

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEBEBİ ANLAŞILAMAYAN TEKRARLAYAN GEBELİK
KAYIPLARINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES
PROTEİNLERİNİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Farida XXX (QULİYEVA)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEBEBİ ANLAŞILAMAYAN TEKRARLAYAN GEBELİK
KAYIPLARINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES
PROTEİNLERİNİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Farida XXX (QULİYEVA)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Necdet DEMİR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-3483 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

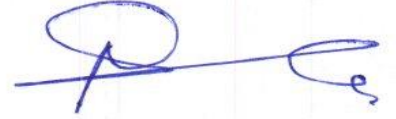
2020-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼đ¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 31 Ocak 2020

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Mehmet şimşek
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Aylin Yaba UÇAR
Yeditepe Üniversitesi



Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri üyeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarihi ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Farida XXX (QULIYEVA)

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Necdet DEMİR

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince tez konumun belirlenmesinde, bilimsel ve kişisel gelişmemde, bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yardımcı olan, yönlendiren, saygı değer danışmanım ve hocam Prof. Dr. Necdet DEMİR'e ve sayın hocam Dr. Esma KIRIMLIOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi bildiriyorum.

Bu günlere gelmemde her zaman yanımda olan, hiç bir zaman destek ve sevgilerini esirgemeyen, her zaman tüm zorlukları aşmamda destekçim olan canım babam Salih QULIYEV'e, benden sevgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili annem Kamale QULIYEVA ve kardeşim Pervin QULUZADE'ye sonsuz minnetarım.

Yüksek lisans eğitim sürecimde değerli desteklerinden dolayı Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer hocalarına, çalışanlarına ve çalışma arkadaşlarıma yaptıkları katkılar için teşekkür ederim.

Yardımları ile ihtiyacım olan her anımda yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli personeline sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK) gebeliklerin%2-5'ini etkileyen sitogenetik anormalliklerdir. ER stresi (ERS), çeşitli koşullar altında yanlış katlanmış proteinlerin birikmesiyle oluşmaktadır. ERS proteinlerinin gebelik ve TGK sırasında desidua ve koryon villusta ekspresyon seviyeleri bilinmemektedir. ERS proteinlerinin Açıklanamayan TGK (ATGK)'deki rolü hakkında literatür bilgisi yoktu. "ATGK'de, ERS proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin normal gebeliklere göre koryonik villus ve desiduada farklı olduğu hipotezini oluşturduk. ATGK'lı hasta desidua ve koryon villus örneklerinde, ERS proteinleri GRP78 ve CHOP'un protein düzeyinde lokalizasyonlarını ve ekspresyonlarını belirlemeyi ve normal gebelik durumu ile karşılaştırarak hastalığın etiolojisi hakkında fikir sahibi olmayı amaçladık.

Yöntem: Kontrol endometriyum (KE) (n = 6), isteğe bağlı sonlandırılmış gebelik (İSG) (n = 6) ve ATGK (n = 6) olarak üç grup oluşturuldu. Gebelik gruplarının desidua ve koryon alanları stereomikroskop ile ayrıldı. Doku takibinden sonra 5 mikronluk kesitler alındı. HE ile morfolojisi ve immünohistokimya ile GRP78 ve CHOP proteinlerinin lokalizasyonları değerlendirildi.

Bulgular : CHOP ekspresyonu ATGK'nin maternal bölümünde KE'ye göre yüksekti. Stromal hücrelerde GRP78 ekspresyonu, ATGK grubunda KE grubuna göre yüksekti. ATGK'deki desidual hücrelerde de şiddetli CHOP nükleer boyanması gözlenmiştir. İSG ve ATGK koryonunun sitotrophoblast ve sinsisyotrofoblastlarında sitoplazmik ve nükleer GRP78 ve CHOP boyanması gözlenmiştir.

Tartışma: İmmünohistokimyasal değerlendirmemizde gebeliğin, maternal ve fetal hücrelerde ERS'ne neden olduğu, ATGK'de ISG'ye göre ERS proteini GRP78'in yüksek bulunması daha şiddetli bir ERS'ne, CHOP ekspresyonunun normal gebelik grubundan daha yüksek şiddette olması ise artmış apoptoza ve patolojik migrasyona bağlı gebelik kayıplarının geliştirebileceğini akla getirmektedir.

Anahtar kelimeler: ERS, Açıklanamayan Tekrarlayan Gebelik Kaybı, İnsan

ABSTRACT

Objective: Recurrent pregnancy losses (RPL) are cytogenetic abnormalities that affect 2-5% of pregnancies. ER stress (ERS) occurs related to the accumulation of misfolded proteins under various conditions. The expression levels of ERS proteins in decidua and chorionic villus during pregnancy and RPL were not known. There was no literature information on the role of ERS proteins in the Unexplained RPL (URPL). We established the hypothesis that "in (URPL), the expression levels of ERS proteins differ in chorionic villi and decidua compared to normal pregnancies". We aimed to determine the localization and expressions of ERS proteins, GRP78 and CHOP, in the decidua and chorion villus samples of the patient with URPL, and to have an idea about the etiology of the disease.

Method: Three groups were formed as control endometrium (KE) (n = 6), optional terminated pregnancy (TP) (n = 6) and URPL (n = 6). The decidua and chorion areas of the pregnancy groups were separated under a stereomicroscope. After Tissue follow-up, 5-micron sections were taken. Morphology with HE staining and also localization of GRP78 and CHOP proteins with immunohistochemical staining methods were evaluated.

Results : CHOP expression was higher in the maternal part of the URPL group compared to the control. GRP78 expression in stromal cells was higher in the URPL group than in a healthy pregnancy. Severe CHOP nuclear staining was also observed in decidual cells in URPL. Both cytoplasmic and nuclear GRP78 and CHOP staining were observed in cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells in chorion samples of TP and URPL patients.

Conclusion:As a result of our immunohistochemical evaluation, pregnancy caused ERS in maternal and fetal cells, higher levels of ERS protein compared to normal pregnancy samples in URPL patients, increased severity of CHOP expression than ISG, increased apoptosis, and pathology. suggests that migration-related pregnancy losses may improve.

Key words: ERS, Unexplained Recurrent Pregnancy Loss, Human

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
İÇİNDEKİLER	III
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gebelik	3
2.2. Gebelik Kaybı	4
2.3. Endoplazmik Retikulum(ER)	10
2.3.1. Endoplazmik Retikulum Stresi	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Deney gruplarının oluşturulması	18
3.2. Materyallerin toplanması ve doku takibi	18
3.3. Hematoksilen-Eosin (H&E) boyama	18
3.4. İmmunohistokimya Yöntemi:	19
4. BULGULAR	22
5. TARTIŞMA	32
SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	38

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. İmmunohistokimyasal analizlerde kullanılan primer ve sekonder antikörler ve dilüsyon oranları

8

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. GER ve DER'in yapısal ilişkisini gösteren çizim (Iurlaro ve Munoz-Pinedo, 2016)	11
Şekil 2. 2. ER Stresi moleküler akış şeması (Remondelli ve Renna, 2017)	14
Şekil 2. 3. ER da hatalı katlanmış protein yanıtı moleküler akış şeması (KARKİN, 2019).	16
Şekil 2. 4. GRP78'in protein katlanmasındaki rolünü gösteren şematik çizim (KARKİN, 2019).	16
Şekil 4. 1. KE desidua HE boyaması (A:4X-B:10X-C:40X)	22
Şekil 4. 2. İSG desidua HE boyaması (A:4X-B:10X-C:40X)	22
Şekil 4. 3. ATGK desidua HE boyaması (A:4X-B:10X-C:40X)	23
Şekil 4. 4. Gebe olmayan Kontrol grubu endometriyumlarında eksprese edilen GRP78 immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (Damar: Ok) (A:10X-B:40X-C:40X)	23
Şekil 4. 5. İSG grubu desidua örneklerinde eksprese edilen GRP78 immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X- C:40X)	24
Şekil 4. 6. ATGK grubu desidua örneklerinde eksprese edilen GRP78 immünoreaktivitesi negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)	24
Şekil 4. 7. Kontrol, İSG ve ATGK grubu stroma/desidua'sında eksprese edilen GRP78 proteinin semi-kantitatif H-SCORE analizi sonuçları	24
Şekil 4. 8. İSG örneklerinden alınan koryon villus fotomikrografları (HE) (A:4X-B:20X-C:40X)	25
Şekil 4. 9. ATGK örneklerinden alınan koryon villus fotomikrografları (HE) (A:4X-B:10X-C:20X)	25
Şekil 4. 10. İSG grubu koryon villus örneklerinde eksprese edilen GRP78 immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X- C:40X)	26

Şekil 4. 11. URLP grubu koryon villus örneklerinde eksprese edilen GRP78 immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)	26
Şekil 4. 12 İSG ve ATGK grubu Fetal kısımda eksprese edilen GRP78 proteinin semi-kantitatif H-SCORE analizi sonuçları	27
Şekil 4. 13. Kontrol grubu endometriyum örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoreaktivitesi ve negative kontrol boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)	28
Şekil 4. 14. İSG grubu desidua örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması . (Ok: peri vasküler boyanma) (A:10X-B:40X-C:40X)	28
Şekil 4. 15. ATGK grubu desidua örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması. (A:10X-B:40X-C:40X)	29
Şekil 4. 16. Kontrol, İSG ve ATGK grubu stroma/desidua'sında eksprese edilen CHOP proteinin semi-kantitatif H-SCORE analizi sonuçları	29
Şekil 4. 17. İSG grubu koryon örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)	30
Şekil 4. 18. ATGK grubu koryon örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması	30
Şekil 4. 19. İSG ve ATGK grubu fetal kısımda eksprese edilen GRP78 proteinin semi-kantitatif H-SCORE analizi sonuçlar	31

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATF4	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü
ATF6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
APS	: Antifosfolipit trombofili sendromu
APAs	: Anti Fosfolipid Antijenleri
BIP	: İmmunoglobulin ağır zincir bağlanma proteini
bZIP	: Esas Lösün Fermuar Domain
CHOP	: C/EBP Homolog Proteini
DER	: Düz Endoplazmik Retikulum
ERAD	: ER İlişkili Bozunma
EDTA	:Etilendiamin tetraasetikasit
ER	:Endoplazmik Retikulum
ERS	: Endoplazmik Retikulum Stresi
eIF2α	: Ökaryotik translasyon başlama faktörü-2
E1E2	: Fosfo2 α
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GRP78	: Glukozla Düzenlenen Protein 78
GRP94	: Glukozla Düzenlenen Protein 94
HSP70	: Isı Şok Proteini-70
HSP90	: Isı Şok Proteini-90

hCG	: İnsan koryonik gonadotropin
HLA	: İnsan Lökosit Antijen
IRE1α	: İnositol gerektiren kinaz1
JNK	: Jun N-terminal kinaz
PERK	: Protein Kinaz RNA benzeri ER kinaz
PKOS	: Polikistik over sendromu
PBS	: Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPL	: Tekrarlayan gebelik kayıpları
STB	: Sitotrofoblastlar
SB	: Sinsityotrofoblast
UPR	: Katlanmamış protein yanıtı
XBP1	: X-box bağlayıcı protein 1

1. GİRİŞ

Bir proteinin özgün işlevini kazanabilmesi için üç boyutlu yapısını kazanması önemlidir. Endoplazmik retikulum (ER) sekretuar ve membran proteinlerinin sentezinden, kalsiyum depolanmasından, steroid ve lipitlerin sentezinden sorumlu kesecik ve kanalcıklardan oluşan bir organeldir. N-glikozilasyon, disülfid oluşumu, oligomerizasyon, hidroksilasyon endoplazmik retikulumda meydana gelir. ER, GER (Granüllü endoplazmik retikulum) ve DER (Düz endoplazmik retikulum) olarak iki tipte organize olur. GER membranında çok sayıda ribozom taşımakta ve ribozomlardan protein sentezini ve salgılanmasını gerçekleştirmektedir. Ribozomlardan yoksun olan DER, protein sentezinden değil, fosfolipid, lipid sentezi, karbohidrat metabolizması, kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde işlevseldir. Hipoksi, glukoz yoksunluğu ya da fazlalığında veya kalsiyum dengesinin bozulması sonucunda ERS (Endoplazmik Retikulum Stresi) meydana gelir. Hücre ERS'ile baş edebilmek için UPR (Katlanmamış Protein Cevabı-Unfolded Protein Response)'yi meydana getirir. ER lümeninde yer alan 3 farklı transmembran proteini vardır. Bunlar; IRE1 α (İnositol Response Element 1), PERK (Protein Kinaz RNA benzeri ER kinaz) ve ATF6 (Aktive edici Transkripsiyon Faktörü 6) olarak tanımlanmıştır. Bu proteinler BIP/GRP78 (Binding immunoglobulin protein)'in ayrılmasıyla aktive olarak UPR'yi başlatırlar.

IRE1 α endoribonükleaz aktivitesi olan transmembran proteindir. Şaperonlar, membranın yeniden modellenmesini ve ER'le ilişkili yıkımı başlatarak hücre siklusunun durdurulması gibi bir takım olaylara öncülük etmektedir. PERK, stres sürecinde, dimerize olur ve protein sentezini durdurarak ATF4'ün nükleusa geçmesini sağlar. Böylelikle aminoasit metabolizmasının, şaperonların, membran biyogenezinin, lipid biyosentezinin ve oksidatif stres cevabıyla ilgili genlerin transkripsiyonunu artırır. ATF6, lösin fermuar protein ailesinin bir üyesidir ve ERSE (ER Stres Element)'nin aktivasyonu ile ER şaperonları, aminoasit metabolizmasının, membran biyogenezinin ve lipid biyosentezinin oksidatif stres cevabıyla ilgili genlerin aktivasyonunu sağlayan transkripsiyon faktörü gibi davranır. Hüresel ve çevresel faktörlerden kaynaklanan kalsiyum dengesindeki anormallikler, protein sentezindeki artış, viral enfeksiyonlar ve glukoz yoksunluğu, ER homeostazını bozduğu için katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein miktarını artırarak ERS'ne

neden olur ve UPR sinyal yolunu aktive eder. Ayrıca ERS'ni aktive eden durumlar içerisinde, ozmotik ve oksidatif stres, çeşitli kimyasalların epigenetik mekanizmalarda ve gen ekspresyonunda yaptığı değişiklikler de bulunmaktadır. Aynı zamanda ERS de, ROS üretime neden olur. ROS' da, Ca⁺⁺ homeostazına ve yanlış protein katlanmasına neden olarak ERS'ni tetikler (Malhotra ve Kaufman, 2007). Ozmotik stres, ERS aracılığıyla apoptozu uyararak oosit olgunlaşması ve embriyo gelişimini olumsuz etkiler (Hao ve ark., 2003; Im ve ark., 2005; J. Y. Zhang ve ark., 2012; T. Lin ve ark., 2015; T. Lin ve ark., 2017). ER lümeninde yanlış katlanmış proteinler biriktiğinde ERS' ni iyileştirmek için UPR sinyali aktive edilir. Uzun süreli stress altında CHOP aktive olur (Szegezdi ve ark., 2006). Stresin engelenemediği durumda CHOP/GADD153 (C/EBP homologous protein/growth arrest and DNA damage 153), Jun N-terminal kinaz (JNK) ve Kaspaz 12 yolları aktive olur. (van der Kallen ve ark., 2009; Abraham ve ark., 2012; Huang ve ark., 2017).

İki ve daha fazla klinik başarısız gebelik, tekrarlayan gebelik kaybı olarak adlandırılır (Medicine, 2012; El Hachem ve ark., 2017). Ebeveyn karyotipi, anne yaşı, endokrin anormallikler, otoimmün bozukluklar, genetik anomaliler, enfeksiyonlar, konjenital ve uterinal anormallikler, sistemik endokrin etkenler (diyabet) hakkında detaylı araştırmalar yapılsa da TGK (Tekrarlayan Gebelik Kayıpları - Recurrent Pregnancy Loss) vakalarının %50'sinin sebebi halen açıklanamamıştır (Jaslow ve ark., 2010; Shahine ve Lathi, 2015). (Novakovic ve ark., 2011; Medicine, 2012; Kohan-Ghadr ve ark., 2016; Jiang ve ark., 2017). (Christiansen ve ark., 1990; El Hachem ve ark., 2017). (Hanson ve ark., 1990; Jovanovic ve ark., 2005).

Gebelik kayıplarında etkili olan faktörlerin tekrarlayan gebelik kayıplarında da etken olabileceği açıktır. Ancak bu faktörlerden hangisi veya hangilerinin gebelik kaybının "tekrarlamasına" neden olan etken olduğu ya da bunların dışında başka bir etkeninin mi etkili olduğu açık değildir. Çalışmamızda; ATGK'de rol alabileceğini düşündüğümüz ERS mekanizmasında etkili GRP78 ve CHOP proteinlerinin ekspresyon düzeylerini belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gebelik

Ovum ve sperm birleşmesiyle oluşan zigot bölünerek önce blastomerleri daha sonra hücrelerin bölünme eksenleri ve kutuplaşmalarına göre düzenleme geçirerek trofoektoderm ve embriyoblastları meydana getirir. Gelişmekte olan blastosist 1-3 gün endometriuma ulaşmadan önce uterusda kalır, 5-7 gün sonra blastosistin yüzeyinde gelişen trofoblast hücreleri sayesinde implantasyon gerçekleşir. İmplantasyon gerçekleştikten sonra trofoblastlarla birlikte diğer komşu hücreler hızla proliferasyon olarak plasenta ve zarları oluşturur. Korpus luteumdan salgılanan progesteron hormonu endometrial stromal hücreleri desidua hücrelerine dönüştürür. Trofoblast hücreleri desiduaı kaplayarak hücrel sindirim ve emilime başlarlar. Trofoektodermal hücreler sitotrofoblastları (STB) oluşturur. Sitotrofoblastları ve embriyoyu sitotrofoblastlardan köken alan sinsityotrofoblast (SB) hücreleri sarar. Plasenta maternal ve fetal kısımların hormonal ve metabolik ilişkileri sağlayan ekstraembriyonik bir yapıdır. Fetüsün gelişimini sağlamak ve reddini önlemek için plasentadaki hücrel dinamikler, vasküler gelişim ve dallanmanın normal şekilde gerçekleşmesi gereklidir (Keith L. Moore; Langman medikal embriyoloji). Döllenmeyi takiben embriyonun yerleşeceği maternal kısım; uterus epiteli, bağ dokusu ve kan damarlarından oluşurken, maternal bölümle ilişkili fetal kısım ise trofoblast hücreleri, kan damarları, embriyonal bağ dokusundan oluşmaktadır. Döllenmeyi takiben oluşan zigot uterusu ulaşmaya çalışırken endometriyal stromal hücreler ve ekstraselüler matriks yapısal değişikliklere uğrayarak desiduaa dönüşür. Endometriyal stromal hücreler, yuvarlak ve büyük desidual hücrelere farklılaşır. Desidua fonksiyonel endometrium tabakasıdır. Desidua bazalis, desidua kapsularis ve desidua pariyetalis olarak 3'e ayrılır. Progesteron gebelik hormonudur (Spencer ve ark., 2004). Desiduanın stromal hücreleri artan progesteron miktarından etkilenip büyüyerek desidual hücreleri oluşturur. Glikojen ve lipid biriktiren desidual hücreler koryon zarı etrafında dejenerasyon olarak, uterus salgısı ve anne kanıyla embriyonun beslenmesini sağlar. Ayrıca desidual hücrelerin sinsityotrofoblastlara karşı maternal organları koruyucu bariyer işlevinden de bahsedilmektedir (Loke ve ark., 1995).

