomics

- Studies on Human Endometrium and Creation of HGEx-ERdb”, *PLoS One*, c. 8, sayı 3, s. e58419, Mar. 2013.
- [12] S. Kuokkanen, B. Chen, L. Ojalvo, L. Benard, N. Santoro, ve J. W. Pollard, “Genomic Profiling of MicroRNAs and Messenger RNAs Reveals Hormonal Regulation in MicroRNA Expression in Human Endometrium¹”, *Biol. Reprod.*, c. 82, sayı 4, ss. 791–801, Nis. 2010.
- [13] S. Altmäe vd., “MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 Regulate Human Endometrial Receptivity”, *Reprod. Sci.*, c. 20, sayı 3, ss. 308–317, Mar. 2013.
- [14] A. Revel, H. Achache, J. Stevens, Y. Smith, ve R. Reich, “MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects”, *Hum. Reprod.*, c. 26, sayı 10, ss. 2830–2840, Eki. 2011.
- [15] L. C. Laurent, “MicroRNAs in embryonic stem cells and early embryonic development”, *J. Cell. Mol. Med.*, c. 12, sayı 6a, ss. 2181–2188, Ara. 2008.
- [16] K. M. Foshay ve G. I. Gallicano, “miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation”, *Dev. Biol.*, c. 326, sayı 2, ss. 431–443, Şub. 2009.
- [17] R. Wang vd., “MiR -206 Regulates Neural Cells Proliferation and Apoptosis via *Otx2*”, *Cell. Physiol. Biochem.*, c. 29, sayı 3–4, ss. 381–390, 2012.
- [18] D. Galliano ve A. Pellicer, “MicroRNA and implantation”, *Fertil. Steril.*, c. 101, sayı 6, ss. 1531–1544, Haz. 2014.
- [19] A.-G. Sha vd., “Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing”, *Fertil. Steril.*, c. 96, sayı 1, s. 150–155.e5, Tem. 2011.
- [20] J. D. K. Kresowik, E. J. Devor, B. J. Van Voorhis, ve K. K. Leslie, “MicroRNA-31 is Significantly Elevated in Both Human Endometrium and Serum During the Window of Implantation: A Potential Biomarker for Optimum Receptivity¹”, *Biol. Reprod.*, c. 91, sayı 1, s. 17, Tem. 2014.
- [21] M. A. Fritz ve L. Speroff, *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [22] Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, “Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion.”, *Fertil. Steril.*, c. 99, sayı 1, s. 63, Oca. 2013.
- [23] A. E. Yumru ve B. Öndeş, “İnfertil Çifte Yaklaşım ve İn Vitro Fertilizasyon’a

Doğru Hasta Seçimi”, 2011.

- [24] S. B. Jaffe ve R. Jewelewicz, “The basic infertility investigation.”, *Fertil. Steril.*, c. 56, sayı 4, ss. 599–613, Eki. 1991.
- [25] F. Atherton ve D. Howel, “Psychological morbidity and the availability of assisted conception: a group comparison study.”, *J. Public Health Med.*, c. 17, sayı 2, ss. 157–60, Haz. 1995.
- [26] A. J. Wilcox vd., “Incidence of Early Loss of Pregnancy”, *N. Engl. J. Med.*, c. 319, sayı 4, ss. 189–194, Tem. 1988.
- [27] C. G. Smith ve R. H. Asch, “Drug abuse and reproduction.”, *Fertil. Steril.*, c. 48, sayı 3, ss. 355–73, Eyl. 1987.
- [28] h. D. Oğuz, “İnfertilite Tedavisi Gören Kadınlarda İnfertilitenin Ruh Sağlığına, Evlilik İlişkileri ve Cinsel Yaşama Etkileri”, 2004.
- [29] L. M. Whiteford ve L. Gonzalez, “Stigma: the hidden burden of infertility.”, *Soc. Sci. Med.*, c. 40, sayı 1, ss. 27–36, Oca. 1995.
- [30] J. H. Miller, R. K. Weinberg, N. L. Canino, N. A. Klein, ve M. R. Soules, “The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age.”, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, c. 181, sayı 4, ss. 952–7, Eki. 1999.
- [31] Ö. Kara, “Açıklanamayan İnfertilite Nedeniyle Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon ve İntrauterin İnseminasyon Uygulanan Hastalarda İui Öncesi Sperm Hazırlama Tekniklerinden Swim Up ve Dansite Gradient Santrifugasyon Yöntemlerinin Gebelik Başarısı Üzerine Etkilerinin”, 2011.
- [32] H. HATASAKA, “New Perspectives for Unexplained Infertility”, *Clin. Obstet. Gynecol.*, c. 54, sayı 4, ss. 727–733, Ara. 2011.
- [33] A. Revel, “Defective endometrial receptivity”, *Fertil. Steril.*, c. 97, sayı 5, ss. 1028–1032, May. 2012.
- [34] T. W. (Thomas W. . Sadler ve J. Langman, *Langman’s medical embryology.*, 11th ed. /. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2010.
- [35] Y. Yamashita vd., “Influence of severe endometriosis on gene expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in granulosa cells from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization-embryo transfer”, 2002.
- [36] H. Achache ve A. Revel, “Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation”, *Hum. Reprod. Update*, c. 12, sayı 6, ss. 731–

746, Ara. 2006.

