

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM ANABİLİM DALI
PERİNATOLOJİ BİLİM DALI

PRETERM EYLEMDE OTOFAJİ MEKANİZMASI
BOZUKLUKLARI

UZMANLIK TEZİ
DR. MURAT AYKUT ÖZEK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MERİH BAYRAM

ANKARA
2017

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM ANABİLİM DALI
PERİNATOLOJİ BİLİM DALI

PRETERM EYLEMDE OTOfAJİ MEKANİZMASI
BOZUKLUKLARI

UZMANLIK TEZİ
DR. MURAT AYKUT ÖZEK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MERİH BAYRAM

ANKARA

2017

ÖNSÖZ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Perinatoloji Bilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince üzerimde emeği olan; başta Prof. Dr. Merih BAYRAM olmak üzere, Prof. Dr. Mehmet Zeki TANER, Prof. Dr. Tuncay NAS ve Doç. Dr. Deniz KARÇAALTINCABA hocalarıma, değerli tecrübe ve bilgilerini hiçbir zaman esirgemedikleri ve mesleki eğitimime tuttukları ışık için minnettarım. Bu çalışmanın laboratuvar kısmındaki destekleri ve işbirlikleri açısından başta Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK olmak üzere, kendisinin tüm ekibine teşekkür ederim. Ayrıca her konuda bana destek ve yardımcı olan sevgili aileme ve değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

ÖZET

PRETERM EYLEMDE OTOFAJİ MEKANİZMASI BOZUKLUKLARI

Preterm doğum, gebeliğin 37. haftasından önce sonlanması durumudur. Preterm doğumların % 70-80'i spontan preterm eylem nedeniyle gerçekleşmektedir. Preterm doğum hızı, dünyada % 11 civarındadır. Preterm eylem ve doğum, neonatal morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. Ancak halen spontan preterm eylemin patofizyolojisi net olarak ortaya konulamamıştır. Otofaji (Tip II programlı hücre ölümü), protein ve diğer subsellüler hücresel elemanların lizozomal degradasyonundan sorumlu intrasellüler yıkım sistemidir. Çoğunlukla intrasellüler stresin arttığı durumlarda aktive olmaktadır. Otofaji sürecinin bozulması; erken gebelik kayıpları ve preeklampsi ile ilişkilendirilmiştir. Biz bu çalışma ile, perinatal morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni olan preterm eylemin patofizyolojisinde yer alan hormonal faktörleri etkileyebilecek otofaji gen ekspresyonu bozukluklarını saptamayı amaçladık. Çalışmaya 34 hafta altında preterm doğumla sonuçlanmış 16 gebe ve kontrol grubu olarak komplikasyonsuz tekil, mükerrer sezeryan endikasyonu ile term sezaryen doğum ile sonuçlanan 6 gebelik dahil edildi. Hastalardan alınan plasental örneklerde otofaji mekanizmasında yer alan gen gruplarının profilleri RT-PCR (Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction) yöntemi ile değerlendirildi. Çalışmamızda yer alan preterm ile sonuçlanan hasta grubu; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BECN1, ATG7, ATG5, ATG12, ATG16L1, TP53, IRGM, ULK1, ESR1 ve TNF genlerinin

ekspresyonunda anlamlı derecede azalma tespit edildi. Preterm eylemde otofaji mekanizmasındaki bozuklukların (otofajinin anormal artması ya da azalması, kısaca disregülasyonu) saptanması, konunun şimdiye kadar bu açıdan yeterince değerlendirilmemiş olması açısından anlamlı olduğu kanaatindeyiz. Birçok faktör tarafınca etkilenen gebelik fizyolojisi, plasental yapı ve metabolik değişiklikler göz önünde bulundurularak geliştirilen hayvan modellerinde ve bu çalışmaların ışığında yapılacak insan çalışmalarında, gebelik ve doğum süreçlerinde otofajinin rollerinin tanımlanacağı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: Otofaji, preterm eylem

ABSTRACT

DYSREGULATION OF AUTOPHAGY IN PRETERM LABOR

Preterm birth is defined as termination of pregnancy before completed 37 weeks. 70-80% of preterm births are consequence of spontaneous preterm labor. It is estimated that preterm birth rate is 11%, worldwide. It is the most important cause of neonatal morbidity and mortality. That said, pathophysiology of preterm birth has not been defined, yet. Autophagy (Type-2 programmed cell death), is defined as an intracellular degradation process responsible of lysosomal degradation of proteins and other subcellular elements. It is activated in cases associated with increased intracellular stress. Autophagy-related disturbances has been related to early pregnancy complications and preeclampsia. In this study, we aimed to define autophagy gene expression alterations that could lead to effect hormonal factors associated with preterm labor and birth. There were 16 cases whom ended up with preterm birth before 34 weeks of gestation were included. Control cases composed of 6 cesarean births, with the indication of previous cesarean section. Placental samples were collected immediately after birth. Autophagy related genes were analysed with RT-PCR (Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction). Compared to controls, expressions of BECN1, ATG7, ATG5, ATG12, ATG16L1, TP53, IRGM, ULK1, ESR1 and TNF genes were down-regulated. Dysregulation of autophagy in preterm birth has not been widely evaluated, yet. Physiological changes of pregnancy are altered by many mechanisms. We are in the opinion that with animal and human studies, role of autophagy in pregnancy and labor could be defined in the near future.

Key words: Autophagy, preterm labor

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR.....	viii
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Preterm Doğum	2
2.1.1. Preterm Doğum Hızları	2
2.1.2. Preterm Yenidoğanlarda Morbidite	3
2.1.3. Preterm Doğumun Nedenleri.....	4
2.2. Otofaji	6
2.2.1. Otofajinin Düzenlenmesi	8
2.3. Otofaji ile Preterm Eylem İlişkisi	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	12
3.1. İstatistiksel Yöntemler:	13
3.2. RNA İzolasyonu.....	13
3.3. cDNA elde edilmesi	14
3.4. RT-PCR Array ve Sonuçların Analizi.....	15
4. BULGULAR	16
5. TARTIŞMA.....	27
6. SONUÇLAR.....	35

7. KAYNAKLAR.....	37
8. EKLER	42
8.1. Etik Kurul Onayı	42



KISALTMALAR

AMPK: 5'-AMP-Aktive Protein Kinaz

ATG : Otofaji İlişkili Gen

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

IL-1 β : Interlökin-1 β

LC-3: Light Chain 3

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

N : Normal

PE: Fosfatidiletanolamin

PI3K: Fosfotidilinozitol-3-kinaz

RDS : Respiratuvar Distres Sendromu

RNA : Ribo Nükleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Türevleri

RT-PCR: Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction

TNF- α : Tumor nekrozis faktör- α

TABLÖLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ

Tablo 1. Hastaların demografik özelliklerinin gruplar açısından değerlendirilmesi	16
Grafik 1: Otofajik Vakuol Oluşumu İle İlgili Gen Grubu Profili	18
Grafik 2: Otofagozom-Lizozom Bağlanması İle İlgili Gen Grubu Profili	19
Grafik 3: Diğer İntrasellüler Sinyaller Nedeniyle Oluşan Otofaji İle İlgili Gen Grubu Profili	20
Grafik 4: İntrasellüler Patojenlerin İndüklediği Otofaji İle İlgili Gen Grubu Profili	21
Grafik 5: Şaperon Aracılı Otofaji İle İlgili Gen Grubu Profili	22
Grafik 6: Otofaji ve Hücre Siklusu Koregülasyonu İle İlgili Gen Grubu Profili	22
Grafik 7: Proteaz Aktivitesi İle İlgili Gen Grubu Profili	23
Grafik 8: Protein Transportu İle İlgili Gen Grubu Profili.....	24
Grafik 9: Protein Ubikitinasyonu İle İlgili Gen Grubu Profili.....	24
Grafik 10: Vakuol Hedeflenmesi İle İlgili Gen Grubu Profili.....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Otofaji yolağında yer alan basamaklar	7
Şekil 2: Otofaji yolağının regülasyonu	9



1. GİRİŞ

Otofaji; sitoplazmik organellerin, intraselüler bakteri ve virüslerin ortadan kaldırılarak hücresel homeostazinin sağlanmasından sorumlu bir hücre içi yolaktır. Hem doğuştan gelen hem de kazanılmış immün sistemin bir parçasıdır. Otofajik yolaktaki çeşitli bozukluklar; nörodejeneratif hastalıklar, kardiyopatiler, enfeksiyöz hastalıklar, otoimmünite ve kanser ile ilişkilendirilmiştir (1). Ancak otofaji mekanizmaları ve/veya bu yolaktaki sorunlar ile üreme fonksiyonu arasındaki ilişki henüz yeterince tanımlanmamıştır. Üreme sürecinde yer alan primordial follikül ve spermatozoa gelişimlerinden embriyo oluşumuna, plasental yatağın gelişiminden, gebelikte uterin sükunetin korunmasına kadar birçok süreçte, otofaji temel rol oynar.

Gebeliğin erken ve geç komplikasyonlarının etiyolojisinde, fetusun perfüzyonunu sağlayan ve feto-maternal bir yapı olan plasenta majör rol oynamaktadır. Bu damarsal organizasyonun gelişimindeki sorunlar ve/veya damar endotelinin zedelenmesi durumlarında, erken gebelik döneminde fetal kayıplara ve geç dönemde perinatal komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu komplikasyonlar arasında abortus, preeklampsi, preterm doğum, plasental ablasyon ve intrauterin büyüme geriliği gibi durumlar bulunmaktadır.

Bu çalışma ile; otofaji yolağında yer alan sorunlar ile preterm doğum arasındaki ilişkinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Preterm Doğum

Preterm doğum, fetal viabilitenin kazanılması ile gebeliğin 37. haftasının tamamlanması arasında doğumun gerçekleşmesi durumudur. Bu tanım 1976 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) tarafından ortaya konmuştur. Bu tanımın spesifik bir fonksiyonel tabanı yoktur, doğumdaki gestasyonel haftanın istatistiksel analizi ile elde edilmiştir (2). Dolayısı ile prematürite ile karıştırılmamalıdır.

2005 yılında 34. gestasyonel haftadan önce doğan bebekler “erken preterm”, 34 ve 36. haftalar arasında doğan bebekler ise “geç preterm” olarak sınıflandırılmıştır. 2013 yılında da, 37 hafta ile 38 hafta 6 gün arasında doğan bebeklerin, prematürite ile ilişkili morbiditelerle, 39 hafta ila 40 hafta 6 gün arası doğan bebeklere kıyasla daha yüksek oranlarda karşılaştığı saptanmıştır. Buradan yola çıkarak; tamamlanmış 37 hafta ile 38 hafta 6 gün arası doğan bebekler “erken term” olarak kabul edilirken, 39 hafta ile 40 hafta 6 gün arasında doğan bebekler “term gebelik” olarak tanımlanmıştır (3).

2.1.1. Preterm Doğum Hızları

Amerika Birleşik Devletleri ulusal verilerine göre; preterm doğum hızı 1984’te %9,4’ten 2006 yılında %12,8’e; %36’lık bir yükseliş göstermiştir. Ancak 2011 verilerine göre bu hız %11,7’ye gerilemiştir. Bu düşüşün saptanmasında doğum belgelerindeki revizyonun uygulamaya konması gösterilmektedir (4).

2.1.2. Preterm Yenidoğanlarda Morbidite

Gebeliğin 37. haftasından önce doğan bebekler, çeşitli organ sistemlerinin immatüritesi nedeniyle birçok kısa ve uzun dönem morbidite ile karşı karşıya kalırlar. Bu komplikasyonlar organ sistemlerine göre şu şekilde sınıflandırılabilirler:

1. Pulmoner Sistem: Respiratuar distress sendromu (RDS), bronkopulmoner displazi, prematürite apnesi, astım
2. Gastrointestinal Sistem: Hiperbilirubinemi, beslenme intoleransı, nekrotizan enterokolit, büyüme gecikmesi, kısa barsak sendromu, kolestaz
3. İmmünolojik: Hastane kaynaklı enfeksiyonlar, immün yetmezlik, perinatal enfeksiyonlar, bronşiolit
4. Santral Sinir Sistemi: İntraventriküler kanama, periventriküler lökomalazi, hidrosefali, serebral palsy, nörogelişimsel gecikme, işitme kaybı
5. Oftalmolojik: Prematürite Retinopatisi, retinal dekolman, görme kaybı
6. Kardiyovasküler Sistem: Hipotansiyon, patent duktus arteriozus, pulmoner hipertansiyon, erişkin çağda hipertansiyon
7. Renal Sistem: Sıvı-elektrolit imbalansı, asit-baz bozuklukları
8. Hematolojik Sistem: İyatrojenik anemi, prematürite anemisi
9. Endokrin Sistem: Hipoglisemi, kortizol eksikliği, glukoz regülasyonunda bozukluk, artmış insülin direnci

2.1.2.1. Viabilite Sınırı

Gebeliğin 26. haftasından önce olan doğumlar, viabilite sınırında kabul edilmektedir. Bu gebelikler birçok medikal, sosyal ve etik sorunlar ile karşı karşıyadır. İmmatür organ sistemleri nedeniyle, bu bebekler çeşitli etmenlere karşı savunmasız durumdadır. Yakın zamandan yapılan bir çalışmada, engelsiz veya hafif engelli çocuklar 22 haftada doğan grubun %40'ını oluşturmaktayken, bu oran 26 haftada doğanlarda %83 olarak saptanmıştır (5). Benzer şekilde, Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir çalışmada, viabilite sınırında doğan bebekler kronik morbiditeler açısından araştırılmıştır. 22. haftada doğan bebeklerde kronik morbiditesiz olma oranı %0 iken, 26. haftada bu oran %34 olarak saptanmıştır (6).