Trofoblast hücreleri ise birbiriyle yakın temasta sinsityotrofoblastlara ve sitotrofoblasta farklılaşır. Sinsityotrofoblastlar, hCG (Human chorionic gonadotropin),

laktojen, progesteron ve östrojen salınımından sorumludur. Organel olarak da Golgi kompleksine, çok sayıda mitokondriyona, yağ damlacıklarına, GER ve DER'e sahiptirler. Sitotrofoblastlar ise steroid hormonlarının ve hCG hormonlarının kaynağıdır. Gelişimin 13. gününde sinsityotrofoblast, sitotrofoblast ve ekstraembriyonik somatik mezoderm birleşerek koryonu yapar ve koryonik kavite denen boşluğu oluşturur. İmplant olmuş embriyo beslenmesini ilk olarak histotropik ovidukt ve uterus sekresyonunu fagositoz yoluyla trofoektoderm tarafından alınmasıyla karşılar. İmplantasyondan ve koriyoalantoik plasenta değişiminden sonra haemotropik beslenmede gereksinimler maternal ve fetal dolaşım arasında maddesel geçişle sağlanır. Gebeliğin 8. haftasına kadar uterus bezlerinin salgıları sinsityotrofoblastlar vasıtasıyla damara aktarılır. Erken gebelik döneminde maternal proteinler sölomik boşluklarda birikerek fetusa sekonder vitellus kesesi yoluyla taşınır. İlk trimesterde düşük oksijen konsantrasyonunda besin sağlandığı için fetüs için radikal oksijen hasarları düşüktür (Burton ve ark., 2001).

2.2. Gebelik Kaybı

Oluşan gebeliklerin %10-12'si klinik olarak kaybedilir (Salem ve ark., 1984). Erken hamilelik insanlarda ilk iki trimester olarak nitelendirilen; kemirgenlerde, ilk 10 günlük gebelik dönemi olarak sınırlandırılan süreçtir (Moyce ve Dolinsky, 2018). TGK, çiftlerin % 1-5'ini etkileyen önemli bir üreme sorunudur. Bunların %15-25 spontan düşükle sonuçlanır (Brezina ve Kutteh, 2014). Gebelik kaybı, doğumun gerçekleşeceği zamana gelmeden kendiliğinden sonaeren bir gebelik olarak tanımlanabilir (Regan ve Rai, 2000). Gebelik boyunca trofoblastlar, bir yandan hormon ve sitokinler salgılamak, bir yandan da mekanik bariyer oluşturur. Gebeliğin sürdürülmesi için endometriyumda doğal immün cevap ve inflamatuvar sitokinler baskılanarak anne için yabancı olan embriyoya immün tolerans yaratılır (Alecsandru ve Garcia-Velasco, 2015).

Gebelik kayıpları primer ve sekonder olarak 2'ye ayrılır. Primer TGK, kadınlarda iki veya daha fazla gebelik kaybı olduğunu tanımlar. Sekonder TGK ise normal gebelik sonucu 3 ve daha fazla gebelik kaybını tanımlar (Silver ve ark., 2011).

Spontan erken düşüklerin %60'ı kromozomal anormalliklerden kaynaklanır. TGK'nin nedenlerinden birisi olan uterinal anormallikler kadınların %19 unda konjenitaldir (Jaslow ve ark., 2010; Werner ve ark., 2012).

Submukozal miyom ve polipler kadınların % 4.5'inde bulunur. TGK'li kadınların ise % 2-3'ünü teşkil eder (Rayburn, 2014). TGK için önem taşıyan otoimmün durum Antifosfolipit trombofili sendromudur (APS) ve TGK vakalarının %5-20'sini oluşturur.

Gebeliğin doğum aşamasına gelmeden kendiliğinden 20. haftadan önce embriyo ve fetus eklerinin uterus dışına atılması düşük (abortus) olarak tanımlanır. Gebelik kaybı 12. haftadan önce gerçekleşiyorsa erken düşük, 12 ile 20. haftalar arasında gerçekleşiyorsa geç düşük olarak adlandırılmaktadır. Düşüklerin %80'i birinci trimesterde gözlemlenmektedir. Anlaşılmayan gebelik kaybı yaşayan hastaların birinci dereceli akrabalarında Human Lökosit Antijen (HLA) türleri, immün sistem bozuklukları gibi faktörlerle ilişkili olarak TGK görülmüştür (Christiansen ve ark., 1990). Bütün gebeliklerin %15-40'ı spontan düşük ile sonlanmaktadır. Bunların %75'i 16. haftadan önce, % 62'si 12. haftadan önce gerçekleşmektedir (Andersen ve ark., 2014). Sporadik abortuslar ve Habituel abortuslar olarak (tekrarlayan düşükler) abortuslar 2'ye ayrılır. Kronik patolojinin olmadığı 2-3 haftalık embriyo kayıpları, sporadic abortuslardır ve spontan abortusların %97-99'unu bunlar oluşturur ("Medical treatment of ectopic pregnancy," 2008). 20. gebelik haftasından önce 3 ve daha fazla gebelik kayıpları, habitüel abortuslar olarak tanımlanmaktadır. 300 gebelikte bir görülen TGK'nin %12-16'sı anatomik faktörlerden, %17-20'si endokrin faktörlerden, %20-50'si immünolojik faktörlerden ve %10'u da diğer faktörler kaynaklanmaktadır. TGK etiyolojik olarak da maternal, paternal ve fetüsa ait sebeplerden kaynaklanır. Embriyodaki kromozomal anormallikler nedeniyle düşük yapma riski anne yaşı ilerledikçe artmaktadır (Stephenson ve ark., 2002).

Maternal kaynaklı sebepler (enfeksiyonlar, endokrin faktörler, anatomik, immünolojik faktörler, toksik sebepler vb.) ve paternal kaynaklı sebepler (spermatik kromozomal translokasyonlar, DNA azlığı) gebelik düşüşe başarısını düşürebilmektedir. (Geyman ve ark., 1999; Child ve ark., 2001).

Fetüsa ait nedenler ise %14,6 oranında monozomi X (45XO), %20'lik oranda triploidiler, %5.6 oranında tetraploidi, %3.8 oranında translokasyonlar, embriyoda konjenital anomaliler yaratarak spontan abortusa neden olur (Geyman ve ark., 1999). Gebelik 3 trimesterden oluşur. 2. trimesterde servikal zayıflıkla ilgili uterus

malformasyonları 1. trimesterdeki kadınlara göre daha fazladır (Grimbizis ve ark., 2001).

Oluş zamanlarına göre abortuslar 3 grupta incelenmektedir:

1. Subklinik abortus: Normal zamanında veya birkaç gün gecikme sonrası menstruasyon ile gebelik sonlanır.
2. Erken abortus: Birinci trimesterde 12. haftanın sonuna kadar oluşan abortuslardır. Tespit edilebilen abortusların en az %50'si fetal kromozomal anomaliler sonucu ortaya çıkar.
3. Geç abortus: 13-20 haftalar arasında oluşan abortuslardır (Andersen ve ark., 2014).

Oluş şekillerine göre abortuslar 2 grupta incelenmektedir:

1. Spontan Abortus: 20. haftadan önce gebeliğin kendiliğinden sonlanmasıdır. Anne yaşı önemlidir. Bu oran 20-24 yaş grubundaki annelerde yaklaşık %8 iken 40 yaşından sonra %26'ya yükselir (Hebert ve ark., 1986; Coulam, 1995).

2. Provoke abortus: 2 alt grupta incelenir;

a. Medikal (terapotik) abortus: Gebeliğin devamının hayati tehlike oluşturduğu ağır maternal hastalıklar, ciddi anormal ultrasonografi (USG) bulguları, fetusta kromozomal anormaliler,

TORCH (TORCH ifadesinde; T, Toksoplazmozisi; R, Rubellayı; C, Cytomegalovirusu ve H, Herpes Simplex virüsü ifade eder. Hepatit B, Leptospirozis, Epstein Barr Virus (EBV), HIV ve Human Parvovirus B19'u içermektedir) ve teratojenik ilaç kullanımı gibi nedenlerle sonlandırılan gebeliklerdir.

b. İstemli abortus: Fetüs veya anne için herhangi bir tıbbi risk yok iken, gebeliğin sonlandırılmasıdır.

Kişinin kendisi ya da bir başkasının uygun olmayan koşullarda gebeliği sonlandırması kriminal abortus, bu işlem esnasında genital organlarda enfeksiyon oluşması sonrası düşük gerçekleşmesine septik abortus adı verilir.

Gebelik kayıplarının çoğu, kromozomal ve genetik anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Anormallik oositten, spermden veya erken evre embriyosundan kaynaklanabilir. Tekrarlayan gebelik kaybı yaşayanlarda düşük riski %17 ile %25, dördüncü gebelik kaybı ise %25-%46 arasındadır (Jeve ve Davies, 2014). Bazen anne yaşından kaynaklı, kötü yumurta kalitesi gebelik kaybıyla sonuçlanabilmektedir (Kutteh, 2014). TGG'li hastalarda plazma hücrelerinin varlığı endometritin göstergesidir. Bu durum hastaların %58'ni teşkil ettiğinden endometritin gebelik kaybına neden oluşturabileceğini düşündürmektedir (El Hachem ve ark., 2017).

Bazen doğuştan bazen de düşükler nedeniyle kadınlarda uterusu yapısal anormallikler gelişebilir. Bu yapısal olumsuzluklar da düşüklerin nedenini oluşturabilmektedir.

Birçok çalışma, sigara, alkol ve kafein kullanımı, obezite ve bazı mesleki tehlikelere maruz kalma gibi faktörlerin TGG ihtimalini arttırabileceğini öne sürmüştür. Trombofili anne babadan fetusa geçen tromboz riskini artıran kalıtsal hastalıktır. İnflamasyon, antifosfolipid sendromu, bazı kanserlerde, protein C ve protein S eksikliğinde pıhtılaşma faktörlerinde artma trombozla sonuçlanabilir. Plasental bozukluklar, trofoblast invazyonundaki sorunlar gebelik kayıplarıyla sonuçlanır. Hastadaki trombojenik değişiklikler uteroplasental kan akımında azalmaya, plasental tromboza ve gebelik kayıplarına neden olur (Stella ve Sibai, 2006). Bir çalışmada ise kadınlarda uterusu doğal öldürücü hücre sayılarının TGG'li kadınlarda daha yüksek olduğu görülmüştür (Saravolos ve Li, 2012).

Yapılan araştırmalarda, yüksek hemoglobin A1c seviyesi olan kadınlarda fetal anomalili gebelik ve düşük riskinin yüksek olduğu bilinmektedir. Tiroid hastalığı (hipo ya da hipertiroidizm) gebelik kaybı ile ilişkilendirilmektedir. Tekrarlayan gebelik kayıplarında trombofili nedenleri arasında APS (antifosfolipid sendromu) birçok gebelik komplikasyonu ile de ilişkilendirilmiştir. APS tanımı, APAs (Anti Phospholipid Antigens) kötü gebelik sonuçları ya da vasküler trombozların birlikteliğini belirtmektedir. APAs'lar fosfolipidleri bağlayıcı plazma proteinlerine karşı afinitesi olan heterojen bir grup otoantikoru içermektedir. Human Leukocyte Antigen (HLA) antijenlerinin, maternal immün yanıtı bozarak, gebelik kayıplarına neden olduğu düşünülmektedir (Coulam ve Coulam, 1992). Tekrarlayan gebelik kaybı izlenen kadınların eşlerinin lenfositleri ile immünize edilmeleri tedavi olarak

denenmiş fakat etkinliği ile ilgili anlamlı sonuçlar alınamamıştır (Coulam ve Coulam, 1992).

Sitogenetik anormallikler, trombofili tekrarlayan düşük yapma riskini arttırsa da ancak oluşan düşüklerin nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır. Düşük için iyi bilinen risk faktörleri, maternal yaşın artması, düşük öyküsü ve infertilitedir (Axmon ve Hagmar, 2005). Gestasyonunun ilk trimesterinde HB-EGF'nin plasentasyon esnasında, trofoblastın gelişimini ve yaşamını sürdürmesinde düzenleyici rol oynadığı belirlenmiştir (S. Zhang ve ark., 2013). Sitokinler, lipit mediatörler, morfogen genler ve büyüme hormonları implantasyon işleminde ovaryan hormonlarla (östrojen, progesteron) birlikte fonksiyon gösterir. Trofoblast fonksiyonlarını etkileyerek TGF- β , IGF, EGF, IFN- α , IFN- γ , IL-1, IL-11, IL-8 başarılı gebeliğin gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar (Suman ve ark., 2013). Büyüme faktörleri ile interlökinler arasındaki sinyal iletimi blastosistin tutunmasına yardımcı olur. Blastosistler endometriuma tutunarak iç ve dış sinsisyotrofoblast hücrelerini oluşmasını sağlar. Dış sinsisyotrofoblastlar endometriyal hücrelerin apoptozunu tetikleyen bir takım faktörler de salgılayarak desidual ekstrasellüler matriksin degrades olmasını sağlamaktadır (Armant, 2005). Dış sinsisyotrofoblast hücreleri proteinlerin, steroid hormonların ve büyüme faktörlerinin sentezi ve salgılanmasında rol oynamaktadır. İç sinsisyotrofoblast hücreleri sıkı hücre grupları oluşturarak ekstravillöz trofoblastlara, bunlar da endovasküler trofoblastlara dönüşmektedirler (Modi ve ark., 2012; Soares ve ark., 2012). Gebelikte immün hücrelerin rolü büyüktür. Birinci trimesterin sonuna kadar T hücreleri, NK hücreleri ve makrofajlar sayıca fazladır. İmmün hücrelerin düzenlenmesinde, apoptozun inhibisyonunda, inflamasyon ve hemostaz uyarılmasındaki sorunlar, ATGK'de rol alabilirler. ERS'nin hem apoptoz hem de inflamasyon üzerinde etkileri bilinmektedir (Ron ve Walter, 2007).

Polikistik over sendromu (PCOS) önemli bir infertile sebebi olup, kadınlarda %40 oranında rastlanan TGK sebeplerinden biridir. Maternal obezite, düşük riski oluşturan faktörlerden biridir. İntrauterin ölüme sebep olan PKOS tedavisi gören hastalar da risk grubudur. (Clifford ve ark., 1994; Rai ve ark., 2000; J. X. Wang ve ark., 2000; Froen ve ark., 2001). TGK yaşayan kadınlarda, yüksek açlık insülini ve insülin direnci izlenmiştir. Aşırı androjen fazlalığının, dolaşımdaki testosteron

konsantrasyonunu ve PCOS riskini artırarak düşük riskini artırdığı bilinmektedir. Hiperhomosisteinemi, endometriyal kan akımı ve damar bütünlüğünü etkileyerek, vasküler endotelyumda oksidatif stresin artmasına ve dolayısıyla erken gebelik kaybına neden olduğu bilinmektedir (Quere ve ark., 2001; Schachter ve ark., 2003; Ispasoiu ve ark., 2013). Polikistik over sendromunda LH'nun aşırı salgılanmasının düşük için bir risk faktörü olduğu rapor edilmiştir (Rai ve ark., 2000). Tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan kadınların %57'sinde üriner LH yüksekliği tespit edilmiştir (Clifford ve ark., 1994). Yüksek LH'nun zararlı etkilerini azaltmak için gonadotropin salgılayan hormon analogları kullanılarak LH etkisi baskılanabilmektedir (Clifford ve ark., 1994; Madani ve ark., 2012).

Prolaktin hormonu kadın üremesinde önemli role sahiptir. Yüksek prolaktin ovulasyondaki disfonksiyonla ilişkilendirildiğinden TGK'li kadınlarda yaygın olarak seviyesi ölçülür. Prolaktin endometrial stromal hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkileyerek embriyo için endometriyumu fizyolojik ve morfolojik olarak düzenler. Ayrıca bölgesel etkili büyüme faktörlerinin uterusu alımını artırır ve maternal fetal arayüzde sitokin üretiminin düzenlenmesini sağlar.

Luteal faz bozukluğunda korpus Luteumun yetersiz progesterone üretimi ve endometriumun implantasyon için yeterli hale gelememiş olması implantasyon kaybına neden olduğunu düşündürmektedir. TGK'na sahip kadınların % 35'inden bu olgunun sorumlu olduğu bildirilmiştir (Graham ve Clarke, 1997; Arredondo ve Noble, 2006; Dante ve ark., 2013).