- [37] T. Strowitzki, A. Germeyer, R. Popovici, ve M. von Wolff, “The human endometrium as a fertility-determining factor”, *Hum. Reprod. Update*, c. 12, sayı 5, ss. 617–630, Eyl. 2006.
- [38] S. Defrere vd., “Human Endometrial Epithelial Cells (EEC) Constitutively Express More Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 than Endometrial Stromal Cells (ESC) in Culture”, *Am. J. Reprod. Immunol.*, c. 54, sayı 1, ss. 5–12, Tem. 2005.
- [39] B. K. Tan, P. Vandekerckhove, R. Kennedy, ve S. D. Keay, “Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK”, *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, c. 112, sayı 6, ss. 773–780, Haz. 2005.
- [40] H. B. Croxatto, M. E. Ortiz, S. Díaz, R. Hess, J. Balmaceda, ve H. D. Croxatto, “Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak.”, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, c. 132, sayı 6, ss. 629–34, Kas. 1978.
- [41] P. A. Bergh ve D. Navot, “The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation.”, *Fertil. Steril.*, c. 58, sayı 3, ss. 537–42, Eyl. 1992.
- [42] E. ÜNAL, “Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı Hastalarının Endometriumunda Granulosit Koloni Stimülasyon Faktör Reseptörü ve Serviko-Vajinal Lavajında Granulosit Koloni Stimülasyon Faktör Düzeyinin Prognostik Önemi”, 2015.
- [43] T. D. Burrows, A. King, ve Y. W. Loke, “Trophoblast migration during human placental implantation.”, *Hum. Reprod. Update*, c. 2, sayı 4, ss. 307–21, 1996.
- [44] A. M. Elnashar ve G. I. Aboul-Enein, “Endometrial receptivity”, 2004.
- [45] A. J. Wilcox, D. D. Baird, ve C. R. Weinberg, “Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy”, *N. Engl. J. Med.*, c. 340, sayı 23, ss. 1796–1799, Haz. 1999.
- [46] C. L. Dunn, R. W. Kelly, ve H. O. D. Critchley, “Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation.”, *Reprod. Biomed. Online*, c. 7, sayı 2, ss. 151–61, Eyl. 2003.
- [47] L. G. Nardo, L. Sabatini, R. Rai, ve F. Nardo, “Pinopode expression during human implantation.”, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, c. 101, sayı 2, ss.

104–8, Mar. 2002.

- [48] U. Bentin-Ley, A. Sjögren, L. Nilsson, L. Hamberger, J. F. Larsen, ve T. Horn, “Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro.”, *Hum. Reprod.*, c. 14, sayı 2, ss. 515–20, Şub. 1999.
- [49] A. Stavreus-Evers, G. Nikas, L. Sahlin, H. Eriksson, ve B. M. Landgren, “Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors.”, *Fertil. Steril.*, c. 76, sayı 4, ss. 782–91, Eki. 2001.
- [50] J. Martín vd., “Human endometrial receptivity: gene regulation.”, *J. Reprod. Immunol.*, c. 55, sayı 1–2, ss. 131–9, 2002.
- [51] F. Domínguez, J. Remohí, A. Pellicer, ve C. Simón, “Human endometrial receptivity: a genomic approach”, *Reprod. Biomed. Online*, c. 6, sayı 3, ss. 332–338, Oca. 2003.
- [52] J. A. HORCAJADAS, A. RIESEWIJK, F. DOMÍNGUEZ, A. CERVERO, A. PELLICER, ve C. SIMÓN, “Determinants of Endometrial Receptivity”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, c. 1034, sayı 1, ss. 166–175, Ara. 2004.
- [53] U. Kämmerer, “Antigen-presenting cells in the decidua.”, *Chem. Immunol. Allergy*, c. 89, ss. 96–104, 2005.
- [54] K. Yoshinaga, “Research on Blastocyst Implantation Essential Factors (BIEFs)”, *Am. J. Reprod. Immunol.*, c. 63, sayı 6, ss. 413–424, Şub. 2010.
- [55] E. B. Cullinan, S. J. Abbondanzo, P. S. Anderson, J. W. Pollard, B. A. Lessey, ve C. L. Stewart, “Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, c. 93, sayı 7, ss. 3115–20, Nis. 1996.
- [56] G. F. Dunlison, D. H. Barlow, ve I. L. Sargent, “Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium.”, *Hum. Reprod.*, c. 11, sayı 1, ss. 191–6, Oca. 1996.
- [57] H. S. Taylor, A. Arici, D. Olive, ve P. Igarashi, “HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium.”, *J. Clin. Invest.*, c. 101, sayı 7, ss. 1379–1384, Nis. 1998.
- [58] H. Nagase, “Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.”, *Biol. Chem.*,

