



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**TÜP BEBEK TEDAVİSİNDE TEKRARLAYAN
İMLANTASYON BAŞARISIZLIĞI GÖRÜLEN
KADINLARDA ANTISENSE MIRNA GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Amir SAGHAFFAN

Danışman
Doç. Dr. Şengül TURAL

SAMSUN
2023

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**TÜP BEBEK TEDAVİSİNDE TEKRARLAYAN
İMLANTASYON BAŞARISIZLIĞI GÖRÜLEN
KADINLARDA ANTISENSE MIRNA GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Amir SAGHAFIAN

Danışman

Doç. Dr. Şengül TURAL

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.22.003 proje numarası ile desteklenmiştir.

**SAMSUN
2023**

TEZ KABUL VE ONAYI

Amir Saghafian tarafından, **Doç. Dr. Şengül TURAL** danışmanlığında hazırlanan “**TÜP BEBEK TEDAVİSİNDE TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI GÖRÜLEN KADINLARDA ANTISENSE MIRNA GEN POLİMORFİZMLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 22.3.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Doç. Dr. Ayşe Feyda NURSAL Hitit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. ŞENGÜL TURAL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ABD	☒ Kabul ☒ Ret
Üye	Prof.Dr. DAVUT GÜVEN Ondokuz Mayıs Üniversitesi CERRAHİ TIP BİLİMLERİ ABD	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Serbülent YİĞİT OMÜ,L.üstü Egt. Enst., Tıbbi Biyo., Vet. Fak., Vet. Gen. ABD	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Ebru ALP Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☒

Hayır ☐

22 /03 / 2023
Amir SAGHAFIAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : Tüp BEBEK TEDAVİSİNDE TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI GÖRÜLEN KADINLARDA ANTISENSE MIRNA GEN POLİMORFİZMLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 02/01/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 15

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

02 /01 / 2023
Doç. Dr. Şengül TURAL

ÖZET

TÜP BEBEK TEDAVİSİNDE TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI GÖRÜLEN KADINLARDA miRNA GEN POLİMORFİZMLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amir SAGHAFFAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Mart/2023

Danışman: Doç. Dr. Şengül TURAL

Bu çalışmadaki amacımız önemli bir sorun haline gelmiş RIF (Recurrent Implantation Failure) etyolojisi ve yönetiminde katkıda bulunmak, başarılı implantasyon oranlarının artmasını sağlamak ve gelecekte mikroRNA ların biyomarker olarak kullanılabilmesine katkıda bulunmaktır. her hangi malignitesi olmayan 24-46 yaş grubundan en az 2 kez taze ve ya donmuş 3. ve ya 5. gün embriyo transferinin başarısız olduğu 105 kadın çalışma grubunu oluşturdu. Kontrol grubunu ise sağlıklı spontan gebeliği olan 22-40 yaş arası 110 kadından oluşturuldu. Kontrol grubu bilgilendirilmiş ve araştırmaya dahil edilebilmeleri için gerekli yasal izinleri alınmıştır. Kontrol grubuna ve hasta grubuna ait kadınların her birinden alınan 5-10'ar cc'lik periferik kan örnekleri EDTA (etilen diamin tetraasetik asitli) tüplere konulmuş ve uygun zamanda DNA ekstraksiyonu yapılmak üzere -20 C°'de saklanmıştır. Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kadınların her birinden 5-10'ar cc'lik periferik kan alınmıştır. RIF grubunda ve kontrol grubunda çalıştığımız periferik kandaki miRNA lar arasında allelik ve genotipik farklılık izlenmedi. Aynı zamanda her iki grubu arasında yaş , BMI (Vücut Kitle Endeksi) ve FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) değerleri arasında da anlamlı fark yoktu. Daha önce yapılan birkaç çalışmanın aksine bizim çalışmamızdaki Türk kadın popülasyonunda RIFli grup ile kontrol grubu arasında periferik kandan bakılan **miR-146aC>G, miR-149C>T, miR-196a2T>C, VE miR-499A>G** arasında anlamlı allelik ve genotipik fark izlenmedi.

Anahtar Sözcükler: Tekrarlayan IVF Başarısızlığı, miRNA, genotip

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MIRNA GEN POLYMOPHISMS IN WOMEN WITH REPEAT IMPLANTATION FAILURES IN IVF TREATMENT

Amir SAGHAFIAN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology Programme

Master, March/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şengül TURAL

To contribute to the etiology and management of RIF (Repeated Implantation failure), which has become an important problem, to increase successful implantation rates and to contribute to the use of micRNAs as biomarkers in the future. At least 2 times fresh or frozen 3rd or 5th day embryo transfer from the 24-46 age group constituted the study group. The control group consisted of 110 women between the ages of 22 and 40 who had healthy spontaneous pregnancies. The control group has been informed and the necessary legal permissions have been obtained to be included in the research. Peripheral blood samples of 5-10 cc each from each of the control group and the patient group were placed in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and stored at -20 C° for DNA extraction at the appropriate time. 5-10 cc each of the healthy women who make up the control group. There was no allelic and genotypic difference between miRNAs in peripheral blood that we studied in the RIF group and the control group. At the same time age between both groups. There was also no significant difference between BMI (Body mass index) and FSH (Follicle-stimulating hormone) values. Conclusions Unlike several previous studies, in our study, there was no significant allelic and genotypic difference between the peripheral blood **miR-146aC>G**, **miR-149C>T**, **miR-196a2T>C**, and **miR-499A>G** between the RIF group and the control group in the Turkish female population.

Keywords: Recurent Implantation Failure, miRNA, genotypic

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında her konuda bilgi ve deneyimi ile yol gösteren, destek olan danışman hocam Doç. Dr. Şengül TURAL hocama, OMÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Sezgin GÜNEŞ'e, eğitim hayatım boyunca hep bilgilerini ve deneyimlerini paylaşan tüm değerli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Bu süreç boyunca bana büyük sabır gösterip katlandığı için değerli eşim Matin Sohrabi ye teşekkürlerimi sunarım Hayatım boyunca yanımda olan, beni destekleyen aileme; özellikle sevgili anneme, babama ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

Amir SAGHAFIAN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Etiyoloji	4
2.1.1. Maternal Faktörler	4
2.1.2. Embriyo Durumu	6
2.1.3. Uterin Faktörler	6
2.1.4. Gamet Faktörleri Oosit Ve Sperm Durumu	7
2.1.5. İmmunolojik Faktörler	8
2.1.6. Endometrial Reseptivite	9
2.1.7. Genetik Faktörler	11
2.2. MiRNA'lar ve Biyolojik Etkileri	13
2.2.1. MiRNA'ların Biyogenezi	14
2.2.2. MiRNA işlevindeki Önemli Proteinler	16
2.2.3. MiRNA Düzenleyici Mekanizmalar	16
2.2.4. Translasyon Aktivasyonu	16
2.2.5. MRNA'nın Parçalanması	17
2.2.6. MiRNA'ların Kanser İle İlişkisi	17
2.2.7. MiRNA'lar ve Kardiyovasküler Hastalıklar	17
2.2.8. MiRNA'lar Ve Diyabet	18
2.3. MiR-146A, MiR-149, MiR-196A2 VE MiR-499 Genlerindeki Polimorflar	19
2.3.1. Genetik Polimorfizmler	19
2.4. Yöntem	22
2.4.1. Transfer Yöntemi	22
2.4.2. İmmunmodulator Desteği	22
2.4.3. İndüksiyon Protokolü	23
2.4.4. Progesteron Desteği	24
2.4.5. Antitrombotik Ajanlar	24
2.4.6. Aspirin	24
2.4.7. Enfeksiyon İçin Antibiyotikler	25
2.4.8. Anatomik müdahale	25
2.4.9. Salpinjektomi	26
2.4.10. Preimplantasyon Genetik Screening	26
2.4.11. Preimplantasyon Genetik Tanı	27
2.4.12. Erkek faktörü	27
3. MATERYAL VE METOD	28
3.1. Kullanılan Araç Ve Gereçler	28
3.2. DNA Ekstraksiyonu	29
3.3. Ekstrakte Edilen DNA'nın Kalitatile İncelemesi	30
3.4. Elde Edilen DNA'nın Kantitatif İncelemesi	30
3.5. Agaroz Jel Elektroforez İle DNA'nın Kalitatif Analizi	30
3.6. PCR	34
3.6.1. PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	34

3.6.2. PCR Programını Optimizasyonu.....	35
3.7. Tek Nükleotid Polimorfizminin Araştırması İçin Yöntem.....	36
3.7.1. PCR-RFLP	36
3.7.2. Restriksiyon Enzimleri Tarafından Enzimatik Sindirim.....	37
3.7.3.Yöntem.....	38
3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Örneklerin Genomik DNA Ekstraksiyonunun Sonuçları.....	40
4.2. miR-146aC>G, miR-149C>T, miR-196a2T>C, VE miR-499A>G Gen Polimorfizmleri PCR Sonuçları	41
4.3. miR-499A>G Polimorfizm Tanımlamak İçin BCLİ Sindirimin Sonuçları.....	42
4.4. miR-196a2T>C Polimorfizm Tanımlamak İçin SACİ Sindirimin Sonuçları.....	43
4.5. miR-149C>T Polimorfizm Tanımlamak İçin MSPI Sindirimin Sonuçları	44
4.6. miR-146aC>G Polimorfizm Tanımlamak İçin SACİ Sindirimin Sonuçları	45
4.7. İstatistiksel Analiz sonuçları.....	46
5. TARTIŞMA.....	50
KAYNAKÇA.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKR	: Ardışık Kesikli Reaktör
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri
RIF	: Recurrent Implantation Failure
BMI	: Vücut Kitle Endeksi
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
Ark	: Arkadaşları
ASRM	: Amerikan Üreme Derneği
OKS	: Oral Kontraseptif PR :- Gebelik Oranı
MUC	: Musin 1 UNK :-Uterin Natural killer
OHSS	: Ovaryan Hiperstümlasyon
RPL	: Tekrarlayan Gebelik kaybı
APS	: Antifosfolipidantikor sendromu
HES	: İnsan embriyonik kök hücreleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. MikroRNA evrim yolları	15
Şekil 2.2. MikroRNA'ların diyabetin oküler, renal, kardiyovasküler komplikasyonları ile ilişkisi	18
Şekil 3.1. PCR reaksiyon adımlarına genel bakış	33
Şekil 4.1. Bazı örneklerin DNA ekstraksiyon sonuçları	41
Şekil 4.2. %3 agaroz jel üzerinde PCR ürünü elektroforezinin sonucunun bir örneği.....	41
Şekil 4.3. BclI enzimi tarafından sindirildikten sonra PCR ürününün elektroforez sonucuna bir örnek	42
Şekil 4.4. MspI enzimi tarafından sindirildikten sonra PCR ürününün elektroforez sonucuna bir örnek	43
Şekil 4.5. AluI enzimi tarafından sindirildikten sonra PCR ürününün elektroforez sonucuna bir örnek	44
Şekil 4.6. SacI enzimi tarafından sindirildikten sonra PCR ürününün elektroforez sonucuna bir örnek	45
Şekil 5.1. PubMed verilerine göre MikroRNA' anahtar kelimesinin kullanım sayısı.....	50
Şekil 5.2. Blastosist ve reseptif maternal endometriyum arasındaki bağlanma	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. PCR için gerekli malzemeler.....	28
Tablo 3.2. Agaroz jeli hazırlamak ve ürünü yüklemek için malzemeler.....	28
Tablo 3.3. Enzimatik sindirim için malzemeler.....	29
Tablo 3.4. Farklı agaroz konsantrasyonları ile DNA moleküllerinin ayırma gücü.....	31
Tablo 3.5. PCR reaksiyonunda çözeltilerin konsantrasyonu ve hacmi.....	35
Tablo 3.6. Tek nükleotid polimorfizmlerinin amplifikasyonu için PCR'nin termal profili	36
Tablo 3.7. Enzim tarafından enzimatik sindirim için en uygun koşullar	37
Tablo 4.1. Demografik veriler.....	40
Tablo 4.2. miR146 genotipik istatistiksel analiz sonucu	46
Tablo 4.3. miR149 genotipik istatistiksel analiz sonucu	47
Tablo 4.4. miR196 genotipik istatistiksel analiz sonucu	48
Tablo 4.5. miR499 genotipik istatistiksel analiz sonucu	49

1. GİRİŞ

İnfertilite, çiftlerin bir yıl süresinde korunma yöntemi kullanmadan düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen gebeliğin oluşmaması, gerçekleşmemesidir. Yardımcı üreme uygulamaları bu konuda önemli katkılar sağlamaktadır. İlk olarak 1958 yılında Bob Edwards arkadaşlarıyla beraber Glasgow'da tavşan embriyolarından ilk kök hücreyi elde ettiler. Bundan 1 yıl sonra 1959 yılında Gregory Pincustur insan overlerinden oosit izole etmeyi başardı. Kaydedilen bu gelişmeler sonucunda ilk tüp bebek araştırmaları 1966 yılında jinekolog Dr.Patrick Christopher Steptoe ve Cambridge Üniversitesinde çalışan fizyolog Robert Edwardsın beraber çalışmaları ile başlamıştır.

1971 yılında Dr Patrick Christopher Steptoe laparoskopik yolla ilk embriyo transferini genel anestezi altında yapmıştır.

Çalışmalarına hiç durmadan devam eden Dr Patrick Christopher Steptoe dünya tarihinde ilk tüp bebeği 25 Temmuz 1978 yılında, İngilterenin Oldham kasabasındaki bir hastahannede dünyaya getirmeyi başarmıştır .Türkiyede ise ilk tüp bebek 1989 yılında dünyaya gelmiştir.

Yıllarca tıp bilimi geliştikçe tüp bebek tedavisi, yöntemleri, engelleri, komplikasyonları ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

İnfertilite, çiftlerin bir yıllık süre içinde çocuk istemelerine, herhangi bir korunma yöntemi kullanmamalarına ve düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen gebeliğin gerçekleşmemesi olarak tanımlanmaktadır .

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) İnfertilite Tanı ve Tedavi Çalışma Grubu, 8500 infertil çift üzerinde bir çalışma yapmış ve infertiliteye katkıda bulunan tıbbi durumları belirlemek için standart tanı kriterlerini kullanmıştır. Gelişmiş ülkelerde, infertil çiftlerin %37'sinde kadın faktörü %8'inde erkek ve %35'inde hem erkek hem de kadın faktörü infertilite sebebi olarak bildirilmiştir. Çiftlerin % 5-de açıklanamayan infertilite mevcuttu ve yüzde 15'i çalışma sırasında gebe kaldı. Bu çalışma, infertilitenin öncelikle sadece kadın partnerdeki bozukluklardan kaynaklanmadığını göstermiştir. (Kuohung W, Hornstein M, Causes of female infertility. 2021)

İmplantasyon, endometrium ile embriyo arasında büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks ve prostoglandinler ile oluşan karmaşık bir diyalog çerçevesinde; embriyonun desidüaya yapışması, bazal membrana doğru inmesi ve stromaya invaze olmasıdır. Günümüz Yardımlı Üreme Teknikleri

'ndeki uygulamalarda %80'lik fertilizasyon oranlarına ulaşılabilmesine rağmen, ortalama canlı doğum oranı %45'i geçememektedir. Bu noktada implantasyon başarısızlıkları ve endometrial reseptivite, yardımcı üreme teknikleri'nin en önemli hız kısıtlayıcı basamaklarından birini oluşturmaktadır.

Yardımcı üreme tekniklerindeki gelişmeler embriyo kalitesini arttırmıştır. Buna karşın hala pek çok hasta IVF tedavisine rağmen gebe kalamamaktadır. İmplantasyon embriyo ve endometrium arasında senkronizasyon gerektiren kompleks bir süreçtir. Reprodüktif tıpta gelişmelerle uterin reseptivitenin daha iyi anlaşılması, implantasyon başarısındaki anahtar faktördür. Moleküler sinyaller daha iyi anlaşıldıkça ve yeni sinyal yolları bulunduğça bunlar uterin reseptivitenin düzeltilmesini ve gebelik oranlarının arttırılmasını sağlayacaktır.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (RIF), in vitro fertilizasyon (IVF) tedavi sikluslarını takiben iyi kalitedeki embriyoların transfer sonrasında implantasyonlarının başarısız olduklarında belirlenir. İmplantasyon başarısızlığı, maternal faktörler veya embriyonik nedenlerle ilişkilidir. Bu karmaşık süreçte endometrial integrinler, hücre dışı matriks molekülleri ve adezyon molekülleri gibi birçok moleküler faktör rol oynamaktadır.

Son çalışmalar, miRNA'ların RIF'yi düzenlediğini göstermektedir. Çok sayıda miRNA insanda endometriozis gibi endometrial bozukluklar ve premature ovarian yetmezlik bulguları ile ilişkilendirilmektedir. Bu sonuçlar, miRNA'ların infertilite dahil olmak üzere kadının üreme sisteminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Antisense miRNA gen polimorfizmlerinin de bu süreçte implantasyon başarısını etkilediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu amaçla bu çalışmada antisense miRNA gen polimorfizmlerinin tekrarlayan implantasyon başarısızlığına etkisini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Çocuk sahibi olmak isteyen, normal yol ile bu isteği gerçekleştiremeyen çiftler için Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) uygulanmaktadır.

Yardımcı Üreme Teknikleri:

IUI: İntrauterin inseminasyon

IVF: İn-vitro fertilizasyon

ICSI: İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu

DCET: Donmuş-çözdürülmüş embriyo transferi

GIFT: Gamet intrafallopian transfer

ZIFT: Zigot intrafallopian transfer

TET: Tubal embriyo transfer

PGT: Preimplantasyon genetik tanı

PESA, MESA, TESA, TESE: Azoospermide sperm elde etme teknikleri

Assisted Hatching

IVM: İn-vitro maturasyon

Diğerleri

IVF ile ilgili yapılan çalışmalar ve araştırmalara rağmen halen başarısız sonuçlar alınabiliyor. Tedavi sürecinin tekrar başlaması çiftlerde hem maliyet açısından, hem de çiftlerin psikolojisi açısından istenmeyen bir durumdur.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (Recurrent implantation failure) için net bir tanımlama yoktur. RIF tanımı farklı literatürlerde farklı tanımlanmıştır.

Zeyneloğlu ve ark., IVF'nin özellikle yüksek kalitede iki embriyo ile üç başarısız döngüsünden sonra olduğu konusunda hemfikirdirler.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, 40 yaşın altındaki bir kadında en az 3 taze ve ya donmuş sıklısta en az 4 kaliteli embriyonun transferinden sonra gebelik elde edilememesi durumudur.

RIF >3 embriyo transferinin başarısız olması durumudur.

Tekrarlayan implantasyon yetmezliği (RIF), implantasyonun pelvik ultrasonografi ile tanınabilir bir aşamaya defalarca ulaşamadığı bir durumu ifade eden klinik bir durumdur

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (RIF), morfolojik olarak iyi embriyoların başarılı bir implantasyon ve klinik gebelik elde edilmeden normal bir

uterusa tekrar tekrar transferi olarak tanımlanabilir. Genel olarak, 10'dan fazla yüksek kaliteli embriyonun uterusa transfer edildiği iki ila altı IVF siklusundan sonra gebelik elde edilememesi RIF olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, çoğu IVF merkezinde, makul derecede iyi embriyoların transfer edildiği üç siklusun başarısızlığı araştırmayı gerektirir. Tedavi protokollerinin optimizasyonuna ve laboratuvar teknolojilerindeki büyük ilerlemelere rağmen, RIF yönetimi evrensel olarak klinisyenler ve embriyologlar için büyük bir zorluk teşkil etmektedir.

IVF ile ilgili yapılan çalışmalar ve araştırmalara rağmen halen başarısız sonuçlar alınabiliyor. Tedavi sürecinin tekrar başlaması çiftlerde hem maliyet açısından, hem de çiftlerin psikolojisi açısından istenmeyen bir durumdur. Bu hastalara yeni ve faydalı çözüm önermek için etyolojiyi belirlemek gerekir.

2.1. Etiyoloji

RIF'li çiftler deneyimli bir Kadın Doğum uzmanı tarafından gözden geçirilmelidir, çünkü altında yatan nedenin araştırılması en önemli adımdır. Çiftlere tedavi sürecini net bir şekilde anlatmak gerekir. İnfertilitenin altında yatan nedenin tanısı, araştırma sonuçları, tedavi protokolü, over stimülasyonuna yanıt, yumurta ve embriyoların kalitesi ve neden başarılı bir gebelik sonucunun elde edilemediği kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmelidir.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının sebepleri multifaktöriyeldir. Temel olarak 5 gruba ayırabiliriz;

1) Maternal faktörler:

- a) Hasta yaşı
- b) Vücut kitle indeksi
- c) Sigara Kullanımı
- d) Stress

2) Embriyo durumu

3) Uterin faktörler olarak sıralanabilir

4) Gamet Faktörleri: Oosit durumu, Sperm durumu

5) Parental genetik durum

2.1.1. Maternal faktörler

a) Hasta yaşı

Anne yaşı, tüp bebek için kullanılan embriyoların kalitesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Anne yaşı arttıkça anöploidi sıklığının da arttığı uzun zamandır

bilinmektedir Gebelik oranlarının da anne yaşı arttıkça azaldığı bulunmuştur. Özellikle Salumets ve ark., özellikle İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) tekniği ile dondurulmuş embriyo transferinde gebelik sonucuna katkıda bulunan başlıca prediktif faktörün anne yaşı olduğunu bulmuşlardır. 39 yaşından itibaren, biyokimyasal gebelik görülme oranı önemli ölçüde daha yüksekti.

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, şu anda 2015'ten itibaren en son istatistiklerle birlikte, her yıl genel YÜT başarı oranlarını bildirmektedir. Literatürle uyumlu olarak, 35 < hastalarda (%41.3 ve %47.1) hem taze hem de dondurulmuş embriyo transferinde implantasyon oranları, > 44kadınlardaki (%1.9 ve %16.2) oranlara göre anlamlı derecede yüksekti. Bu, genetik özellikler de dahil olmak üzere embriyo kalitesinin anne yaşının artmasıyla düştüğü fikrini de desteklemektedir.

b)Vücut kitle indeksi

Artmış VKİ'nin (>25 kg / m²) implantasyon oranını da etkilediği gösterilmiştir. IVF uygulanan hastalarda, Sınıf I, II ve III obez hastalar (VKİ > 30 kg / m²), normal kilolu hastalarla (VKİ 18.5-24.99 kg / m²) karşılaştırıldığında, 0.69 (0.53-0.90), 0.52 (0.36-0.74) ve 0.58 (0.35-0.96) oranlarıyla gösterilen en yüksek implantasyon başarısızlığı şansına sahipti.

c)Sigara içmek

Gebelik sırasında çoğu kadın çevre baskısına maruz kalmamak adına sigarayı bırakır,ya da gizli kullanır.Bu nedenle sigara kullanımının RİF üzerine etkisine dair çok geniş çaplı çalışma yoktur. Sigara içmenin, YÜT uygulanan sigara içmeyen hastalara kıyasla her gebelik için düşük yapma riskinin (belirtilmemiş zaman) önemli ölçüde artmasına neden olduğu gösterilmiştir.