Hipertiroidizm olan gebelerin spontan düşük, konjestif kalp yetmezliği, tiroid, preterm doğum, preeklampsi, fetal büyüme geriliği riskinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Glinenoer, 1998).

İmplantasyon penceresinde gerçekleşen immünolojik bir değişikliğin ER stresiyile ilişkili olduğu ve tekrarlayan düşüklere sebep olduğu bildirilmiştir (Galgani ve ark., 2015). Gecikmiş implantasyonla gebelik kayıpları arasında bir ilişki olabileceği de düşünülmektedir. Embriyonik trofoblastik hücreler tarafından salgılanan progesteron, metalopeptidaz, östradiol ve inhibitörler, implantasyonda ve blastosistin endometriuma tutunmasında rol almaktadır (Tien ve Tan, 2007; Szekeres-Bartho ve Balasch, 2008). Luteal fazda endometrium üzerinde etkili olan hCG apoptotik ölümü

geciktirebildiğinden TKG için önem taşımaktadır (Lovely ve ark., 2005; Tien ve Tan, 2007). Ancak, ERS'nin birinci trimesterdeki (12. haftaya kadar) gebelik kayıplarındaki rolüyle ilişkili literatür bilgisine rastlanılamamıştır.

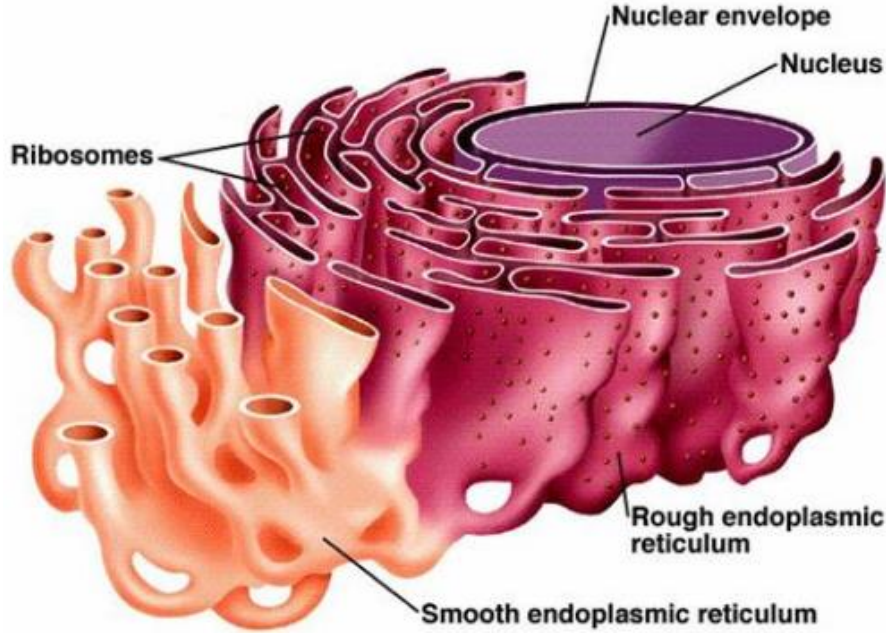
2.3. Endoplazmik Retikulum (ER)

ER membranöz bir hücre içi organel olarak salgılamadan sorumlu, hücrenel proteinlerin yaklaşık üçte birinin üretilmesine ve katlanmasına katkıda bulunur. ER sitoplazmanın büyük bir bölümünü kapsayan uzun tübüller yoluyla moleküllerin sitoplazma içerisinde geniş alanlara transfer edilmesini sağlar (Palade ve Porter, 1954; Almanza ve ark., 2019). ER toplam hücre zarının %60'ını oluşturur ve doğrudan veya dolaylı olarak nukleus, Golgi cisimciği, mitokondri ve proteozomlar gibi hücrenin bazı organelleri ile etkileşim içindedir.

ER bir proteinin özgür işlemini kazanabilmesi için üç boyutlu yapılarını kazanmasında gerekli katlanmaların gerçekleştirildiği organeldir. Sekretuar ve membran proteinlerinin sentezinde, kalsiyum depolanmasından, steroid ve lipidlerin sentezinden sorumlu kesecik ve kanalcıklar şeklinde yapılanmıştır. ER GER (Granüllü endoplazmik retikulum) ve DER (Düz endoplazmik retikulum) olarak 2'ye ayrılır. GER üzerinde yer alan ribozomlar, protein sentezi ve salgılanmasını gerçekleştirir. DER ribozomlardan yoksundur, protein sentezinden değil, fosfolipit, lipid sentezi, karbohidrat metabolizması, kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde işlevseldir. Proteinlerin katlanarak fonksiyonel yapılarını kazanmalarından, hücre içine ve hücre dışına taşınmasından, lipid biyosentezinden DER sorumludur. DER ribozomların olmadığı anastomozlaşan kısa tübüllerden oluşmaktadır. Adrenokortikal hücreler ve testiküler Leydig hücreleri gibi steroid sentezleyen ve salgılayan hücrelerde iyi gelişmiştir, detoksifikasyondan ve zararlı maddelerin konjugasyonundan sorumlu organeldir. ER'un gen regülasyonu için gelen sinyalin çekirdeğe iletilmesinde ve hücre içindeki hassas metabolik değişikliklerin algılanmasında rol oynadığı bilinmektedir (Ron ve Walter, 2007).

Plazma hücreleri ve beta hücreleri, sekretuar protein talebini karşılamak için GER bakımından zenginken, karaciğer hücreleri ise ilaç detoksifikasyonunda rol oynayan çok miktarda DER'e sahiptir (Şekil 1). Ca^{++} birçok hücre içi ve hücre dışı sinyalde gen ekspresyonu, protein sentezi ve hücre çoğalması, farklılaşması, metabolizması ve apoptozda rol alır. ER, Ca^{++} düzenlenmesinde önemli rol

oynamaktadır (Meldolesi ve Pozzan, 1998; Clapham, 2007). ER homeostazını bozan koşullar, genellikle “ER stresi” olarak adlandırılan hücresel bir durum oluşturur. ER stresine hücresel cevap, stresin üstesinden gelmek ve ER homeostazını geri kazanmak için adaptif mekanizmaların aktivasyonunu içerir (Hetz, 2012).



Şekil 2. 1. GER ve DER'in yapısal ilişkisini gösteren çizim (Iurlaro ve Munoz-Pinedo, 2016).

2.3.1. Endoplazmik Retikulum Stresi

Hücrenin protein sistemi, GER ve ribozomlardan oluşmaktadır. Viral enfeksiyonlar, enerji veya besin yoksunluğu gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar, protein sentezi ve katlanması işlevinde ER kapasitesini zorlayabilir. Bu durum ER'de katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olabilmektedir. Hücredeki bu olumsuzluklar ER stresi (ERS) olarak adlandırılan tabloyu ortaya çıkarmaktadır (Jing ve ark., 2012). Endoplazmik retikulum (ER) protein katlanması, taşınması ve sentezi için önemli bir organeldir. ER mikroçevresi; Ca^{++} tükenmesi, hipoksi ve N-terminal glikozilasyonunda meydana gelen fonksiyon bozukluğundan etkilenir ve bu durum ER stresine sebep olur (Koumenis, 2006). Hücre dışı ve / veya hücre içi modifikasyonlara cevap olarak, hücreler, protein homeostazı olarak adlandırılan bir mekanizma yoluyla protein sentezi ve yıkımı arasında bir dengeye aracılık ederek fizyolojik fonksiyonları sürdürür. Katlanmış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikmesi, ER stresine sonuçlanır ve UPR işlemini aktive eder. ER'un katlanma kapasitesini artırmak ve protein sentezini yavaşlatmak için bir

kaç sistemi bir araya getirir. UPR yolağı etkili olursa ERS esnasında da protein sentezi devam eder, hücrel hemeostaz düzenlenir. ERS devam eder ve UPR ile baş edemezse, hücrede oksidatif stress ve apoptoz yolakları aktive olur (M. Wang ve Kaufman, 2016). ER membranında ERS'in üç sensörü yer alır. Protein kinaz R (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), inositol gerektiren protein la (IRE1 α) ve ATF6 α (ayrıca siklik AMP'ye bağılı transkripsiyon faktörü 6 α olarak da bilinir). Hücre stress altında olmadığı zaman ER şaperon bağılayıcı immünoglobulin proteini (BIP) yani GRP78, PERK ve IRE1 α bağılanarak inaktif durumda tutar. Artmış bağılayıcı protein BIP/GRP78 yanlış katlanmayı hafifletir. BIP/GRP78'in yanlış katlanmış proteinlere daha fazla bağılanması hem PERK'in hem de IRE1 α 'nın dimerizasyonu ve aktivasyonunu kolaylaştırır (Cui ve ark., 2011; Wu ve ark., 2014). Protein ilk düz zincir halinde sentezlenirken daha sonra üç boyutlu yapı kazanır. Üç boyutlu yapıda herhangi bir sorun olması durumu katlanmamış yada yanlış katlanma olarak ifade edilmektedir. GRP78 (BIP) adı verilen moleküler yada refakatçı protein tarafından PERK, IRE1 α ve ATF6 bağılı halde tutularak ER lümeninde inaktif halde bekletilir. Herhangi stres durumunda GRP78 lümenine giderek membrana bağılı proteinlere bağılanır ve PERK, IRE1 α ve ATF6 α 'yı aktif hale geçirerek ER lümeninin genişlemesini sağılar. ER kapasitesini aşacak miktarda protein biriktiğı zaman sinyal yolakları aktive olur. GRP78/BIP bunlardan ayrılır ve ilk olarak Golgi'ye gider ve burada Site1 (Sinyal Tanıma Partikülü 1) ve Site2 (Sinyal Tanıma Partikülü 2) proteazlar tarafından proteolize uğrar. bZIP (Basic Leucine Zipper -Esas Lösün Fermuar Domaini) domaini içiren ATF6 nukleusa taşınarak hedef genlerinin aktivasyonunu sağılayan transkripsiyon faktörü gibi davranır. ER şaperonları, aminoasit metabolizması, membran biyogenezinin lipid biyosentezinin oksidatif stress cevabıyla ilgili genlerinin transkripsiyonunu artırır. IRE1 α fosforile olur. XBP1 mRNA'sını (X-box bağılayıcı protein 1) belirli bölgelerden keserek, splice formu oluşturulur. XBP1s çekirdeğe taşınarak, ER şaperonlarının ve ERAD proteinlerinin ekspresyonunu, ROS'la ilgili genlerin transkripsiyonunu artırır. PERK fosforile olur E1E2 (fosfo2 α) ATF4'ün aktif hale gelmesini sağılayarak genel protein translasyonunu azaltır. UPR'nin asıl amacı sitoplazmik olan olayı nukleusa yansıtacak bir kaskat oluşturmasıdır (Şekil 2).

ER stresine karşı hücre katlanmamış protein yanıtı başlatır (UPR). UPR sinyal proteinleri, ER stresinin neden olduğu sorunları onararak, ER homeostazını

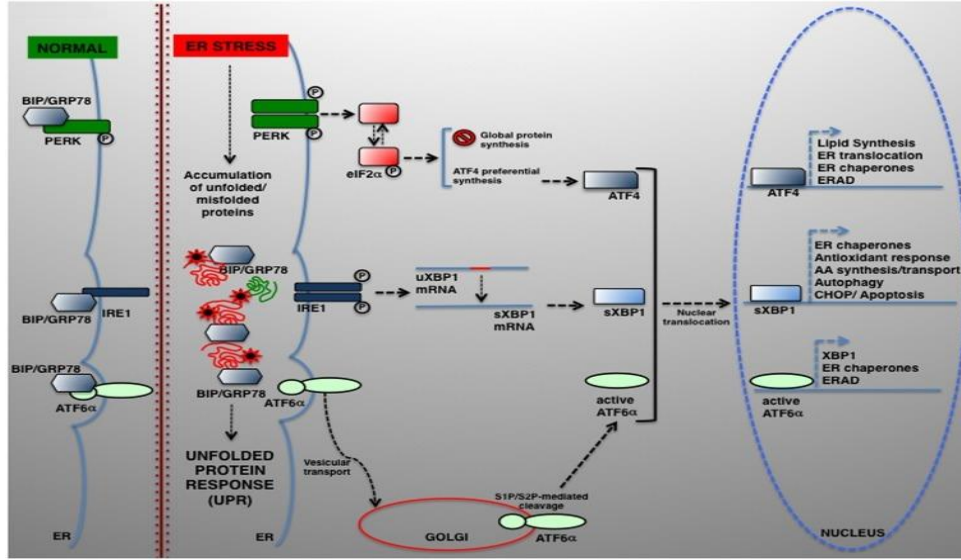
sağlamaktadır. Fizyolojik koşullar altında, PERK, IRE1 α ve ATF6 proteinleri lüminal alanda, onları inaktif tutan ER şaperonu GRP78/BiP'e bağlı olarak tutulur. Katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler ER'de birikirse, biriken proteinlerin katlanmasına yardımcı olmak için BiP bu komplekslerden ayrılır. UPR sinyali IRE1 α (inositol gerektiren protein -1 α), PERK (protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz) ve ATF6 (aktive edici transkripsiyon faktörü 6) dan oluşan üç transmembran proteini aracılığıyla gerçekleşir. UPR ile birlikte 3 adaptif cevap meydana gelir;

1. Genel protein sentezini azaltarak, ER'daki protein katlanma yükü azaltılır.
2. ER protein katlanma kapasitesini artırır.
3. ERS çok şiddetli ve uzun süreli ise, çevre hücelere zarar gelmesini önlemek için hücre apoptoza yönlendirilebilir (Szegezdi ve ark., 2006).

ER stres durumundayken apoptoz indükleyici CHOP'un transkripsiyonu UPR'nin üç farklı sinyal yolundan indüklense de, CHOP protein ekspresyonunun artması için PERK-eIF2 α -ATF4 yolu gereklidir (Szegezdi ve ark., 2006).

ERS ve dişi üreme sistemi ilişkisiyle ilgili çalışmaların sonuçları son birkaç yıldır yayınlanmaya başlanmıştır (Yang ve ark., 2016). Başarılı bir implantasyon için reseptif evrede blastosistin implantasyon kabiliyeti ve uterus endometriyumu arasında karşılıklı etkileşim olması gereklidir (Dey ve ark., 2004). İmplant olan embriyonun etrafını saran endometriyal stromal hücreleri, embriyonun invazyonu ve hayatta kalması için destek veren desidual hücelere dönüşürler (Lim ve Wang, 2010). Hatalı desidualizasyon uterusun fonksiyon bozukluklarına ve gebelik başarısızlıklarına neden olabilir Lin ve ark. yaptıkları bir çalışmada GRP78'in belirgin bir şekilde fare desidual hücrelerinde arttığını belirtmişlerdir (P. Lin ve ark., 2014). Buna karşılık, GRP78'in erken gebelik kaybı yaşayan hastalardan alınan desidual hücrelerde azaldığı tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2011). Ayrıca, desidualizasyonda uzun süren ERS indüklü apoptozun erken gebelik kayıplarında rol oynayabileceği belirtilmiştir (Liu ve ark., 2011).

Bu literatür bilgileri ışığında sebebi anlaşılmamış gebelik kayıplarının oluşmasında ERS indüklü apoptozun ve bununla ilişkili UPR'nin rolü olabileceğini düşünmekteyiz.



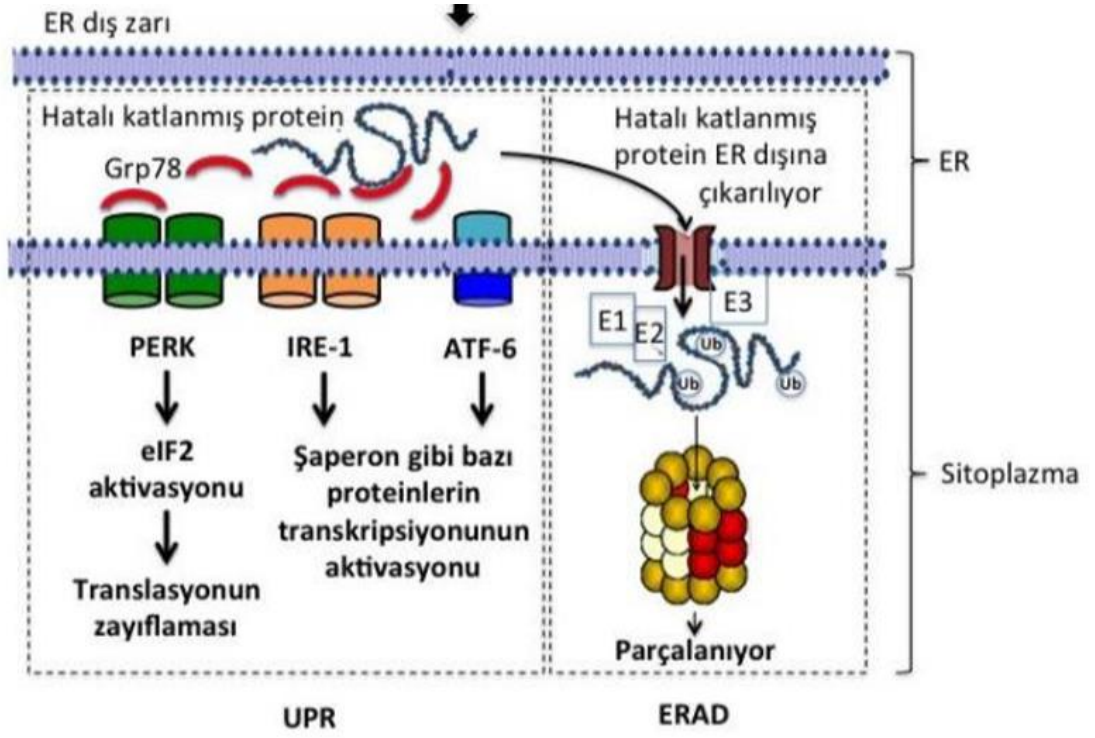
Şekil 2. 2. ERS moleküler akış şeması (Remondelli ve Renna, 2017)

