

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

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE OLGULARINDA
ENDOMETRİUMDAKİ İMPRİNT GENLERİN
EKSPRESYONU**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Ümit KORUCUOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Aydan ASYALI BİRİ**

ANKARA-2008

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

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE OLGULARINDA
ENDOMETRİUMDAKİ İMPRİNT GENLERİN
EKSPRESYONU**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Ümit KORUCUOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Aydan ASYALI BİRİ**

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

ANKARA-2008

TEŐEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim ve uzmanlık tezimin hazırlanmasında değerli emekleri olan başta tez danışmanım Doç. Dr. Aydan ASYALI BİRİ ve Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Onur KARABACAK olmak üzere, tezime hasta bulunması aşamasında sonsuz desteklerini gördüğüm hocalarım Doç. Dr. Ahmet ERDEM ve Doç. Dr. Mehmet ERDEM'e ve tüm öğretim üyelerimize şükranlarımı sunarım. 5 yıl boyunca her türlü zorluğa birlikte göğüs gerdiğimiz tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin oluşmasında büyük katkıları olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Ece KONAÇ'a ve uzman biyologlar Ebru ALMAYANLAR ve İlke ÖNEN'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, istatistiksel analizde yardımlarını esirgemeyen, Halk Sağlığı Anabilim Dalı'dan canım abim Yrd. Doç. Dr. Mustafa İLHAN'a tüm sevgilerimi ve teşekkürlerimi iletirim.

En zor günlerimde bana destek olabilmek için hep yanımda olan, tüm zorlukları göğüslemek için gerekli gücü bana sağlayan fedakar babama, biricik anneme ve canım kardeşim Kemal'e en derin sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ümit KORUCUOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no:</u>
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	4
III. GEREÇ VE YÖNTEM	9
IV. BULGULAR	42
V. TARTIŞMA	60
VI. SONUÇ	66
VII. TÜRKÇE ÖZET	67
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	69
IX. KAYNAKLAR	71
X. ETİK KURUL KARARI	79

I. GİRİŞ

İmplantasyon, blastokistin maternal endometrial yüzeye bağlanarak plasentayı oluşturması ve bu yolla büyüyen fetus ile maternal sirkülasyon arasında iletişim kurulması olarak tanımlanmıştır (1,2). İmplantasyon, embryo ile endometrium arasındaki kompleks ve sofistike ilişkinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bir çok molekülün rol oynadığı implantasyon olayını çok sayıda gen kontrol etmektedir. İmprint (damgalanmış) genler, implantasyonda önemli rol oynadıkları düşünülen genlerdir.

Bugün için ortaya koyulan ve yaklaşık yüz kadar olduğu düşünülen damgalanmış genlerin hemen tümü implantasyon, plasentasyon ve embriyofetal gelişim için gereklidir ve normal gelişim için uygun dozlarda ve uygun zamanlarda aktivasyonları önemlidir. H19 ve IGF-2 üzerinde en çok çalışılmış, önemi çeşitli çalışmalarda ortaya konmuş damgalanmış genlerden ikisidir. H19 ve IGF-2 genlerinin postnatal hayatta birçok dokuda ekspresyonlarının azalıp kaybolma noktasına gelirken endometriumda belirgin derecede eksprese edilmeleri ve özellikle de ekspresyonlarının menstrüel siklusun fazlarıyla uyumlu olarak değişmesi ve geç sekretuar dönemde zirve yapması (3) bu genlerin implantasyonda görev alabileceklerini düşündürmektedir. Siklusun 21. günüyle siklusun sonu arasında en üst düzeyde eksprese edilen H19 ve IGF-2'nin implantasyonun embryo tarafında önemli rolü olduğu zaten bilinirken, endometrium tarafındaki fonksiyonları araştırılmamıştır.

Bu noktadan yola çıkarak, bu çalışmada, açıklanamayan infertilitesi olup daha önce en az 3 başarısız intrauterin inseminasyonu olan hastalardan siklusun geç sekretuar döneminde alınan endometrial biopsilerdeki IGF-2 ve H19 ekspresyonunun, fertilité sorunu olmayan kadınlardan siklusun geç sekretuar döneminde alınan endometrial biopsilerdeki IGF-2 ve H19 ekspresyonuyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

İnfertil bir çiftin başlangıç değerlendirmesinde yapılacak temel tetkikler basit olup, erkek faktörünü araştırmak için bakılan semen analizini, tubal faktörü değerlendirmek için yapılan histerosalpingografiyi ve ovülasyonun gösterilmesini içermektedir. Bu temel tetkiklerinde herhangi bir anormallik tespit edilemeyen çiftlerde tanı ‐açıklanamayan infertilite‐dir. Açıklanamayan infertilite tanısı almış çiftlerde infertiliteye neden olacak bir faktör mutlaka vardır ancak bu faktör temel tetkiklerle ortaya konamamaktadır. İmplantasyonda rol oynayan mekanizmalardaki bozukluk böyle bir tabloya yol açabilir. Bu fikirden yola çıkarak açıklanamayan infertilitesi olan hastalarda implantasyonda rol alan moleküllerin ekspresyonunun normal fertil kadınlardan farklı olup olmadığını ortaya koyabilmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada, integrin ailesinde bulunan VLA-1 (very late activating antigen-1) ekspresyonunun, açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda, fertil kadınlara kıyasla farklı olduğu gösterilmiştir (4). B-1 integrin ekspresyonunu temel alan bir çalışmada ise açıklanamayan infertil grupla fertil grup arasında fark bulunmuştur (5). LIF ve IL-11'in temel alındığı bir çalışmada ise iki grup LIF ekspresyonu açısından benzer ancak IL-11 ekspresyonu açısından farklı bulunmuştur (6). Açıklanamayan infertiliteyi açıklamak, ve bu hastalarda olası implantasyon kusurunu gösterebilmek için implantasyonda rol alan hemen hemen tüm moleküllerin kullanıldığı çok sayıda araştırmayı literatürde görmekteyiz.

Ancak, implantasyon, plasentasyon ve fetal gelişim için önemleri ortaya konmuş imprint (damgalanmış) genlerin ekspresyonlarının açıklanamayan infertil grupla fertil grupta farklı olup olmadığını araştırmaya yönelik bir çalışma bugüne kadar yapılmamıştır. Literatürde, bu konuyla ilgili yapılmış olan bu ilk çalışmada biz, elde edilen sonuçların “açıklanamayan infertilite”si olan hastaların infertilitesini açıklama çabalarına yeni bir bakış açısı getirmesini ve üzerinde çok az çalışılmış bu alanda yeni gelişmeleri tetiklemesini amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

Başarılı implantasyon için sağlıklı bir blastokistin, reseptivitesi normal bir endometriuma, doğru zamanda ulaşması gereklidir. Her menstrüel siklusun kısa bir bölümünde endometrium implantasyon için uygundur ve bu döneme “implantasyon penceresi” denir. Normal bir siklusta embryo endometrial kaviteye ovülasyondan yaklaşık 4 gün sonra girer (7). Endometriumun reseptivitesi ovülasyondan sonra yaklaşık 6-8 günde başlar ve yaklaşık 4 gün sürer (8).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar insan embryosunun implantasyonunda birçok aşama olduğunu göstermiştir (9). İmplantasyonun ilk aşaması olarak embryo polarite göstermekte ve bir kutuptan endometriuma yaklaşmaktadır. Bu yönelme “appozisyon” olarak anılır ve appozisyonun gerçekleştiği sırada bir sonraki aşama olan adezyon için hazırlıklar başlar ve uterin sekresyonlar içinde 1-3 gün kalan blastokist zona pellusidasından kurtularak kendini adezyona hazırlar. Blastokistin endometrial yüzeyle temas etmesiyle birlikte “adezyon” gerçekleşir. İnsan uterusunda implantasyon noktası genellikle orta hatta olup üst kısımda ve posterior duvardadır. Son basamak, blastokistin epiteli geçmesi ve stromaya doğru ilerlemesi ile karakterize “invazyonun” başlamasıdır.

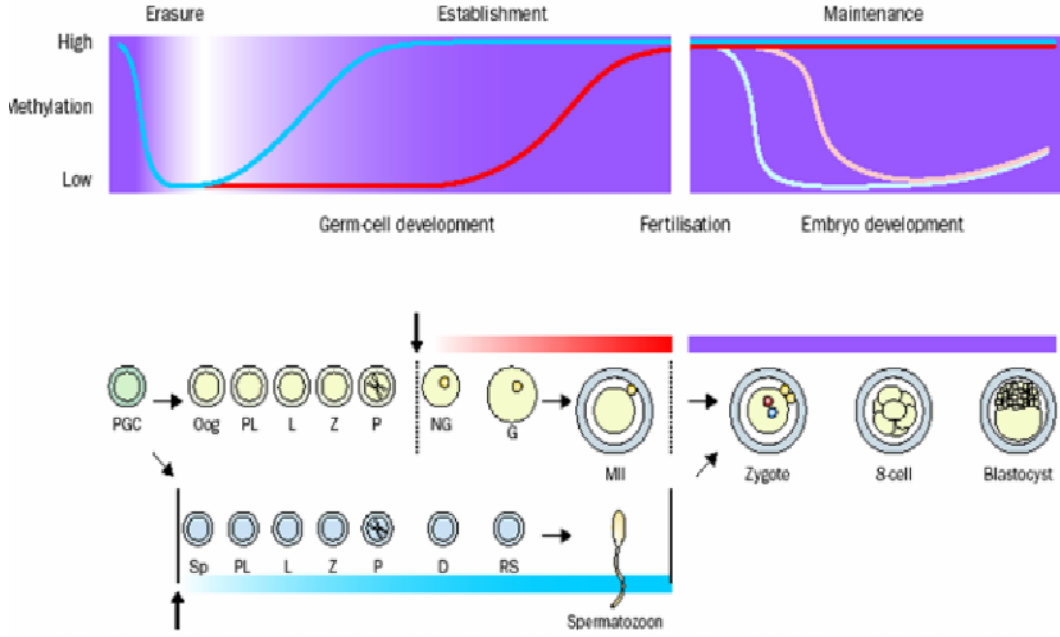
Tüm bu basamaklar temelde seks steroidlerinin ve diğer hormonların kontrol ettiği çok sayıda gen aktivasyonu ve inaktivasyonu ile giden oldukça karışık alt noktalardan oluşur. Endometrium, implantasyonla ilişkili olduğu bilinen en az 3 sitokin sentezlemektedir: colony-stimulating factor-1 (CSF-1), leukemia-inhibitory factor (LIF) ve interleukin-1 (IL-1) (10). CSF-1 hem endometrium hem de preimplantasyon embryoda eksprese olur. CSF-1 mutasyonu olan ratların implantasyon kaybı nedeniyle infertil oldukları bulunmuştur (11). Benzer şekilde

görev yapan LIF ve IL-1 genlerinde mutasyon olan ratların da infertil olduğu bulunmuştur (12). İmplantasyonun adezyon basamağında “cell adhesion molecule (CAM) family” olarak adlandırılan ve integrin, selektin, cadherin ve immunoglobulin olmak üzere 4 alt gruptan oluşan bir gen ailesi rol almaktadır. Bu moleküller glikoprotein yapısında olup hücre-hücreye adezyonun gerçekleşmesini sağlamaktadırlar (13). İntegrinler transmembran hücre yüzey reseptörü olup kollajen, fibronektin ve lamininleri bağlarlar. Endometrial integrin ekspresyonu siklik dalgalanma gösterir ve implantasyon döneminde en yüksek seviyeye ulaşır (14). Blastokist de benzer şekilde implantasyonla uyumlu olacak düzeylerde integrin eksprese eder (15). Selektinler de glikoprotein yapısında olup P-selektin, L-selektin ve E-selektin olmak üzere 3 formda bulunurlar. Preimplantasyon embryoda yüksek miktarda L-selektin ekspresyonu tespit edilmiştir (16). Cadherinler de glikoprotein yapısındadır ve E-, P- ve N-cadherin olmak üzere 3 formda bulunurlar. E-cadherin molekülünün preimplantasyon gelişimde önemli olduğu bulunmuştur (17). İmmünglobulin ailesi geniş olup en önemli üyesi “intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)”dir. Tüm bu moleküllerin yanında, insan blastokistinin endometriuma implantasyonunda, prostaglandinler, tromboksanlar, büyüme faktörleri gibi çok çeşitli moleküller rol alır. Bu kadar karmaşık mekanizmaları ve molekülleri içeren implantasyon olayında rol alan genlerin bir kısmının imprint (damgalanmış) gen olması şaşırtıcı olmayacaktır. İnsanda yaklaşık olarak 100 tane imprint gen tanımlanmış olup bunlar temel olarak implantasyon ve fetal gelişimde rol almaktadırlar.

Genomik imprinting, genetik materyalin paternal ya da maternal kökenli olmasına bağlı olarak hem kromozomal hem de allelik düzeyde farklı ifade edilmesidir ve normal embriyofetal gelişim ve büyüme için imprinted (damgalanmış) genlerin doğru kurulması, korunması ve aktarılması gereklidir (18,19). Bu aşamalardaki herhangi bir kusur bu genlerin

aktivitelerini değiştirerek gelişimi herhangi bir noktada durdurabilir ya da anormal gelişime yol açabilir.