IVF uygulanan kadınlarda, sigara içen hastaların over stimülasyonu sırasında daha düşük östradiol seviyelerine sahip oldukları bulunmuştur. Sigara toksinleri, korpus luteum oluşumunu ve embriyonun implantasyonunu bozmada rol oynayabilir.

d)Stress

"Stres hormonu" olarak da bilinen yüksek kortizol seviyelerinin, düşük kortizol seviyesine sahip kadınlara kıyasla, gebe kaldıktan sonraki ilk 3 hafta içinde 2.7 kat daha fazla düşük yapma şansına yol açtığı gösterilmiştir. Vücuttaki kortizol üretimi, psikolojik, immünolojik ve diğer stresörlere yanıt olarak yükselir.

Bu, maternal stresörlerin önlenmesinin veya azaltılmasının gebelik üzerinde olumlu bir sonuca sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmanın aksine, Pasch

ve ark., klinik anksiyete veya depresyon gibi psikolojik stresin, ilk kez doğurganlık tedavisi gören kadınlarda IVF sonucu üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını bulmuşlardır. Yalnız bu çalışma sadece ilk kez infertilite tedavisine başvurup başarısız olanlarla yapılmıştır.

2.1.2. Embriyo Durumu

Özellikle RİF-li hastalarda kaliteli embriyo seçmek en önemli prensiptir. İyi kalitede bir embriyo, gelişim gününe karşılık gelen doğru sayıda hücreye sahip olan embriyo olarak tanımlandı .

Transfer esnasında verilen embriyolardan blastokistlerin 2.-3. gün (klivaj dönemi) embriyolarına kıyasla implantasyon başarısının daha iyi olduğu izlenmektedir. Özellikle iyi ovaryan cevabı olan ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı hastalarında blasto kist aşamasında embriyo daha fazla görülmektedir. İmplantasyon başarısını arttırmak için kullanılan diğer bir seçenek de dondurulmuş embriyo transferi dir.2018 yılında yapılan randomize kontrollü çalışmada donmuş ve taze sikluslar arasında klivaj dönemindeki embriyo transferlerinde canlı doğum oranları açısından istatistiksel bir fark izlenmemiştir. Fakat çalışmada blastokist transferi için bu sonuçlar üzerinden tahminde bulunulamayacağı belirtilmiştir. Bu çalışmada iki grup arasında sadece ovaryan hiperstimulasyon sendromu belirgin olarak taze sikluslarda donmuş sikluslara oranla daha fazla izlenmiştir.

Embriyo kalitesinin değerlendirilmesi ve en iyi embriyonun seçiminde hızlandırılmış görüntüleme gibi teknikler geliştirilmiştir. Bu optik mikroskopla embriyonun gelişimin tüm evrelerinde inkübatordan çıkarılıp izlenebilir.

EmbryoScope(Unisense FertiliTech) embriyo gelişiminin morfolojik ve mekansal analizine izin verir . Ama maliyeti yüksek ve çok zaman alıcıdır.

2.1.3 Uterin faktörler

Uterin faktörler temel olarak myometrial, endometrial ve tubal patolojiler olarak sınıflandırılabilir. IVF uygulanan hastalarda implantasyon oranlarını etkileyebilecek polipler, myomlar ve adezyonlar dahil olmak üzere çeşitli uterus patolojileri vardır. Çoğu zaman hastalar asemptomatiktir ve bazen bu problemler transvajinal ultrasonda fark edilmeyebilir. Bu da histeroskopi gibi endometrial kaviteyi değerlendirme yöntemini gerektiriyor . Myomlar endometriyal kavitenin bozulmasına neden olabilir. Bu da implantasyonun gerçekleşmesine engel olabilir. Geçirilmiş ameliyat veya enfeksiyona sekonder gelişen yapışıklıklar embriyonun luminal yüzeye yapışmasını

önleyebilir ASRM (American Üreme Tıbbı Derneği) hidrosalpinslerin IVF geçiren kadınlarda implantasyon üzerinde de olumsuz bir etkisi olabileceğini bildirmiştir. RIF'li hastalarda septat uterus ve bikornuat uterus gibi mullerian anormallikler de dikkate alınmalıdır. Septat uterus, tedavi edilmemiş septası olanların, histeroskopik metroplasti yapılanlara kıyasla IVF sonrası kötü sonuçlara sahip olmaları nedeniyle RIF'e katkıda bulunabilir.

Endometriyumun kendisi de implantasyon başarısızlığının kaynağı olabilir. Önceki endometriyal travma, OKS-lerin uzun süreli kullanımı ve bozulmuş uterus kan akışı, ince bir endometriyumun potansiyel etiyolojileridir.

Endometriyumun kalınlığının implantasyon oranları üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Uygun endometriyal kalınlık için kesin bir eşik değer belirlenmiş olmasa da, YÜT-ün genellikle başarılı olabileceği alt sınır yaklaşık 8 mm olduğu öne sürülmektedir. 9 mm'den 16 mm'ye kadar gebelik şansı %53'ten %77'ye yükselerek implantasyon oranlarında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

2.1.4 Gamet Faktörleri oosit ve sperm durumu

RIF'in bir nedeni de oosit kalitesinin düşük olmasıdır. Over stimülasyonuna yanıt az olduğunda da oosit kalitesinin düşük olmasından şüphelenmemiz gerek (Ferraretti ve ark., 2011) Yukarıdaki özellikler düşük antral folikül sayıları, yüksek FSH ve düşük anti-Müllerian hormonu ile ilişkili olduğunda, RIF'in altında yatan nedenin düşük oosit kalitesi ile ilişkili olduğu varsayılabilir. Oosit kalitesindeki yaşa bağlı düşüş, artmış kromozomal nondisjunction ile ilişkilidir, bu da anöploid embriyolar, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ve mitokondriyal DNA hasarının artması ile sonuçlanır (Wang ve ark., 2009)

Artık sadece oositin değil, kumulus hücrelerinin de implantasyon sürecinde önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Kumulus ooforus, antral folikül aşamasından döllenmeye ve erken embriyo gelişimine kadar oosit ile ilişkili granüloza hücrelerinin bir külesidir (32) Kumulus hücreleri prostaglandinlerin kaynağıdır ve implantasyon bölgesinde anjiyogenezde rol oynayabilecek anjiyojenik faktörleri eksprese eder (vasküler endotelial büyüme faktörü). Kumulus hücre gen ekspresyonunun oosit kalitesi, embriyo yeterliliği ve gebelik sonucu ile ilişkili olduğu görülmektedir (Assou ve ark., 2010). Yakın zamanda yapılan prospektif randomize bir çalışma, kumulus hücreli embriyoların ko-kültürünün, tekrarlanan implantasyon

başarısızlığı olan kadınlarda, kumulus hücreleri olmayan kültüre kıyasla daha iyi implantasyon ve gebelik sonuçları olduğunu göstermiştir.

Kötü embriyo kalitesinin sebeplerinden biri de zayıf sperm kalitesidir. Normal karyotipi olan RIF hastalarında sperm kromozomal anormalliklerinin daha yüksek bir insidansı bildirilmiştir. Teratozoospermili hastalarda gebelik oranları (PR) ve implantasyon oranlarının anlamlı olarak daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Rubio ve arkadaşları normal karyotipli hastalarda 13, 18, 21, X ve Y kromozomları için sperm anöploidisi ve diploidi oranlarını ikili ve üçlü renkli FISH teknikleri kullanarak analiz etmişlerdir İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrası RIF'li çiftlerde cinsiyet kromozomu disomilerinin insidansının arttığını bildirdiler.

Ek olarak, kaotik mozaiklerle sonuçlanan sentrozom anomalileri büyük olasılıkla baba kökenliydi.

Kanıtlar, sperm DNA hasarının IUI ve IVF sonrası düşük gebelik oranlarıyla ilişkili olduğunu göstermektedir .Ek olarak, sperm DNA hasarının artmış seviyeleri, IVF ve ICSI sonrası gebelik kaybı riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Bu nedenle, IVF'de hem maternal hem de baba kromozomal anormalliklerinin tekrarlanan implantasyon başarısızlığının etiyolojisinde anahtar rol oynadığını gösteren önemli kanıtlar vardır.

2.1.5 İmmunolojik Faktörler

Son zamanalarda yapılan çalışmalarda immunolojik olayların da RIF etyolojisinde rol oynadığını göstermiştir. Yamada ve ark., tekrarlayan abortusları olan ,normal fetal karyotipleri olan kadınlarda gebelik öncesi periferik NK hücre düzeyini ve aktivitesini ve bu NK hücrelerinin gelecekteki spontan gebelik oranları üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir Bir sonraki gebeliği hem biyokimyasal gebelik hem de abortusla sonuçlanan kadınlarda periferik NK hücrelerinin düzeylerinin nispeten eşit olduğu belirlendi, bu da bu bağışıklık hücrelerinin sadece implantasyonu etkilemeyebileceğini, aynı zamanda gebelikte ek bir mekanizma içerebileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, bu iki gruptaki NK hücre düzeyi ve aktivitesi, başarılı canlı doğumlar elde etmeye devam eden kadınlardan anlamlı derecede daha yüksekti . Sacks ve ark., RIF'li kadınların, kontrollere kıyasla lenfositlerin konsantrasyonu ($0.23 \times 10^9 / L \pm 0.11$ 'e karşı $0.20 \times 10^9 / L \pm 0.13$) ve yüzdesi ($> \% 18$, eşik değeri) ile periferik NK hücrelerini anlamlı olarak arttırdığını bulmuşlardır Bununla birlikte, bu

testin duyarlılığının sadece% 11 olduğunu, RIF'li kadınların gebeliğe ulaşmadaki zorluklarına katkıda bulunan diğer birçok faktöre sahip olabileceğini düşündüğünü belirtmek önemlidir. Bu nedenle, NK hücre düzeylerinin test edilmesi, RIF'li kadınları genel popülasyondan ayırt etmek için mutlaka kullanılamaz, ancak implantasyon başarısızlıklarının etiyolojisinin immünolojik profilleriyle ilişkili olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir.

2014 yılında Santillan ve ark. tarafından yayınlanan bir çalışmada, RIF'li hastalarda hem periferik NK hem de Uterin NK hücrelerinin yükseldiği görülmüştür. Bugüne kadar bu çalışmalar hala araştırılmaktadır ve NK hücrelerinin tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıplarındaki rolü hala tartışmalıdır. NK hücre seviyesi ve aktivitesi, infertiliteden muzdarip kadınlarda bağışıklık sisteminin sadece bir yanıtıdır ve bu bilgilerden klinik değer elde etmek için daha fazla veriye ihtiyacımız vardır.

2.1.6 Endometrial Reseptivite

Embriyo implantasyon oranı %25-30 aralığında olup, uygunsuz uterin reseptivite implantasyon başarısızlığının yaklaşık 2/3'ünden sorumlu tutulmaktadır. Bu başarısızlıkta embriyonun payı ise 1/3 ile sınırlıdır.

İmplantasyon aşamaları üç basamakta tanımlanmıştır; Apozisyon, Adezyon ve İnvazyon. Özetle değinecek olursak; blastokist apozisyon aşamasında trofoblastik hücreler aracılığıyla reseptif endometriyel epitele tutunur. Bu aşamada blastokist ile endometriyumun etkileşimine bağlı hücrelerde polarite kaybı, pinopodların oluşması, Musin-1 (MUC-1) üretimi ile blastokistin endometriyum yüzeyi uygun alanının buluşması gerçekleşir. Pinopodlar; uterodomlar olarakta adlandırılır ve doğal menstrüel siklusun 19-21. günleri arasında oluşan endometriyal epitelyal hücre membran mikro çıkıntıları olarak bilinirler. Pinopodların gelişiminde luteal faz dominant hormonu; progesteron ve HOXA-10 gen transkripsiyonu sorumludur. Adezyon aşamasının önemli sitokinlerinden; Leukemia inhibiting factor' de (LIF) pinopodlar tarafından salgılanır . Endometriyum lüminal yüzeyi glikoprotein bir yapı ile kaplıdır ve majör proteini progesteron etkisi altında salınan MUC-1' dir. MUC-1 embriyonun uygun tutunma alanına taşınma ve yönlendirilmesinden sorumludur. Apozisyonu, adezyon basamağı takip eder ve kısaca invazif blastokistin lüminal epitele penetrasyonu olarak tariflenebilir . Bu aşamada blastokist ve endometrium arasında yoğun bir etkileşim vardır, implantasyonda hücreler arası ve hücre dışı

matriks etkileşimleri hücre yüzey adezyon molekülleri sayesinde olur. Bu yüzey adezyon moleküllerinden en iyi bilinenleri; İntegrin, Kaderin, Selektin ve immünglobulinlerdir . Desidualize endometriyum ve erken embriyo, hücre adezyonunu sağlayan Laminin ve Fibronektin gibi ekstrasellüler matriks komponentlerini eksprese ederler. Bu dönemde büyüme faktörleri ve sitokinlerle birlikte birçok molekül embriyo ile endometriyum arasında sinyal iletimine yardımcı olarak adezyonu sağlarlar. İnvazyon evresi kontrolü ise, trofoblastların etkisi altında olup trofoblastların luminal epitel ve bazal laminadan geçerek endometriyal stroma içerisine doğru penetre olmaları ile karakterizedir. Bu evre sayesinde embriyonun vitalitesini devam ettirmesi için gereken maternal vasküler yatağın işgali ve gelişmiş plasental sistemin oluşumu sağlanır . Bu aşamada sinsityotrofoblastlara invazyon yeteneği kazandıran ve plazminojenin, plazmine dönüşümünü sağlayan matrix metalloproteinazların salınmasına yol açan plazminojen aktivatörünün kısıtlayıcı basamağı, desidual hücrelerin majör ürünü olan Plasminojen Aktivatör İnhibitörü-1(PAI-1)'dir.

Endometriyal reseptivitenin gösterilmesinde pinodopodlara dair ilk çalışma, Psychos tarafından ortaya atılmış ve günümüzde pinopodların insan endometriyumu reseptif penceresinde bir biomarker olarak gösterilmesi ile sürdürülmüştür. Embriyonun erken tutunma ve invazyonunun menstruel siklusun ancak 19. gününde gerçekleştiği ise Herting A.T. ve ark.'nın çalışmasında gösterilmiştir . Ancak 90'lı yıllara gelindiğinde Navot D. ve ark. insanlarda donör embriyoları kullanarak reseptif endometriyumun insan endometriyal siklusunda progesteronun maksimum konsantrasyona ulaştığı 4-5 günlük süreçte gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır. Sonuçta, endometriyal reseptif pencere siklusun 19-20. günlerinde epitelyal östrojen ve progesteron reseptörlerinin kaybolması ile belirmektedir. Bugün fertil kadınlarda endometriyal reseptiviteyi anlamamız bize açıklanamayan infertilite ve rekürren gebelik kayıplarını anlamada yol gösterici olmuştur. Endometriyal reseptivitenin değerlendirilmesi ve günümüz bilgilerine ulaşılması uterin sekresyonların ince katman kromotografisi, immünohistokimya, reverse transkripsiyon – PCR, DNA mikro array, micRNA çalışmaları ve proteomik analizler sayesinde olmuştur.

Uterodamlar veya pinopodlar olarak bilinen mikroskopik projeksiyonlar 4-5 gün süren reseptif dönemin değerlendirilmesinde potansiyel belirteç olarak gösterilmişlerdir. Kanıtlar göstermektedir ki, in-vitro ortamda embriyo bu yapılarla etkileşime girmektedirler. Pinopodların değerlendirilmesi büyük ölçüde subjektif

olmaktadır. Endometriyal örneklerde bulunup bulunmamaları; ya gözüktüp kaybolmalarına veya bizim erken değerlendirmemize bağlı henüz oluşmamış olabileceklerinden, kafa karışıklığına yol açabilir. Sonuç olarak, endometriyel reseptif dönemin tanımlanmasında pinopodların varlığının gösterilmesinin, tek başına yeterli olmadığı sonucuna varılabilir. Diğer lüminal proteinlerden MUC-1, karbonhidrat glikoprotein yapısında olup lüminal yüzeyde glikokaliks bir katman oluşturur ve implantasyon için bir bariyer görevi yapar. MUC-1' in implantasyon döneminde fare deneylerinde kaybolduğu gösterilmiştir. İnsanlarda ise MUC-1 endometriyal reseptif dönem boyunca sentezlenmekte ve endometriyal reseptivitenin belirlenmesinde aktif çalışılan proteinlerden biri olma özelliğini korumaktadır . Endometriyal biomarker olmaya aday endometriyum lümeninde saptanabilen ve embriyo yapışmasında görev alan proteinler trophinin , L-selectin ligand ve heparin-binding epidermal growth factor – like growth factor (HB-EGF) olabileceği bildirilmiştir. Fakat bunların hiçbirisinin endometriyal reseptivite değerlendirilmesinde faydalı olduğuna dair elde yeterli veri yoktur.

Endometriyumun bir önceki siklusta histeroskopik veya pipel biyopsi/hasarlamasının reseptiviteyi bir sonraki siklusta glicodelin A, laminin $\alpha 4$, integrin $\alpha 6$ ve MMP1 gibi faktörlerin gen ekspresyonlarını artırması ve bu sayede reseptivitenin iyileştirilerek implantasyona uygun hale getirilmesi amaçlanmıştır. Endometriyal hasarlanma ile ilgili yapılan bir meta analizde, IVF siklusu öncesinde yapılan hasarlanmanın faydalı olduğu bildirilmiştir. Ancak faydası gösterilmiş olan bu işlemle ilgili tartışmalı olan konu, endometriyal hasarlanmanın tüm IVF hastalarımıza uygulanıp uygulanmayacağıdır.

Sonuç olarak, endometriyal reseptivite halen araştırmaya açık bir konu olup, mevcut bilgilerimiz bazı potansiyel biomarkere işaret etmekte ancak bunların rutin kullanıma girmesi için halen daha fazla çalışmalara ve uluslararası konsensus kararlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.7 Genetik Faktörler

Çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalar, IVF sonrası tekrarlanan implantasyon başarısızlığının önemli bir nedeninin yüksek kromozomal anöploidi sıklığı olduğunu kanıtlamıştır. Yüksek dereceli RIF'li kadınlarda translokasyonlar, mozaikizm, inversiyonlar ve delesyonlar gibi kromozomal anormalliklerin artmış insidansı gösterilmiştir.

RIF'li hastalarda genel kromozomal anormallik oranı %2,5 olarak gözlenmiştir. Bu anormalliklerin çoğu kromozomal translokasyonlardı.

Pehlivan ve ark. 13, 16, 18, 21, 22, X ve Y kromozomları için biyopsi yapılan 3. gün embriyolarından blastomerler üzerinde floresan in-situ hibridizasyon (FISH) kullanarak, üç veya daha fazla başarısız IVF girişimi olan hastalarda kontrollere (% 36) kıyasla kromozomal anormalliklerin (% 67) anlamlı derecede daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Başka bir çalışmada, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) kullanarak, Voullaire ve ark. IVF sonrası RIF'li 20 kadında implantasyondan önce embriyolardan biyopsi yapılan 76/126 (% 60) tek blastomerde kromozomal anormallikler tespit etmişlerdir.

Çalışmalar erken insan embriyolarında kromozom replikasyonunun ve ayrışmasının normal dizisinin bozulmasının, maternal sitoplazmik faktörlerin veya hücre döngüsü kontrol genlerindeki mutasyonlarına neden olarak, RIF'in yaygın bir nedeni olabileceğini öne sürdüler.

Daha önce de genetik bozukluklarla RIF arasındaki ilişkiye yönelik çalışmalar yapılmıştır.

2020 yılında 'Association of miR-27aA>G, miR-423C>a, miR-449bA>G, and miR604A>G Polymorphisms with Risk of Recurrent Implantation Failure' isimli çalışma yapılmış. Sonuç olarak bu genlerdeki polimorfizm artmış RIF ile ilişkilendirilmiştir.

RIF ve tekrarlayan abortusların etyolojisi benzerdir. Daha önce tekrarlayan abortuslarda da genetik çalışmalar yapılmış ve aşağıdaki sonuçlar alınmıştır. 2001 yılında İsrailde Tel Aviv Hastanesinde 'Rekurren abortuslarda Karyotip' isimli çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 125 örnek başarılı bir şekilde karyotiplendirilmiş. Sonuç: Anormalliklerin düşük (%29) insidansı, tekrarlayan düşüklerin çoğundan alternatif mekanizmaların sorumlu olabileceğini göstermektedir. Bu rakamlar, tekrarlayan düşükler için tedavinin etkinliğini değerlendirmek için bir temel oluşturmaktadır. Daha ileri çalışmalar, karyotipik olarak anormal fetüsleri olan hastaların iyi bir prognoza sahip olduğunu doğrularsa, daha fazla araştırma ve tedavi yapılması gerekip gerekmediği konusunda bilinçli bir karar verilebilir.

2016 yılında Suudi Arabistanda King Abdulaziz University Hospital de 'Kromozomal anormallikler, trombofili, alelik polimorfizmleri ve/veya akraba evliliği ile tekrarlayan düşüklerin ilişkileri' isimli çalışma yapılmıştır.

Sonuç: hastaların %7.6'sının sayısal veya yapısal kromozomal anormalliklerin taşıyıcısı olduğunu ortaya koymuştur. Tekrarlayan gebelik kaybı olan grupta yüksek translokasyon oranı (%46) izlenmiş. Akraba olup,tekrarlayan ghebelik olanlarda ise kromozomal anormallikler arasında anlamlı bir korelasyon bulundu. Hem Faktör V Leiden,hem de Protrombin A20210G allelik polimorfizmleri artmış tekrarlayan düşük prevalansı ile ilişkiliydi.

2.2 MicroRNA lar ve Biyolojik Etkileri:

1993'te Lee ve arkadaşları, mikroRNA'lar (miR'ler) olarak adlandırılan protein kodlayan RNA'ların ekspresyonunu ve işlevini düzenlemede yer alan kodlamayan küçük RNA'ları ilk kez tanımladılar. MikroRNA'lar genellikle 24-28 nükleotittir ve yüksek oranda korunur.

mikroRNA'lar mRNA transkripsiyonunu ve translasyonunu azaltır ve bu sayede gen ekspresyonunun düzenlenmesinde indirgeyici rol oynarlar.

MikroRNA kodlayan genlerden transkripsiyon yapılır, ancak proteinlere çevrilmez. MikroRNA'lar, ön mikroRNA'lar olarak bilinen küçük seri pin yapıları şeklindeki birincil transkriptlerden oluşur. pre mikroRNA sonunda fonksiyonel mikroRNA haline gelir. MikroRNA'lar bir veya daha fazla mRNA molekülünü bir dereceye kadar tamamlayıcıdır.