2.1.3. Preterm Doğumun Nedenleri

Preterm doğumun direkt olarak nedenleri dört ana grupta değerlendirilebilir.

1. Membranların intakt olduğu, nedeni bilinmeyen spontan preterm eylem
2. İdiopatik membranların preterm prematür rüptürü
3. Maternal veya fetal nedenlerle doğum
4. Çoğul gebelikler

Bütün preterm doğumlar irdelendiğinde, endikasyonlu doğumlar %30-35 oranında, spontan preterm doğumların %40-45, preterm membran rüptürünün ise %30-35 oranında gerçekleştiği saptanmıştır (7).

2.1.3.1. Uterin Distansiyon

Çoğul gebelik ve polihidramniosis, preterm doğum riskini artıran durumlardır. Erken dönemde gelişen uterin distansiyon ile; myometriumda connexin 43, oksitosin

reseptörleri ve prostaglandin sentaz proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (8, 9).

Ayrıca, uterin gerilmenin plasental-fetal endokrin kaskadın erken aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Maternal kortikotropin hormonun ve östrojenin erken yükselmesinin, yukarıda bahsedilen genlerin ekspresyonunu daha da artırdığı ortaya konmuştur (10).

2.1.3.2. Maternal-Fetal Stres

Stres, bir bireyin normal fizyolojik veya psikolojik işlevini etkileyen olumsuz bir durum ya da çevreyi tanımlar. Maternal stres ile preterm eylem arasındaki ilişki çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur (11, 12). Gebeliğin son trimesterinde maternal plasental kortikotropin salgılatıcı hormon seviyeleri yükselir. Bu durum, adrenokortikotropin salgılatıcı hormon üzerinden maternal ve fetal kortizol biyosentezine neden olur. Yükselen kortizol seviyeleri, plasental kortikotropin salgılatıcı hormonun daha da artmasına neden olur. Bu kaskad doğuma kadar artarak çalışmaya devam eder.

Yapılan çalışmalarda, fetal adrenal-plasental endokrin kaskadın erken aktivasyonunun, preterm eylem ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (13, 14).

2.1.3.3. Enfeksiyon

Preterm eylemde enfeksiyonun yeri hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Son zamanlarda, metagenomik analizler ile, gebe olmayan kadınların vajinal mikrobiyal florasındaki farklılıklar ortaya konmuş ve preterm eylem ile olası ilişkisi irdelenmiştir (15). Elimizdeki veriler, reproduktif traktın mikrobiyal invazyonunun, enfeksiyon nedenli preterm eylem gelişimi için yeterli olduğunu göstermektedir. Kültür ile ortaya

konulabilen mikroorganizma olmadan inflamasyon varlığı da bir risk faktörüdür. Bu enfeksiyonlarda, mikroorganizmalar sadece maternal dokulara yerleşmiş olabilirler, amniyon mayisinin enfeksiyonu gerekli değildir. Mikroorganizmalar maternal sistemik enfeksiyonun transplasental geçişi ile, fallop tüplerinden retrograd ya da vajen ve serviksten asendan yolla intrauterin dokulara ulaşabilirler. Bunlar arasından asendan enfeksiyon en sık suçlanan mekanizmadır. Mikroorganizmalar serviks, desidua ve membranları kolonize ederler. Bakteriler tarafınca salgılanan lipopolisakkaridler ve diğer toksinler, immün hücrelerin bu alana yönlendirilmesine ve interlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin üretimine neden olurlar. Lipopolisakkaridler ve sitokinler prostoglandin salınmasını provoke ederler. Bunun sonucu olarak da servikal değişiklikler başlar ve uterus sükunet hali sona erer.

2.1.3.4. Çoğul Gebelikler

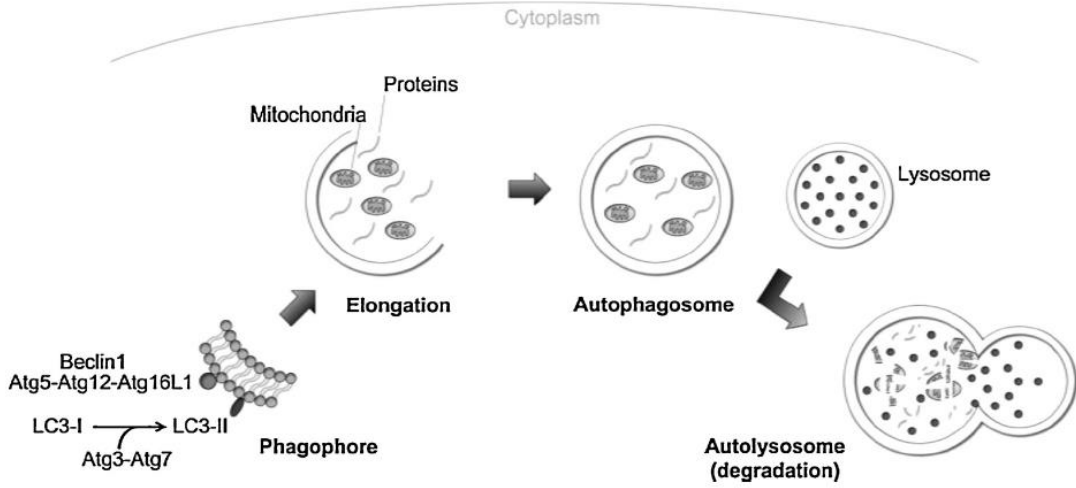
Çoğul gebelik ihtimalinin arttığı, ileri yaşta anne sahibi olma oranlarının artması ve infertilite tedavileri gibi nedenlerle çoğul gebeliklerin insidansı artmıştır. Preterm eylem, çoğul gebeliklerde perinatal morbidite ve mortalitenin en önemli sebebi olmaya devam etmektedir. Bu gebeliklerdeki preterm eylem oranının yüksek olması, uterus distansiyonunun artmış olması ile ilişkilendirilmiştir (2).

2.2. Otofaji

Otofaji, Yunanca “auto” (kendi) ve “phegein” (yemek) kelimelerinden oluşur. Gereksiz, hasarlı veya yıkıcı sitoplazmik organel veya makromoleküllerin ortadan kaldırılması yoluyla hücresel homeostazisin sağlanması amaçlanan bir intrasellüler süreçtir. Hedef yapılar lizozomal yıkıma uğratılır ve oluşan yeni ürünler anabolik yollarla ve enerji üretiminde kullanılırlar. Otofaji aynı zamanda intrasellüler bakteri ve virüslerin

eliminasyonundan sorumludur ve hem doğal hem kazanılmış immün sistemin önemli bir komponentidir (16).

Otofaji mekanizması, homeostazisten sapan intrasellüler ortama cevaben işlemeye başlar. Hedef yapı veya makromolekülü saracak iki membranlı “fagofor” yapısının oluşmasında görevli birçok protein vardır. Fagofor tamamen kapandıktan sonra “otofagozom” ismini alır. Otofagozom, lizozom ile birleşerek “otolizozom”u oluşturur. Lizozomal enzimler otolizozomal içeriğin yıkımını gerçekleştirir ve sitoplazmaya aminoasitler, yağ asitleri ve monosakkaridler salınır. Bu yolağın çeşitli basamaklarında görevli proteinlere otofaji ilişkili gen (Oig/Atg) proteinleri denir. Otofaji yolağındaki diğer kritik iki protein is beclin 1 ve light chain 3 (LC3) preteinleridir (1). Şekil 1’de otofaji yolağı gösterilmektedir.



Şekil 1: Otofaji yolağında yer alan basamaklar

Beclin 1’in fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K)’a bağlanması, otofaji indüksiyonunun ve fagofor oluşumunun ilk basamağını oluşturur. PI3K kompleksi Atg12/Atg5/Atg16 ve protein light chain 3B (LC3B)-2 komplekslerini fagofora eklenmesini sağlar. Bu eklenme; otofagozomun membran elongasyonunu ve ekspansiyonunu sağlar. Atg7,

Atg12'nin aktivasyonunu ve Atg5'e konjugasyonunu sağlar. Atg5-Atg12 konjugatı, Atg16L1 ile birleşerek fagofor membranına tutunur. Atg3, Atg7 ve Atg12/Atg5/Atg16L1 kompleksi; LC3B-1'in fosfatidiletanolamin (PE) ile birleşerek LC3B-2 kompleksinin oluşumuna yardımcı olurlar (17).

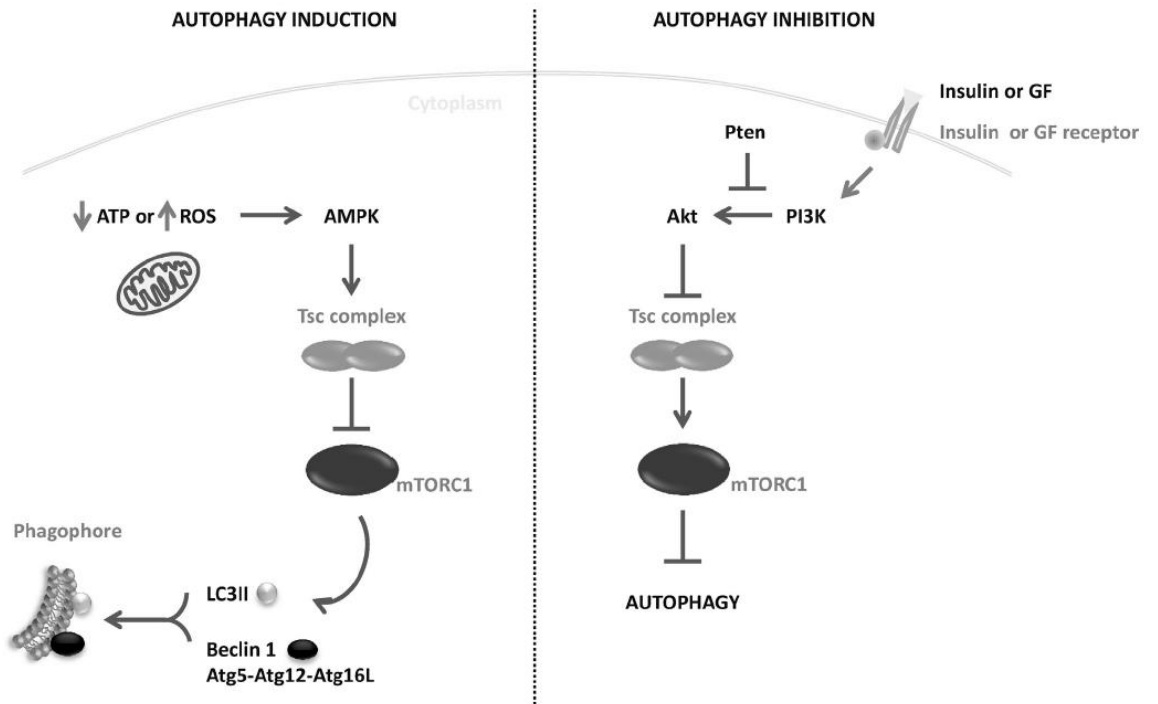
2.2.1. Otofajinin Düzenlenmesi

Otofaji mekanizmasını uyaran temel etkenler yetersiz besin veya enerji kaynağı, metabolik stres ve büyüme faktörü yetmezliği durumlarıdır. Otofaji sürecini başlatan önemli proteinlerden biri mTOR'dur (mammalian target of rapamycin). Bu serin/treonin kinaz enzimi, intrasellüler ortamdaki besin ve enerji substratlarının yeterliliğini algılar. Bu faktörlerdeki azalma mTOR fonksiyon kaybına ve otofajinin başlamasında neden olur (18).

mTOR, mTORC1 ve mTORC2 multiprotein komplekslerinin bir bileşenidir. mTORC1 protein ve lipid sentezi ile hücre büyümesini kontrol ederken, mTORC2 sitoskeletal organizasyonu düzenler (19). Aminoasit deprivasyonunda, hipoksi veya enerji üretiminde düşüş varsa; hücre içi AMP/ATP oranındaki artış, Tsc2 (tuberoz skleroz kompleksi 2 veya tuberin)'yi fosforile ederek aktive eden 5'-AMP-aktive protein kinaz (AMPK) aktivasyonuna neden olur. Hipoksi ve besin yoksunluğu, diğer yandan AMPK'yı daha da uyaran reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşmasını artırır. Bu durum da mTORC1 aktivitesinin inhibisyonuna ve otofajinin indüklenmesine; Atg proteinlerinin, LC3 ve beclin 1'in sentez ve aktivasyonuna neden olur (20). mTORC1'in kesin rolü henüz anlaşılamamış olsa da, mTORC1 ile etkileşime girerek otofaji regülasyonunda görev yaptığı düşünülmektedir (21). Otofaji indüksiyonunda yer alan bir diğer yolak ise PI3K-Akt-mTOR yolağı olarak bilinir. Sınıf 1 fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K), hücresel büyüme veya çoğalmayı uyaran insülin, büyüme faktörleri

tarafınca tetiklenir. Bu da, Akt (v-akt murine timoma viral onkojen homolog 1 Akt) isimli bir protein kinazı aktive eder. Aktive Akt, Tsc2'yi inhibe ederek, mTORC1'i aktive eder ve otofajiyi inhibe eder. Akt aktivasyonu, Pten (fosfataz ve tensin homolog) isimli tümör süpresör protein tarafınca inhibe edilir. Bu inhibisyon otofajinin indüklenmesine neden olur (22). Şekil 2'de otofaji regülasyonu gösterilmiştir.

