



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



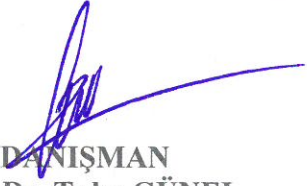
YÜKSEK LİSANS TEZİ

IN VITRO FERTİLİZASYON SONRASI TEKRARLAYAN
İMLANTASYON BAŞARISIZLIĞI İLE İLİŞKİLİ
ENDOMETRİYAL GEN ANLATIMI ANALİZİ

İrem Gülfem ALBAYRAK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

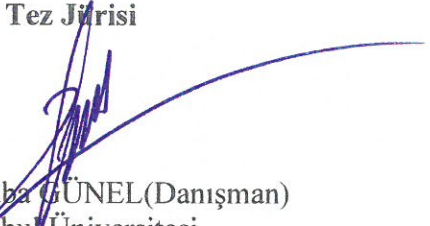

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Şubat, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 3.02.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof. Dr. Tuba GÜNEL (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Ercan BAŞTU
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar
Üniversitesi
Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 32431 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında desteğini hissettiğim, engin tecrübe ve bilgisi ile her zaman yanımda olan, üniversite hayatıma başladığım ilk andan itibaren bilime bakışını, disiplinli tavrını, çalışma azmini her zaman örnek aldığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tuba GÜNEL'e;

Hasta materyallerinin sağlanmasındaki emeklerinden dolayı Prof. Dr. Ercan BAŞTU ve Dr. Burçin KARAMUSTAFAOĞLU BALCI'ya;

Tezimin deneylerinin gerçekleştirilmesi sırasında her aşamada yardımcı olan ve bir abla olarak gördüğüm sevgili Dr. Fatemeh AZHARİ'ye;

Genetik Hastalıklar ve Moleküler Analiz Birimi Laboratuvarına adım attığım ilk andan itibaren bana her konuda yol gösteren ve destek olan Arş. Gör. Ece GÜMÜŞOĞLU'na ve tüm laboratuvar ekip arkadaşlarıma;

Yüksek Lisans sürecimin her aşamasında birbirimize destek olduğumuz sevgili arkadaşım Zeynep KUMRAL'a ve çok sevgili dostum Tuğba KOÇMAR'a;

Hayatım boyunca hiçbir zaman destek ve sevgilerini benden esirgemeyen, her zaman arkamda olup bu süreçte de tüm kahrımı çeken, bana her zaman güvendiklerini ve yanımda olduklarını hissettiğim canım ailem; annem Dilek ALBAYRAK, babam Okan ALBAYRAK ve kız kardeşim İlkem ALBAYRAK'a;

Sonsuz teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Şubat 2021

İrem Gülfem ALBAYRAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. UTERUS HİSTOLOJİSİ.....	4
2.1.1. Endometriyum	5
2.1.2. Miyometriyum	5
2.1.3. Perimetriyum	5
2.2. MENSTRUAL DÖNGÜ	5
2.2.1. Proliferatif Evre	6
2.2.2. Sekretuar Evre	6
2.2.3. Menstrual Evre	6
2.3. İMPLANTASYON	8
2.3.1. İmplantasyon Penceresi	9
2.4. TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI.....	10
2.4.1. Multifaktöriyel TİB	10
2.4.2. Endometriyal TİB	11
2.4.3. İdiyopatik TİB	11
2.5. TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞININ NEDENLERİ	11
2.5.2. Gamet Faktörleri.....	12
2.5.2.1. Oosit Kalitesi	12
2.5.2.2. Sperm Kalitesi.....	12
2.5.2. Embriyo Faktörleri	13
2.5.3. Endometriyal Faktörler.....	14
2.5.3.1. Prostoglandinler	14

2.5.3.2. Hücre Adezyon Molekülleri	15
2.5.3.3. Müsinler	16
2.5.3.4. Sitokinler	17
2.6. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ	20
2.6.1. İn Vitro Fertilizasyon	21
2.7. ENDOMETRİYAL GEN ANLATIMI VE TİB BİYOBELİRTEÇLERİ	22
2.7.1. TNC Geni ve Fokal Adezyon Yolağı	23
2.7.2. MME Geni ve Renin-Anjiyotensin Sistem	26
2.7.2. WWC1 Geni ve Hippo Sinyal Yolağı	28
2.8. DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	30
3. MALZEME VE YÖNTEM	33
3.1. HEDEF GENLERİN SEÇİMİ	33
3.2. HASTA SEÇİMİ VE ÖRNEK ELDESİ	33
3.3. ENDOMETRİYAL DOKUDAN TOTAL RNA İZOLASYONU	34
3.4. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN KALİTE KONTROLÜ	36
3.5. CDNA SENTEZİ	36
3.6. DAMLACIKLI DİJİTAL PZR UYGULAMASI	36
3.7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	38
4. BULGULAR	40
4.1. KULLANILAN ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ	40
4.2. ÖRNEKLERİN KALİTE KONTROLÜ	40
4.3. SONUÇLARIN NORMALİZASYONU	43
4.4. MRNA ANLATIM ANALİZİ	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR	52
EKLER	64
EK 1. ETİK KURUL BELGESİ	64
EK 2. BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU	67
EK 3. HASTA TAKİP FORMU	69
ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2. 1: Uterus anatomisi.	4
Şekil 2. 2: Gebeliğin gerçekleşmediği menstrual döngü sırasında uterus mukozasında (endometriyumda) ve overlerdeki eş zamanlı değişimler.	7
Şekil 2. 3: Overlerdeki ve uterus mukozasındaki eş zamanlı değişimler. Blastosistin implantasyonu gebelikte korpus luteumun oluşmasına neden olur. Endometriyumun sekretuar aktivitesi korpus luteum tarafından salgılanan progesteron hormonu nedeni ile zaman içinde artar.....	8
Şekil 2. 4: (a) Fertilizasyondan 4,5 gün sonra bir insan blastosistinin şematik görünümü. Mavi hücreler iç hücre kitlesini veya embriyoblastı, yeşil hücreler de trofoblastı temsil etmektedir. (b) Gelişimin 9. gününde bir blastosistin şematik kesiti. Blastosistin embriyonik kutbunda yerleşmiş olan trofoblast hücreleri uterus mukozasını delmişlerdir. İnsan blastosisti, uterusa mukozasının içine 6. günden sonra gömülmeye başlar.	9
Şekil 2. 5: (a) Embriyonun glikokaliksle bağlanmasının ilk aşaması. Bu aşamada uterus yüzeyinde “ <i>uterodome</i> ” olarak adlandırılan çok sayıda küçük çıkıntılar meydana gelir. (b) Bağlanmanın ikinci aşamasında embriyonik sinyallere yanıt olarak glikokaliksin apikal yüzeyindeki MUC-1’ler temizlenir. Trofoektoderm, lüminal epitel hücrelerinin arasına eklenir. (<i>MUC1= Müsin 1, OPN=Osteopontin, $\alpha\beta3= Integrin \alpha\beta3$</i>).	16
Şekil 2. 6: MUC-1, embriyonun apikal endometriyal yüzeye bağlanması için bariyer görevi gören bir anti-adezyon molekülüdür. MUC-1 temizlenmesi embriyonun implantasyon için apikal hücre yüzey reseptörlerine erişebilmesini sağlar.	17
Şekil 2. 7: Embriyo ve endometriyum arasındaki implantasyon öncesi erken sinyalleşmenin şematik gösterimi. Blastosist, integrinler ve “ <i>uterodome</i> ”lar aracılığı ile alıcı endometriyuma yaklaşır. (<i>LIF= Leukemia Inhibitory Factor, EGF=Epidermal Büyüme Faktörü</i>)	18
Şekil 2. 8: TNC geninin genomik konumu.	24
Şekil 2. 9: Fokal adezyon yolağı. TNC geninin yolaktaki yeri kırmızı ile işaretlenmiştir.	24
Şekil 2. 10: MME geninin genomik konumu.	26
Şekil 2. 11: Renin-Anjiyotensin sistem yolağında MME geninin yeri kırmızı ile işaretlenmiştir.	27
Şekil 2. 12: WWC1 geninin genomik konumu.	28

Şekil 2. 13: Hippo sinyal yolağı. WWC1 geninin yolaktaki yeri kırmızı ile işaretlenmiştir.	29
Şekil 2. 14: Damlacıklı dijital PZR iş akışı: (a) Örnekler ve damlacık oluşturmak için kullanılan yağ sekiz kanallı damlacık oluşturma kartuşuna yüklenir. (b) Damlacık oluşturma cihazı, uyguladığı vakum ile örnekleri ve yağı çekerken 1 nL boyutunda damlacıklar oluşturur ve örnekleri bu damlacıkların içine hapseder. 2 dakikadan az bir sürede, sekiz örneğin 20.000 damlacık içeren setlere dönüştürülür. (c) Oluşan damlacıklar 96 kuyucuklu “plate”lere aktarılır. (d) 35-40 döngülük bir PZR reaksiyonu gerçekleştirilir. (e) “Plate” damlacık okuyucu cihaza aktarılır ve cihaz her bir damlacıktaki floresan ışımayı okur. (f) Cihaz tarafından “QuantaSoft” yazılımı ile damlacıkların pozitif ve negatif ışımaları değerlendirilerek örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.	32
Şekil 4. 1: İki TİB hastası ve iki kontrol örneğine ait ddPZR amplifikasyon grafikleri. Her grafik, dört örnekte analiz edilen dört hedef genin amplifikasyonunu göstermektedir. X ekseninde örnekler, Y ekseninde ışım miktarını değerleri yer almaktadır. Mavi noktalar pozitif damlacıkları, gri noktalar negatif damlacıkları temsil eder. Pembe çizgi pozitif ve negatif damlacıkların sınırlarını belirler.	44
Şekil 4. 2: MME, WWC1 ve TNC genlerinin ROC eğrisi analizleri.....	45
Şekil 4. 3: MME, WWC1 ve TNC genlerinin rölatif mRNA anlatım seviyeleri.....	46
Şekil 5. 1: MME, Anjiyotensin I ve Anjiyotensin II’nin Renin Anjiyotensin Sistem yolağındaki ilişkisi.....	49
Şekil 5. 2: WWC1, Mst1/2, Lats1/2 ve YAP/TAZ’ın Hippo Sinyal Yolağındaki ilişkisi.	50
Şekil 5. 3: TNC geninin İntegrin B (ITGB) anlatımını etkileyerek Fokal Adezyon Yolağını düzenlemesi.....	51

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2. 1: Yardımcı üreme teknikleri ve uygulanma yöntemleri.....	20
Tablo 2. 2: Mikrodizilim analizi sonucu, TİB hastalarında kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde anlatım değişimi tespit edilen genlere ait p değerleri ve logFC değerleri. (Verilere ait “ <i>Gene Expression Omnibus</i> ” erişim numarası: GSE111974)	23
Tablo 3. 1: Hedef genlerin belirlenmesinde kullanılan mikrodizilim analizi sonuçları	33
Tablo 3. 2: Örnek miktarlarına göre eklenecek “ <i>Lysis Buffer</i> ” miktarları.....	35
Tablo 3. 3: “ <i>iScript cDNA Synthesis Kit</i> ” ile bir cDNA sentez reaksiyonu için gerekli bileşen miktarları.....	36
Tablo 3. 4: cDNA sentezi için kullanılan termal döngü.....	36
Tablo 3. 5: Genlere ait primer dizileri, primerlerin Tm dereceleri ve ürün boyutları.....	37
Tablo 3. 6: Damlacıklı dijital PZR uygulamasında kullanılacak her bir primer için hazırlanan “ <i>mix</i> ” için gerekli bileşenlerin miktarları.....	37
Tablo 3. 7: “ <i>EvaGreen Supermix</i> ” prosedürüne ait termal döngü.....	38
Tablo 4. 1: Çalışmada kullanılan örneklere ait yaş, doğum sayısı ve 3. Gündeki hormon seviyesi (mIU/mL) değerleri.....	40
Tablo 4. 2: TİB hastalarına ait total RNA “ <i>Nanodrop</i> ” ölçüm sonuçları ve A260/A280 ile A260/A230 değerleri.....	41
Tablo 4. 3: Kontrol örneklerine ait total RNA “ <i>Nanodrop</i> ” ölçüm sonuçları ve A260/A280 ile A260/A230 değerleri.....	42
Tablo 4. 4: TNC, MME ve WWC1 genlerine ait normalize edilmiş anlatım değerleri.....	43
Tablo 4. 5: Endometriyal doku örneklerinde ddPZR ile yapılan mRNA anlatım analizlerinin istatistiksel sonuçları.....	45
Tablo 4. 6: Hedef genlerin buldukları yolaklar ve hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla genlerin anlatım miktarlarındaki değişim oranları.....	46

SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
L	: Litre
mg	: Miligram
mIU	: Milli Uluslararası Birim
mL	: Mililitre
nL	: Nanolitre

Kısaltmalar	Açıklama
ACE	: " <i>Angiotensin-converting enzyme</i> "
Ang	: Anjiyotensin
AT (1-2)	: " <i>The angiotensin II type 1 receptor</i> "
AUC	: " <i>Area Under Curve</i> "
BÇ	: Baz Çifti
CBC	: " <i>Cap Binding Complex</i> "
COX	: Siklooksijenaz
ddPZR	: Damlacıklı Dijital PZR
E2	: Estradiol Hormonu
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GEO	: " <i>Gene Expression Omnibus</i> "
IL	: " <i>interleukin</i> "
IL-1ra	: " <i>interleukin-1 receptor antagonist</i> "
ITGB	: İntegrin B
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
KEGG	: " <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> "
LATS1/2	: " <i>Large tumor suppressor kinase 1/2</i> "
LH	: Luteinleştirici Hormon
LIF	: " <i>Leukemia Inhibitory Factor</i> "
miRNA	: Mikro RNA
MME	: Membran Metalloendopeptidaz Geni
mRNA	: Mesajcı RNA
MST1/2	: " <i>Macrophage Stimulating 1/2</i> "

MUC-1	: “ <i>Mucin 1</i> ”
ncRNA	: Kodlama Yapmayan RNA
OPN	: Osteopontin
ORF	: Açık Okuma Penceresi
P53	: Tümör Protein 53
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPZR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAS	: Renin-Anjiyotensin Sistem
RNA	: Ribonükleik Asit
ROC	: “ <i>Receiver Operating Characteristics</i> ”
TAZ	: “ <i>WW-domain-containing transcription regulator 1</i> ”
TD	: Tekrarlayan Düşük
TİB	: Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı
TNC	: Tenascin C Geni
TSH	: Tiroit Uyarıcı Hormon
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WWC1	: “ <i>WW And C2 Domain Containing 1</i> ”
YAP	: “ <i>Yes-associated protein 1</i> ”
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IN VITRO FERTİLİZASYON SONRASI TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI İLE İLİŞKİLİ ENDOMETRİYAL GEN ANLATIMI ANALİZİ

İrem Gülfem ALBAYRAK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Kadınların üreme sürecinde embriyo implantasyonu en önemli safhalardan biridir. İmplantasyon blastosistin, maternal endometriyal yüzeye tutunup önce maternal epitele, ardından plasentayı oluşturmak için maternal dolaşım sistemine bağlanması sürecini ifade eder. İmplantasyonun başarılı olması embriyo ve reseptif endometriyum arasındaki senkronize etkileşime bağlıdır. Bu etkileşim sadece belirli bir zaman aralığında gerçekleştiğinde implantasyon gerçekleşir. Menstrual döngünün 20-24. günlerini kapsayan bu zaman aralığı implantasyon penceresi olarak tanımlanmıştır.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB) yüksek derecede kaliteli embriyoların implantasyonunun birkaç ardışık *in vitro* fertilizasyon (IVF) döngüsünden sonra başarısız olması olarak tanımlanmaktadır. İmplantasyon sürecini düzenleyen birçok gen bulunmaktadır. Bu genlerin anlatımındaki düzensizliklerin implantasyon başarısızlığına neden olabileceği düşünülmektedir. Maternal mRNA'lardaki anlatım değişimlerinin TİB dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkisi olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, maternal endometriyal dokuda hedef genlere ait mRNA'ların miktarlarını ve bu mRNA'lara ait implantasyon süreci ile ilişkili olabilecek metabolik yolları belirlemektir.

Araştırmada 34 sağlıklı fertil kontrolden ve 34 TİB hastasından, sekretuar fazda (menstrual döngünün 20-24. günleri arasında) endometriyal doku örnekleri elde edilmiştir. "*Pathway and*

network-oriented GWAS analysis” (PANOGA) ve “*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*” (KEGG) yolak analizi sonucu implantasyon süreci ile ilişkili olabileceği belirlenen “*Membrane Metalloendopeptidase*” (MME), “*WW and C2 Domain Containing 1*” (WWC1) ve “*Tenascin C*” (TNC) genleri hedef genler olarak seçilmiştir. Kontrol grubu ve hasta grubundaki hedef genlere ait mRNA anlatım seviyeleri arasındaki farklılık damlacıklı dijital PZR (ddPZR) kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar “*Graphpad Prism 8.3.0*” programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık testleri parametrik olmayan “*Mann Whitney Test*”, duyarlılık ve spesiflik testleri ROC (“*Receiver Operating Characteristics*”) analizi ile yapılmıştır.

ddPZR uygulamasından elde edilen veriler hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla MME gen anlatımının 4,9 kat arttığını ($p < 0,05$), WWC1 gen anlatımının 5,2 kat arttığını ($p < 0,05$) ve TNC gen anlatımının 9 kat azaldığını ($p < 0,05$) göstermiştir.

İmplantasyon sürecinde MME geninin yer aldığı renin anjiyotensin sistem yolağının anlatımında değişiklikler gözlenmektedir. MME gen anlatımının artması sonucu artan Anjiyotensin II gen anlatımının, trofoblast hücrelerinin invazyonunu kısıtlayarak implantasyon başarısızlığına neden olduğu düşünülebilir.

Hippo sinyal yolağında yer alan WWC1 gen anlatımının artması transkripsiyonel bir kofaktör olan “*Yes-associated protein 1*” (YAP) anlatımını inhibe etmektedir. YAP proteini anlatımının inhibisyonu, endometriyal desidualizasyonun gerçekleşmemesine neden olarak implantasyon sürecinin başarısız olmasına neden olmuş olabilir.

TNC geni fokal adezyon yolağında yer almakta ve bu yolak embriyonun endometriyuma tutunmasını kolaylaştırmak için endometriyal yüzeydeki hücre adezyonunu azaltmaktadır. İmplantasyon başarısızlığının nedeni, TNC geninin etkili olduğu fokal adezyon yolağının anlatımının azalması sonucu, hücreler arası bağlantıların implantasyona uygun hale gelememesi olabilir.

Hedef genlerin implantasyon süreci ile ilişkileri göz önüne alındığında, genlerin anlatımındaki değişikliklerin TİB’e neden olabileceği düşünülmektedir.

Şubat 2021, 85 sayfa.

Anahtar kelimeler: TİB, IVF, mRNA, Endometriyum, Gen Anlatımı

SUMMARY

M.Sc. THESIS

ENDOMETRIAL GENE EXPRESSION PROFILING of RECURRENT IMPLANTATION FAILURE AFTER IN VITRO FERTILIZATION

İrem Gülfem ALBAYRAK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Embryo implantation is one of the most important stages of the female reproductive process. Synchronous interaction between a receptive endometrium and embryo is crucial for the success of implantation. In addition, implantation occurs only when this interaction takes place over a certain period of time. This time interval covering the 20-24 days of the regular menstrual cycle was named as window of implantation in the 1970s.

Recurrent implantation failure (RIF) is diagnosed when good-quality embryos repeatedly fail to implant after transfer in several *in vitro* fertilization (IVF) treatment cycles. There are many genes that regulate the implantation process. Differences in the expression of these genes can cause implantation failure. Expression differences in maternal mRNAs could be referring to so many diseases including RIF.

The aim of this thesis study was to identify different expression levels of several mRNAs in the maternal endometrium tissue and determine their associated pathways.

In this study, the endometrial biopsy samples were collected in secretory phase (cycle day 20-24) from healthy fertile controls (n=34) and patients with RIF (n=34). After “*Pathway and network-oriented GWAS analysis*” (PANOGA) and KEGG pathway analysis “*Membrane Metalloendopeptidase*” (MME), “*WW and C2 Domain Containing 1*” (WWC1) and “*Tenascin*

C" (TNC) genes were chosen as target genes by regarding to their possible relation with implantation process. Detection of differences in mRNA expression between control group and RIF patients was performed with droplet digital PCR (ddPCR) method. The obtained results were evaluated using "Graphpad Prism 8.3.0" software. Significance tests were performed using non-parametric "Mann Whitney Test". Sensitivity and specificity tests were performed using ROC ("Receiver Operating Characteristic") analysis.