MikroRNA'lar, MikroRNA'ları ve SiRNA'lar adı verilen küçük enterferans yapan RNA'ları içeren küçük düzenleyici RNA'lar grubudur. İnsan genomunda yaklaşık 1000 farklı mikroRNA olduğu ve insan genlerinin %30'a kadarının mikroRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir. Bazı insan genlerinin düzenlenmesinde birden fazla microRNA yer alabilir.

Korunan mikroRNA'ların %80'den fazlası dokuya özgüdür.

MikroRNA'lar, hedef mRNA'larını çeşitli şekillerde kapatır.

MikroRNA anormallikleri, kan maligniteleri dahil olmak üzere çok çeşitli insan kanserlerinde rapor edilmiştir: Promiyelositik lösemi ve leiomyom ve hipofiz adenomu gibi iyi huylu tümörler, pankreatit, tiroid, akciğer, meme, nöroblastom ve glioblastoma gibi çeşitli karsinom türleridir. MiRNA'nın en yaygın kullanımı terapötik amaçlar ve tanısal biyobelirteçler için olmuştur.

Bu moleküller işlevlerine göre onkogenler ve baskılayıcı tümörler olmak üzere iki gruba ayrılır. Terapötik çalışmaların çoğu artık onkogen miRNA'lar ve bunların

aktivitelerini engelleyen teknolojiler ve bu molekülleri inhibe etmek için ilaçların kullanımını üzerinde gerçekleştirilmiştir.

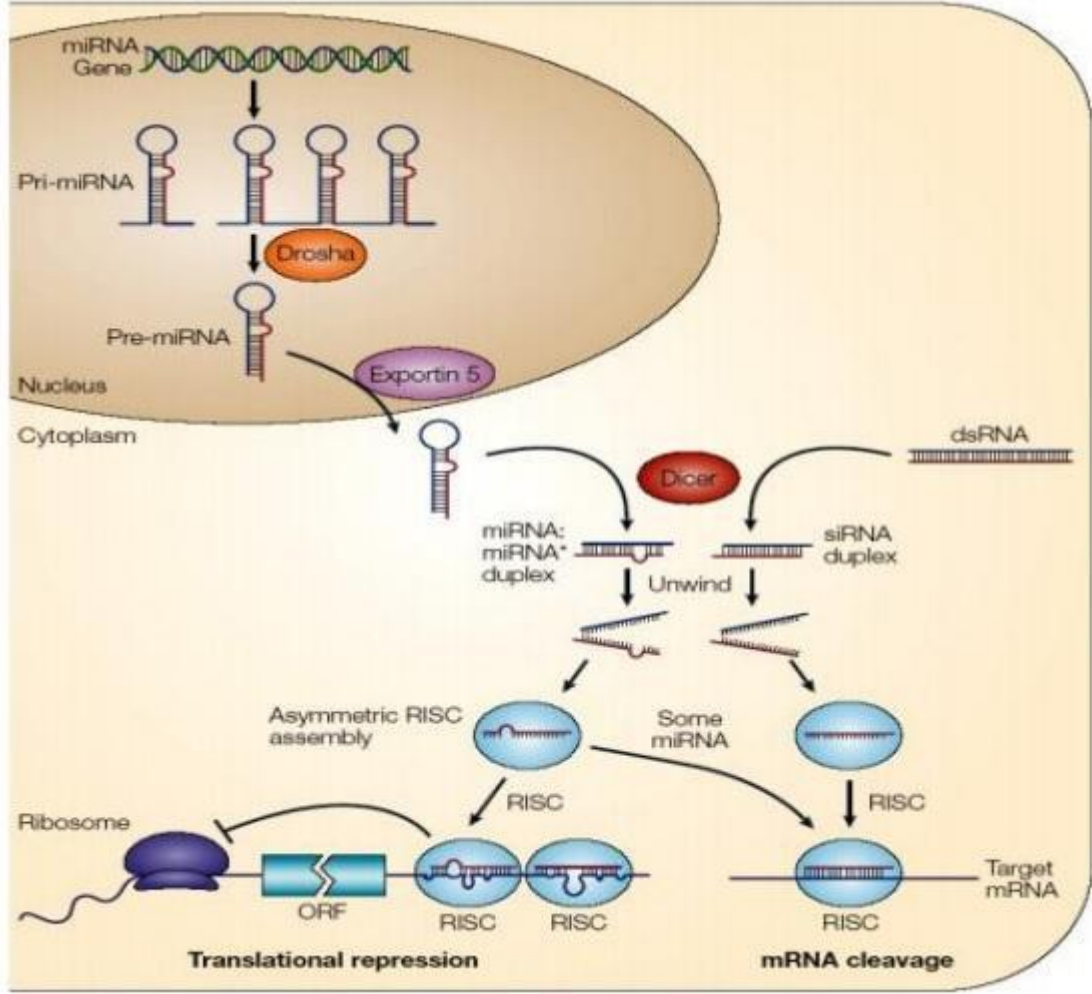
2.2.1. MikroRNA'ların Biyogenezi:

MikroRNA'lar, yüksek düzeyde evrimsel olarak korunan büyük bir RNA alt kümesidir. Bu moleküller, transkripsiyondan sonra mRNA'ların translasyonunu inhibe ederek veya mRNA'nın UTR'-3 ucuna bağlanarak degradasyonlarını indükleyerek gen ekspresyonunu kontrol eder. MikroRNA'ların biyogenezi, çekirdekte ve sitoplazmada gerçekleşir. İlk olarak, çekirdekte RNA polimeraz II proteini kodlayan genlerden pri miRNA'yi kopyalar. Pri miRNA'lar, 3 ucunda bir Poly A kuyruğu ve 5 ucunda bir CAP başlığı olan bir döngü-sap yapısına sahiptir.

Pri miRNA'lar, Drosha adı verilen çift sarmallı RNA'nın bölünmesi için RNase III enzimini ve DGCR8 çift sarmallı RNA'ya bağlanan proteini içeren bir kompleks tarafından miRNA-pre'ye dönüştürülür ve Pri miRNA'lar exportin5 ile sitoplazmaya taşınır.

Sitoplazmada, TRBP/Dicer kompleksi tarafından Pri miRNA üzerinde son işlem yapılır. Dicer, SiRNA yolunu katalize eden ve RISC kompleksinin oluşumunu başlatan iki RNase III bölgesi ve bir PAZ bölgesi içerir. Dicer katalitik bileşeni, bir mRNA olan tamamlayıcı SiRNA dizisini yok eder. Dicer eylemi, 4-18 nükleotid uzunluğunda çift sarmallı RNA'ların oluşumuyla sonuçlanır, bunlar bir iplik kılavuz ipliği ve bir iplik yolcu ipliğini içerir. Takip eden zincir yok edilir ve lider zincir, indüklenebilir kompleks argonat (miRISC) miRNA proteinlerine bağlanır. Bu kompleks, hedef mRNA'nın UTR'-3 ucunu tamamlar. MiRNA dizisi, hedef mRNA'yı tamamen tamamlayıcıysa ve tamamen bağlanırsa, hedef mRNA'yı yok edecektir. Ayrıca, miRNA ile mRNA arasındaki bağlantı bozuksa, translasyonu engeller. Böylece her mRNA birden fazla mRNA'yı hedefleyebilir.

Aşağıdaki şekil, MicroRNA'nın evrimsel yolunu ve transkripsiyon sonrası ve çeviri düzeyinde gen ekspresyonunu düzenleme yöntemlerini gösterir.



Şekil 2.1. MikroRNA evrim yolları ve transkripsiyon sonrası ve çeviri düzeyinde gen ekspresyonunu düzenleme yöntemleri (He ve Hannon, 2004)

MikroRNA'lar, RNA polimeraz II tarafından pri-miRNA'lar adı verilen büyük RNA öncüleri olarak kopyalanır ve bir 5 başlık ve bir poli A kuyruğundan oluşur. Pri-miRNA'lar çekirdekte, Drosha adı verilen RNaz III enziminden ve çift sarmallı RNA'ya bağlanan bir proteinden oluşan bir mikroişlemci kompleksi tarafından işlenir. İşlenmiş Pr-miRNA'lar yaklaşık 70 nükleotit uzunluğundadır ve kusurlu bir kök-ilmek yapısı (seri pin şekli) oluşturan PriRNA'lara dönüştürülür. Daha sonra ihracat sistemi yoluyla sitoplazmaya taşınırlar. Sitoplazmadaki Pri-miRNA'lar, Dicer adlı bir RNase III enzimi tarafından başka bir işleme adımı, miRNA adı verilen yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda çift sarmallı RNA'lar üretir. Dicer ayrıca RNA ile uyarılan susturma kompleksi (RISC) üretmeye başlar.

2.2.2 MiRNA İşlevindeki önemli Proteinler

Proteinlerin miRNA işlevindeki rolünün tam mekanizması tam olarak anlaşılmassa da, bir kısmı hedef üzerindeki miRNA işlevinde aracı görevi görür. Bu proteinlerin bazıları, görevi onları hedef mRNA'daki tamamlayıcı bölgeye yerleştirmek olan RNA kaynaklı yok olma kompleksinin anahtar bileşenleridir; Diğer proteinler bu kompleks ile geçici olarak ilişkilirken. RISC kompleksinin ana alt birimi, miRNA'ya bağlanan AGO proteindir. AGO, farklı türler arasında homolog bir proteindir.

2.2.3 MiRNA düzenleyici mekanizmalar

MiRNA mekanizmasının en tartışmalı yönü, translasyonu baskılamasıdır. Başlangıçta, miRNA'ların translasyonu azaltma yeteneği, protein sentezi ve mRNA konsantrasyonu üzerindeki etkilerindeki farklılıklardan çıkarılmıştır. MiRNA'nın translasyonun başlamasını engellediği teorisi birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Örneğin, sakkaroz yoğunluğu gradyanlı santrifüjleme yöntemini kullanan bir dizi çalışma, mRNA'ların yönünde daha az kütleyle sahip polisomlara doğru bir kayma göstermiştir; Bu başlı başına çeviriye hatalı bir başlangıç olduğunu gösterir. Hücresiz sistemlerde miRNA kaynaklı translasyon baskılanmasındaki gelişmeler, miRNA'nın mRNA üzerinde S85 ribozom kullanımının inhibisyonu üzerindeki etkisini göstermiştir. Buna karşılık, diğer çalışmalar miRNA'ların hedeflenen mRNA'larının polisom profilinde bir değişiklik göstermedi, bu da miRNA'ların sonraki aşamalarda translasyonu baskılayabileceğini düşündürdü.

2.2.4 Translasyon Aktivasyonu

MiRNA'ların uzun süredir çeviri sürecinde yalnızca engelleyici bir rolü olduğu düşünülse de, yeni kanıtlar, belirli koşullar altında çeviriyi uyarabileceklerini öne sürüyor. Bu nedenle, memeli çoğalan hücrelerinde translasyonu engelleyen mRNA, hücre döngüsü Aphidicollin gibi bir replikasyon inhibitörü tarafından durdurulduktan sonra ters etkiye sahiptir. Örneğin, çeviri bastırma işlemi ayrıca hedef mRNA'nın miRNA üzerindeki dizi ile eşleştirilmesini gerektirir. Bununla birlikte, miRNA'ların translasyon verimliliğini arttırdığı kesin mekanizma henüz açıklığa kavuşturulmamıştır.

2.2.5 mRNA'nın Parçalanması

MicroRNA, mRNA'yı iki farklı mekanizma ile bozar. Hedef mRNA ile tamamen eşleştirilmiş olan bu miRNA'lar, endonükleotit bölünmesine neden olur. Bu durumda, mRNA tamamen yok edilir ve ortaya çıkan fragmanlar, kafa 5 ve 3'teki koruma eksikliği nedeniyle eksonükleazların saldırısına karşı hassastır. MiRNA'nın hedef mRNA'yı parçalama potansiyeli olmasına rağmen, bu, miRNA'nın hedefiyle tam eşleşmemesi nedeniyle hayvan hücrelerinde nadiren görülür. Bu nedenle, miRNA'lar hedefleriyle tam olarak eşleşmediğinde, poli A kuyruk hasatının hızlanması artar. Deadenilasyonun ardından, poli A'nın kuyruğuna bağlanan protein işlevini kaybeder, bu da sırayla kalech'in kafa 5'ten alımını hızlandırır ve mRNA'yı uç 5'ten eksonükleotit sindirime maruz bırakır. MiRNA'nın bozunma yeteneğinin iki önemli sonucu vardır: Birincisi, hedef transkriptlerin konsantrasyonunu azaltarak, mRNA'yı proteine dönüştürme verimliliği büyük ölçüde azalır. İkincisi, miRNA'nın hedefinin yok edilmesi üzerindeki inhibitör etkisi, translasyonun baskılanmasına kıyasla geri döndürülemez ve bu da miRNA'nın inhibitör etkisinin etkinliğini artırır. MiRNA'ların gen ekspresyonu üzerindeki genel etkileri arasında, mRNA bozunmasının etkisinin kapsamı, bir mRNA'dan diğerine büyük ölçüde değişir. Bazı durumlarda, mRNA degradasyonu, gen ekspresyonunun aşağı regülasyonunda önemli bir rol oynar; Diğer durumlarda, bu ayarlamaların etkisi, çeviri bastırmanın etkisinden çok daha azdır.

2.2.6 MikroRNA'ların Kanserle İlişkisi:

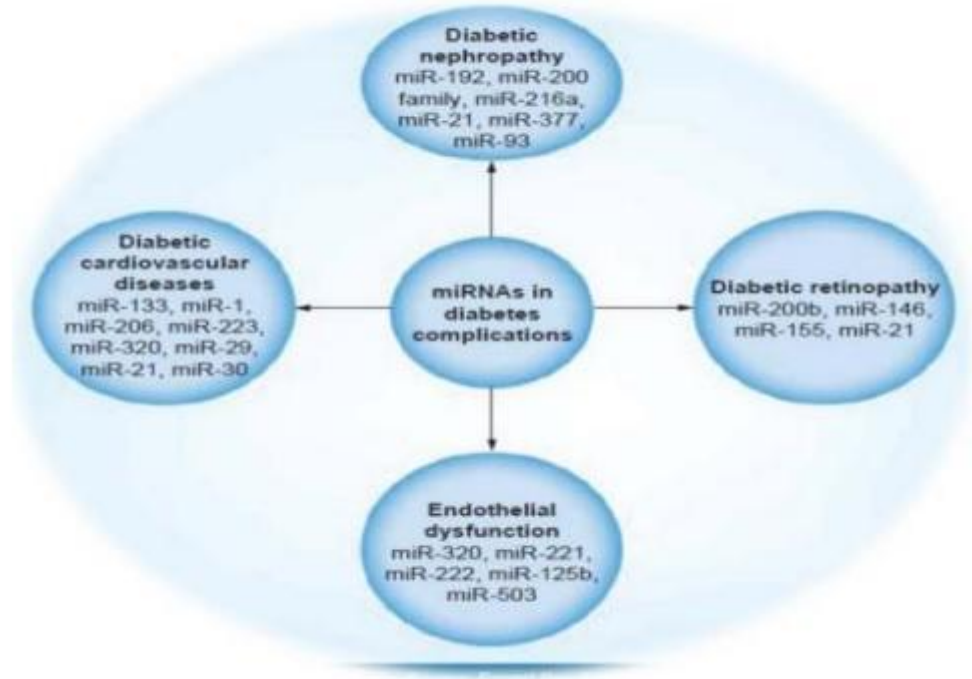
Bilinen mikroRNA'ların hemen hemen yarısı, kanserle ilişkilidir. MikroRNA'lar kullanılarak kanser tanımlanabilir, sınıflandırılabilir ve hastalığın ciddiyetini tahmin etmek için kullanılabilir.

2.2.7 MikroRNA'lar ve kardiyovasküler hastalıklar

MikroRNA'ların son yıllarda kardiyak fonksiyon ve vasküler morfolojinin temel düzenleyicileri olarak tanımlanması, kardiyovasküler sistemin fizyolojisi ve patolojisi hakkındaki görüşümüzü değiştirmiştir. MikroRNA'lar tarafından gen ekspresyonunun düzenlenmesinin karmaşıklığı, her biri birkaç yüz hedef geni düzenleyen birkaç önemli kardiyovasküler mikroRNA tanımlanarak vurgulanmıştır. Yakın zamanda yayınlanan makaleler, microRNA'ların miyokard enfarktüsü, hipertrofi ve fibroz gibi embriyonik ve vasküler gelişim sırasında kardiyovasküler gelişimdeki rolünü vurgulamış ve bunları kardiyovasküler hastalığın önlenmesi, teşhisi ve tedavisi için potansiyel hedefler olarak tanımlamıştır.

2.2.8 MikroRNA'lar ve Diyabet:

Tip 2 diabetes mellitus, günümüzün gelişmiş dünyasında kardiyovasküler ölüm, körlük ve böbrek yetmezliğine neden olan yaşam boyu süren bir hastalıktır. MikroRNA'ların tip 2 diyabetteki rolü ilk olarak 2004 yılında Poy ve ark tarafından yayınlandı ve insülin sekresyonunun düzenlenmesinde doğrudan rol oynayanın miR-375 olduğunu gösterdi. Son yıllarda, düzinelerce mikroRNA tipi, hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin patogeneze katkıda bulunan faktörler veya katkıda bulunanlar olarak tanımlanmıştır. Bu hastalığın çok faktörlü doğası nedeniyle, birçok mikroRNA'nın ve belki de diğer küçük düzenleyici RNA suşlarının diyabete katkıda bulunan faktörler olarak tanımlanacağı görülmektedir.



Şekil 2.2. MikroRNA'ların diyabetin oküler, renal, kardiyovasküler komplikasyonları ile ilişkisi

2.3 MIR-146a, MIR-149, MIR-196a2 ve MIR-499 Genlerindeki Polimorflar:

Çalışmalar, MIR-196a2 ekspresyonunun arttırılmasının HOX ailesi genlerinin ekspresyonu üzerinde etkili olduğunu ve düşükklere neden olmada etkili olabilen Akt mesajlaşma yolunu göstermiştir. Bu ailenin genleri, embriyo implantasyonu sürecinde çok önemli bir rol oynamaktadır. HOXB8, MIR-196a2'nin hedef genlerinden biridir. MIR-499 için birincil hedef gen, FGF3 ekspresyonunu baskılayan ve meme kanseri ile bağlantılı olan SOX6 gen transkripsiyon inhibitörüdür.

Çalışmalar, MIR-196a2 ve MIR-499'un spontan düşüklerle ilişkili olduğunu ve bu mikroRNA'ların ayrıca TP53 ve MDM2 ile ilişkili olduğunu ve çeşitli hücrel süreçlerde yer aldığını göstermiştir.

Mir-146a ekspresyonu, Fas gen ekspresyonunu düzenler. Mir-146a ifadesi, NF kB yolu tarafından düzenlenir. Mir-146a'nin önemli hedef genlerinden biri, embriyonik kök hücrelerin farklılaşmamasında önemli rol oynayan ve bunu Cip1/WAF1/p21 ile yapan SMAD4 genidir. Mir-146a için başka bir hedef gen, hücre döngüsü ve büyümesinde yer alan Akt ve E2F genleridir. mir-149 mir-146a mir-196a2 ve mir-499'un küretaj ile ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

2.3.1 Genetik Polimorfizmler

Günümüzde genetik polimorfizmler ile bazı hastalıklara yatkınlık arasındaki ilişkinin tartışılması önemli konulardan biridir.

Bir türün popülasyonunda bulunan ve farklı fenotiplere neden olabilen bir genin farklı alellere genetik polimorfizm denir.

Nokta mutasyonlarını tespit etmek ve kaydetmek için PCR-RFLP adı verilen bir polimeraz zincir reaksiyonu kullanılır.

Bu yöntemde, polimeraz zincirlerinin reaksiyon ürünleri, kısıtlama enzimleri tarafından sindirilir ve daha sonra elde edilen fragmanlar, poliakrilamid veya agaroz jel üzerinde ayrılır. Kesme noktalarından herhangi birinde bir mutasyon olması durumunda, sindirilen parçaların boyutunda bir uzunluk farkı gözlemlenecektir. Kesim noktalarında herhangi bir mutasyon olmasa bile, amplifiye edilen parçaların sindirilmesinden sonra, küçük ve ekstra mutasyonların varlığından kaynaklanabilecek bir uzunluk farkı gözlemlenebilir.

2008 yılında yapılan bir çalışmada, Zhibi Hu ve diğerleri, artan meme kanseri riski taşıyan micoRNA'lardaki yaygın genetik varyantları ve bu moleküllerin Çinli kadınlarda tümör baskılayıcı veya onkogenler olarak işlevini inceledi. Bu çalışmada

meme kanserli 1009 hasta hasta grubu ve 1093 hasta kontrol grubu olarak seçilmiştir.Çalışmalarının sonuçları, artan meme kanseri riskinde rol oynayan çeşitli genotiplerin mir-196a2 ve mir-499 olduğunu gösterdi.

Kore'de genç Joo Joan tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada, mir-149 mir-146a mir-196a2 ve mir-499 içeren miRNA polimorfizmleri ile tekrarlayan düşükler arasındaki ilişki incelenmiştir. Araştırma 564 Koreli kadın arasında yapılmış, en az iki ardışık düşük yapan 330 hasta ve düşük öyküsü olmayan en az bir canlı doğum yapan kontrol grubundaki 234 kadın test edilmiştir. Araştırmalarının sonuçları, mir-196a2 ve mir-499 kombinasyonunun sinerjik etkilere sahip olduğunu gösterdi.

2015 yılında yapılan bir çalışmada, Farah Parvin ve Suraksha Agrawal, mir-146a, mir-499, mir-196a2 ve mir-149 dahil miRNA polimorfizmleri ile kuzey Hindistan'ın kadın popülasyonunda tekrarlayan düşükler arasındaki ilişkiyi inceledi. Bu çalışma, kontrol grubu olarak tekrarlayan düşükleri olan 200 kadın ve çocuğu olan ve doğal doğum öyküsü olan 300 kadın üzerinde gerçekleştirildi. Bireylerin genotiplenmesi için RFLP-PCR tekniği kullanıldı. Çalışmalarının sonuçları, mir-499 polimorfizmlerinin farklı alel ve genotiplerinin, tekrarlayan düşük olasılığı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir.

2013 yılında Dae Ho Ahn ve arkadaşları, mir-146a, mir-499, mir-196a2 ve mir-149 polimorfizmlerini ve bunların mide kanseri riski ile ilişkisini inceledi. Kore popülasyonunda 469 hastayı hasta ve 447 kontrol olarak incelediler. Mide kanserinde mir-146 ve mir-499 genotipleri birleştirildiğinde hastalarda hayatta kalma şansının arttığını bulmuşlardır.