İnsan embryosu için epigenetik programlamanın gerçekleştiği iki kritik dönem mevcuttur: birincisi gametogenez dönemi diğeri ise preimplantasyon dönemi (20). Gametogenez sırasında gerçekleşen programlama “imprinting” (damgalanma) mekanizması için esastır. Damgalama mekanizması anneden ve babadan gelen genlerin farklı olarak ifade edilmesine imkan tanımaktadır. Gonadlara giren primordial germ hücrelerinde demetilasyon işlemi hem damgalanmış hem de damgalanmamış tüm genler için gerçekleşir ve hücreler erkekte mitozda ve kadında mayozda beklemeye başlarlar. Takiben, hücre siklusunun devamında, spermelerde daha fazla olmak üzere yeniden metilasyon işlemi başlar ve hem sperm hücresinin hem de ovumun genetik materyalleri tüm genleri içine alacak şekilde metillenmiş olur. Eğer fertilizasyon gerçekleşirse ikinci bir kez hızlı bir demetilasyon süreci başlar fakat bu dönemdeki demetilasyondan damgalanmış genler korunurlar (21). Diğer genlerde ise implantasyondan hemen önce tekrar metilasyon gerçekleşir (22). İmplantasyondan hemen önce gerçekleşen bu epigenetik programlamada esas hedef implantasyon, büyüme ve gelişimi etkileyen ve damgalanmış olan genlerdir. Damgalanmış genler, diğer genlerden farklı olarak, ikinci demetilasyon işleminden etkilenmediklerinden fertilizasyondan sonra da metillenmiş durumlarını korurlar ve implantasyon öncesi gerçekleşen bu metilasyon ve demetilasyon aşamalarından etkilenmezler ve bu yolla etkilerinin uygun dozda aktif olmaları sağlanır.



Şekil I. Gametogenez ve preimplantasyon dönemlerindeki epigenetik programlama.

Lucifero D ve ark. Hum Reprod Update 2004 (22).

H19 geni maternal alelden transkriptte olur ve insanda gösterilen sayılı damgalanmış genlerden biridir (23,24). Gen lokusu 11p15.5 olup IGF-2 genine yakın lokalizasyonda bulunmaktadır (25). Farklı olarak IGF-2 geni paternal alelden transkriptte olur (26). Bu iki genin ortak cis-regulatuvar sekansları vardır (27,28) ve bir çok dokuda aynı anda eksprese olurlar (29). IGF-2'nin çeşitli dokular için önemli bir proliferasyon ve differansiasyon görevi üstlendiği iyi bilinmekle birlikte H19 geninin tam fonksiyonu uzun yıllardan beri yapılan çalışmalara rağmen halen net olarak anlaşılammıştır. H19'un proteine translasyonu olmaz ve RNA molekülü olarak fonksiyon görür (30). Bazı dokuların proliferasyon ve differansiasyonu sırasında yoğun bir şekilde eksprese olması nedeniyle düzenleyici görevi üzerinde durulmaktadır. H19 ekspresyonu özellikle embriyogenez ve fetal hayatta belirgin olup (31), postnatal dönemde birçok dokuda ekspresyonu baskılanır (32). Aynı zamanda H19'un bir onkofetal RNA olduğu ve bu geni eksprese eden dokulardan gelişen çocukluk çağı tümörlerinde ekspresyonunun belirgin olduğu gösterilmiştir (33,34).

H19 geninin ekspresyonunun postnatal hayatta nadiren devam ettiği dokulara ilginç iki örnek over ve endometriumdur (3). H19'un endometrium ve overde endometrial ve folliküler değişikliklere paralel olarak siklik ekspresyonu olduğu bulunmuştur (3). Buna göre, proliferatif fazda endometriumdaki stromal hücrelerde orta derecede H19 ekspresyonu olduğu bulunmuştur (fetal endometriumdaki H19 ekspresyonundan biraz daha az). Ekspresyonu ovülasyonla birlikte hemen düşmekte ve erken sekretuar fazda oldukça düşük seyretmektedir. Daha sonra H19 ekspresyonu giderek artmakta ve siklusun 21. gününde oldukça yüksek seviyelere ulaştıktan sonra hafif artışla siklusun sonunda en yüksek değerine ulaşmaktadır.

Aynı çalışma, IGF-2 ekspresyonunun da endometriumda izlendiğini ve menstrüel siklusun dönemleriyle değiştini göstermiştir (3). Proliferatif faz ve erken sekretuar dönemde çok düşük seviyelerde bulunan IGF-2 ekspresyonu geç sekretuar fazda yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Bu yönüyle H19'a benzer şekilde eksprese olan IGF-2, H19'dan farklı olarak yalnız stromal hücrelerden değil aynı zamanda glandüler epitelden de eksprese edilir.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1.Cihazlar

- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Spin vortex (Biosan FV-2400, Rusya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan TDB-120, Rusya)
- Manyetik karıştırıcı (Assistent TMA 2071, Almanya)
- Masaüstü mini santrifüj (Hettich Mikro 22, Almanya)
- Masaüstü mini soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, ABD)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Mikropipetler (CLP Bt10, Bt100, Bt1000 Beta pipetor, ABD)
- Derin dondurucu (-86⁰C) (Sanyo MDF-U53865, Japonya)
- Derin dondurucu (-30⁰C) (Sanyo MDF-U333, Japonya)
- Güvenlik Kabini (DanLaf VFERS 1206, Danimarka)
- Azot tankı (Air liquide GT212, Fransa)
- Thermal Cycler (Thermo Hybaid PCR-sprint, ABD)
- Real time PCR cihazı (Roche LightCycler, Almanya)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic 100, ABD)
- Mikrodalga fırın (Arçelik MD553, Türkiye)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo EC250-90, ABD)
- Elektroforez tankı (Thermo Midicell Primo EC330, ABD)
- UV transluminator (LKB 2011, ABD)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Tris-HCl (Sigma, ABD)
- KCl (Sigma, ABD)
- MgCl₂ (Fermantas, Litvanya)
- CaCl₂ (Merck, Almanya)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat) (Sigma, ABD)
- Sodyum hidroksit peleti (Merck, Almanya)
- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye)
- Steril distile su (Eczacıbaşı, Türkiye)
- DEPC'li (Diethylpikarbonat) su (Biological Industries, İsrail)
- Kloroform (Amresco, ABD)
- İzopropanol (Amresco, ABD)
- Saf etanol (Carlo Erba, İtalya)
- DNaz I recombinant (Roche, Almanya)
- TaqMan Master mix (Roche, Almanya)
- IGF-2, H19 ve GADPH primerleri (Tıbbolbiol, Almanya)
- IGF-2, GADPH, H19 LNA problemleri (UPL, Almanya)
- PCR tamponu (Fermantas, Litvanya)
- dNTP karışımı (Fermantas, Litvanya)
- Taq DNA polimeraz (Fermantas, Litvanya)
- Agaroz (ONBIO Inc., Kanada)
- Etidyum Bromür (Sigma, ABD)
- Tris bazı (Sigma, ABD)
- Borik asit (Merck, Almanya)
- Gliserol (Sigma, ABD)

- Orange G (Sigma, ABD)
- *RsaI* ve *ApaI* restriksiyon enzimleri ve tamponları (Fermentas, Litvanya)
- 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas, Litvanya)

3.1.3. Kitler

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

3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. 0.5 M EDTA (pH: 8) Çözeltisi Hazırlanışı

- EDTA 186.1 g
- 800 ml distile su

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

3.2.2. 5X TBE Çözeltisi Hazırlanışı

- Tris bazı 54 g
- Borik asit 27.5 g
- 0,5 M EDTA (pH: 8) 20 ml

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

3.2.3. 1X TBE Çözeltisi Hazırlanışı

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

3.2.4. Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı

10 mg etidyum bromür 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.2.5. Orange G Jel Yükleme Tamponu Hazırlanışı

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

Karıştırılarak çözülür.

3.3. Agaroz Jel Hazırlanışı

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 g agaroz hassas terazide tartıldı. 1X TBE çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırın kullanılarak kaynatıldı. Agarozun homojen bir şekilde erimesinden ve sıcaklık 60°C' ye düştükten sonra 3 µl etidyum bromür eklendi. Hazırlanan karışım elektroforez tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE çözeltisinden eklendi.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 01/2005-65 kodlu bu çalışma üniversitemiz yerel etik kurulu tarafından onaylandı. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran 30 birey çalışmaya dahil edildi. Açıklanamayan infertilite tanımı olarak en az 1 yıllık düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememiş ve yapılan temel infertilite tetkiklerinde düzenli ovülasyonu olduğu tespit edilmiş, histerosalpingografileri normal olup tubal faktörü ekarte edilmiş ve semen analizi normal olup erkek faktörü ekarte edilmiş hastalar olarak kabul edildi. Bu kriterlere sahip olan 15 hasta çalışma grubunu oluştururken, fertilitelerini kanıtlamış 15 sağlıklı kadın kontrol grubunu oluşturdu. Kontrol

grubundaki sağlıklı kadınların en az 1 yaşıyan çocuklarının olması ve obstetrik öykülerinde başıarisiz implantasyonu düşündürecek spontan abort, blighted ovum ya da missed abort gibi bir öykülerinin olmaması Őartı arandı. Açıklanamayan infertilite grubuna dahil edilen tüm hastalar primer infertildi. Hiçbirinde daha önce klinik gebelik elde edilememiŐti. Bu hastaların hepsinin histerosalpingografisi normal olarak deęerlendirilmiŐ ve hiçbirinde tubal faktör düŐünülmemiŐti. Çalışmaya alınmadan önce laparoskopisi yapılmış 7 hastanın hiçbirinde infertiliteyi açıklayacak patolojik bulgu saptanmamıŐti. 15 hastadan 2'sine çalışma öncesi histeroskopi yapılmıŐti. Bu iki hastanın birine polipektomi yapılmış diğerinin endometrial kavitesi normal olarak deęerlendirilmiŐti. Tüm hastaların eŐlerinin sperm analizleri yapılmıŐti ve hiçbirinde anormallik tespit edilmemişti. Tüm hastalarda daha önce en az 3 kez ovülasyon indüksiyonu ve intrauterin inseminasyon denenmiŐ ancak gebelik elde edilememiŐti.

Hem hasta hem de kontrol grubundakiler çalışmaya alınmadan önce araştırma konusunda bilgilendirildi. Tüm olgulardan aydınlatılmıŐ onamları alındı.

Açıklanamayan infertilitesi olan hastalarla fertil kadınların endometriumundaki H19 ve IGF-2 imprint genlerinin ekspresyonlarının karŐılaŐtırıldıęı bu çalıŐmanın en önemli noktası hastalardan yapılan endometrial gnlemeydi. Tüm rneklemelemluteal fazda siklusun 20-26 günleri arasında yapıldı. Bu periyoda karar verirken Őu faktörler göz önüne alındı:

- Her menstrüel siklusun kısa bir bölümünde endometrium implantasyon için uygundur ve bu döneme “implantasyon penceresi” denir. Endometriumun reseptivitesi ovülasyondan sonra yaklaşık 6-8 günde başlar ve yaklaşık 4 gün sürer (35). Bu da siklusun 20-26. günleri arasına denk gelir.

- H19 ekspresyonu ovülasyonla birlikte hemen düşmekte ve erken sekretuar fazda oldukça düşük seyretmektedir. Daha sonra H19 ekspresyonu giderek artmakta ve siklusun 21. gününde oldukça yüksek seviyelere ulaştıktan sonra hafif artışla siklusun sonunda en yüksek değerine ulaşmaktadır (3). IGF-2 ekspresyonu da proliferatif faz ve erken sekretuar dönemde çok düşük seviyelerde iken geç sekretuar fazda yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Bu yönüyle H19’a benzer şekilde eksprese olmaktadır.

- Seçilen 20-26 gün arasındaki periyot hem implantasyon penceresini oluşturmakta hem de H19 ve IGF-2 ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğu döneme denk gelmektedir.

Örnekleme tamami steril pipelle kanülü ile yapılmış olup örnekleme sonucu elde edilen doku iki eşit parçaya ayrılarak hem genetik inceleme hem de patolojik olarak Noyes klasifikasyonuna (36) göre endometrial günleme gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, örneklemenin yapıldığı gün hastaların serum progesterone seviyelerine de bakılmıştır.

Ayrıca her iki grupta, implantasyon ve başarılı gebelik üzerine etki edebilecekleri düşünülerek tiroid fonksiyon testleri ve tam trombofili paneli bakıldı (37). Tiroid fonksiyon testleri normalken, yalnız tiroid antikor pozitifliğinin görüldüğü durumların infertilite üzerine etkileri net olmadığından tiroid antikorları rutin olarak bakılmadı (38).

3.4.2.Endometriyum Dokusundan Total RNA Saflaştırılması

Hastalardan steril pipelle ile alınan endometriyum örnekleri steril petride serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun (50mg- 100mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. DNaz ve RNaz free 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde donduruldu. Örnekler izole edilinceye kadar - 80°C' de saklandı.