Otofaji yolağındaki fizyolojik aktivasyon ya da birleşme sürecindeki bozukluklar birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında nörodejeneratif hastalıklar, kardiyopatiler, enfeksiyöz hastalıklar, otoimmünite ve kanser mevcuttur (23).



Şekil 2: Otofaji yolağının regülasyonu

Otofajinin, üreme spektrumunda primordial follikül ve spermatozoa gelişiminden plasental gelişime kadar olan basamaklarda temel fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Gebelik esnasındaki uterin sükunet halinin korunmasında da rolü olduğu öne sürülmektedir.

2.3. Otofaji ile Preterm Eylem İlişkisi

Otofaji ile preterm eylem ilişkisini irdeleyen az sayıda çalışma mevcuttur. Bilgilerimiz daha çok hayvan deneyleri kaynaklıdır. Knock-out farelerin kullanıldığı bir deneyde, mTORC1 sentezinin arttığı yani otofajinin inhibe edildiğinde preterm doğum ile karşılaşıldığı saptanmıştır (24). Bu farelerde prostaglandin sentezinin artması ile sonuçlanan prostaglandin F sentaz ve siklooksijenaz 2 enzimlerinin de arttığı gözlenmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, preterm eylem ile sonuçlanmış gebelerin plasentasında, inflamasyon ile bağlantılı bir şekilde otofaji ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir (25). Gebelikte, yüksek seviyelerde ROS üretimi ve buna mukabil yeterli otofajik cevabın geliştirilememesi preterm eylem ve doğuma neden olabileceği savunulmuştur (26).

İnsanlarda, plasental gelişimin erken evreleri düşük oksijen ve glukoz ortamında gerçekleşir. Bu orta dereceli hipoksik ortam ROS oluşumuna neden olarak normal gebelikteki oksidatif strese katkıda bulunur (27). Plasental gelişimin erken evrelerinde, anabolik ve katabolik yolların dengede yürümesi ve embriyo ve plasentanın büyümesinin sağlanmasında otofaji temel rol oynar. Erken gebelik dönemindeki hipoksi, besin deprivasyonu ve oksidatif stres gibi durumlar mTOR supresyonu üzerinden otofajiyi stimüle eder (28). Otofagozom oluşumunda gerekli olan LC3'ün aktif formu, erken gebelik döneminde villöz sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlarda saptanmıştır (29). In vitro ortamda hipoksinin indüklediği otofaji ile, ekstrasvillöz trofoblast invazyonunun arttığı gözlenmiştir (30). Normal üçüncü trimester plasenta dokusundan ve amniyotik epitel hücrelerinden yapılan çalışmalarda da otofaji varlığı gösterilmiştir (31, 32).

Trofoblastlarda gözlenen otofajinin, yeterli plasentasyonun sağlanması ile hücresel sağkalımın ve kısa dönemli besinsel deprivasyon dönemlerinde fetal sağkalımın sağlanmasında adaptif rolünün olduğu düşünülmektedir. Ekstravillöz trofoblastların, endometriyel invazyonun otofajik yolakla desteklenmesinin keşfi, ileride farmakolojik müdahaleler ile bu yolağın yönetilmesi araştırılabilecektir. Bu sayede preterm doğumun gelişiminin önüne geçilmesi mümkün olabilecektir.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmamız prospektif kontrollü bir çalışma olarak tasarlanmıştır. Bu çalışmaya; Ocak 2016 – Ocak 2017 tarihleri arasında, Gazi Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Perinatoloji Ünitesinde gebelik takibi yapılan, 34 hafta altında doğum ile merkezimizde gebeliği sonuçlanan hastalar alınmıştır.

Üçüncü basamak sağlık kuruluşu olarak çalışan birimimizde; gebeler ilk trimesterde takibe alınmakta, ilk başvuruda gebelerin medikal ve obstetrik hikayeleri alınmakta, son adet tarihlerine göre gebelik haftaları hesaplanmakta ve ultrasonografi ile doğrulanmaktadır. Hastalara; polikliniğe başvurdıkları gestasyonel yaşa göre, birinci veya ikinci trimester fetal anöploidi taraması yapılmakta ve tüm gebeler fetal anatomi taraması için 18-22. haftalar arası ultrasonografik olarak değerlendirilmektedir.

Araştırmamıza; 34 hafta altında preterm doğumla sonuçlanmış 16 gebe ve kontrol grubu olarak komplikasyonsuz tekil, mükerrer sezeryan endikasyonu ile term sezaryen doğum ile sonuçlanan 6 gebelik dahil edilmiştir. Hasta grubu ve kontrol grubundaki gebelerin doğumları sonlandıktan sonra, plasentalarından örnekleme yapılmıştır. Bu örneklerden otofaji yolağında görev alan genler çalışılmıştır.

➤ Çalışmaya Alınma Kriterleri:

- Ocak 2016-Ocak 2017 tarihleri arasında, gebeliğin 34. Haftasından önce preterm doğumla sonuçlanan tekil gebelik olması
- Gebeliğin takibinin Gazi Üniversitesi Perinatoloji Ünitesinde yapılması
- Gebeliğin Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde sonuçlanması

➤ Çalışmaya Alınmama Kriterleri:

- Gebeliğin takibinin bir başka merkezde yapılmış olması

- Gebeliğin başka bir merkezde sonuçlanması
- Fetusu ait kromozomal ya da yapısal anormallikler
- Çoğul gebelikler
- Medikal nedenler ile (gestasyonel hipertansiyon, preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği, plasenta previa, gestasyonel diyabet, maternal hastalıklar) preterm doğumla sonuçlanan gebelikler

3.1. İstatistiksel Yöntemler:

Verilerin analizi SPSS for Windows 22.0 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan (minimum-maksimum) biçiminde, kategorik değişkenler ise olgu sayısı ve (%) şeklinde gösterildi.

3.2. RNA İzolasyonu

1- Hastalardan ve kontrol grubundan plasenta dokusu steril bir şekilde alınarak RNA Later (Ambion, L/N:1305012, USA) solüsyonu içerisine aktarıldı. RNA izolasyonu yapılana kadar dokular -86°C 'de muhafaza edildi. Toplam olarak 16 kontrol ve 8 hasta grubu çalışılmıştır.

2-RNA'yı izole etmek için Trizol (Invitrogen, L/N:10531401) ve QIGENE Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen,L/N:157014006) kullanıldı.

3-RNA izolasyonu için her örnekten 300 mg doku kullanıldı. Dokuların üzerine 1 ml Trizol ilave edildi. Doku homojenizatör (IKA, Germany) kullanılarak homojenize edildi. Lizat üzerine 200 μl kloroform eklenerek 3 dk oda sıcaklığında bekletildi.

4- Lizat 10 dk $13000\times g$ ve 4°C 'de santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve içerisine eşit hacimde etanol (%70'lik) ilave edildi. Elde edilen lizat, spin klona aktarıldı ve $8000\times g$ 'de santrifüj edildi.

5- Rneasy Plus kitinin içeriğinde bulunan yıkama solüsyonları sıra ile spin kolon içine koyularak santrifugasyon yapıldı.

6- Örnekte bulunan DNA'ları parçalayabilmek için 10 µl DNase, 70 µl RDD solüsyonu ile karıştırılarak spin kolon içine ilave edildi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.

7- İnkübasyon sonunda, Rneasy Plus kitinin içeriğinde bulunan yıkama solüsyonları sıra ile spin kolon içine koyularak santrifugasyon yapıldı.

8. Son aşamada RNA'yı Spin kolondan ayırmak için spin kolon içine 30 µl RNase Free su eklenerek santrifugasyon yapıldı. Klondan geçen elüsyon (RNA) steril bir tüp içinde toplandı. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu belirlendi. RNA'ları cDNA'ya çevirebilmek için aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı.

3.3. cDNA elde edilmesi

cDNA elde etmek için RT2 First Strand Kit (Qigen, L/N:0314154506) kullanıldı.

Genomik DNA eliminasyonu için aşağıda belirtilen mix hazırlandı. Hazırlanan örnek thermal cycler cihazında 42°C'de 5 dk. inkübe edildi.

Genomik DNA elimination mix

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
RNA	1 µg
Buffer GE	2 µl
RNase-free water	(variable)
Total volume	10 µl

Reverse-transkripsiyon mix aşağıdaki gibi hazırlandı. İçerisine Genomik DNA eliminasyonu yapılmış olan RNA rneęi ilave edildi. Son hacim 20 µl olan örnek, thermal cyclers cihazında 42°C’de 15 dk ve 95°C’de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra elde edilen cDNA sonraki aşamada kullanılabilece kadar -20°C’de muhafaza edildi.

Reverse-transkripsiyon mix

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
RNase-free water	3 µl
Total volume	10 µl

3.4. RT-PCR Array ve Sonuçların Analizi

RT-PCR Array yapmak için, PAHS-084ZF Human Autophagy PCR Array (Qiagen,L/N: IB05.2-R1) kiti kullanıldı. Kit içeriğinde bulunan SYBR Green Master Mix solüsyonu ile cDNA rneęi karıştırıldı. Bu karışım, 96 kuyucuklu array platede her kuyucuğa son hacim 25 µl olacak şekilde dağıtıldı. 96’lık Array plate, Roche LightCycler 480 cihazına yerleştirilerek, üretici firmanın tavsiye ettiği program uygulandı. PCR cihazından elde edilen veriler QIAGEN Data analiz programı ile analiz edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya katılan hastaların yaş, obstetrik hikaye ve doğum sonuçlarının dağılımı Tablo 4.1’de verilmiştir. Preterm doğum grubundaki hastaların ortalama yaşı $29,3 \pm 3,8$, ortalama gebelik sayıları $1,7 \pm 0,6$, ortalama doğum haftası $31,5 \pm 1,5$ ve ortalama doğum ağırlığı 1856 ± 256 gr idi. Buna karşılık kontrol grubundaki hastaların ortalama yaşı $31,5 \pm 2,2$, ortalama gebelik sayıları $2,5 \pm 0,75$, ortalama doğum haftası $38,6 \pm 0,5$ ve ortalama doğum ağırlığı 3555 ± 235 gr idi (**Tablo 1**).