The data obtained from ddPCR application showed that MME gene expression increased 4.9 times ($p < 0.05$), WWC1 gene expression increased 5.2 times ($p < 0.05$) and TNC gene expression decreased 9 times ($p < 0.05$) in the patient group compared to the control group.

Changes are observed in the expression of the renin angiotensin system pathway in which the MME gene is involved in the implantation process. The increase in Angiotensin II gene expression, which is as a result of increased MME gene expression, can be thought to cause implantation failure by restricting the invasion of trophoblast cells.

Increasing WWC1 gene expression in the Hippo signaling pathway inhibits "Yes-associated protein 1" (YAP) expression, which is a transcriptional cofactor. Inhibition of YAP protein expression may have resulted in failure of the implantation process by causing the failure of endometrial decidualization.

The TNC gene is located in the focal adhesion pathway and this pathway reduces cell adhesion on the endometrial surface to facilitate the attachment of the embryo to the endometrium. The reason for implantation failure might be that the intercellular connections are not suitable for implantation as a result of decreased expression of the focal adhesion pathway in which the TNC gene is effective.

Considering the relations between the pathways of the target genes and the implantation process, changes in the expression of target genes might be a cause RIF.

February 2021, 85 pages.

Keywords: RIF, IVF, mRNA, Endometrium, Gene Expression

1. GİRİŞ

Uterus, histolojik olarak endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç tabakadan meydana gelir. Uterusun en iç tabakası olan endometriyum, tek sıralı kinosilyalı prizmatik yüzey epiteli, basit tübüler yapıdaki uterus bezleri ve hücreden son derece zengin stroma kısmından oluşur. Endometriyum her ay fertilize bir ovumun implantasyonu ve beslenmesi için hazırlanır [1,2].

Endometriyum puberteden (11-13 yaş) menapoza kadar (45-50 yaş), overlerin hormonal kontrolü altında döngüsel periyodik değişiklikler gösterir. Normal döngü süresi değişebilir ancak bu döngülerin ortalama süresi 28 gündür [3].

Menstrual döngü boyunca endometriyum; foliküler (proliferatif) evre, sekretuar evre ve menstrual evre olmak üzere 3 evreden geçer.

Proliferatif evre, menstrual evrenin sonunda başlar, östrojen hormonunun etkisi altında over foliküllerinin büyümesine paralel seyrederek. Luteinleştirici Hormon (LH) etkisiyle ovulasyonun gerçekleştiği 14. günden sonra, endometriyum yaklaşık 13 gün sürecek olan sekresyon evresine girer [4]. Döllenme gerçekleşmediği takdirde, endometriyumun kompakt ve süngerimsi tabakaları dökülmeye başlar ve menstrual evre başlamış olur. Döllenme gerçekleştiyse, endometriyum implantasyona yardım eder ve plasentanın oluşumuna katkıda bulunur [5].

Embriyo implantasyonu, birçok türde üreme sürecinin en kritik basamağını temsil eder. İmplantasyon blastosistin, maternal endometriyal yüzeye, büyüyen fetüs ile maternal dolaşım arasında bir ara yüz sağlayacak plasentayı oluşturmak için bağlandığı bir biyolojik süreçtir [6,7]. Başarılı implantasyon için reseptif bir endometriyum, blastosist gelişim aşamasında fonksiyonel bir embriyo ve maternal dokular ile embriyonik dokular arasında senkronize bir iletişim gereklidir [8]. Ek olarak, bu etkileşim, sadece belli bir zaman aralığında gerçekleştiğinde implantasyon oluşur. Düzenli adet döngüsünün 20-24. günleri arasında kapsayan bu zaman aralığı 1970'lerde "implantasyon penceresi" olarak adlandırılmıştır [9].

Tekrarlanan implantasyon başarısızlığı (TİB) esas olarak, her döngüde yüksek kalitede bir ila iki embriyonun aktarıldığı üç ardışık in vitro fertilizasyon (IVF) girişiminden sonra klinik

gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır [10]. TİB oluşumunda gametlere, embriyoya ve endometriyal gen anlatımına bağlı faktörler etkili olmaktadır.

TİB; multifaktöriyel TİB, endometriyal TİB ve idiyopatik TİB olarak üç ana başlık altında sınıflandırılabilir. Multifaktöriyel TİB birden fazla nedene bağlı olarak ortaya çıkan, endometriyal TİB endometriyumdaki bozukluklar nedeni ile ortaya çıkan, idiyopatik TİB embriyo ve endometriyum arasındaki bozulmuş “*cross-talk*” sebebi ile ortaya çıkan implantasyon başarısızlıklarını ifade eder [11].

İmplantasyon başarısızlığı, üreme tıbbının önündeki önemli engellerden biridir. İmplantasyon başarısızlığı sebebiyle diğer açılardan sağlıklı birçok birey infertilite gerçeğiyle yüz yüze kalmaktadır [12]. Son yıllarda, IVF tedavilerinde yaşanan tüm gelişmelere rağmen, IVF tedavisiyle oluşan embriyoların uterusu transferi sonrası sadece %20 oranında canlı doğum sağlanabilmektedir [13]. İmplantasyon başarısızlığının sebebi, 1/3 oranında embriyo kaynaklı, 2/3 oranında ise yetersiz reseptivite nedeniyledir [14]. Bu sebeple tekrarlayan implantasyon başarısızlığı yönetimi, yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) en zor alanlardan biridir.

Bu çalışmada sağlıklı fertil kontrol grubu (n=34) ve TİB hasta grubundaki bireylerden (n=34) menstrual döngünün 21. gününde endometriyal biyopsi örnekleri elde edilmiştir. Kontrol grubu; 40 yaşından genç, en az bir normal canlı doğum geçirmiş, oral veya rahimiçi kontraseptif kullanmayan ve tıbbi geçmişinde infertilite öyküsü yer almayan bireylerden oluşmaktadır. Hasta grubu; 40 yaşından genç, IVF tedavisi gören, IVF tedavisi sonrası yüksek kalite embriyo transfer edilmiş en az üç defa embriyo transferinde başarısızlık yaşanmış, normal hormon rezervine sahip (FSH<8 mIU/mL), hormon stimülasyonuna iyi cevap vermiş (>8 oosit toplanması), normal uterus kavitesine ve endometriyal kalınlığa sahip bireyden oluşmaktadır. Toplam 68 örnek üzerinden çalışma gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen endometriyal doku örneklerinden total RNA izolasyonu sonucunda elde edilen yeterli miktarda RNA ile damlacıklı dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPZR) gerçekleştirilmiştir. İmplantasyon süreci ile ilişkili olabileceği belirlenen "*Membrane Metalloendopeptidase*" (MME), "*WW And C2 Domain Containing 1*" (WWC1) ve "*Tenascin C*" (TNC) genlerinin, hasta ve kontrol grubunda anlatım seviyelerindeki farklılıklar belirlenmiştir.

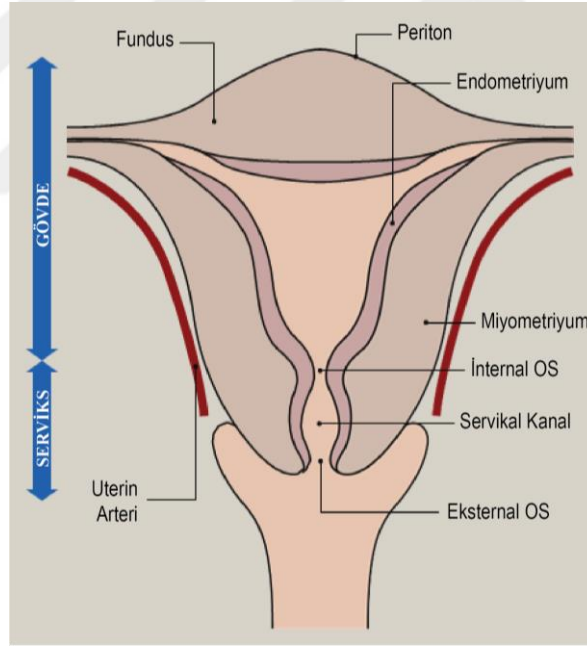
Dijital PZR sistemi izole edilmiş nükleik asit örneklerini nanolitre boyutundaki binlerce yağ damlacığına hapseder ve her damlacıkta bir PZR reaksiyonu gerçekleştirir. Bir kuyucuğa koyulan örnek 20.000 damlacığa bölünür ve her bir damlacıkta istenilen nükleik asit bölgesine özgü floresan bazlı proplar kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirir [15], [16]. Dijital PZR, teorik olarak tek bir hedef molekülün bile saptanabilmesine olanak sağlayabildiğinden yüksek hassasiyete sahip bir metottur [17].

Çalışma sonucunda TNC, MME ve WWC1 genlerinin anlatım seviyelerinin, hasta ve kontrol gruplarında anlamlı derecede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. TNC geninin anlatım seviyesinin, hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla 9 kat ($p < 0.05$) azaldığı; MME ve WWC1 genlerinin anlatım seviyelerinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 4,9 ve 5,2 kat ($p < 0.05$) arttığı gösterilmiştir. “*Pathway and network-oriented GWAS analysis*” (PANOGA) ve “*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*” (KEGG) veri tabanları ile genlere ait olan yollar tespit edilmiş; TNC geninin fokal adezyon yolağında, MME geninin renin anjiyotensin sistem yolağında ve WWC1 geninin hippo sinyal yolağında yer aldığı belirlenmiştir. Bu yolların endometriyum dokusundaki anlatım profilleri araştırılarak tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ile olan ilişkileri tartışılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. UTERUS HİSTOLOJİSİ

Pelviste mesane ile rektum arasında bulunan uterus, kalın müsküler duvarlı, içi boş, armut şeklinde bir organdır [1,18]. Uterus anatomisi ekil 2.1’de gösterilmiştir. Doğum yapmamış kadınlarda yaklaşık 30-40 gram ağırlığında ve 7,5 santimetre uzunluğındadır. Üretkenlik ağında normal bir uterusun boyutları ve ağırlığı gebeliğe göre oldukça değişkenlik gösterir [18]. Uterus yapı ve fonksiyon bakımından incelendiğinde korpus ve serviks olmak üzere iki ana kısıma ayrılmaktadır [19]. Korpus, uterusun büyük üst kısmıdır. Uterusun n yüzeyi düz, arka yüzeyi konvektir. Uterus gövdesinin üst kısmındaki genişleyen yuvarlak kısım fundus olarak adlandırılmaktadır [2]. Serviks, uterusun alttaki silindirik biçimli kısmıdır. Servikal kanal internal os ile uterusa boşluğuna, eksternal os ile vajinaya açılır [1,2,18].



Şekil 2. 1: Uterus anatomisi.¹

Uterus histolojik olarak endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç tabakadan oluşur.

¹ Abbas K., Monaghan S. D., ve Campbell I., 2011, Uterine physiology, *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, c. 12, sayı 3. Elsevier Ltd, ss. 108–110.

2.1.1. Endometriyum

Uterusun en iç tabakası olan endometriyum, tek sıralı kinosilyalı prizmatik yüzey epiteli, basit tübüler yapıdaki uterus bezleri ve hücreden son derece zengin stroma kısmından oluşur. Endometriyum her ay fertilize bir ovumun implantasyonu ve beslenmesi için hazırlanır [1,2]. Üretkenlik döneminde endometriyumun fonksiyonel tabakası menstrual döngü hormonlarının etkisi ile morfolojik değişikliklere uğrar. Endometriyumun alt kısmı, endometriyal bezlerin ve arterlerin kök kısımlarını içerir. Bu bazal kısım, özel kanlanması dolayısıyla menstruasyonda dökülmeden kalır ve yüzeysel tabakanın yenilenmesini sağlar. Endometriyumu besleyen kan damarları bu tabakanın büyük bir bölümünün periyodik olarak dökülmesinde özel bir öneme sahiptir [18].

2.1.2. Miyometriyum

Miyometriyum ortada yer alan en kalın tabakadır. Birbirine bağlı düz kas demetlerinden oluşmuştur. Düz kas demetleri uterusun işlevi ile ilişkili olarak sınırları tam ayırt edilemeyen üç tabaka şeklinde düzenlenmiştir [1]. Miyometriyumu endometriyumdan ayıran submukoza bulunmaz [2]. Gebelik sırasında, miyometriyal düz kaslar büyür ve aynı zamanda sayıca artar [4].

2.1.3. Perimetriyum

Uterusu kaplayan dış seröz tabaka olan perimetriyum, tek sıralı yassı epitelden ve ince bir gevşek bağ dokusu tabakasından meydana gelmektedir. Perimetriyum uterusun arka yüzeyini tamamen kaplarken ön yüzün yalnızca bir kısmını kaplar, geri kalan kısım bağ dokusundan oluşur [2].

2.2. MENSTRUAL DÖNGÜ

Endometriyum puberteden (11-13 yaş) menapoza kadar (45-50 yaş), overlerin hormonal kontrolü altında döngüsel periyodik değişiklikler gösterir. Normal döngü süresi değişebilir ancak bu döngülerin ortalama süresi 28 gündür. Üreme yılları içinde döngü süresinin değişkenliği daha erken veya daha geç ota çıkabilir [3]. Menstrual döngü boyunca endometriyum; foliküler (proliferatif) evre, sekretuar evre ve menstrual evre olmak üzere 3 evreden geçer.

2.2.1. Proliferatif Evre

Menstrual evrenin sonunda başlayan proliferatif evre, östrojen hormonunun etkisi altında ovarian foliküllerin büyümesine paralel seyreder [5] ve yaklaşık 9 gün sürer. Bu evre sırasında, folikül stimüle edici hormon (FSH) etkisiyle olgunlaşan ovaryum foliküllerinde üretilen östrojenin uyarıcı etkisiyle endometriyumun kalınlığı artar [4].

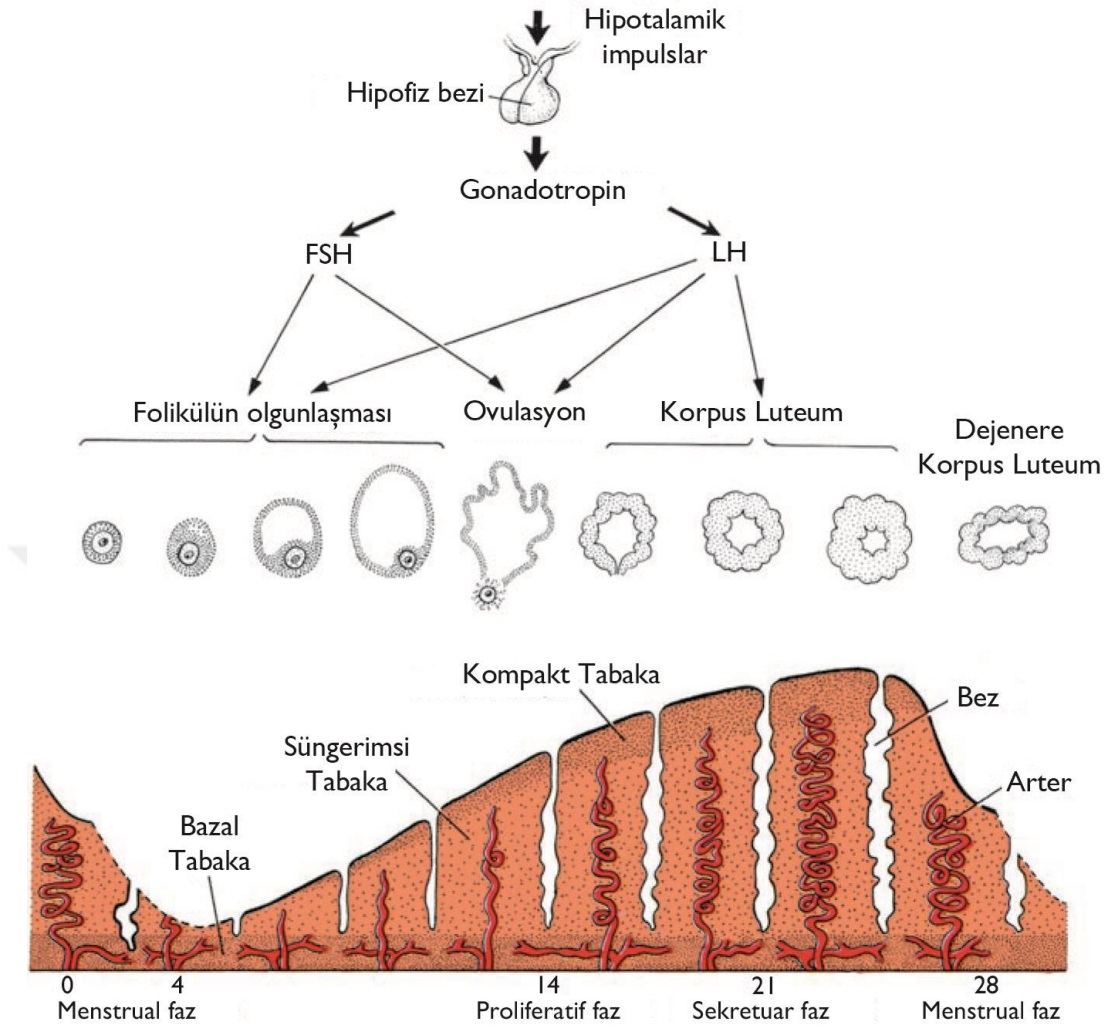
2.2.2. Sekretuar Evre

Luteinleştirici hormon (LH) etkisiyle ovulasyonun olduğu 14. günden sonra, endometriyum yaklaşık 13 gün sürecek olan sekresyon evresine girer. Bu evre sırasında endometriyal bezler salgılamaya başlar. Sekresyon evresi korpus luteumda üretilen progesteron ve östrojen tarafından kontrol edilir [4].

2.2.3. Menstrual Evre

Döllenme gerçekleşmediği takdirde endometriyumun kompakt ve süngerimsi tabakaları dökülmeye başlayarak menstrual evrenin başladığını işaret eder. Döllenme olmaması durumunda endometriyumda oluşan değişimler Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Döllenme gerçekleştiyse, endometriyum implantasyona yardım eder ve plasentanın oluşumuna katkıda bulunur. Gebeliğin daha ileri evrelerinde hormon yapımı plaseenta tarafından üstlenilir ve korpus luteum dejenere olur [5].

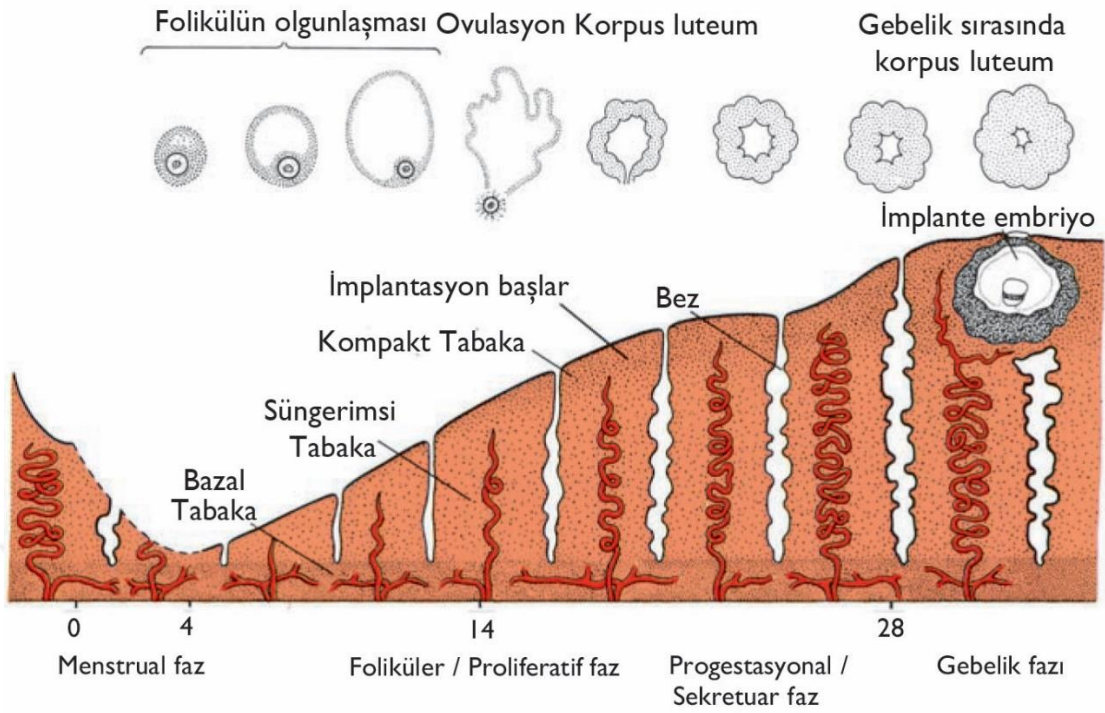
İmplantasyon sırasında uterus mukozası, uterus bez ve arterlerinin uzayıp kıvrılarak helezonik bir görünüm aldığı ve dokuların tümüyle dolgunlaştığı sekresyon evresindedir. Bu evrede endometriyumda; yüzeysel kompakt tabaka, süngerimsi bir ara tabaka ve ince bir bazal tabaka olmak üzere 3 belirgin tabaka ayırt edilebilir. Normalde döllenmiş oosit, uterus gövdesinin ön veya arka duvarı boyunca, bezlerin ağızları arasından implante olur (Şekil 2.3).