Doku örneklerinden total RNA saflaştırma işlemi peqGOLD TriFast™ dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile işlemler güvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

- 1- 1.5 ml' lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden pastle ile homojenize edildi.
- 2- Homojenat üzerine 1000 mikrolitre (μ l) TriFast eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 3- 200 μ l kloroform eklenerek, 15 sn boyunca karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu.
- 4- Örnekler 11.000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
- 5- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 μ l izopropanol eklenip karıştırıldı.
- 6- Örnekler 1.5 saat -20 °C'de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

- 7- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 µl DNaz (µg başına 5U DNaz), 300 µl DNaz Buffer I ve 400 µl DEPC'li su eklenerek 30 dk 37 °C sıcaklığında bekletildi.
- 8- Örneklerin üzerine 300 µl 25mM EDTA eklendi ve 65 °C'de 10 dk bekletildi.
- 9- 12.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan süpernatant atıldı.
- 10- 1000 µl %75'lik alkol (taze hazırlanır) eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan süpernatant atıldı.
- 11- Peletin üzerine tekrar 1000 µl %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan süpernatant atıldı.
- 12- Pelet kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı. Çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı.

3.4.3. cDNA Sentez Tepkimesi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de [RNA için 260 nanometre'de (nm); protein için 280 nm] ölçülerek mikrolitre/ mikrogram (µl/ug) miktarları ve saflıkları belirlendi. Primer olarak random hegzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları tablo-1'de verilmiştir.

Tablo I. RT-PCR tepkime karışımı

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

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

3.4.3.1. RT-PCR Programı

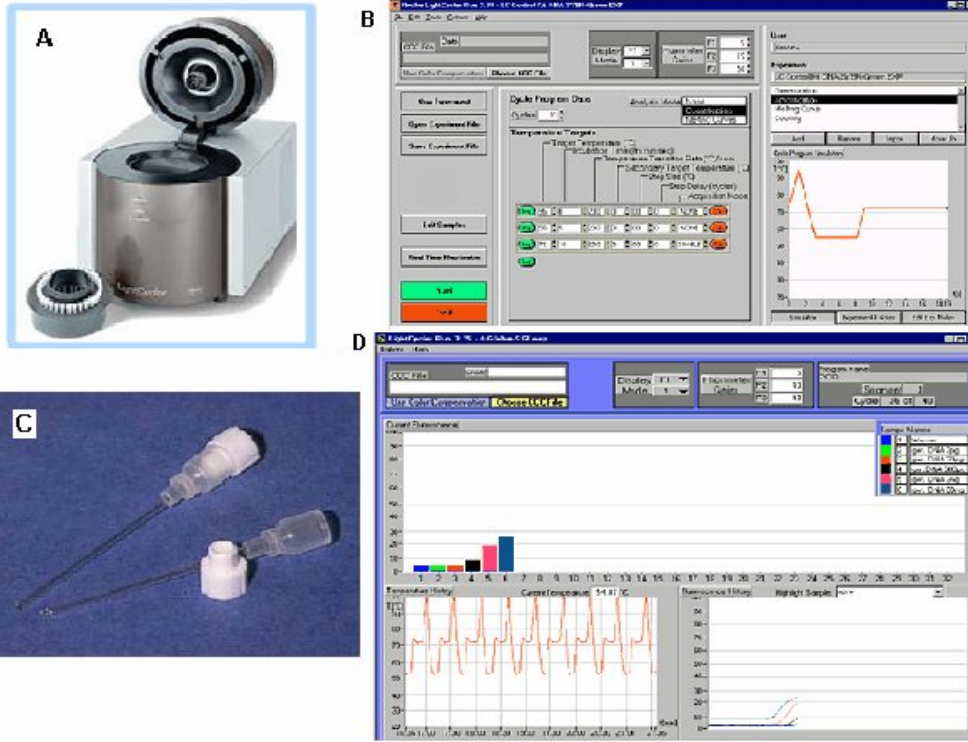
Otomatik ısı döngü cihazı aşağıda belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA'lerden cDNA elde edildi.

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

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

3.4.4. H19 ve IGF-2 Genlerinin İfadelemesinin Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi

H19 ve IGF-2 genlerinin ifadenmesinin kantitatif değerlendirmesi için Light Cycler™ (LC) cihazı kullanıldı (Şekil-2). Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu ve LC TaqMan Master mix kullanılarak gerçekleştirildi. H19 ve IGF-2 gen ifadenmesini normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, GAPDH genine özgü primer ve UPL TaqMan probu kullanılarak da çalışıldı.



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

A: Real Time PCR cihazı

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

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

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

3.4.4.1. H19 Geninin İfadeleme Düzeyinin Kantitatif Analizi

H19 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri şekil 3' de gösterildi. UPL'den sipariş edilen prob ve primerlerin özelliklerini gösteren şekil UPL assay design sayfasından alındı.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NR_002196.1 Homo sapiens H19, imprinted maternally expressed transcript (H19) on chromosome 11.

Assay rank 1

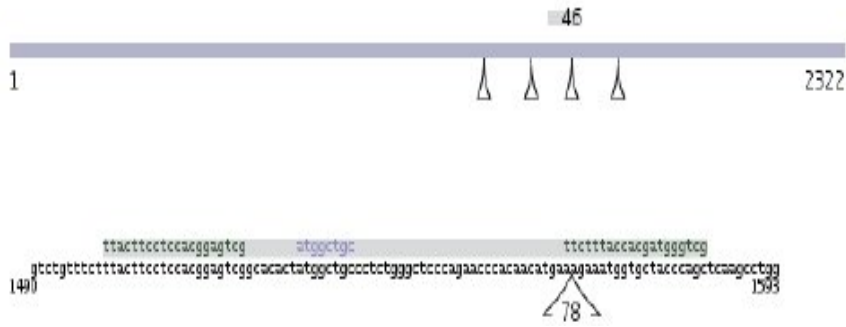
Use probe #46 (cat. no. 04688068001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	1500 - 1519	60	55	ttacttctctccacggagtcg
Right	20	1564 - 1583	59	50	gtcgggtagcaccatttctt
Amplicon (84 nt)					
ttacttctctccacggagtcggcacactatgggtgccctctggggtccccagaaccacacaacatgaaagaaatgggtgctaccagc					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 78 nt



Şekil III. H19 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri

Şekil 3' de gösterilen primer ve probalar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo II. H19 real-time PCR tepkime karışımı

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

3.4.4.2. IGF-2 Geninin İfadeleme Düzeyinin Kantitatif Analizi

IGF-2 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri şekil 4'de gösterildi. UPL'den sipariş edilen prob ve primerlerin özelliklerini gösteren şekil UPL assay design sayfasından alındı.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:

BC000531.1|BC000531:EMBL|TRAN00000100339:ASTD|HIT000029713:H-InvDB|IMAGp958J0964:RZPD|IRALp962P021:RZPD
Homo sapiens insulin-like growth factor 2 (somatomedin A), mRNA (cDNA cloneMGC:8683 IMAGE:2964584), complete cds.

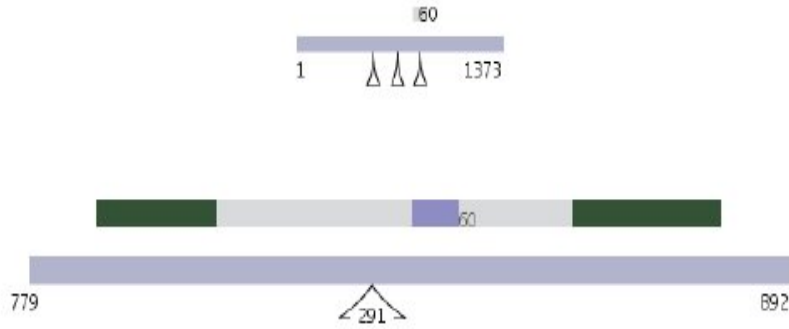
Use probe #60 (cat. no. 04688589001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	789 - 807	59	58	aagtccgagaggggacgtgt
Right	23	880 - 882	60	43	tccaggtgtcatattggaagaac
Amplicon (94 nt)					
aagtccgagaggggacgtgtcgaacctccgacogtgcctcoggaacaactccccagataccccgtggccaagttcttccaatatgacac ctgga					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 291 nt



Şekil IV. IGF-2 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri

Şekil 4’ de gösterilen primer ve probalar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler tablo 3’de verilmiştir.

Tablo III. IGF-2 Real-time PCR tepkime karışımı

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

3.4.4.3. GADPH Geninin İfadeleme Düzeyinin Kantitatif Analizi

GADPH genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri şekil 5’de gösterildi. UPL’den sipariş edilen prob ve primerlerin özelliklerini gösteren şekil UPL assay design sayfasından alındı.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_002046.3 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA.

Assay rank 1

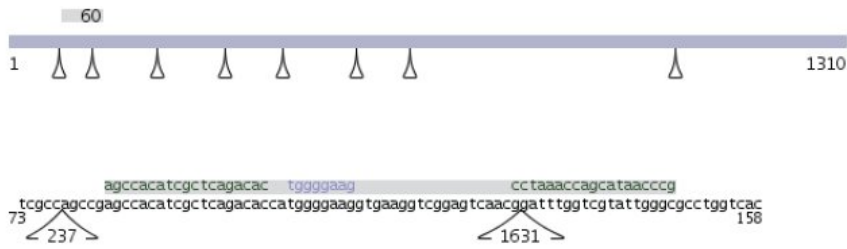
Use probe #60 (cat. no. 04688589001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	83 - 101	60	58	agccacatcgctcagacac
Right	19	130 - 148	60	53	gcccaatacgaccaaatcc
Amplicon (66 nt)					
agccacatcgctcagacacccatggggaaggtgaaggtcggagtcacggatttggctgtattgggc					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 1631 nt



Şekil V. GAPDH genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri

Şekil 5’de gösterilen primer ve proplar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler tablo 4’de gösterildi.

Tablo IV. GADPH Real-time PCR tepkime karışımı

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

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA'ler eklendi. Kapiller tüpler 3000-5000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler yerleştirildikten sonra LC cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. IGF-2, H19 ve GADPH genleri için aynı PCR programı kullanıldı.

3.4.4.4. H19, IGF-2 ve GADPH LC Deney Programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)

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

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

Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10 sn	20 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0

Program 3. Soğutma

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

Reaksiyon sonucu herbir bireye ait H19, IGF-2 ve GADPH genleri mRNA ifadenme düzeyini gösteren crossing point (Cp) değerleri belirlendi. H19 ve IGF-2 ifadenme düzeyleri GADPH ifadenme düzeyine göre normalize edildi.

3.4.5.Endometriyum Dokusunda H19 ve IGF-2 Genlerinin metilasyon düzeylerinin (allelık ifadenmesi) Belirlenmesi

H19 ve IGF-2 genlerinin allelik ifadenmelerini belirlemek amacıyla endometriyum dokularından genomik DNA elde edildi. H19 geninde tanımlanan (rs2839704) ve IGF-2 geninde tanımlanan (rs680) polimorfizmleri Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemiyle belirlendi. Heterozigot olan örneklerin, RNA' larından elde edilen cDNA' lar aynı primerler kullanılarak ile çoğaltıldı ve RFLP yöntemiyle genotiplendirildi. DNA ve cDNA genotiplendirme sonuçları karşılaştırıldı. Buna göre; DNA

ve cDNA genotipi heterozigot olan örnekler biallelik, DNA genotipi heterozigot, cDNA genotipi homozigot olan örnekler ise monoallelik olarak kabul edildi.

3.4.5.1. Dokudan Genomik DNA Eldesi

Çalışmaya dahil edilen her bireyden steril pipet ile alınan endometriyum örneklerinden High Pure PCR Template preparation kit kullanılarak genomik DNA elde edildi. DNA eldesinde kullanılan kit protokolü aşağıda belirtilmiştir.

- 1- Küçük parçalara ayrılmış doku örneği üzerine 200 µl doku parçalayıcı tampon, 40 µl Proteinaz K eklenerek tüm doku tamamen parçalanana kadar 1 saat 55 °C' de bekletildi.
- 2- 200 µl binding buffer eklenerek 70 °C' de 10 dk bekletildi.
- 3- 100 µl izopropanol eklenerek karıştırıldı.
- 4- Kalan doku parçaları pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- 5- Toplama tüpüne kitin içinden çıkan filtre yerleştirildi. Örneğin sıvı kısmı filtreye aktarıldı.
- 6- 8000 g' de 1dk santrifüj edildi.
- 7- Filtre yeni bir tüpe yerleştirildi.
- 8- 500 µl inhibitör removal buffer eklendi.
- 9- 8000 g' de 1dk santrifüj edildi.
- 10- Filtre yeni bir tüpe yerleştirildi.
- 11- 500 µl wash buffer eklendi.
- 12- 8000 g' de 1dk santrifüj edildi.
- 13- Filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 14- 500 µl wash buffer eklendi.

15- 8000 g' de 1dk santrifüj edildi.

16- Tüpün altındaki sıvı döküldü ve filtre aynı tüpe yerleştirildi.

17- 13000 g' de 5 dk santrifüj edildi.

18- Filtre yeni 1.5 ml' lik ependorf tüpe aktarıldı. Daha önceden ısıtılmış elution buffer' dan 200 µl eklendi.

19- 8000 g' de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen genomik DNA -20 °C' de saklandı.

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

H19 geni rs2839704 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler eşliğinde çoğaltıldı.

3.4.5.2.1 H19 Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen primerler kullanılarak 654 bç'lik bölge çoğaltıldı. Bölgeyi çoğaltmak üzere seçilen primerlerin genomdaki yerleşimleri aşağıdaki şekil 6'da gösterildi.