Tablo 1. Hastaların demografik özelliklerinin gruplar açısından değerlendirilmesi

Gruplar	Yaş (Ortalama, SD)	Gravida (Ortalama, SD)	Parite (Ortalama, SD)	Doğum Haftası (Ortalama, SD)	Doğum Ağırlığı (Ortalama, SD)
Preterm Doğum Grubu	29,3 (3,8)	1,7 (0,6)	0,4 (0,6)	31,5 (1,5)	1856 (256)
Kontrol Grubu	31,5 (2,2)	2,5 (0,75)	1,4 (0,5)	38,6 (0,5)	3555 (235)

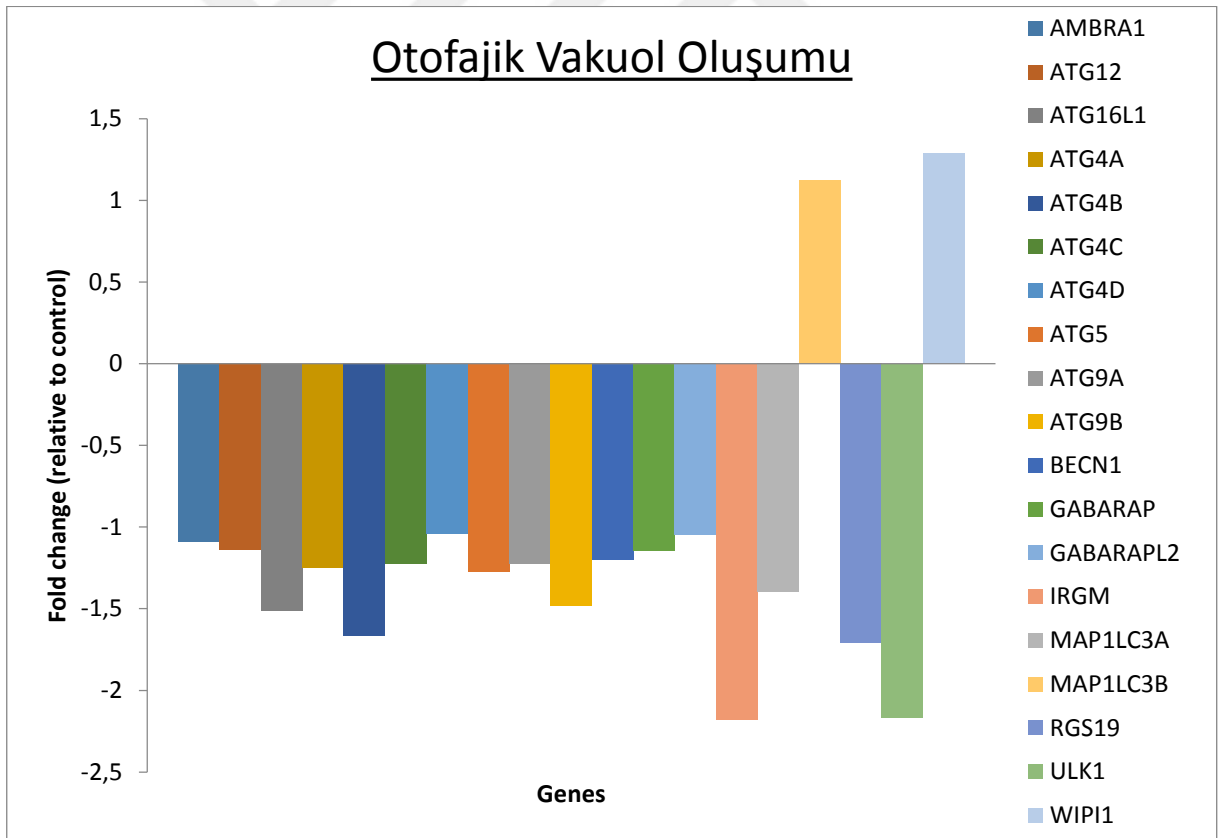
Çalışmamızda, preterm eylem ile sonuçlanan vaka grubu ve kontrol grubundaki hastaların plasental örneklerinde otofaji mekanizması komponentleri ve otofajinin düzenlenmesinde görevli gen gruplarına ait ekspresyon farklılıkları karşılaştırılmıştır. Gen grupları ve ilgili genler şu şekilde gruplandırılmıştır:

- Otofajik Vakuol Oluşumu İle İlgili Gen Grubu: AMBRA1, ATG12, ATG16L1, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG5, ATG9A, ATG9B, BECN1, GABARAP, GABARAPL2, IRGM, MAP1LC3A, MAP1LC3B, RGS19, ULK1, WIPI1

- Otofagozom-Lizozom Bağlanması İle İlgili Gen Grubu: DRAM1, GABARAP, LAMP1, NPC1
- Diğer İntrasellüler Sinyaller Nedeniyle Oluşan Otofaji İle İlgili Gen Grubu: CTSD, CTSS, DRAM2, EIF4G1, ESR1, GAA, HGS, MAPK14, PIK3C3, PIK3R4, RPS6KB1, TMEM74, ULK2, UVRAG
- İntrasellüler Patojenlerin İndüklediği Otofaji İle İlgili Gen Grubu: EIF2AK3, IFNG, LAMP1
- Şaperon Aracılı Otofaji İle İlgili Gen Grubu: HSP90AA1, HSPA8
- Otofaji ve Hücre Siklusu Koregülasyonu İle İlgili Gen Grubu Profili: BAX, CDKN1B, CDKN2A, IFNG, PTEN, RB1, TGFB1, TP53
- Proteaz Aktivitesi İle İlgili Gen Grubu: ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D
- Protein Transportu İle İlgili Gen Grubu: ATG10, ATG16L1, ATG16L2, ATG3, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG7, ATG9A, GABARAP, GABARAPL2, RAB24
- Protein Ubikitinasyonu İle İlgili Gen Grubu: ATG3, ATG7, HDAC6
- Vakuol Hedeflenmesi İle İlgili Gen Grubu: ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, GABARAP
- Otofaji ve Apoptozisin Koregülasyonu İle İlgili Gen Grubu: AKT1, APP, ATG12, ATG5, BAD, BAK1, BAX, BCL2, BCL2L1, BECN1, BID, BNIP3, CASP3, CASP8, CDKN1B, CDKN2A, CLN3, CTSB, CXCR4, DAPK1, DRAM1, EIF2AK3, FADD, FAS, HDAC1, HTT, IFNG, IGF1, INS, MAPK8, MTOR, NFKB1, PIK3CG, PRKAA1, PTEN, SNCA, SQSTM1, TGFB1, TGM2, TNF, TNFSF10, TP53

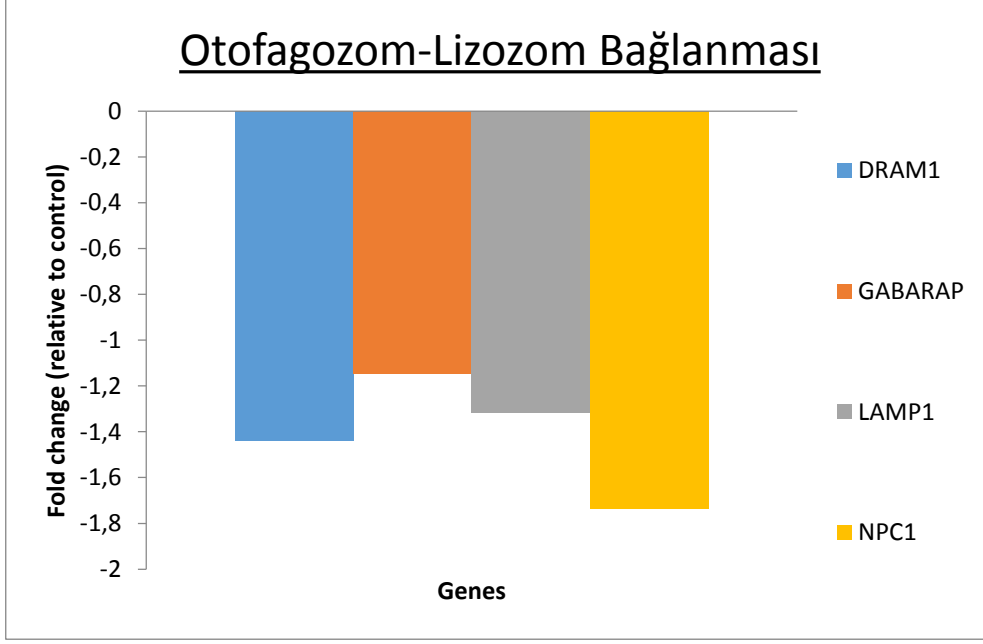
Preterm doğum grubundaki hastaların gen ekspresyon farklılıkları “fold regulation” artış veya azalışı şeklinde incelendi.

Preterm doğum grubundaki hastalar, “Otofajik Vakuol Oluşumu İle İlgili Gen Grubu” profili açısından kontrol vakaları ile karşılaştırılmıştır. Bu grupta bulunan AMBRA1, ATG12, ATG16L1, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG5, ATG9A, ATG9B, BECN1, GABARAP, GABARAPL2, IRGM, MAP1LC3A, RGS19, ULK1 genlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir (**Grafik 1**).



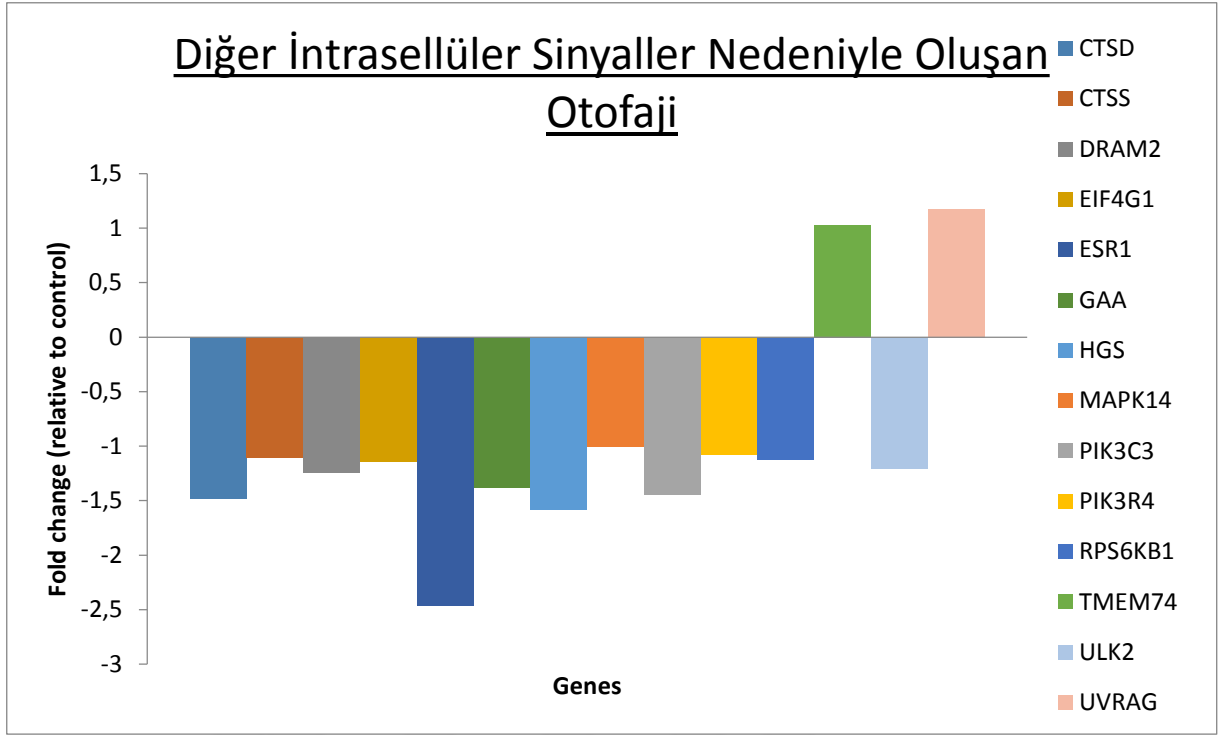
Grafik 1: Otofajik Vakuol Oluşumu İle İlgili Gen Grubu Profili

“Otofagozom-Lizozom Bağlanması İle İlgili Gen Grubu” açısından preterm doğum ile sonuçlanan grupta, kontrol vakalara göre DRAM1, GABARAP, LAMP1, NPC1 genlerinin tamamının ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı izlenmiştir (**Grafik 2**).