- c. 378, sayı 3–4, ss. 151–60, 1997.
- [59] A. J. Levi, M. R. Drews, P. A. Bergh, B. T. Miller, ve R. T. Scott, “Controlled ovarian hyperstimulation does not adversely affect endometrial receptivity in in vitro fertilization cycles.”, *Fertil. Steril.*, c. 76, sayı 4, ss. 670–4, Eki. 2001.
- [60] A. Tavaniotou, J. Smitz, C. Bourgain, ve P. Devroey, “Ovulation induction disrupts luteal phase function.”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, c. 943, ss. 55–63, Eyl. 2001.
- [61] M. B. TIRAŞ ve F. AYBAR, *Türkiye klinikleri. Cerrahi tıp bilimleri dergisi.*, c. 2, sayı 5. Ortadoğu Reklam Tanıtım ve Yayıncılık, 2006.
- [62] S.-M. Liu vd., “Factors Associated with Effectiveness of Treatment and Reproductive Outcomes in Patients with Thin Endometrium Undergoing Estrogen Treatment.”, *Chin. Med. J. (Engl.)*, c. 128, sayı 23, ss. 3173–7, Ara. 2015.
- [63] S. H. Cho vd., “Association of miR-146aC>G, miR-149C>T, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with risk of recurrent implantation failure in Korean women”, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, c. 202, ss. 14–19, Tem. 2016.
- [64] T. Timeva, A. Shterev, ve S. Kyurkchiev, “Recurrent implantation failure: the role of the endometrium.”, *J. Reprod. Infertil.*, c. 15, sayı 4, ss. 173–83, Eki. 2014.
- [65] M. Das ve H. E. G. Holzer, “Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors”, *Fertil. Steril.*, c. 97, sayı 5, ss. 1021–1027, May. 2012.
- [66] N. Laufer ve A. Simon, “Recurrent implantation failure: current update and clinical approach to an ongoing challenge”, *Fertil. Steril.*, c. 97, sayı 5, ss. 1019–1020, May. 2012.
- [67] A. S. Penzias, “Recurrent IVF failure: other factors”, *Fertil. Steril.*, c. 97, sayı 5, ss. 1033–1038, May. 2012.
- [68] T. El-Toukhy ve M. Taranissi, “Towards better quality research in recurrent implantation failure: standardizing its definition is the first step.”, *Reprod. Biomed. Online*, c. 12, sayı 3, ss. 383–5, Mar. 2006.
- [69] N. Lédée-Bataille, G. Laprée-Delage, J.-L. Taupin, S. Dubanchet, R. Frydman, ve G. Chaouat, “Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation.”, *Hum. Reprod.*, c. 17,

sayı 1, ss. 213–8, Oca. 2002.

- [70] T. Hardarson, C. Hanson, A. Sjögren, ve K. Lundin, “Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation.”, *Hum. Reprod.*, c. 16, sayı 2, ss. 313–8, Şub. 2001.
- [71] S. D. Spandorfer, P. H. Chung, I. Kligman, H. C. Liu, O. K. Davis, ve Z. Rosenwaks, “An analysis of the effect of age on implantation rates.”, *J. Assist. Reprod. Genet.*, c. 17, sayı 6, ss. 303–6, Tem. 2000.
- [72] L. Wang, D. Wang, X. Zou, ve C. Xu, “Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos”, *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, c. 10, sayı 7, ss. 483–492, Tem. 2009.
- [73] E. B. Baart vd., “Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial”, *Hum. Reprod.*, c. 22, sayı 4, ss. 980–988, Nis. 2007.
- [74] J. Collins, “Mild stimulation for in vitro fertilization: making progress downward”, *Hum. Reprod. Update*, c. 15, sayı 1, ss. 1–3, Eki. 2008.
- [75] M. F. G. Verberg vd., “The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis”, *Hum. Reprod. Update*, c. 15, sayı 1, ss. 5–12, Eki. 2008.
- [76] A. Raziel, S. Friedler, M. Schachter, E. Kasterstein, D. Strassburger, ve R. Ron-El, “Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization.”, *Fertil. Steril.*, c. 78, sayı 3, ss. 515–9, Eyl. 2002.
- [77] Ş. B. Bozkurt, “Serum Anti Müllerian Hormon, Bazal Fsh Düzeyleri ve Bazal Antral Folikül Sayımının Fertil ve İnfertil Popülasyonda Prospektif Karşılaştırılması”, 2013.
- [78] S. M. Nelson ve D. A. Lawlor, “Predicting Live Birth, Preterm Delivery, and Low Birth Weight in Infants Born from In Vitro Fertilisation: A Prospective Study of 144,018 Treatment Cycles”, *PLoS Med.*, c. 8, sayı 1, s. e1000386, Oca. 2011.
- [79] F. Pellestor, B. Andréo, F. Arnal, C. Humeau, ve J. Demaille, “Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes.”, *Hum. Genet.*, c. 112, sayı 2, ss. 195–203, Şub. 2003.