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

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

2461 CTGGGCCTTTGAATCCGGACACAAAACCCCTCTAGCTTGGAAATGAATATGCTGCACCTTA
5' TA
CAACCACTGCACTACCTG 3'
2521 CAACCACTGCACTACCTGACTCAGGAATCGGCTCTGGAAGGTGAGCACCAGCGCTCCTTC
2581 CGGAAGCCTCCAGGCCCGGAGCACCCTGCCCCATCCCACCCACGTGTGCTATCTCTA
2641 GGTGAAGCTAGAGGAACCAGACCTCATCAGCCCAACATCAAAGACACCATCGGAACAGCA
2701 GCGCCCGCAGCACCACCCCGCACCAGGCGACTCCATCTTCATGGCCACCCCTGCGGCGG
2761 ACGGTTGACCACCAGCCACCACATCATCCAGAGCTGAGCTCCTCCAGCGGGATGACGCC
2821 GTCCCCACCACCTCCCTCTTCTTTTTCATCCTTCTGTCTCTTTGTTTCTGAGCTTTC
2881 CTGTCTTTCCTTTTTTCTGAGAGATTCAAAGCCTCCACGACTCTGTTTCCCCCGTCCCTT
2941 CTGAATTTAATTTGCACTAAGTCATTTGCACTGGTTGGAGTTGTGGAGACGGCCTTGAGT
rs2839704
↓
3001 CTCAGT***A**CGAGTGTGCGTGAGTGTGAGCCACCTTGGCAAGTGCCTGTGCAGGGCCCGGCC
↑
RsaI
3061 GCCCTCCATCTGGGCCGGGTGACTGGGCGCCGGCTGTGTGCCCGAGGCCTCACCCCTGCC
3121 TCGCCTAGTCTGGAAGCTCCGACCGACATCACGGAGCAGCCTTCAAGCATTCCATTACGC
3' CGTCGGAAGTTCGTAAG 5'

Şekil VI. H19 gen bölgesini çoğaltan primerler ve bölgenin genomdaki yerleşimi ve rs2839704 polimorfizmi

için kullanılan RsaI restriksiyon enzimi ve kesim yeri. Referans: ENSG00000130600 giriş no'lu dizi.

H19 gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan malzemelerin oranları aşağıdaki tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo V. H19 gen bölgesi PCR karışımı

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

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

Tablo VI. H19 PCR programı

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

Çoğaltılan PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirildi.

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

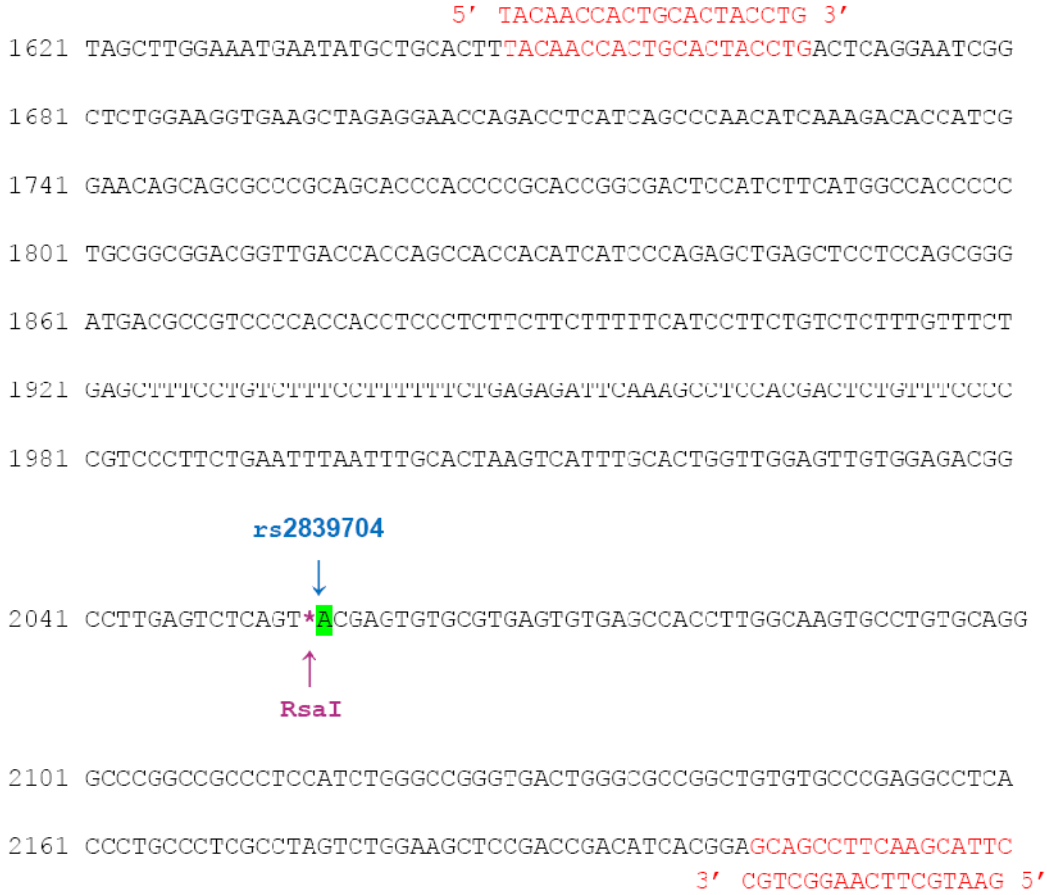
H19 rs2839704 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler eşliğinde çoğaltıldı.

3.4.5.3.1 H19 Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen primerler kullanılarak 573 bp'lik bölge çoğaltıldı. H19 geninin genomik DNA'dan ve cDNA'dan çoğaltılması sırasında aynı primerler kullanılmıştır. Elde edilen ürünler arasındaki fark ekzonlar arasına giren intron büyüklüğünden kaynaklanmaktadır. Bölgeyi çoğaltmak üzere seçilen primerlerin genomdaki yerleşimleri şekil 7'de gösterildi.

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

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



Şekil VII. cDNA'dan H19 geni rs2839704 polimorfizmini içeren bölgenin çoğaltılmasında kullanılan primerler,

RsaI restriksiyon enzimi ve kesim yeri. Referans: ENST00000252900 giriş no'lu dizi.

H19 gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan malzemelerin oranları aşağıdaki tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo VII. H19 gen bölgesi PCR karışımı

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

PCR tepkime karışımı tablodaki miktarlara göre hazırlandı. Karışım PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra cDNA’dan 2.5 µl eklendi. Otomatik ısı döngü cihazında tablo 8’de belirtilen programa göre PCR tepkimesi uygulandı.

Tablo VIII. H19 PCR programı

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

Çoğaltılan PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.4.5.4. H19 Geni PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Değerlendirilmesi

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

3.4.5.5.H19 Geni PCR Ürünlerinin *RsaI* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

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

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

cDNA' dan PCR tepkimesi sonrası 573 bp'lik PCR ürünü *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonucu nükleotit değişimi olan (GG) bireylerde 573 bp'lik tek bant, her iki allelinde nükleotit değişimi taşımayan (AA) bireylerde 407 ve 165 bp' lik iki bant, heterozigot (AG) bireylerde ise 573, 407 ve 165 bp olmak üzere üç bant oluşur.

3.4.5.5.1. Deneyin Yapılışı

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

3.4.5.6. Genomik DNA ve cDNA'dan IGF-2 Geni (rs680) Polimorfizminin Belirlenmesi

IGF-2 geni rs680 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler eşliğinde çoğaltıldı. cDNA ve genomik DNA' dan elde edilen PCR ürünlerinin büyüklükleri, reaksiyon sırasında kullanılan malzemelerin oranları ve PCR koşulları aynıdır.

3.4.5.6.1 IGF-2 Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen primerler kullanılarak 292 bç' lik bölge PCR ile çoğaltıldı. Seçilen primerlerin genomdaki yerleşimleri aşağıdaki şekil 8'de gösterilmiştir.

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

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



Şekil VIII. IGF-2 gen bölgesini çoğaltan primerler ve bölgenin genomdaki yerleşimi ve rs680 polimorfizmi için kullanılan ApaI restriksiyon enzimi ve kesim yeri. Referans: ENSG00000167244 giriş no'lu dizi.

IGF-2 gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan malzemelerin oranları aşağıdaki tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo IX. IGF-2 gen bölgesi PCR karışımı

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

PCR tepkime karışımı tablodaki miktarlara göre hazırlandı. Karışım PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan genomik DNA veya cDNA örneğinden 2.5 µl eklendi. Otomatik ısı döngü cihazında tablo 10’da belirtilen programa göre PCR tepkimesi uygulandı.

Tablo X. IGF-2 PCR programı

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

Çoğaltılan PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.4.5.7 IGF-2 Geni PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Değerlendirilmesi

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

3.4.5.8. IGF-2 Geni PCR Ürünlerinin *ApaI* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

ApaI, *Acetobacter pasteurianus*' un *ApaI* genini taşıyan *E. coli*'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı 5'-GGGCC↓C-3' dizisinden tanıyarak kesim yapar. PCR tepkimesi sonrası 292 bp'lik PCR ürünü *ApaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede guanin (G) içeren allel *ApaI* enzimi için kesim noktası içerir. Adenin (A) içeren allel ise ilgili enzim için kesim noktası taşımamaktadır. Guaninden adenine (G→A) bir nükleotit değişimi olması halinde *ApaI* enziminin tanıdığı bölge kaybolur ve kesim gerçekleşmez. Dolayısı ile enzim kesiminden sonra nükleotit değişimi olan (AA) bireylerde 292 bp'lik tek bant, her iki allelinde nükleotit değişimi taşımayan (GG) bireylerde 226 ve 65 bp'lik iki bant, heterozigot (GA) bireylerde ise 292, 226 ve 65 bp olmak üzere üç bant oluşur.

3.4.5.8.1 Deneýin Yapılışı

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

3.4.6 İstatistiksel Analiz Yöntemleri

İki gruptaki hastaları yaş, tiroid fonksiyon testleri, gen mutasyonları dışındaki trombofilik faktörleri, örnekleme günleri ve progesterone seviyelerini açısından karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. FV Leiden, MTHFR ve protrombin gen mutasyonları açısından fark olup olmadığını anlamak için ki-kare testi uygulanmıştır. Hasta ve kontrol grubu endometriyum dokularında izlenen IGF-2 ve H19 mRNA ifadenmesine ait veriler REST (2005 Beta V1.9.9) programı ile karşılaştırılmıştır. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

Açıklanamayan infertil gruptaki hastaların tümü primer infertil hastalardı. Bu gruptaki çiftlerin ortalama infertilite süresi 73.2 ± 53.2 ay (minimum: 18 ay; maksimum: 216 ay) olarak bulunmuştur. Tüm hastaların çalışma öncesi yapılmış histerosalpingografi mevcut olup, hepsi normal olarak değerlendirilmiştir. 15 hastadan 7'sine çalışmadan önce laparoskopi uygulanmıştı ve hiçbirinde patolojik bulgu tespit edilmemişti. 15 hastadan 2'sine çalışma öncesi histeroskopi yapılmıştı. Bu iki hastanın birine polipektomi yapılmış diğerinin endometrial kavitesi normal olarak değerlendirilmiştir. Onbeş hastanın eşlerine çalışma öncesi sperm analizi yapılmıştır. Buna göre, ortalama sperm sayısı 99.4 ± 95.1 milyon (minimum: 15 milyon; maksimum: 296 milyon) ve ortalama sperm motilitesi yüzde 56.3 ± 9.8 (minimum: %33; maksimum: %73) olarak bulunmuştur.

Bu hastalara ortalama $3.8 + 1.5$ (minimum: 3; maksimum: 8) intrauterin inseminasyon yapılmıştı. Hiçbir hastada klinik gebelik elde edilememiştir. Her hasta için yapılan toplam intrauterin inseminasyon sayısı ve intrauterin inseminasyon öncesi yapılan ovülasyon indüksiyonunda kullanılan ilaçlar tablo 11'de özetlenmiştir.

Tablo XI. İnfertil hastaların OI + IUI sikluslarının özeti

Hasta	IUI öncesi kullanılan ilaç	IUI sayısı
1	Puregon	3
2	Klomen + Puregon	8
3	Puregon	3
4	Puregon	4
5	Klomen + Gonal F	6
6	Puregon	3
7	Klomen + Gonal F	4
8	Klomen	3
9	Puregon	3
10	Gonal F	4
11	Gonal F	3
12	Puregon + Gonal F	4
13	Puregon + Gonal F	4
14	Klomen	3
15	Klomen + Puregon	3

Bunun yanı sıra fertilitesi bilinen 15 hastadan oluşan kontrol grubunda ortalama gravida 2.8 (minimum: 1; maksimum: 8) ve ortalama parite 2.3 (minimum: 1; maksimum: 4) olarak tespit edildi. Kontrol grubundaki hastaların hiçbirinin obstetrik öyküsünde spontan abortus, missed abortus ya da blighted ovum gibi başarısız implantasyon ve gebeliği düşündürecek bir bulgu yoktu. Açıklanamayan infertilite nedeniyle çalışmaya dahil edilen 15 hastanın yaş ortalaması 30.6 ± 5.5 iken kontrol grubunu oluşturan 15 hastanın yaş ortalaması 31.7 ± 4.0 olarak tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0.738$). Her iki gruptaki kadınlar sağlıklı bireyler arasından seçilmiş ve kronik hastalıkları olanlar çalışma dışı bırakılmıştır.