Şekil 2. 2: Gebeliğin gerçekleşmediği menstrual döngü sırasında uterus mukozasında (endometriyumda) ve overlerdeki eş zamanlı değişimler.²

Oosit döllendiği takdirde, venüller ve sinüzoidal boşluklar kan hücreleriyle dolup tıkanmaya ve kan dokuya çıkmaya başlar. Menstrual evrenin başlamasıyla, kan yüzeysel arterlerin dışına çıkar ve endometriyumun yüzeyinden küçük stroma ve bez parçaları kopmaya başlar. Sonraki 3 veya 4 gün içinde endometriyumun kompakt ve süngerimsi tabakaları tümüyle dökülerek uterus dışına atılır; geride endometriyumun sadece bazal tabakası kalır. Bu tabaka kendi arterleri olan bazal arterler tarafından beslendiğinden, bir sonraki proliferatif evrede uterus bezlerinin ve arterlerinin yeniden yapılmasını sağlar [5].

² Sadler T.W., 2017, *Langman Medikal Embriyoloji*, Palme Yayıncılık, ss. 47.



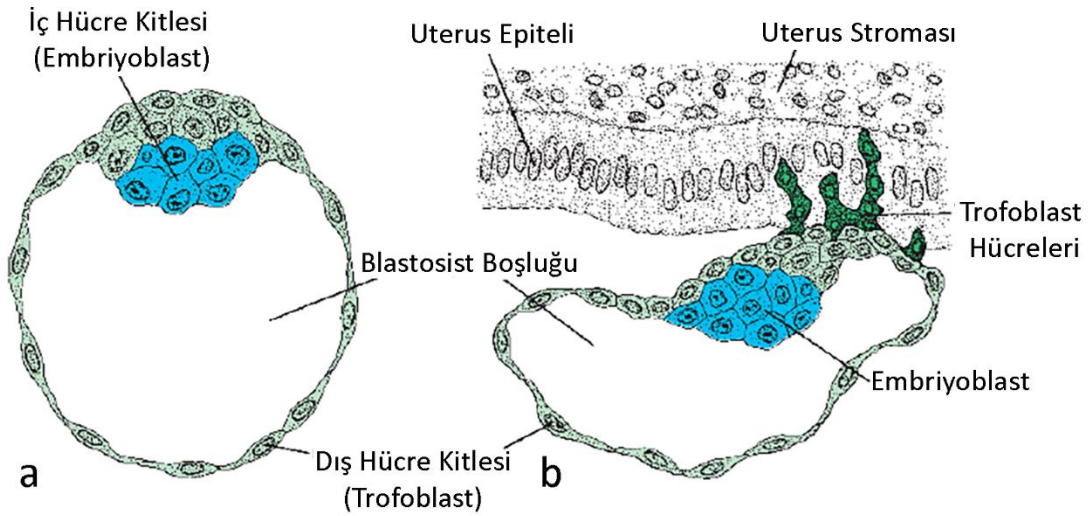
Şekil 2. 3: Overlerdeki ve uterus mukozasındaki eş zamanlı değişimler. Blastosistin implantasyonu gebelikte korpus luteumun oluşmasına neden olur. Endometriyumun sekretuar aktivitesi korpus luteum tarafından salgılanan progesteron hormonu nedeni ile zaman içinde artar.³

2.3. İMPLANTASYON

Embriyo implantasyonu birçok türde üreme sürecinin en kritik basamağını temsil eder. İmplantasyon embriyonun, uterus duvarına tutunup önce maternal epitele ardından da plasentayı oluşturmak için maternal dolaşım sistemine bağlandığı bir süreçtir [19]. Başarılı bir implantasyon için alıcı bir endometriyum ile embriyo arasında senkronize bir iletişim gereklidir [6].

İmplantasyon süreci yerleşme, yapışma ve istila olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur [20]. Blastosistin yerleşmesi sırasında trofoblast hücreleri, alıcı endometriyal epitelyuma yapışır (Şekil 2.4). Daha sonra blastosist, endometriyal bazal lamina ve stromal hücre dışı matrikse bağlanır. Bu aşamadan sonra embriyo ile endometriyum arasında oluşan bağlantı menstruasyon ile bozulamaz [22].

³ Sadler T.W., 2017, *Langman Medikal Embriyoloji*, Palme Yayıncılık, ss. 46.



Şekil 2. 4: (a) Fertilizasyondan 4,5 gün sonra bir insan blastosistinin şematik görünümü. Mavi hücreler iç hücre kitlesini veya embriyoblastı, yeşil hücreler de trofoblastı temsil etmektedir. (b) Gelişimin 9. gününde bir blastosistin şematik kesiti. Blastosistin embriyonik kutbunda yerleşmiş olan trofoblast hücreleri uterus mukozasını delmişlerdir. İnsan blastosisti, uterus mukozasının içine 6. günden sonra gömülmeye başlar.⁴

Ardından blastosist luminal epitelyuma invaze olur [20]. Blastosistin implantasyonu sadece düzenli adet döngüsünün 20 ve 24. günlerini kapsayan sınırlı bir dönemde ortaya çıkabilir. İmplantasyon penceresi olarak adlandırılan bu dönem boyunca [9] endometriyum, implantasyon için ovaryum steroid hormonları tarafından morfolojik ve fonksiyonel olarak hazırlanır [22,23].

2.3.1. İmplantasyon Penceresi

Gelişimsel olarak yetkin bir embriyonun endometriyuma yapışmasına ve istila etmesine izin verilen menstrual döngüdeki zaman aralığına implantasyon penceresi adı verilmiştir [9]. İmplantasyon penceresi ilk olarak, embriyo transferinin zamanlamasını değerlendiren üreme endokrinologları tarafından tanımlanmıştır.

Navot ve arkadaşları [24] , 42 ila 48 saatlik embriyoların menstrual döngünün sadece 17, 18 veya 19. günlerinde (yumurtlama gününün menstrual döngünün 14. günü olduğu varsayıldığında) aktarıldığında implante olduğunu belgelemişlerdir. Daha önce veya daha sonra yapılan transferler herhangi bir gebelikle sonuçlanmamıştır. Daha ileri çalışmalar [25,26]

⁴ Sadler T.W., 2017, *Langman Medikal Embriyoloji*, Palme Yayıncılık, ss. 44.

sonucunda implantasyon penceresinin menstrual döngünün 19-23. günlerini kapsadığı gösterilmiştir.

Bu bulgular, düzenli menstrual döngüye sahip doğurgan kadınlara transfer edilen 4,5–7 günlük embriyoların, döngünün 18,5 ila 21. günleri arasında implante olmasının gözlemlenmesi ile korelasyon göstermektedir [27].

Saflaştırılmış sitotroblastları ve endometriyal eksplantları içeren bir in vitro ko-kültür modeli, trofoblastların menstrual döngü gününden bağımsız olarak stromaya seçici olmayan bir şekilde yapıştıklarını ortaya çıkarmıştır. Ancak trofoblastlar, sadece döngünün 19. gününde elde edilen örneklerde endometriyal yüzey epiteline yapışmaktadırlar [28]; bu da yüzey epitelinin endometriyal seçiciliğin en kritik bileşeni olduğunu göstermektedir [29].

2.4. TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI

TİB esas olarak, her döngüde yüksek derecede kaliteli bir ila iki embriyonun aktarıldığı üç ardışık IVF girişiminden sonra klinik gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır [10,30]

TİB'in çeşitli nedenleri vardır ve özellikle uterus anormallikleri, hormonal veya metabolik bozukluklar, enfeksiyonlar ve immünolojik faktörler gibi maternal faktörlerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca paternal faktörün de embriyonun genetik ve morfolojik durumu üzerindeki etkisi TİB'e yol açabilmektedir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, bu karmaşık implantasyon sürecinde kümülüs hücrelerinin etkisi gibi diğer birçok faktörün rolünü de araştırmıştır [11].

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının sınıflandırması bu hastalar için doğru terapötik yaklaşımların uygulanmasına imkan sağlayacağı için faydalı görünmektedir [11]. TİB; multifaktöriyel TİB, endometriyal TİB ve idiyopatik TİB olmak üzere üç ana başlık altında sınıflandırılabilir.

2.4.1. Multifaktöriyel TİB

Konjenital uterin anormallikler, endometriyal polipler, uterin fibroidler, endometriozis gibi maternal faktörler TİB ile sonuçlanabilir. Şiddetli oligoastenozoospermi teşhisi koyulması veya sperm DNA fragmantasyonunun artması da TİB'e neden olabilir. Aynı zamanda iyi morfolojiye

sahip embriyoların anöploidi olduğu genetik anormallikler, hormonal veya metabolik bozukluklar (kontrolsüz diyabet, tiroid hastalığı, prolaktin düzeyindeki değişiklikler vb.), enfeksiyonlar, trombofili, immünolojik faktörler, psikolojik faktörler ve yaşam tarzı multifaktöriyel TİB'in diğer nedenleridir [11].

2.4.2. Endometriyal TİB

Vaskülaritedeki değişimlerden bağımsız olarak, endometriyumun ince (≤ 6 mm) olması nedeni ile, yüksek kalite embriyoların transferlerinin başarısız olması durumu endometriyal TİB olarak sınıflandırılmaktadır [11].

2.4.3. İdiyopatik TİB

Hastanın kendisinde, eşinde ve embriyolarda herhangi bir rahatsızlık olmaksızın, uterus kavitesinde ve endometriyumda herhangi bir anatomik ve histolojik değişiklik olmadan, kaliteli embriyoların transfer edilmesinden sonra hamileliğe ulaşılamayan vakalardaki bu açıklanamayan başarısızlıklar idiyopatik TİB olarak sınıflandırılmaktadır [11].

2.5. TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞININ NEDENLERİ

İmplantasyon başarısızlığının birincil nedeninin anneden mi yoksa embriyodan mı kaynaklandığı uzun zamandır araştırılan ve henüz cevaplanamamış bir sorudur. İmplantasyon sürecini erken dönemde kontrol eden mekanizmaların anlaşılması için farelerde yapılan gen susturma çalışmaları gibi birçok hayvan modeli çalışmaları yapılmıştır [31,32].

Hayvan modellerine ek olarak embriyo ile endometriyum arasındaki etkileşimleri incelemek için çeşitli in vitro modeller de oluşturulmuştur [33,34].

Yapılan çalışmalar, desidualize olan endometriyal stromal hücrelerin gelişimsel olarak bozulmuş insan embriyolarını seçici olarak tanıyabildiğini göstermektedir. Embriyo kalitesinin maternal olarak analiz edilmesi sürecindeki kusurların, düşük kaliteli embriyoların implantasyonunu kolaylaştırdığı ve normal embriyoların gelişimini tehlikeye atarak tekrarlayan düşüklere neden olduğu düşünülmektedir [35].

TİB'in nedenleri gamet faktörleri, embriyo faktörleri ve endometriyal faktörler olmak üzere üç ana başlıkta değerlendirilebilir.

2.5.2. Gamet Faktörleri

2.5.2.1. Oosit Kalitesi

Oosit kalitesinde yaşa bağlı düşüş gözlenir ve bu da kromozomal işlev bozukluklarının artmasına neden olur. Bunun sonucunda anöploid embriyoların sayısı artar ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ile mitokondriyal DNA hasarında artış görülür [36]. Literatürde, agresif yumurtalık stimülasyon protokollerinin kalitesiz oositlerin üretimine ve daha yüksek dölleme başarısızlığına yol açabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [37–39].

İmplantasyon sürecinde kümülüs hücrelerinin de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Kümülüs hücreleri, folikül evresinden döllemeye ve erken embriyo gelişimine kadar oositin etrafını saran bir hücre kütesidir [40]. Kümülüs hücreleri bir prostaglandin kaynağıdır ve implantasyon sırasında anjiyogenezde rol oynayacak anjiyogenik faktörlerin (vasküler endotelyal büyüme faktörü, VEGF) anlatımını yapar. Kümülüs hücrelerinin gen anlatımının oosit kalitesi, embriyo yetkinliği ve gebelik başarısı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [41].

Yakın zamanda yapılan bir çalışma TİB gözlenen kadınlarda, kümülüs hücreleri ile birlikte kültüre alınan embriyoların, kümülüs hücresi olmayan hücre kültürüne kıyasla daha gelişmiş implantasyon ve gebelik ürettiğini göstermiştir [42].

2.5.2.2. Sperm Kalitesi

Düşük kaliteli oositlerin düşük kaliteli embriyolar üretmesi gibi, düşük kaliteli spermelerin de düşük kaliteli embriyo üretimine yol açması mümkündür. Geleneksel semen analiz parametrelerinin sperm kalitesini doğru bir şekilde yansıtmadığı düşünülmektedir. Genom ve epigenom bütünlüğü dölleme, normal embriyo gelişimi ve başarılı implantasyon için gereklidir. Bu nedenle sperm analizlerinde genetik testlerin yapılması daha faydalıdır [40].

Sigara kullanımı, genital sistem enfeksiyonu, kemoterapi veya radyoterapi dahil olmak üzere çeşitli faktörler spermde DNA hasarına neden olur [43–45]. Sperm DNA'sının hasar görmesi, zayıf embriyo gelişimi ile ilişkilidir [46]. Aynı zamanda hem hayvan hem de insan çalışmaları, spermdeki DNA hasarının, kendiliğinden [47] ve YÜT kullanılarak elde edilen gebeliklerin kaybı ile ilişkili olduğunu göstermiştir [48–50].

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, sperm DNA'sının hasarının IVF tedavisini takiben gebelik oranları üzerinde az bir etkiye sahip olduğunu ileri sürmüştür [51]. Sonuç olarak, üreme başarısızlığının değerlendirilmesinde sperm DNA'sının genetik olarak analiz edilmesine olan ilgi son zamanlarda artmaktadır. Sperm DNA'sının parçalanması düşük yapma riski ile ilişkili olabilir [52,53], ancak TİB ile ilişkisi henüz belirlenememiştir.

2.5.2. Embriyo Faktörleri

Embriyo kalitesinin düşük olması, implantasyon başarısızlığının ana nedeni olarak kabul edilir [54]. Embriyonik genetik anormallik sıklığı yaşla birlikte artmakta [55,56] ve infertil çiftlerde genel popülasyona göre daha yüksek oranda görülmektedir [57]. Bu anormallikler mayoz bölünme sırasında oluşan bir hatadan kaynaklanıyor olabilir ve bu da kromozomal mozaikliğe neden olur.

Mozaiklik implantasyon öncesi gelişimin erken evrelerinde insan embriyolarının %91'inde görülen bir durumdur. Ancak embriyo blastosist evresine ulaştığında mozaiklik oranı anlamlı olarak daha düşüktür [58,59]. Mozaik embriyoların çoğunluğunun ilk trimester döneminden önce kaybolduğu görülmektedir. Bu durumun mozaik embriyolara ya da embriyo içindeki anormal hücrelere karşı seçim ve normalleşme nedeniyle olduğu düşünülmektedir [60]. Blastosist evresinde embriyoların çoğunluğunun tek tip öploid olduğu düşünülmektedir [61].

Mozaik embriyoların oranının IVF tedavisi gören diğer hastalara kıyasla TİB hastalarında çok daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [62,63]. İmplantasyon öncesi genetik tarama, transfer edilecek doğru embriyoyu seçmede ve tedavi sonuçlarını iyileştirmekte yardımcı olabilir.

Bazı durumlarda TİB embriyonun "*zona pellucida*"sından çıkamamasına bağlı olabilir [64]. "*Zona pellucida*", döllenmeden sonra embriyoyu sıkıştıran ve şekillendiren bir glikoprotein tabakasıdır. "*Zona pellucida*" embriyonun fallop tüplerinden aktif olarak taşınmasını kolaylaştırarak, embriyoyu mikroorganizmalardan ve bağışıklık hücrelerinden korur [65]. Blastosist aşamasında embriyonun endometriyal epitele tutunabilmesi için zonadan ayrılması gerekir [66]. Bu durumun başarısız olmasına IVF kültür koşullarından kaynaklanan zona sertleşmesi [67] veya kriyoprezervasyon [68] neden olabilir. Ayrıca yumurtalık stimülasyonunun neden olduğu ileri endometriyal gelişim [69] ve in vitro embriyoların gecikmiş gelişimi [70], embriyonun zonadan zamanından önce çıkmasına neden olan bir

senkronizasyon problemi oluşturabilir. Bu senkronizasyon problemi embriyo implantasyonunda başarısızlık ile sonuçlanabilir [35].

2.5.3. Endometriyal Faktörler

Son yıllarda endometriyumun reseptif olduğu dönemde ve bu dönemin hemen öncesinde birçok gen ve protein anlatım analizi çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar endometriyumun doğal döngüsü sırasında [71,72] ve yumurtalık stimülasyonu sırasında [41,73,74] yapılmıştır.

Tüm bu çalışmalar ile çok sayıda biyobelirteç tanımlanmış olsa da farklı yöntemler, teknikler, hasta özellikleri ve zamanlama nedeniyle çalışmalar arasında ortak sonuçlar azdır [75]. Bu çalışmalar endometriyal reseptivitenin evrimsel olarak korunmuş bazı düzenleyicilerin gen anlatımlarının yapılması ile yönetildiğini göstermektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarla, bu faktörleri kadınlarda üreme yetmezliği ile ilişkilendirmek veya terapötik hedefler olarak kullanmak mümkün olmamıştır. Ancak anlamlı derecede farklılık gösteren anlatım profilleri tespit edilmiştir [35].

2.5.3.1. Prostaglandinler

Yapılan çalışmalarda prostoglandinlerin (PG'lerin) başarılı embriyo implantasyonu için çok önemli olduğu gösterilmiştir [76,77]. Siklooksijenazlar (COX-1 ve COX-2), progesteron tarafından anlatımı arttırılan ve PG'lerin sentezinden sorumlu enzimlerdir [78]. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, TİB hastalarında kontrollere kıyasla COX-2 geninin anlatım seviyesinin azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu durum IVF sonrası TİB gözlenen hastalarda PG sentezinin, fertil kontrollere kıyasla daha az olması ile sonuçlanmaktadır [79].

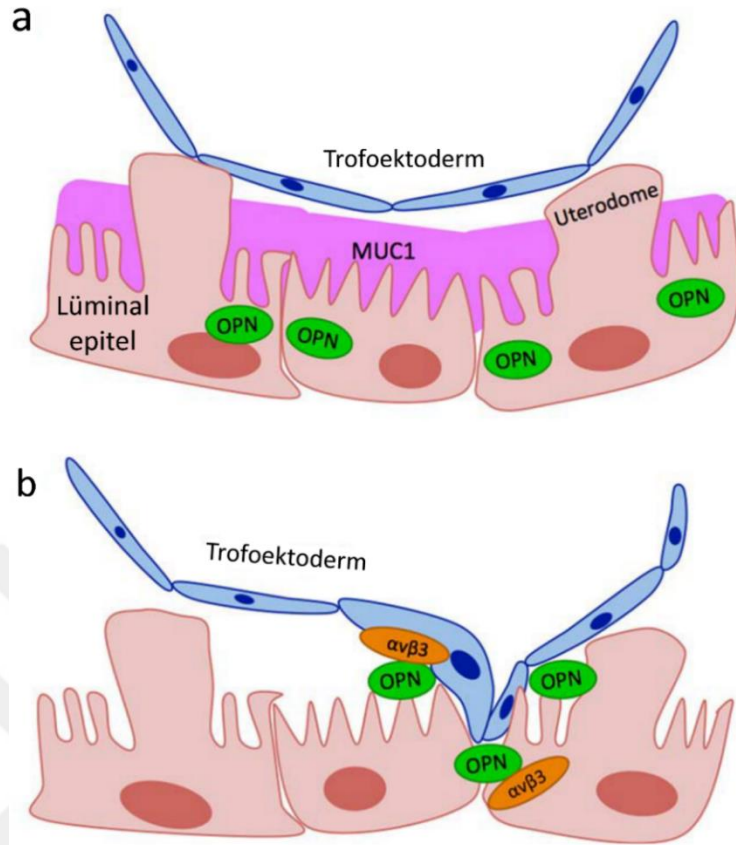
TİB hastalarında COX-2 gen anlatımındaki azalma ile birlikte VEGF gen anlatımının da azaldığı tespit edilmiştir. Bu sebeple COX kaynaklı sinyal yolağının başarılı embriyo implantasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [80].