- [80] K. Nasmyth, J. M. Peters, ve F. Uhlmann, “Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids.”, *Science*, c. 288, sayı 5470, ss. 1379–85, May. 2000.
- [81] E. J. Margalioth, A. Ben-Chetrit, M. Gal, ve T. Eldar-Geva, “Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET”, *Hum. Reprod.*, c. 21, sayı 12, ss. 3036–3043, Ara. 2006.
- [82] D. A. Clark, C. B. Coulam, ve R. B. Stricker, “Is intravenous immunoglobulins (IVIG) efficacious in early pregnancy failure? A critical review and meta-analysis for patients who fail in vitro fertilization and embryo transfer (IVF)”, *J. Assist. Reprod. Genet.*, c. 23, sayı 1, ss. 1–13, Oca. 2006.
- [83] M. D. Stephenson ve M. R. Fluker, “Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo-controlled Canadian trial.”, *Fertil. Steril.*, c. 74, sayı 6, ss. 1108–13, Ara. 2000.
- [84] S. Talbi vd., “Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women.”, *Endocrinology*, c. 147, sayı 3, ss. 1097–121, Mar. 2006.
- [85] F. Domínguez vd., “Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated”, *Hum. Reprod.*, c. 24, sayı 10, ss. 2607–2617, Eki. 2009.
- [86] D. Haouzi vd., “Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients”, *Hum. Reprod.*, c. 24, sayı 6, ss. 1436–1445, Haz. 2009.
- [87] D. Haouzi vd., “Controlled Ovarian Hyperstimulation for In Vitro Fertilization Alters Endometrial Receptivity in Humans: Protocol Effects¹”, *Biol. Reprod.*, c. 82, sayı 4, ss. 679–686, Nis. 2010.
- [88] D. Haouzi, H. Dechaud, S. Assou, J. De Vos, ve S. Hamamah, “Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data”, *Reprod. Biomed. Online*, c. 24, sayı 1, ss. 23–34, Oca. 2012.
- [89] Y. E. M. Koot, G. Teklenburg, M. S. Salker, J. J. Brosens, ve N. S. Macklon, “Molecular aspects of implantation failure”, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, c. 1822, sayı 12, ss. 1943–1950, Ara. 2012.
- [90] P. R. Brinsden, V. Alam, B. de Moustier, ve P. Engrand, “Recombinant human

leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure”, *Fertil. Steril.*, c. 91, sayı 4, ss. 1445–1447, Nis. 2009.

- [91] N. Lédée vd., “New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side”, *J. Reprod. Immunol.*, c. 88, sayı 2, ss. 118–123, Mar. 2011.
- [92] H. Song vd., “Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial [correction of A2alpha deficiency is crucial] for ‘on-time’ embryo implantation that directs subsequent development.”, *Development*, c. 129, sayı 12, ss. 2879–89, Haz. 2002.
- [93] X. Ye vd., “LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing”, *Nature*, c. 435, sayı 7038, ss. 104–108, May. 2005.
- [94] Y. Kotani, A. Iwase, H. Ando, ve S. Mizutani, “Oxytocin-induced Prostaglandin E₂ (PGE₂) Synthesis is Regulated by Progesterone via Oxytocinase in Ishikawa Cells”, *Horm. Metab. Res.*, c. 37, sayı 1, ss. 4–9, Oca. 2005.
- [95] H. Achache, A. Tsafirir, D. Prus, R. Reich, ve A. Revel, “Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization”, *Fertil. Steril.*, c. 94, sayı 4, ss. 1271–1278, Eyl. 2010.
- [96] A. W. Horne, J. O. White, R. A. Margara, R. Williams, R. M. Winston, ve E. Lalani, “MUC 1: a genetic susceptibility to infertility?”, *Lancet (London, England)*, c. 357, sayı 9265, ss. 1336–7, Nis. 2001.
- [97] C. Tei, T. Maruyama, N. Kuji, T. Miyazaki, M. Mikami, ve Y. Yoshimura, “Reduced expression of alphavbeta3 integrin in the endometrium of unexplained infertility patients with recurrent IVF-ET failures: improvement by danazol treatment.”, *J. Assist. Reprod. Genet.*, c. 20, sayı 1, ss. 13–20, Oca. 2003.
- [98] B. A. Lessey, A. J. Castelbaum, S. W. Sawin, ve J. Sun, “Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility.”, *Fertil. Steril.*, c. 63, sayı 3, ss. 535–42, Mar. 1995.
- [99] K. B. C. Apparao, L. P. Lovely, Y. Gui, R. A. Lininger, ve B. A. Lessey, “Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome.”, *Biol. Reprod.*, c. 66, sayı 2, ss. 297–304, Şub. 2002.
- [100] A. Revel vd., “Heparanase improves mouse embryo implantation”, ss. 580–586,

2005.