GRP78/BIP

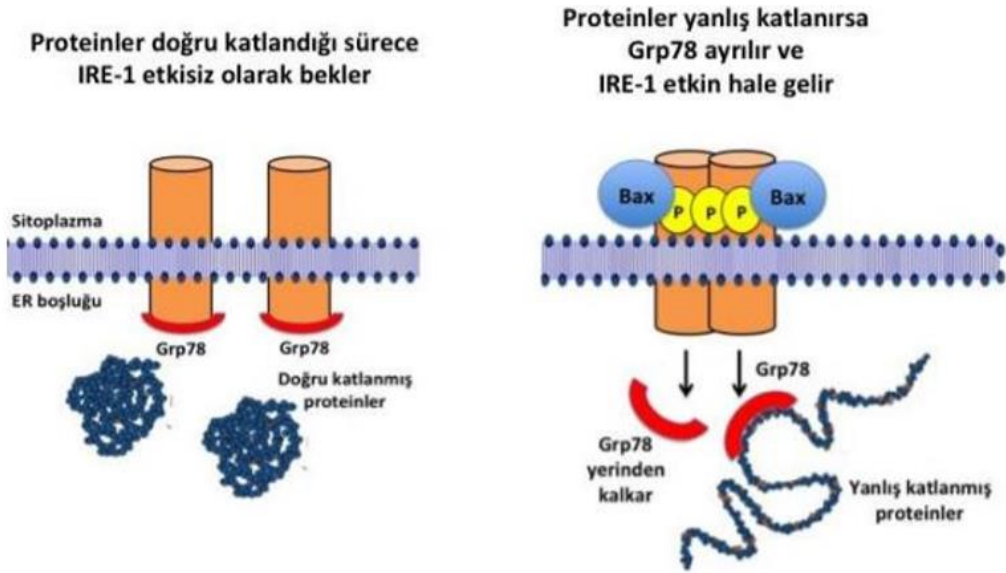
İmmüoglobulin ağır zincir bağlayıcı protein (BIP) olarak da adlandırılan GRP78 (HSPA5), ısı şoklu protein-70 (HSP70) ailesinin bir üyesidir ve ER'da yanlış katlanan proteinlerin düzeltilmesinde rol alır (Kober ve ark., 2012). Uygun protein katlanmasını kolaylaştıran, sitosol, çekirdek, mitokondri ve hücre yüzeyi dahil olmak üzere çoklu hücresel bölmelerde çeşitli işlevler gerçekleştiren, katlanmış proteinleri koruyan moleküler bir şaperondur ve protein ara maddelerinin endoplazmik retikulumda (ER) birikmesini önler (Lee, 2005; Stetler ve ark., 2010; Ni ve ark., 2011). Isı şoku proteinleri (HSP-heat shock protein) ilk kez *Drosophila melanogaster*'de tespit edilmiştir. HSP'ler stres proteinleri olarak da bilinmektedir. Yüksek sıcaklık, pH değişikliği, oksijen eksikliği, glukoz yetersizliği, infeksiyon, inflamasyon, ağır metaller veya anti-kanser ajanları vasıtasıyla hücrede stress durumu olduğunda, hücrede sentezi artarak proteinlerin yanlış katlanmasını önler (Garrido ve ark., 2006; Hartl ve ark., 2011). HSP70 ailesinin üyesi bir şaperon protein olan GRP78/BIP (78 kDa Glucose-Regulated Protein veya Binding Immunoglobulin Protein) bir çok organizmada bulunur. Proteinleri agregasyondan korumak, yanlış katlanmış proteinleri açarak yeniden katlanmalarını sağlamak veya yıkılmaları için uygun hale getirmek gibi işlevlere sahiptir (Verghese ve ark., 2012). İnsanlarda HSPA5 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Hendershot ve ark., 1994). BIP,ER lümeninde yer alan ve yeni sentezlenmiş proteinleri ER'a aktarıldıklarında bağlayan ve bunları daha sonra katlanıp oligomerizasyon için

yetkin bir durumda tutan bir HSP70 moleküler  aperondur. K12 hücreleri glikoza a  bırakıldığında, glikoz düzenlenmiŐ proteinler (GRP'ler) olarak bilinen proteinlerin sentezi artar. BIP hücre içinden dıŐa salındığı zaman güçlü immünolojik aktiviteye neden olur. Anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar sinyalleri immün ağlara bağlanmasını indükleyerek inflamasyonu gidermeye yardımcı olur. Monositlerin yüzeyindeki bir reseptöre bağlanarak anti-inflamatuar sitokin salgılanmasını indüklediği, T-lenfosit aktivasyonunda rol alan kritik molek leri k  lt ğ  ve monositlerin dendritik hücelere farklılaŐma yolunu düzenlediği gösterilmiştir (Corrigall ve ark., 2004; Panayi ve ark., 2004; Corrigall ve ark., 2009). BIP, yanlış katlanmış proteinleri düzelterek ER stresi tarafından tetiklenen nöronal hücre ölümünü önler (Anttonen ve ark., 2005; Corrigall ve ark., 2009).

ER lümenindeki hipoksik durumlar, Ca^{+2} tükenmesi, glukoz yoksunluğu, mutant proteinlerin ekspresyonu stresi tetiklemektedir. Stres durumunda GRP78/BIP mitokondride lokalize olarak mitokondri enerji dengesinin düzenlemesinde rol alır (Ni ve ark., 2011). GRP78/BIP, proteinler yanlış katlanıp ardından ER'da biriktiğinde ortaya çıkan katlanmış protein yanıtında (UPR)  zellikle önemli bir rol oynar. UPR'nin ana yolakları, GRP78, ER transmembran proteinleri PERK, IRE1  ve ATF6 ayrıldığı zaman aktive olur (Shen ve ark., 2002).



Şekil 2. 3. ER da hatalı katlanmış protein yanıtı moleküler akış şeması (KARKİN, 2019).



Şekil 2. 4. GRP78'in protein katlanmasındaki rolünü gösteren şematik çizim(KARKİN, 2019).

CHOP

C/EBP'lerin baskın bir negatif inhibitörü olarak görev yapan CHOP proteini CCAAT arttırıcı bağlayıcı proteinlerin (C/EBP'ler) bir üyesi insanda CHOP169 veya kemirgenlerde CHOP 168 amino asit kalıntıları içeren bir 29kDa proteindir (Corrigall ve ark., 2004). DNA hasarı ile indüklenebilen gen 153 (GADD153), DNA hasarı ile indüklenebilir transkript 3 (DDIT3) ve C/EBP olarak bilinen GADD genleri, apoptoz için önemli, genotoksik stres ve büyüme durdurma sinyalleri tarafından indüklenen bir grup genlerdir (Matsumoto ve ark., 1996; Maytin ve ark., 2001). CHOP ekspresyonu ve çekirdekteki birikimi, ER stresi ile indüklenen apoptoz sırasında katyonik olarak yukarı doğru düzenlenirken, glukoz yoksunluğu ve amino asit açlığı gibi besin kısıtlamalarında tetiklenmektedir (Lu ve ark., 2014). BIP'in aşırı ekspresyonu stres zamanı CHOP u indükleyerek hücre döngüsünü düzenler ve strese karşı apoptozu engeller (Maytin ve ark., 2001; Oyadomari ve ark., 2001; Gotoh ve ark., 2002; Oyadomari ve Mori, 2004). Uzun süreli ER stresi, UPR ile aktive olan CHOP yoluyla kısmen apoptozu tetikler. CHOP, ER ve katlanma proteinlerinin ER'de ve oksidatif streste birikimi ve toplanmasını bağlayan kritik bir aracı olarak yükselir, ayrıca artan insülin talebi koşulları altında hücrede apoptozun indüklenmesine katkıda bulunur (Li ve ark., 2009).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Çalışmamızı insan endometriyumu ve küretaj materyalleri üzerinde gerçekleştirdik. Gruplar aşağıdaki şekilde planlanlandı.

Grup 1. Sağlıklı kontrol grubu (endometriyum örnekleri) (n:6)

Grup 2. İstemli sonlandırılmış (İSG- İstemli Sonlandırılmış Gebelik) ilk trimester gebelik grubu (n:6)

Grup 3. İlk trimester ATGK grubu (n:6)

Endometriyum, İSG ve ATGK gruplarından elde edilen örnekler desidua ve koryon olarak ayrılarak, bu örneklerde GRP78 ve CHOP proteinlerinin lokalizasyonları immünohistokimyasal olarak değerlendirildi.

3.2. Materyallerin Toplanması ve Doku Takibi

Gruplara ait insan materyalleri gerekli onam belgeleri alınarak Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi ve özel muayenehanelerden toplandı. Örnekler buzlu kap içerisinde hızlı bir şekilde laboratuvara getirilerek 2. ve 3. gruptaki materyallar, önceden hazırlanmış heparin eklenmiş serum fizyolojik ile kanından arındırılana kadar yıkandıktan sonra, steriomikroskop altında desidua ve koryon örnekleri dikkatli bir şekilde ayrıldı. Örnekler %10'luk formaldehit ile 1 gece fikse edildikten sonra çeşme suyunda 3 saat yıkandı. Sonra dehidrasyon için %50, %70, %80, %90 alkol serilerinde 1 gece, %100 alkolde ise 4 saat bekletildi. Dehidrasyon işleminden sonra dokular şeffaflaştırma işlemine tabi tutularak, şeffaflaştırma ksilol 1, ksilol 2, ksilol 3'te 5'er dakika kadar tutularak yapıldı. Örnekler daha önceden eritilmiş süzölmüş parafinde 60°C etüvde 3 kez 1'er saat parafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Takip edilen dokular parafin içine doğru oryantasyonda gömülerek bloklandı. Bloklardan mikrotom ile normal polilizinli ve pozitif şarjlı lamlara 5 µm kalınlıkta kesitler alındı.

3.3. Hematoksilen-Eosin (H&E) Boyama

Polilizinli normal lamlara alınan kesitlere Hematoksilen-Eozin boyaması yapılarak toplanan örneklerin morfolojik değerlendirilmesi ve bölge tayinleri yapıldı. Deney

gruplarından elde edilen desidua ve koryon örneklerinin her birinden polilizinli lamlara alınan kesitler, boyama yapmadan bir gece önce 60 °C etüvde bekletilerek kesitin slayta yapışması sağlandı. Boyama yapılacak slaytlar 10'ar dk. ksilol 1–2 serilerinden, 5'er dk. %100–90–80–70 alkol serilerinden geçirildikten sonra, 10 dk. suda bekletilerek rehidratasyonu sağlandı. 1-1.5 dk. süzölmüş hemotoksilen ile boyaması yapılarak ve çeşme suyu ile yıkanarak morartıldı. 15-30 sn eosin ile boyaması yapılarak ve bol su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı. Ardından seri bir şekilde %70–80–90 alkol serilerinden bekletmeden geçirilerek ve 5 dk. %100 alkolde bekletildi. 10'ar dk. ksilol 1-2'de bekletildikten sonra entellan ile preparatlar kapatıldı. Preperat kuruduktan sonra kesitler 10X ve 40X büyötmelerde fotoğraflandı.

3.4. İmmunohistokimya Yöntemi

Desidua ve koryon örneklerinde GRP78, CHOP, Sitokeratin, Vimentin immunohistokimyasal boyamaları yapıldı.

Kullanılacak Solösyonlar

PBS (Phosphate Buffered Saline –Fosfat tamponlu tuz Solösyonu)

- 7.2 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 0.8 gr KH_2PO_4
- 16 gr NaCl

Bu kimyasallar 2 litre distile su içerisinde çözüldükten sonra 2 N NaOH ile pH'sı 7.4 olacak şekilde ayarlandı.

- Sitrat Tamponu

- 2.1 gr sitrik asit
- 900 ml distile su
- 900 ml distile suda sitrik asit çözüldükten sonra pH 6'ya ayarlandı.

-% 3'lük H_2O_2 solösyonu

- 63 ml metanol
- 7 ml %35'lik H_2O_2 alüminyum folyo ile sarılmış şale içerisinde hazırlandı.

-Bloklama Solösyon: Ultra V Blok

-Antikor Dilüent Solüsyonu: Antibody Diluent Reagent

-Streptavidin Peroksidaz Kompleksi

- Kromojen Substrat: DAB kromojen +DAB Substrat

Mayer'in Hematoksilen Boyası

Kesitler 1 gece 60°C etüvde bekletildi. Preparatlar 10'ar dakika ksilol 1 ve ksilol 2'den tutularak %100-%90-%80-%70 alkol serilerinden 5'er dakika bekletildikten sonra, 5 dakika distile su içerisinde bekletildi. Mikrodalga fırında 3 kez 7'er dakika kaynatıldıktan sonra kesitler 20 dk ağzı kapalı şekilde etüv içinde soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizilerek, PBS içinde 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra, %3'lük H₂O₂ içinde 15 dk oda ısısında bekletilerek, yeniden PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanarak ve ardından UV bloklama solüsyonuyla 7dk. bloklandı. Daha sonra önceden optimizasyonu yapılarak belirlenen dilüsyon oranlarında primer antikor damlatılarak +4°C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra, önceden optimizasyonu yapılarak belirlenen dilüsyon oranlarında sekonder antikor ilave edilerek 30dk oda ısısında bekletildi. Daha sonra PBS'le 3 kez 5'er dakika yıkanarak preparatlar streptoavidin damlatılarak 20 dk inkübe edilmeye bırakıldı. İnkübasyon sonunda preparatlar PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanıp, daha sonra DAB damlatılarak ışık mikroskobu altında reaksiyonun gerçekleşmesi izlendi. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapılarak, akar musluk suyunda yıkandı. Yıkamayı takiben ardından artan alkol serilerinden geçirilerek (%70-%80-%90-100) suyu giderildi. Ksilol 1 ve ksilol 2'de 10'er dakika olacak şekilde bekletilerek entellan ile kapatıldı. Entellan kurutulduktan sonra ışık mikroskobunda resimleri çekilerek ve H-skor programı kullanılarak analizi yapıldı. Kullanılan antikorların dilüsyonları ve katalog no'ları Tablo 3.1 verilmiştir.

Tablo 3. 1. İmmunohistokimyasal analizlerde kullanılan primer ve sekonder antikor ve dilüsyon oranları

Primer Antikor	Katalog numarası	Dilüsyon	Sekonder Antikor	Katalog numarası	Dilüsyon
GRP78	C50B12 cell signaling	1/800	Biotinylated Goat anti-rabbit	BA-1000 Vector	1/400
CHOP	K3011 santa kuruz	1/50	Biotinylated Goat anti-rabbit	BA-1000 Vector	1/400

İstatistiksel Analizler:

Slaytlar H-SCORE analizi ile semikantitatif olarak değerlendirildi. Özellikle CHOP ve GRP78 için immünboyanma yoğunluğu semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve skorlandı. Skorlamada: 0, hiç boyanma yok; 1, zayıf, fakat belirlenebilir boyanma; 2, orta derecede boyanma; ve 3, yoğun boyanma olarak hesaplama yapıldı. H-SCORE değeri, her bir yoğunluk katagorisinde boyanan hücrelerin yüzdeleri eklenerek ve bu değerlerin boyanan ağırlıklı yoğunluğu ile çarpılmasıyla elde edildi.

H-SCORE = $\sum i_i \times P_i$ formülü kullanıldı.

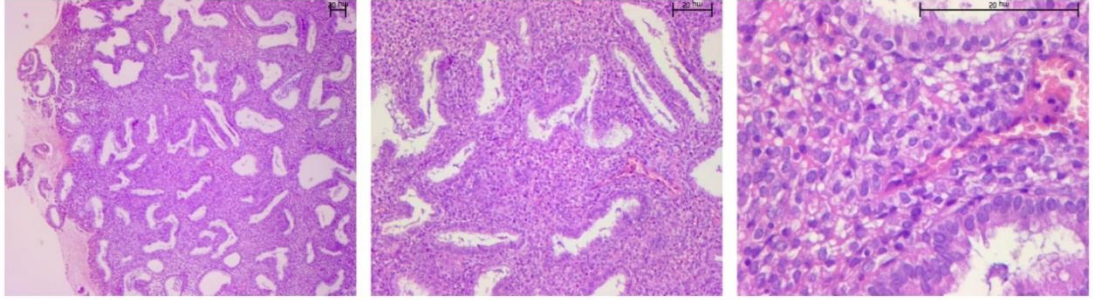
P_i yoğunluk puanları alınan kesitte hücrelere karşılık gelen yüzdendir. Her slaytta 40X büyütmede rastgele seçilen üç alan ışık mikroskobu altında değerlendirildi. H-SCORE farklı zamanlarda iki farklı gözlemci (Dr. Esmâ KIRIMLIOĞLU ve Farida QULİEVA) tarafından belirlendi ve her iki gözlemcinin ortalama puanı daha sonra her örnek için H-SCORE olarak kullanıldı.

Gruplar arasında; Maternal H-SCORE, Bonferroni-post hoc testiyle tek yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldı. Fetal H-SCORE için ise Student-t-testi kullanıldı. Veriler, $P < 0,05$ 'te istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur.

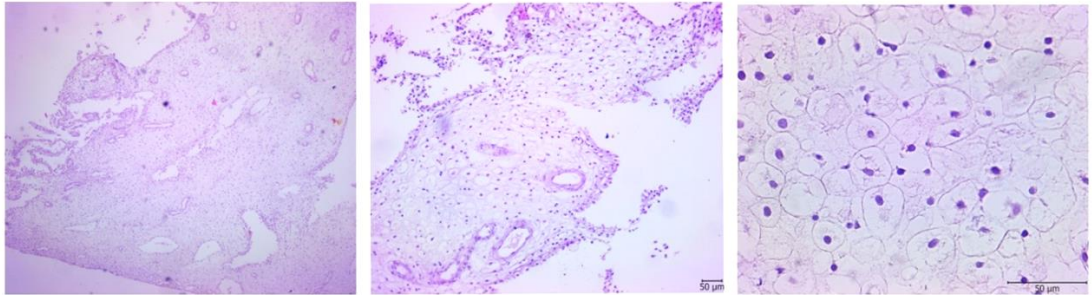
4. BULGULAR

Bu çalışmada sebebi bilinmeyen gebelik kayıplarında ERS proteinlerinin rolünü belirlemek amacıyla GRP78 ve CHOP immunohistokimya boyamaları yapıldı. Normal gebe olmayan endometriyum (Kontrol), istemli sonlandırılmış gebe (İSG-Termination Pregnancy) ve sebebi anlaşılamamış tekrarlayan gebelik kayıpları (ATGK- Unexplained Recurrent Pregnancy Loss) yaşamış 1. trimesterdeki hastaların desidua ve koryon örneklerinde GRP78 ve CHOP proteinlerinin immunohistokimyasal analizleri yapıldı. ATGK ve İSG gruplarına ait bulgular birbirleriyle ve normal endometrim bulgularıyla karşılaştırıldı.