2.5.3.2. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücre adezyon molekülleri ailesi integrinler, selektinler, kaderinler ve immünoglobulinler olmak üzere dört üyeden oluşur. Genellikle karbonhidrat glikoproteinlerinden oluşan bu yüzey ligandları hücrelerin birbirlerine yapışmasına aracılık eder.

İntegrin $\alpha V\beta 3$ 'ün ve ligandı olan osteopontinin anlatımının implantasyon penceresinin başlaması ile eş zamanlı olarak başladığı (Şekil 2.5) endometriyal epitel yüzeyinde immünohistokimyasal olarak saptanmıştır [81]. Anormal $\alpha V\beta 3$ integrin anlatımı açıklanamayan infertilite [82,83], endometriyozis [84] ve polikistik over sendromu [85] gibi diğer jinekolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Menstrual döngünün 21. gününde integrin mRNA'sı seviyesinin düşük olmasının implantasyon oranını normale göre %50 oranında düşürdüğü tespit edilmiştir [86,87].

Lüminal epitel hücreleri yüzeyinde bulunan oligosakkarit ligandlar, embriyonal L-Selektin'e bağlanmaktadır [88]. Selektinlerin embriyo-maternal etkileşimin erken dönemlerindeki olaylara katkıda bulunduğu bilinmektedir [89]. E-Kaderin, hücre-hücre adezyonunda rol oynayan bir kaderin molekülüdür. E-Kaderin anlatımının azalmasının embriyo invazyonunda rol oynadığı düşünülmektedir [89]. Selektin ve kaderin moleküllerin anlatımının TİB ile ilişkisi konusundaki çalışmalar halen yetersizdir.

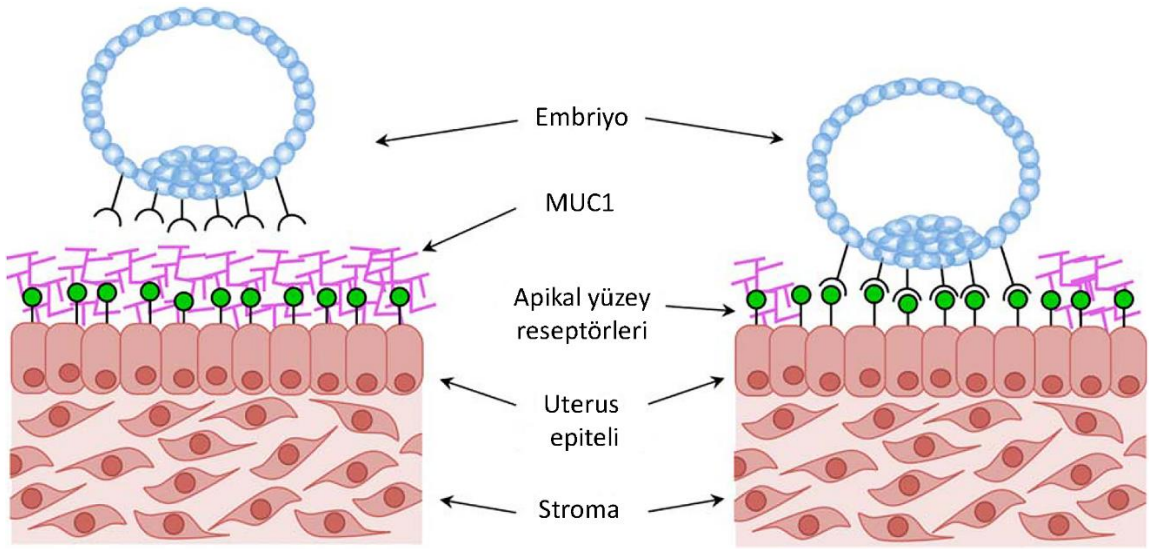


Şekil 2. 5: (a) Embriyonun glikokalikse bağlanmasının ilk aşaması. Bu aşamada uterus yüzeyinde “uterodome” olarak adlandırılan çok sayıda küçük çıkıntılar meydana gelir. (b) Bağlanmanın ikinci aşamasında embriyonik sinyallere yanıt olarak glikokaliksin apikal yüzeyindeki MUC-1’ler temizlenir. Trofoektoderm, lüminal epitel hücrelerinin arasına eklenir. (*MUC1* = *Müsin 1*, *OPN* = *Osteopontin*, $\alpha\beta 3$ = *İntegrin $\alpha\beta 3$*).⁵

2.5.3.3. Müsinler

Endometriyumda MUC-1 glikoproteinini, endometriyumun lüminal epitel tabakasının üzerinde yer alır ve implantasyon için bir bariyer görevi görür (Şekil 2.6) [90] . İnsan in-vitro implantasyon modelleri, implantasyon penceresi [91] sırasında MUC-1 anlatımının arttığını ve implantasyon sonrasında anlatımının azaldığını [92] göstermektedir.

⁵ Davidson L.M. ve Coward K., 2016, *Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation*, Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, c. 108, sayı 1, ss. 23.



Şekil 2. 6: MUC-1, embriyonun apikal endometriyal yüzeye bağlanması için bariyer görevi gören bir anti-adezyon molekülüdür. MUC-1 temizlenmesi embriyonun implantasyon için apikal hücre yüzey reseptörlerine erişebilmesini sağlar.⁶

TİB hastalarında normal bireylere kıyasla endometriyal MUC-1 geninin anlatım seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir [93,94]. MUC-1, oldukça polimorfik bir genidir. 2001 yılında yapılan bir çalışmada, MUC-1 allelinin büyüklüğü ile implantasyon başarısızlığı arasındaki ilişki gösterilmiştir [95]. Diğer taraftan 2004 yılında bir çalışmada, implantasyon başarısızlığı görülen on hasta ve on fertil bireyin MUC-1 genotipi karşılaştırılmış ve herhangi bir ilişki olmadığı öne sürülmüştür [96]. Ayrıca tekrarlayan düşük yapma öyküsü olan hastalarda da MUC-1 gen anlatımı ile hastalık arasında bir ilişki bulunamamıştır [96].

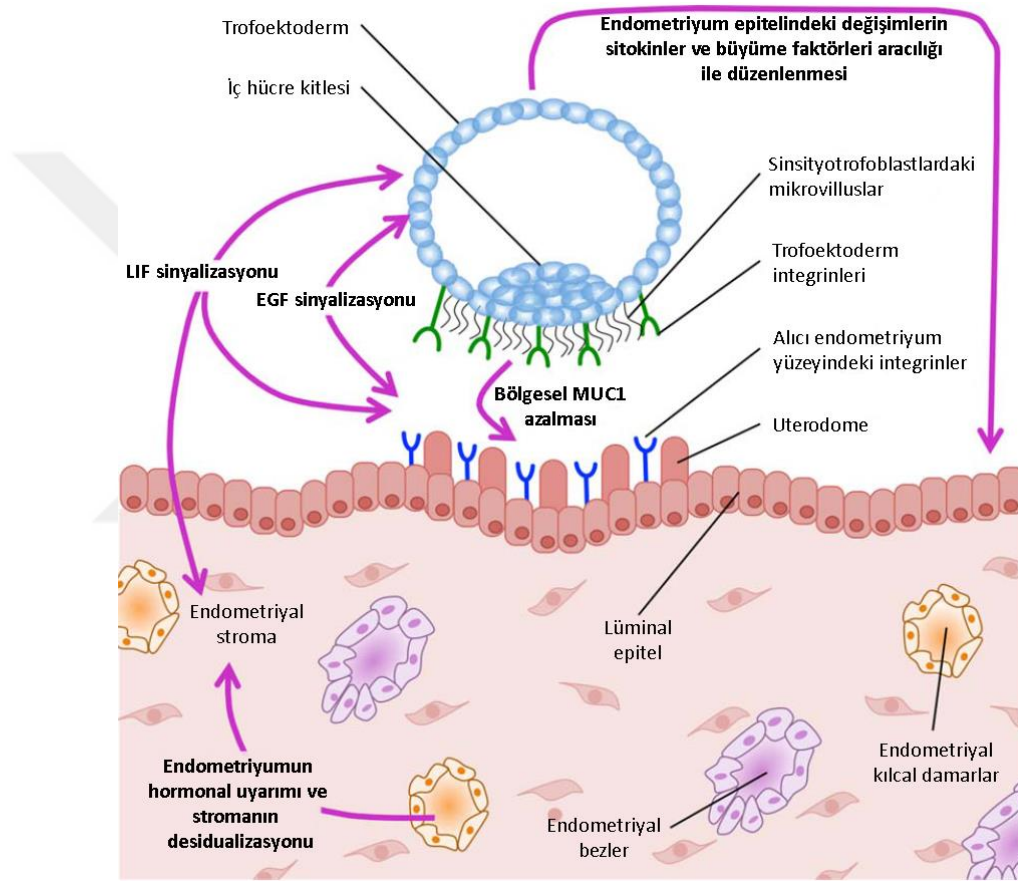
2.5.3.4. Sitokinler

Uterin doğal katil hücreleri, endometriyumda en çok bulunan bağışıklık hücreleridir. Bu hücreler bağışıklık düzenlenmesi, anjiyogenez, plasental gelişim ve gebelik oluşumu için önemli olan çeşitli sitokinleri salgılar [97,98].

Sitokinlerden “*Leukemia Inhibitory Factor*”ün (LIF’in) proliferasyon, farklılaşma ve hücrelerin hayatta kalması üzerine etkileri, araştırmacıları LIF’in implantasyondaki rolünü araştırmaya yönlendirmiştir (Şekil 2.7). TİB hastalarında LIF gen mutasyonlarının rolü araştırılmıştır [99].

⁶ Davidson L. M. ve Coward K., 2016, *Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation*, Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, c. 108, sayı 1, ss. 24.

İnsan endometriyal hücrelerinin LIF salgılama seviyesi, TİB ve açıklanamayan infertilitesi olan hastalarda proliferatif faz ile sekretuar faz karşılaştırıldığında zayıf bir artış göstermiştir [100]. Bununla birlikte, en az iki başarısız IVF öyküsü olan hastalara rekombinant LIF uygulaması yapılan klinik çalışmada, çalışma grubu kontrol grubuna kıyasla daha yüksek implantasyon oranları göstermiştir [101].



Şekil 2. 7: Embriyo ve endometriyum arasındaki implantasyon öncesi erken sinyalleşmenin şematik gösterimi. Blastosist, integrinler ve "uterodome"lar aracılığıyla alıcı endometriyuma yaklaşır. (LIF= *Leukemia Inhibitory Factor*, EGF=Epidermal Büyüme Faktörü) ⁷

⁷ Davidson L. M. ve Coward K., 2016, *Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation*, Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, c. 108, sayı 1, ss. 20.

IL-1 sitokinlerinin implantasyondaki önemi fare deneyleri ile belirlenmiştir. IL-1 eksikliği bulunan farelerde gebelik gözlenebilirken, uygun zamanda yapılan IL-1ra (IL-1 reseptör antagonisti, IL-1 inhibitörü) enjeksiyonu blastosist implantasyonunu engellemiştir. Bu durum, luminal epitel yüzeyindeki önemli integrinlerin anlatımının azalmasına bağlanmıştır [102]. Benzer bir durum insanda da ortaya çıkmaktadır. IL-1'in endometriyal epitelyal hücrelerin kültür ortamına eklenmesi, integrin $\beta 3$ anlatımının artmasına neden olmakta ve bu durum blastosist implantasyonunu arttırmaktadır [35]. IVF sonrası TİB yaşayan hastalarda, kontrol gruplarına göre IL-5 ile IL-8 sitokinlerinin düzeylerinin farklı olduğu ve bu farklılığın uterin doğal katil hücrelerinin üretimi ve anjiyogenez ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir [103]. IL-6 eksikliği olan farelerde implantasyon bölgelerinde ve doğurganlıkta azalma gösterilmiştir. Tekrarlayan düşük (TD) görülen hastalarda IL-6'nın geç sekretuar fazda anormal anlatımı gösterilmiştir [104]. IL-11 üzerinde yapılan çalışmalar, bu biyobelirtecini anlatımının TD hastalarının endometriyal biyopsi örneklerinde fertil kontrollere kıyasla daha düşük olduğunu ortaya koymuştur [105]. Bu durum sitokinlerin, endometriyal desidualizasyonda rol oynadığını düşündürmektedir.

2.6. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ

Çiftlerin düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına ve korunma yöntemi uygulamalarına rağmen, bir yıl içerisinde gebelik görülmemesine infertilite (kısırlık) adı verilmektedir. Dünyada kısırlık oranı %8-12, Türkiye’de ise %10-20 arasındadır. Yardımcı üreme teknikleri (YÜT), hamileliğe ulaşmayı amaçlayan tedavi ve prosedürleri ifade eder. YÜT’ün çeşitleri ve uygulanma yöntemleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir [106]. YÜT’e ışık tutan ilk çalışmalar 1800’lü yılların sonlarına uzanmaktadır. Teknik gelişmelere paralel olarak yardımcı üreme teknikleri ile canlı bebek sahibi olma şansı da artmaktadır [107].

Tablo 2. 1: Yardımcı üreme teknikleri ve uygulanma yöntemleri.

Yöntem	Uygulanan İşlem
İntra Uterin İnseminasyon	Spermilerin katater aracılığı ile uterus veya fallop tüpüne transfer edilmesi işlemidir.
İn Vitro Fertilizasyon	Laboratuvar ortamında döllenmiş yumurta ve spermün uterusu transfer edilmesi işlemidir.
Gametlerin İntrafallopian Transferi	Oosit ve spermilerin döllenmeden laparoskopi veya transvajinal ultrason ile fallop tüplerine transfer edilmesidir.
İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu	Spermün yumurtanın içine enjekte edilmesi işlemidir.
Zigotların İntrafallopian Transferi ve Tubal Embriyo Transferi	Zigot veya erken dönemdeki embriyonun laparoskopi veya transvajinal ultrason ile fallop tüplerine transfer edilmesidir.

2.6.1. İn Vitro Fertilizasyon

IVF, hormonal stimulusla uyarılan ovaryumlarda oluşturulan çok sayıdaki oositin toplanması, uygun şartlarda laboratuvar ortamında sperm ile dölleniş ve daha sonra uterusu yerleştirilmesi işlemidir. IVF'in başarı oranı annenin yaşına bağlıdır. 35 yaşından küçük kadınların %30'u ilk denemede hamile kalabilmektedir. Başarı oranı 35-37 yaş arasındaki kadınlarda %25'e, 38-40 yaş arasında %17'ye ve 40 yaşın üstündeki kadınlarda %5'e düşmektedir [5].

Ovaryum stimülasyonu menstruasyonun 3. gününde başlar. Çoğu hastaya FSH analogu olan gonadotropinler yaklaşık 10 gün süre ile uygulanır. Folikül olgunlaşması saptanırsa, LH etkisi gösteren β -hCG verilir. Enjeksiyondan 36 saat sonra ovulasyon olacağı düşünülerek bu sürenin dolmasından hemen önce ultrason eşliğinde vajina duvarından ovaryuma giren bir iğne yardımı ile oositler toplanır. Genellikle genel anestezi altında gerçekleştirilen bu işlem 20-30 dakikada tamamlanır. Laboratuvar ortamına alınan oositler çevrelerindeki hücreler temizlenerek fertilizasyona hazırlanır. Bu sırada spermiyum da fertilizasyon işlemi için hazır hale getirilir. Oosit ve spermiyum (1/75,000 oranında) 18 saat birlikte tutulurlar. Bu süre sonunda gerçekleştirilen kontrolde fertilizasyon sağlanmışsa iki pronükleus görülür. Pronükleusa sahip zigotlar özel bir büyüme medyumuna alınarak 48 saat bekletilir. Bu süre sonunda 6-8 hücreli döneme ulaşılması gerekir. Embriyo transferi genellikle bu dönemde yapılır. Embriyologlar tarafından hücre sayısı, büyüklük ve fragmantasyon açısından kaliteleri derecelendirilen embriyoların en iyileri ince, plastik bir katater aracılığı ile uterusu transfer edilir. Genellikle 2 embriyodan fazlasının transferi çoğul gebelik olasılığı bulunduğundan sakıncalıdır. İşlem başarıya ulaşırsa implantasyonu takip eden normal bir gebeliğin ardından sağlıklı bir bebek dünyaya gelebilir [107].

2.7. ENDOMETRİYAL GEN ANLATIMI VE TİB BİYOBELİRTEÇLERİ

Son on yılda endometriyumun reseptif olduğu dönemde ve öncesinde normal menstrual döngü [71,72,74,108] ve yumurtalık stimülasyonu [73,74,109] sırasında çok sayıda gen ve protein anlatım profili çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm bu çalışmalarda çok sayıda biyobelirteç tanımlanmış olsa da farklı teknikler, hasta özellikleri ve zamanlama nedeni ile sonuçlar arasındaki benzerlikler düşüktür [75]. Şimdiye kadar bu biyobelirteçleri implantasyon başarısızlığı ile ilişkilendirmek ve terapötik hedefler olarak geliştirmek mümkün olmamıştır. Ancak çalışmalarda, örneklerin anlatım profillerinde anlamlı farklılıklar belirlenmiştir [110].

Hücre döngüsü, Wnt sinyalizasyonu ve hücrel adezyon yollarında, reseptif fazda TİB hastalarında sağlıklı fertil kontrollere göre düzensiz gen anlatımı görülmektedir [111]. İmplantasyon başarısızlıkları ve tekrarlayan düşükler ile fertil kontrollerin gen anlatım profillerini karşılaştıran bir çalışmada 2200'e yakın genin anlatımında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Hasta gruplarında ortak olarak DNA transkripsiyonu ve hematolojik sistem yollarında düzensiz gen anlatımı görülmüştür. İmplantasyon başarısızlığı görülen hastalarda, hücrel immün yanıt ve sinir sistemi gelişimi süreçlerinde yüksek oranda bozulmuş gen anlatımı gözlenmiştir [103]. Diaz-Gimeno ve diğ. endometriyal reseptivite için bir biyobelirteç seti geliştirmiş olsalar da bu set TİB gibi olguları tespit etmekte yetersiz kalmıştır [72].

Hücre apoptozu ve anjiyogenez süreçlerini düzenleyen P53 tümör baskılayıcı geni ile yapılan çalışmalarda, p53 geninin TİB hastalarında anlamlı derecede yüksek oranda homozigot genotipte olduğu gösterilmiştir [112,113].

MSX "*homebox*" genlerindeki delesyonun farelerde blastosis implantasyonunu engellediği bilinmektedir [114].

TİB hastalarının endometriyal doku örnekleri ile aynı yaş aralığındaki sağlıklı fertil bireylerin endometriyal doku örnekleri karşılaştırılarak yapılan mikrodizilim analizi sonucunda [115] anlatım farklılığı saptanan genler Tablo 2.2 'de gösterilmiştir. Bu genler arasından seçilen MME, WWC1 ve TNC genleri bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.

Tablo 2. 2: Mikrodizilim analizi sonucu, TİB hastalarında kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde anlatım değişimi tespit edilen genlere ait p değerleri ve logFC değerleri. (Verilere ait “*Gene Expression Omnibus*” erişim numarası: GSE111974)

Gen Sembolü	P Değeri	logFC Değeri
MARK2	1.24e-19	-20.956.625
TOP1	3.82e-19	-101.385
RBM47	1.31e-18	-159.389.817
ACTB	1.59e-17	-115.016.212
USF2	2.95e-17	-0.95277917
MOB1A	9.77e-17	-111.699.355
KIAA1429	2.97e-16	-100.214.583
ROCK2	3.64e-16	-1.289.025
NCOA4	3.70e-16	-126.248.072
SMG5	3.91e-16	-152.331.667
C1orf229	4.97e-16	1.499.875
MLL5	5.05e-16	-128.184.465
CIZ1	6.17e-16	-1.198.425
SEPT9	6.52e-16	-164.046.667
AGAP1	2.47e-15	-116.275.023
FAM107B	3.52e-15	-1.359.375
HOOK3	4.99e-15	-128.945.833
XLOC_l2_015397	5.98e-15	119.270.833
PHF8	7.18e-15	-31.969.875
LATS1	8.95e-15	-15.212.375
PAPOLA	1.05e-14	-130.216.667
WWC1	3.57e-08	-129.708.333
MME	4.07e-06	-130.683.333
TNC	4.97e-03	105.077.917

2.7.1. TNC Geni ve Fokal Adezyon Yolağı

TNC (“*Tenascin C*”) geni 9q33.1’de yer alan, protein kodlayan bir gendir (Şekil 2.9). Bu genin kodladığı hücre dışı matriks proteini embriyonal gelişim, sinaptik plastisite, nöronal rejenerasyon ve aksonların yönlendirilmesi süreçlerinde rol oynar. Aynı zamanda tümörlerde endotelial hücrelerin uzaması, migrasyonu ve filizlenmesi ile anjiyogenezi uyarır [116].