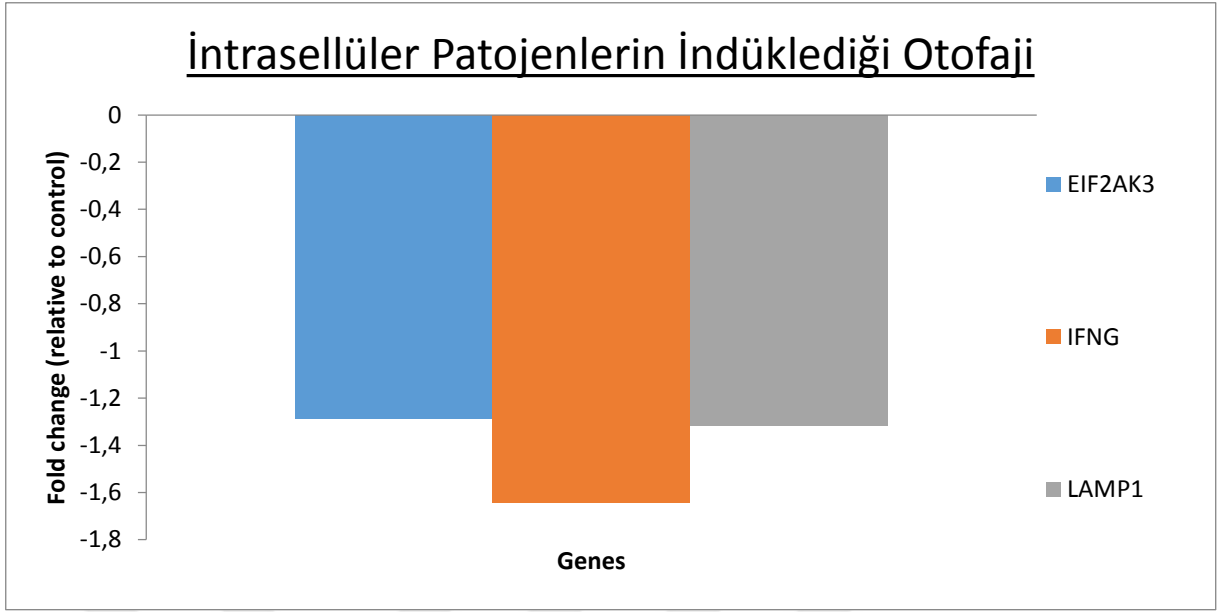
Grafik 2: Otofagozom-Lizozom Bağlanması İle İlgili Gen Grubu Profili

Hastalar; “Diğer İntrasellüler Sinyaller Nedeniyle Oluşan Otofaji İle İlgili Gen Grubu Profili” açısından kıyaslandığında, “Preterm Doğum” grubunda CTSD, CTSS, DRAM2, EIF4G1, ESR1, GAA, HGS, MAPK14, PIK3C3, PIK3R4, RPS6KB1, ULK2 genlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (**Grafik 3**).



Grafik 3: Diğer İntrasellüler Sinyaller Nedeniyle Oluşan Otofaji İle İlgili Gen Grubu Profili

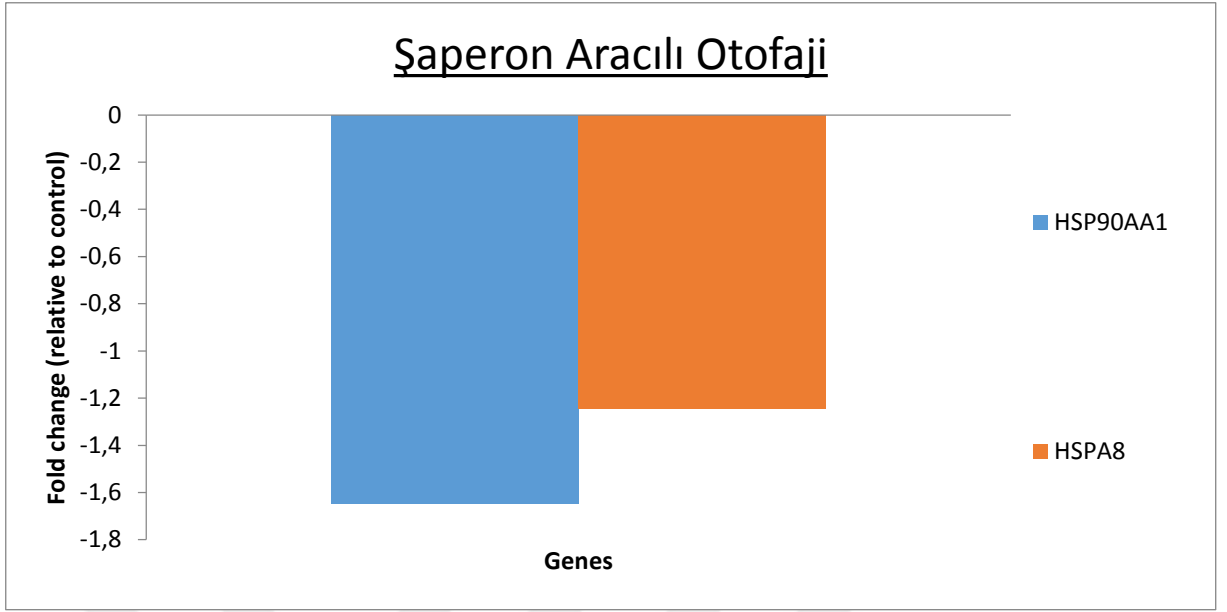
“Preterm Doğum” grubundaki hastalar, kontrol vakaları ile “İntrasellüler Patojenlerin İndüklediği Otofaji İle İlgili Gen Grubu” açısından kıyaslandığında ortaya çıkan gen profili **Grafik 4**’te gösterilmiştir. Buna göre bu yolda rol oynayan EIF2AK3, IFNG, LAMP1 genlerinin tamamının ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı ortaya konmuştur.



Grafik 4: İntrasellüler Patojenlerin İndüklediği Otofaji İle İlgili Gen Grubu Profili

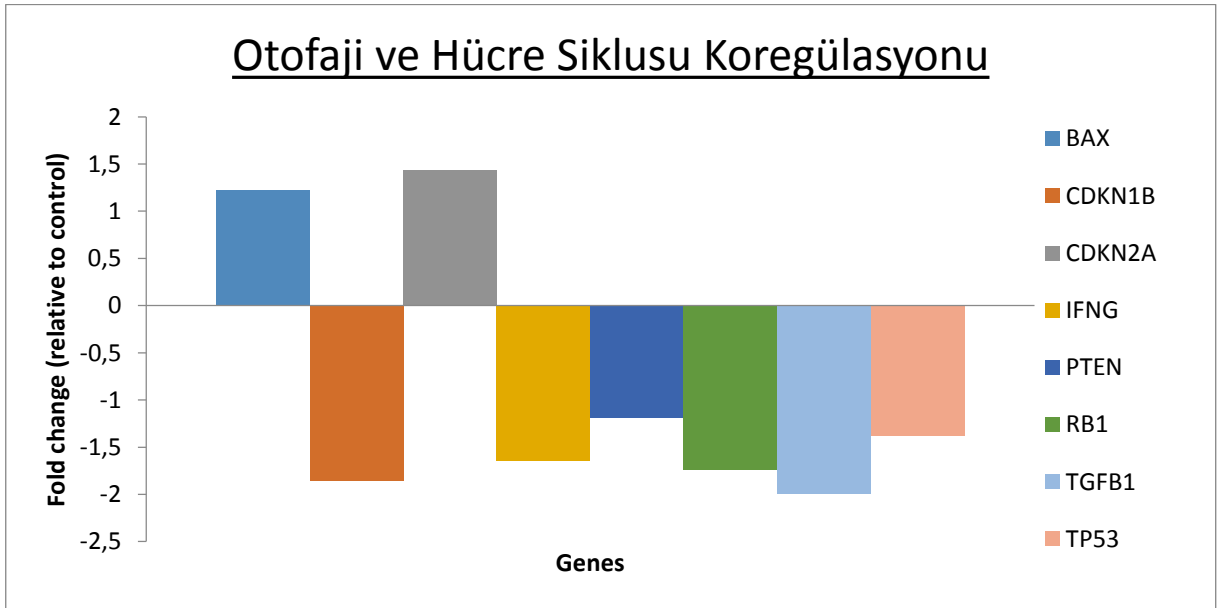
“Preterm Doğum” grubundaki vakalar, kontrol grubu ile “Şaperon Aracılı Otofaji İle İlgili Gen Grubu” açısından kıyaslandığında ortaya çıkan gen profili **Grafik 5**’tedir.

Buna göre bu yolakta rol oynayan HSP90AA1, HSPA8 genlerinin ikisinin de ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olduğu gözlenmiştir.



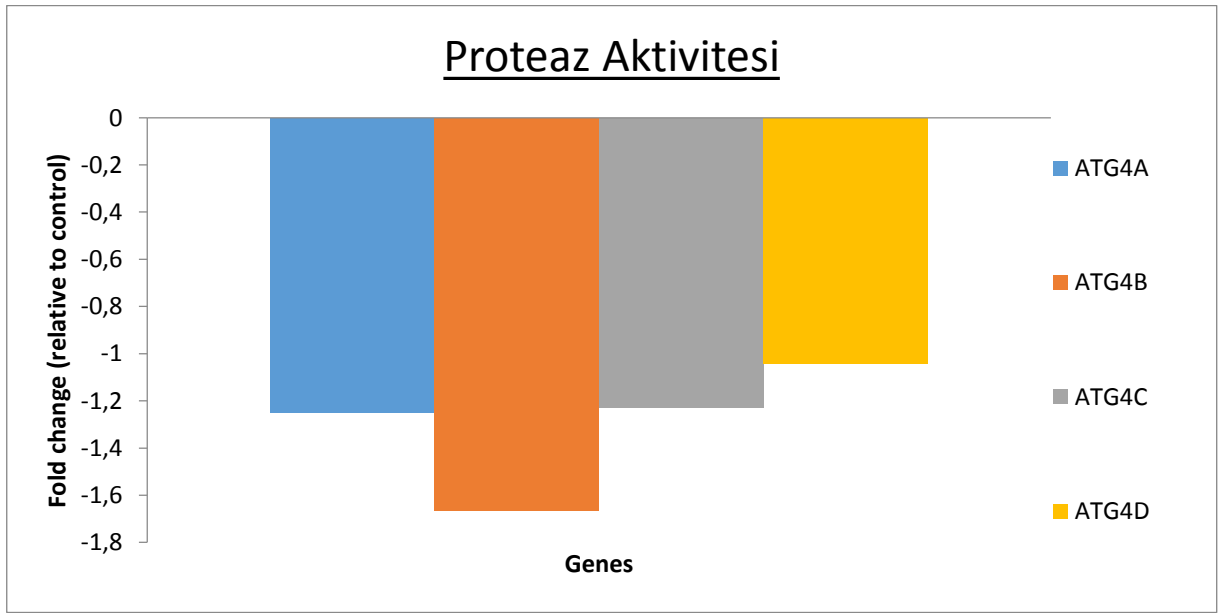
Grafik 5: Şaperon Aracılı Otofaji İle İlgili Gen Grubu Profili

“Otofaji ve Hücre Siklusu Koregülasyonu İle İlgili Gen Grubu” açısından “Preterm Doğum” ile sonuçlanan grupta, kontrol vakalara göre, CDKN1B, IFNG, PTEN, RB1, TGFB1, TP53 genlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı izlenmiştir (**Grafik 6**).



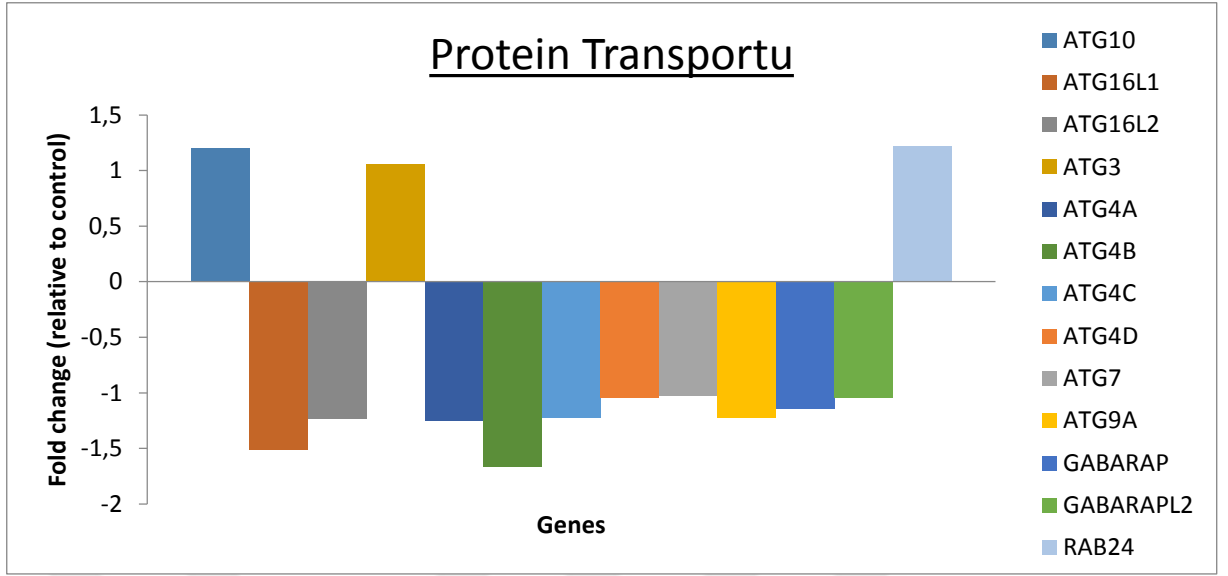
Grafik 6: Otofaji ve Hücre Siklusu Koregülasyonu İle İlgili Gen Grubu Profili

“Preterm Doğum” grubundaki hastalar, “Proteaz Aktivitesi İle İlgili Gen Grubu” profili açısından kontrol vakaları ile karşılaştırılmıştır. Bu grupta bulunan ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D genlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir (**Grafik 7**).