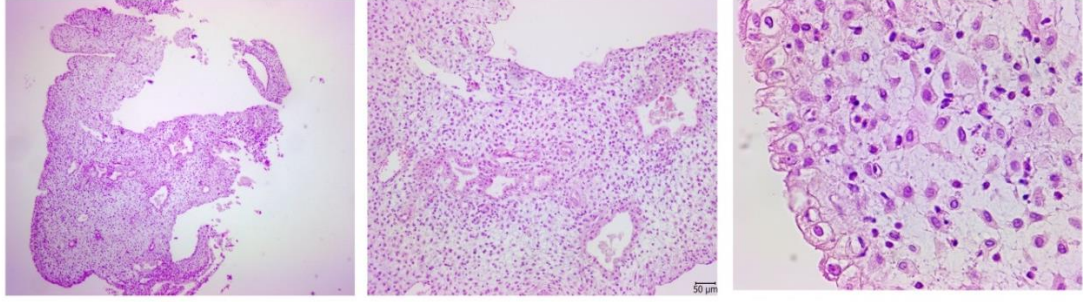
Gruplara ait örneklerde HE boyamalarıyla kesit bölgelerindeki doku ve yapılar tanımlandı. Bu örneklerde benzer alanlarda immunohistokimyasal boyamalar gerçekleştirilerek değerlendirmeleri yapıldı. Endometriyumda stromal hücreler, glandular ve lüminal epitel hücrelerinde immunreaktivite kalitatif ve semikantitatif (H-SCORE) olarak değerlendirildi.



Şekil 4. 1. KE stroma H.E boyaması (A:4X-B:10X-C:40X)



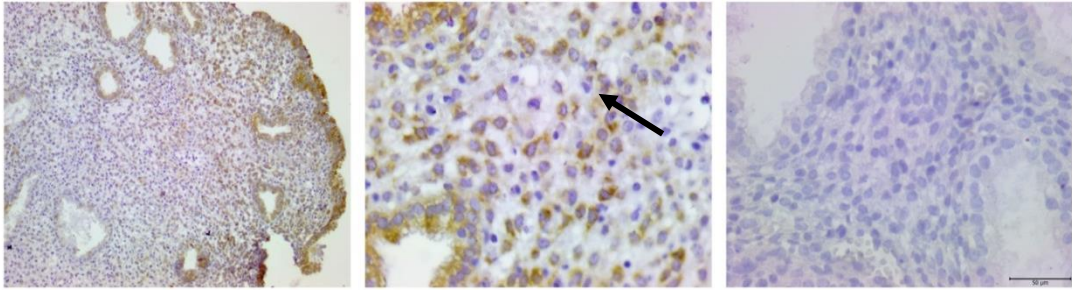
Şekil 4. 2. İSG desidua H.E boyaması (A:4X-B:10X-C:40X)



Şekil 4. 3. ATGK desidua H.E boyaması (A:4X-B:10X-C:40X)

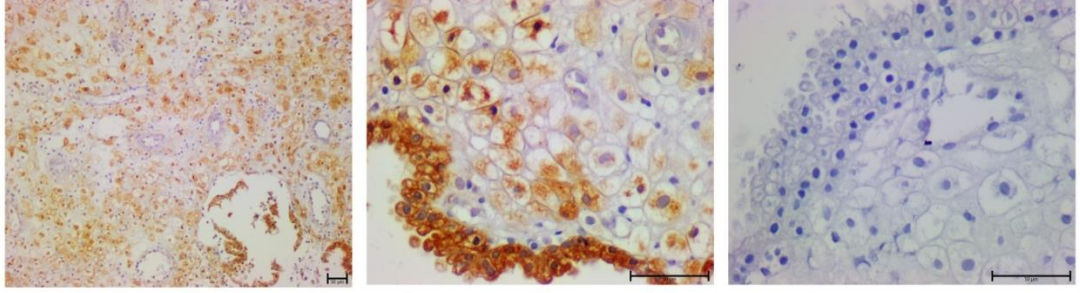
4.2. GRP78 İmmunreaktivitesi

Endometriumda glandular epitelde GRP78 hafif şiddetli sitoplazmik ekspresyon gösterirken nüklear ekspresyon izlenmedi. GRP78 pozitif hücrelerde immünreaktivite özellikle hücrelerin apikal sitoplazmasında daha yoğun izlenmekteydi. Endometrium stromal hücreler GRP78 immünreaktivitesi bakımından negatifti. Stromal hücrelerde ne sitoplazmik ne de nüklear reaksiyon izlendi. Endometrial damar endotel hücreleri de stromal hücrelere benzer şekilde herhangi bir GRP78 ekspresyonu göstermiyordu (şekil 4.4).



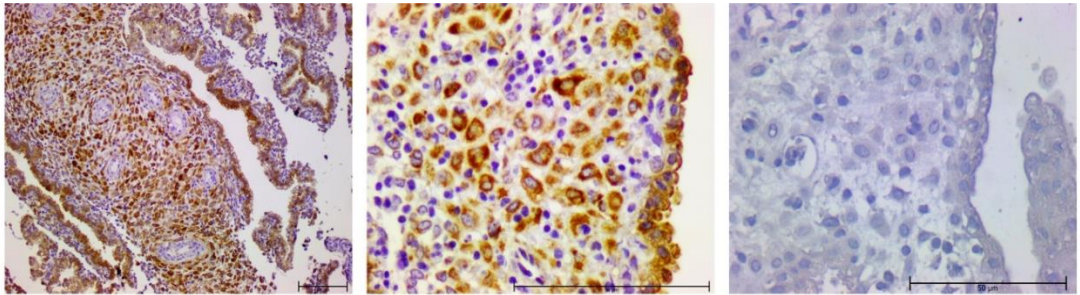
Şekil 4. 4. Gebe olmayan Kontrol grubu endometriyumlarında eksprese edilen GRP78 immünreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (Damar: Ok) (A:10X-B:40X-C:40X)

İSG desiduasında Kontrol'le benzer şekilde lümen epiteli yoğun sitoplazmik GRP78 ekspresyonu gösterirken stromal hücrelerde boyanma farklılık göstermekteydi. Desidua hücrelerinin bir bölümü yoğun sitoplazmik ekspresyon gösterirken bazı hücreler hem nüklear hem sitoplazmik ekspresyona sahipti (Şekil 4.5)

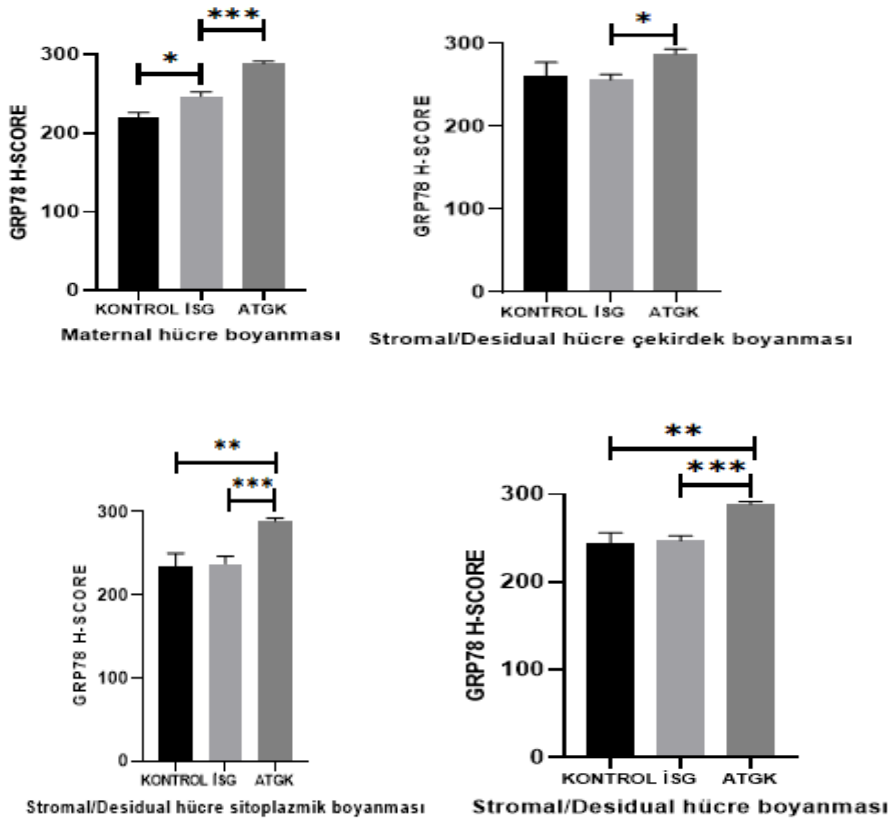


Şekil 4. 5. İSG grubu desidua örneklerinde eksprese edilen GRP78 immünoreaktivitesi ve negatif control boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)

ATGK grubuna ait örneklerde ise gland ve lümen epiteli yoğun olarak hem sitoplazmik hem nüklear ekspresyon göstermekteydi. Bu grupta stroma diğer gruplara göre oldukça fazla sayıda lenfosit içermekteydi. Lenfositler GRP78 immünoreaktivitesi bakımında negatif özellik göstermekteydi (Şekil 4.6).

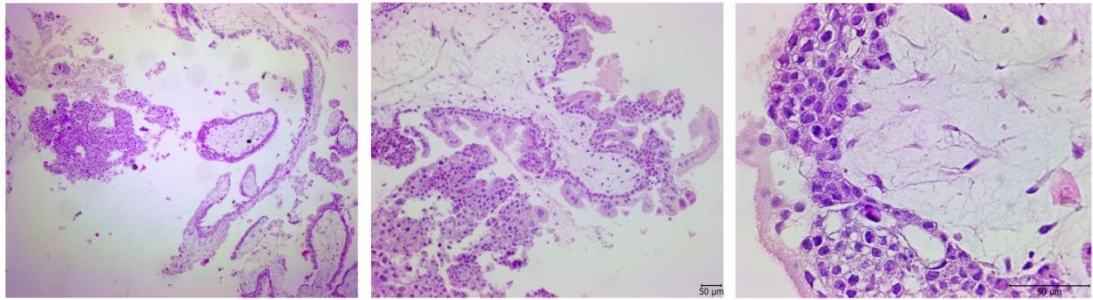


Şekil 4. 6. ATGK grubu desidua örneklerinde eksprese edilen GRP78 immünoreaktivitesi negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)

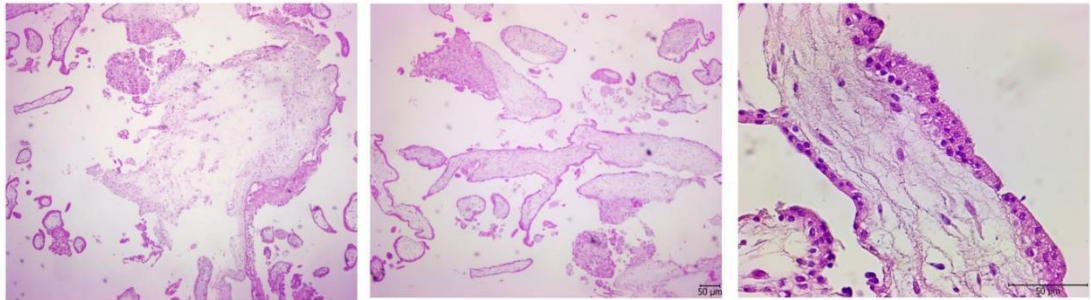


Şekil 4. 7. Kontrol, İSG ve ATGK grubu stroma/Desidua'sında eksprese edilen GRP78 proteinin semi-kantitatif H-SCORE analizi sonuçları

Maternal kısımda GRP78 ekspresyonunu H-SCORE analizine göre değerlendirdiğimizde tüm maternal kısımdaki hücrelerde GRP78 ekspresyonunda hem İSG grubunda Kontrol'e göre (P=0.02) hem de ATGK grubunda İSG grubuna göre (P<0.001) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ekspresyon gözlenmiştir. Stromal/Desidual hücrelerde GRP78 nuklear ekspresyonu, İSG'de Kontrol'e göre daha düşük ekspresyon izlenirken, ATGK grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan yüksek ekspresyon göstermiştir. Aynı hücrelerde ATGK grubunda İSG grubuna göre sadece nuklear olarak GRP78 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek ekspresyon izlenmiştir (P=0.03). Stromal/Desidual hücrelerde ATGK grubunda, Kontrol grubuna göre (P=0.002) İSG grubuna göre (P<0.001) ise sitoplazmik olarak GRP78 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek ekspresyon izlenmiştir. Stromal/Desidual hücrelerin totalinde, ATGK grubunda, Kontrol grubuna göre (P=0.004) İSG grubuna göre (P<0.001) ise GRP78 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek ekspresyon izlenmiştir (Şekil 4.7).



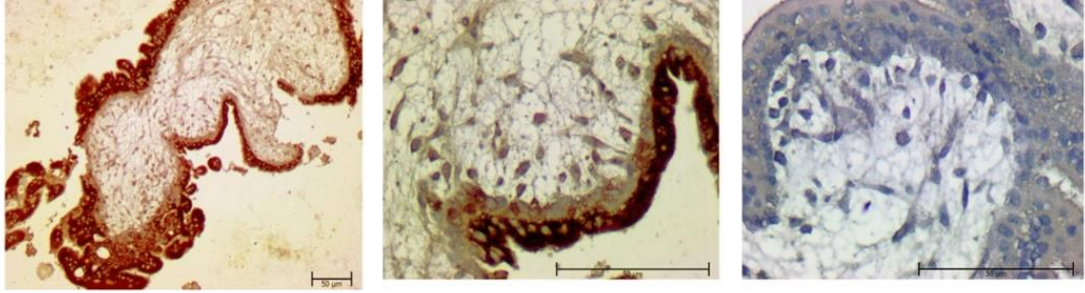
Şekil 4. 8. İSG örneklerinden alınan koryon villus fotomikrografları (H-E) (A:4X-B:20X-C:40X)



Şekil 4. 9. ATGK örneklerinden alınan koryon villus fotomikrografları (H-E) (A:4X-B:10X-C:20X)

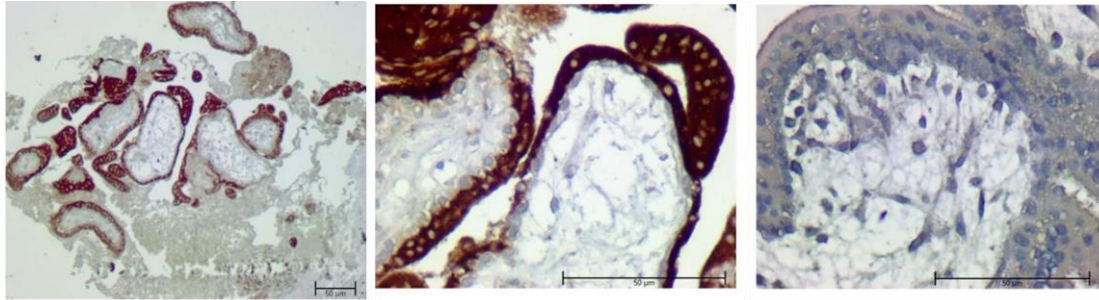
İSG grubu koryon örneklerinde sinsisyotrofoblastlarda şiddetli GRP78 ekspresyonu izlenirken sitotrofoblastlarda daha zayıf bir ekspresyon görülmekteydi. Villus stroma

hücrelerinde hafif nükleer ekspresyon belirlendi. Damar endotel hücrelerinde ise GRP78 ekspresyonunun olmadığı belirlendi (Şekil 4.10)

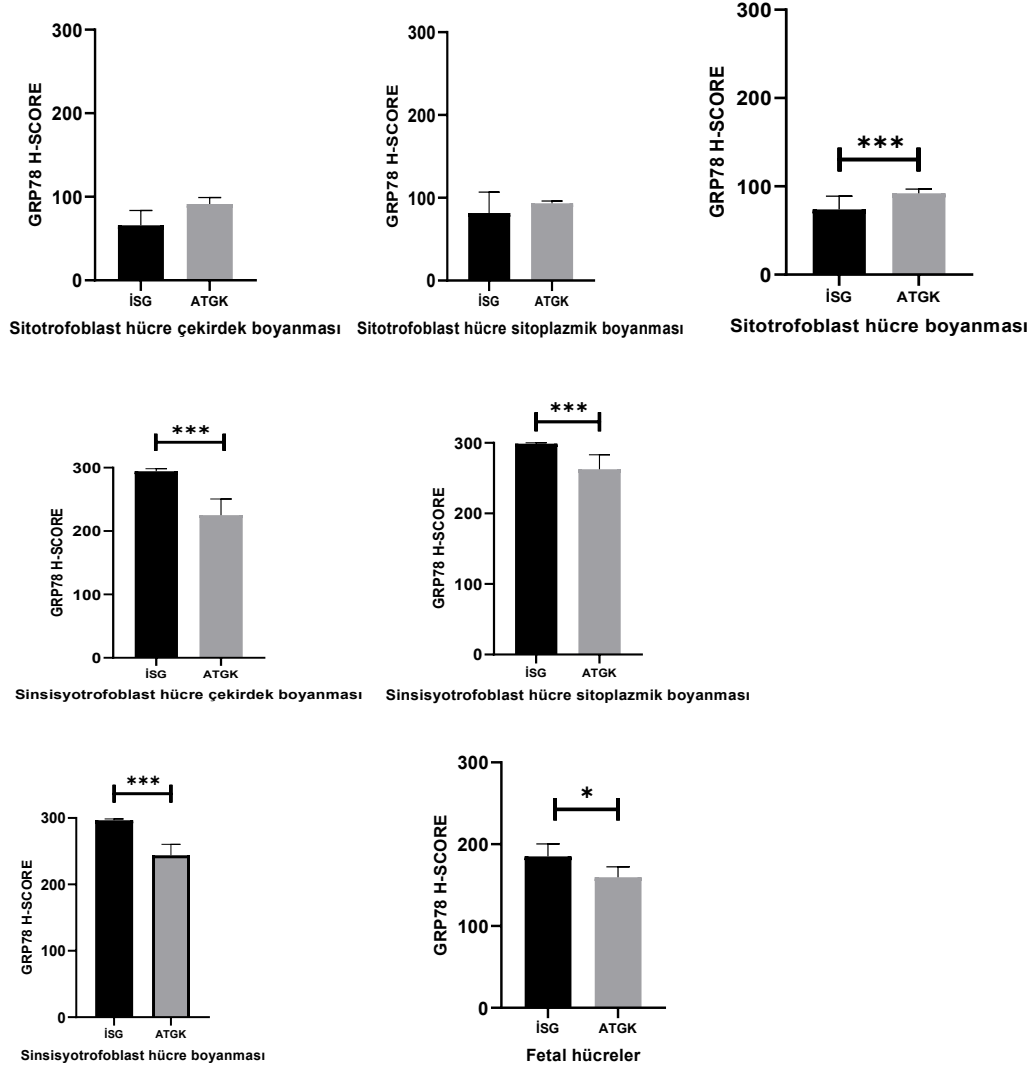


Şekil 4. 10. İSG grubu koryon villus örneklerinde eksprese edilen GRP78 immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)

ATGK grubu koryon örneklerinde normal gebelik grubu örneklerindeki koryon villusuna benzer şekilde trofoblast tabakasında GRP78 ekspresyonu görüldü. Bu grupta İSG grubuna benzer şekilde sisnsiyotrofoblast tabakasında şiddetli immunreaktivite görüldü. ATGK grubu örneklerinin sitototrofoblast hücreleri ise İSG grubunun aksine GRP78 immünoreaktivitesi bakımından tamamen negatifti. Aynı şekilde stromal kapiller endotelinde de GRP78 boyanması izlenemiyordu (Şekil 4.11).