Fokal adezyon yolağı hücre-matriks etkileşimleri, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, gen anlatımının düzenlenmesi ve hücre sağ kalımı gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynar.

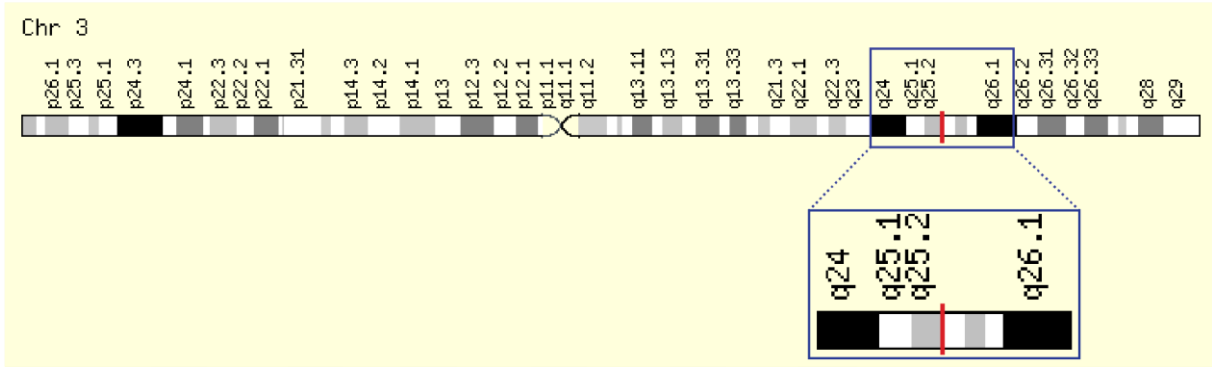
Hücrelerin hücre dışı matriks ile birleştiği noktalarda fokal adezyon olarak adlandırılan, aktin filamentlerinin integrin ailesi üyesi olan transmembran reseptörlere tutunması ile oluşan özel yapılar oluşturulur. Fokal adezyonun bazı bileşenleri membran reseptörleri ve aktin hücre iskeleti arasındaki yapısal bağlantıya katılırken; bazıları farklı protein kinazları, fosfatazları ve onların substratlarını içeren çeşitli hücre içi sinyal moleküllerini oluşturur [117].

Yapılan çalışmalarda fokal adezyon kinazların (FAK'ın) erken dönemde embriyonik hücrelerin göçünü düzenlediği, embriyogenez sırasında vaskülaritede önemli rol oynadığı tespit edilmiştir [118]. FAK geni susturulmuş farelerde kardiyovasküler bozukluklar nedeni ile erken embriyonik dönemde ölümler gözlemlenmiştir [119].

TNC gen anlatımının implantasyon öncesi dönemde değiştii gösterilmiştir [120,121]. Bu değişimin, embriyonun endometriyuma yapışmasını kolaylaştırmak için endometriyal yüzeydeki hücre adezyonunu azalttığı düşünölmektedir [122,123]. Noda ve diğ. fareler üzerinde yaptıkları endometriyal gen anlatım analizinde, TNC gen anlatımının endometriyumda gebelik öncesinde arttığını göstermişlerdir [123]. Koler ve diğ. yaptıkları çalışmada TİB hastalarında fertil kontrollere kıyasla fokal adezyon yolağındaki genlerin anlatımının azaldığını tespit etmişlerdir [111]. Yapılan çalışmalar fokal adezyon yolağının implantasyon sürecindeki önemini kanıtlamaktadır. TNC geni fokal adezyon yolağının anlatımını düzenleyen gen olması sebebi ile implantasyon başarısı için önemlidir.

2.7.2. MME Geni ve Renin-Anjiyotensin Sistem

MME (“*Membran Metalloendopeptidaz*”) geni 3q25.2’de yer alan protein kodlayan bir genidir (Şekil 2.11). Bu gen tarafından tip II transmembran glikoproteini ve insan akut lenfositik lösemi tanısında yaygın olarak kullanılan önemli bir hücre yüzey antijeni kodlanır [124].



Şekil 2. 10: MME geninin genomik konumu. ¹⁰

MME geni renin-anjiyotensin sistem (RAS) yolağında (Şekil 2.12), hematopoietik hücre yolağında, protein sindirilmesi ve emilimi yolağında ve Alzheimer hastalığı ile ilişkili yollarda bulunur.

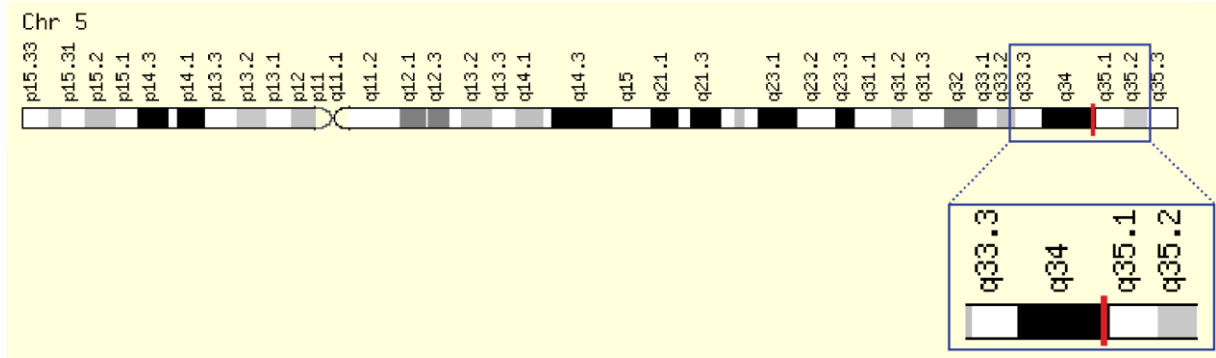
RAS'ta renin enzimi, anjiyotensin dönüştürücü enzim ile birlikte görev yaparak, Anjiyotensin'i Anjiyotensin II'ye (Ang II) dönüştürür. RAS'ta kritik bir öneme sahip olan Ang II, AT1 reseptörünü aktive eder. AT1 reseptörü böbreklerde Ang II'nin etkilerini düzenleyen reseptördür. Damarların oluşturulması, böbreklerde sodyumun geri emilimi, aldosteron salgılanması, kan basıncının artırılması gibi süreçleri yönetir [125].

Plasentada RAS'ın anlatımı gebeliğin erken dönemlerinde en üst seviyededir ve placentanın oluşumu sırasında da kritik rol oynar. Anjiyotensin reseptörü gibi bileşenler gebeliğin erken dönemlerinde maternal Ang II'ye bağlı olarak, sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlarda üretilmeye başlanır [126,127]. Ang II ile Ang IV trofoblastların invazyonunu, çoğalmasını [127] ve plasental dokudaki anjiyogenezi tetikler [128].

¹⁰ <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MME> [Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2020]

2.7.2. WWC1 Geni ve Hippo Sinyal Yolağı

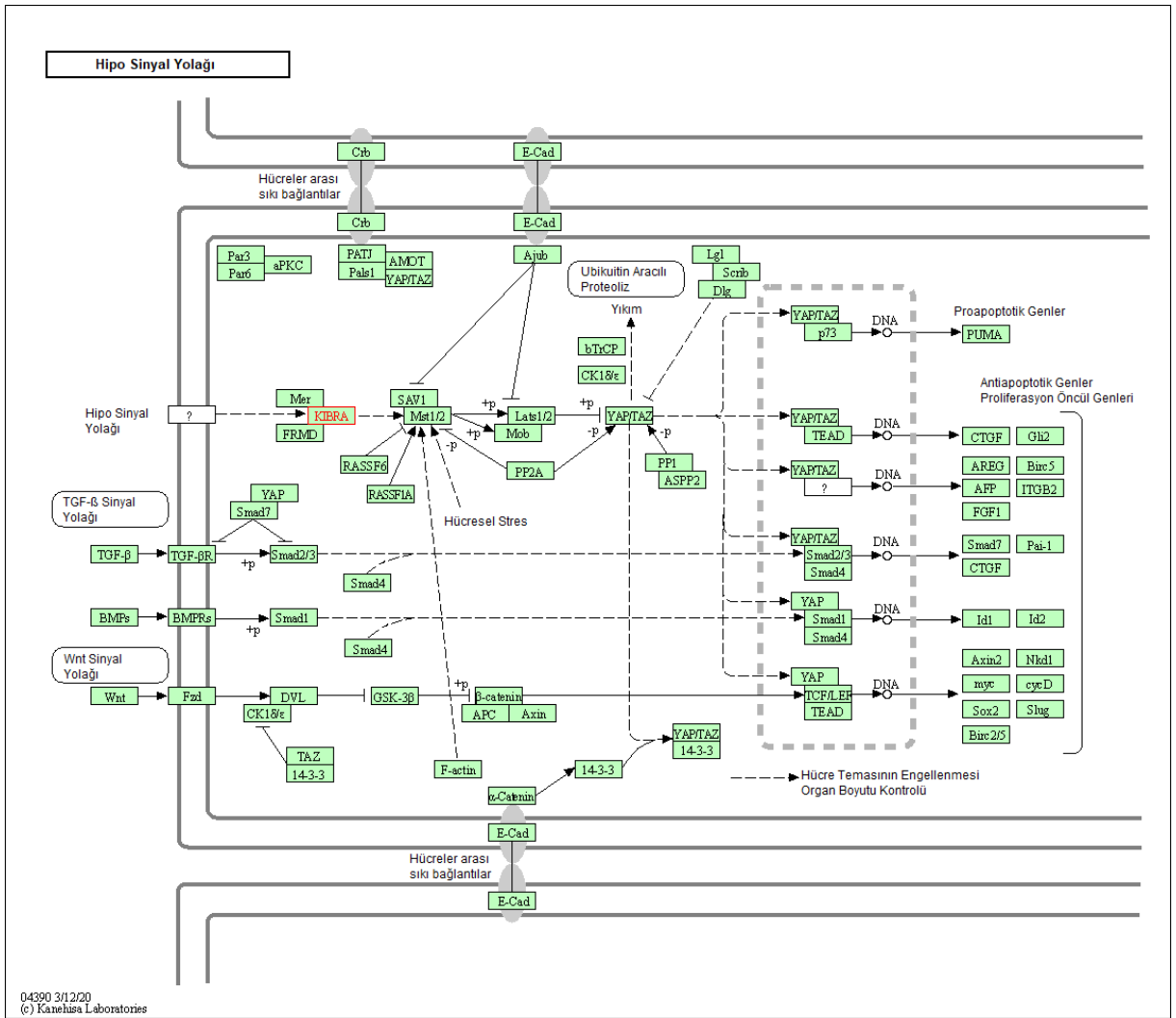
WWC1 ("*WW And C2 Domain Containing 1*") geni 5q34'te yer alan protein kodlayan bir gendir (Şekil 2.13). Bu gen tarafından sitoplazmik bir fosfoprotein kodlanır [130]. WWC1 geni, proliferasyonu kısıtlayıp apoptozu uyararak tümörleri baskılayan önemli bir yolak olan hippo sinyal yolağının düzenleyicisidir [131].



Şekil 2. 12: WWC1 geninin genomik konumu.¹²

Hippo sinyal yolağı sineklerden insanlara kadar birçok organizmada organ boyutunu kontrol eden, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yolağıdır. Bu yolak insanlarda ve farelerde MST1, MST2 kinazlardan ve bunların kofaktörü olan Salvador, LATS1 ve LATS2'den oluşur (Şekil 2.14). Hücre yoğunluğunun artmasına yanıt olarak, aktive edilmiş LATS1/2, transkripsiyonel koaktivatörler olan "*Yes-associated protein 1*" (YAP) ve "*WW-domain-containing transcription regulator 1*" (TAZ)'ı fosforile eder. Bu durum hücre apoptozuna yol açarak organların aşırı büyümesini engeller. Hücre yoğunluğunun düşük olması sebebi ile hippo sinyal yolağı inaktive edildiğinde, YAP ve TAZ nükleusta transkripsiyonu artırıcı faktörlere bağlanarak hücre büyümesi ve çoğalmasını teşvik eder. Ayrıca YAP ve TAZ, Wnt büyüme faktörleri gibi hippo sinyal yolağı aracılığı ile düzenlenen diğer transkripsiyonel faktörler ve sinyal molekülleri ile de etkileşime girer [132].

¹² <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WWC1> [Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2020]



Şekil 2. 13: Hippo sinyal yolağı. WWC1 geninin yolaktaki yeri kırmızı ile işaretlenmiştir.¹³

Memeli hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucunda P53 ailesi üyesi olan p53 [133], TEAD/TEF transkripsiyon faktörleri ailesi [134] gibi birçok DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörünün YAP'ın hedefi olduğu belirlenmiştir. Memeli genomu, implantasyon öncesindeki embriyolardan yetişkin dokulara kadar çeşitli dokularda anlatım yapan dört adet homolog TEAD/TEF ailesi üyesi içerir [135].

YAP proteininin endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonunu düzenlediği gösterilmiştir [136]. Blastosist evresindeki fare embriyolarında hippo sinyal yolağı

¹³ https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04390 [Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2020]

aktivitesindeki değişimler, ilk olarak iç hücre kütesinde, sonrasında blastosistin dışını kaplayan trofektoderimde sitoplazmada ve nukleusta YAP yerleşimine yol açar [137]. Hippo sinyal aktivitesinin hücre yerleşimine göre farklılık gösteriyor olması, içteki ve dıştaki hücreler arasındaki bağlantıların farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Bu bağlamda hippo sinyal yolağı, hücre bağlantısı aracılığı ile proliferasyonun durdurulmasını tetiklemeden hücre sağ kalımını düzenler [132].

2.8. DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

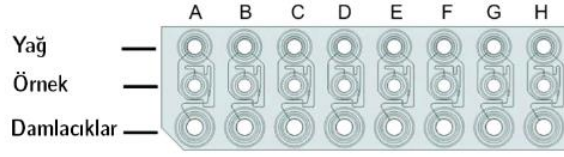
Damlacıklı dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPZR) sistemi izole edilmiş nükleik asit örneklerini nanolitre boyutundaki binlerce yağ damlacığına hapseder ve her damlacıkta bir PZR reaksiyonu gerçekleştirir (Şekil 2.12). Bir kuyucuğa koyulan örnek 20.000 damlacığa bölünür ve her bir damlacıkta istenilen nükleik asit bölgesine özgü PZR reaksiyonu gerçekleştirir. Damlacıklar, bir PZR reaksiyonunun gerçekleştiği test tüpleri veya “plate”lerin aynı işlevi gören daha küçük versiyonlarıdır. On binlerce damlacık oluşturulması pratik bir şekilde tek bir numuneden on binlerce veri noktası oluşturularak ddPZR’ın analiz gücünü arttırmaktadır. Örneğin binlerce damlacığa bölünmesi ddPZR yönteminin ayırıcı özelliğidir. DNA örneği her bir damlacığa rastgele miktarda dağılır. Bu teknik, diğer dijital PZR sistemlerine göre daha küçük miktarda numune gereksinimine sahiptir. Daha düşük numune ve reaktif hacimleri kullanan ddPZR teknolojisi, duyarlılık ve hassasiyeti korurken diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında toplam maliyeti azaltan yüksek verimli bir PZR sağlar [15].

DdPZR, kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile karşılaştırıldığında daha yüksek hassasiyete sahip bir ölçüm tekniğidir. Bu iki teknikte de aynı primerler ve probalar kullanılır ancak ddPZR daha yüksek hassasiyet sağlar. qPZR’de 2 kattan küçük kopya sayısı değişiklikleri ayırt edilemez ve frekansları %1’den az olan alelleri belirlemek zordur. Çünkü qPZR benzer dizilere sahip çok sayıda ortak alelli de tespit eder. DdPZR gen ifadesindeki daha küçük farklılıkları ölçebilir ve binde bir frekansta bulunan alelleri tanımlayabilir [138]. Kanser ve viral enfeksiyonlar ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda, qPZR’ye kıyasla ddPZR’nin duyarlılığının ve hassasiyetinin daha fazla olduğu gösterilmiştir [139]. Duyarlılığın ve hassasiyetin yüksek olmasının temel nedeni, reaksiyonların tek tek bölümlendirilebilmesidir [15]. DdPZR eşik değerlerini yorumlayabilmek için standart dilüsyon eğrilerine gerek duymamaktadır [16]. Bu nedenle qPZR ile tespit edilemeyecek kadar düşük düzeyde anlatım yapan genlerin varlığı ddPZR ile saptanabilmektedir. DdPZR’ın bir diğer üstünlüğü mutlak

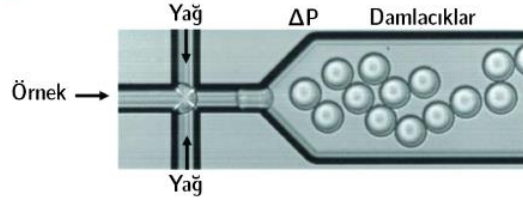
ölçüm (“*absolute quantitation*”) sağlamasıdır [140]. DdPZR sisteminde hedeflenen bölgeler floresan bazlı probalar kullanılarak çoğaltılır ve miktarları belirlenir. Hedefin en az bir kopyasını içeren pozitif damlacıklar, hedefin hiçbir kopyasını içermeyen negatif damlacıklara göre daha fazla floresan ışığa gösterir. DdPZR sisteminde analiz için kullanılan “*QuantaSoft™*” yazılımı, her bir örnekteki floresan ışığa miktarına göre pozitif ve negatif damlacık sayılarını belirler ve bunları standart bir eğriye ihtiyaç duymadan “*Poisson*” istatistiklerini kullanarak analiz eder [16]. DdPZR, teorik olarak tek bir hedef molekülün bile saptanabilmesine olanak sağlayabildiğinden yüksek hassasiyete sahip bir metottur [17].

DdPZR yöntemi faj-konak etkileşimi çalışmaları [141], fetal tarama [142], biyobelirteç analizi [143], viral saptama [144], prognostik izleme [145], yüksek verimli dizileme [146], Alzheimer hastalığında mitokondrial DNA değişimi [147] çalışmalarında kullanılmaktadır.

- a** Örnekler ve yağ tek kullanımlık damlacık oluşturma kartuşuna yüklenir.



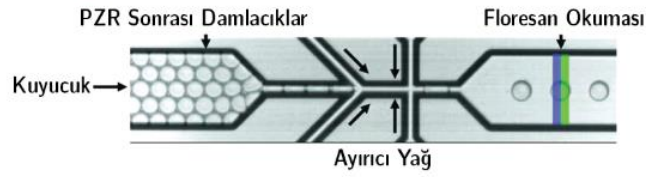
- b** Damlacıklar oluşturulur.



- c** Damlacıklar 96 kuyucuklu "plate"e aktarılır.

- d** Termal döngü gerçekleştirilir.

- e** Damlacıkların floresan ışması okunur.



- f** Konsantrasyonlar QuantaSoft yazılımında hesaplanır.

Şekil 2. 14: Damlacıklı dijital PZR iş akışı: (a) Örnekler ve damlacık oluşturmak için kullanılan yağ sekiz kanallı damlacık oluşturma kartuşuna yüklenir. (b) Damlacık oluşturma cihazı, uyguladığı vakum ile örnekleri ve yağı çekerken 1 nL boyutunda damlacıklar oluşturur ve örnekleri bu damlacıkların içine hapseder. 2 dakikadan az bir sürede, sekiz örneğin 20.000 damlacık içeren setlere dönüştürülür. (c) Oluşan damlacıklar 96 kuyucuklu "plate"lere aktarılır. (d) 35-40 döngülük bir PZR reaksiyonu gerçekleştirilir. (e) "Plate" damlacık okuyucu cihaza aktarılır ve cihaz her bir damlacıktaki floresan ışmayı okur. (f) Cihaz tarafından "QuantaSoft" yazılımı ile damlacıkların pozitif ve negatif ışmaları değerlendirilerek örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.¹⁴

¹⁴ B. J. Hindson *vd.*, 2011, High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number, *Analytical Chemistry*, c. 83, sayı 22, ss. 8604–8610.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HEDEF GENLERİN SEÇİMİ

TİB hastalarının endometriyal doku örnekleri ile aynı yaş aralığındaki sağlıklı fertil bireylerin endometriyal doku örnekleri karşılaştırılarak yapılan mikrodizilim analizi sonucunda [115], hem transkriptom hem de proteom analizinde anlatımı anlamlı şekilde değiştiği (Tablo 3.1) tespit edilen, "*Membrane Metalloendopeptidase*" (MME), "*WW And C2 Domain Containing 1*" (WWC1) ve "*Tenascin C*" (TNC) genleri hedef genler olarak seçilmiştir.