Joost P.G. Hollanda'da, Sluijter ve meslektaşları insan embriyonik kardiyomiyosit progenitör hücrelerini izole edip kültürlediler ve bunları verimli donör kalp hücrelerine ayırdılar.MiRNA'ların ekspresyonu, kas dokusuna özgü olan miR-1 ve mir-499'un farklılaşmış hücrelerde güçlü bir şekilde arttığını gösterdi.

miR-1 ve mir-499'un geçici transfeksiyonu, CMPC'lerin proliferasyon oranını sırasıyla %25 ve %10 oranında azalttı ve muhtemelen histon dekstral 4 veya Sox6'yı baskılayarak CMPC'lerden ve embriyonik kök hücrelerden kardiyomiyosit farklılaşmasını arttırdı.Sonunda, miRNA'ların, miR-1 ve mir-499'un ekspresyon seviyelerini modüle ederek CMPC'lerin kardiyomiyositlere çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlediği sonucuna varmışlardır.

Qiu Fuman ve arkadaşları tarafından 2015 yılında Güney Çin'de yapılan bir araştırma, miR499 polimorfizmi ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi

inceledi. Araştırma 564 Çinli arasında yapıldı. Kanser öyküsü olmayan 368 kanserli hasta ve kontrol grubundaki 346 hasta test edildi. Çalışmalarının sonuçları, yetişkin mir-499 dizisindeki rs3746444 polimorfizminin akciğer kanseri ile ilişkilendirilebileceğini ve bu kanserde bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini gösterdi.

Mehrzaad pourjafar ve arkadaşları tarafından 2017 yılında İran'da yapılan bir çalışmada, mir-499 ve mir-196a2 dahil miRNA polimorfizmleri arasındaki ilişki, artan anemi riski ile incelenmiştir. Bu çalışmada anemi öyküsü olmayan 80 hasta ve kontrol grubundaki 105 hasta test edildi. Araştırmalarının sonuçları, mir-499 ve mir-196a2 kombinasyonunun sinerjik etkilere sahip olduğunu gösterdi.

Seyed mortezaafsharzadeh ve arkadaşları tarafından 2016 yılında İran'da yapılan bir çalışmada mir-146a, mir-499 ve mir-196a2 gibi miRNA polimorfizmlerinin meme kanseri ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmalarının sonuçları, yalnızca mir-499'un artan meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu gösterdi.

Mohsen Omrani ve arkadaşları tarafından 2012 yılında İran'da yapılan bir çalışmada, mir-146a ve mir-499 dahil miRNA polimorfizmleri ile romatoid artrit arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Bu çalışmaya 104 hasta ve kontrol grubunda 110 hasta dahil edildi. Çalışmalarının sonuçları, mir-499'un bu hastalıkla ilişkili olduğunu gösterdi.

İmplantasyon, endometrium ile embriyo arasında büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks ve prostoglandinler ile oluşan karmaşık bir diyalog çerçevesinde; embriyonun desidua'ya yapışması, bazal membrana doğru inmesi ve stromaya invaze olmasıdır. Günümüz Yardımlı Üreme Teknikleri 'ndeki uygulamalarda %80'lik fertilizasyon oranlarına ulaşılabilmesine rağmen, ortalama canlı doğum oranı %45'i geçememektedir. Bu noktada implantasyon başarısızlıkları ve endometrial reseptivite, yardımcı üreme teknikleri'nin en önemli hız kısıtlayıcı basamaklarından birini oluşturmaktadır.

Yardımcı üreme tekniklerindeki gelişmeler embriyo kalitesini arttırmıştır. Buna karşın hala pek çok hasta IVF tedavisine rağmen gebe kalamamaktadır. İmplantasyon embriyo ve endometrium arasında senkronizasyon gerektiren kompleks bir süreçtir. Reprodüktif tıpta gelişmelerle uterin reseptivitenin daha iyi anlaşılması, implantasyon başarısındaki anahtar faktördür. Moleküler sinyaller daha iyi anlaşıldıkça ve yeni sinyal yolları bulunduğunda bunlar uterin reseptivitenin düzeltilmesini ve gebelik oranlarının arttırılmasını sağlayacaktır.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (RIF), in vitro fertilizasyon (IVF) tedavi sikluslarını takiben iyi kalitedeki embriyoların transfer sonrasında implantasyonu başarısız olduğunda belirlenir. İmplantasyon başarısızlığı, maternal faktörler veya embriyonik nedenlerle ilişkilidir. Bu karmaşık süreçte endometrial integrinler, hücre dışı matriks molekülleri ve adezyon molekülleri gibi birçok moleküler faktör rol oynamaktadır.

Son çalışmalar, miRNA'ların RIF'yi düzenlediğini göstermektedir. Çok sayıda miRNA insanda endometriozis gibi endometrial bozukluklar ve prematüre ovarian yetmezlik bulguları ile ilişkilendirilmektedir (Burney et al. 2009; Rah H. Et al. 2013) Bu sonuçlar, miRNA'ların infertilite dahil olmak üzere kadının üreme sisteminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Antisense miRNA gen polimorfizmlerinin de bu süreçte implantasyon başarısını etkilediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Cho Sh et al, 2016). Bu amaçla bu bilgiler ışığında, çalışmamızda antisense miRNA gen polimorfizmlerinin tekrarlayan implantasyon başarısızlığına etkisini incelemeyi amaçladık.

2.4.Yöntem

RİF-li hastaların yönetimi için etyolojiyi belirlemek en önemli adımdır. Başarılı IVF sonuçları için halen de tartışmalar vardır. Günümüzde embriyo başına implantasyon oranı sadece %15 civarındadır.

2.4.1 Transfer Yöntemi

Embriyo transferi için kullanılan ve implantasyonu ve gebelik sonucunu etkileyebilecek birkaç farklı yöntem türü vardır. Ultrason eşliğinde transfer, daha yüksek klinik gebelik ve canlı doğum oranlarına yol açtı. Kullanılan ideal kateter tipi (sert ve yumuşak) servikal şekle bağlı olabilir. Ek olarak, bazı durumlarda servikal mukusun aspirasyon yoluyla çıkarılması daha başarılı gebelik sonuçlarına yol açabildiği de gösterilmiştir

2.4.2 İmmunmodulator Desteği

Önceki çalışmalar, bağışıklık sisteminin implantasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarını etkilediğini göstermiştir. Eğer RİF etyolojisinde immunolojik olaylar yer alıyorsa aşağıdaki tedaviler eklenebilir:

Prednisolon- anti-inflamatuar ve immunsupresyon özelliği ile otoimmün hastalıklarda sıklıkla kullanılır. uNK (uterin NK) hücrelerinin sayısının artması çeşitli mekanizmalarla gebelik kaybına neden olabilmektedir. Prednisolon verilmesi gebelik

kaybı oranının %14'ten %9'lara kadar düşürmektedir. Prednisolon Th-1 sitokinlerinin sekresyonu inhibe ederek düzenleyici T hücrelerinin sayısını artırır ve ayrıca NK hücrelerinin sitotoksitesini inhibe eder.

Randomize olmayan bir çalışmada IVF başarısızlığı olan kadınlarda kombine heparin ve prednisolon uygulamaları canlı doğum oranlarında artışa sebep olduğu bildirilmiştir.

Tacrolimus - Takrolimus, doku implantasyonu uygulanan kişiler için reçete edilir. Bildiğimiz gibi, hamilelik aynı zamanda bir tür yarı allogrefttir. Annenin bağışıklık sistemi fetüsü yabancı bir ajan olarak görür ve fetüse karşı cevap verir, eğer bu aktivasyon ve yanıt aşırı ise,

implantasyon başarısızlığına yol açacaktır. Bu ilaç lenfosit proliferasyonunu inhibe eder, IL-2 reseptör ekspresyonu ve sitotoksik T hücrelerinin oluşumuna sebep olur. Nakagawa ve ark., 2015-te bir kohort çalışması yapmış, RIF öyküsü olan 25 kadına embriyo transferinden iki gün önce ile takrolimus vermiş ve on altı gün daha devam etmiş. On yedi RIF-li hasta ise kontrol grubu olarak seçilmiştir. Sonuçlar tacrolimus uygulamasından sonra artmış gebelik ve canlı doğum oranı gösterdi.

IVIG- ile ilgili çalışmalar, IVIG-in B hücrelerinin otoantikor üretiminin inhibisyonu Th1/Th2 sitokin oranını azalttığını, periferik NK hücrelerinin yüzdesini azalttığını ve aynı zamanda T süpresör aktivitesini artırarak canlı doğum oranını artırdığını göstermiştir. Retrospektif bir çalışmada üç veya daha fazla implantasyon başarısızlığı olan 188 RIF hastasında embriyo transferinden yedi gün önce 0.2 g / kg immünoglobulin ile tedavi edildi. Çalışma grubunda sırasıyla implantasyon ve canlı doğum oranları %21.0- ve %42.0 dı. Oysa kontrol grubunda implantasyon oranı ve canlı doğum oranı %9.3 ve %16.1 idi.

TNF antagonistleri-yüksek Th1/Th2 sitokin oranı olan infertil kadınlarda IVIG ve adalimumab kombinasyonunun canlı doğum oranlarını anlamlı derecede arttırdığı bildirilmiştir.

2.4.3 İndüksiyon Protokolü

arklı kontrollü over stimülasyon protokollerinin kullanımı tartışma konusudur. IVF protokolündeki GnRH agonistlerinin antagonistlere karşı implantasyon oranları üzerindeki etkileri hem kendi başlarına hem de oral kontraseptif ön tedavi ile birlikte kullanıldığında değerlendirilmiştir. 2017 yılının başlarında, genel IVF popülasyonunda, antagonistlerle tedavi edilen grubun, agonistlerle tedavi edilenlerden daha düşük

gebelik oranlarına sahip olduğunu gösteren bir meta-analiz yayınlanmıştır. Bununla birlikte, antagonistlerle tedavi edilenler, IVF'nin bir komplikasyonu olan daha düşük OHSS oranlarına sahipti. Barmat ve ark. implantasyon oranlarında anlamlı bir fark bulamadılar ve bulunan tek önemli fark, protokolün daha kısa zamanlaması nedeniyle GnRH antagonistini kullanan grupta hasta oosit alımının kolaylığıydı. RIF hastalarında IVF için spesifik bir stimülasyon protokolünün implantasyon ve doğum sonuçlarında önemli bir fark yaratıp yaratmayacağını belirlemek önemli olabilir. Bununla birlikte, bu, hastanın implantasyon başarısızlığının etiyojisine ve anne yaşı da dahil olmak üzere diğer önemli klinik parametrelere bağlı olarak başarı oranında da farklılık gösterebilir.

Endometriozis ve adenomyozisli kadınlarda, IVF veya ICSI'den birkaç ay önce GnRH agonistlerinin uygulanmasını içeren ultra uzun protokolün kullanılması gebelik oranını artırabilir.

2.4.4 Progesteron Desteği

Progesteron desteğinin IVF protokollerinin önemli bir parçası olduğu iyi bilinmektedir. RPL'de olduğu gibi, progesteron tipi RIF hastalarında doğum oranının artmasında önemli bir rol oynayabilir. Saccone ve ark. tarafından yapılan sistematik bir derleme ve meta analiz, tekrarlayan gebelik kaybından muzdarip kadınlar için erken gebelikte progesteron kullanmanın açık bir yararını göstermişti.

Roepke ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çok yeni bir meta analiz ve sistematik derleme, kanıta dayalı tıbbı göre, literatürün, ovulasyondan başlayan progesteron uygulaması hariç, idiyopatik tekrarlayan gebelik kaybı için herhangi bir spesifik tedavi önermediği sonucuna varmıştır.

2.4.5 Antitrombotik Ajanlar

Heparin, RIF hastalarında kullanım için değerlendirilmiştir, ancak bu hastalarda daha iyi gebelik sonuçları için kullanımını öneren henüz kanıt yoktur. Düşük moleküler ağırlıklı heparin ile tedavi edilen bir grup RIF hastası, kontrollerle karşılaştırıldığında neredeyse aynı implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranı sonuçlarına sahipti.

2.4.6 Aspirin

Bazı merkezler RIF'li kadınlarda aspirinin ampirik kullanımını sunmaktadır. Düşük doz aspirin kullanımı üzerine yapılan son sistematik bir derleme ve meta-analiz,

IVF programlarında kullanımının hiçbir yararı olmadığını göstermiştir (89). 201 çifti içeren daha sonraki prospektif, randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışma, daha önceki meta-analizin sonucuyla aynı fikirdeydi. Aspirinin RIF'li kadınlarda kullanılmaması gerektiğini gösteren iyi kanıtlar vardır. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde riskli hastalarda preeklampsi veya fetal büyüme kısıtlaması gibi plasenta ile ilişkili komplikasyonları önlemek için, her gün 100 mg aspirin kullanılabilir.

Yukarıda belirtilen önerinin bir istisnası, antifosfolipid sendromudur. APS tanısı alan RIF hastaları, gebe kalmadan önce veya pozitif bir gebelik testi ile her gün aspirin (50-150 mg) kullanımından yararlanır ve 34.gebelik haftasına kadar devam etmelidir.

2.4.7 Enfeksiyon için Antibiyotikler

Histeroskopi ve kültür yoluyla kronik endometrit tanısı alan hastalarda, antibiyotik tedavisinin çoğu enfeksiyonu tedavi etmek için etkili bir müdahale olduğu ve gelecekteki IVF döngülerinde daha başarılı implantasyon oranlarına yol açtığı gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, IVF sonrası RIF'li hastalarda kronik endometrit prevalansını %14 oranında bildirmiştir. Kronik endometritli kadınlar tedaviyi takiben IVF döngüsünde endometritsiz kadınlara (%32.7) göre daha düşük implantasyon oranlarına (%11.5) sahiptir. Raporlar, kronik endometrit varlığının endometriyal reseptiviteyi değiştirebileceğini ve gebelik oranları üzerinde olumsuz bir etki yaratabileceğini düşündürmektedir

2.4.8 Anatomik müdahale

Polipler, myomlar, adezyonlar ve septaların hepsi implantasyonu etkileyebilir ve değerlendirme için altın standart histeroskopidir. Daha önce bildirilen saptanmamış anomalilerin prevalansı %20 ila %45 arasındaydı, ancak Fatemi ve ark. çalışma popülasyonlarındaki prevalansı sadece %11 olarak bulmuş ve polipleri en sık görülen patoloji (%41) olarak tanımlamışlardır Cenksoy ve ark., çalışmalarındaki hastaların% 44.9'unun anormal histeroskopik sonuçlara sahip olması nedeniyle dramatik olarak farklı bulgular göstermiştir. Patoloji düzeltildikten sonra, bu kadınların% 51'i hamile kaldı. Demirel ve ark. klinik gebelik oranlarının histeroskopi ile polip ve adezyon tedavisi alanların göreceli olarak histeroskopik değerlendirme yapılmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (%30.4'e karşı %21.6). Anormal histeroskopi bulguları olan hastaların çoğunda normal histerosalpingografi sonuçları vardı. Histeroskopi birçok RIF hastasında yararlı bir tanı aracı olarak hizmet edebilir,

Çünkü yapılan çalışmalar gebelik sonuçlarında büyük değişiklikler olabileceğini düşündürmektedir .

2.4.9 Salpinjektomi

Hidrosalpinkslerin varlığında salpinjektomi ve bazı tubal oklüzyon prosedürlerinin gelecekteki IVF döngülerinde implantasyon başarısı olasılığını arttırdığı gösterilmiştir. Strandell ve ark., salpinjektomi ile tedavi edilen bilateral hidrosalpinksli hastalarda implantasyon oranlarının yanı sıra klinik gebelik oranlarının ve doğum oranlarının, bir sonraki IVF döngüsünde, prosedüre girmeyenlere kıyasla anlamlı olarak arttığını bulmuşlardır. İmplantasyon oranları salpinjektomi yapılanlarda %25.6 iken, işlem yapılmayanlarda %12.3 idi. Klinik Gebelik oranları salpenjektomi yapılanlarda %45.7 iken, olmayanlarda %22.5 idi . Salpinjektomi yapılanlarda canlı doğum oranları %40 iken, kontrol grubunda %17,5 idi.

2.4.10 Preimplantasyon Genetik Screening (PGS)

PGS, spontan abortusu olan hastalarda görülen çok sayıda kromozomal anormalliye yanıt olarak geliştirilmiştir. Başlangıçta, PGS'nin RIF hastalarında gebelik sonuçlarının iyileştirilmesinde yardımcı olabileceği varsayılmış olsa da, Rubio ve ark. tarafından yapılan son çalışmalar, implantasyon hızında (% 36.6'ya karşı, % 21.4), klinik gebelik oranında (% 53.5'e karşı % 33.3) veya canlı doğum oranında (% 47.9'a karşı % 27.9) PGS ile değerlendirilen ve değerlendirilmeyenler arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir . Hatirnaz ve ark. 2017 yılında PGS'nin tekrarlayan IVF başarısızlığı olan hastalarda klinik gebelik ve canlı doğum oranları üzerinde anlamlı bir sonucu olmadığını belirleyen bir çalışma yayınlamıştır(98). Ek olarak, Greco ve ark., implante edilmiş mozaik embriyoların aslında normal genetik yapıya sahip sağlıklı yenidoğanlara dönüşebileceğini bulmuşlardır, ancak bu küçük bir çalışma boyutunda gösterilmiştir. Bu, PGS'nin aslında çiftleri gebeliklerinin olası sonuçları hakkında yanlış bilgilendirebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, Coulam ve ark. tarafından yapılan bir 2016 araştırması, 40 yaşın üzerindeki kadınların, kümülatif dört embriyo transfer edildikten sonra, fetal kardiyak aktivite ile ölçülen gebelik oranlarında önemli bir artışa sahip olduğunu belirlemiştir ($P = 0.03$). PGS, transfer için en kaliteli embriyonun seçilmesine yardımcı olsa da, tutarlı başarısız gebelik oranlarıyla transfer edilen embriyolar ne kadar fazla olursa, embriyonun bu durumlarda sorun olma olasılığı o kadar düşüktür.

2.4.11 Preimplantasyon Genetik Tanı

RIF'li hastaların embriyolarında daha fazla kromozom anormalliği olduğunu gösteren veriler vardır. Sonuç olarak, preimplantasyon genetik tanı (PGT), spesifik risk faktörleri olan IVF hastaları arasında spesifik kromozomal hastalıkları değerlendirmek için kullanılabilir. Pehlivan ve ark. tarafından yapılan daha önceki bir çalışmada, kromozomal anomalilerin, özellikle de tekrarlanan implantasyon başarısızlığı olanlar arasında anöploidilerin anlamlı derecede daha yüksek bir oranı olduğu bulunmuştur. Ek olarak, bu hastalar FISH kullanılarak embriyoların genetik taramasını yaptıklarında ve normal embriyoları transfer için seçildiğinde, implantasyon oranı% 24.6, genç fertil kontrollerle karşılaştırıldığında,% 24.1 idi. Bunun büyük ölçüde yaşa bağlı olduğunu ve bu sonuçların sadece 37 yaşın < uygulandığını belirtmek önemlidir. 37 yaşın > kadınlarda implantasyon oranları sadece% 12.2 idi. 37 > kadınlar ayrıca kromozom 21 ve 22'de en yüksek kromozomal anormallik oranlarına sahipti ve 37 yaşından < olanlar kromozom 13'te daha yüksek anormallik oranlarına sahipti . Bu, ileri anne yaşına sahip olanlarda başarılı implantasyonu engelleyen ek mekanizmalar olabileceğini düşündürmektedir. RIF'li kadınların dengeli translokasyonlara sahip olup olmadıklarını belirlemek için karyotiplendirilmeleri önerilir. PGT sadece bu dengeli translokasyonlara sahip hastalarda önerilmektedir, çünkü bunlar gametlerinde anöploidiye yol açabilir.

2.4.12 Erkek faktörü

RIF'de rol oynayan maternal faktörlerin yanı sıra erkek faktörü, özellikle spermatozoal morfoloji de rol oynayabilir. DNA fragmentasyonları ve morfolojide bozulmalar sperm DNA'sındaki bozuklukların işaret etmektedir. COMET veya TUNEL gibi DNA fragmentasyon testleri mevcuttur. Bu testlerde bozukluk çıkan hastalarda IMSI dediğimiz intrasitoplazmik morfolojik olarak seçilmiş sperm injeksiyonu uygulanabilir. Morfolojik anormallikleri olan spermilerin genel olarak semen spermeleri olduğu testis içerisindeki spermelerde bu anormalliklerin daha az izlendiği belirtilmekte ve bu tip hastalara TESE de önerilebilmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tüp Bebek Merkezine başvurmuş, özellikle metabolik bir sendromu, trombolotik hastalığı, koroner arter hastalığı, tiroid, karaciğer ve böbrek hastalığı ve benzeri herhangi bir kronik hastalığı olmayan, her hangi malignitesi olmayan 24-46 yaş grubundan en az 2 kez taze ve ya donmuş 3. ve ya 5. gün embriyo transferinin başarısız olduğu 105 kadın çalışma grubunu oluşturdu. Kontrol grubunu ise sağlıklı spontan gebeliği olan 22-40 yaş arası 110 kadınlardan oluşturuldu. Kontrol grubu bilgilendirilmiş ve araştırmaya dahil edilebilmeleri için gerekli yasal izinleri alınmıştır.. Kontrol grubuna ve hasta grubuna ait kadınların her birinden alınan 5-10'ar cc'lik periferik kan örnekleri etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere konulmuş ve uygun zamanda DNA ekstraksiyonu yapılmak üzere -20 C0'de saklanmıştır. Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kadınların her birinden 5-10'ar cc'lik periferik kan alınmıştır.