Bu çalışmada her iki grup tiroid fonksiyon testleri açısından da değerlendirildi. Açıklanamayan infertilite grubunda ortalama TSH değeri 1.9 ± 0.9 μ IU/ml iken kontrol grubunda 1.9 ± 0.7 μ IU/ml olarak bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.709$). Açıklanamayan infertilite grubunda ortalama serbest T3 değeri 2.6 ± 0.5 pg/ml iken kontrol grubunda 2.7 ± 0.5 pg/ml olarak bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.803$). Açıklanamayan infertilite grubunda ortalama serbest T4 değeri 1.1 ± 0.2 ng/dl iken kontrol grubunda 1.1 ± 0.3 ng/dl olarak bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.289$).

Ayrıca, her iki gruptaki hastaların trombofili panelleri de incelenmiştir. Her iki gruptaki hastalardan hiçbirinin antitrombin 3 seviyesi normal sınırların dışında değildi (normal sınırlar: % 80-120). Hasta grubunda ortalama antitrombin 3 değeri $\% 98.6 \pm 7.3$ iken kontrol grubunda ortalama antitrombin 3 değeri $\% 100.9 \pm 10.4$ olarak bulunmuştur ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.723$).

Açıklanamayan infertilite grubundan 4 hastanın, kontrol grubundan ise 3 hastanın protein C seviyeleri normalden düşük bulundu (normal sınırlar: % 70-130). Hasta grubunda ortalama protein C değeri 84.7 ± 24.9 (minimum: % 56; maksimum: % 128) iken kontrol grubunda ortalama protein C değeri 91.1 ± 31.4 (minimum: % 53; maksimum: % 132) olarak bulunmuştur ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (p=0.708).

Açıklanamayan infertilite grubundan 3 hastanın, kontrol grubundan ise 5 hastanın protein S seviyeleri normalden düşük bulundu (normal sınırlar: % 65-140). Hasta grubunda ortalama protein S değeri 91.3 ± 30.7 (minimum: % 45; maksimum: % 132) iken kontrol grubunda ortalama protein S değeri 86.5 ± 32.1 (minimum: % 45; maksimum: % 124) olarak bulunmuştur ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (p=0.693).

Açıklanamayan infertilite grubundan 3 hastanın, kontrol grubundan ise 4 hastanın aktive protein C rezistansı (APCR) seviyeleri normalden yüksek bulundu (normal değer: < % 0.86). Hasta grubunda ortalama APCR değeri 0.69 ± 0.17 (minimum: % 0.40; maksimum: % 0.90) iken kontrol grubunda ortalama APCR değeri 0.65 ± 0.22 (minimum: % 0.30; maksimum: % 0.98) olarak bulunmuştur ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (p=0.588).

Ayrıca, trombofili paneli kapsamında tüm hastaların faktör V Leiden mutasyonları, protrombin gen mutasyonları ve metilen tetrahidrofolat gen mutasyonları araştırılmıştır. Tüm hastaların sonuçları tablo 12'de özetlenmiştir.

Tablo XII. Trombofili paneli sonuçları

	FV Leiden	MTHFR C677T	MTHFR A1298C	Protrombin
Hasta 1	Normal	Normal	Normal	Normal
Hasta 2	Heterozigot	Heterozigot	Normal	Normal
Hasta 3	Heterozigot	Normal	Normal	Heterozigot
Hasta 4	Normal	Heterozigot	Normal	Heterozigot
Hasta 5	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
Hasta 6	Normal	Normal	Normal	Normal
Hasta 7	Normal	Normal	Heterozigot	Normal
Hasta 8	Normal	Normal	Normal	Normal
Hasta 9	Heterozigot	Normal	Normal	Normal
Hasta 10	Normal	Normal	Normal	Normal
Hasta 11	Normal	Normal	Normal	Heterozigot
Hasta 12	Heterozigot	Heterozigot	Normal	Normal
Hasta 13	Heterozigot	Normal	Normal	Normal
Hasta 14	Normal	Normal	Normal	Normal
Hasta 15	Normal	Normal	Heterozigot	Normal
Kontrol 1	Normal	Normal	Heterozigot	Normal
Kontrol 2	Normal	Normal	Normal	Normal
Kontrol 3	Normal	Normal	Normal	Normal
Kontrol 4	Normal	Normal	Normal	Heterozigot
Kontrol 5	Normal	Heterozigot	Heterozigot	Normal
Kontrol 6	Heterozigot	Heterozigot	Normal	Normal
Kontrol 7	Normal	Normal	Normal	Normal
Kontrol 8	Normal	Normal	Normal	Normal
Kontrol 9	Heterozigot	Normal	Heterozigot	Heterozigot
Kontrol 10	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
Kontrol 11	Normal	Normal	Normal	Normal
Kontrol 12	Normal	Normal	Normal	Normal
Kontrol 13	Normal	Normal	Normal	Normal
Kontrol 14	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
Kontrol 15	Heterozigot	Normal	Normal	Normal

Faktör 5 Leiden mutasyonu açısından değerlendirildiğinde, hasta grubunda %66.6 heterozigotluk varken kontrol grubunda %33.3 heterozigotluk bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.409$). MTHFR C677T mutasyonu her iki grupta da %26.7 oranında heterozigot olarak tespit edilmiştir. MTHFR A1298C mutasyonu açıklanamayan infertilite grubunda %13.3 heterozigot iken kontrol grubunda %20.0 heterozigot olarak bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.568$). Protrombin gen mutasyonu ise açıklanamayan infertilite grubunda %20.0 heterozigot iken kontrol grubunda %13.3 heterozigot olarak bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.568$).

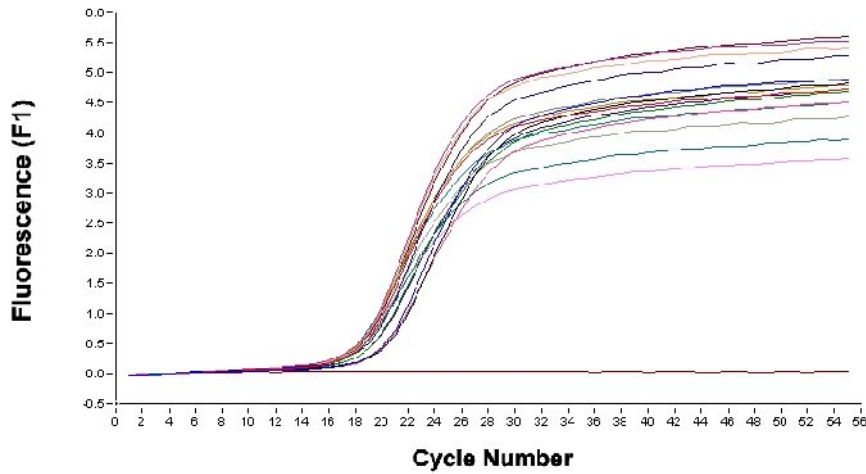
Endometrial örnekleme sonuçları tablo 13'te gösterilmiştir. Buna göre, açıklanamayan infertilite grubunda endometrial örnekleme yapılan günün ortalama değeri 21.8 ± 1.7 iken kontrol grubunda endometrial örnekleme yapılan günün ortalama değeri 21.5 ± 0.8 olarak tespit edilmiş ve bu açıdan iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p= 0.596$). Ayrıca her iki grup endometrial örnekleme yapılan günlerde bakılan serum progesteron seviyeleri açısından değerlendirildiğinde, açıklanamayan infertilite grubunda ortalama serum progesteron seviyesi 11.3 ± 6.3 ng/ml ve kontrol grubunda ortalama serum progesteron seviyesi 9.7 ± 3.5 ng/ml olarak bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.281$).

Tablo XIII. Serum progesteron ve endometrial gnleme sonuçları

	örneklemenin yapıldığı siklus günü	Serum progesteron seviyesi (ng/ml)	Noyes klasifikasyonuna göre endometrial gnleme sonucu
Hasta 1	21	8,60	erken sekretuar
Hasta 2	20	13,60	22.gün
Hasta 3	22	16,10	21.gün
Hasta 4	21	9,70	erken sekretuar
Hasta 5	21	13,60	17.gün
Hasta 6	21	13,60	proliferatif endometrium
Hasta 7	21	3,10	17.gün
Hasta 8	21	2,30	erken sekretuar
Hasta 9	21	13,70	19.gün
Hasta 10	25	8,80	23.gün
Hasta 11	24	10,00	26.gün
Hasta 12	21	27,50	17.gün
Hasta 13	26	2,30	26.gün
Hasta 14	21	12,80	21.gün
Hasta 15	21	13,20	18.gün
Kontrol 1	21	1,20	24.gün
Kontrol 2	22	12,50	17.gün
Kontrol 3	21	9,30	26.gün
Kontrol 4	22	9,00	interval
Kontrol 5	23	9,40	22.gün
Kontrol 6	22	5,70	25.gün
Kontrol 7	21	11,40	16.gün
Kontrol 8	23	11,50	22.gün
Kontrol 9	21	12,40	23.gün
Kontrol 10	20	10,90	erken sekretuar
Kontrol 11	22	12,80	23.gün
Kontrol 12	22	15,30	24.gün
Kontrol 13	21	10,30	22.gün
Kontrol 14	21	6,50	26.gün
Kontrol 15	21	7,20	23.gün

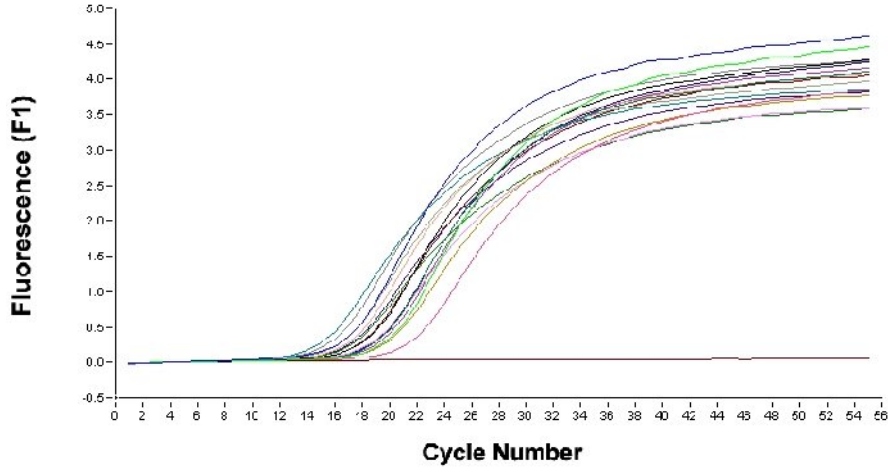
H19 ve IGF-2 genlerinin ifadenmesinin kantitatif değerlendirmesi için Light Cycler™ cihazı kullanıldı. H19 ve IGF-2 gen ifadenmelerini normalize etmek için hasta ve kontrol gruplarına ait her bir cDNA rneği, GAPDH genine zɡu primer ve UPL TaqMan probu kullanılarak çalışıldı.

H19 ve IGF-2 genlerinin normalize etmek için seçilen GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 9’da gösterilmiştir.



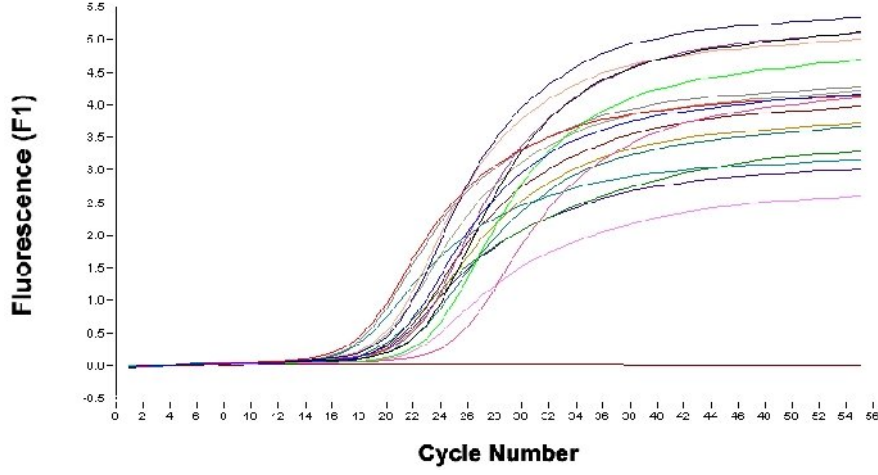
Şekil IX. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri; GAPDH geni Real Time PCR tepkimesine ait C_T (threshold cycle) değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyali izlenmektedir.

H19 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil X. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin H19 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri; H19 Real Time PCR tepkimesine ait C_T (treshhold cycle) değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyali izlenmektedir.

IGF-2 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil XI. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin IGF-2 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri; IGF-2 Real Time PCR tepkimesine ait C_T (treshhold cycle) değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresans sinyali izlenmektedir.

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



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

4.1. H-19 Geninin İfadenme Düzeyinin Değerlendirmesi

H19 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat daha az olduğu görüldü (ifadenme oranı= 0.237). Hasta grubundaki mRNA ifadenmesindeki bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0.0001$). H19 mRNA ifadenmesinin hasta ve kontrol grupları arasındaki istatistiksel değerlendirme tablo 14'te gösterilmiştir.