- [101] C. Goodman, R. S. Jeyendran, ve C. B. Coulam, “P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure”, *Fertil. Steril.*, c. 92, sayı 2, ss. 494–498, Ağu. 2009.
- [102] H.-J. Kang vd., “Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, c. 106, sayı 24, ss. 9761–9766, Haz. 2009.
- [103] T. Daikoku vd., “Conditional Deletion of MSX Homeobox Genes in the Uterus Inhibits Blastocyst Implantation by Altering Uterine Receptivity”, *Dev. Cell*, c. 21, sayı 6, ss. 1014–1025, Ara. 2011.
- [104] M. S. Kupka vd., “Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE”, *Hum. Reprod.*, c. 29, sayı 10, ss. 2099–2113, Eki. 2014.
- [105] C. Yang, S.-D. Zheng, H.-J. Wu, ve S.-J. Chen, “Regulatory Mechanisms of the Molecular Pathways in Fibrosis Induced by MicroRNAs.”, *Chin. Med. J. (Engl.)*, c. 129, sayı 19, ss. 2365–72, 2016.
- [106] W. Liu vd., “MicroRNA and embryo implantation”, *Am J Reprod Immunol*, c. 75, ss. 263–271, 2016.
- [107] D. Cretoiu, J. Xu, J. Xiao, N. Suci, ve S. M. Cretoiu, “Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy”, *Dis. Markers*, c. 2016, ss. 1–7, Tem. 2016.
- [108] H. Zhang, F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, ve W. Filipowicz, “Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III”, *Cell*, c. 118, sayı 1, ss. 57–68, Tem. 2004.
- [109] E. Koscińska, J. Starega-Roslan, ve W. J. Krzyzosiak, “The Role of Dicer Protein Partners in the Processing of MicroRNA Precursors”, *PLoS One*, c. 6, sayı 12, s. e28548, Ara. 2011.
- [110] M. A. Taylor, “Circulating MicroRNAs as Biomarkers and Mediators of Cell-Cell Communication in Cancer.”, *Biomedicines*, c. 3, sayı 4, ss. 270–281, Kas. 2015.
- [111] R. Avraham ve Y. Yarden, “Regulation of signalling by microRNAs.”, *Biochem. Soc. Trans.*, c. 40, sayı 1, ss. 26–30, Şub. 2012.

- [112] J. T. Mendell ve E. N. Olson, “MicroRNAs in Stress Signaling and Human Disease”, *Cell*, c. 148, sayı 6, ss. 1172–1187, Mar. 2012.
- [113] L. He ve G. J. Hannon, “Erratum: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation”, *Nat. Rev. Genet.*, c. 5, sayı 7, ss. 522–531, Tem. 2004.
- [114] D. Tesfaye vd., “Potential role of microRNAs in mammalian female fertility”, *Reprod. Fertil. Dev.*, c. 29, sayı 1, s. 8, Oca. 2017.
- [115] E. M. C. Ohlsson Teague, C. G. Print, ve M. L. Hull, “The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions”, *Hum. Reprod. Update*, c. 16, sayı 2, ss. 142–165, 2010.
- [116] J. Liang, S. Wang, ve Z. Wang, “Role of microRNAs in embryo implantation.”, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, c. 15, sayı 1, s. 90, Kas. 2017.
- [117] J. A. Vidigal ve A. Ventura, “The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies”, *Trends Cell Biol.*, c. 25, sayı 3, ss. 137–147, Mar. 2015.
- [118] S. Vasudevan, Y. Tong, ve J. A. Steitz, “Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation”, *Science (80-.)*, c. 318, sayı 5858, ss. 1931–1934, Ara. 2007.
- [119] C.-C. Lin, L.-Z. Liu, J. B. Addison, W. F. Wonderlin, A. V Ivanov, ve J. M. Ruppert, “A KLF4-miRNA-206 autoregulatory feedback loop can promote or inhibit protein translation depending upon cell context.”, *Mol. Cell. Biol.*, c. 31, sayı 12, ss. 2513–27, Haz. 2011.
- [120] S. Vasudevan, “Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs”, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, c. 3, sayı 3, ss. 311–330, May. 2012.
- [121] Z. Li ve T. M. Rana, “Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges”, *Nat. Rev. Drug Discov.*, c. 13, sayı 8, ss. 622–638, Ağu. 2014.
- [122] M. Meseguer, I. Rubio, M. Cruz, N. Basile, J. Marcos, ve A. Requena, “Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study”, *Fertil. Steril.*, c. 98, sayı 6, s. 1481–1489.e10, Ara. 2012.
- [123] N. Basile vd., “Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis”, *Fertil. Steril.*, c. 101, sayı 3, s. 699–704.e1, Mar. 2014.
- [124] F. Tang vd., “Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development”, *Genes Dev.*, c. 21, sayı 6, ss. 644–648, Mar. 2007.