3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler:

Bu araştırmada kullanılan malzeme ve sarf malzemeleri ile ekipmanlar aşağıdaki gibidir;

Tablo 3.1. PCR için gerekli malzemeler:

1	2X Taq DNA Polimeraz Master Mix
2	Primer
3	Genomik DNA
4	H2O

Tablo 3.2. Agaroz jeli hazırlamak ve ürünü yüklemek için malzemeler:

1	Kalıp DNA
2	Distile Su
3	Gel Red
4	Agaroz
5	50 bp DNA Ladder
6	TBE 0.5 X
7	DNA loading

Tablo 3.3. Enzimatik sindirim için malzemeler:

1	BclI, AluI, MspI, SacI Restriksiyon enzimleri
2	Buffer
3	Distile Su
4	PCR ürünü

3.2 DNA Ekstraksiyonu:

Bu çalışmada kit ekstraksiyon yöntemi ile DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir:

- 1: İlk olarak, 200 µl tampon liziz mikrotüp içinde 200 µl kan örneği ile karıştırıldı.
- 2: Daha sonra karışıma 20 µl protein kinaz eklendi.
- 3: Mikrotüp kapağını kapatın ve vorteksleyin ve ardından birkaç saniye santrifüjleyin.
- 4: Mikrotüpler daha sonra 10 dakika boyunca 60 °C'de bir su banyosunda yerleştirildi.
- 5: Daha sonra mikrotüp su banyosundan çıkarıldı, üzerine 200 µl %98 etanol eklendi ve birkaç kez pipetleme yapıldı.
- 6: Kitin içindeki filtrelenenmiş kolonları çıkarın ve karışımın tamamını mikrotüpün içine ekleyin ve 1 dakika 1000 g'de santrifüjleyin.
- 7: Filtre kolondan çıkarıldı ve yeni bir mikrotüp içine yerleştirildi.
- 8: Daha sonra üzerine 500 µl yıkama 1 solüsyonu eklendi ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 9: Filtrenin altındaki mikrotüpü atıldı, yeni bir mikrotüp alınıp ve filtreyi yerleştirildi, 500 µl yıkama 2 solüsyonu eklenip ve tekrar 8000 g'de 1 dakika 15 saniye santrifüjlendi.
- 10: Daha sonra mikrotüpün içeriğini atın ve kolonu tekrar aynı mikrotüp içine yerleştirin ve 3 dakika 14,000 g'de santrifüjleyin.
- 11: Tampon solüsyonu çözünmesi için birkaç saniye su banyosuna koyuldu , filtreye 120 mikrolitre eklenip ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 12: Santrifüj, 8000 g'de 1 dakika boyunca tekrar gerçekleştirildi.
- 13: Sonunda filtreyi çıkardık. Mikrotübülün altındaki sıvı DNA içerir.

3.3 Ekstrakte edilen DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif İncelemesi

Moleküler reaksiyonlar sırasında çözeltide ne kadar DNA olduğunu bilmek önemlidir. Bu nedenle DNA ayırma ve ekstraksiyonundan sonra nitelik ve niceliği sağlamak için kalitatif ve kantitatif DNA analizi yapıldı.

DNA konsantrasyonu, ultraviyole absorpsiyon spektroskopisi ile nicel olarak ölçülebilir. Bir çözelti tarafından absorbe edilen UV miktarı, numunedeki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorpsiyon tipik olarak, bir birim absorpsiyonun mililitrede 50 mikrogram çift sarmallı DNA'ya eşdeğer olduğu dalga boyu olan 260 nm'de ölçülür. Elbette, DNA'nın saflığını kontrol etmek için UV absorpsiyonu da kullanılır. Saf bir DNA örneğinde, 260 nm ila 280 nm'deki absorbans oranı 1/8'dir. 1/8'den küçük oranlar, numunenin protein kontaminasyonunu gösterir.

260 nm'nin DNA'nın maksimum absorpsiyona sahip olduğu dalga boyu ve 280 nm'nin proteinin maksimum absorpsiyona sahip olduğu dalga boyu olduğunu belirtmekte fayda var. Jel elektroforezi ayrıca DNA kalitesini değerlendirmek için kullanılır.

3.4 Elde edilen DNA'nın kantitatif incelemesi

- 1: Spektrofotometre dsDNA'ya ayarlandı.
- 2: Cihazın küvetine iki kez 100 mikrolitre distile su dökün ve cihazı balonun üzerine yerleştirdikten sonra cihaz numunelerin DNA'sını okumaya hazır hale geldi.
- 3: Ardından küveti boşaltın ve içine 100 mikrolitre seyreltilmiş DNA dökün ve DNA içeren solüsyonun 260 nm'de absorbansını okuyun.
DNA'yı seyreltmek için, 5 mikrolitre saflaştırılmış DNA, 95 mikrolitre çift damıtılmış su ile karıştırılmalıdır.
- 4: OD260 / OD280 oranı her numune için hesaplanmıştır.

Ekstrakte edilen numunelerdeki ortalama DNA miktarı, mililitrede 190 mikrogram DNA idi.

3.5 Agaroz jel elektroforezi ile DNA'nın Kalitatif Analizi

Jel elektroforezi, bir karışımdaki molekülleri aralarındaki elektriksel yük farkından ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. DNA molekülleri negatif yüklüdür ve bir elektrik alanına maruz kaldığında pozitif kutba doğru hareket eder.

Bir molekülün hareket hızı iki faktöre bağlıdır: şekil ve yükün kütleye oranı. Ne yazık ki Çoğu DNA molekülü benzer bir şekle sahiptir ve hepsinde yükün kütleye oranı aynıdır. Bu nedenle, farklı boyutlardaki parçalar geleneksel elektroforez ile ayrılamaz.

Bir jel üzerinde elektroforez yapıldığında, DNA molekülünün boyutu ayırmada bir faktör olacaktır.

Elektroforez jeli, agaroz, poliakrilamid veya her ikisinin karışımından oluşur ve DNA molekülünün pozitif kutba doğru hareket etmesi gereken bir gözenek ağı oluşturur.

Daha küçük DNA molekülleri jel içinde daha hızlı hareket eder. Böylece jel elektroforezi DNA moleküllerini boyutlarına göre ayırır. Pratikte jel bileşimi, ayrılabilir DNA moleküllerinin boyutunu belirler. Nispeten geniş gözeneklere sahip 0,5 cm kalınlığındaki %0,5 agaroz, 1 ila 30 k çift baz boyut aralığındaki molekülleri ayırmak için kullanılır ve örneğin 10 ve 12 k çift baz boyutundaki moleküller açıkça kullanılabilir. Öte yandan, 0,3 mm kalınlığında çok ince %40 poliakrilamid jel çok küçük gözeneklere sahiptir ve 1 ile 300 bp aralığında daha küçük DNA moleküllerini ayırmak için kullanılır ve moleküller bir nükleotid ile bile ayrılabilir.

Aşağıdaki tablo, farklı agaroz konsantrasyonları ile DNA moleküllerinin ayrılma gücünü göstermektedir.

Tablo 3.4. Farklı agaroz konsantrasyonları ile DNA moleküllerinin ayırma gücü

agar yüzdesi	DNA Ayırma Gücü
0.4	30-50 kbç
0.6	10-30 kbç
0.8	1000-7000 bç
1	500-5000 bç
1.5	300-3000 bç
2	200-1500 bç
3	100-1000 bç

Jel elektroforezinin sonuçlarını görmenin en kolay yolu, jeli DNA'yı ortaya çıkaran bir bileşik ile boyamaktır. Jeli yapmak için aşağıdaki malzemelere ihtiyacımız var:

Agaroz tozu, TBE ürünü, 6x ağırlık tamponu, jel tepsisi, tarak, elektroforez tankı ve güç kaynağı cihazı.

TBE tamponu genellikle beş veya 10X bir konsantrasyonda hazırlanır ve oda sıcaklığında saklanır ve distile suda bir ila yirmi oranında seyreltilir. Bu tamponu hazırlamak için aşağıdaki bileşenler birlikte karıştırılır:

54 gram Tris + 27.5 gram borik asit + 200 ml yarım molar EDTA

DNA ağırlaştırıcı tampon, TBE tamponunda lineer çift sarmallı DNA ile aynı hıza sahip olan bermofenol mavisi ve xainol siyanol ile numunenin kuyuda olmasını sağlamak için numunenin yoğunluğunu artıran Ficol 400 içerir.

Genomik DNA'yı incelemek için %2 agaroz jel kullanıldı. Jel tepsisinin hacmine göre 3 gram agaroz tozu 300 cc 0.5 X TBE solüsyonu ile karıştırılarak eritilmesi için ısı kullanıldı, böylece ısı tozun tamamen çözülmesine ve solüsyonun berraklaşmasına neden oldu, ancak yanmadı. Başka bir şey yapmadan önce tüm agar partiküllerinin tamamen çözüldüğünden emin olun, aksi takdirde jel eşit şekilde soğumaz ve jeli dökerken problem olur.

Daha sonra yavaş yavaş soğuması için Erlenmeyer jel solüsyonunu oda sıcaklığında bırakıldı.

Sıcaklık yaklaşık 50 dereceye ulaştığında, yavaşça elektroforez tepsisine döküp ve yaklaşık yarım saat sonra jel tamamen kuruduktan ve hazır olduktan sonra tarağı yavaşça çekdik ve jeli elektroforez tankına yerleştirdik. Tankın içi önceden 0,5 X TBE tamponu bulunmakta idi.

Daha sonra 3 µl DNA örneği 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara aktarıldı. Normalde, kuyu hacminin bir kısmı, tipik olarak kuyu hacminin beşte biri olan tampona tahsis edilmelidir ve bu nedenle numune boyutu kuyu hacminin beşte dördü olacaktır. Cihaz voltajı santimetre başına 5 volt olarak ayarlandı. Boyalar jelin yaklaşık 3.4 katı uzunluğunda olduktan sonra akış kesildi. Son aşamada UV cihazı kullanılarak jel üzerinde DNA gözlemlendi ve kaliteleri incelendi. Gerekli bant çözünürlüğüne sahip olmayan örnekler çıkarıldı ve DNA'ları kandan yeniden çıkarıldı.

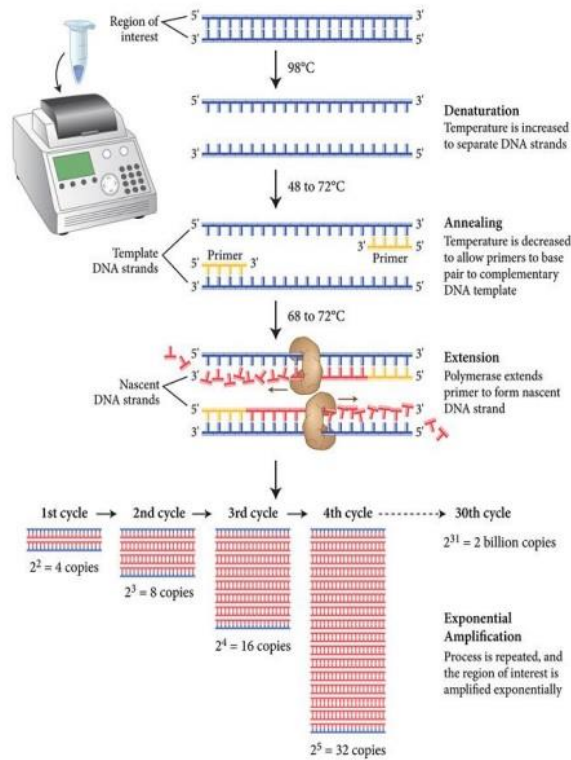
PCR veya polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide en yaygın kullanılan tekniklerden biridir ve bir DNA bölgesinin binlerce ve milyonlarca kez amplifiye edilmesini sağlar. PCR'nin temeli, birkaç sıcaklık döngüsünde tamamlanan DNA polimeraz tarafından bir DNA zincirinin enzimatik sentezidir. Bu yöntemi yöneten kurallar, bir termocycler'da mikrotübüllerdeki canlı hücre yerine PCR yönteminin gerçekleştirilmesi dışında, canlı bir hücredeki replikasyon sürecindeki kurallarla aynıdır. Bu, reaksiyon döngüleri sırasında reaksiyonu gerçekleştirmek için gereken çeşitli sıcaklık değişikliklerine izin veren bir makinedir.

PCR adımları:

- 1: DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması
- 2: Primerleri hedef DNA'daki tamamlayıcı zincire takın
- 3: DNA enzimi Taq polimeraz kullanılarak hedef DNA'da istenen parçanın amplifikasyonu.

DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması ısı ile yapılır. Bu amaçla termocycler numuneyi 95 santigrat dereceye kadar ısıtır, böylece DNA'yı oluşturan iki zincir birbirinden ayrılır. DNA polimeraz enzimi hedef bölgeyi tespit edemediğinden primerler kullanılır.

Primer, dizisi hedef alandaki dizinin bir bölümünü tamamlayan kısa bir DNA parçasıdır. Primerleri iki ayrı ipliğin DNA'sına bağlamak için sıcaklığı 95 dereceden 60-50 dereceye düşürün. Bu sıcaklık, primerleri DNA'ya bağlar. Primerleri DNA zincirine bağladıktan sonra, Taq polimeraz enzimi kullanılarak DNA sentezi gerçekleştirilir. Sıcaklık tekrar DNA polimeraz aktivitesi için doğru sıcaklık olan 72 °C'ye yükselir. Bu üç aşamalı döngü daha sonra 30 ila 35 kez tekrarlanır ve istenen parça katlanarak yayılır.



Şekil 3.1. PCR reaksiyon adımlarına genel bakış

3.6 PCR

3.6.1 PCR Reaksiyonunun Bileşenleri:

Taq enzim tamponu, dNTP, MgCL₂, primerler, şablon DNA ve Taqpolimeraz, polimeraz zincir reaksiyonunun ana bileşenleridir. Bu solüsyonların -20 °C'de saklanması gerekir. Tamponlar genellikle enzim ile 10 kat konsantrasyonlarda mevcuttur. Tampon genellikle daha iyi enzim performansı için pH'ı ayarlayan tris içerir ve tamponun diğer bileşenleri, şablon DNA'nın primere bağlanmasını kolaylaştıran KCl veya amonyum sülfat içerir.

Primerler hedef dizi için özel olarak tasarlanmıştır ve dizinin her iki tarafına da bağlanarak DNA polimerazın polimeraz aktivitesini başlatmasına izin verir. DNA polimeraz enzimi, kaplıcalarda yaşayan ve ısıya dayanıklı *Thermos aquaticus* bakterisine aittir.

Deoksi nükleotid trifosfat (dNTP) dört baz içerir: adenin, guanin, sitozin ve timin ve DNA polimeraz enzimi için bir substrat görevi görür.

Bu çözeltileri her kullandığınızda, çözelti hasat edilmeden önce her bir şişenin tamamen eritilmesi gerektiğine dikkat etmek önemlidir.

Kısmi erime, çözeltideki konsantrasyonun tekdüzeliğini ve böyle bir çözeltinin kullanımını bozar.

Reaktiflerin konsantrasyonundaki hata nedeniyle PCR reaksiyonu gerçekleştirmek istenmeyen sonuçlara neden olabilir.

Tüm malzemeler ve bileşen ekleme adımları buz üzerinde yapılır.

Malzeme, birlikte karıştırılmak üzere birkaç saniye mikrosantrifüj ile santrifüjlenir.

Her reaksiyon serisinde, herhangi bir kontaminasyon ve spesifiklik eksikliği olup olmadığını kontrol etmek için test edilen numunelere paralel olarak biri model DNA'sız ve diğeri primersiz olmak üzere en az iki negatif kontrol reaksiyonunun gerçekleştirilmesi gerekir. Ardından tüpleri termocyclera yerleştirdik ve reaksiyon için optimize edilmiş adımlara göre cihaza girdik. Bu çalışmada PCR reaksiyonu için Biolab firmasının hazır karışımı kullanılmıştır.

3.6.2 PCR Programını Optimizasyonu

Hedef genler için reaksiyonu optimize etmek için, bileşenlerin her birini diğer koşullarla uyumlu olması beklenen ölçüde toplam 25 mikrolitre hacimde birleştirdik ve aparata yerleştirdik. İstenilen alanda net bir bant görmek için çözelti konsantrasyonu, döngü sayısı ve sıcaklık gibi çeşitli koşulları değiştirdik. Primer, Leandros ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada modellenmiştir.

MiR-146aC> G polimorfizminin PCR'si, 147-bp'lik bir ürün oluşturmak için aşağıdaki primerler kullanılarak yapıldı: forward 5'-CAT GGG TTG TGT CAG TGT CAG AGC T-3' ve reverse 5'-TGC CTT CTG TCT CCA GTC TTC CAA-3'.

MiR-149T> C polimorfizmi için, 263-bp ürünü üretmek için aşağıdaki primerler kullanıldı: forward 5'-CTG GCT CCG TGT CTT CAC TC-3' ve reverse 5'-TGA GGC CCG AAA CAC CCG TA-3'.

MiR-196a2T> C polimorfizmi için, 149-bp'lik bir ürün üretmek için aşağıdaki primerler kullanıldı: forward 5'-CCC CTT CCC TTC TCC TCC AGA TA-3' ve reverse 5'-CGA AAA CCG ACT GAT GTA ACT CCG-3'.

miR-499A>G polimorfizmi için, 146-bp'lik bir ürün üretmek için aşağıdaki primerler kullanıldı: forward 5'-CAA AGT CTT CAC TTC CCT GCC A-3' ve reverse 5'-GAT GTT TAA CTC CTC TCC ACG TGA TC'.

Tablo 3.5. PCR reaksiyonunda çözeltilerin konsantrasyonu ve hacmi

Sıra	Solüsyon	25 mikrolitrede kullanılan hacim
1	2 X Taq DNA Polymerase Master Mix	8
2	F primer	0,5
3	R primer	0,5
4	DNA	2
5	H2O	14
Toplam hacim		25

Tablo 3.6. Tek nükleotid polimorfizmlerinin amplifikasyonu için PCR'nin ısı profili

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı	PCR aşaması
95	5 dk	1	Birincil denatürasyon
95	30 s	35	İkincil denatürasyon
64	30 s		Primer bağlantı
72	30 s		Uzatmaya
72	5 dk	1	Uzatmaya

PCR reaksiyonunun ardından mikrotüpler cihazdan çıkarıldı ve ardından 3 µl PCR ürünü %3 agaroz jel üzerinde örneklendi ve ürünü değerlendirmek için 100 voltta bir saat bekletildi. Elektroforez sonuçları, herhangi bir spesifik bant olmaksızın 146 ve 224 ve 149 ve 147 çiftlerinde tek banttı. PCR sonrası numuneler ve ürünlerin elektroforez ile incelenmesi ve PCR ürününün istenilen kısmının spesifik amplifikasyonunun sağlanması sonraki aşamalar için -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Bandı olmayan veya bandı zayıf olan örnekler için tekrar PCR yapıldı.

3.7 Tek Nükleotid Polimorfizminin Araştırılması İçin Yöntem

Tek bir nükleotid polimorfizmi, bazı insanlarda görülen nokta mutasyonlarını içeren DNA dizisindeki bir polimorfizmdir. Hemen hemen tüm yaygın polimorfizmlerin iki aleli vardır. Mutasyon tarafından oluşturulan alel %1'lik bir sıklığa sahipse site polimorfik olarak kabul edilir, aksi takdirde bu alel nadir bir varyanttır. Genomun kodlayan ve kodlamayan bölgesinde polimorfizmler meydana gelebilir ve bunların önemi insanlarda hastalığa yol açtığında belirlenir. Polimorfizmleri analiz etmek ve tanımlamak için çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemlerden biri de RFLP-PCR'dir.

3.7.1 PCR-RFLP

Bu teknikte, bir kısıtlama enzimi ile bağlantılı bir bilişsel lokusa neden oluyorsa veya onu ortadan kaldırıyorsa, mutasyon, PCR ürününün uygun enzim ile sindirilmesi ve ürünün elektroforez ile izole edilmesiyle saptanabilir. Kısıtlama enzimleri, bakteriler tarafından üretilen endonükleazlardır. Bu enzimler, 4 ila 8 baz çiftinin spesifik dizilerini tespit eder ve daha sonra bu konumda her iki DNA zincirini keser. Çoğu kısıtlama endonükleazı, pH 7.4'te iyi işlev görür, ancak farklı enzimler, genellikle sodyum klorür ve MgCl₂ tarafından sağlanan farklı iyon kuvvetleri ve

magnezyum konsantrasyonları gerektirir. Ayrıca enzimi stabilize etmek ve inaktivasyonunu önlemek için ditiotritol veya DTT gibi bir indirgeyici ajan kullanılması tavsiye edilir. İstenen enzimin düzgün çalışması için uygun tampon bileşimi sağlandıktan sonra sıra sınırlayıcı endonükleazın eklenmesine gelir. Bir enzim biriminin tanımına göre, 1 mikrogram DNA'yı bir saatte kesmek için gereken enzim miktarı. Çoğu kısıtlama endonükleazı en iyi 37 °C'de çalışır. Yeterli bir süre sonra enzim, sonraki aşamalarda kazara DNA parçalarını kesmeyecek şekilde yok edilmelidir. Enzimleri durdurmanın birkaç yolu vardır. Bazı enzimler için 70 ° C'ye kısa ısıtma yeterlidir ve geri kalanı için fenol ile ekstraksiyon veya etilen-diamin tetraasetamik asit veya EDTA ilavesi endonükleaz inhibitörünün çalışmaya devam etmesini önlemek için kullanılır. Enzimatik sindirimin sonucu, boyutu, belirtildiği gibi jel elektroforezi ile ayrılan birincil DNA üzerindeki kısıtlama endonükleaz tanımlama dizilerinin tam konumuna bağlı olan bir dizi DNA fragmanıdır.

3.7.2 Restriksiyon Enzimleri Tarafından Enzimatik Sindirim

Tüm hasta ve kontrollere PCR reaksiyonu uygulandıktan sonra, restriksiyon enzimleri DraIII ve AclI kullanılarak RFLP-PCR tekniği ile son değerlendirme yapıldı. Enzimatik sindirim koşulları optimize edildikten sonra, tüm numuneler BclI ve AluI ve MspI ve SacI enzimlerinin etkisi altında kesildi ve daha sonra %3 agaroz jele aktarıldı.

Tablo 3.7. Enzim tarafından enzimatik sindirim için en uygun koşullar

Bileşenler	Hacim (mm)	Koşullar
10x NEBbuffer	2 µl	37 0C 4 saat
Restriction Enzyme	0,5 µl	
PCR Product	10 µl	
H2O	17,5 µl	
Toplam hacim	30 µl	

3.7.3 Yöntem

Belirtildiği gibi, RFLP-PCR tekniği, tek bir nükleotid polimorfizminin yabanıl alellerini ve varyantlarını ayırt etmek için bir kısıtlama enzimi kullanılır.

A>G tek nükleotid polimorfizmi durumunda, nükleotid A, G ile değiştirildi ve bu polimorfizmi içeren amplifiye ürünün uzunluğu 146 bp idi.

C>T tek nükleotid polimorfizmi durumunda, nükleotid C, T ile değiştirildi ve bu polimorfizmi içeren amplifiye ürünün uzunluğu 224 bp idi.

T>C tek nükleotid polimorfizmi durumunda, nükleotid T, C ile değiştirildi ve bu polimorfizmi içeren amplifiye ürünün uzunluğu 149 bp idi.

G>C tek nükleotid polimorfizmi durumunda, nükleotid G, C ile değiştirildi ve bu polimorfizmi içeren amplifiye ürünün uzunluğu 147 bp idi.