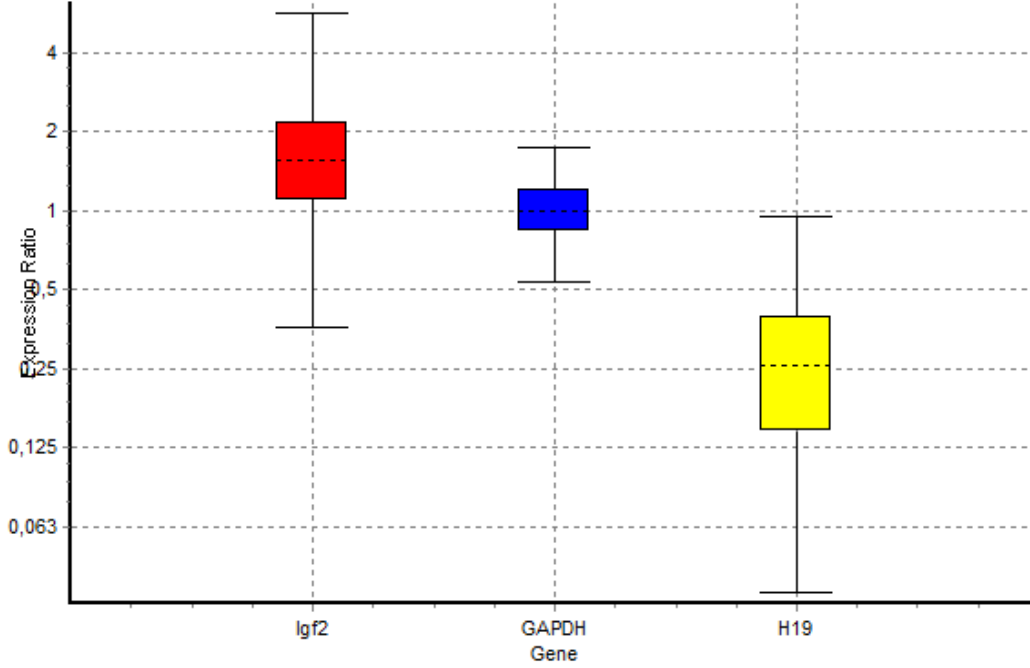
4.2. IGF-2 Geninin İfadenme Düzeyinin Değerlendirmesi

Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında IGF-2 mRNA ifadenmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p=0.015$). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hasta grubundaki IGF-2 mRNA ifadenmesinin yaklaşık 1.5 kat arttığı belirlendi (ifadenme oranı=1.557). IGF-2 mRNA ifadenmesinin hasta ve kontrol grupları arasındaki istatistiksel değerlendirme tablo 14'te gösterilmiştir.

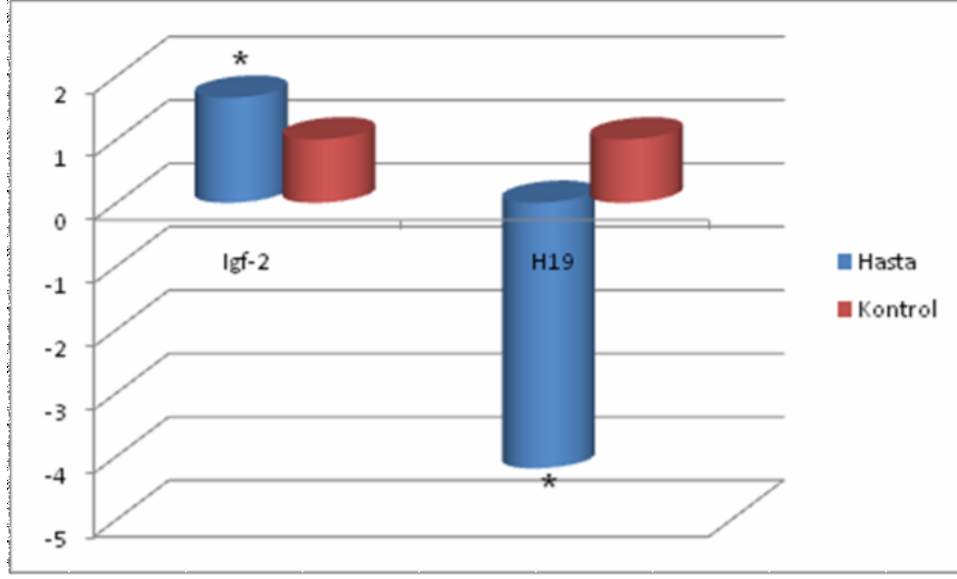
Tablo XIV. IGF-2 ve H19 mRNA ifadelenmelerinin hasta ve kontrol arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	Std. Hata	%95 GA	p değeri	Sonuç
		0.744	–		
GAPDH	1.000	1.377	0.602 - 1.607	1.000	
		0.894	–		İfadenme Düzeyinde
IGF-2	1.557	2.636	0.532- 4.337	0.015	Artma
		0.744	–		
GAPDH	1.000	1.377	0.602 –1.607	1.000	
		0.114	–		İfadenme Düzeyinde
H19	0.237	0.490	0.057- 0.681	0.0001	Azalma

Grafik 1’de GAPDH, H19 ve IGF-2 genlerinin Real time PCR sonuçlarının REST programıyla değerlendirilmesi sonucu elde edilen kutu grafiği gösterilmiştir. H19 ve IGF-2 genlerine ait mRNA ifadenmelerinde görülen artma ve azalma grafik 2’de gösterilmiştir.



Grafik I. H19 ve IGF-2 genlerine ait Real Time PCR sonuçlarının hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımının kutu grafiği (whisker box plot) ile gösterimi. Kutular çeyreklerarası aralığı gösterir. Kutunun ortasındaki çizgi ortanca, kutunun yukarısına veya aşağısına uzanan çizgiler sınır olarak bilinir. Üst sınırın sonunda en yüksek değer alt sınırın sonunda da en düşük değer gösterilmektedir.



Grafik II. H19 ve IGF-2 mRNA ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması

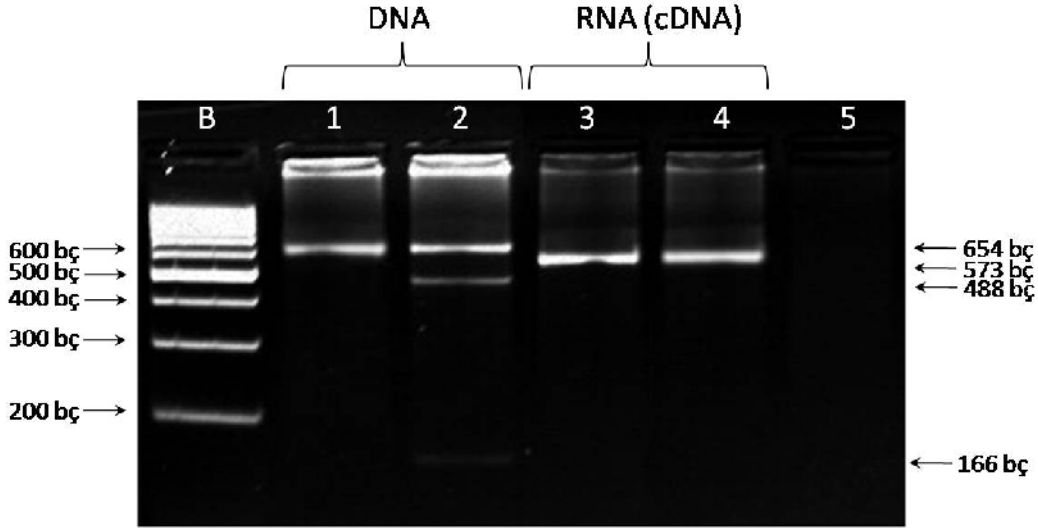
* Hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlam olduğunu göstermektedir.

H19 ve IGF-2 mRNA ifadenmelerinin normalizasyonları GAPDH genine göre yapılmıştır.

4.3. Endometriyumda H19 Geninin Allelik İfadenmesi

H19 geninin allelik ifadenmesinin belirlenmesi için 15 hasta ve 15 kontrolden alınan endometriyum dokularından genomik DNA elde edildi. rs2839704 polimorfizmini içeren H19 gen bölgesi özgül primerler kullanılarak çoğaltıldı. Bu polimorfizmin RFLP yöntemiyle belirlenmesinde *RsaI* restriksiyon enzimi kullanıldı. DNA'dan elde edilen sonuçlara göre H19 için 15 hastadan 8 tanesi, 15 kontrolden ise 7 tanesi informatif (heterozigot) bulundu. Bireylerin allelik ifadenmelerinin belirlenmesi için DNA sonucuna göre heterozigot olan bireylerin cDNA' sından aynı primerler ile H19 gen bölgesi çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri *RsaI* restriksiyon enzimi kullanılarak kesildi. DNA ve cDNA genotipi heterozigot olan örnekler biallelik, DNA genotipi heterozigot, cDNA genotipi homozigot olan örnekler ise monoallelik olarak kabul edildi. DNA ve cDNA' dan elde edilen sonuçlara göre H19 açısından informatif olan 8 hastanın ve 7 kontrolün hepsinin monoallelik ifadelendikleri

belirlendi. H19 geninin allelik ifadenmesini gösteren agaroz jel fotoğrafı şekil 12’de gösterilmiştir. Hastaların ve kontrollerin H19 genine ait allelik ifadenmeleri Tablo 15’te gösterilmiştir.



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

B: 100 bç’ lik ağırlık belirteci,

1. kuyu; DNA’ dan yapılan PCR ürünü

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

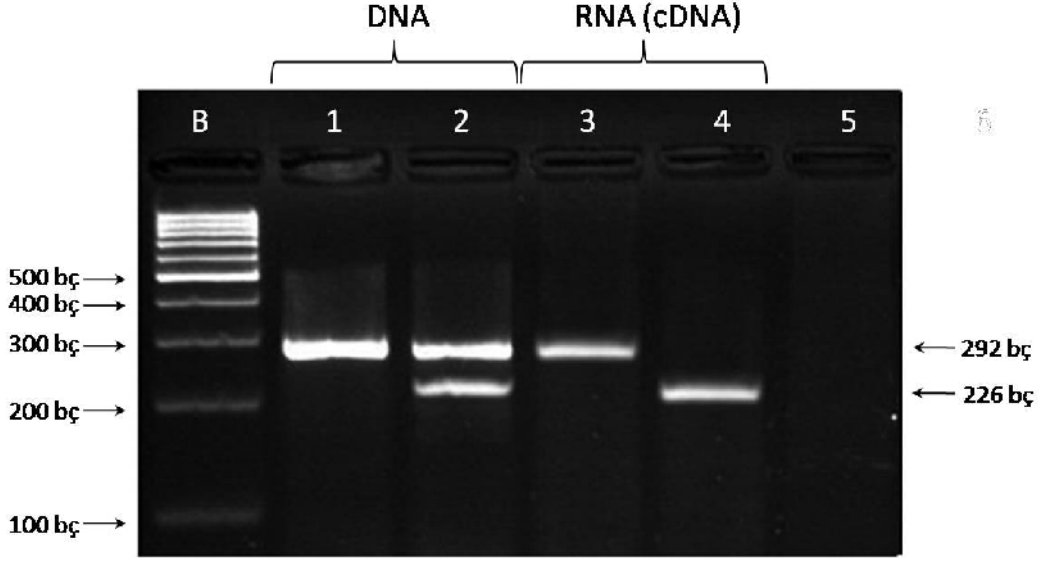
3. kuyu; cDNA’ dan yapılan PCR ürünü

4. kuyu; cDNA’ dan elde edilen PCR ürününden monoallelik ifadenmenin gösterildiği *RsaI* restriksiyon enzimi kesim sonucu

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

4.4. Endometriumda IGF-2 geninin Allelik İfadelenmesi

IGF-2 geninin allelik ifadelenmesini göstermek için 15 hasta 15 kontrol olmak üzere toplam 30 endometrium dokusundan genomik DNA elde edildi. Uygun primerler ile çoğaltılan IGF-2 gen bölgesinde yer alan rs680 polimorfizmi RFLP yöntemiyle belirlendi. Bu polimorfizmin belirlenmesinde *ApaI* restriksiyon enzimi kullanıldı. DNA' dan elde edilen sonuçlara göre IGF-2 için 15 hastadan 7 tanesi informatif (heterozigot) iken, 15 kontrolden 6 tanesi informatif bulundu. Bireylerin allelik ifadelenmelerinin belirlenmesi için DNA sonucuna göre heterozigot olan bireylerin cDNA'sından aynı primerler ile IGF-2 gen bölgesi çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri *ApaI* restriksiyon enzimi ile kesildi ve rs680 polimorfizmini içeren örnekler belirlendi. DNA ve cDNA genotipi heterozigot olan örnekler biallelik, DNA genotipi heterozigot, cDNA genotipi homozigot olan örnekler ise monoallelik olarak kabul edildi. DNA ve cDNA' dan elde edilen sonuçlara göre IGF-2 açısından informatif olan 7 hastanın ve 6 kontrolün hepsinin monoallelik ifadelenmiş oldukları belirlendi. IGF-2 geninin Allelik ifadelenmesini gösteren agaroz jel fotoğrafı Şekil 13'te gösterilmiştir. Hastaların ve kontrollerin IGF-2 genine ait allelik ifadelenmeleri Tablo 15'te gösterilmiştir.