Tablo 3. 1: Hedef genlerin belirlenmesinde kullanılan mikrodizilim analizi sonuçları

Gen	logFC RNA	logFC Proteom	İlgili Yolaklar
MME	1.306951806	1.014046729	Renin-Anjiyotensin Sistem
TNC	-1.050784463	-0.930413465	Fokal Adezyon
WWC1	1.297250315	1.666045211	Hippo Sinyal Yolağı

Anlatım farklılığı saptanan bu üç genin ve ilgili yolaklarının belirlenmesinde PANOGA ve KEGG veritabanları kullanılmıştır.

PANOGA, araştırılan genlerin birbirleriyle ve farklı gen kümeleri ile olan ilişkilerini belirlemek için kullanılan bir veritabanıdır. PANOGA kullanılarak erişilen zengin etkileşim bilgisi ile önceden belirlenmiş mekanizmalara ek olarak yeni mekanizmalar belirlenebilmesi amaçlanmıştır. Genlerin buldukları yolaklara dair bilgiler güvenilir bir veritabanı olan KEGG veritabanından elde edilmiştir.

3.2. HASTA SEÇİMİ VE ÖRNEK ELDESİ

Çalışma için İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 05.10.2018 tarihli ve 286582 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Araştırma başlangıcında şartlara uygun hastaların bilgilendirilmiş onam formu ve sorumlu doktor aracılığı ile bilgilendirilmesi sağlanmıştır. Bilgilendirme sonucunda onamı alınan hastaların bilgileri hasta takip formuna kaydedildikten sonra endometriyal örnekleme yapılmıştır. Endometriyal biyopsi örnekleri,

menstrual döngünün 21. gününde elde edilmiştir. Hastaların post-ovuleter olduğu serum progesteron ölçümü ile saptanmıştır (>20ng/ml). Elde edilen örnekler analiz gününe kadar -80°C’de saklanmıştır.

Çalışma grupları fertil hastalar (kontrol grubu) ve IVF sonrası tekrarlayan implantasyon başarısızlığı yaşayan hastalar (çalışma grubu) olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Kontrol grubu 40 yaşından genç, en az bir normal canlı doğum geçirmiş 34 hastadan oluşmaktadır. Kontrol grubunun dışlama kriterleri:

- ✓ Halihazırda oral kontraseptif kullanımı,
- ✓ Halihazırda rahimiçi kontraseptif araç kullanımı,
- ✓ Tıbbi geçmişinde infertilite öyküsü yer alması şeklindedir.

Çalışma grubu 40 yaşından genç, IVF tedavisi gören 34 hastadan oluşmaktadır. Çalışma grubunun içerme kriterleri:

- ✓ IVF tedavisi sonrası yüksek kalite embriyo transfer edilmiş en az üç defa embriyo transferin başarısızlık yaşanması,
- ✓ Normal hormon rezervine sahip olması (FSH<8 mIU/mL),
- ✓ Hormon stimülasyonuna iyi cevap vermesi (>8 oosit toplanması),
- ✓ Ofis histeroskopi ile saptanmış normal uterin kavitesine ve endometriyal kalınlığa sahip olması şeklindedir.

Çalışma süresince bu gruptaki hastaların hormon tedavisi kullanmamaları istenmiştir.

3.3. ENDOMETRİYAL DOKUDAN TOTAL RNA İZOLASYONU

Endometriyal dokudan total RNA izolasyonu için “*PureLink RNA Mini Kit*” kullanılmıştır. Kitin önerilen prosedürü takip edilmiştir;

1. Her bir örnek için 1 ml “*Lysis Buffer’a*” 10 µl β-merkaptotanol eklenerek “*Buffer*” hazırlanır ve 1 dakika bekletilip vorteks yapılır.
2. Endometriyal doku daha önceden -20°C’de bekletilmiş havanda sıvı azot ile ezilir. Tüm aşamalar sırasında örnekler buzda bekletilir. Ezilen örnekler 2 ml’lik ependorflara transfer edilir. Tüplere koyulan örneklerin miktarı 30-60 mg arasında olmalıdır.

3. Örnek miktarına göre “*Lysis Buffer*” eklenir. Eklenecek “*Lysis Buffer*” miktarı Tablo 3.1’deki gibi belirlenir.

Tablo 3. 2: Örnek miktarlarına göre eklenecek “*Lysis Buffer*” miktarları.

Örnek Miktarı	“ <i>Lysis Buffer</i> ” Miktarı
<20 mg	350 µl
20-40 mg	600 µl
40-60 mg	800 µl
>60 mg	1000 µl

4. 2600g’de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant başka bir 2 ml’lik ependorf tüpe aktarılır.
5. Süpernatant hacmi kadar %70’lik etanol eklenir ve vorteks yapılır.
6. 700 µl örnek kitin içinde bulunan “*Spin Cartridge*” tüpe eklenir ve 12.000 g’de 15 saniye santrifüj edilir. Santrifüjün ardından “*collection*” tüpte kalan sıvı atılır.
7. 5. ve 6. basamaktaki aşamalar 2 ml’lik ependorftaki örnekler bitene kadar tekrarlanır.
8. “*Spin Cartridge*” tüpe 700 µl “*Wash Buffer 1*” eklenerek 12.000 g’de 15 saniye santrifüj edilir. “*Spin Cartridge*” tüpteki filtre yeni bir “*collection*” tüpe aktarılır.
9. “*Collection*” tüpe 500 µl “*Wash Buffer 2*” eklenerek 12.000 g’de 15 saniye santrifüj edilir. “*collection*” tüpte kalan sıvı atılır.
10. “*Collection*” tüpe 500 µl “*Wash Buffer 2*” eklenir. 12.000 g’de 15 saniye santrifüj edilir ve “*collection*” tüpte kalan sıvı atılır.
11. 12.000 g’de 1 dakika santrifüj edilir. Filtrenin içinde olduğu “*collection*” tüp atılır ve filtre “*Spin Cartridge Recovery*” tüpe aktarılır.
12. 30 µl “*RNase Free Water*” filtrenin ortasına gelecek şekilde eklenir. Oda sıcaklığında 5 dakika beklenir.
13. 12.000 g’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra filtre atılır.
14. “*Nanodrop*” cihazında örneklerin kalitesini kontrol etmek için 1-2 µl örnek ayırılır. Geri kalan örnekler bir sonraki aşamaya kadar -80°C’de saklanır.

3.4. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN KALİTE KONTROLÜ

Endometriyum dokusundan elde edilen total RNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümleri "Nanodrop" cihazında yapılmıştır. Ölçüm için her örnekten 1,5 µl alınmıştır. Her bir örnek için A260/A280, A230/A280 ve konsantrasyon değerleri kaydedilmiştir.

3.5. CDNA SENTEZİ

İzole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi "*iScript cDNA Synthesis Kit*" kullanılarak yapılmıştır. Bir reaksiyon için gerekli bileşen miktarları Tablo 3.2'de gösterilmiştir. cDNA sentezi için kitin önerdiği termal döngü kullanılmıştır ve Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. 3: "*iScript cDNA Synthesis Kit*" ile bir cDNA sentez reaksiyonu için gerekli bileşen miktarları.

Bileşen	Bir Reaksiyon için Gerekli Miktar
5x " <i>iScript Reaction Mix</i> "	4 µl
" <i>iScript Reverse Transcriptase</i> "	1 µl
Örnek (1µg total RNA olacak şekilde)	Örnek miktarına göre değişkenlik gösterir.
" <i>Nuclease-free water</i> "	Örnek miktarına göre değişkenlik gösterir.
Toplam hacim	20 µl

Tablo 3. 4: cDNA sentezi için kullanılan termal döngü.

Aşama	Süre	Sıcaklık
" <i>Priming</i> "	5 dakika	25°C
" <i>Reverse Transcription</i> "	20 dakika	46°C
" <i>RT Inactivation</i> "	1 dakika	95°C
" <i>Optional Step</i> "	Bekleme	4°C

3.6. DAMLACIKLI DİJİTAL PZR UYGULAMASI

Anlatım analizi için "*Bio-Rad*" firmasının "*Droplet Digital PCR*" cihazı kullanılmıştır. Başlamadan önce örnekler RNA konsantrasyonları 1 ng olacak şekilde sulandırılmıştır. Genlere ait primer dizileri Tablo 3.4'te verilmiştir. Damlacıklı dijital PZR uygulaması için cihaza ait aşağıdaki prosedür takip edilmiştir;

Tablo 3. 5: Genlere ait primer dizileri, primerlerin Tm dereceleri ve ürün boyutları.

Genin Adı	Oligonükleotid Dizisi (5'-3')	Tm Derecesi (°C)	Ürün Boyutu (bp)
MME	f: AGGTGATGGGCAAGTCAGAA	60.7	158
	r: GGTTGCATAGAGTGCGATCA	59.8	
WWC1	f: CTCGCTGGACCTGGAGTTAG	60.0	151
	r: GTCCTCACGCAACCACTGT	59.7	
TNC	f: GATGAAGGGGTCTTCGACAA	60.0	168
	r: TCGCCTTCCTTTGCTTATTC	59.4	
GAPDH	f: AGGGCTGCTTTAACTCTGGT	61.5	235
	r: CCCCACTTGATTTTGAGGGA	66.1	

- Her primer için gerekli bileşenler Tablo 3.5'teki miktarlarda karıştırılarak "mix" elde edilir.

Tablo 3. 6: Damlacıklı dijital PZR uygulamasında kullanılacak her bir primer için hazırlanan "mix" için gerekli bileşenlerin miktarları.

Bileşen	Bir Reaksiyon için Gerekli Miktar
"Eva Green Supermix"	10 µl
"Forward Primer"	1,6 µl
"Reverse Primer"	0,8 µl
cDNA örneği	2,5 µl
"Nuclease-free water"	5,1 µl
Toplam	20 µl

- Oluşturulan "mix" 8'li strip tüplere dağıtılır. Tüplere konsantrasyonları önceden Ing'a ayarlanmış olan cDNA örnekleri eklenir. Kullanılan her primer için cDNA örneği yerine "Nuclease-free Water" eklenerek NTC ("No Template Control")'ler hazırlanır.
- Stripler 2000 g'de 2 dakika plate santrifüjünde santrifüj edilir. Köpük kalmamasına dikkat edilir.
- 8 kanallı pipet kullanılarak striplerdeki örnekler "DG8 Cartridge"deki "sample" kuyucuklarına yüklenir.
- "DG8 Cartridge"deki "oil" kuyucuklarına "Droplet Generator Oil"den 70 µl yüklenir.

6. “DG8 Cartridge”, “QX200 Droplet Generator” cihazına yüklenir. Cihaz “droplet”leri oluşturur.
7. “DG8 Cartridge”deki “droplet” kuyucuğundan 40 µl “droplet” alınarak 96’lı “plate”e aktarılır.
8. Bu aşamalar tüm örnekler için tekrarlandıktan sonra “plate”in üstü folyo ile “Bio-Rad’s PX1PCR Plate Sealer” cihazında 180°C’de kapatılır.
9. PZR aşamasına geçilir. “EvaGreen Supermix” prosedüründe belirtilen termal döngü Tablo 3.5.’te gösterilmiştir.

Tablo 3. 7: “EvaGreen Supermix” prosedürüne ait termal döngü.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Enzim aktivasyonu	95	5 Dakika	1
Denatürasyon	95	30 Saniye	40
Bağlanma/Uzama	60	1 Dakika	40
Sinyal Stabilizasyonu	4	5 Dakika	1
	90	5 Dakika	1
Bekleme (opsiyonel)	4	Sonsuz	1

10. “QuantaSoft” yazılımı kullanılarak kuyucuklardaki örneklerin özellikleri ve boyanma yöntemleri bilgisayara girilir.
11. PZR sonrası “plate” “QX100 Droplet Reader” cihazına aktarılır. Cihazın kuyucuklardaki pozitif ve negatif “droplet”leri okumasının ardından sonuçlar analiz edilir.

3.7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sonuçlar değerlendirilirken ddPZR uygulaması sonrasında bulunan anlatım değerleri normalize edilmiştir. Normalize edilirken her örnek için çalışılan gendeki anlatım değeri, aynı örneğin GAPDH geninin anlatım değerine bölünmüştür.

Normalizasyon sonrası elde edilen sonuçların hassasiyet ve doğruluğunun kanıtlanması için “Graphpad Prism 8.3.0” biyoistatistiksel veritabanı kullanılmıştır. ddPZR sonuçları parametrik olmayan “Mann Whitney Test” ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ve ROC “Receiver Operating Characteristics” eğrileri oluşturulmuştur.

ROC eğrisi grafikleri yapılan analizlerin duyarlılıklarını ve seçiciliklerini ölçmek için kullanılan bir analiz yöntemidir. ROC eğrisi altında kalan alan (AUC, “*Area Under the Curve*”) yapılan analizlerin duyarlılığını ve özgüllüğünü belirlemek için kullanılır. AUC değeri 0,5 ile 1 arasında bir değer alır ve 1’e ne kadar yakın olursa sonuçların doğruluğunun o kadar yüksek olduğu anlamına gelir.

Genlerin ait olduğu yolların belirlenmesi için PANOGA ve KEGG veritabanları kullanılmıştır. Hedef genler KEGG veritabanında araştırılarak, bu genlerin bulunduğu TIB ile ilişkili olabilecek metabolik yollar belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1.KULLANILAN ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ

Çalışmada kullanılan örneklere ait yaş, doğum sayısı ile 3. Gündeki FSH, E2, prolaktin ve TSH hormon seviyeleri Tablo 4.1’de belirtilmiştir.

Tablo 4. 1: Çalışmada kullanılan örneklere ait yaş, doğum sayısı ve 3. Gündeki hormon seviyesi (mIU/mL) değerleri.

	Fertil Kontroller (n=34)	TİB Hastaları (n=34)
Yaş	31.06 ± 3.72	32.52 ± 2.84
Doğum Sayısı	1.77 + 0.45	Yok
FSH	7.48 ± 1.60	6.68 ± 2.53
E2	50.62 ± 27.07	45.60 ± 19.92
Prolaktin	17.67 ± 6.07	11.63 ± 3.92
TSH	2.17 ± 1.11	2.18 ± 0.85

4.2. ÖRNEKLERİN KALİTE KONTROLÜ

TİB hastalarına ve kontrol grubuna ait total RNA “*Nanodrop*” ölçüm sonuçları sırasıyla Tablo 4.2’de ve Tablo 4.3’te belirtilmiştir.

Tablo 4. 2: TİB hastalarına ait total RNA “*Nanodrop*” ölçüm sonuçları ve A260/A280 ile A260/A230 değerleri.

Hasta Grubu	Konsantrasyon (ng/µl)	A260/A280	A260/A230
H1	966,4	2,06	2,18
H2	1110,2	2,06	2,01
H3	643	2,02	2,17
H4	389,9	2,07	2,15
H5	258,3	2,11	0,63
H6	89,8	2,05	0,21
H7	223,4	2,09	2,07
H8	778,9	2,07	2,11
H9	162,1	2,07	2,11
H10	293,9	2,06	2,04
H11	89,1	2,05	1,47
H12	569,3	2,02	2,08
H13	427,5	2,06	2,08
H14	891,8	2,1	2,22
H15	1002,5	2,1	2,2
H16	1299,4	2,09	2,19
H17	204,7	2,07	2,1
H18	1031,1	2,08	2,19
H19	254,3	2,08	1,84
H20	524,1	2,12	1,21
H21	1732,2	2,08	2,15
H22	1436,3	2,08	2,2
H23	202,7	2,08	1,87
H24	524,7	2,03	1,2
H25	225,8	2,04	1,45
H26	359,5	2,06	1,32
H27	22,9	1,96	1,47
H28	899,2	2,14	1,89
H29	404,4	2,11	1,94
H30	141,4	2,02	1,8
H31	869,9	2,13	1,89
H32	338,7	2,1	1,79
H33	364,9	2,08	1,24
H34	640,9	2,12	2,06

Tablo 4. 3: Kontrol örneklerine ait total RNA “*Nanodrop*” ölçüm sonuçları ve A260/A280 ile A260/A230 değerleri.

Kontrol Grubu	Konsantrasyon (ng/µl)	A260/A280	A260/A230
K1	185,7	2,08	1,71
K2	208,2	2,08	1,62
K3	277,5	2,08	1,78
K4	527	2,04	2
K5	436,7	2,05	2,14
K6	610,7	2,07	2,2
K7	670,6	2,08	2,18
K8	422	2,07	1,81
K9	964	2,08	2,15
K10	936,4	2,05	2,19
K11	430,1	2,05	2,08
K12	606,6	2,1	0,97
K13	391,7	2,06	2,21
K14	642,7	2,1	2,12
K15	315,1	2,08	2,05
K16	220,3	2,07	2,07
K17	292,4	2,09	1,2
K18	779	2,12	1,95
K19	704,4	2,1	1,95
K20	373	2,07	2,21
K21	411,6	2,06	2,11
K22	899,7	2,1	2,09
K23	193,3	2,06	2,02
K24	680,8	2,11	2,14
K25	522,3	2,04	1,9
K26	982,6	2,09	2,18
K27	70,3	2,02	1,86
K28	445,4	2,07	1,75
K29	703,9	2,08	2,07
K30	99,1	2,03	1,63
K31	501,2	2,08	2,05
K32	661,3	2,1	1,72
K33	196,9	2,09	1,35
K34	539,1	2,07	1,99

4.3. SONUÇLARIN NORMALİZASYONU

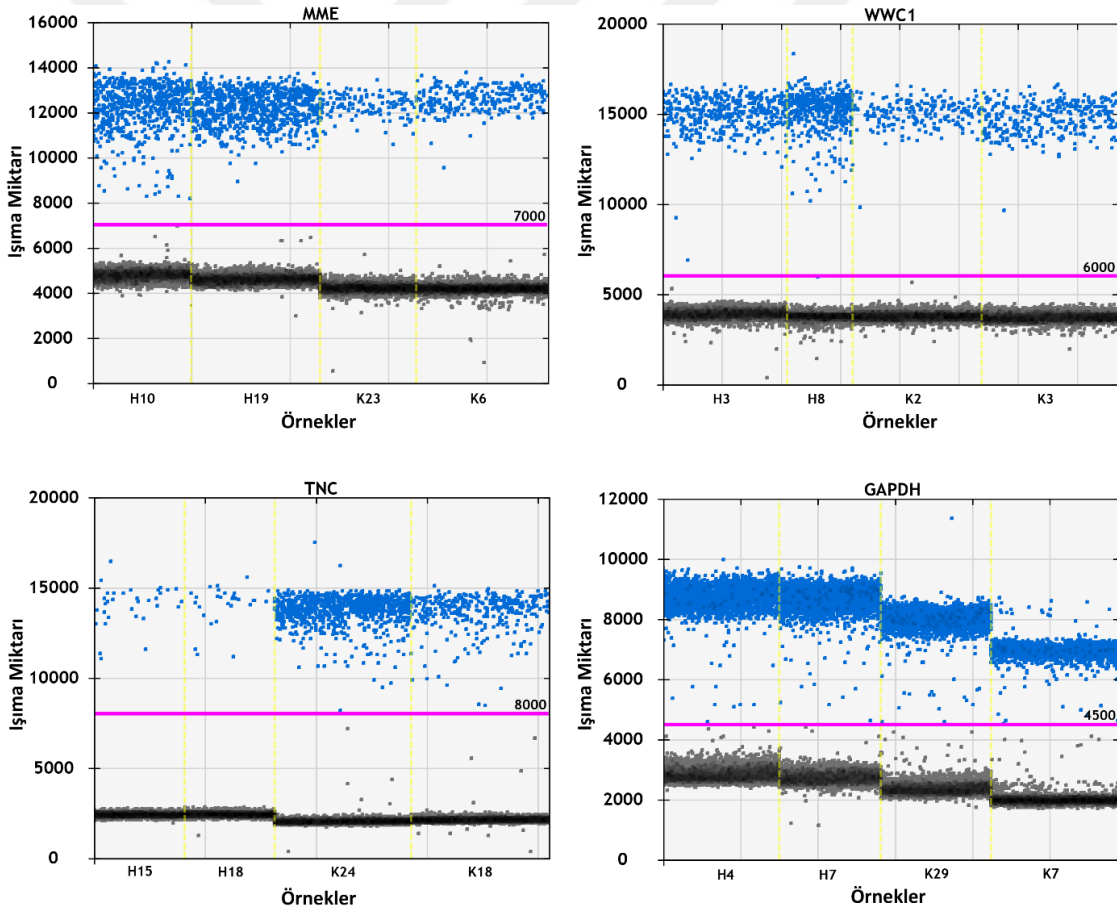
ddPZR sonrası TNC, MME ve WWC1 genleri için normalize edilmiş anlatım değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4. 4: TNC, MME ve WWC1 genlerine ait normalize edilmiş anlatım değerleri.