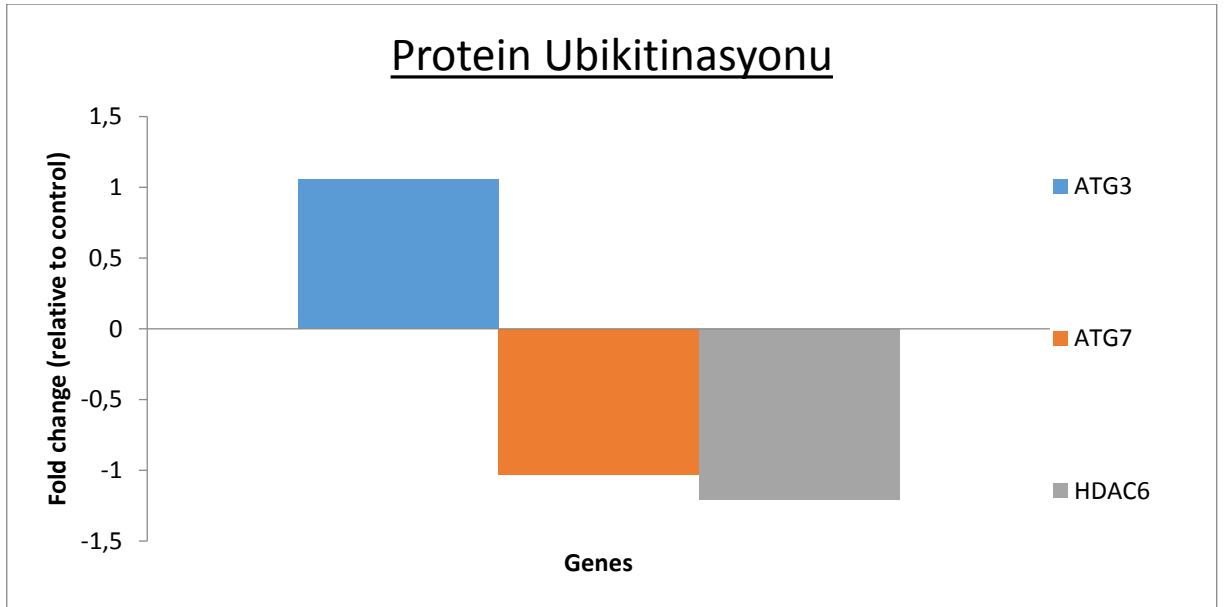
Grafik 7: Proteaz Aktivitesi İle İlgili Gen Grubu Profili

“Preterm Doğum” grubundaki vakalar, kontrol grubu ile “Protein Transportu İle İlgili Otofaji Gen Grubu” açısından kıyaslandığında ortaya çıkan gen profili **Grafik 8**’de gösterilmektedir. Buna göre bu yolda rol oynayan ATG16L1, ATG16L2, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG7, ATG9A, GABARAP, GABARAPL2 genlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olduğu gözlenmiştir.



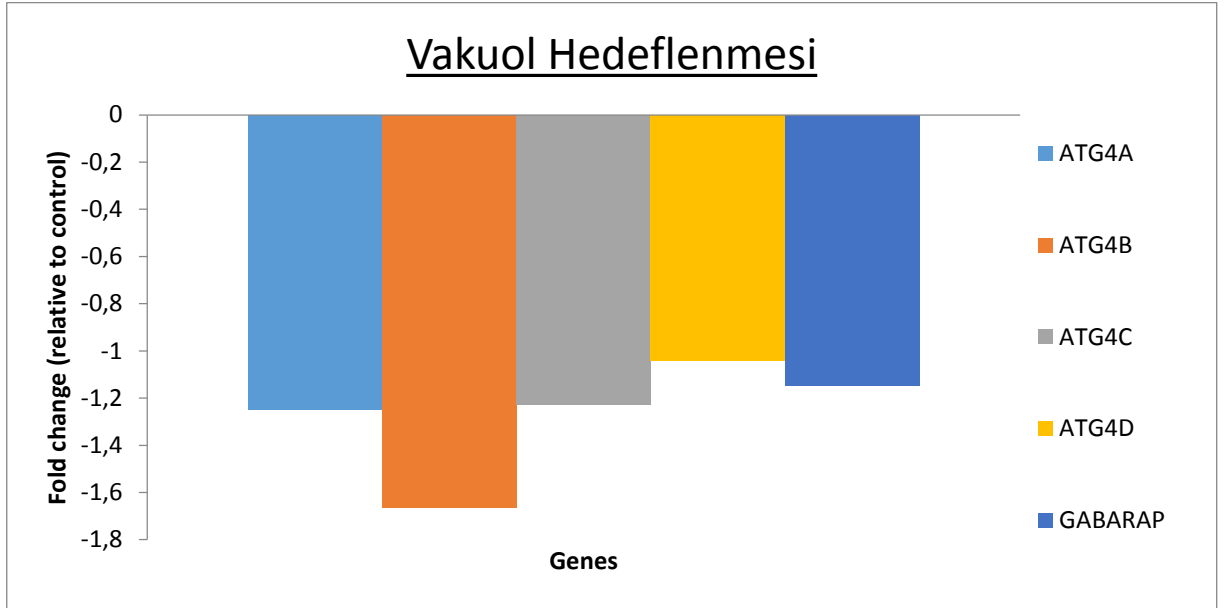
Grafik 8: Protein Transportu İle İlgili Gen Grubu Profili

“Protein Ubikitinasyonu İle İlgili Gen Grubu” açısından “Preterm Doğum” ile sonuçlanan grupta, kontrol vakalara göre ATG7 ve HDAC6 genlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı izlenmiştir (**Grafik 9**).



Grafik 9: Protein Ubikitinasyonu İle İlgili Gen Grubu Profili

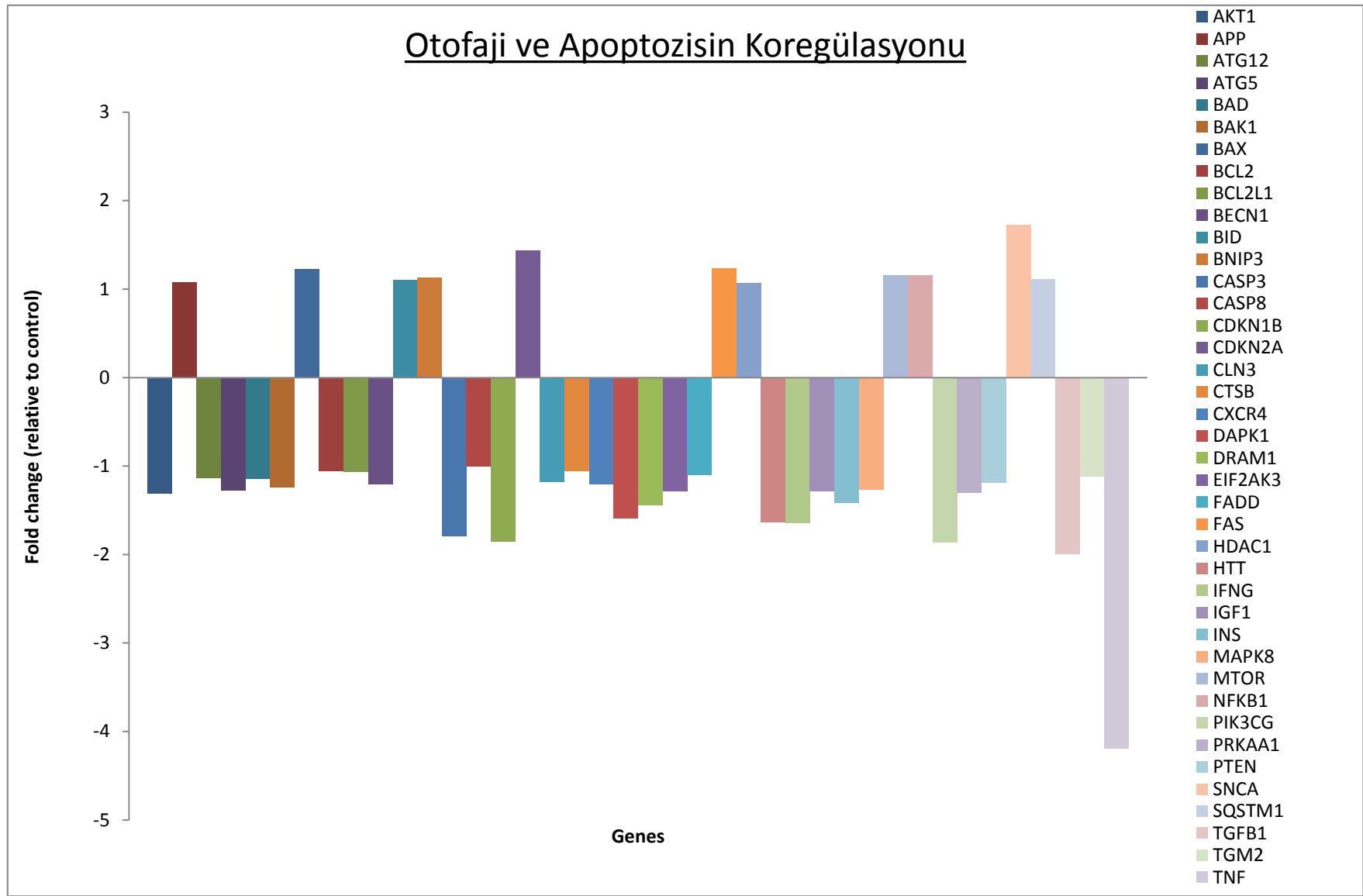
“Preterm Doğum” grubundaki hastalar, “Vakuol Hedeflenmesi İle İlgili Gen Grubu” profili açısından kontrol vakaları ile karşılaştırılmıştır. Bu grupta bulunan ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D ve GABARAP genlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir (**Grafik 10**).



Grafik 10: Vakuol Hedeflenmesi İle İlgili Gen Grubu Profili

“Preterm Doğum” grubundaki vakalar, kontrol grubu ile “Otofaji ve Apoptozisin Koregülasyonu İle İlgili Gen Grubu” açısından kıyaslandığında ortaya çıkan gen profili

Grafik 11’dedir. Buna göre bu yolda rol oynayan AKT1, ATG12, ATG5, BAD, BAK1, BCL2, BCL2L1, BECN1, CASP3, CASP8, CDKN1B, CLN3, CTSB, CXCR4, DAPK1, DRAM1, EIF2AK3, FADD, HTT, IFNG, IGF1, INS, MAPK8, NFKB1, PIK3CG, PRKAA1, PTEN, TGFB1, TGM2, TNF, TNFSF10, TP53 genlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olduğu gözlenmiştir.



Grafik 11: Otofaji ve Apoptozisin Koregölasyonu İle İlgili Gen Grubu Profili (bu sayfayı yan şekilde basacağız, açıklaması bir sonraki sayfada yer alacak)

5. TARTIŞMA

Preterm doğum; gebeliğin en sık gözlenen komplikasyonlarından biri olmasına rağmen, üzerinde fikir birliğinin net olarak bulunmadığı bir konudur. “Maternal-Fetal Tıp”, ileri tanı yöntemleri sayesinde yüksek riskli hastaların erken dönemde saptanması ve erken müdahale sayesinde bu komplikasyonların önüne geçmeyi hedeflemektedir. Olgunun sıklığı ve ilişkili olduğu perinatal sorunlar, uzun yıllardır çalışmalara konu olmuş ve ortaya konmuştur. Ancak hem preterm eylemin tanısındaki hem de olası nedenler ve bunlara yönelik tedaviler hakkındaki farklı bulgular; konunun, modern obstetriye ait “gri bölgelerden” sadece birini daha oluşturmaktadır.

Otofaji mekanizmasının ilk kez tanımlanmasının üzerinden yaklaşık 60 yıl geçmiştir. İlk başlarda, hücrel bileşenlerin geri dönüşümü için kullanılan bir yıkım mekanizması olarak görülse de, günümüzde birçok fizyolojik süreçte hücrel gelişim ve farklılaşmadan sorumlu bir sistem olduğu ortaya konmuştur (33). Bunun yanı sıra, üreme spektrumunda bulunan primordial follikül ve spermatozoa gelişimlerinden embriyo oluşumuna, plasental yatağın gelişimine kadar birçok süreçte, otofajinin temel rol oynadığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur.

Bu çalışmamız ile; bunların yanı sıra, gebelikte uterin sakinlik halinin korunmasında fizyolojik bir rolü olduğu ileri sürülen otofaji mekanizmasında yer alan ve/veya otofaji yolağının düzenlenmesinde görevli genlere ait ekspresyon farklılıklarının ve dolayısı ile bozulmuş otofaji sistemi ile preterm doğum arasındaki olası ilişkiyi ortaya koymayı amaçladık. Bu kapsamlı çalışma sonucu elde edilecek verilerin bu konuda literatüre katkı sağlayacağı kanısındayız.