Şekil XIII. IGF-2 geni rs680 polimorfizmini içeren bölgenin DNA ve cDNA'dan elde edilen PCR ürünlerini ve *ApaI* restriksiyon enzimi ile kesimini gösteren agaroz jel fotoğrafı

B: 100 bç' lik ağırlık belirteci,

1. kuyu; DNA' dan yapılan PCR ürünü

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

3. kuyu; cDNA' dan yapılan PCR ürünü

4. kuyu; cDNA' dan elde edilen PCR ürününden monoallelik ifadenmenin gösterildiği *ApaI* restriksiyon enzimi kesim sonucu

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

Tablo XV. H19 ve IGF-2 genlerinin allelik ifadelenmeleri

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

5. TARTIŞMA

İmplantasyon, blastokistin maternal endometrial yüzeye bağlanarak plasentayı oluşturması ve bu yolla büyüyen fetüs ile maternal sirkülasyon arasında iletişim kurulması olarak tanımlanmıştır (1,2). Fetüs ile anne arasındaki bu interaksiyon son derece kompleks olup çok çeşitli moleküllerin ve genlerin katılımını içermektedir. Appozisyon, adezyon ve invazyonda rol alan moleküller ve genler uzun bir liste oluşturmaktadırlar. Endometrium, implantasyonla ilişkili olduğu bilinen en az 3 sitokin sentezlemektedir: colony-stimulating factor-1 (CSF-1), leukemia-inhibitory factor (LIF) ve interleukin-1 (IL-1) (10). Ayrıca, implantasyonun adezyon basamağında “cell adhesion molecule (CAM) family” olarak adlandırılan ve integrin, selektin, cadherin ve immunoglobulin olmak üzere 4 büyük alt gruptan oluşan bir gen ailesi rol almaktadır. Bu moleküller hücre-hücreye adezyonun gerçekleşmesini sağlamaktadırlar (13). Tüm bu moleküllerin yanında, insan blastokistinin endometriuma implantasyonunda, prostaglandinler, tromboksanlar, büyüme faktörleri gibi çok çeşitli moleküller rol alır.

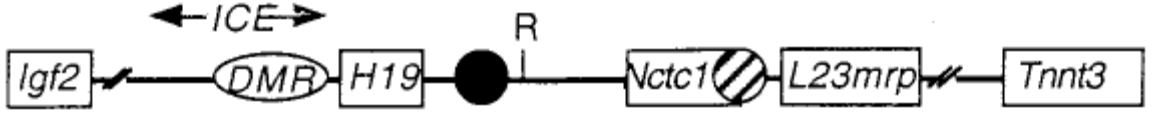
Bu kadar karmaşık mekanizmaları ve molekülleri içeren implantasyon olayında rol alan genlerin bir kısmının imprint (damgalanmış) gen olması şaşırtıcı olmayacaktır. Bugün için ortaya koyulan ve yaklaşık yüz kadar olduğu düşünülen damgalanmış genlerin hemen tümü implantasyon, plasentasyon ve embriyofetal gelişim için gereklidir ve normal gelişim için uygun dozlarda ve uygun zamanlarda aktivasyonları önemlidir. H19 ve IGF2 üzerinde en çok çalışılmış, önemi çeşitli çalışmalarda ortaya konmuş damgalanmış genlerden ikisidir. Ancak bu genlerin implantasyondaki olası rollerini araştıran herhangi bir çalışma bugüne kadar literatürde bildirilmemiştir. Endometriumda, bu genlerin ekspresyonu ile ilgili olarak tüm literatürde yalnız 2 çalışma mevcuttur. Ariel I ve ark. (3) 1997 yılında yaptıkları

çalışmada damgalanmış H19 ve IGF-2 genlerinin endometriumdaki ekspresyonlarını ve bu ekspresyonların menstrüel siklusla birlikte değişimini incelemişlerdir. Buna göre, proliferatif fazda endometriumdaki stromal hücrelerde orta derecede H19 ekspresyonu olduğu bulunmuştur (fetal endometriumdaki H19 ekspresyonundan biraz daha az). Ekspresyonu ovülasyonla birlikte hemen düşmekte ve erken sekretuar fazda oldukça düşük seyretmektedir. Daha sonra H19 ekspresyonu giderek artmakta ve siklusun 21. gününde oldukça yüksek seviyelere ulaştıktan sonra hafif artışla siklusun sonunda en yüksek değerine ulaşmaktadır. Aynı çalışmada, IGF-2 ekspresyonunun da endometriumdaki izlendiğini ve menstrüel siklusun dönemleriyle değiştiğini göstermiştir (3). Proliferatif faz ve erken sekretuar dönemde çok düşük seviyelerde bulunan IGF-2 ekspresyonu geç sekretuar fazda yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Bu yönüyle H19'a benzer şekilde eksprese olan IGF-2, H19'dan farklı olarak yalnız stromal hücrelerden değil aynı zamanda glandüler epitelden de eksprese edilir. H19 ve IGF-2 genlerinin endometriumdaki implantasyonu ile ilgili literatürdeki ikinci çalışma Tanos V. ve ark tarafından yapılmıştır (39). Bu çalışmada, H19 ekspresyonu hem epitelde hem de stromada incelenmiştir. Normal epitelde H19 ekspresyonu yokken, hiperplastik endometrium epitelinde %15 ve neoplastik endometrium epitelinde %60 oranında eksprese edildiği tespit edilmiştir. Stromadaki H19 ekspresyonu incelendiğinde ise normal endometriumdaki %75, hiperplastik endometriumdaki %55 ve neoplastik endometriumdaki %37 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla, epiteldeki H19 ekspresyonunun differensiasyonla ilişkili olabileceği ve H19 ekspresyonunun endometrium kanserinde ek bir histopatolojik ve prognostik belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (39). Literatürde bu iki çalışma dışında, H19 ve IGF-2 damgalanmış genlerinin endometriumdaki ekspresyonlarıyla ilgili başka çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan bizim çalışmamız, damgalanmış genlerin implantasyondaki fonksiyonlarıyla ilgili olarak yapılmış literatürdeki ilk ve tek çalışmadır.

H19 geni insanda gösterilen ilk imprint (damgalanmış) genlerden biridir ve maternal alelden eksprese edilir (35). Bu gen damgalanmış genlerin özel bir alt grubuna üyedir ve translasyona uğramayan RNA sentezi yapar (30). İlk kez Pachnis ve arkadaşları tarafından 24 yıl önce bulunmasına rağmen halen fonksiyonu tam olarak anlayamamıştır (32). H19 üzerinde yapılan ilk çalışmalar insan plasentasında ve bazı embryonik dokularda yoğun şekilde eksprese olduğunu göstermiştir (29). Daha yakın zamanda yapılan çalışmalar ise, H19 geninin, birkaç sekans uzağındaki bir kontrol bölgesi ve “CCCTC binding factor” aracılığıyla IGF-2 geninin ekspresyonunu düzenlediğini ortaya koymuştur (40,41). H19’un aynı zamanda bir tümör süpresör gen olduğu düşünülmektedir. Normalde damgalanmış olan ve yalnızca maternal ekspresyonu olan H19’un damgalanma kusuruyla ortaya çıkan ve 11p15.5 geninin heterozigotluk kaybına yol açan durumlarda Wilm’s tümörü, embryonel rabdomyosarkom ve Beckwith-Wiedemann gibi kansere yatkınlık yaratan sendromlar görülebilmektedir (42,43).

IGF-2 ise H19 genine yakın lokalizasyonda bulunan, bu genle paralel çalışan ancak resiprokal damgalanmış bir gendir (25). Şekil 14, bu iki gen lokusunun ilişkisini göstermektedir. H19 geni kromozom üstündeki damgalanmış genlerin sınırını oluşturur ve H19’dan hemen sonra gelen ilk genler NcTc1 ve L23mrp iyi bilinen ve bialelik ekspresyonu olan iki gendir (44,45).

Şekil XIV. H19 ve IGF-2 genlerinin komşuluğu



Hem H19 hem de IGF-2 fetal ve erken postnatal hayatta yüksek miktarda eksprese olurlar. Yakın komşulukları ve örtüşen ekspresyon paternleri dolayısıyla iki genin ortak transkripsiyon regülatöre sahip oldukları düşünülmektedir. H19'un paternal alelinin susturulması ve IGF-2'nin maternal alelinin susturulması ortak bir cis-acting elemana bağlıdır (H19ICE) ve H19 lokusundan biraz yukarıda bulunmaktadır (46,47). H19ICE bölgesindeki mutasyonlar aynı anda hem inaktif paternal H19 alelinin hem de inaktif IGF-2 maternal alelinin aktivasyonuna neden olmaktadır (48).

H19ICE (imprinting control region) lokusunun içinde, ve H19 gen lokusunun hemen komşuluğunda bulunan DMR (differentially methylated region) geninin temel görevi IGF-2 sentezini uyaran promoter ürünlerin yapımını baskılamaktır ve IGF-2 sentezini baskılayan faktörlerin üretimini artırmaktır. DMR geni paternal ve maternal kromozomlarda farklı olarak metillenir. DMR, paternal kromozomda, gelişimin tüm aşamalarında hipermetile durumdadır ve fonksiyon yapmaz. Böylece IGF-2 sentezini uyuracak promoter ürünlerin sentezi baskılanmaz ve baskılayıcı faktörler sentezlenmez ve paternal kromozomdan IGF-2 bol miktarda eksprese olur (46,49). Aynı zamanda, paternal kromozomdaki metillenmiş DMR, H19 sentezini de baskılar.

Metillenmemiş maternal kromozom üzerinde ise DMR aktiftir ve IGF-2 sentezini baskılar. CTCF (CCCTC-binding factor) iyi bilinen bir IGF-2 baskılayıcıdır ve DMR lokusunun içinde CpG içeren sekanslarla ilişkiye girerek fonksiyon görür (50,51). Maternal kromozom üzerindeki metillenmemiş, boş DMR bölgesine bağlanan CTCF IGF-2 sentezinin baskılanmasını sağlar ve aynı zamanda H19 sentezini tetikler. Eğer her iki aleldeki DMR metillenmezse, her iki alelden H19 sentezi artarken IGF-2 sentezi duracaktır. Bunun tersi bir durumda, yani her iki aleldeki DMR metillenmişse o zaman CTCF bağlanamayacak ve H19 baskılanırken IGF-2 sentezi fazla miktarda olacaktır ki, bu durum klinikte Wilms tümörü gibi neoplastik durumlarla ortaya çıkmaktadır (52,53). Bazı durumlarda ise DMR bölgesi inkomplet metillenebilmekte ve dolayısıyla parsiyel CTCF bağlanmasıyla birlikte H19/IGF-2 ekspresyonu beklenmedik farklı şekillerde ortaya çıkabilmektedir (54).

H19 ve IGF-2 implantasyon, plasentasyon ve embriyofetal gelişim için gereklidir, ve normal gelişim için uygun dozlarda ve uygun zamanlarda aktivasyonları önemlidir. Postnatal hayatta ekspresyonları dokularda giderek azalan bu iki genin endometriumda tüm yaşam boyu ekspresyonlarının devam etmesi ve menstrüel siklusun fazlarıyla birlikte değişkenlik göstermesi (3) bu genlerin implantasyonun embryo-fetal kısmında olduğu kadar endometrium kısmında da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezi test etmek için planladığımız bu çalışmada en az üç intrauterin inseminasyona rağmen klinik gebelik elde edilememiş primer infertil hastalarla fertilitelerini kanıtlamış hastalardan alınan endometrial örneklerden çalışılan H19 ve IGF-2 seviyeleri karşılaştırılmıştır. Her iki grup öncelikle implantasyonu etkileyebilecek diğer parametreler açısından karşılaştırılmıştır. İki grup hasta yaşı, tiroid fonksiyon testleri ve trombofili panelleri açısından benzer bulunmuştur. Her iki grup örnekleme yapıldığı gün açısından da benzer bulunmuştur. Bu noktada, çalışma dahilinde tüm örnekleme implantasyon penceresini içine alacak şekilde IGF-2 ve H19'un en çok

eksprese oldukları geç sekretuar fazda yapılmasına özen gösterilmiştir. Hastaların ovulatuar olduklarından ve örneklemelerin geç luteal faza denk geldiğinden emin olmak için örnekleme günü hastaların serum progesteron seviyelerine bakılmış aynı zamanda alınan örneklerin Noyes klasifikasyonuna göre endometrial günlemelerinin yapılabilmesi için mikroskopik inceleme için Patoloji departmanına gönderilmiştir. Bu açılardan da iki grup arasında fark izlenmemiştir.

Bu çalışmada araştırılan temel parametre infertil gruptaki hastaların endometriumundaki H19 ve IGF-2 ekspresyonunun fertil gruptan farklı olup olmadığıdır. Diğer bir deyişle, infertil hastaların endometriumundaki H19 ve IGF-2 ekspresyonundaki bir anormalliğin bu hastalardaki implantasyon kusurunu açıklayıp açıklayamayacağı araştırıldı. H19 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat daha az olduğu görüldü (ifadenme oranı= 0.237). Hasta grubundaki mRNA ifadenmesindeki bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0.0001$). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hasta grubundaki IGF-2 mRNA ifadenmesinin yaklaşık 1.5 kat arttığı belirlendi (ifadenme oranı=1.557). Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında IGF-2 mRNA ifadenmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p=0.015$). IGF-2 gen ürününün endometriumda proliferasyon yaptığı ve H19 geninin IGF-2 ekspresyonunu kontrol ettiği bilgileri göz önüne alındığında bu genlerin farklı miktarlardaki ekspresyonlarının endometriumun uygun proliferasyonunu bozarak implantasyon kusuruna yol açması beklenebilir.