Şekil 4. 11. ATGK grubu koryon villus örneklerinde eksprese edilen GRP78 immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)



Şekil 4. 12. İSG ve ATGK grubu Fetal kısımda eksprese edilen GRP78 proteinin semi-kantitatif H-SCORE analizi sonuçları

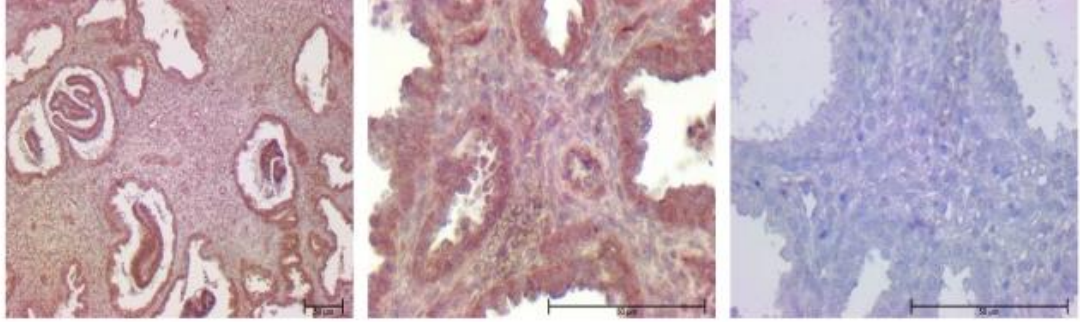
Fetal kısımda GRP78 ekspresyonunu H-SCORE analizine göre değerlendirdiğimizde sitotrofoblastlarda hem nüklear hem de sitoplazik olarak GRP78 ekspresyonu daha yüksek bulunmuştur. Bu durum sitotrofoblast hücrelerinin totali değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Sinsisyotrofoblast tabakasında ise hem nüklear hem de sitoplazik olarak GRP78 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük izlenmiştir (Şekil 4.12).

4.3. CHOP İmmunreaktivitesi

Endometriyumda glandular epitel sitoplazmasında yoğun CHOP ekspresyonu izlenirken stromal hücrelerin bir bölümünde sadece nüklear ekspresyon izlendi. Gland epiteli ile stromal hücreler arasında CHOP ekspresyonunun farklı yerleşimi dikkat çekiciydi. 2012 yılına kadar CHOP ekspresyonunun lokalizasyonu nüklear

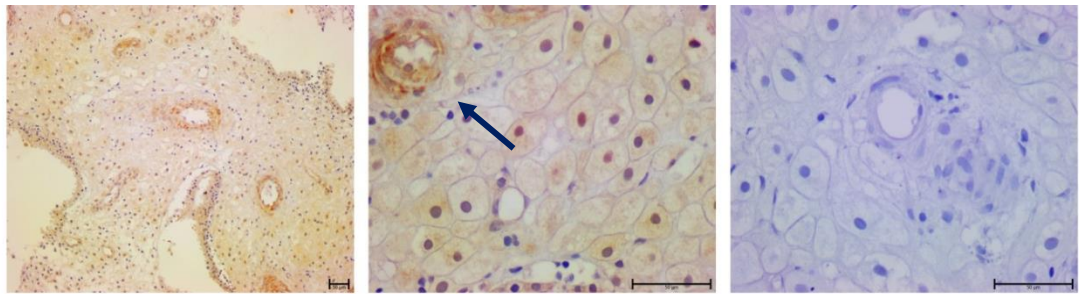
olarak tanımlamasına rağmen (Jauhiainen ve ark., 2012) yaptığı çalışmada CHOP ekspresyonunun hem nüklear, hem sitoplazmik olarak gözlenebileceği ifade edilmiştir.

CHOP un genellikle nüklear ekspresyon göstermesi nedeniyle bu bulgu dikkat çekici olarak değerlendirilmiştir. Literatür bilgisine dayanılarak (Jauhiainen ve ark., (2012) boyanmanın spesifik olabileceği kanatine varılmıştır.(Şekil 4.13)



Şekil 4. 13. Kontrol grubu endometriyum örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)

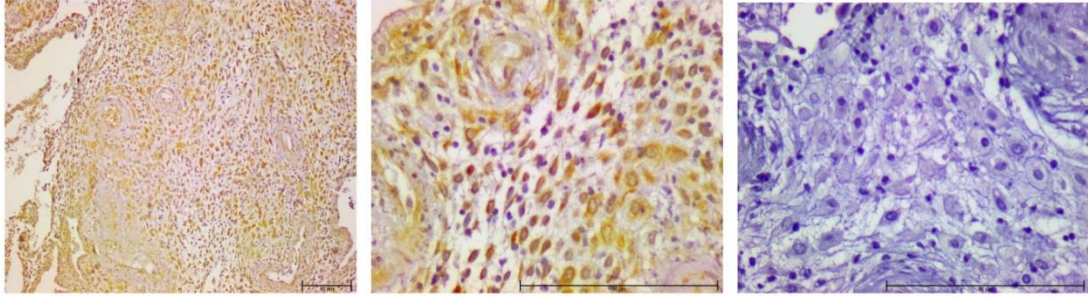
İSG grubuna ait desidua örneklerinde CHOP ekspresyonu desidual hücrelerde şiddetli nüklear, zayıf sitoplazmik ekspresyon göstermekteydi. Damar endotelinde genel olarak CHOP ekspresyonu sitoplazmik olarak izlenirken, perivasküler alanda yer alan hücrelerde şiddetli nüklear, orta derecede sitoplazmik CHOP ekspresyonu görüldü (Şekil 4.14)



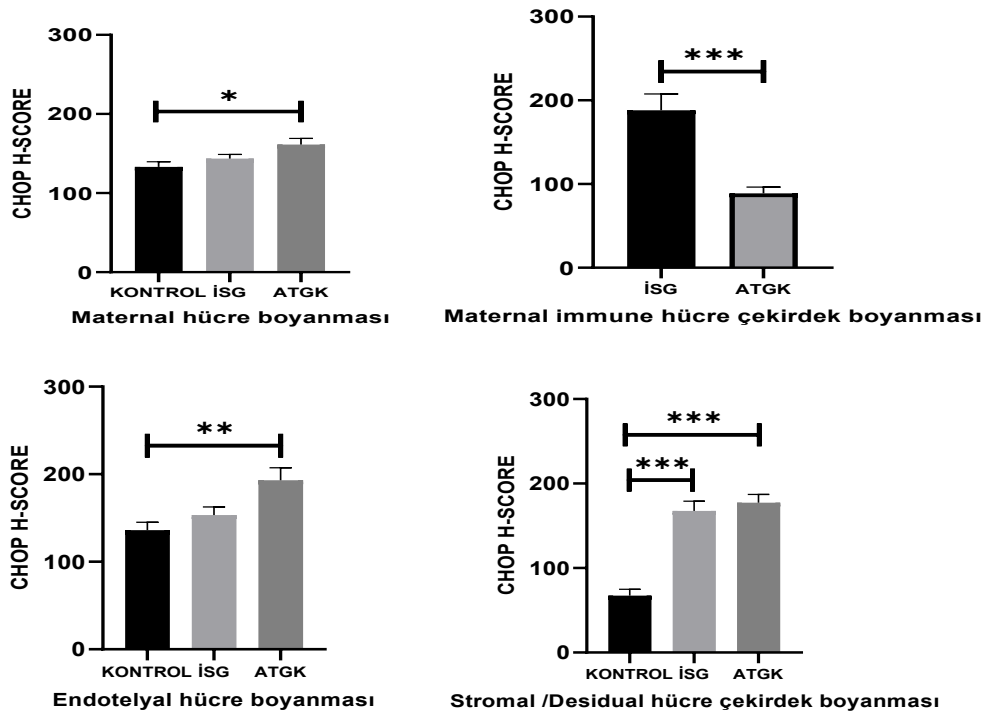
Şekil 4. 14. İSG grubu desidua örneklerinde örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması. (Ok: peri vasküler boyanma) (A:10X-B:40X-C:40X)

ATGK grubuna ait desidua örneklerinde desidual hücreler sitoplazmik ve nüklear CHOP ekspresyonları göstermekteydi. Özellikle perinüklear sitoplazmada şiddetli CHOP ekspresyonları izlenmekteydi. İstemli sonlandırılmış gebeliklerde CHOP ekspresyonu göstermeyen desidual hücreler, oldukça bol miktarda izlenirken, ATGK grubuna ait desidua örneklerinde tüm desidual hücreler CHOP ekspresyonu

göstermekteydi. Desidua'da izlenen maternal immün hücrelerin bir bölümünde şiddetli nüklear CHOP ekspresyonu izlendi. (Şekil 4.15) .



Şekil 4. 15. ATGK grubu desidua örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoaktivitesi ve negatif kontrol boyanması. (A:10X-B:40X-C:40X)

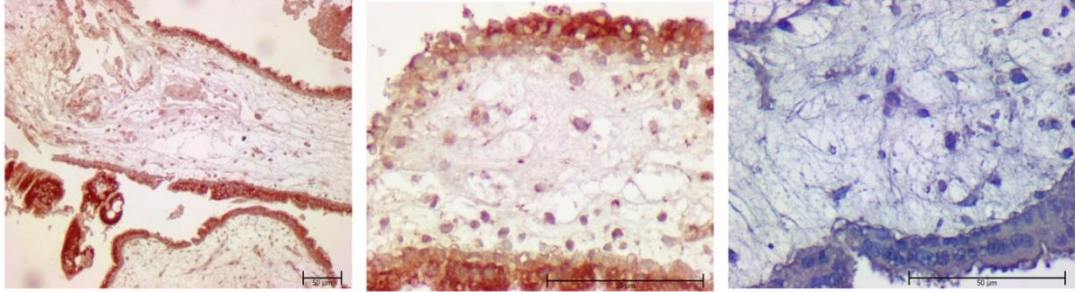


Şekil 4. 16. Kontrol, İSG ve ATGK grubu stroma/Desidua'sında eksprese edilen CHOP proteinin semi-kantitatif H-SCORE analizi sonuçları

Maternal kısımda CHOP ekspresyonunu H-SCORE analizine göre değerlendirdiğimizde Tüm maternal kısımdaki hücrelerde CHOP ekspresyonunda ATGK grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (P=0.02) Desidua haricinde izlediğimiz ve maternal immün hücreler olabileceğini öngördüğümüz hücrelerde ise ATGK grubunda İSG grubuna göre sadece nüklear olarak CHOP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ekspresyon belirlenmiştir (P<0.0001). Endotel hücrelerinin totalinde ATGK grubunda Kontrol'e göre CHOP ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Desidual hücrelerde ise İSG ve ATGK grupları Kontrol'e

kıyasla CHOP nüklear ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (her ikisinde $P < 0.001$) (Şekil 4.16).

Normal gebelik koryon villus örneklerinde CHOP ekspresyonu sinsisyum tabakasının sitoplazmalarında yoğun olarak izlenmektedir. Sitotrofoblastlarda ise hafif sitoplazmik ekspresyon izlenmektedir

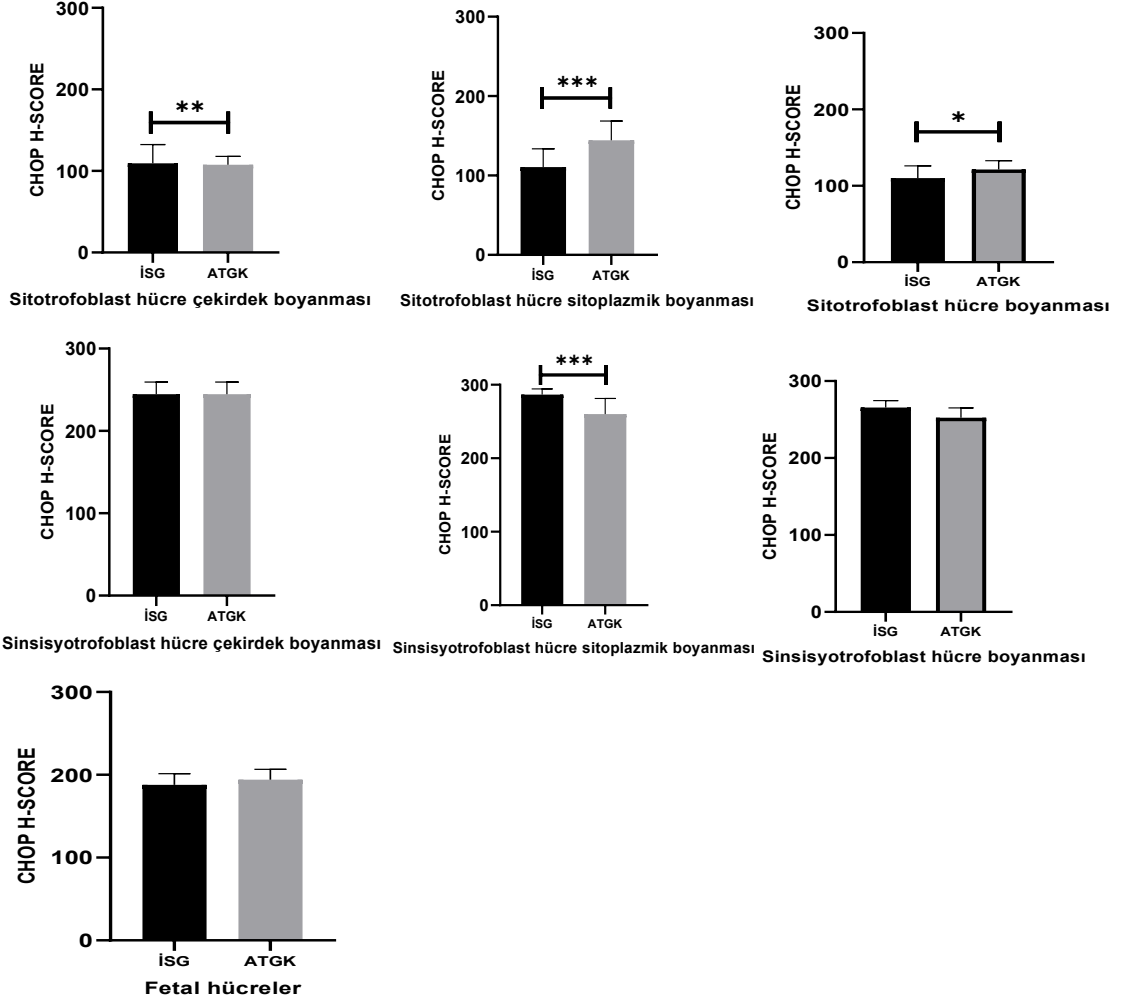


Şekil 4. 17. İSG grubu koryon örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoreaktivitesi ve negatif kontrol boyaması (A:10X-B:40X-C:40X)



Şekil 4. 18. ATGK grubu koryon örneklerinde eksprese edilen CHOP immünoreaktivitesi ve negative kontrol boyaması (A: 10X-B:40X-C:40X)

ATGK grubu koryon villus örneklerinde CHOP ekspresyonu İSG grubuna benzer şekilde sinsisyum ve sitotrofoblastlarda görülmekteydi. Ekspresyon düzeyi bu grupta da şiddetli olmakla birlikte kürtaj grubuna göre bir miktar daha düşük ekspresyon gösterdi. Stromal hücrelerde kürtaj grubunun aksine bazı hücrelerde nüklear ekspresyon izlenmekteydi. ATGK villus stromasında yer alan bazı stromal hücreler şiddetli nüklear ekspresyon göstermekteydi. Koryon villus sinsisyumunda şiddetli CHOP ekspresyonu izlenirken sitotrofoblastlarda ekspresyon oldukça zayıf olarak izlendi.