Bu çalışmada, RFLP-PCR tekniği uygulanarak ve reaksiyon ürünlerinin BclI enzimi ve jel elektroforezi kullanılarak enzim kesme pozisyonuna göre jel elektroforezi üzerinde üç farklı patern gözlemlenmesi beklentisi şu şekilde olmuştur:

- 1) AA Homozigot bireyler: 120 ve 26 çift alanında iki bant
- 2) Heterozigot AG'ler: 146, 120 ve 26 çiftlerinde üç bant
- 3) Homozigot insanlar GG: 146 çift oyun alanında bir bant

AluI enzimi ile :

- 1:TT Homozigot bireyler: 224 ve 66 çift alanında iki bant
- 2: Heterozigot CT'ler: 224, 153, 71 ve 66 çiftlerinde dört bant
- 3: Homozigot insanlar CC: 153, 71 ve 66 çift bantlar

MspI enzimi ile :

- 1:TT Homozigot bireyler: 149 çift alanında bir bant
- 2: Heterozigot CT'ler: 149, 125 ve 24 çiftlerinde üç bant
- 3: Homozigot insanlar CC: 125 ve 24 çift bantlar

SacI enzimi ile :

- 1:GG Homozigot bireyler: 147 çift alanında bir bant
- 2: Heterozigot AG'ler: 147, 122 ve 25 çiftlerinde üç bant
- 3: Homozigot insanlar AA: 122 ve 25 çift bantlar

Bu nedenle enzimatik reaksiyon sonrası jel üzerinde oluşan bantların sayısı ve uzunluğundan teknonükleotid polimorfizminin genotipi anlaşılabilir. Önce reaksiyonun bileşenlerini birleştirdik. Reaksiyonun son hacmi 25 mikrolitredir. Daha sonra mikrotüpleri 4 saat 37 derecelik inkübatöre yerleştirdik. Son olarak, 15 mikrolitre reaksiyon çözeltisi, ürünü test etmek için %3 agaroz jel üzerinde örneklendi ve bir saat boyunca 100 volta yerleştirildi ve ardından jel, test sonuçlarını gözlemek için bir UV cihazına yerleştirildi.

3.8 Verilerin istatistiksel analizi

Veri analizi için, SPSS yazılımı kullanılarak "Ki-kare" veya "Fisher" istatistiksel testleri, allel frekansı, genotipik frekans, bu polimorfizmin genotipleri ve çalışılan değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanıldı. Vaka ve kontrol grupları arasındaki genotipik ve alelik frekanslardaki farklılıklar, %95 güven düzeyi ile istatistiksel anlamlılık açısından analiz edildi.

4. BULGULAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tüp Bebek Merkezine başvurmuş, özellikle metabolik bir sendromu, trombolitik hastalığı, koroner arter hastalığı, tiroid, karaciğer ve böbrek hastalığı ve benzeri herhangi bir kronik hastalığı olmayan, herhangi bir malignitesi olmayan 24-46 yaş grubundan en az 2 kez taze ve ya donmuş 3. ve ya 5. gün embriyo transferinin başarısız olduğu 105 kadın çalışma grubunu oluşturdu. Kontrol grubunu ise sağlıklı spontan gebeliği olan 22-40 yaş arası 110 kadından oluşturuldu. Kontrol grubu bilgilendirilmiş ve araştırmaya dahil edilebilmeleri için gerekli yasal izinleri alınmıştır. Kontrol grubuna ve hasta grubuna ait kadınların her birinden alınan 5- 10'ar cc'lik periferik kan örnekleri etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere konulmuş ve uygun zamanda DNA ekstraksiyonu yapılmak üzere -20 C°'de saklanmıştır. Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kadınların her birinden 5-10'ar cc'lik periferik kan alınmıştır. Her iki grubun ayrıca yaş, BMI ve FSH değerlerine bakıldı.

Tablo 4.1. Demografik veriler

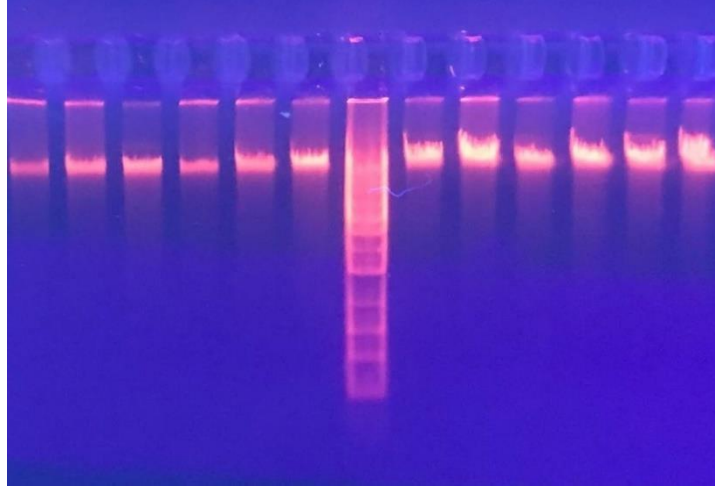
Parametre	Kontrol (n=110)	RİF(n=105)	p
Yaş	31,5±5,54	34,19±2,81	0,295
BMI	22,7±5,62	24,23±6,32	0,321
FSH (U/L, mean ± SD)	8,45±2,71	7,88±4,12	0,078

Yapılan istatistik analize göre RİF grubunda yaş 34,19±2,81, kontrol grubunda 31,5±5,54 ile anlamlı bir fark izlenmedi (p=0.295); RİF grubunda BMI 24,23±6,32 ,kontrol grubunda 22,7±5,62 ile anlamlı bir fark izlenmedi (p=0.321); FSH değeri RİF grubunda 7,88±4,12, kontrol grubunda 8,45±2,71 anlamlı fark yoktu (p=0.078).

4.1 Örneklerin Genomik DNA Ekstraksiyonunun Sonuçları:

DNA'nın doğru saflaştırılmasını sağlamak için ekstrakte edilen DNA'lar %3 agaroz jel elektroforezi kullanılarak incelendi ve oluşan bantlar, bant çözünürlüğü açısından bir jel dock cihazı ile fotoğraflanarak gözlemlendi.

Bazı örneklerin DNA elektroforezi sonuçları aşağıdaki şekilde verilmiştir.



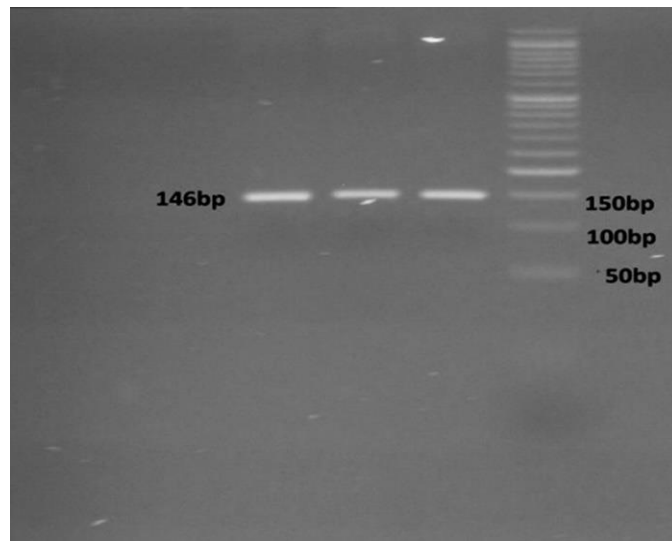
Şekil 4.1. Bazı örneklerin DNA ekstraksiyon sonuçları (Ters değil mi bu)

Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi, çıkarılan DNA iyi kalitede olup, herhangi bir kırık veya lekesi yoktur.

4.2 miR-146aC>G, miR-149C>T, miR-196a2T>C, VE miR-499A>G Gen Polimorfizmleri PCR sonuçları:

Numunelerin PCR ürünleri, istenen fragmanın %3 agaroz jel elektroforezi ile spesifik amplifikasyonunu kontrol etmek için bir saat boyunca 100 voltaj altına konuldu. Elektroforez sonuçları, spesifik olmayan herhangi bir bant olmaksızın 147, 263, 149 ve 146 bp bölgelerinde tek bir bant olarak bulundu.

Çoğaltılan kısım Geldak makinesi ile fotoğraflanmıştır. Bir dizi numunenin PCR ürünü elektroforezinin sonuçları aşağıdaki şekilde gösterilmektedir.



Şekil 4.2. %3 agaroz jel üzerinde PCR ürünü elektroforezinin sonucunun bir örneği.

Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi miR-499 gen lokusunun PCR ürünleri 146 bp uzunluğunda tek bant şeklinde olup kaliteli ve spesifik olmayan bantlar içermez.

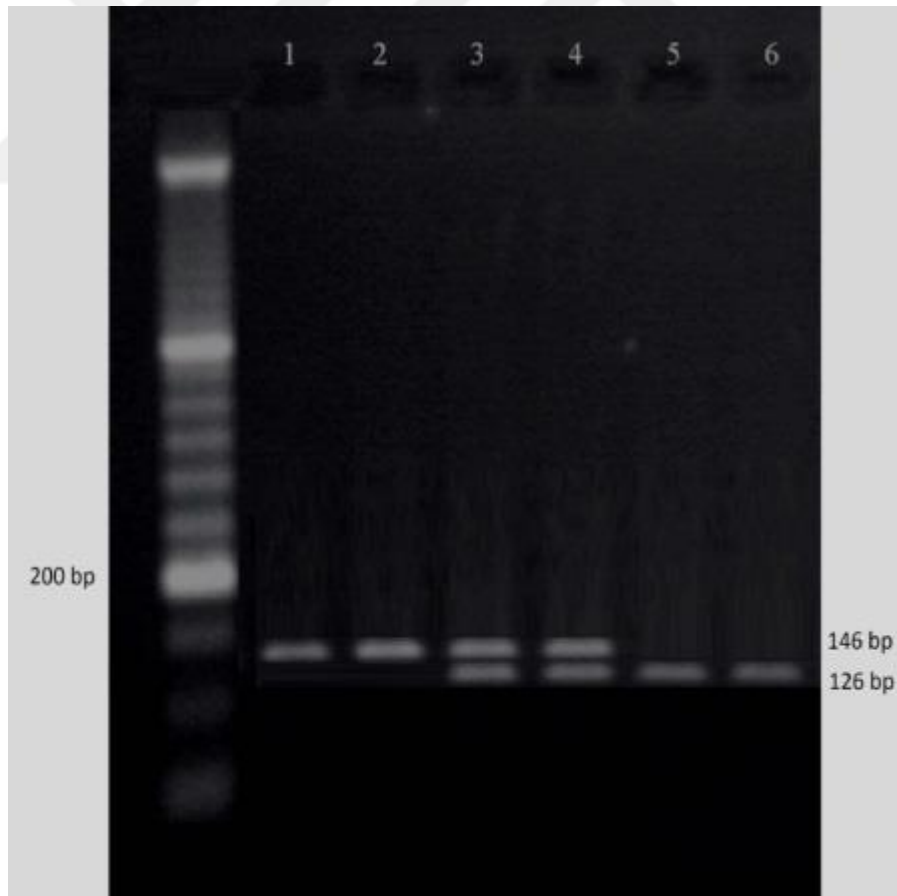
Elektroforez ile istenen parçanın spesifik amplifikasyonunun doğrulanmasından sonra, PCR ürünü sonraki adımlar için -20 santigrat derecede saklandı.

Bandı olmayan veya bandı zayıf olan örnekler tekrar PCR edildi.

4.3 MİR499 A>G PLİMORFİZMİNİ TANIMLAMAK İÇİN BCLİ ENZİMATİK SİNDİRİMİN SONUÇLARI:

RFLP, PCR ürünleri üzerinde BCLİ enzimi ile 37°C sıcaklıkta maksimum 4 saat süreyle 25 mikrolitre hacimde ve bir önceki bölümde belirtilen aşamalarda gerçekleştirilmiştir.

Mir499 A>G Polimorfizm'in PCR ürününün enzimatik sindiriminden elde edilen parçalar aşağıdaki şekilde görülebilir.



Şekil 4.3. BclI enzimi tarafından sindirildikten sonra PCR ürününün elektroforez sonucuna bir örnek

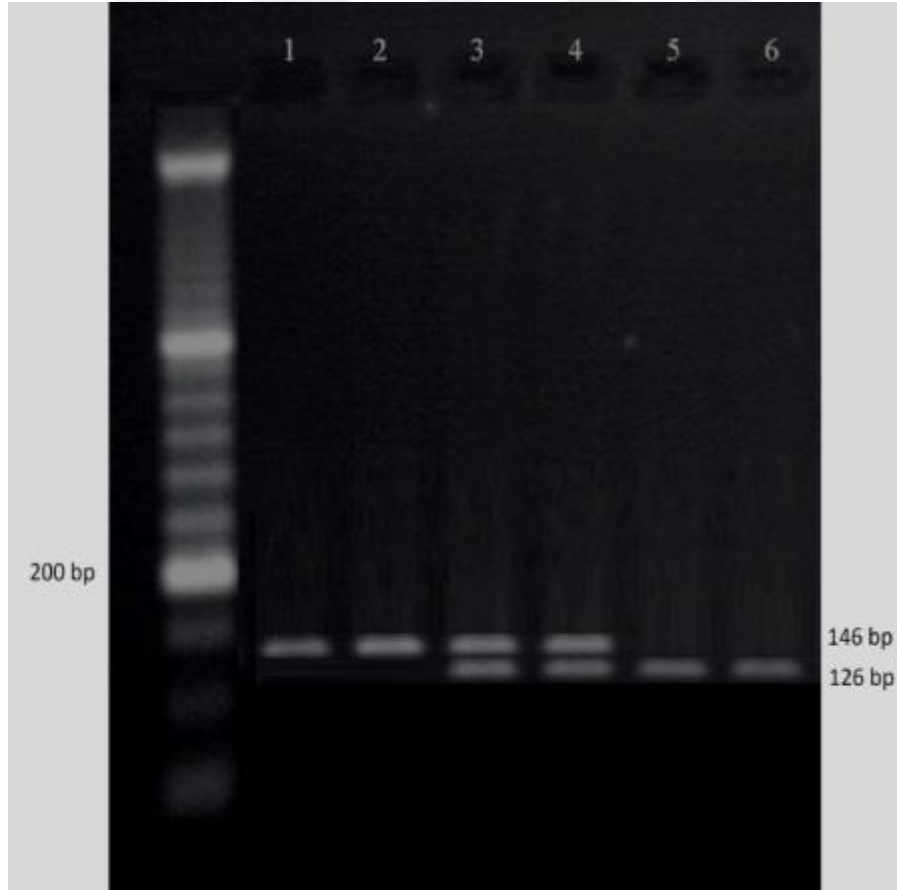
İstenen tek nükleotid polimorfizmini içeren amplifiye fragmanda G alleli için kesim bölgesi BCL1 enzimi tarafından tespit edilmedi ve bu alel SNP bölgesinde mevcutsa 146 bp fragman kesilmemiş şeklinde kalır.

Eğer A aleli mevcutsa, enzimin kesme bölgesi olduğu için 26 ve 120 baz çiftli iki fragman oluşacak ve bireyin genotipi heterozigot ise 146, 120 ve 26 baz çiftli üç fragman görülecektir.

4.4 MİR-196A2T>C PLİMORFİZMİNİ TANIMLAMAK İÇİN MSPI ENZİMATİK SİNDİRİMİN SONUÇLARI:

RFLP, PCR ürünleri üzerinde MspI enzimi ile 37°C sıcaklıkta maksimum 4 saat süreyle 25 mikrolitre hacimde ve bir önceki bölümde belirtilen aşamalarda gerçekleştirilmiştir.

miR-196a2T>C Polimorfizm'in PCR ürününün enzimatik sindiriminden elde edilen parçalar aşağıdaki şekilde görülebilir.



Şekil 4.4. MspI enzimi tarafından sindirildikten sonra PCR ürününün elektroforez sonucuna bir örnek

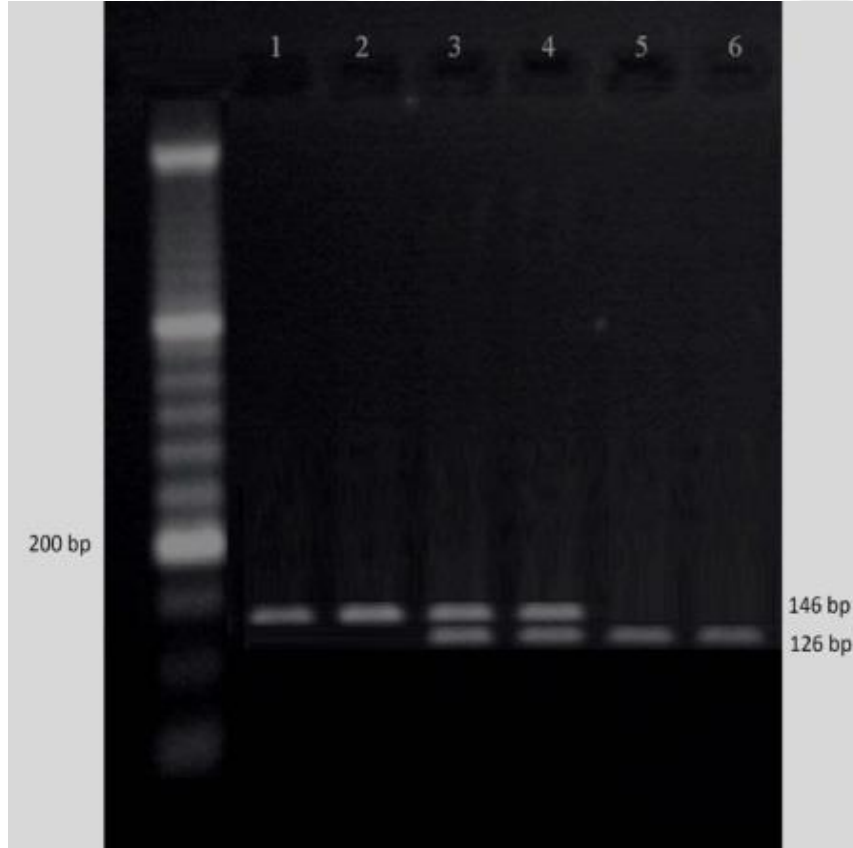
İstenen tek nükleotid polimorfizmini içeren amplifiye fragmanda t alleli için kesim bölgesi MspI enzimi tarafından tespit edilmedi ve bu alel SNP bölgesinde mevcutsa 149 bp fragman kesilmemiş şeklinde kalır.

Eğer C aleli mevcutsa, enzimin kesme bölgesi olduğu için 24 ve 125 baz çiftli iki fragman oluşacak ve bireyin genotipi heterozigot ise 149, 125 ve 24 baz çiftli üç fragman görülecektir.

4.5 MİR-149C>T PLİMORFİZMİNİ TANIMLAMAK İÇİN ALUI ENZİMATİK SİNDİRİMİN SONUÇLARI:

RFLP, PCR ürünleri üzerinde AluI enzimi ile 37°C sıcaklıkta maksimum 4 saat süreyle 25 mikrolitre hacimde ve bir önceki bölümde belirtilen aşamalarda gerçekleştirilmiştir.

Mir149 C>T Polimorfizm'in PCR ürününün enzimatik sindiriminden elde edilen parçalar aşağıdaki şekilde görülebilir.



Şekil 4.5. AluI enzimi tarafından sindirildikten sonra PCR ürününün elektroforez sonucuna bir örnek

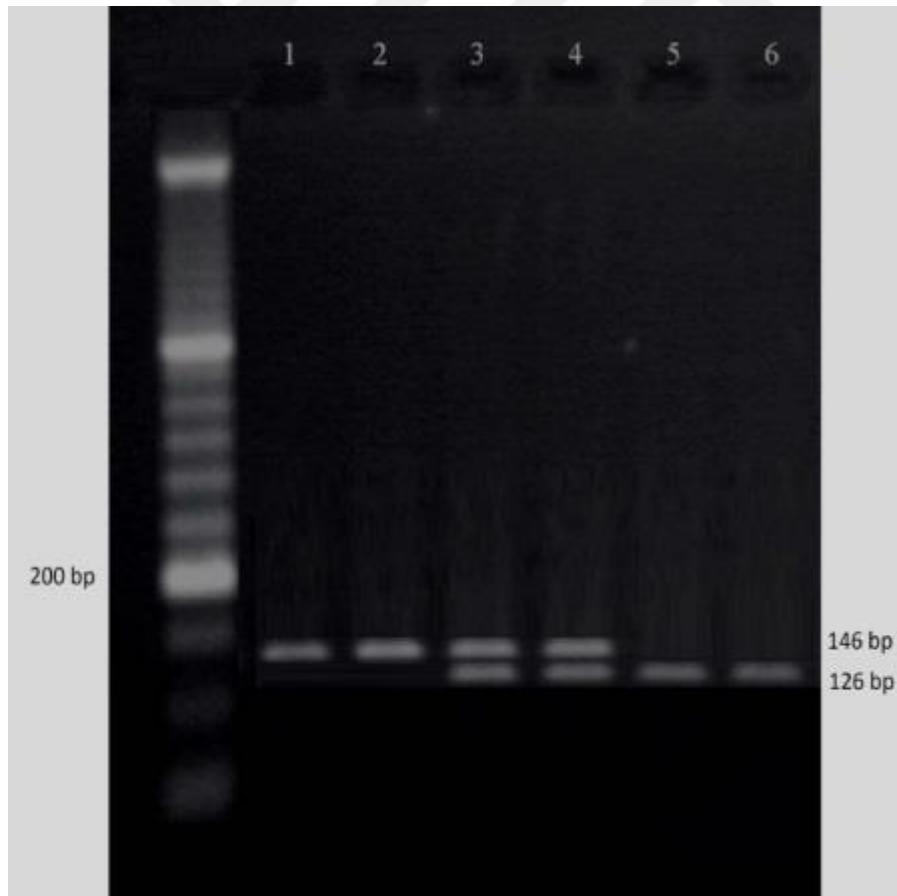
İstenen tek nükleotid polimorfizmini içeren amplifiye fragmanda T alleli için kesim bölgesi AluI enzimi tarafından tespit edilmedi ve bu alel SNP bölgesinde mevcutsa 224 ve 64 bp fragmanlara kesilmemiş şeklinde kalır.

Eğer C aleli mevcutsa, enzimin kesme bölgesi olduğu için 66 VE 71 ve 153 baz çiftli üç fragman oluşacak ve bireyin genotipi heterozigot ise 124, 153, 71 ve 66 baz çiftli dört fragman görülecektir.

4.6 MİR-146AC>G PLİMORFİZMİNİ TANIMLAMAK İÇİN SACI ENZİMATİK SİNDİRİMİN SONUÇLARI:

RFLP, PCR ürünleri üzerinde SacI enzimi ile 37°C sıcaklıkta maksimum 4 saat süreyle 25 mikrolitre hacimde ve bir önceki bölümde belirtilen aşamalarda gerçekleştirilmiştir.

miR-146aC>G Polimorfizm'in PCR ürününün enzimatik sindiriminden elde edilen parçalar aşağıdaki şekilde görülebilir.



Şekil 4.6. SacI enzimi tarafından sindirildikten sonra PCR ürününün elektroforez sonucuna bir örnek

İstenen tek nükleotid polimorfizmini içeren amplifiye fragmanda G alleli için kesim bölgesi SacI enzimi tarafından tespit edilmedi ve bu alel SNP bölgesinde mevcutsa 147 bp fragman kesilmemiş şeklinde kalır.