- [125] Y. Yang vd., “Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray”, *Dev. Dyn.*, c. 237, sayı 9, ss. 2315–2327, Eyl. 2008.
- [126] J. Mineno vd., “The expression profile of microRNAs in mouse embryos”, *Nucleic Acids Res.*, c. 34, sayı 6, ss. 1765–1771, Mar. 2006.
- [127] U. Lakshmipathy vd., “MicroRNA Expression Pattern of Undifferentiated and Differentiated Human Embryonic Stem Cells”, *Stem Cells Dev.*, c. 16, sayı 6, ss. 1003–1016, Ara. 2007.
- [128] B. McCallie, W. B. Schoolcraft, ve M. G. Katz-Jaffe, “Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility”, *Fertil. Steril.*, c. 93, sayı 7, ss. 2374–2382, May. 2010.
- [129] E. M. Rosenbluth, D. N. Shelton, A. E. T. Sparks, E. Devor, L. Christenson, ve B. J. Van Voorhis, “MicroRNA expression in the human blastocyst”, *Fertil. Steril.*, c. 99, sayı 3, s. 855–861.e3, Mar. 2013.
- [130] E. M. Rosenbluth, D. N. Shelton, L. M. Wells, A. E. T. Sparks, ve B. J. Van Voorhis, “Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation”, *Fertil. Steril.*, c. 101, sayı 5, ss. 1493–1500, May. 2014.
- [131] G. Falcone, A. Felsani, ve I. D’Agnano, “Signaling by exosomal microRNAs in cancer”, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, c. 34, sayı 1, s. 32, Ara. 2015.
- [132] W.-T. Teh, J. McBain, ve P. Rogers, “What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure?”, *J. Assist. Reprod. Genet.*, c. 33, sayı 11, ss. 1419–1430, Kas. 2016.
- [133] L. A. Salamonsen, J. Evans, H. P. T. Nguyen, ve T. A. Edgell, “The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success”, *Am. J. Reprod. Immunol.*, c. 75, sayı 3, ss. 218–225, Mar. 2016.
- [134] N. Ludwig vd., “Distribution of miRNA expression across human tissues”, *Nucleic Acids Res.*, c. 44, sayı 8, ss. 3865–3877, May. 2016.
- [135] Q. Pan, X. Luo, T. Toloubeydokhti, ve N. Chegini, “The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression”, *Mol. Hum. Reprod.*, c. 13, sayı 11, ss. 797–806, Kas. 2007.
- [136] M. Louise Hull ve V. Nisenblat, “Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease”, *Reprod. Biomed. Online*, c. 27,

- sayı 5, ss. 515–529, Kas. 2013.
- [137] J. Wittmann ve H.-M. Jäck, “Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers”, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, c. 1806, sayı 2, ss. 200–207, Ara. 2010.
- [138] M. A. Cortez ve G. A. Calin, “MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases”, *Expert Opin. Biol. Ther.*, c. 9, sayı 6, ss. 703–711, Haz. 2009.
- [139] C. H. Lawrie vd., “Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma”, *Br. J. Haematol.*, c. 141, sayı 5, ss. 672–675, Haz. 2008.
- [140] X. Chen vd., “Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for nonsmall cell lung cancer diagnosis”, *Int. J. Cancer*, c. 130, sayı 7, ss. 1620–1628, Nis. 2012.
- [141] X. Ji, R. Takahashi, Y. Hiura, G. Hirokawa, Y. Fukushima, ve N. Iwai, “Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury”, *Clin. Chem.*, c. 55, sayı 11, ss. 1944–1949, Kas. 2009.
- [142] J. C. Brase, D. Wuttig, R. Kuner, ve H. Sültmann, “Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer”, *Mol. Cancer*, c. 9, sayı 1, s. 306, Kas. 2010.
- [143] R. Machtinger, L. C. Laurent, ve A. A. Baccarelli, “Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation”, *Hum. Reprod. Update*, c. 22, sayı 2, s. dm055, Ara. 2015.
- [144] Y. Zhang vd., “Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration”, *Mol. Cell*, c. 39, sayı 1, ss. 133–144, Tem. 2010.
- [145] A. S. Azmi, B. Bao, ve F. H. Sarkar, “Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review”, *Cancer Metastasis Rev.*, c. 32, sayı 3–4, ss. 623–642, Ara. 2013.
- [146] M. Tkach ve C. Théry, “Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go”, *Cell*, c. 164, sayı 6, ss. 1226–1232, Mar. 2016.
- [147] G. Burns, K. Brooks, M. Wildung, R. Navakanitworakul, L. K. Christenson, ve T. E. Spencer, “Extracellular Vesicles in Luminal Fluid of the Ovine Uterus”, *PLoS One*, c. 9, sayı 3, s. e90913, Mar. 2014.
- [148] K. Rekker, M. Saare, A. M. Roost, A. Salumets, ve M. Peters, “Circulating microRNA Profile throughout the Menstrual Cycle”, *PLoS One*, c. 8, sayı 11, s. e81166, Kas. 2013.