TNC		MME		WWC1	
<i>Kontrol</i>	<i>Hasta</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Hasta</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Hasta</i>
0,042814	0,023996	0,129785	0,053266	0,225023	0,035578
0,007289	0,009302	0,164729	1,113811	0,098191	0,07289
0,194286	0,07767	0,098853	0,047022	0,032657	0,098746
0,028806	0,001187	0,065313	0,159251	0,001348	0,04918
0,011208	0,007789	0,013078	0,166276	0,050348	0,044308
6,428571	0,104403	0,028373	0,012596	0,016981	0,004336
0,036641	0,000524	0,021509	0,007634	0,051493	0,08626
0,009005	0,005261	0,012325	0,076613	0,019231	0,100806
0,006861	0,067582	0,098134	0,085763	0,01544	0,039623
0,00928	0,001315	0,034121	0,089099	0,000677	0,042882
0,838	0,010987	0,074355	0,993158	0,065471	0,035849
0,010604	0,04232	0,123565	1,464804	0,023523	0,048917
0,005922	0,010894	0,860365	0,007692	0,028073	0,029944
0,071795	0,028824	0,067039	0,021648	0,065882	0,037949
0,103906	0,008629	0,054176	1,294056	0,08151	0,034063
1,563281	0,376601	0,046598	0,118962	0,315969	0,065385
0,006002	0,149444	0,001574	0,57346	0,359522	0,063506
1,232227	0,001435	0,001293	0,678065	0,031955	1,374408
0,905213	0,009236	0,130458	0,212291	0,001574	0,595784
0,522581	0,070423	0,05	0,001037	0,002063	3,935484
0,189944	0,022941	0,046519	1,046667	0,002939	0,878065
0,055274	0,025316	0,256983	0,319697	0,072359	0,22905
0,006496	0,014525	0,18352	0,048148	0,068662	0,03369
0,005556	0,103134	0,222134	0,183727	0,087647	0,108667
0,272727	0,089936	0,162955	1,989011	0,064176	0,454545
0,005882	0,03895	0,172867	2,946058	0,085653	0,039434
0,839895	0,036364	0,12987	0,095492	0,048796	0,839895
1,208791	0,002075	0,011068	2,343284	0,044156	1,538462
0,103734	0,076101	0,018239	0,085965	0,00538	0,091286
0,005328	0,077291	0,021912	0,03966	0,054717	0,064344
0,283582	0,004068	0,042559	0,016997	0,03506	1,089552
0,044737	0,120231	0,07341	0,111041	0,044068	0,037719
0,057507	0,023438	0,192188	0,141325	0,1	0,039093
0,008076	0,014722	0,153125	2,003282	0,121875	0,068139
0,024945	0			0,0477	0,042779

4.4. MRNA ANLATIM ANALİZİ

ddPZR uygulamasının ardından “*QuantaSoft*” yazılımı ile her örnek için mikrolitredeki konsantrasyon değeri ile Şekil 4.1’de örnek olarak 20 tanesi gösterilen damlacık grafikleri elde edilmiştir. Elde edilen verilerin doğruluğuna grafiklerin yorumlanması sonucu karar verilmiştir. Grafiklerde görülen mavi renkli noktalar pozitif damlacıkları belirtmektedir ve floresan ışınım miktarları 10000 ile 20000 arasında olmalıdır. Gri noktalar negatif damlacıkları belirtmektedir ve floresan ışınım miktarları 5000 değerine yakın olmalıdır. Sonuçların güvenilir olarak değerlendirilebilmesi için mavi ve gri noktalar arası yeterince ayrılmış olmalıdır; iki nokta kümesini ayıran çizgi pembe ile gösterilmiştir ve cihaz tarafından otomatik olarak ayarlanabildiği gibi manuel olarak da ayarlanabilmektedir.



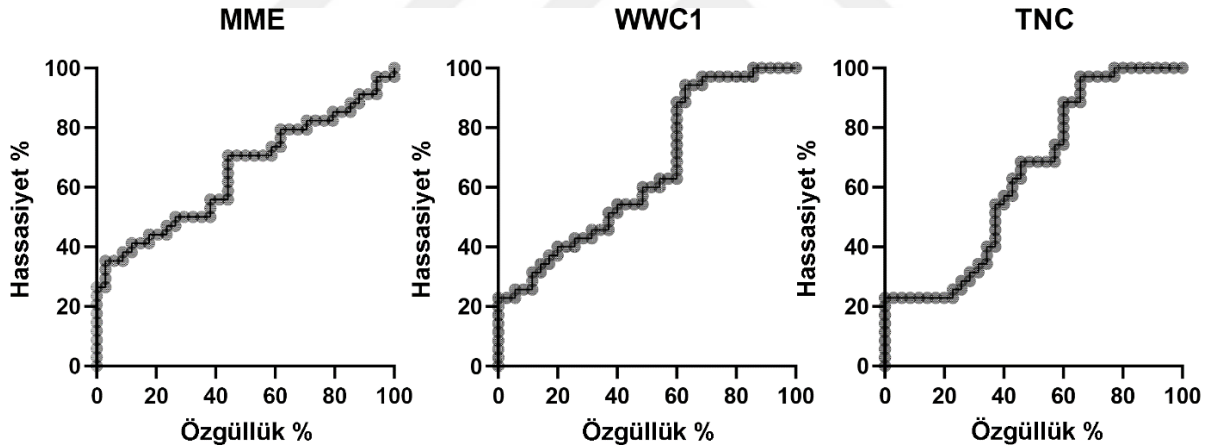
Şekil 4. 1: İki TİB hastası ve iki kontrol örneğine ait ddPZR amplifikasyon grafikleri. Her grafik, dört örnekte analiz edilen dört hedef genin amplifikasyonunu göstermektedir. X ekseninde örnekler, Y ekseninde ışınım miktarını değerleri yer almaktadır. Mavi noktalar pozitif damlacıkları, gri noktalar negatif damlacıkları temsil eder. Pembe çizgi pozitif ve negatif damlacıkların sınırlarını belirler.

ddPZR analizi sonucu elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirildiği “Mann Whitney Test” ve ROC analizi sonuçları Tablo 4.5’te gösterilmiştir.

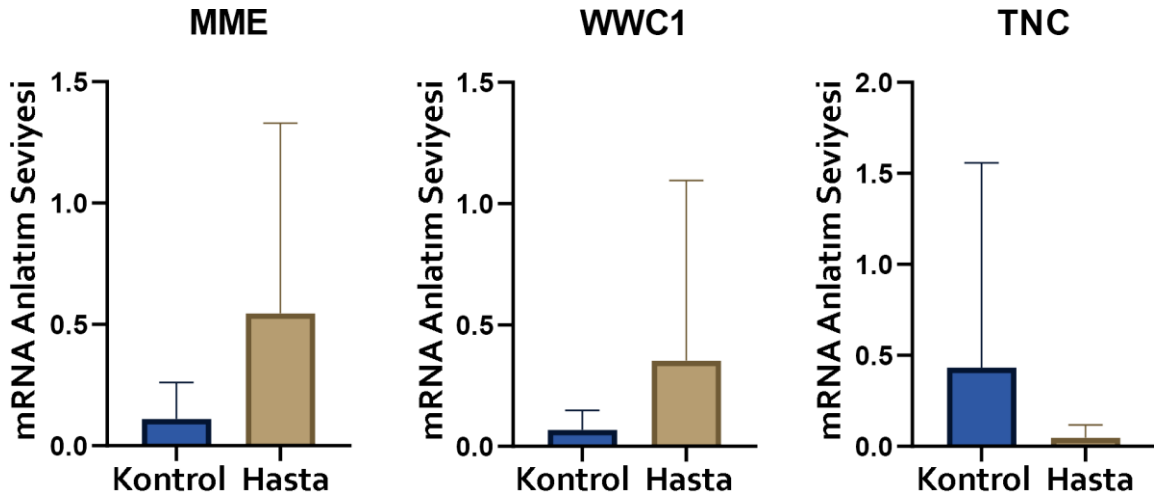
Tablo 4. 5: Endometriyal doku örneklerinde ddPZR ile yapılan mRNA anlatım analizlerinin istatistiksel sonuçları.

Aday mRNA	"Mann Whitney Test"		ROC Analizi		
	p DEĞERİ	AUC	Standart Sapma	p Değeri	%95 Güven Aralığı
TNC	0,04	0,63	0,06	0,04	0,50-0,76
MME	0,03	0,65	0,06	0,03	0,51-0,78
WWC1	0,03	0,65	0,06	0,03	0,52-0,77

“Graphpad Prism version 8.3.0” analizi ile elde edilen ve ROC eğrileri Şekil 4.2’de, rölatif mRNA anlatım seviyeleri Şekil 4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4. 2: MME, WWC1 ve TNC genlerinin ROC eğrisi analizleri.



Şekil 4. 3: MME, WWC1 ve TNC genlerinin rölatif mRNA anlatım seviyeleri.

Hedef genlere ait anlatım değışim oranları ve genlerin buldukları yolaklar Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 6: Hedef genlerin buldukları yolaklar ve hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla genlerin anlatım miktarlarındaki değışim oranları.

Gen Adı	Anlatım Değişimi	Oran	İlgili Yolak
MME	Artmış	4.9	Renin-anjiyotensin Sistem
WWC1	Artmış	5.2	Hippo Sinyal Yolağı
TNC	Azalmış	-9.0	Fokal Adezyon Yolağı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Embriyo implantasyonu kadınların üreme sürecinde en önemli evrelerden biridir. İmplantasyonun başarısı için embriyo ve reseptif bir endometriyum arasında senkronize etkileşim çok önemlidir [8]. Bu senkronize etkileşim sadece belli bir zaman aralığında gerçekleştiğinde implantasyon oluşur. Düzenli adet döngüsünün 20-24. günlerini kapsayan bu zaman aralığı 1970'lerde implantasyon penceresi olarak adlandırılmıştır [9]. İmplantasyon blastosistin, maternal endometriyal yüzeye tutunup önce maternal epitele, ardından plasentayı oluşturmak için maternal dolaşım sistemine bağlanması sürecini ifade eder [19].

Endometriyumun reseptif olduğu dönemi belirlemek için klinisyenler uzun yıllardır Noyes ve arkadaşları [148] tarafından 1975'te tanımlanmış histolojik kriterleri kullanmaktadır. Bu kriterler overler tarafından salgılanan steroid hormonlarının etkisiyle endometriyumda oluşan histolojik değişiklikleri baz alırlar. Bunun yanında son yıllarda yapılan çalışmalar, histolojik zamanlama kriterlerinin fertil hastaları infertil hastalardan ayırmada zayıf bir belirteç olduğunu göstermiştir [149].

İmplantasyon başarısızlığı üreme tıbbının önündeki önemli engellerden biridir. İmplantasyon başarısızlığı sebebiyle diğer açılardan sağlıklı birçok hasta infertilite gerçeğiyle yüz yüze kalmaktadır [12]. Son yıllarda, in vitro fertilizasyon (IVF) tedavilerinde yaşanan tüm gelişmelere rağmen, IVF tedavisiyle oluşan embriyoların uterusu transferi sonrası sadece %20 oranda canlı doğum sağlanabilmektedir [13]. İmplantasyon başarısızlığına %33 oranında embriyonun kendisi neden olurken, %66 oranında yetersiz endometriyal reseptivite neden olmaktadır [14]. Bu sebeple yardımcı üreme tekniklerinde tekrarlayan implantasyon başarısızlığı yönetimi en zor alanlardan biridir.

TİB hastalarının endometriyal doku örnekleri ile aynı yaş aralığındaki sağlıklı fertil bireylerin endometriyal doku örnekleri karşılaştırılarak yapılan mikrodizilim analizi sonucunda [115] "*Membrane Metalloendopeptidase*" (MME), "*WW And C2 Domain Containing 1*" (WWC1) ve "*Tenascin C*" (TNC) genlerinin anlatımında anlamlı farklılık gösterilmiştir. Anlatım farklılığı saptanan bu üç gen PANOGA ve KEGG analizleri ile seçilerek bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.

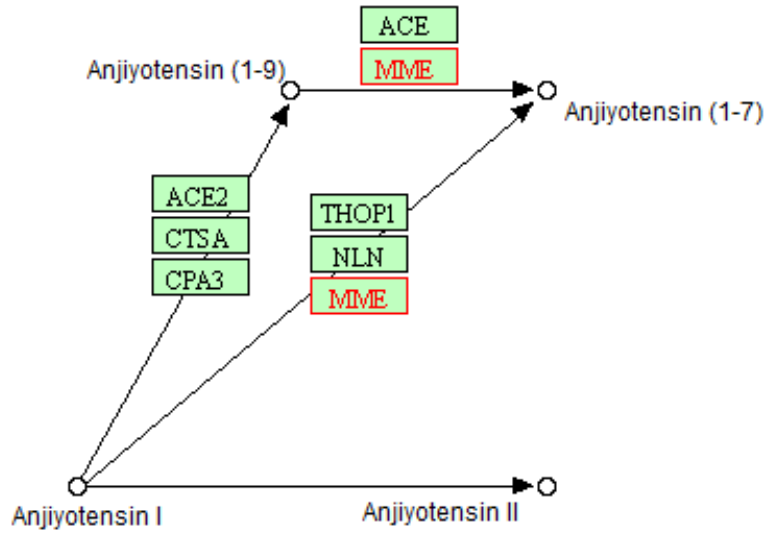
Tez kapsamında mikrodizilim analizi sonucu elde edilen MME, WWC1 ve TNC genlerinin ddPZR yöntemi ile validasyonu yapılmıştır. Mikrodizilim analizi ile benzer olarak, TİB hastalarına ait örneklerde kontrol grubuna kıyasla MME gen anlatımının 4,9 kat arttığı ($p < 0,05$), WWC1 gen anlatımının 5,2 kat arttığı ($p < 0,05$) ve TNC gen anlatımının 9 kat azaldığı ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar “*Graphpad Prism 8.3.0*” programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık testleri parametrik olmayan “*Mann Whitney Test*”, duyarlılık ve spesifiklik testleri ROC (“*Receiver Operating Characteristics*”) analizi ile yapılmıştır.

TİB ile ilişkili olabileceği düşünülen MME, WWC1 ve TNC genlerinin PANOĞA ve KEGG analizleri sonucunda etkili oldukları yollar belirlenmiştir. PANOĞA, araştırılan genlerin birbirleriyle ve farklı gen kümeleri ile olan ilişkilerini belirlemek için kullanılan bir veritabanıdır. PANOĞA kullanılarak erişilen zengin etkileşim bilgisi ile önceden belirlenmiş mekanizmalara ek olarak yeni mekanizmalar belirlenebilmesi amaçlanmıştır. Genlerin bulunduğu yolları araştırmak için güvenilir bir veritabanı olan KEGG analizi sonucunda MME geninin renin anjiyotensin sistem (RAS) yolağında, WWC1 geninin hippo sinyal yolağında ve TNC geninin fokal adezyon yolağında yer aldıkları tespit edilmiştir.

Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı 4,9 kat artan MME geninin KEGG yolağına göre etkili olduğu RAS; kan basıncını, sodyum ve sıvı homeostazını düzenleyen önemli bir yolağıdır. Embriyo implantasyonu sürecinde ve gebelikte RAS yolağında bulunan genlerinin anlatımında büyük değişiklikler meydana gelmektedir [150]. RAS bileşenleri olan anjiyotensinojen, renin, ACE (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim), Ang I, Ang II ve AT1 ve AT2 reseptörleri; plasenta, amniyotik sıvı, uterus (endometriyum ve miyometriyum) ve fetal membranlarda bulunur [129]. Ang II'nin lokal etkilerinin hamilelik sırasında embriyo implantasyonu ve uterus kan akışı kontrolünde doğrudan rol oynayabileceği gösterilmiştir [115,122].

MME gen anlatımı, Ang I anlatımı ile doğrudan ilişkilidir. MME gen anlatımının artması, Ang I gen anlatımının artmasının sonucudur. Ang I geni, aynı zamanda Ang II anlatımını düzenlemektedir (Şekil 5.1). Dolayısıyla, MME gen anlatımının artması, Ang II anlatımının da arttığını işaret etmektedir. Xia ve diğ. [150] artan Ang II gen anlatımının, insan trofoblast hücrelerinin invazyonunu kısıtladığını göstermişlerdir. İmplantasyon başarısızlığının sebebinin artan Ang II gen anlatımının trofoblast hücrelerinin invazyonunu kısıtlaması olması düşünülebilir.

Anjiyotensin (1-7) (Ang (1-7)), RAS sisteminin bir üyesidir ve MME geni Ang (1-7)'nin anlatımını doğrudan etkilemektedir. İlk trimesterde spontan olarak gerçekleşen düşük vakalarında yüksek Ang (1-7) seviyesi tespit edilmiştir. Bu durum Ang (1-7) düzeyinin anormal gelişimde rol oynayabileceğini düşündürmektedir [129]. Bu çalışmada, Ang (1-7) gen anlatımının arttıran MME gen anlatımının arttığı belirlenmiştir. Bu sebeple MME geninin anlatımının artmasının implantasyon başarısızlığına neden olmuş olduğu düşünülebilir. Çalışmalarında Baştu ve ark. RAS üyesi olan iki genin (MME ve AGT) anlatımının değiştiğini belirlemiştir [115]. Çalışmamızla benzer şekilde MME geninin anlatımının arttığını göstermişlerdir.



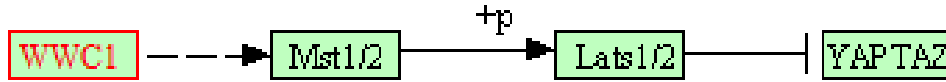
Şekil 5. 1: MME, Anjiyotensin I ve Anjiyotensin II'nin Renin Anjiyotensin Sistem yolağındaki ilişkisi.

Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı 5,2 kat artan WWC1 geninin etkili olduğu hippo sinyal yolağı, büyüme kontrolünde önemli rol oynayan yüksek oranda korunmuş bir sinyal yolağıdır [151]. Yapılan çalışmalarda hippo sinyal yolağında bulunan genlerin endometriyumda anlatım yaptığı ve anlatım profillerinin menstrual döngü boyunca değiştiği gösterilmiştir. Bu sebeple hippo sinyal yolağının endometriyal fizyolojinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir [152].

Literatürde hippo sinyal yolağının endometriyumdaki bazı süreçlerde yer aldığına dair kanıtlar vardır; ancak WWC1 geninin anlatımının implantasyon başarısızlığı ile ilişkisi hakkında bir

çalışma yoktur. Çalışmamızda WWC1 gen anlatımının TİB hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir.

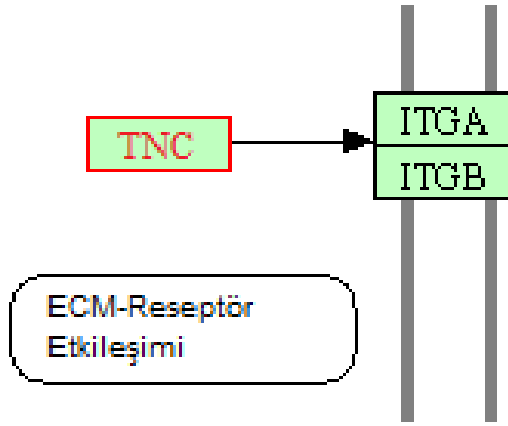
WWC1 geni hippo sinyal yolağında Mst1/2 anlatımını arttırmaktadır. Mst 1/2'nin fosforilleyerek aktive ettiği Lats 1/2 ise transkripsiyonel kofaktörler olan “*Yes-associated protein 1*” (YAP) ve “*WW-domain-containing transcription regulator 1*” (TAZ)’ı inhibe etmektedir (Şekil 5.2). YAP proteininin endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonunu düzenlediği gösterilmiştir [153]. Artan WWC1 gen anlatımı sebebi ile inhibe edilen YAP proteini anlatımının, endometriyal desidualizasyonun gerçekleşmemesine neden olarak implantasyon sürecinin başarısız olmasına neden olduğu düşünülebilir.