Eğer A aleli mevcutsa, enzimin kesme bölgesi olduğu için 25 ve 122 baz çiftli iki fragman oluşacak ve bireyin genotipi heterozigot ise 147, 122 ve 25 baz çiftli üç fragman görülecektir.

4.7 İstatistiksel analiz sonuçları:

Kontrol grubundaki kadınlarda ve tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda polimorfizm Mir499 A>G için genotipleme örneklerinin sonuçları Tablo 12'de genotipik frekanslar şeklinde sunulmaktadır.

Sağlıklı ve infertil kişiler arasındaki genotipik frekansların karşılaştırılması Ki-kare testi ve Fisher's exact testi ile SPSS istatistik yazılımı sürüm 21 ile %95 güven düzeyi ile yapılmış ve bu test, polimorfizm açısından bu iki grup arasında anlamlı bir farklılık göstermedi.

Tablo 4.2. miR146 genotipik istatistiksel analiz sonucu

			Hasta kontrol		toplam	P değeri
			Hasta	Kontrol		
miR146	CC	sayı	41	45	86	0,791
		%-si	47,7%	52,3%	100,0%	
		%-si Hasta	39,0%	40,9%	40,0%	
		kontrol				
	GC	sayı	53	51	104	0,791
		%-si	51,0%	49,0%	100,0%	
		%-si Hasta	50,5%	46,4%	48,4%	
		kontrol				
	GG	sayı	11	14	25	0,966
		%-si	44,0%	56,0%	100,0%	
		%-si Hasta	10,5%	12,7%	11,6%	
		kontrol				

Örneklerin genotipleme sonuçlarına göre, kontrol grubundaki homozigot CC'nın sıklığı 52,3% ve hasta grubu 47,7%'dir.

Kontrol grubunda homozigot GG sıklığı 56,0%, hasta grubu 44,0%'dir.

Kontrol grubunda heterozigot GC sıklığı 49,0%, hasta grubu 51,0% idi.

Allelik frekansının belirlenmesi sonuçlarına göre, C alelinin sıklığı kontrol grubunda %64, çalışma grubunda %64, G alelinin sıklığı kontrol grubunda %36, çalışma grubunda ise %36 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.3. miR149 genotipik istatistiksel analiz sonucu

			Hasta kontrol		toplam	P değeri
			Hasta	Kontrol		
miR149	CC	sayı	7	8	15	0,625
		%-si	46,7%	53,3%	100,0%	
		%-si Hasta kontrol	6,7%	7,3%	7,0%	
	TT	sayı	55	64	119	0,625
		%-si	46,2%	53,8%	100,0%	
		%-si Hasta kontrol	52,4%	58,2%	55,3%	
	TC	sayı	43	38	81	0,543
		%-si	53,1%	46,9%	100,0%	
		%-si Hasta kontrol	41,0%	34,5%	37,7%	

Örneklerin genotipleme sonuçlarına göre, kontrol grubundaki homozigot CC'nın sıklığı 53.3% ve hasta grubu 46.7%'dir.

Kontrol grubunda homozigot TT sıklığı 53.8%, hasta grubu 46.2%'dir.

Kontrol grubunda heterozigot TG sıklığı 46.9%, hasta grubu 53.1% idi.

Allelik frekansının belirlenmesi sonuçlarına göre, C alelinin sıklığı kontrol grubunda %25, çalışma grubunda %27, G alelinin sıklığı kontrol grubunda %75, çalışma grubunda ise %73 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.4. miR196 genotipik istatistiksel analiz sonucu

				Hasta kontrol		toplam	P değeri
				Hasta	Kontrol		
miR196	CC	sayı		24	28	52	0,690
		%-si		46,2%	53,8%	100,0%	
		%-si	Hasta	22,9%	25,5%	24,2%	
			kontrol				
	TT	sayı		26	22	48	0,690
		%-si		54,2%	45,8%	100,0%	
		%-si	Hasta	24,8%	20,0%	22,3%	
			kontrol				
	TC	sayı		55	60	115	0,801
		%-si		47,8%	52,2%	100,0%	
		%-si	Hasta	52,4%	54,5%	53,5%	
			kontrol				

Örneklerin genotipleme sonuçlarına göre, kontrol grubundaki homozigot CC'nın sıklığı 53.8% ve hasta grubu 46.2%'dir.

Kontrol grubunda homozigot TT sıklığı 45.8%, hasta grubu 54.2%'dir.

Kontrol grubunda heterozigot TG sıklığı 52.2%, hasta grubu 47.8% idi.

Allelik frekansının belirlenmesi sonuçlarına göre, C alelinin sıklığı kontrol grubunda %52, çalışma grubunda %49, T alelinin sıklığı kontrol grubunda %49, çalışma grubunda ise %51 olarak bulunmuştur

Tablo 4.5. miR499 genotipik istatistiksel analiz sonucu

			Hasta kontrol		toplam	P değeri
			Hasta	Kontrol		
miR499	GG	sayı	10	5	15	0,350
		%-si	66,7%	33,3%	100,0%	
		%-si Hasta kontrol	9,5%	4,5%	7,0%	
	AA	sayı	71	77	148	0,344
		%-si	48,0%	52,0%	100,0%	
		%-si Hasta kontrol	67,6%	70,0%	68,8%	
	AG	sayı	24	28	52	0,169
		%-si	46,2%	53,8%	100,0%	
		%-si Hasta kontrol	22,9%	25,5%	24,2%	

Örneklerin genotipleme sonuçlarına göre, kontrol grubundaki homozigot GG'nın sıklığı 33.3% ve hasta grubu 66.7%'dir.

Kontrol grubunda homozigot AA sıklığı 52%, hasta grubu 48%'dir.

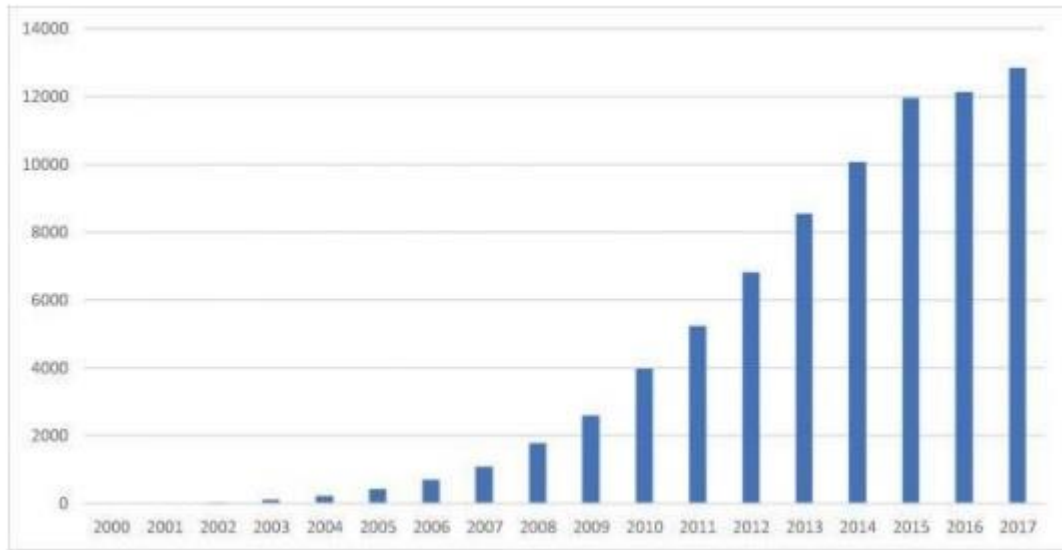
Kontrol grubunda heterozigot AG sıklığı 53.8%, hasta grubu 46.2% idi.

Allelik frekansının belirlenmesi sonuçlarına göre, G alelinin sıklığı kontrol grubunda %17, çalışma grubunda %21, A alelinin sıklığı kontrol grubunda %83 , çalışma grubunda ise %79 olarak bulunmuştur

5. TARTIŞMA

RİF yıllardır infertilite tedavisi alan hastalarda istenmeyen bir durumdur. Gebeliklerin yaklaşık %80'i ilk trimesterde kaybedildiğinden, başarısız gebeliğin başlıca nedeninin embriyo implantasyonu hatası olduğu ileri sürülmüştür. Genetik faktörler implantasyonda başarısızlığa yol açıp, spontan abortuslara sebep olurlar. Başarılı bir implantasyon için, trofoblastların endometriuma invazyonu ve yeterli vaskularizasyonun uyarılması gerekmektedir.

Invazyon ve anjiyogenez süreçlerini düzenleyen genetik faktörlerin embriyo implantasyonunda kritik öneme sahip olduğunu gösteren kanıtlar giderek artmaktadır. Genetik defekt ve hatta bu süreçlerde yer alan genlerin genetik polimorfizmleri, implantasyon başarısızlığına yol açabilir veya en azından duyarlılığı artırabilir. Yıllardır araştırmacılar RİF ile miRNA arasındaki bağlantıyı çözebilmek için çoklu çalışmalar yapmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bir memeli hücresinde yaklaşık 50000 miRNA mevcut



Şekil 5.1. PubMed verilerine göre MikroRNA' anahtar kelimesinin kullanım sayısı MikroRNA' anahtar kelimesini kullanarak PubMed veritabanında her yayın yılı için bulunan referansların sayısı. 2017 yılında bu sayı 12.682 idi. (The role of microRNAs in human embryo implantation: a review Anthea B. M. Paul, Seifeldin T. Sadek, and Arnold M. Mahesan)

MikroRNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar ve perimplantasyon döneminde görev alırlar.

Örneğin, miRNA'ların önemi, farelerde Dicer1 (Dcr1) geninin silinmesinin, farklılaşmadaki kusurlar nedeniyle 7. ve 5. günde embriyo gelişiminin durmasıyla sonuçlanması gerçeğiyle doğrulanmıştır . Yang ve ark. , miRNA'lar tarafından da düzenlendiği anlaşılan değişmiş embriyonik anjiyogenez nedeniyle gebeliğin 12.5 ila 14.5. günleri arasında benzer etkiler bildirmişlerdir

Bu araştırmacılar, miRNA'ların hedef genlerinin posttranskripsiyonel baskılayıcıları olarak hareket ettikleri için, Dicker'deki bir kusurun miRNA'larda kusurlara yol açtığını gösterdi. Bu da embriyolarda Ang-1 ve PTEN gibi hedef genlerin aşırı ekspresyonuna neden olur.

Benzer şekilde, Medeiros ve ark. miRNA Mir-290-295 eksikliğinin kısmi embriyonik ölüme ve germ hücresi defektlerine yol açtığını göstermiştir. Dahası, germ hücrelerindeki bir kusur nedeniyle hayatta kalan embriyolarda dişi fertilitenin tehlikeye girdiğini ve bunun da erken ovaryan yetmezliğine yol açtığını gösterdiler.(109) Mikro-RNA'lar ayrıca insan embriyonik kök (hES) hücrelerinde de yüksek oranda eksprese edilir. Ren ve ark. miR520'nin hES hücre fonksiyonu ile yakından ilişkili olabileceğini bulmuşlardır. MiR-302 ve miR-200 aileleri gibi diğer miRNA'lar da benzer şekilde insanlarda ve fare embriyonik kök hücrelerinde gözlenmiştir.

Mic-RNA-lar erken plasental gelişimde ve gebelik devamında önemli göreve sahiptirler. Bazı miRNA-lar tam olarak hangi fizyolojik süreçte hangi etkiyi yaptıklarını tam olarak bilmesek de gebelik boyunca plasentadan salınırlar

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda birinci ve üçüncü trimesterdaki plasentalardan 208 miRNA izole edilmiş ve bunların iki trimesterde farklı fonksiyonları ifade ettiği ve trimestere göre bunların farklı eksprese edildiği izlenmiştir

Hence yapılan çalışmaların ışığında mic-RNA-ların plasental defekt ve preeklampsisi için biyomarker olabileceğini söylemiştir.

Rosenbluth ve ark. 14 blastosistte (beş female, dört male ve beş anöploidi embriyosu) eksprese edilen 754 miRNA'yı incelediler. Kantitatif PCR (qPCR) ile miR-372, miR-720 ve miR-302c dahil olmak üzere en çok ifade edilen miRNA'ların 27 blastosistte (yedi male, on bir female ve dokuz anöploid) tezahürünü doğruladılar. Bu araştırmacılar, insan blastosistlerinin, embriyo sağkalımı ve gelişiminin yanı sıra kök

hücre pluripotensinin korunması için gerekli olan çok sayıda miRNA'yı eksprese ettiğini gözlemlemişlerdir.

Dahası, erkek ve dişi embriyoları karşılaştırarak, bu araştırmacılar bir miRNA'nın, miR-518d-5p'nin, erkek embriyolarda 5.6 kat daha fazla eksprese edildiğini ve gelişimin blastosist aşamasında bile bir dereceye kadar cinsel farklılaşmayı etkilediğini bulmuşlardır. mRNA Mir-518-d'nin, miRNA genlerinin organize edildiği en büyük insan kümesi olan C19MC kümesine ait olması ilginçtir. Bu kümelerde, miRNA genleri sadece plasentada eksprese edilir ve plasenta gelişimi ve implantasyonunda rol oynayabilir.

Daha yakın zamanlarda, Rosenbluth ve ark. miRNA'ların in vitro fertilizasyon kültür ortamlarında tespit edilebildiğini, burada fertilizasyon yöntemine, kromozomal duruma ve gebelik sonucuna göre farklı şekilde eksprese edildiklerini göstermiştir. Bu sonuçlar, miRNA'ların IVF sonrası başarıyı tahmin etmek için potansiyel belirteçler olduğunu göstermektedir.

Yeni teknolojilerin kullanımı ile birlikte embriyo gelişimi hakkında artan bilgi, ART'deki klinik sonuçları iyileştirmek amacıyla, kaliteli embriyoların potansiyel yeni biyobelirteçlerinin tanımlanmasına yol açmıştır.

Bu bağlamda, miRNA'lar embriyo gelişimi için noninvaziv biyobelirteçler gibi görünmektedir. Bazı çalışmalar, miRNA'nın bir dizi türde embriyo gelişiminde ve kök hücre farklılaşmasında kritik bir rol oynadığını ortaya koymuş olsa da, sadece birkaç çalışma insan embriyolarındaki miRNA'ların ekspresyonunu analiz etmiştir.

Polikistik over sendromu veya erkek faktörü infertilitesi gibi bazı patolojilerde miRNA sentezinin değişebileceği zaten bilinmektedir. Aynı şey, tekrarlanan implantasyon başarısızlığı olan veya yüksek progesteron seviyeleri olan anormal over stimülasyonu olan hastalar için de geçerli görünmektedir.

McCallie ve ark. yaptığı bir çalışmada ilk kez erkek faktörü infertilitesi ve polikistik overleri olan hastalardan türetilen morfolojik olarak benzer blastosistlerin anormal miRNA profilleri sunduğunu gözlemlemişlerdir. (hsa-let-7a and hsa-miR-24), PCO'lu hastalar altı miRNA'da azalmış ekspresyon gösterdi (hsa-let-7a, hsa-miR19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-24, hsa-miR-92, and hsa-miR-93) Daha spesifik olarak, fertil kontrol blastosistleri ile karşılaştırıldığında, erkek faktörü infertilitesi olan hastalar iki miRNA'nın ekspresyonunda önemli bir azalma göstermiştir.(116) Bu bulgular, benzer kalitede embriyoların, implantasyon başarısızlığına katkıda bulunan embriyolarda eksprese edilen anormal miRNA profillerinden kaynaklanabilecek farklı klinik

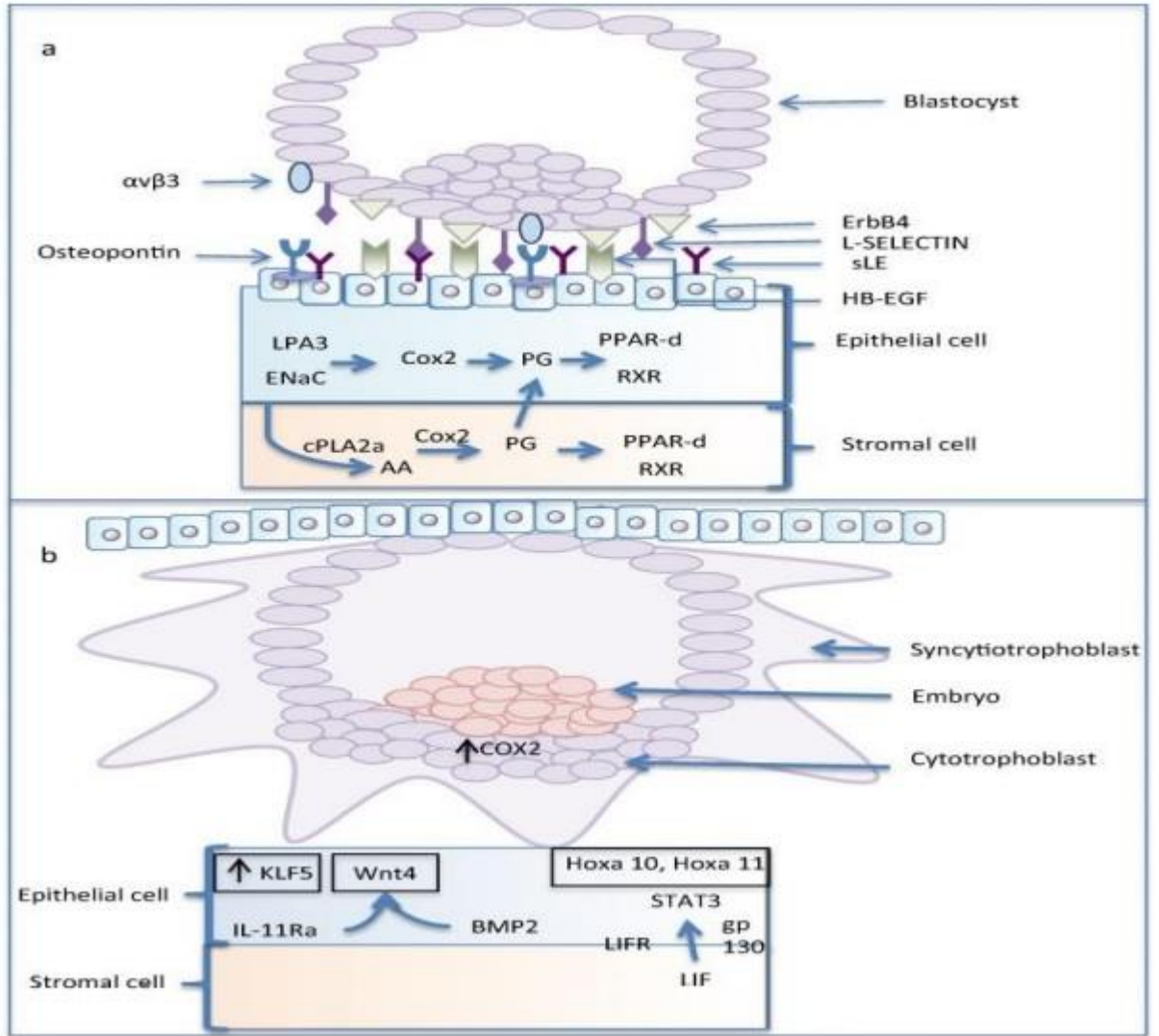
sonuçlara yol açabileceğini düşündürmektedir. Diferansiyel olarak eksprese edilen bu miRNA'ların gen hedefleri, gen ontolojisi, biyolojik süreçleri ve hücre büyümesi ve transkripsiyonu veya nükleik asit bağlanması gibi moleküler fonksiyonlar ile ilişkilidir. Örneğin, has-miR-19a ve has-miR-19b'nin gen hedefleri, interlökin-6 (IL-6) büyüme sinyalinin inhibisyonunda rol oynayan SOCS1'in negatif regülasyonunu göstermiştir.

Daha önce de belirtildiği gibi, miRNA'lar gen ekspresyonunun negatif veya pozitif düzenleyicileri olabilir. MiRNA ekspresyonundaki bir azalma, düzenlemede yer alan belirli mekanizmalara bağlı olarak, bir hedef gen ekspresyonunda bir artışa veya azalmaya yol açabilir. McCallie ve ark.tarafından yapılan çalışmada, öngörülen üç miRNA hedef geninin, ARIH2, KHSRP ve NFAT5'in, erkek faktörü infertilitesinden veya PCO hastalarından türetilen embriyolarda, fertil hastalara kıyasla değiştiği gösterilmiştir. Bunun nedeni, bu tür blastosistlerde ARIH2 ve KHSRP ekspresyonunun arttığı ve NFAT5'in ekspresyonunun azaldığı değiştirilmiş miRNA ekspresyon profiliydi, böylece miRNA sapmasının miRNA hedef genlerinin değiştirilmiş ekspresyonuna neden olabileceğini düşündürdü .

Cinsiyet veya ploidi durumuna bağlı olarak farklı miRNA'ların ekspresyonunu gösteren bu veriler, miRNA'ların bir insan embriyosunun potansiyelinin umut verici belirteçleri olarak daha fazla araştırılması ihtiyacını doğrulamaktadır. Potansiyel olarak önemli bir diğer yol, miRNA'ların embriyo gelişimi ve endometriyal reseptivitede yerleşik temel fonksiyonlara sahip gen ağlarındaki rolünün daha iyi anlaşılmasıdır. Ayrıca, miRNA'lar ve kodlayan genler arasındaki çapraz regülasyonun bilinmesi, belirli klinik koşullara veya prognostiklere özgü profillerin tanımlanmasına yardımcı olabilir. Bu doğrultuda, Tan ve ark. tarafından yapılan bir çalışma, miRNA'ların preimplantasyon fare embriyosunda kritik fonksiyonlara sahip pluripotens düzenleyicileri olduğunu vurgulamıştır. Gerçekten de, araştırmacılar, Oct4 ve Nanog tarafından doğrudan kontrol edilen miRN-290-295 miRNA kümesinin, retinoblastom benzeri 2 (Rbl2) mRNA'yı hedefleyerek ve preimplantasyon embriyosundaki Dnmt3b transkripsiyonunun Rbl2 regülasyonu yoluyla DNA metilasyonunu düzenlediğini gösterdi.

Revel ve ark., tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (RIF) olan hastaların endometrium salgısının , fertil kadınlarınkinden farklı bir miRNA ekspresyonu ile karakterize olduğunu göstermiştir. Çalışmada, 3.800 genin ekspresyonunu düzenleyen 13 farklı şekilde eksprese edilmiş miRNA tanımladılar. Bu miRNA'ların on tanesi aşırı

eksprese edildi (miR 145, 23b ve 99a dahil) ve sadece üçü az eksprese edildi (has-miR-32, 628-5p ve 874)



Şekil 5.2. Blastosist ve reseptif maternal endometriyum arasındaki bağlanma.