- [149] G. W. Burns, K. E. Brooks, ve T. E. Spencer, “Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep¹”, *Biol. Reprod.*, c. 94, sayı 3, Mar. 2016.
- [150] D. W. Greening, H. P. T. Nguyen, K. Elgass, R. J. Simpson, ve L. A. Salamonsen, “Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions¹”, *Biol. Reprod.*, c. 94, sayı 2, s. 38, Şub. 2016.
- [151] S. M. Peterson, J. A. Thompson, M. L. Ufkin, P. Sathyanarayana, L. Liaw, ve C. B. Congdon, “Common features of microRNA target prediction tools”, *Front. Genet.*, c. 5, s. 23, Şub. 2014.
- [152] B. P. Lewis, I. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, ve C. B. Burge, “Prediction of mammalian microRNA targets.”, *Cell*, c. 115, sayı 7, ss. 787–98, Ara. 2003.
- [153] D. Yue, H. Liu, ve Y. Huang, “Survey of Computational Algorithms for MicroRNA Target Prediction”, *Curr. Genomics*, c. 10, sayı 7, ss. 478–492, Kas. 2009.
- [154] K. J. Livak ve T. D. Schmittgen, “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method”, *Methods*, c. 25, sayı 4, ss. 402–408, Ara. 2001.
- [155] N. Matentzoglou, J. Malone, C. Mungall, ve R. Stevens, “MIRO: guidelines for minimum information for the reporting of an ontology”, *J. Biomed. Semantics*, c. 9, sayı 1, s. 6, Ara. 2018.
- [156] Y.-J. Kang, M. Lees, L. C. Matthews, S. J. Kimber, K. Forbes, ve J. D. Aplin, “miR-145 suppresses embryo-epithelial juxtacrine communication at implantation by modulating maternal IGF1R”, *J. Cell Sci.*, c. 128, sayı 4, ss. 804–814, Şub. 2015.
- [157] K. Rull, L. Nagirnaja, ve M. Laan, “Genetics of Recurrent Miscarriage: Challenges, Current Knowledge, Future Directions”, *Front. Genet.*, c. 3, s. 34, 2012.
- [158] I. Virant-Klun, A. Ståhlberg, M. Kubista, ve T. Skutella, “MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans”, *Stem Cells Int.*, c. 2016, ss. 1–17, 2016.
- [159] A. Kozomara, M. Birgaoanu, ve S. Griffiths-Jones, “miRBase: from microRNA

- sequences to function”, *Nucleic Acids Res.*, c. 47, sayı D1, ss. D155–D162, Oca. 2019.
- [160] M. Ruiz-Alonso, D. Blesa, ve C. Simón, “The genomics of the human endometrium”, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, c. 1822, sayı 12, ss. 1931–1942, Ara. 2012.
- [161] R. G. Petracco, A. Kong, O. Grechukhina, G. Krikun, ve H. S. Taylor, “Global Gene Expression Profiling of Proliferative Phase Endometrium Reveals Distinct Functional Subdivisions”, *Reprod. Sci.*, c. 19, sayı 10, ss. 1138–1145, Eki. 2012.
- [162] J. M. Borthwick vd., “Determination of the transcript profile of human endometrium”, *Mol. Hum. Reprod.*, c. 9, sayı 1, ss. 19–33, Oca. 2003.
- [163] C. Punyadeera vd., “Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium”, *Cell. Mol. Life Sci. C.*, c. 62, sayı 2, ss. 239–250, Oca. 2005.
- [164] S. Mirkin vd., “In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation”, *Hum. Reprod.*, c. 20, sayı 8, ss. 2104–2117, Ağu. 2005.
- [165] A. M. Sharkey ve S. K. Smith, “The endometrium as a cause of implantation failure.”, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, c. 17, sayı 2, ss. 289–307, Nis. 2003.
- [166] R. Hamutoğlu vd., “Tekrarlayan implantasyon başarısızlığında hücre adezyon moleküllerinin rolü”.
- [167] E. Evans-Hoeker vd., “Endometrial BCL6 Overexpression in Eutopic Endometrium of Women with Endometriosis”, *Reprod. Sci.*, c. 23, sayı 9, ss. 1234–1241, 2016.
- [168] P. Jahan, R. Sreenivasagari, D. Goudi, P. L. Komaravalli, M. Ishaq, ve J. Parveen, “Role of Foxp3 Gene in Maternal Susceptibility to Pre-eclampsia - A Study From South India”, *Scand. J. Immunol.*, c. 77, sayı 2, ss. 104–108, 2013.
- [169] Benjamin MM ve Khalil RA., “Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease.”, *EXS*, c. 103, ss. 209–279, 2012.
- [170] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, ve T. Tuschl, “Identification of tissue-specific microRNAs from mouse.”, *Curr. Biol.*, c. 12, sayı 9, ss. 735–9, Nis. 2002.
- [171] M. Z. Michael, S. M. O’ Connor, N. G. van Holst Pellekaan, G. P. Young, ve R.