BECN1 geni, otofajinin düzenlenmesinde temel rol oynayan protein olan beclin 1'i kodlar. Otofagozom oluşumunun ilk aşamalarında ve matürasyonunda rol oynayan fosfatidilinozitol-3-kinaz (PIK3) kompleksinin bir bileşenidir. Yaptıkları hayvan deneylerinde, Gawriluk ve arkadaşlarının (2015) otofaji yolağında görevli Beclin1 (BECN1) geni delesyona uğratılmış farelerin gebeliği sürdüremediğini ortaya koymuşlardır. Gebelik süresince progesteron seviyelerini takipleri sonucunda, bu farelerin progesteron seviyelerinin de düşük olduğunu saptamışlardır. Konock out farelerin corpus luteumları incelendiğinde, lipid depolarının normal kontrollere göre çok daha az olduğu gözlenmiştir. Farelere eksojen progesteron desteği verildiğinde ise gebelik sürelerinin kontrol vakaları kadar uzun olduğu görülmüştür. Memelilerde gebeliğin devamının sağlanması için progesteron hormonunun gerekli olduğu bilinmektedir. Buradan yola çıkarak, corpus luteum'da steroidojenik görevli hücrelerin hormon sentezi için BECN1 geni fonksiyonuna dayandığı sonucuna varılmıştır (34). Brickle ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları araştırmada; spontan preterm doğumlarda, fetal membranlar incelendiğinde otofajik aktivitenin azalmış olduğu saptanmıştır. Preterm doğum yapan hastalarda Beclin1 ve Atg7 proteinlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı ortaya konmuştur (17). ATG7 (Autophagy Related 7) geni, otofaji ve sitoplazmik vakuol transportunda görevli Atg7 enzimini kodlayan gendir. Atg7, Atg12'nin aktivasyonunu ve Atg5'e konjugasyonunu sağlar. Bizim çalışmamızda da; preterm doğum ile sonuçlanan hasta grubu, kontrol vakalar ile kıyaslandığında BECN1 ve ATG7 genlerinin ekspresyonunda anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada, preterm doğum yapan hastalar, eyleme girmeden yine preterm dönemde sezeryana alınan vakalar ile karşılaştırılmıştır. Bu yönüyle örneklem açısından bizim çalışmamız ile temel farklılık arz etmektedir. Bahsi geçen

çalışmada, bu iki grup arasında Atg3, Atg5, Atg12 ve Atg16L1 protein ekspresyonları açısından ise anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Hücre içinde vakuol transferi, otofaji ve mitokondriyal homeostaziste görevli olan Atg3 enzimini kodlayan ATG3 geni açısından bakıldığında, bizim çalışmamızda gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Otofajik vezikül formasyonu, oksidatif hasardan sonra mitokondriyal tamir, antiviral bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, lenfosit gelişimi ve proliferasyonu gibi bir çok işlevi olan Atg5 proteinini ATG5 geni kodlar. Atg5 proteini, daha önce de belirtildiği gibi Atg12 ve Atg16L1 ile konjuge olup fagofor membranına tutunur. Çalışmamızdaki preterm doğum grubunda, ATG5, ATG12 ve ATG16L1 gen ekspresyonlarının anlamlı derecede azalmış olduğu saptanmıştır. Literatürde, preterm doğum ile ATG5 ve ATG12 ekspresyonlarının azalması arasında şimdiye kadar olan bilgilerimiz dahilinde daha önce böyle bir ilişki henüz tarif edilmemiştir. Ancak Cao ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada, özellikle 32 haftanın altında doğan preterm olgularda, ATG16L1 ekspresyonunun anlamlı ölçüde azalmış olduğu saptanmıştır (35). Çalışmamıza dahil ettiğimiz preterm doğum olgularının tamamının 34. gebelik haftasından önce doğum yapan hastalar olduğu göz önünde tutulursa, sonuçlarımızın bu çalışmayı destekler nitelikte olduğu anlaşılmaktadır. Doulaveris ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, spontan eyleme girmeyen term hastalar değerlendirilmiştir. Bu hastalara doğum indüksiyonu uygulanmıştır. ATG16L1 geninde, otofajinin indüklenmesinde azalma ile ilişkili bir polimorfizmi olan vakaların çok daha hızlı bir şekilde eyleme gördüğü saptanmıştır. Bu ilişki, otofaji inhibisyonunun eylemin uyarılması ile ilişkili olduğunun bir diğer göstergesi olarak değerlendirilebilir (36).

mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) geni, hücre proliferasyonu ve sağkalımında önemli rol oynayan bir serin/treonin kinazdır. Bu kompleks, otofajinin inhibisyonundan sorumludur. Artmış mTORC1 sinyalizasyonunun hücresel yaşlanma yollarını hızlandığı ortaya konmuştur (37). Hirota ve ark.(2011), farelerde geliştirdikleri modelde, mTORC1 sinyalizasyonunun artmasını sağlamışlardır. mTORC1 sinyalizasyonunun artırıldığı farelerin gebeliklerinde, desidual yaşlanma bulgularının anlamlı şekilde daha erken dönemde ortaya çıktığını ve bu vakaların preterm doğum ile sonuçlandığını gözlemlemişlerdir. Desidual yaşlanmanın belirteci olarak p53 fonsiyonunun azalması durumu kullanılmıştır. Preterm doğum ile sonuçlanan vakalarda, prostaglandin sentezinde rol oynayan ve dolayısı ile miyometriyel kontraktiletiyi artıran ve eylemin başlangıcından sorumlu olduğu düşünülen siklooksijenaz 2 (COX2) ve prostaglandin F sentaz (PGFS) aktivitelerinin artmış olduğunu saptamışlardır. Aynı modelde; mTORC1 sinyalizasyon yolağının inhibitörü olan rapamisin verildiğinde ise bu etkilerin geriye döndüğü, COX2 seviyelerinin bazale indiğı saptanmıştır (24). Bu bulgular mTORC1 sinyalizasyonunun, desiduada COX2 enziminin sentezini ve dolayısıyla preterm eyleme neden olduğı sonuçlarına varılabilir. Çalışmamızda, preterm doğum ile sonuçlanan grup kontrol vakaları ile karşılaştırıldığında, MTOR geninde anlamlı dereceye ulaşmayan bir aktivite artışı söz konusu idi. Bunun yanında, TP53 geninde anlamlı seviyede ekspresyon azalması gözlemlendi. Literatürde, preterm doğum ile sonuçlanmış insan plasentasında MTOR ve/veya TP53 geni ekspresyon seviyeleri ile ilgili çalışma henüz mevcut değildir. Anlamlı seviyeye ulaşmayan MTOR ekspresyon artışı bulgusu ile ilgili daha fazla vaka sayıları ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

IRGM geni, Immunity Related GTPase M proteinini kodlar. Bu protein, otofajik vakuol formasyonunda ve intrasellüler patojenlere karşı otofajik yanıtın verilmesinde görevlidir. Bu genin normal ekspresyonunu etkileyen polimorfizmlerin Crohn hastalığına ve tüberküloza yatkınlığa yol açtığı bilinmektedir (38, 39). Çalışmamızda, preterm doğum grubundaki hastalarda IRGM gen ekspresyonunun belirgin derecede azalmış olduğunu saptadık. Literatürde preterm doğum ile IRGM gen ekspresyonu ilişkisini irdeleyen bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır. Preterm doğumun bir kısmının enfeksiyon nedenli olduğu, mevcut bilgilerimiz arasındadır. Hastaları çalışmamıza dahil ederken her ne kadar klinik olarak saptanabilen enfeksiyonu olan hastalar dışlandıysa da, subklinik enfektif durumların olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. İntrasellüler patojenlerin eliminasyonundaki bozukluklar, sinsityotrofoblast ve sitotrofoblastların apoptozisine ve dolayısı ile maternal-fetal arayüzde çeşitli sorunlara yol açabilir. Bu konuda yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile bu olası ilişkinin aydınlatılabileceğini düşünmekteyiz.

ULK1 geni, açlık durumuna yanıt olarak oluşan otofaji mekanizmasında yer alan önemli bir serin/treonin protein kinaz enzimi kodlar. PI3K kompleksi ile birlikte, otofagozomların erken dönemlerindeki oluşumunu düzenler. Rhee ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada, diyetle indüklenmiş obezite yaratılan hayvan modellerinde, endometriyel stromal hücrelerin desidualizasyon durumu ve bu durumun otofaji ile olası ilişkisi araştırılmıştır. Diyet ile indüklenmiş obezite grubunda, kontrol grubuna göre desidualizasyonun anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Yine bu grup incelendiğinde, ULK1 ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı raporlanmıştır. Buradan yola çıkarak obezite ile ilişkili kötü obstetrik sonuçlarla, erken dönemdeki desidualizasyon defektleri arasında bir ilişki olabileceği öne sürülmüştür. Bu

desidualizasyon problemine otofaji mekanizmasındaki defektin katkıda bulunabileceği ve bu yolaktaki sorunların çözümünün olası komplikasyonların önüne geçebileceği ileri sürülmüştür (40). Ayrıca, Su ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada, hiperinsülinemik hayvan modelleri kullanılmıştır. Gebeliğin erken döneminde hiperinsülinemi yaratılan farelerde, implantasyon döneminde ovaryen luteinizasyonun ve fonksiyonun bozulduğu saptanmıştır. Overlerden alınan örnekler incelendiğinde ise otofaji yolağında önemli rol oynayan ULK1 geninin ekspresyonunun anlamlı seviyede azaldığı ortaya konmuştur. Araştırmacılar bu bulgulardan yola çıkarak, hiperinsülineminin luteinizasyon sürecindeki kötü etkilerinin bozulmuş otofaji mekanizması üzerinden ortaya çıkmış olabileceğini ileri sürmüşlerdir (41). Literatür araştırmamızda, preterm doğum ile ULK1 gen ekspresyonu seviyelerini doğrudan karşılaştıran bir çalışma bulunmamıştır. Çalışmamızda, preterm doğum ile sonuçlanan hasta grubumuzda, ULK1 gen ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olduğunu saptadık. Daha önceki çalışmalarda endometriyel desidualizasyon sorunlarının ve ovaryen luteinizasyon defektleriyle ilişkilendirilen azalmış ULK1 gen ekspresyonunu bulgularıyla kendi sonuçlarımızın paralel olduğu kanısındayız. Bu ilişkinin daha net olarak ortaya konuabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

ESR1 geni, bir nükleer hormon reseptörü olan estrogen reseptörü 1'i kodlar. Bu reseptörler özellikle reproduktif sisteme ait hücrelerde gen ekspresyonlarını, hücresel gelişim ve proliferasyonu düzenlerler. Estrojenin bunun dışında iskelet sisteminin gelişiminde, kardiyovasküler ve sinir sisteminin fonksiyonlarında görevleri olduğu bilinmektedir. Kim ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada; preterm ve term doğum yapmış olan vakaların plasentalarından örnekler alınmıştır. Bu örneklerde estrogen reseptörlerine ait ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Özellikle erken

preterm olgularda ESR1 ekspresyonunun belirgin ölçüde azalmış olduğu ortaya konmuştur. Estrojenin gebeliğin devamındaki önemi, reseptör ekspresyonu bağlamında da belirtilmiştir (42). Bizim çalışmamızda da ESR1 gen ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olduğunu saptandı. Preterm doğum grubundaki hastalarımızın tamamı erken preterm dönemde doğurmuş hastalardan oluştuğu göz önünde bulundurulacak olursa, önceki çalışmayı destekler nitelikte sonuçlara ulaşmış bulunmaktayız. Estrojenin etkilerini sıralarken, otofaji yolağındaki etkilerinin göz ardı edilmemesi gerektiği kanısındayız.

TNF geni, akut faz reaksiyonunu oluşturan ve sistemik inflamasyondan sorumlu ve temel olarak makrofajlardan salınan bir sitokin olan tümör nekrozis faktör'ü (TNF) kodlar. Pro-apoptotik bir sitokindir ve otofajinin indüklenmesi fonksiyonu vardır. Çalışmamızda preterm doğumla sonuçlanan grupta TNF gen ekspresyonunun belirgin derecede azalmış olduğu saptandı. TNF'nin pro-inflammatuar bir sitokin olduğu bilinmektedir. Vaka seçiminde enfeksiyon bulgularının olduğu bireylerin çalışma dışı bırakıldığı göz önünde bulundurulacak olursa, inflamasyon ile ilişkili olmayan preterm olgularda bu sonuca ulaşılabilceği ileri sürülebilir. Otofajinin indüklenmesinde görevli olan TNF gen ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olması; erken preterm doğum olgularının, otofaji ve/veya apoptozis yollarındaki disregulasyon ile ilişkili olması durumunu destekler nitelikte olduğu kanısındayız. Çalışmamızın bu yönüyle, literatüre farklı bir bakış açısı sunduğu kanaatindeyiz.