Blastosist ve reseptif maternal endometriyum arasındaki bağlanma ve b implantasyonunun şematik diyagramı. Blastosist yüzeyindeki ErbB4, maternal endometriyum epiteli tarafından eksprese edilen l-selektin ligandları (sLE) ile birlikte blastosist üzerindeki l-selektin reseptörlerine transmembran HB-EGF'ye (LİG tarafından modüle edilmiş) bağlanır. Adezyon ve implantasyon için diğer önemli sinyal yolları da gösterilmiştir. AA, arakidonik asit; BMP2, bone morfogenetik protein 2; Cox2, siklooksijenaz-2; ENaC, epitel sodyum kanalı; ErbB4; epidermal büyüme faktörü reseptörü 1/4; gp130, glikoprotein 130; HB-EGF, heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü benzeri büyüme faktörü; Hoxa10/11, homeobox A10/11; KLF5,

Kruppel benzeri faktör 5; LIF lösemi inhibitör faktörü; LIFR LIF reseptörü; LPA3, lizofosfatidik asit reseptörü 3; PG, prostaglandin; PPAR-δ; peroksizom çoğaltıcılar – aktive edici reseptör δ; Wnt4, kanatsız tip MMTV entegrasyon sinyal aile üyeleri.

MiR 145, 23b ve 99a'nın daha önce endometriozis gibi diğer endometriyal disfonksiyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aheren kavşakları, hücre adezyon molekülleri, Wntsignaling ve hücre döngüsü yolları gibi mikro-RNA tarafından düzenlenen moleküler yollar implantasyon için çok önemlidir, ancak RIF hastalarında daha düşüktü

MiRNA-ların RIF üzerindeki etkisi sürekli araştırılmıştır. Şunu söyleye biliriz ki, sunulan çalışmaların tümü aynı sonuçları elde etmemiştir. Bu nedenle, embriyo implantasyonu sırasında miRNA'ların oynadığı spesifik rol belirsizliğini korumaktadır ve daha fazla araştırma gerektirmektedir. Bu, miRNA'ların bozulmuş endometriyal reseptiviteyi tanımlamak ve tedavi etmek için kılavuz olarak kullanılabilmesi için önemli bir adım olacaktır. Embriyo veya endometriyal hücreler tarafından sentezlenen spesifik miRNA'lar, tamamlayıcı mRNA'larına bağlanır, translasyonlarını bastırır ve embriyo implantasyonunda yer alan hücreyel olayları ve yolları modüle eder.

Biz bu çalışmada en az 2 başarısız IVF hikayesi (taze ve ya frozen siklularda transfer edilmiş 3.ve 5. gün embriyolarının) olan Türk kadın popülasyonunda miR-146aC>G, miR-149C>T, miR-196a2T>C, ve miR-499A polimorfizmini araştırıp alelik ve genotipik frekansları, yaş,BMI ve FSH değerlerini, spontan sağlıklı gebeliği olan popülasyonla karşılaştırdık.Çalışma grubumuzda anatomik bozukluğu ,trombolitik hastalığı,enfeksiyöz durumu olanları dışladık.Çalışma grubumuzda 105, kontrol grubunda 110 kadın vardı.

Benzer çalışma daha önce Korede yapılmıştı. Mart 2010 ile Aralık 2012 arasında Güney Kore, Seongnam'daki CHA Bundang Hastahanesi Tüp Bebek Merkezi'ndeki yapılan çalışmada RIF -li 120 hastadan ve 219 kontrol katılımcısından kan örnekleri toplanmış. Tüm hastalar ve kontroller Koreliydi. Korede yapılan bu çalışmada da bizim çalışmaya benzer şekilde çalışma grubunu en az 2 başarısız IVF hikayesi olan hastalar teşkil ediyordu. Çalışmada periferik kandan miR-27a miR-423C, miR449bA, miR-604A genlerine bakıldı. Çalışma grubunda mevcut çalışmamıza benzer şekilde anatomik, enfeksiyöz,trombolitik,hormonal ve ya otoimmün nedenlere bağlı olan RIF hastaları alınmamıştır.Çalışmamızdan farklı olarak Korede yapılan bu çalışmada özellikle bu çalışmadaki embriyo kalitesini

değerlendirmek için özel bir embriyolog belirlenmiş ve embriyo kalitesi en iyi olanlar transfer edilmiş.Ek olarak,Koredeki çalışmada her iki gruptan serum Homosistein düzeyi,Folik asit düzeyi,Prolaktin,Hb,Plt,Total Kolesterol,Ürik asit,Kreatinin değerlerine bakılmıştır.Sonuç olarak RİF-li kadınlarda bakılan genlerde allelik olarak anlamlı değişiklik izlenmiş özellikle miR-27a ve aPTT arasında sinerjik ilişki izlenmiş.miR27a özellikle G alleli olanlarda aPTT zamanı uzamış olup,trombolitik olaylarla sebebiyet verebileceği ve bu nedenle RİF-e sebebiyet verebileceği düşünülmüş. Koreli kadınların popülasyonunda, miR-449bA>G polimorfizminin (AG + GG)genotipi RIF prevalansı ile ilişkiliydi, Bu olumlu gözlemlere rağmen, RIF etiyopatolojisinde mikroRNA'ların işlevinin altında yatan belirsizlik devam etmektedir Yalnız bu çalışma da çok kapsamlı olmayışı ve mekanizmayı tam olarak açıklayamadığı için bu da sadece analiz olarak kabul ediliyor.

Öneriler:

- 1: Türkiye'de yaşayan diğer bölge ve ırklarda miRNA polimorfizminin tekrarlayan abortusla ilişkisinin araştırılması.
- 2: miRNA gen ekspresyonu ile tekrarlayan düşük arasındaki ilişkinin araştırılması
- 3: Benzer çalışmalarda önerilen diğer polimorfizmlerin tekrarlayan düşüklerle ilişkisinin incelenmesi
- 4: Aile öyküsü, kanser vb. diğer faktörleri göz önünde bulundurarak başka çalışmaların yapılması.

KAYNAKLAR

- Adjunct low-molecular-weight heparin to improve live birth rate after recurrent implantation failure: a systematic review and meta-analysis Human Reproduction Update, Volume 19, Issue 6, November/December 2013, Pages 674
- Aghajanova L, Bjuresten K, Altmae S, Landgren BM, Stavreus-Evers A. HB-EGF but not amphiregulin or their receptors HER1 and HER4 is altered in endometrium of women with unexplained infertility. *Reprod Sci* 2008;15:484–92
- American College of Obstetricians and Gynecologists [ACOG], 2009
- Antiphospholipid syndrome: Obstetric implications and management in pregnancy Charles J Lockwood, MD, MHCM Michael D Lockshin, MD, MACR
- Antiphospholipid syndrome: Obstetric implications and management in pregnancy Charles J Lockwood, MD, MHCM Michael D Lockshin, MD, MACR
- Association of miR-27aA>G, miR-423C>a, miR-449bA>G, and miR-604A>G Polymorphisms with Risk of Recurrent Implantation Failure Jung Oh Kim¹ & Eun Hee Ahn² & Jung Hyun Sakong¹ & Hui Jeong An¹ & Han Sung Park¹ & Young Ran Kim² & Jung Ryeol Lee³ & Woo Sik Lee⁴ & Nam Keun Kim¹ Received: 15 November 2018 /Accepted: 8 April 2019 /Published online: 1 January 2020 # Society for Reproductive Investigation 2019
- Barmat LI, et al. A randomized prospective trial comparing gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist/recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH) versus GnRH-agonist/rFSH in women pretreated with oral contraceptives before in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2005;83(2):321–30.
- Bashiri A, Halper KI, Orvieto R, Recurrent Implantation Failure re-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Dec 5;16(1):121. doi: 10.1186/s12958-018-0414-2
- Bentin-Ley U, Sjögren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod* 1999;14:515–20
- Berker B, et al. The role of low-molecular-weight heparin in recurrent implantation failure: a prospective, quasi-randomized, controlled study. *Fertil Steril*. 2011;95(8):2499–502
- Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 2005;120:21–4.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003;35:215–7
- Bouet P-E, El Hachem H, Monceau E, et al. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis *Fertil Steril*. 2016;105(1):106–110
- Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174–9
- Carson DD, Julian J, Lessey BA, Prakobphol A, Fisher SJ. MUC1 is a scaffold for selectin ligands in the human uterus. *Front Biosci* 2006;11:2903–8

- Carson DD, Tang JP, Julian J. Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Dev Biol.* 1993 Jan;155(1):97-106
- Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2015 Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services; 2017.
- Cenksoy P, et al. Hysteroscopic findings in women with recurrent IVF failures and the effect of correction of hysteroscopic findings on subsequent pregnancy rates. *Arch Gynecol Obstet.* 2013;287(2):357–60
- Chen DB, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod* 2013;88:130
- Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res.* 2004;6(Suppl 2):S125–40
- Coughlan C, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod BioMed Online.* 2014;28(1):14–38. 2) Orvieto, R., M. Brengauz, and B. Feldman, A novel approach to normal responder patient with repeated implantation failures - a case report.
- Coughlan C, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod BioMed Online.* 2014;28(1):14–38. 12. Zeyneloglu HB, Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. *Semin Reprod Med.* 2014;32(4):297–305
- Coughlan C, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod BioMed Online.* 2014;28(1):14–38
- Coughlan C, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod BioMed Online.* 2014;28(1):14–38
- Coulam CB, et al. What is Implantation Failure? *J Reprod Endoc Infer.* 2017;2(1)
- Creus M, Balasch J, Ordi J, Fábregues F, Casamitjana R, Quinto L, et al. Integrin expression in normal and out-of-phase endometria. *Hum Reprod* 1998;13:3460–8
- Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:569–73. 81
- Cutting R. Morroll D. Roberts S.A. Pickering S. Rutherford A. Elective single embryo transfer: guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Hum. Fertil. (Camb.).* 2008; 11: 131-146
- Daftary GS, Troy PJ, Bagot CN, Young SL, Taylor HS. Direct regulation of beta3- integrin subunit gene expression by HOXA10 in endometrial cells. *Mol Endocrinol* 2002;16:571–9
- Das and Holzer, 2012 Laufer and Simon, 2012 Penzias, 2012 Simon and Laufer, 2012a Simon and Laufer, 2012b Urman et al , 2005
- Delhanty JD. Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:237–44
- De los Santos MJ, Mercader A, Galán A, Albert C, Romero JL, Pellicer A. Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture. *Placenta.* 2003 Oct;24 Suppl B:S13-9.
- Does low-dose aspirin improve pregnancy rate in IVF/ICSI? A randomized double-blind placebo controlled trial Dirckx ;Cabri P.;Merien A.;Galajdova L.;Gerris J.;Dhont M.De Sutter P.

- Demirol A, Gurgan T. Effect of treatment of intrauterine pathologies with office hysteroscopy in patients with recurrent IVF failure. *Reprod BioMed Online*. 2004;8(5):590–4.
- Dentillo DB, Souza FRP, Meola J, et al. No evidence of association of MUC-1 genetic polymorphism with embryo implantation failure. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:793–7
- Effect of Intravenous immunoglobulin on Th1 and Th2 lymphocytes and improvement of pregnancy outcome in recurrent pregnancy loss (RPL) MajidAhmadi, SamanehAbdolmohammadi-vahid, MahnazGhaebi, eili Aghebati Maleki, AmirAfkhani, ShahlaDanaii, SedighehAbdollahi-Fard, LidaHeidari, FarhadJadidi-Niaragh, VahidYounesi, Mohammad Nouri, MehdiYousefi
- Emma Rasmak Roepke, Margareta Hellgren, Ragnhild Hjertberg, Lennart Blomqvist, Leif Matthiesen, Emir Henic, Sujata Lalitkumar, Annika Strandell. Treatment efficacy for idiopathic recurrent pregnancy loss - a systematic review and meta-analyses. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2018;97(8):921–41
- Enders, A.C., Nelson, D.M., 1973. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am. J. Anat*. 138, 277–299
- Fatemi HM, et al. Prevalence of unsuspected uterine cavity abnormalities diagnosed by office hysteroscopy prior to in vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2010;25(8):1959–65.
- Fukuda MN, Sato T, Nakayama J, Klier G, Mikami M, Aoki D, et al. Trophinin and tasin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation. *Genes Dev* 1995;9:1199–210
- Gardner DK, Weissman A, Howles CM and Shoham Z. Text book of Assisted Reproductive Techniques Volume:2 Clinical Perspectives, Fifth edition, 2018. Part 51: Recurrent implantation failure p:662-673.
- Gabriele Saccone, Corina Schoen, Jason M. Franiak, Richard T. Scott, Vincenzo Berghella. Supplementation with progestogens in the first trimester of pregnancy to prevent miscarriage in women with unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Fertility and Sterility*. 2017;107(2):430–38.e3
- Gonzales DS, Jones JM, Pinyopummintr T, Carnevale EM et al. Trophectoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod*. 1996;11:2739-45
- Goodman C, Jeyendran RS, Coulam CB. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 2008;16:720–3
- Greco E, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20:226-30
- Greco, E., M.G. Minasi, and F. Fiorentino, Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. Pubmed
- Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;304:E836–43
- Guerif F, et al. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod BioMed Online*. 2004;9(6):630-6. 36
- Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation. *Reprod Biomed Online*. 2007 Dec;15(6):728-39
- Hatirnaz S, et al. Pre-implantation genetic screening among women experiencing recurrent failure of in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet*. 2017;137(3):314–8

- He, L., and Hannon, G. J. (2004). Correction: MicroRNAs: Small RNAs with a Big Role in Gene Regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 631. doi:10.1038/nrg1415
- Hernandez-Gonzalez ve ark., 2006; Motta ve ark., 1995a,b; Nottola ve ark., 1991
- Hertig AT, Rock J, Adams EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat* 1956;98:435–93
- Impact of technical difficulties, choice of catheter, and the presence of blood on the success of embryo transfer - Experience from a single provider Sallam, Hassan N., Agameya, Abdel Fattah, Rahman, Ashraf Farrag Ezzeldin, Fathy, Sallam, Ahmed N
- Kabir-Salmani M, Nikzad H, Shiokawa S, Akimoto Y, Iwashita M. Secretory role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF. *Mol Hum Reprod.* 2005 Aug;11(8):553-9
- Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage Howard Carp B.S. Vladimir Toder Ph.D Ayala Aviram Ph.D. Michal Daniely Ph.D. Shlomo Mashiach M.D. Gad Barkai (M.D 2001
- Kim, J.O.; Ahn, E.H.; Sakong, J.H.; An, H.J.; Park, H.S.; Kim, Y.R.; Lee, J.R.; Lee, W.S.; Kim, N.K. Association of miR-27aA>G, miR-423C>a, miR-449bA>G, and miR604A>G Polymorphisms with Risk of Recurrent Implantation Failure. *Reprod. Sci.* 2020, 27, 29–38
- Krussel JS, Bielfeld P, Polan ML, et al. Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gyn R B.* 2003;110:S2–S9
- Kuohung W, Hornstein M, Causes of female infertility. 2021 Ali, M. S., and Hossain, M. M. (2010). Factors influencing the performance of farmers in broiler production of Faridpur District in Bangladesh. *World's Poultry Science Journal*, 66(1), 123-131.
- Lambalk CB, et al. GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type. *Hum Reprod Update.* 2017;23(5):560–79
- Le'de'e-Bataille, N., Lapre'e-Delage, G., Taupin, J.L., Dubanchet, S., Frydman, R., Chaouat, G., 2002. Concentraion of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predicitve of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 17, 213–218
- Lebovitz O, Orvieto R. Treating patients with “thin” endometrium - an ongoing challenge. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30(6):409–14
- Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2011 Sep;96(3):522-9
- Lessey BA, Castelbaum AJ. Integrins and implantation in the human. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:107–17
- Levitas E, et al. Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Fertil Steril.* 2004;81(3):567-71
- Littman E, Giudice L, Lathi R, Berker B, Milki A, Nezhat C. Role of laparoscopic treatment of endometriosis in patients with failed in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2005;84:1574 8
- Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy B. Schiessl, ... +5 ... , et al. *Placenta*, 30 (2009), pp. 79-87
- Low-dose aspirin for in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis T.A. Gelbaya, M. Kyrgiou, T.C. Li, C. Stern, L.G. Nardo
- Margarit L, Gonzalez D, Lewis PD, Hopkins L, Davies C, Conlan RS, et al. L-selectin ligands in human endometrium: comparison of fertile and infertile subjects. *Hum Reprod* 2009;24:2767–77

- Medeiros LA, Dennis LM, Gill ME, Houbaviy H, Markoulaki S, Fu D, et al. Mir-290– 295 deficiency in mice results in partially penetrant embryonic lethality and germ cell defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108: 14163–8
- McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst microRNA exp
- McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril* 2010;93: 2374–82
- McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril* 2010;93: 2374–82
- Mouillet JF, Chu T, Sadovsky Y. Expression patterns of placental microRNAs. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91:737–43
- Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, et al. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:93–6
- Nakagawa et al., 2015 ‘Immunosuppression with tacrolimus improved reproductive outcome of women with repeated implantation failure and elevated peripheral blood TH1/TH2 cell ratios K. Nakagawa, ... +5 ... , et al. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 73 (2015), pp. 353-361
- Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL et al. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril*. 1991;55:114-8
- Nel-Themaat L, Nagy ZP. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta* 2011;32(Suppl 3):S257–63
- Nepomnaschy PA, et al. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans: *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2006. p. 3938–42.
- Nikas G, Aghajanova L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reprod Biomed Online*. 2002;4 Suppl 3:18-23
- Obasaju M, Kadam A, Sultan K, Fateh M, Munne S. Sperm quality may adversely affect the chromosome constitution of embryos that result from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;72:1113–5
- Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol* 2009;23:265–75
- Orvieto R, et al. The influence of body mass index on in vitro fertilization outcome. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009
- Orvieto, R., M. Brengauz, and B. Feldman, A novel approach to normal responder patient with repeated implantation failures – a case report
- Pasch LA, et al. Psychological distress and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2012;98(2):459–64 Shi Y, et al. Transfer of taze versus frozen embryos in ovulatory women. *N Engl J Med*. 2018;378(2):126-36
- Pehlivan T, et al. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod BioMed Online*. 2003;6(2):232–7
- Potdar, N., Gelbaya, T., Nardo, L.G., 2012. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* 25, 561–571.
- Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm* 1973;31:201–56
- Raziel A, Friedler S, Schachter M, Kasterstein E, Strassburger D, Ron-El R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;78:515–9

- Recurrent implantation failure: definition and management C. Coughlan W. Ledger Q. Wang K. Ong H. Sallam T.C. Li Reproductive medicine Online Journal 2014
- Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors Mausumi Das, M.D., and Hananel E. G. Holzer, M.D. Division of Reproductive Endocrinology and Infertility, Department of Obstetrics and Gynecology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
- Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J Transl Med* 2009;7:20
- Revel A, Achache H, Stevens J, Smith Y, Reich R. MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Hum Reprod* 2011;26:2830–40
- Revel A, Achache H, Stevens J, Smith Y, Reich R. MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Hum Reprod* 2011;26:2830–40
- Richter KKR, et al. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. *Fertil Steril.* 2007;87(1):53–9
- Rola F. Turki, Mourad Assidi, Huda A. Banni, Hanan A. Zahed, Sajjad Karim, Hans Juergen Schulten Muhammad Abu-Elmagd, Abdulrahim A. Rouzi, Osama Bajouh, Hassan S. Jamal, Mohammed H. Al-Qahtani Adel M. Abuzenadah 2016 10 October BMC Medical Genetics
- Rosenbluth EM, Shelton DN, Wells LM, Sparks AET, Van Voorhis BJ. Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril.* Published online March 12, 2014
- Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2084–92
- Rubio C, et al. Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril.* 2013;99(5):1400–7
- Sacks G, et al. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67(5):434–42.
- Santillan I, et al. Where and when should natural killer cells be tested in women with repeated implantation failure? *J Reprod Immunol.* 2015;108:142–8.
- Stephens PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1976; 1:880
- Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HWG. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod* 1999; 14:2097–101.
- Siristatidis et al., 'Addition of prednisolone and heparin in patients with failed IVF/ICSI cycles: a preliminary report of a clinical trial' 16 Jun 2013 Human infertility journal
- Short Communication CD3+ CD56+ CD16+ Natural Killer Cells and Improvement of Pregnancy Outcome in IVF/ICSI Failure After Additional IVIG-Treatment' Lothar Heilman, Martin Schorsch, Thomas Hahn Wiesbaden, Germany
- Strauss JF III, Lessey BA. The structure, function and evaluation of the female reproductive tract. In: Strauss JF III, Barbieri RL, editors. *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management.* New York: W.B. Saunders; 2006
- Strandell A, et al. Hydrosalpinx and IVF outcome: a prospective, randomized multicentre trial in Scandinavia on salpingectomy prior to IVF. *Hum Reprod.* 1999;14(11):2762–9

- Tan MH, Au KF, Leong DE, Foygel K, Wong WH, Yao MW. An Oct4-Sall4- Nanog network controls developmental progression in the preimplantation mouse embryo. *Mol Syst Biol* 2013;9:632
- Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive D, Arici A. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1999;14:1328–31
- Treatment with adalimumab (Humira®) and intravenous immunoglobulin improves pregnancy rates in women undergoing IVF E.E. Winger, J.L. Reed, S. Ashoush, S. Ahuja, T. El-Toukhy and M. Taranissi *Am. J. Reprod. Immunol.*, 61 (2009), pp. 113-120
- Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T, Williamson R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:1035–41
- Waylen AL, et al. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009;15(1):31–44
- Yamada H, et al. Pre-conceptional natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol*. 2003;50(4):351–4
- Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao GJ. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 2005;280:9330–5
- Zeadna A, et al. A comparison of biochemical pregnancy rates between women who underwent IVF and fertile controls who conceived spontaneously. *Hum Reprod*. 2015;30(4):783–8
- Zeyneloglu HB, Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. *Semin Reprod Med*. 2014;32(4):297–305.
- Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and metaanalysis. *Hum Reprod* 2008;23:2663–8

ÖZ GEÇMİŞ

Amir SAGHAFIAN, Tabriz Ostad shahriyar Lisesi’ni bitirdikten sonra Shahid chamran Üniversitesi Fen Fakültesi, Genetik bölümünden 20.01.2010 tarihinde mezun oldu. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. 19.07.2013 tarihte bitirdi, 30.01.2015 doktora programına başladı.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-4774-5862

Yayınlar:

1. Taskin M., Ortucu S., Unver Y., Arslan N.P., Algur O.F., and Saghafian A. L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* MBG-10 using starch-rich waste loquat kernels as substrate. *Starch* 2013;65:322–329.
2. Taskin M., Saghafian A., Aydogan M.N. , Arslan N.P. Microbial lipid production by coldadapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium.10.1002/bbb.1560
3. Saghafian A., Tural S., Association of PPAR-A gene polymorphism with osteoporosis in postmenopausal turkish wome. 2022.
4. Saghafian A. Methods and Applications of Protein Engineering in the Field of Biology and Nanobiotechnology. 2022.