Şekil 4. 19. İSG ve ATGK grubu Fetal kısımda eksprese edilen CHOP proteinin semi-kantitatif H-SCORE analizi sonuçları

Fetal kısımda CHOP ekspresyonunu H-SCORE analizine göre değerlendirdiğimizde sitotrofoblastlarda hem nüklear hem de sitoplazik olarak CHOP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (nükleusda $P < 0.0039$, sitoplazmasında $P < 0.565$, totalinde $P < 0.0280$). Sinsisyotrofoblast tabakasında ise sadece zayıf sitoplazik CHOP ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sitoplazmasında $P < 0.0005$, totalinde $P = 0.0618$ (Şekil 4.18).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda sebebi anlaşılmayan tekrarlayan gebelik kayıplarında ERS rolüne yaklaşımda bulunmak için endometrial, desidual ve plasental hücrelerde ERS proteinlerinden GRP78 ve CHOP ekspresyon düzeylerini değerlendirmeyi amaçladık. Gebeliğin sağlıklı devam edebilmesi için blastokistin sağlıklı implantasyonu ve sağlıklı bir plasental gelişimin gerçekleşmesi gerekmektedir. Spiral arter modellenmesindeki anormallikler, anormal vaskülarizasyon plasenta oluşumunda sorunlara sebep olarak gebelik kayıplarıyla sonuçlanabilen olumsuzluklara neden olabilmektedir. Şiddetli/ uzun süreli ER stres aracılı uyarılmış UPR sinyal yolları, bozulmuş ER homeostazının kurulmasında etkili olmasının yanı sıra, endometriozis, kanserler, tekrarlayan gebelik kaybı ve konjenital anomaliler dahil olmak üzere birçok patolojiye de katkı yaptığı bildirilmiştir (Guzel ve ark., 2017).

Erken embriyonik gelişim sırasında yüksek olan GRP78'in ekspresyonu düzeyi yaşlanma sürecinde daha düşüktür (Ni ve Lee, 2007; Pfaffenbach ve Lee, 2011). Simmons ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sıçanlarda yalancı gebeliğin 5. gününde uterus epitelyal GRP78 ekspresyonunun yüksek olduğu belirlenmiş ve bu durumun uterin sensitizasyonunun başlangıcında yer alan proteinlerin etkin biyosentezi ve salgılanması için özel olarak gerekli olabileceği yönünde yorumlanmıştır (Simmons ve Kennedy, 2000). GRP78 ekspresyonunun artması ERS tetiklendiğini gösterir (Barateiro ve ark., 2012). GRP78 insan endometriumu pars bazalisinde geç proliferatif fazda artış gösterir. Progesteronla ters korelasyondadır ve progesteron GRP78 seviyesini düzenleyerek ER homeostazına katkıda bulunur. Bu etki ROS ve enflamatuar sitokinlerin endometriumu alınımını sağlayarak endometriumda ERS ve UPR yolağını aktive eder. UPR, XBP1 aracılığıyla GRP78 ekspresyonunu artırır (Yoshida ve ark., 2001; Jabbour ve ark., 2006; Ron ve Walter, 2007). Hem glandular hem de stromal hücrelerde GRP78 ekspresyonu, hücre içi Ca^{++} dengesini, protein katlanmasını kontrol ederek UPR yolağını ve hücrestresi önleyerek endometrial doku homeostazının korunmasına katkıda bulunur (Guzel ve ark., 2011). Aşırı sitokin miktarı, artmış glikoz seviyeleri, yağ birikimi gibi metabolik koşullar ER stresi ve inflamasyona yol açarak ER'dan Ca^{++} salınımını ve ROS üretimini tetikler (K. Zhang ve Kaufman, 2008).

Lin ve ark. yaptıkları bir çalışmada GRP78'in belirgin bir şekilde fare desidual hücrelerinde yüksek olduğunu belirtmişlerdir (P. Lin ve ark., 2014). Buna karşılık, GRP78'in erken gebelik kaybı yaşayan hastalardan alınan desidual hücrelerinde düşük ekspresyona sahip olduğu tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2011). Aynı çalışmada desidualizasyonda uzun süren ERS indüklü apoptozun erken gebelik kayıplarında rol oynayabileceği de ileri sürülmüştür (Liu ve ark., 2011).

TGK olan kadınlarda HSPA5 'ler normal endometriumda menstrual siklus sırasında en düşük ekspresyon seviyesine sahiptir ve hatalı implantasyonda rol oynamaktadır (Guzel ve ark., 2011).

Çalışmamızda GRP78 ve CHOP immünohistokimyasal bulgularına baktığımızda ERS göstergesi olan GRP78 ekspresyonu ATGK grubu stromal hücrelerinde kontrole kıyasla farklılık göstermekteydi. Bazı hücreler yoğun sitoplazmik ekspresyon gösterirken bazı hücreler hem nüklear hem sitoplazmik ekspresyona sahipti.

Sağlıklı gebelikte, gebe olmayan gruba oranla stromal hücrelerde artan GRP78 ekspresyonu URPL grubunda daha da yüksek izlendi. Bu durum; İlk trimester gebeliğinde normal fizyolojik olarak uterusda artan inflamasyonun sonucu olarak UPR artmış olabilir. URPL grubunda GRP78 ekspresyonunun daha da artması bir etkene bağlı oluşmuş inflamasyonunda bir göstergesi olabileceği şeklinde değerlendirildi.

Apoptozda rol alan ERS proteini olan CHOP'un ekspresyonunun çekirdekde lokalizasyonu görülmüştür (X. Z. Wang ve ark., 1996). Çalışmamızda ATGK desidua örneklerinde, desidual hücrelerde ve perivasküler alanda yer alan hücrelerde şiddetli CHOP nüklear boyanmaları izendi. Bu bulgumuzu ATGK'de desidualizasyon ve vasküler modellenmede ERS'nin etkili olabileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirebiliriz.

Sonuçlarımızda tekrarlayan gebelik kaybı grubuna ait desidua örneklerinde CHOP ekspresyonu desidual hücrelerde zayıf sitoplazmik ekspresyon göstermekteydi. Damar endotelinde genel olarak CHOP ekspresyonu sitoplazmik olarak izlenirken, perivasküler alanda yer alan hücrelerde orta şiddette sitoplazmik ekspresyon tespit edildi. Sitoplazmik CHOP ekspresyonu gözlemlenmesi ERS 'nin baskılandığını düşündürmektedir.

2012 yılına kadar CHOP ekspresyonunun lokalizasyonu nüklear olarak tanımlamasına rağmen Jauhiainen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Jauhiainen ve ark., 2012) CHOP ekspresyonunun hem nüklear, hem sitoplazmik olarak gözlemlenebileceği ifade edilmiştir. Biz de bulgularımızda araştırmacıların öne sürdüğü gibi ATGK grubu koryon örneklerinde damar endotelinde şiddetli sitoplazmik CHOP ekspresyonu gözlemledik. Sitoplazmik CHOP ekspresyonu migrasyonla ilişkili genleri etkileyerek migrasyonu inhibe ettiği, nüklear ekspresyonun ise hücre döngüsünü G1 fazında arrest ettiği 2012 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. (Jauhiainen ve ark., 2012).

Koryon örneklerinde GRP78 immün boyanmaları sonucunda, ATGK hasta grubunun endometrial hücrelerinde istemli sonlandırılmış gruba kıyasla daha fazla lokalizasyon gözlemlendi.

İSG ve ATGK grubu desidual hücrelerinde GRP78 boyanma sonuçları değerlendirildiğinde her iki grup için de benzer düzeyde ekspresyonun varlığı belirlendi.

İstemli sonlandırılmış gebelik kayıplarından farklı olarak ATGK grubu desiduada izlenen maternal immün hücrelerde şiddetli nüklear CHOP ekspresyonu tespit edilmişti. Bildiğimiz gibi GRP78 den kurtulan ATF6 golgiye taşınarak aktif forma dönüşür. Aktif ATF6, CHOP ve GRP78 transkripsiyonunu sağlayarak ER şaperon proteinlerinin sentezinin artmasına ve ağır strese cevap olarak apoptozun indüklenmesine neden olur (Fu ve ark., 2015).

ATGK'ye ait örneklerin gland ve lümen epiteli hem sitoplazmik hem nüklear yoğun GRP78 ekspresyon gösterdi. Hücrede GRP78 sentezinin artması ERS varlığını gösterdiğinden (Ni ve ark., 2011) bu bulgumuzu ATGK hastalarda yaygın ERS varlığının kanıtı olarak değerlendirdik.

ATGK hastalarının koryon örneklerinde stromal hücrelerde, sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblastik hücrelerinde yoğun olarak nüklear GRP78 boyanması izledik. GRP78, ektopik olarak aşırı eksprese edildiğinde veya ERS ile indüklendiğinde çekirdekte de gözlemlendiğinden (Rao ve ark., 2002; Reddy ve ark., 2003), bu durum spesifik bir reaktivite olarak değerlendirildi. Bu durum, bu hastaların plasental hücrelerinde şiddetli bir apoptozun gerçekleştiğinin kanıtı olarak alınabilir. Şiddetli

stromal mezenşimal hücreler, sinsisyum ve sitotrofoblast apoptozu plasental yapılanmayı olumsuz etkileyerek gebelik kayıplarının nedenini oluşturuyor olabilir.

İSG ve ATGK hastalarının koryon örneklerinde sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast hücrelerinde hem sitoplazmik hem de nükleer GRP78 ve CHOP boyanması izlendi.

ATGK koryonunda sinsisyotrofoblast tabakasında GRP 78 şaperonundaki azalma bu hücrelerde ERS'nin normal gebeliğe göre azaldığını göstermektedir. Sitoplazmik CHOP ekspresyonundaki azalma ise migrasyon genlerin normal olması gerekenden daha fazla aktive edilerek patolojilere yol açarak kayba neden olabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

ATGK koryonunda sitotrofoblast hücrelerinde GRP78 şaperonundaki artış bu hücrelerde ERS'nin normal gebeliğe göre arttığını göstermektedir. ATGK grubu nükleer CHOP ekspresyonundaki artış ise artan ERS'nin bu hücrelerde apoptozu indüklediğini, sitoplazmik CHOP ekspresyonundaki artış ise migratif özellikleri inhibe ettiğini düşündürmektedir.

PERK'nin inhibitörü olan P58IPK öncelikle ER'de bulunurken, verimsiz translokasyon sitozolik lokalizasyona yol açabilir (Rutkowski ve ark., 2007). GRP78 sitosölde yerleşir bir çok sessiz proteini aktif eder, aşırı eksprese edildiğinde P58IPK ile etkileşime girer ve onun PERK üzerindeki inhibe edici etkisine neden olur, aktive olmuş PERK sinyallemesi ve ERS rağmen hücre sağkalımı ile sonuçlanır

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CHOP nükleusda ekspresyonu gözlemlenmiş ve bu da hücrede stresin olduğunu gösteriyor (X. Z. Wang ve ark., 1996). Bizim sonuçlarımızda damar endotelinde genel olarak CHOP ekspresyonu sitoplazmik olarak görüldüğünden, hücrede ERS'nin baskılandığını düşündürmektedir.

ATGK grubunda İSG grubuna göre damar endotelinde ve perivasküler alanda yer alan hücrelerde CHOP ekspresyonu daha yoğun sitoplazmik olarak izlendi. CHOP ekspresyonun sitoplazmik olması ERS'nin baskılandığını düşündürülebilir. Ya da CHOP ekspresyonun sitoplazmik olması vasküler remodeling için ekstravillöz trofoblastların spiral artere migrasyonunda ERS aracılı bir probleme işaret ediyor olabilir.

ATGK'da perivasküler hücrelerde izlenen sitoplazmik boyanmayla birlikte şiddetli CHOP nüklear boyanması da izlenmiştir. ATGK'da desidual hücrelerde de şiddetli CHOP nüklear boyanması izlenmiştir. Bu durum desidualizasyon ve vasküler remodellenme aşamasında UPR'deki anormalliğin sonucu olarak ortaya çıkan ERS aracılıklı apoptozun göstergesi olabilir

SONUÇ VE ÖNERİLER

- ATGK grubu stromal hücrelerinde GRP78 ekspresyonu kontrole kıyasla daha yoğun sitoplazmik nükleer ekspresyona göstermesi bu grupta şiddetli ERS valığının kanıtı olarak değerlendirilebilir.
- ATGK desidua örneklerinde, desidual hücrelerde ve perivasküler alanda yer alan hücrelerde şiddetli CHOP nükleer boyanmaları ERS nin yoğun apoptoza bağlı desidualizasyon ve vasküler modellenmede anormalıklara neden olabileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.
- İSG ve ATGK grubu desidual hücrelerinde GRP78 boyanma sonuçları değerlendirildiğinde her iki grup için de benzer düzeyde ve normal endometrial stromal hücrelerden daha yüksek ekspresyonun varlığı ERSİ dah yüksek olduğunu göstergesi olarak düşünülebilir.

Sonuç olarak;

İmmunohistokimyasal değerlendirmemiz sonucunda;

Gebeliğin, maternal ve fetal ekstambriyonik hücrelerde ERS'ne neden olduğu,

ATGK hastalarında normal gebeliğe göre ERS'nin daha şiddetli olduğu

CHOP ekspresyonunun normal gebeliğe göre yerleşim ve ekspresyon düzeyinde göstermiş olduğu değişikliklerin, artmış apoptoza ve patalojik migrasyona bağlı gebelik kayıplarını geliştirebileceğini akla getirmektedir.

KAYNAKLAR

Abraham, T., Pin, C. L., & Watson, A. J. Embryo collection induces transient activation of xbp1 arm of the er stress response while embryo vitrification does not. *Mol Hum Reprod.* 2012; 18 (5): 229-242.

Alecsandru, D., & Garcia-Velasco, J. A. Immunology and human reproduction. *Current opinion in obstetrics & gynecology.* 2015; 27 (3): 231-234.

Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., . . . Samali, A. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS journal.* 2019; 286 (2): 241-278.

Andersen, S. L., Olsen, J., Wu, C. S., & Laurberg, P. Spontaneous abortion, stillbirth and hyperthyroidism: A danish population-based study. *European thyroid journal.* 2014; 3 (3): 164-172.

Anttonen, A. K., Mahjneh, I., Hamalainen, R. H., Lagier-Tourenne, C., Kopra, O., Waris, L., . . . Lehesjoki, A. E. The gene disrupted in marinesco-sjogren syndrome encodes sil1, an hspa5 cochaperone. *Nature genetics.* 2005; 37 (12): 1309-1311.

Armant, D. R. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Developmental biology.* 2005; 280 (2): 260-280.

Arredondo, F., & Noble, L. S. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2006; 24 (1): 33-39.

Axmon, A., & Hagmar, L. Time to pregnancy and pregnancy outcome. *Fertility and sterility.* 2005; 84 (4): 966-974.

Barateiro, A., Vaz, A. R., Silva, S. L., Fernandes, A., & Brites, D. Er stress, mitochondrial dysfunction and calpain/jnk activation are involved in oligodendrocyte precursor cell death by unconjugated bilirubin. *Neuromolecular Med.* 2012; 14 (4): 285-302.

Brezina, P. R., & Kutteh, W. H. Classic and cutting-edge strategies for the management of early pregnancy loss. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2014; 41 (1): 1-18.

Burton, G. J., Hempstock, J., & Jauniaux, E. Nutrition of the human fetus during the first trimester--a review. *Placenta*. 2001; 22 Suppl A: S70-77.

Child, T. J., Thomas, J., Rees, M., & MacKenzie, I. Z. A comparative study of surgical and medical procedures: 932 pregnancy terminations up to 63 days gestation. *Hum Reprod*. 2001; 16 (1): 67-71.

Christiansen, O. B., Mathiesen, O., Lauritsen, J. G., & Grunnet, N. Idiopathic recurrent spontaneous abortion. Evidence of a familial predisposition. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1990; 69 (7-8): 597-601.

Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell*. 2007; 131 (6): 1047-1058.

Clifford, K., Rai, R., Watson, H., & Regan, L. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: Preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod*. 1994; 9 (7): 1328-1332.

Corrigall, V. M., Bodman-Smith, M. D., Brunst, M., Cornell, H., & Panayi, G. S. Inhibition of antigen-presenting cell function and stimulation of human peripheral blood mononuclear cells to express an antiinflammatory cytokine profile by the stress protein bip: Relevance to the treatment of inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004; 50 (4): 1164-1171.

Corrigall, V. M., Vittecoq, O., & Panayi, G. S. Binding immunoglobulin protein-treated peripheral blood monocyte-derived dendritic cells are refractory to maturation and induce regulatory t-cell development. *Immunology*. 2009; 128 (2): 218-226.

Coulam, C. B. Immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Early Pregnancy*. 1995; 1 (1): 13-26.

Coulam, C. B., & Coulam, C. H. Update on immunotherapy for recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 1992; 27 (3-4): 124-127.

- Cui, W., Li, J., Ron, D., & Sha, B. The structure of the perk kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011; 67 (Pt 5): 423-428.
- Dante, G., Vaccaro, V., & Facchinetti, F. Use of progestagens during early pregnancy. *Facts Views Vis Obgyn*. 2013; 5 (1): 66-71.
- Dey, S. K., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Paria, B. C., Daikoku, T., & Wang, H. Molecular cues to implantation. *Endocrine reviews*. 2004; 25 (3): 341-373.
- El Hachem, H., Crepaux, V., May-Panloup, P., Descamps, P., Legendre, G., & Bouet, P. E. Recurrent pregnancy loss: Current perspectives. *Int J Womens Health*. 2017; 9: 331-345.
- Froen, J. F., Arnestad, M., Frey, K., Vege, A., Saugstad, O. D., & Stray-Pedersen, B. Risk factors for sudden intrauterine unexplained death: Epidemiologic characteristics of singleton cases in oslo, norway, 1986-1995. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184 (4): 694-702.
- Fu, J., Zhao, L., Wang, L., & Zhu, X. Expression of markers of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placenta of women with early and late onset severe pre-eclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2015; 54 (1): 19-23.
- Galgani, M., Insabato, L., Cali, G., Della Gatta, A. N., Mirra, P., Papaccio, F., . . . Ulianich, L. Regulatory t cells, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in women with defective endometrial receptivity. *Fertility and sterility*. 2015; 103 (6): 1579-1586 e1571.
- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., & Kroemer, G. Heat shock proteins 27 and 70: Anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell cycle*. 2006; 5 (22): 2592-2601.
- Geyman, J. P., Oliver, L. M., & Sullivan, S. D. Expectant, medical, or surgical treatment of spontaneous abortion in first trimester of pregnancy? A pooled quantitative literature evaluation. *J Am Board Fam Pract*. 1999; 12 (1): 55-64.
- Glinioer, D. Thyroid hyperfunction during pregnancy. *Thyroid*. 1998; 8 (9): 859-864.