Günümüzde, fizik muayene, biyokimyasal testler, ultrasonografik parameteler kullanılarak preterm doğumun öngörülmesi için protokoller geliştirilmektedir. Ne yazık ki, elimizdeki bu veriler daha ziyade indirekt bulguları kapsamakta ve öngörü açısından yetersiz kalmaktadır. Benzer şekilde, preterm eylemin başlangıcını geciktirmek veya

preterm doğuma ilerlemesini yavaşlatmak ya da engellemek için alınan önlemler nedenin kendisine yönelik olmaktan uzakta ve dolayısıyla yeterince iyi sonuçlara ulaşamamıştır. Preterm eylemde otofaji mekanizmasındaki bozuklukların (otofajinin anormal artması ya da azalması, kısaca disregülasyonu) saptanması, konunun şimdiye kadar bu açıdan yeterince değerlendirilmemiş olması açısından anlamlıdır. Birçok faktör tarafınca etkilenen gebelik fizyolojisi, plasental yapı ve metabolik değişiklikler göz önünde bulundurularak geliştirilen hayvan modellerinde ve bunların ışığında yapılacak insan çalışmalarında, gebelik ve doğum süreçlerinde otofajinin rollerinin tanımlanacağı kanısındayız.

Her hastanın tedavisi, hastalığına göre kişiselleştirilmelidir. Literatürde bulunan bilgiler ve elde ettiğimiz bulgular ışığında, uygulanacak tedavi ve takip stratejilerinin sayesinde olumlu sonuçlar alınabileceği kanısındayız. Elde edilecek verilerin gebelik sürecindeki fizyolojik ve patolojik değişikliklerin daha iyi anlaşılmasına ve çok da uzak olmayan bir gelecekte günümüzde yaşanan komplikasyonların daha etkili bir şekilde önlenmesi için kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Maternal-Fetal Tıp alanındaki birçok konuda olduğu gibi, çalışmamızın üzerinde yoğunlaştığı preterm doğum olguları ile ilgili; nedene yönelik, daha kapsamlı ve randomize kontrollü çalışmalara gereksinim vardır.

6. SONUÇLAR

- Preterm doğum, sadece bir sonuç değil, patofizyolojisi daha net ortaya konması gereken bir süreçtir.
- Preterm doğum ile sonuçlanan hasta grubu, kontrol vakalar ile kıyaslandığında BECN1 ve ATG7 genlerinin ekspresyonunda anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir.
- Hücre içinde vakuol transferi, otofaji ve mitokondriyal homeostaziste görevli olan Atg3 enzimini kodlayan ATG3 geni açısından araştırdığımızda, çalışmamızda gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.
- Çalışmamızda preterm doğum grubunda, ATG5, ATG12 ve ATG16L1 gen ekspresyonlarının anlamlı derecede azalmış olduğu saptanmıştır.
- Preterm doğum ile sonuçlanan grup kontrol vakaları ile karşılaştırıldığında, MTOR geninde anlamlı dereceye ulaşmayan bir aktivite artışı söz konusu idi. Bunun yanında, TP53 geninde anlamlı seviyede ekspresyon azalması gözlemlendi.
- Çalışmamızda, preterm doğum grubundaki hastalarda IRGM gen ekspresyonunun belirgin derecede azalmış olduğunu saptadık. Daha önce preterm doğum ile IRGM gen ekspresyonu ilişkisini irdelleyen bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır.
- Literatür araştırmamızda, preterm doğum ile ULK1 gen ekspresyonu seviyelerini doğrudan karşılaştıran bir çalışma bulunmamıştır. Çalışmamızda, preterm doğum ile sonuçlanan hasta grubumuzda, ULK1 gen ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olduğunu saptadık. Daha önceki çalışmalarda endometrial desidualizasyon sorunlarının ve ovaryen luteinizasyon defektleriyle ilişkilendirilen azalmış ULK1 gen ekspresyonunu bulgularıyla

kendi sonuçlarımızın uyumlu olduğu kanısındayız. Bu ilişkinin daha net olarak ortaya konuabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

- Çalışma grubumuzda, ESR1 gen ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olduğunu saptandı.
- Preterm doğumla sonuçlanan grupta, otofajinin indüklenmesinde görevli olan TNF gen ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olması; erken preterm doğum olgularının, otofaji ve/veya apoptozis yolaklarındaki disregulasyon ile ilişkili olması durumunu destekler nitelikte olduğu kanısındayız. Çalışmamızın bu yönüyle, literatüre farklı bir bakış açısı sunduğu kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Kanninen TT, de Andrade Ramos BR, Witkin SS. The role of autophagy in reproduction from gametogenesis to parturition. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2013;171(1):3-8.
2. Cunningham FG. Williams obstetrics. 24th edition. ed. New York: McGraw-Hill Education/Medical; 2014. xviii, 1358 pages p.
3. Spong CY. Prediction and prevention of recurrent spontaneous preterm birth. *Obstetrics and gynecology*. 2007;110(2 Pt 1):405-15.
4. Mathews TJ, MacDorman MF. Infant mortality statistics from the 2009 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep*. 2013;61(8):1-27.
5. Serenius F, Kallen K, Blennow M, Ewald U, Fellman V, Holmstrom G, et al. Neurodevelopmental outcome in extremely preterm infants at 2.5 years after active perinatal care in Sweden. *JAMA*. 2013;309(17):1810-20.
6. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2010;126(3):443-56.
7. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.
8. Korita D, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Yoshida M, Kakui K, et al. Cyclic mechanical stretch augments prostacyclin production in cultured human uterine myometrial cells from pregnant women: possible involvement of up-regulation of prostacyclin synthase expression. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(11):5209-19.

9. Sooranna SR, Lee Y, Kim LU, Mohan AR, Bennett PR, Johnson MR. Mechanical stretch activates type 2 cyclooxygenase via activator protein-1 transcription factor in human myometrial cells. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(2):109-13.
10. Warren WB, Goland RS, Wardlaw SL, Stark RI, Fox HE, Conwell IM. Elevated maternal plasma corticotropin releasing hormone levels in twin gestation. *Journal of perinatal medicine*. 1990;18(1):39-44.
11. Hedegaard M, Henriksen TB, Sabroe S, Secher NJ. Psychological distress in pregnancy and preterm delivery. *Bmj*. 1993;307(6898):234-9.
12. Ruiz RJ, Fullerton J, Dudley DJ. The interrelationship of maternal stress, endocrine factors and inflammation on gestational length. *Obstetrical & gynecological survey*. 2003;58(6):415-28.
13. McGrath S, Smith R. Prediction of preterm delivery using plasma corticotrophin-releasing hormone and other biochemical variables. *Ann Med*. 2002;34(1):28-36.
14. Heine RP, McGregor JA, Goodwin TM, Artal R, Hayashi RH, Robertson PA, et al. Serial salivary estriol to detect an increased risk of preterm birth. *Obstetrics and gynecology*. 2000;96(4):490-7.
15. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schutte UM, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med*. 2012;4(132):132ra52.
16. Mizushima N. Physiological functions of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;335:71-84.
17. Brickle A, Tran HT, Lim R, Liong S, Lappas M. Autophagy, which is decreased in labouring fetal membranes, regulates IL-1beta production via the inflammasome. *Placenta*. 2015;36(12):1393-404.

18. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110(2):163-75.
19. Foster KG, Fingar DC. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(19):14071-7.
20. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010;40(2):294-309.
21. Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol*. 2008;28(12):4104-15.
22. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*. 2002;10(1):151-62.
23. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011;469(7330):323-35.
24. Hirota Y, Cha J, Yoshie M, Daikoku T, Dey SK. Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(44):18073-8.
25. Avagliano L, Massa V, Zullino S, Doi P, Marconi AM, Ferrazzi E, et al. Inflammation modulates LC3 expression in human preterm delivery. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2017;30(6):698-704.
26. de Andrade Ramos BR, Witkin SS. The influence of oxidative stress and autophagy cross regulation on pregnancy outcome. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(5):755-62.

27. Saito S, Nakashima A. Review: The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia. *Placenta*. 2013;34 Suppl:S79-84.
28. Bildirici I, Longtine MS, Chen B, Nelson DM. Survival by self-destruction: a role for autophagy in the placenta? *Placenta*. 2012;33(8):591-8.
29. Signorelli P, Avagliano L, Virgili E, Gagliostro V, Doi P, Braidotti P, et al. Autophagy in term normal human placentas. *Placenta*. 2011;32(6):482-5.
30. Nakashima A, Yamanaka-Tatematsu M, Fujita N, Koizumi K, Shima T, Yoshida T, et al. Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia. *Autophagy*. 2013;9(3):303-16.
31. Curtis S, Jones CJ, Garrod A, Hulme CH, Heazell AE. Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2013;26(4):339-46.
32. Shen ZY, Li EM, Lu SQ, Shen J, Cai YM, Wu YE, et al. Autophagic and apoptotic cell death in amniotic epithelial cells. *Placenta*. 2008;29(11):956-61.
33. Giansanti V, Torriglia A, Scovassi AI. Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?". *Apoptosis*. 2011;16(4):321-33.
34. Gawriluk TR, Ko C, Hong X, Christenson LK, Rucker EB, 3rd. Beclin-1 deficiency in the murine ovary results in the reduction of progesterone production to promote preterm labor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(40):E4194-203.
35. Cao B, Macones C, Mysorekar IU. ATG16L1 governs placental infection risk and preterm birth in mice and women. *JCI Insight*. 2016;1(21):e86654.

36. Doulaveris G, Orfanelli T, Benn K, Zervoudakis I, Skupski D, Witkin SS. A polymorphism in an autophagy-related gene, ATG16L1, influences time to delivery in women with an unfavorable cervix who require labor induction. *Journal of perinatal medicine*. 2013;41(4):411-4.
37. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):21-35.
38. Iida T, Onodera K, Nakase H. Role of autophagy in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2017;23(11):1944-53.
39. Lu Y, Li Q, Peng J, Zhu Y, Wang F, Wang C, et al. Association of autophagy-related IRGM polymorphisms with latent versus active tuberculosis infection in a Chinese population. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016;97:47-51.
40. Rhee JS, Saben JL, Mayer AL, Schulte MB, Asghar Z, Stephens C, et al. Diet-induced obesity impairs endometrial stromal cell decidualization: a potential role for impaired autophagy. *Human reproduction*. 2016;31(6):1315-26.
41. Su Y, Wu J, He J, Liu X, Chen X, Ding Y, et al. High insulin impaired ovarian function in early pregnant mice and the role of autophagy in this process. *Endocr J*. 2017.
42. Kim SC, Park MN, Lee YJ, Joo JK, An BS. Interaction of steroid receptor coactivators and estrogen receptors in the human placenta. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(3):239-47.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Preterm eylemde hormonal faktörleri etkileyen otofaji genlerinin ekspresyonu
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Etik Kurul Sekreterliği Eğitim Merkezi Danışma Birimi B Blok -1.Kat Altındağ Ankara
	TELEFON	03125085174
	FAKS	3125084938
	E-POSTA	cirakogluten@hotmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Merih Bayram			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Perinatoloji, Maternal Fetal Tıp			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Analitik çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Hürrem BODUR

İmza:

Prof. Dr. Süreyya Ben
Y.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ			
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU			
	İLAN			
	YILLIK BİLDİRİM			
	SONUÇ RAPORU			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 528/2015	Tarih: 19.08.2015		
	Yukarıda bilgileri verilen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Merih Bayram sorumluluğunda yapılması planlanan "Preterm eylemde hormonal faktörleri etkileyen otofaji genlerinin ekspresyonu" isimli klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Hürrem BODUR

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Hürrem BODUR	Enf. Hast.ve Kl.Mikrobiyoloji	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Süreyya BARUN	Farmakoloji	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Adil ERYILMAZ	Kulak Burun Boğaz	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet Deniz BELEN	Beyin Cerrahi	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Adem ÖZKARA	Aile Hekimliği	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Sezer KULAÇOĞLU	Patoloji	Ankara Numune EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Altuğ TUNCEL	Üroloji	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Betül BOZKURT	Genel Cerrahi	Ankara Numune EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Doğan UNCÜ	Tıbbi Onkoloji	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. İsmail KARABULUT	Fizyoloji	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Uzm. Dr. Dilek KANYILMAZ	Halk Sağlığı	Ankara Numune EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Ecz. Dilek ATABEY	Eczacılık	Ankara Numune EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Avukat Buket ÖZBEK	Hukuk	Ankara Barosu	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Selma Kobal	İş İdaresi	Emekli	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

*:Toplantıda Bulunma