- J. James, “Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia.”, *Mol. Cancer Res.*, c. 1, sayı 12, ss. 882–91, Eki. 2003.
- [172] S.-Y. Cui, R. Wang, ve L.-B. Chen, “MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways.”, *J. Cell. Mol. Med.*, c. 18, sayı 10, ss. 1913–26, Eki. 2014.
- [173] U. Jeschke vd., “The human endometrium expresses the glycoprotein mucin-1 and shows positive correlation for Thomsen-Friedenreich epitope expression and galectin-1 binding”, *J. Histochem. Cytochem.*, c. 57, sayı 9, ss. 871–881, 2009.
- [174] N. Dharmaraj, S. J. Gendler, ve D. D. Carson, “Expression of Human MUC1 During Early Pregnancy in the Human MUC1 Transgenic Mouse Model1”, *Biol. Reprod.*, c. 81, sayı 6, ss. 1182–1188, 2009.
- [175] M. Donadelli, I. Dando, C. Fiorini, ve M. Palmieri, “Regulation of miR-23b expression and its dual role on ROS production and tumour development”, *Cancer Lett.*, c. 349, sayı 2, ss. 107–113, 2014.
- [176] M. G. Martínez-Hernández, L. A. Baiza-Gutman, A. Castillo-Trápala, ve D. R. Arment, “Regulation of proteinases during mouse peri-implantation development: Urokinase-type plasminogen activator expression and cross talk with matrix metalloproteinase 9”, *Reproduction*, c. 141, sayı 2, ss. 227–239, 2011.
- [177] S. Benvenuti ve P. M. Comoglio, “The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis”, *J. Cell. Physiol.*, c. 213, sayı 2, ss. 316–325, Kas. 2007.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 2081

Tarih : 28.12.2015

Konu : Prof. Dr. Sadrettin PENÇE

Sayın Prof. Dr. Sadrettin PENÇE

Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü

İlgi : DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalının 17/12/2015 gün ve 399295 sayılı yazı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Doktora Öğrencisi Fatemeh Azhari ZARNAGH' ın yürüteceği 2015/2063 dosya numaralı "Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığında, Doku ve Dolaşımdaki mikroRNA' ların Etkisi" başlıklı çalışma kurulumuzun 25/12/2015 tarih ve 22 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

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞINDA, DOKU VE DOLAŞIMDAKİ MİKRORNA'LARIN ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**3**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**2**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	acikerisim.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
3	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Girne American University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	academic.oup.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.diclemedj.org İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatemeh	Soyadı	Azhari Zarnagh
Doğ. Yeri	Tabriz-İran	Doğ. Tar.	16/05/1982
Uyruğu	İran	TC Kim No	99001323478
Email	Hani_815@yahoo.com	Tel	05372821885

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	2019
Yük.Lis.	Zanjan Azad Üniversitesi, Fen Fakültesi	2010
Lisans	Zanjan Azad Üniversitesi, Fen Fakültesi	2005
Lise	Sama	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığında, Doku ve Dolaşımdaki mikroRNA'ların Etkisi	İÜ Bilimsel proje destekli	2015 - 2018
2.	'MTHFR C677T ve A1298C gen varyasyonlarının böbrek kanseri oluşumuna etkilerinin incelenmesi'	İÜ	2016
3.	Eroin Bağımlı Beyin Dokusunda Moleküler Mekanizmalar	Tübitak	2014-2017
4.	Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> in Tabriz, northwest of Iran.		2011
5.	Prevalence of PER and VEB Type Extended Spectrum Betalactamases among Multidrug Resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> Isolates in North-West of Iran		2009-2010

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Farsça	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
İngilizce	İyi	İyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office 98,2007	İyi
Excel,Word	İyi
PowerPoint	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Farajnia S, **Azhari F**, Alikhani MY, Hosseini MK, Peymani A, Sohrabi N. Prevalence of PER and VEB Type Extended Spectrum Betalactamases among Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in North-West of Iran. Iran J Basic Med Sci. 2013 Jun;16(6):751-5.
2. Peymani A, Farajnia S, Nahaei MR, Sohrabi N, Abbasi L, Ansarin K, **Azhari F**. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, northwest of Iran. Pol J Microbiol. 2012;61(1):57-60.
3. Ahdi Khosroshahi Sh, Farajnia S, **Azhari F**, Hosseini MK, Naghili B. Antimicrobial Susceptibility Pattern and Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase Genotypes among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, North-West of Iran. Iran, Jundishapur J Microbiol. 2017; 10(6): e13368. doi: 10.5812/jjm.13368.