Gotoh, T., Oyadomari, S., Mori, K., & Mori, M. Nitric oxide-induced apoptosis in raw 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving atf6 and chop. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277 (14): 12343-12350.

Graham, J. D., & Clarke, C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*. 1997; 18 (4): 502-519.

Grimbizis, G. F., Camus, M., Tarlatzis, B. C., Bontis, J. N., & Devroey, P. Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update*. 2001; 7 (2): 161-174.

Guzel, E., Arlier, S., Guzeloglu-Kayisli, O., Tabak, M. S., Ekiz, T., Semerci, N., . . . Kayisli, U. A. Endoplasmic reticulum stress and homeostasis in reproductive physiology and pathology. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18 (4).

Guzel, E., Basar, M., Ocak, N., Arici, A., & Kayisli, U. A. Bidirectional interaction between unfolded-protein-response key protein hspa5 and estrogen signaling in human endometrium. *Biol Reprod*. 2011; 85 (1): 121-127.

Hanson, U., Persson, B., & Thunell, S. Relationship between haemoglobin a1c in early type 1 (insulin-dependent) diabetic pregnancy and the occurrence of spontaneous abortion and fetal malformation in sweden. *Diabetologia*. 1990; 33 (2): 100-104.

Hao, Y., Lai, L., Mao, J., Im, G. S., Bonk, A., & Prather, R. S. Apoptosis and in vitro development of preimplantation porcine embryos derived in vitro or by nuclear transfer. *Biol Reprod*. 2003; 69 (2): 501-507.

Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011; 475 (7356): 324-332.

Hebert, C. C., Bouyer, J., Collin, D., & Menger, I. Spontaneous abortion and interpregnancy interval. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1986; 22 (3): 125-132.

Hendershot, L. M., Valentine, V. A., Lee, A. S., Morris, S. W., & Shapiro, D. N. Localization of the gene encoding human bip/grp78, the endoplasmic reticulum cognate of the hsp70 family, to chromosome 9q34. *Genomics*. 1994; 20 (2): 281-284.

Hetz, C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under er stress and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2012; 13 (2): 89-102.

Huang, N., Yu, Y., & Qiao, J. Dual role for the unfolded protein response in the ovary: Adaption and apoptosis. *Protein Cell*. 2017; 8 (1): 14-24.

Im, G. S., Yang, B. S., Lai, L., Liu, Z., Hao, Y., & Prather, R. S. Fragmentation and development of preimplantation porcine embryos derived by parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*. 2005; 71 (2): 159-165.

Ispasoiu, C. A., Chicea, R., Stamatian, F. V., & Ispasoiu, F. High fasting insulin levels and insulin resistance may be linked to idiopathic recurrent pregnancy loss: A case-control study. *Int J Endocrinol*. 2013; 2013: 576926.

Iurlaro, R., & Munoz-Pinedo, C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS journal*. 2016; 283 (14): 2640-2652.

Jabbour, H. N., Kelly, R. W., Fraser, H. M., & Critchley, H. O. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev*. 2006; 27 (1): 17-46.

Jaslow, C. R., Carney, J. L., & Kutteh, W. H. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. *Fertility and sterility*. 2010; 93 (4): 1234-1243.

Jauhiainen, A., Thomsen, C., Strombom, L., Grundevik, P., Andersson, C., Danielsson, A., . . . Aman, P. Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein ddit3/chop/gadd153. *PLoS One*. 2012; 7 (4): e33208.

Jeve, Y. B., & Davies, W. Evidence-based management of recurrent miscarriages. *Journal of human reproductive sciences*. 2014; 7 (3): 159-169.

Jiang, Z., Wang, Y., Lin, J., Xu, J., Ding, G., & Huang, H. Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017; 44: 90-104.

Jing, G., Wang, J. J., & Zhang, S. X. Er stress and apoptosis: A new mechanism for retinal cell death. *Experimental diabetes research*. 2012; 2012: 589589.

Jovanovic, L., Knopp, R. H., Kim, H., Cefalu, W. T., Zhu, X. D., Lee, Y. J., . . . Mills, J. L. Elevated pregnancy losses at high and low extremes of maternal glucose in early normal and diabetic pregnancy: Evidence for a protective adaptation in diabetes. *Diabetes Care*. 2005; 28 (5): 1113-1117.

KARKİN, D. K. DİYABETİK ve normal hastalarda mesane kanserİ dokusunda age (advanced end glycation product) ekspresyonu'nun gösterİlmesi ve age akümülasyonu İle er (endoplazmik retikulum) stresİnİn mesane kanserİ İle İlişkisi. 2019.

Kober, L., Zehe, C., & Bode, J. Development of a novel er stress based selection system for the isolation of highly productive clones. *Biotechnology and bioengineering*. 2012; 109 (10): 2599-2611.

Kohan-Ghadr, H. R., Kadam, L., Jain, C., Armant, D. R., & Drewlo, S. Potential role of epigenetic mechanisms in regulation of trophoblast differentiation, migration, and invasion in the human placenta. *Cell Adh Migr*. 2016; 10 (1-2): 126-135.

Koumenis, C. Er stress, hypoxia tolerance and tumor progression. *Current molecular medicine*. 2006; 6 (1): 55-69.

Kutteh, W. H. Recurrent pregnancy loss. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2014; 41 (1): xi-xiii.

Lee, A. S. The er chaperone and signaling regulator grp78/bip as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. 2005; 35 (4): 373-381.

Li, S. Y., Gilbert, S. A., Li, Q., & Ren, J. Aldehyde dehydrogenase-2 (aldh2) ameliorates chronic alcohol ingestion-induced myocardial insulin resistance and endoplasmic reticulum stress. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009; 47 (2): 247-255.

Lim, H. J., & Wang, H. Uterine disorders and pregnancy complications: Insights from mouse models. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120 (4): 1004-1015.

Lin, P., Jin, Y., Lan, X., Yang, Y., Chen, F., Wang, N., . . . Wang, A. Grp78 expression and regulation in the mouse uterus during embryo implantation. *Journal of molecular histology*. 2014; 45 (3): 259-268.

Lin, T., Lee, J. E., Oqani, R. K., Kim, S. Y., Cho, E. S., Jeong, Y. D., . . . Jin, D. I. Delayed blastocyst formation or an extra day culture increases apoptosis in pig blastocysts. *Anim Reprod Sci*. 2017; 185: 128-139.

Lin, T., Zhang, J. Y., Diao, Y. F., Kang, J. W., & Jin, D. I. Effects of sorbitol on porcine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Zygote*. 2015; 23 (2): 297-306.

Liu, A. X., He, W. H., Yin, L. J., Lv, P. P., Zhang, Y., Sheng, J. Z., . . . Huang, H. F. Sustained endoplasmic reticulum stress as a cofactor of oxidative stress in decidual cells from patients with early pregnancy loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011; 96 (3): E493-497.

Loke, Y. W., King, A., & Burrows, T. D. Decidua in human implantation. *Hum Reprod*. 1995; 10 Suppl 2: 14-21.

Lovely, L. P., Fazleabas, A. T., Fritz, M. A., McAdams, D. G., & Lessey, B. A. Prevention of endometrial apoptosis: Randomized prospective comparison of human chorionic gonadotropin versus progesterone treatment in the luteal phase. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005; 90 (4): 2351-2356.

Lu, T. H., Tseng, T. J., Su, C. C., Tang, F. C., Yen, C. C., Liu, Y. Y., . . . Chen, Y. W. Arsenic induces reactive oxygen species-caused neuronal cell apoptosis through jnk/erk-mediated mitochondria-dependent and grp 78/chop-regulated pathways. *Toxicology letters*. 2014; 224 (1): 130-140.

Madani, T., Ashrafi, M., & Yeganeh, L. M. Comparison of different stimulation protocols efficacy in poor responders undergoing ivf: A retrospective study. *Gynecol Endocrinol*. 2012; 28 (2): 102-105.

Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9 (12): 2277-2293.

Matsumoto, M., Minami, M., Takeda, K., Sakao, Y., & Akira, S. Ectopic expression of chop (gadd153) induces apoptosis in m1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS letters*. 1996; 395 (2-3): 143-147.

Maytin, E. V., Ubeda, M., Lin, J. C., & Habener, J. F. Stress-inducible transcription factor chop/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Experimental cell research*. 2001; 267 (2): 193-204.

Medical treatment of ectopic pregnancy. *Fertility and sterility*. 2008; 90 (5 Suppl): S206-212.

Medicine, P. C. o. t. A. S. f. R. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertility and sterility*. 2012; 98 (5): 1103-1111.

Meldolesi, J., & Pozzan, T. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: A view from the lumen. *Trends in biochemical sciences*. 1998; 23 (1): 10-14.

Modi, D. N., Godbole, G., Suman, P., & Gupta, S. K. Endometrial biology during trophoblast invasion. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012; 4: 1151-1171.

Moyce, B. L., & Dolinsky, V. W. Maternal beta-cell adaptations in pregnancy and placental signalling: Implications for gestational diabetes. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19 (11).

Ni, M., Zhang, Y., & Lee, A. S. Beyond the endoplasmic reticulum: Atypical grp78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *The Biochemical journal*. 2011; 434 (2): 181-188.

Novakovic, B., Gordon, L., Wong, N. C., Moffett, A., Manuelpillai, U., Craig, J. M., Saffery, R. Wide-ranging DNA methylation differences of primary trophoblast cell populations and derived cell lines: Implications and opportunities for understanding trophoblast function. *Mol Hum Reprod*. 2011; 17 (6): 344-353.

Oyadomari, S., & Mori, M. Roles of chop/gadd153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation*. 2004; 11 (4): 381-389.

Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., . . . Mori, M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the

endoplasmic reticulum stress pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98 (19): 10845-10850.

Palade, G. E., & Porter, K. R. Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ. *The Journal of experimental medicine*. 1954; 100 (6): 641-656.

Panayi, G. S., Corrigan, V. M., & Henderson, B. Stress cytokines: Pivotal proteins in immune regulatory networks; opinion. *Current opinion in immunology*. 2004; 16 (4): 531-534.

Quere, I., Mercier, E., Bellet, H., Janbon, C., Mares, P., & Gris, J. C. Vitamin supplementation and pregnancy outcome in women with recurrent early pregnancy loss and hyperhomocysteinemia. *Fertility and sterility*. 2001; 75 (4): 823-825.

Rai, R., Backos, M., Rushworth, F., & Regan, L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage--a reappraisal. *Hum Reprod*. 2000; 15 (3): 612-615.

Rao, R. V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., . . . Bredesen, D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: Role of the er chaperone grp78. *FEBS letters*. 2002; 514 (2-3): 122-128.

Rayburn, W. F. Recurrent first trimester pregnancy loss. Foreword. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2014; 41 (1): ix-x.

Reddy, R. K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R. C., Kaufman, R. J., & Lee, A. S. Endoplasmic reticulum chaperone protein grp78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: Role of atp binding site in suppression of caspase-7 activation. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278 (23): 20915-20924.

Regan, L., & Rai, R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Bailliere's best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*. 2000; 14 (5): 839-854.

Remondelli, P., & Renna, M. The endoplasmic reticulum unfolded protein response in neurodegenerative disorders and its potential therapeutic significance. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017; 10: 187.

- Ron, D., & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2007; 8 (7): 519-529.
- Rutkowski, D. T., Kang, S. W., Goodman, A. G., Garrison, J. L., Taunton, J., Katze, M. G., . . . Hegde, R. S. The role of p58ipk in protecting the stressed endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 2007; 18 (9): 3681-3691.
- Salem, H. T., Ghaneimah, S. A., Shaaban, M. M., & Chard, T. Prognostic value of biochemical tests in the assessment of fetal outcome in threatened abortion. *Br J Obstet Gynaecol*. 1984; 91 (4): 382-385.
- Saravelos, S. H., & Li, T. C. Unexplained recurrent miscarriage: How can we explain it? *Hum Reprod*. 2012; 27 (7): 1882-1886.
- Schachter, M., Raziel, A., Friedler, S., Strassburger, D., Bern, O., & Ron-El, R. Insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome is associated with elevated plasma homocysteine. *Hum Reprod*. 2003; 18 (4): 721-727.
- Shahine, L., & Lathi, R. Recurrent pregnancy loss: Evaluation and treatment. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2015; 42 (1): 117-134.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., & Prywes, R. Er stress regulation of atf6 localization by dissociation of bip/grp78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Developmental cell*. 2002; 3 (1): 99-111.
- Silver, R. M., Branch, D. W., Goldenberg, R., Iams, J. D., & Klebanoff, M. A. Nomenclature for pregnancy outcomes: Time for a change. *Obstetrics and gynecology*. 2011; 118 (6): 1402-1408.
- Soares, M. J., Chakraborty, D., Renaud, S. J., Kubota, K., Bu, P., Konno, T., & Rumi, M. A. Regulatory pathways controlling the endovascular invasive trophoblast cell lineage. *The Journal of reproduction and development*. 2012; 58 (3): 283-287.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., & Bazer, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from domestic animals. *Biol Reprod*. 2004; 71 (1): 2-10.

Stella, C. L., & Sibai, B. M. Thrombophilia and adverse maternal-perinatal outcome. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2006; 49 (4): 850-860.

Stephenson, M. D., Awartani, K. A., & Robinson, W. P. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: A case-control study. *Hum Reprod*. 2002; 17 (2): 446-451.

Stetler, R. A., Gan, Y., Zhang, W., Liou, A. K., Gao, Y., Cao, G., & Chen, J. Heat shock proteins: Cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Progress in neurobiology*. 2010; 92 (2): 184-211.

Suman, P., Malhotra, S. S., & Gupta, S. K. Lif-stat signaling and trophoblast biology. *Jak-Stat*. 2013; 2 (4): e25155.

Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 2006; 7 (9): 880-885.

Szekeres-Bartho, J., & Balasch, J. Progestagen therapy for recurrent miscarriage. *Human reproduction update*. 2008; 14 (1): 27-35.

Tien, J. C., & Tan, T. Y. Non-surgical interventions for threatened and recurrent miscarriages. *Singapore medical journal*. 2007; 48 (12): 1074-1090; quiz 1090.

van der Kallen, C. J., van Greevenbroek, M. M., Stehouwer, C. D., & Schalkwijk, C. G. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: Is there a role for adipose tissue and liver? *Apoptosis*. 2009; 14 (12): 1424-1434.

Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K. A. Biology of the heat shock response and protein chaperones: Budding yeast (*saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2012; 76 (2): 115-158.

Wang, J. X., Davies, M., & Norman, R. J. Body mass and probability of pregnancy during assisted reproduction treatment: Retrospective study. *BMJ*. 2000; 321 (7272): 1320-1321.

Wang, M., & Kaufman, R. J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*. 2016; 529 (7586): 326-335.

Wang, X. Z., Lawson, B., Brewer, J. W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L. J., . . . Ron, D. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce c/ebp-homologous protein (chop/gadd153). *Mol Cell Biol.* 1996; 16 (8): 4273-4280.

Werner, M., Reh, A., Grifo, J., & Perle, M. A. Characteristics of chromosomal abnormalities diagnosed after spontaneous abortions in an infertile population. *Journal of assisted reproduction and genetics.* 2012; 29 (8): 817-820.

Wu, H., Ng, B. S., & Thibault, G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Biosci Rep.* 2014; 34 (4).

Yang, Y., Pei, X., Jin, Y., Wang, Y., & Zhang, C. The roles of endoplasmic reticulum stress response in female mammalian reproduction. *Cell and tissue research.* 2016; 363 (3): 589-597.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. Xbp1 mRNA is induced by atf6 and spliced by ire1 in response to er stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001; 107 (7): 881-891.

Zhang, J. Y., Diao, Y. F., Kim, H. R., & Jin, D. I. Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves mouse embryo development. *PLoS One.* 2012; 7 (7): e40433.

Zhang, K., & Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 2008; 454 (7203): 455-462.

Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., & Armant, D. R. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular aspects of medicine.* 2013; 34 (5): 939-980.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Farida	Uyruğu	Azerbaycan
Soyadı	Quliyeva (XXX)	Tel no	05387919644
Doğum tarihi	15.06.1992	e-posta	Feride.q.994@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı	
Lise	Azerbaycan BMLK 43 sayılı litsey	2009
Lisans	Atatürk Üniversitesi	2012-2016
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2019
Doktora		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Gebeliğin başlangıcı ve devamında TAM reseptörleri ve ligandlarının uterinal immün toleransın gelişimindeki rolünün araştırılması	1001 TUBİTAK	2018-2019
Melatoninin Sıçan Ovaryumunda VEGF Ve Reseptörlerinin Ekspresyonları Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi	14. ULUSAL HİSTOJİ ve EMBRİYOLOJİ Kongresi poster sunumu	2018

Burslar-Ödüller:

Yayımlar ve Bildiriler:

Is the effect of melatonin on vascular endothelial growth factor receptor-2 associated with angiogenesis in the rat ovary?

Kandemir YB, Konuk E, Katırcı E, Xxx F, Behram M.

Clinics (Sao Paulo). 2019 Mar 7;74:e658. doi: 10.6061/clinics/2019/e658.