VI. SONUÇ

Biz bu çalışmada, maternal eksprese olan H19'un açıklanamayan infertil grupta kontrol grubuna göre ekspresyonunun belirgin olarak daha düşük ve paternal eksprese olan IGF-2'nin açıklanamayan infertil grupta kontrol grubuna göre ekspresyonunun belirgin olarak daha yüksek olduğunu tespit ettik. İmplantasyon için önemli olan bu iki genin ekspresyonlarının infertil grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olması bu hastaların infertilitelelerinin zemininde yatan olası bir genetik temeli düşündürmektedir.

VII. ÖZET

İmplantasyon, embryo ile endometrium arasındaki kompleks ve sofistike ilişkinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu ilişkiyi etkileyen hücresel mekanizmalar çok çeşitlidir. Bir çok molekülün rol oynadığı implantasyon olayını çok sayıda gen kontrol etmektedir. İmprint (damgalanmış) genler, implantasyonda önemli rol oynadıkları düşünülen genlerdir. H19 ve IGF-2 üzerinde en çok çalışılmış, önemi çeşitli çalışmalarda ortaya konmuş damgalanmış genlerden ikisidir. H19 ve IGF-2 genlerinin postnatal hayatta birçok dokuda ekspresyonlarının azalıp kaybolma noktasına gelirken endometriumda belirgin derecede eksprese edilmeleri ve özellikle de ekspresyonlarının menstrüel siklusun fazlarıyla uyumlu olarak değişmesi ve geç sekretuar dönemde zirve yapması bu genlerin implantasyonda görev alabileceklerini düşündürmektedir. Siklusun 21. günüyle siklusun sonu arasında en üst düzeyde eksprese edilen H19 ve IGF-2'nin implantasyonun embryo tarafında önemli rolü olduğu zaten bilinirken, endometrium tarafındaki fonksiyonları araştırılmamıştır.

Bu noktadan yola çıkarak, bu çalışmada, açıklanamayan infertilitesi olup daha önce en az 3 başarısız intrauterin inseminasyonu olan hastalardan siklusun geç sekretuar döneminde alınan endometrial biopsilerdeki IGF-2 ve H19 ekspresyonunun, fertilité sorunu olmayan kadınlardan siklusun geç sekretuar döneminde alınan endometrial biopsilerdeki IGF-2 ve H19 ekspresyonuyla karşılaştırılması amaçlanmıştır. İmprint (damgalanmış) genlerin ekspresyonlarının açıklanamayan infertil grupta fertil grupta farklı olup olmadığını araştırmaya yönelik bir çalışma bugüne kadar yapılmamıştır. Literatürde, bu konuyla ilgili yapılmış olan bu ilk çalışmada biz, elde edilen sonuçların “açıklanamayan infertilite”si olan hastaların infertilitesini açıklama çabalarına yeni bir bakış açısı getirmesini ve üzerinde çok az çalışılmış bu alanda yeni gelişmeleri tetiklemesini amaçladık.

H19 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat daha az olduğu görüldü (ifadenme oranı= 0.237). Hasta grubundaki mRNA ifadenmesindeki bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (p=0.0001). Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında IGF-2 mRNA ifadenmesinde de istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi (p=0.015). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hasta grubundaki IGF-2 mRNA ifadenmesinin yaklaşık 1.5 kat arttığı belirlendi (ifadenme oranı=1.557).

Biz bu çalışmada, maternal eksprese olan H19'un açıklanamayan infertil grupta kontrol grubuna göre ekspresyonunun belirgin olarak daha düşük ve paternal eksprese olan IGF-2'nin açıklanamayan infertil grupta kontrol grubuna göre ekspresyonunun belirgin olarak daha yüksek olduğunu tespit ettik. İmplantasyon için önemli olan bu iki genin ekspresyonlarının infertil grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olması bu hastaların infertilitelerinin zemininde yatan olası bir genetik temeli düşündürmektedir.

VIII. SUMMARY

Implantation is a result of the complicated and sophisticated interaction between the human embryo and the uterine endometrium. Diverse cellular mechanisms interfere with this interaction. These various mechanisms are governed by different genes. Imprinted genes are thought to play an important role in implantation. H19 and IGF-2 are two imprinted genes which have been extensively studied. These genes are thought to take place during implantation as they remain to be expressed in uterine endometrium although their expression is scanty in most tissues during postnatal life and their expression is strictly dependent on the menstrual cycle and peaks during the time period of luteal phase consistent with the “implantation window”. Besides, these genes have been previously shown to be important for the fetal part of the implantation. However, their importance for the endometrial part of the implantation has not been researched in the literature up to now.

Based upon this finding, this study aimed to compare expressions of H19 and IGF-2 in endometrial tissue of women with unexplained infertility and in endometrial tissue of women with no fertility problem. A study comparing endometrial expressions of H19 and IGF-2 in women with unexplained infertility and in women with no fertility problem has not been performed till now. In this first study, we aimed to bring a new sight to the underlying factors of unexplained infertility and to trigger new developments in this field.

mRNA expression of the gene H19 was 4 times less among women with unexplained infertility as compared to the women with no fertility problem (rate of expression=0.237). This decrease in mRNA expression in the group of women with unexplained infertility was found to be statistically significant ($p=0.0001$). Comparison of both groups with regard to the expression of IGF-2 also revealed a statistically significant difference ($p=0.015$). mRNA expression of IGF-2 was 1.5 times more in the group with unexplained infertility as compared with the control group.

This study demonstrated a significantly less expression of maternally expressed H19 and a significantly more expression of paternally expressed IGF-2 in women with unexplained infertility as compared with the control group. This significant difference in the expression of these two imprinted genes important for the implantation between women with unexplained infertility and women with no fertility problem pointed to a possible genetic basis for unexplained infertility.

IX. KAYNAKLAR

1. Denker HW. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool* 1993; 266: 541–58.
2. Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 757–64.
3. Ariel I, Weinstein D, Voutilainen R, et al. Genomic imprinting and the endometrial cycle. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6(1): 17-25.
4. Ghafourian Boroujerdnia M, Ghalambor Dezfuly F, Emad Mosthophy N, Chinipardaz R. Expression of VLA1, VLA2 and VLA3 Integrin Molecules in Uterine Endometrium of Infertile Women with Unexplained Aetiology in Ahwaz-Iran. *Iran J Immunol* 2006; 3(4): 157-63.
5. Klentzeris LD, Bulmer JN, Trejdosiewicz LK, Morrison L, Cooke ID. Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Hum Reprod* 1993; 8(8): 1223-30.
6. Dimitriadis E, Sharkey AM, Tan YL, Salamonsen LA, Sherwin JR. Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 29(5): 44.

7. Croxatto HB, Ortiz ME, Diaz S, Hess R, Balmaceda J, Croxatto HD. Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol* 1978;132:629–34.
8. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992; 58: 537–42.
9. Enders AC, Schlafke S, Hendrickx AG. Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey. *Am J Anat* 1986;177: 161–85.
10. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, Frances A, Velasco JG, Remohi J, Polan ML, Pellicer A. Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 405.
11. Pollard JW, Hunt JS, Wiktor-Jedrzejczak W, Stanley ER. A pregnancy defect in the osteopetrotic mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev Biol* 1991; 148: 273.
12. Stewart CL, Kapsar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of LIF. *Nature* 1992; 76: 359.
13. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 307.

14. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994; 62: 497.
15. Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the Mouse embryo. *Development* 1993; 119: 1975.
16. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD and Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal–fetal interface. *Science* 2003; 299: 405–8.
17. Riethmacher D, Brinkmann V and Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 855–9.
18. de-Groot N, Hochberg A. Gene imprinting during placental and embryonic development. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 390-406.
19. Surani MA. Genomic imprinting: developmental significance and molecular mechanism. *Curr Opin Genet Dev* 1991; 1: 241-6.
20. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089-1093.

21. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000; 403: 501-2.
22. Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update* 2004; 10(1): 3-18
23. Rachmilewitz J, Goshen R, Ariel I, Schneider T, de-Groot N, Hochberg A. Parental imprinting of the human H19 gene. *FEBS Lett* 1992; 309: 25-8.
24. Zhang Y, Tycko B. Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nature Genet* 1992; 1: 40-4.
25. Zemel S, Bartolomei MS, Tilghman SM. Physical linkage of the mammalian imprinted genes. H19 and the insulin-like growth factor 2. *Nature Genet* 1992; 2: 61-5.
26. Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 1993; 362: 747-9.
27. Bartolomei MS, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse chromosome 7. *Semin Dev Biol* 1992; 3: 107-17.
28. Leighton PA, Ingram RS, Eggenschwiler J, Efstratiadis A, Tilghman SM. Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 region in mice. *Nature* 1995; 375: 34-9.

29. Goshen R, Rachmilewitz J, Schneider T, et al. The expression of the human H19 and IGF-2 genes during human embryogenesis and placental development. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 374-9.
30. Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 28-36.
31. Lustig O, Ariel I, Ilan J, Lev-Lehman E, de-Groot N, Hochberg A. Expression of the imprinted H19 gene in the human fetus. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 239-46.
32. Pachnis V, Belayew A, Tilghman SM. Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 84: 5523-7.
33. Ariel I, Lustig O, Schneider T, et al. The imprinted H19 as a tumor marker in bladder carcinoma. *Urology* 1995; 45: 335-8.
34. Biran H, Ariel I, de-Groot N, Shani A, Hochberg A. Human imprinted genes as oncodevelopmental markers. *Tumor Biol* 1994; 15: 123-34.
35. Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 1991;351:153-5.
36. Noyes RW, Hertig A, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3-25.

37. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod* 2006; 21(10): 2694-8.
38. Poppe K, Glinoeer D, Tournaye H, Devroey P, van Steirteghem A, Kaufman L, Velkeniers B. Assisted reproduction and thyroid autoimmunity: an unfortunate combination? *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(9): 4149-52.
39. Tanos V, Ariel I, Prus D, de-Groot N, Hochberg A. H19 and IGF-2 expression in human normal, hyperplastic and malignant endometrium. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 521-5.
40. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 2000;405:482–5.
41. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer- blocking activity at the H19/*Igf2* locus. *Nature* 2000;405: 486–9.
42. Hao Y, Cernshaw T, Moulton T, Newcomb E, Tycko B. Tumor suppressor activity of H19 RNA. *Nature* 1993;365:764–7.
43. Scrabble HJ, Sapienza C, CaveneeWK. Genetic and epigenetic losses of heterozygosity in cancer predisposition and progression. *Adv Cancer Res* 1990;54:25–62.

44. Ishihara K, Kato R, Furuumi H, Zubair M, Sasaki H. Sequence of a 42-kb mouse region containing the imprinted H19 locus: identification of a novel muscle-specific transcription unit showing biallelic expression. *Mamm Genome* 1998; 9: 775–7.
45. Zubair M, Hilton K, Saam J, Surani M, Tilghman S, Sasaki H. Structure and expression of the mouse L23mrp gene downstream of the imprinted H19 gene: biallelic expression and lack of interaction with H19 enhancers. *Genomics* 1997; 45: 290–6.
46. Kaffer CR, Srivastava M, Park K, Ives E, Hsieh E, Battle J, Grinberg A, Huang SP, Pfeifer K. A transcriptional insulator at the imprinted H19/Igf2 Locus. *Genes Dev* 2000; 14:1908–19
47. Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev* 1998; 12: 3693–702.
48. Srivastava M, Hsieh S, Grinberg A, Williams-Simon L, Huang SP, Pfeifer K. H19 and Igf2 monoallelic expression is regulated in two distinct ways by a shared cis acting element. *Genes Dev* 2000; 14:1186–95.
49. Brenton JD, Drewell RA, Viville S, Hilton KJ, Barton SC, Ainscough JF, Surani MA. A silencer element identified in *Drosophila* is required for imprinting of H19 reporter transgenes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 9242–7.

50. Kanduri C, Pant V, Loukinov D, Pugacheva E, Qi C, Wolffe A, Ohlsson R, Lobanenko V. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent-of-origin specific and methylation-sensitive. *Curr Biol* 2000; 10: 853–6.
51. Szabo P, Tang S, Rentsendorj A, Pfeifer G, Mann JR. Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol* 2000; 10: 607–10.
52. Moulton T, Crenshaw T, Hao Y, Moosikasuwan J, Lin N, Dembitzer F, Hensle T, Weiss L, McMorro L, Loew T, et al. Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients. *Nat Genet* 1994; 7: 440-7.
53. Taniguchi T, Sullivan MJ, Ogawa O, Reeve AE. Epigenetic changes encompassing the IGF2/H19 locus associated with relaxation of IGF2 imprinting and silencing of H19 in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2159-63.
54. Ulaner GA, Yang Y, Hu JF, Li T, Vu TH, Hoffman AR. CTCF binding at the IGF2/H19 imprinting control region is insufficient to regulate IGF2/H19 expression in human tissues. *Endocrinology* 2003; 144 (10): 4420-6.