Şekil 5. 2: WWC1, Mst1/2, Lats1/2 ve YAP/TAZ’ın Hippo Sinyal Yolağındaki ilişkisi.

Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı 9 kat azalan TNC geninin etkili olduğu fokal adezyon yolağı, hücre içi aktin filamentleri ile hücre dışı matriks arasındaki bağlantıyı sağlar ve hücreleri altta yatan bağ dokusuna sabitlemede önemli bir rol oynar [154,155].

Uterus hücreleri, blastosistin implantasyonuna izin vermek için apoptoza uğrayabilmektedir. Reseptif faz sırasında fokal adezyonun moleküler süreçlerinin, uterus hücrelerinin bu özelliği ile yakından ilişkili olabileceği düşünülmektedir [156]. Literatürde başarılı bir embriyonik implantasyon için fokal adezyon yolağının önemli olduğunu kanıtlayan çok sayıda çalışma bulunmaktadır [156–158]. Fokal adezyon yolağında yer alan İntegrin B’nin embriyo implantasyonu sırasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir [159,160]. TNC geni proteini, İntegrin B reseptörü ile doğrudan etkileşime girerek fokal adezyon yolağının anlatımını düzenlemektedir (Şekil 5.3). Bu sebeple TNC geninin anlatımındaki azalmanın, fokal adezyon yolağındaki genlerin anlatımında düzensizliğe sebep olarak embriyo implantasyonunun başarısızlığına neden olabileceği düşünülebilir. TNC gen anlatımının implantasyon öncesi dönemde değiştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [120,121]. Bu değişimin sebebinin embriyonun endometriyuma yapışmasını kolaylaştırmak için endometriyal yüzeydeki hücre adezyonunu azaltmak olduğu düşünülmektedir [122,123].



Şekil 5. 3: TNC geninin İntegrin B (ITGB) anlatımını etkileyerek Fokal Adezyon Yolağını düzenlemesi.

Noda ve diğ. fareler üzerinde yaptıkları endometriyal gen anlatım analizinde, TNC gen anlatımının endometriyumda gebelik öncesinde arttığını göstermişlerdir [123]. Çalışmamız sonucu tespit edilen TİB hastalarında TNC gen anlatımındaki azalma, endometriyumun implantasyon sürecine hazırlanamamasına ve bu sebeple implantasyonun başarısız olmasına neden olmuş olabilir. Embriyo implantasyonu için fokal adezyon yolağının önemi düşünüldüğünde, bu yolağın bir üyesi olan TNC geninin implantasyon süreci için önemli olduğu tahmin edilebilir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, TNC geninin bulunduğu yolağın kritik rolü göz önüne alındığında, TNC'nin anlatım seviyesindeki azalmanın TİB'in nedenlerinden biri olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamıza benzer olarak, Koler ve diğ. TİB hastalarında fokal adezyon yolağının anlatımının azaldığını tespit etmişlerdir [111].

Bu bulguları bir adım daha ileri götürmek için gelecekteki çalışmalar MME, WWC1 ve TNC genlerinin anlatım seviyelerindeki değişimi daha fazla hasta örneği kullanarak doğrulayabilir. Ayrıca bu genlere ait mRNA'ların anlatım seviyelerindeki değişim western blot analizleri, gen ve protein dizileme deneylerini içeren moleküler yöntemlerle de analiz edilebilir.

Endometriyal gen anlatım analizi çalışmaları, endometriyal reseptiviteye özgü biyobelirteçlerin tanımlanmasının gerekliliğinden dolayı önemlidir. Anlatım seviyeleri değişmiş genlerin tespit edilmesine ek olarak, bu genlerin içinde buldukları yolakların belirlenmesi, TİB'deki moleküler süreçlerin ortaya çıkarılması ve hastalığın altında yatan mekanizmaların anlaşılması için önemlidir. Sonuçlarımız TİB hastalarında MME, WWC1 ve TNC genlerinin anlatım seviyelerinde görülen anlamlı farklılığın TİB'in bir nedeni olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ovalle W. K., N.P.C. , 2009, Netter temel histoloji, *Güneş Tıp Kitabevi*, Güneş Tıp Kitabevleri
- [2] Ross, M. ve Pawlina, W. , 2016, Histology - Text and atlas, *Palme Yayıncılık*, 1002–1002
- [3] Robin R. Preston, T.E.W. , 2016, Fizyoloji, *Nobel Tıp Kitabevleri*, 442–4
- [4] Kierszenbaum, A.L. ve Tres, L.L. , 2012, Histology and cell biology : an introduction to pathology, *Elsevier Saunders*, Elsevier Saunders. 684
- [5] Sadler, T.W. , 2017, Langman Medikal Embriyoloji, *Palme Yayıncılık*, 45–7
- [6] Aplin, J.D. , 2000, The cell biological basis of human implantation, *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology*, Bailliere Tindall Ltd. 14, 757–64
- [7] Denker, H.-W. , 1993, Implantation: A cell biological paradox, *Journal of Experimental Zoology*, 266, 541–58
- [8] Simón, C., Martín, J.C. ve Pellicer, A. , 2000, Paracrine regulators of implantation, *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 14, 815–26
- [9] Psychoyos, A. , 1973, Hormonal control of ovoid implantation, *Vitamins and hormones*, 31, 201–56
- [10] Simon, A. ve Laufer, N. , 2012, Repeated implantation failure: Clinical approach, *Fertility and Sterility*, 97, 1039–43
- [11] Timeva, T., Shterev, A. ve Kyurkchiev, S. , 2014, Recurrent implantation failure: The role of the endometrium, *Journal of Reproduction and Infertility*, 15, 173–183
- [12] Margalioth, E.J., Ben-Chetrit, A., Gal, M. ve Eldar-Geva, T. , 2006, Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET, *Human Reproduction*, Oxford University Press. 21, 3036–43
- [13] Stern, J.E., Cedars, M.I., Jain, T., Klein, N.A., Beaird, C.M., Grainger, D.A. ve Gibbons, W.E. , 2007, Assisted reproductive technology practice patterns and the impact of embryo transfer guidelines in the United States, *Fertility and Sterility*, 88, 275–82
- [14] Ledee-Bataille, N. , 2002, Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation, *Human Reproduction*, Oxford University Press (OUP). 17, 213–8
- [15] Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S. ve Colston, B.W. , 2011, High-throughput droplet digital PCR system for

- absolute quantitation of DNA copy number, *Analytical Chemistry*, 83, 8604–10
- [16] Wiencke, J.K., Bracci, P.M., Hsuang, G., Zheng, S., Hansen, H., Wrensch, M.R., Rice, T., Eliot, M. ve Kelsey, K.T. , 2014, A comparison of DNA methylation specific droplet digital PCR (ddPCR) and real time qPCR with flow cytometry in characterizing human T cells in peripheral blood, *Epigenetics*, Landes Bioscience. 9, 1360–5
- [17] Jahn, M., Vorpahl, C., Türkowsky, D., Lindmeyer, M., Bühler, B., Harms, H. ve Müller, S. , 2014, Accurate determination of plasmid copy number of flow-sorted cells using droplet digital PCR, *Analytical Chemistry*, American Chemical Society. 86, 5969–76
- [18] McCluggage, W.G. , 2011, Benign Diseases of the Endometrium, *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, Springer US. 305–58
- [19] Rosai, J. , 2011, Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, *Elsevier*, 2, 1477–540
- [20] Enders, A.C. ve Nelson, D.M. , 1973, Pinocytotic activity of the uterus of the rat, *American Journal of Anatomy*, 138, 277–99
- [21] Simón, C., Martín, J.C. ve Pellicer, A. , 2000, Paracrine regulators of implantation, *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology*, Bailliere Tindall Ltd. 14, 815–26
- [22] Fatemi, H.M. ve Popovic-Todorovic, B. , 2013, Implantation in assisted reproduction: A look at endometrial receptivity, *Reproductive BioMedicine Online*, 27, 530–8
- [23] Paria, B.C., Reese, J., Das, S.K. ve Dey, S.K. , 2002, Deciphering the cross-talk of implantation: Advances and challenges, *Science*, 296, 2185–8
- [24] Navot, D., Scott, R.T., Drosch, K., Veeck, L.L., Liu, H.C. ve Rosenwaks, Z. , 1991, The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro, *Fertility and Sterility*, 55, 114–8
- [25] Bergh, P.A. ve Navot, D. , 1992, The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation, *Fertility and Sterility*, 58, 537–42
- [26] Wilcox, A.J., Baird, D.D. ve Weinberg, C.R. , 1999, Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy, *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society. 340, 1796–9
- [27] Hertig, A.T., Rock, J. ve Adams, E.C. , 1956, A description of 34 human ova within the first 17 days of development, *American Journal of Anatomy*, 98, 435–93
- [28] Kliman, H.J., Feinberg, R.F. ve Haimowitz, J.E. , 1990, Human trophoblast-endometrial interactions in an in vitro suspension culture system, *Placenta*, 11, 349–67
- [29] Kliman, H.J. ve Frankfurter, D. , 2019, Clinical approach to recurrent implantation failure: evidence-based evaluation of the endometrium, *Fertility and Sterility*, Elsevier Inc. 111, 618–28
- [30] Somigliana, E., Vigano, P., Busnelli, A., Paffoni, A., Vegetti, W. ve Vercellini, P. , 2018, Repeated implantation failure at the crossroad between statistics, clinics and over-diagnosis, *Reproductive BioMedicine Online*, Elsevier Ltd. 36, 32–8
- [31] Wang, H. ve Dey, S.K. , 2006, Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models, *Nature Reviews Genetics*, 7, 185–99

- [32] Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F. ve Abbondanzo, S.J. , 1992, Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor, *Nature*, 359, 76–9
- [33] Carver, J., Martin, K., Spyropoulou, I., Barlow, D., Sargent, I. ve Mardon, H. , 2003, An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst, *Human Reproduction*, Oxford University Press. 18, 283–90
- [34] Teklenburg, G. ve Macklon, N.S. , 2009, Review: In Vitro Models for the Study of Early Human Embryo-Endometrium Interactions, *Reproductive Sciences*, 16, 811–8
- [35] Koot, Y.E.M., Teklenburg, G., Salker, M.S., Brosens, J.J. ve Macklon, N.S. , 2012, Molecular aspects of implantation failure, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*,
- [36] Wang, L.Y., Wang, D.H., Zou, X.Y. ve Xu, C.M. , 2009, Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos, *Journal of Zhejiang University: Science B*, 10, 483–92
- [37] Baart, E.B., Martini, E., Eijkemans, M.J., Van Opstal, D., Beckers, N.G.M., Verhoeff, A., Macklon, N.S. ve Fauser, B.C.J.M. , 2007, Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial, *Human Reproduction*, 22, 980–8
- [38] Collins, J. , 2009, Mild stimulation for in vitro fertilization: Making progress downward, *Human Reproduction Update*, 15, 1–3
- [39] Verberg, M.F.G., Eijkemans, M.J.C., Macklon, N.S., Heijnen, E.M.E.W., Baart, E.B., Hohmann, F.P., Fauser, B.C.J.M. ve Broekmans, F.J. , 2009, The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: A meta-analysis, *Human Reproduction Update*, 15, 5–12
- [40] Coughlan, C., Ledger, W., Wang, Q., Liu, F., Demirel, A., Gurgan, T., Cutting, R., Ong, K., Sallam, H. ve Li, T.C. , 2014, Recurrent implantation failure: Definition and management, *Reproductive BioMedicine Online*, Elsevier. 28, 14–38
- [41] Assou, S., Haouzi, D., De Vos, J. ve Hamamah, S. , 2010, Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes, *Molecular Human Reproduction*, 16, 531–8
- [42] Benkhalifa, M., Demirel, A., Sari, T., Balashova, E., Tsouroukaki, M., Giakoumakis, Y. ve Gurgan, T. , 2012, Autologous embryo-cumulus cells co-culture and blastocyst transfer in repeated implantation failures: A collaborative prospective randomized study, *Zygote*, 20, 173–80
- [43] Erenpreiss, J., Hlevicka, S., Zalkalns, J. ve Erenpreisa, J. , 2002, Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: A negative effect in abnormal semen samples, *Journal of Andrology*, 23, 717–23
- [44] Morris, I.D. , 2002, Sperm DNA damage and cancer treatment, *International Journal of Andrology*, 25, 255–61
- [45] Potts, R.J., Newbury, C.J., Smith, G., Notarianni, L.J. ve Jefferies, T.M. , 1999, Sperm chromatin damage associated with male smoking, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 423, 103–11

- [46] Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P.N., Pérez-Crespo, M., Sánchez-Martín, M., Ramirez, M.A., Pericuesta, E., Bilbao, A., Bermejo-Alvarez, P., Hourcade, J. de D., Fonseca, F.R. de ve Gutiérrez-Adán, A. , 2008, Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA-Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring1, *Biology of Reproduction*, 78, 761–72
- [47] Evenson, D.P. ve Wixon, R. , 2008, Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome, *Fertility and Sterility*, 90, 1229–31
- [48] Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J. ve Giwercman, A. , 2007, Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome, *Human Reproduction*, 22, 174–9
- [49] Duran, E.H. , 2002, Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study, *Human Reproduction*, Oxford University Press (OUP). 17, 3122–8
- [50] Muriel, L., Meseguer, M., Fernández, J.L., Alvarez, J., Remohí, J., Pellicer, A. ve Garrido, N. , 2006, Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study*, *Human Reproduction*, 21, 738–44
- [51] Collins, J.A., Barnhart, K.T. ve Schlegel, P.N. , 2008, Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?, *Fertility and Sterility*, 89, 823–31
- [52] Absalan, F., Ghannadi, A., Kazerooni, M., Parifar, R., Jamalzadeh, F. ve Amiri, S. , 2012, Value of sperm chromatin dispersion test in couples with unexplained recurrent abortion,. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29, 11–4
- [53] Brahem, S., Mehdi, M., Landolsi, H., Mougou, S., Elghezal, H. ve Saad, A. , 2011, Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss, *Urology*, 78, 792–6
- [54] Urman, B., Yakin, K. ve Balaban, B. , 2005, Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple, *Reproductive biomedicine online*, 11, 371–81
- [55] Gutiérrez-Mateo, C., Colls, P., Sánchez-García, J., Escudero, T., Prates, R., Ketterson, K., Wells, D. ve Munné, S. , 2011, Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos, *Fertility and Sterility*, 95, 953–8
- [56] Wilton, L. ve Harper, J. , 2002, Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: A review, *Prenatal Diagnosis*, 22, 512–8
- [57] Munné, S. , 2001, Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities, *Molecular and cellular endocrinology*, 183 Suppl 1, S55-8
- [58] Santos, M.A., Teklenburg, G., MacKlon, N.S., Van Opstal, D., Schuring-Blom, G.H., Krijtenburg, P.J., De Vreeden-Elbertse, J., Fauser, B.C. ve Baart, E.B. , 2010, The fate of the mosaic embryo: Chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos, *Human Reproduction*, Oxford University Press. 25, 1916–26
- [59] Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock,

- S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F., Fryns, J.P., Verbeke, G., D'Hooghe, T., Moreau, Y. ve Vermeesch, J.R. , 2009, Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos, *Nature Medicine*, 15, 577–83
- [60] Los, F.J., Van Opstal, D. ve van den Berg, C. , 2004, The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: A theoretical model, *Human Reproduction Update*, s. 79–94
- [61] Northrop, L.E., Treff, N.R., Levy, B. ve Scott, J.T. , 2010, SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts, *Molecular Human Reproduction*, 16, 590–600
- [62] Mantzouratou, A., Mania, A., Fragouli, E., Xanthopoulou, L., Tashkandi, S., Fordham, K., Ranieri, D.M., Doshi, A., Nuttall, S., Harper, J.C., Serhal, P. ve Delhanty, J.D.A. , 2007, Variable aneuploidy mechanisms in embryos from couples with poor reproductive histories undergoing preimplantation genetic screening, *Human Reproduction*, Oxford University Press. 22, 1844–53
- [63] Voullaire, L., Collins, V., Callaghan, T., McBain, J., Williamson, R. ve Wilton, L. , 2007, High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure, *Fertility and Sterility*, 87, 1053–8
- [64] Cohen, J., Elsner, C., Kort, H., Malter, H., Massey, J., Mayer, M.P. ve Wiemer, K. , 1990, Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation, *Human Reproduction*, Oxford University Press. 5, 7–13
- [65] Zhao, M. ve Dean, J. , 2002, The zona pellucida in folliculogenesis, fertilization and early development, *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 3, 19–26
- [66] Cole, R.J. , 1967, Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst, *Journal of embryology and experimental morphology*, 17, 481–90
- [67] DeMeestere, I., Barlow, P. ve Leroy, F. , Hardening of zona pellucida of mouse oocytes and embryos in vivo and in vitro, *International journal of fertility and women's medicine*, 42, 219–22
- [68] Carroll, J., Depypere, H. ve Matthews, C.D. , 1990, Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes, *Journal of Reproduction and Fertility*, 90, 547–53
- [69] Horcajadas, J.A., Mínguez, P., Dopazo, J., Esteban, F.J., Domínguez, F., Giudice, L.C., Pellicer, A. ve Simón, C. , 2008, Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Endocrine Society. 93, 4500–10
- [70] Hsu, M.I., Mayer, J., Aronshon, M., Lanzendorf, S., Muasher, S., Kolm, P. ve Oehninger, S. , 1999, Embryo implantation in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred, *Fertility and sterility*, 72, 679–85
- [71] Carson, D.D. , 2002, Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive

- phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening, *Molecular Human Reproduction*, Oxford University Press (OUP). 8, 871–9
- [72] Díaz-Gimeno, P., Horcajadas, J.A., Martínez-Conejero, J.A., Esteban, F.J., Alamá, P., Pellicer, A. ve Simón, C. , 2011, A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature, *Fertility and Sterility*, Elsevier Inc. 95
- [73] Macklon, N.S., Van Der Gaast, M.H., Hamilton, A., Fauser, B.C.J.M. ve Giudice, L.C. , 2008, The impact of ovarian stimulation with recombinant FSH in combination with GnRH antagonist on the endometrial transcriptome in the window of implantation, *Reproductive Sciences*, 15, 357–65
- [74] Haouzi, D., Assou, S., Mahmoud, K., Tondeur, S., Rème, T., Hedon, B., De Vos, J. ve Hamamah, S. , 2009, Gene expression profile of human endometrial receptivity: Comparison between natural and stimulated cycles for the same patients, *Human Reproduction*, Oxford University Press. 24, 1436–45
- [75] Haouzi, D., Dechaud, H., Assou, S., De Vos, J. ve Hamamah, S. , 2012, Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data, *Reproductive BioMedicine Online*, 24, 23–34
- [76] Song, H., Lim, H., Paria, B.C., Matsumoto, H., Swift, L.L., Morrow, J., Bonventre, J. V. ve Dey, S.K. , 2002, Cytosolic phospholipase A2 α deficiency is crucial for “on-time” embryo implantation that directs subsequent development, *Development*, 129, 2879–89
- [77] Ye, X., Hama, K., Contos, J.J.A., Anliker, B., Inoue, A., Skinner, M.K., Suzuki, H., Amano, T., Kennedy, G., Arai, H., Aoki, J. ve Chun, J. , 2005, LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing, *Nature*, 435, 104–8
- [78] Kotani, Y., Iwase, A., Ando, H. ve Mizutani, S. , 2005, Oxytocin-induced prostaglandin E2 (PGE2) synthesis is regulated by progesterone via oxytocinase in ishikawa cells, *Hormone and Metabolic Research*, 37, 4–9
- [79] Achache, H., Tsafirir, A., Prus, D., Reich, R. ve Revel, A. , 2010, Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization, *Fertility and Sterility*, 94, 1271–8
- [80] Wang, Y., Zhao, A. ve Lin, Q. , 2010, Role of cyclooxygenase-2 signaling pathway dysfunction in unexplained recurrent spontaneous abortion, *Chinese medical journal*, 123, 1543–7
- [81] Apparao, K.B.C., Murray, M.J., Fritz, M.A., Meyer, W.R., Chambers, A.F., Truong, P.R. ve Lessey, B.A. , 2001, Osteopontin and Its Receptor $\alpha\beta$ 3 Integrin Are Coexpressed in the Human Endometrium during the Menstrual Cycle But Regulated Differentially , *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, The Endocrine Society. 86, 4991–5000
- [82] Klentzeris, L.D., Bulmer, J.N., Trejdosiewicz, L.K., Morrison, L. ve Cooke, I.D. , 1993, Infertility: Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women, *Human Reproduction*, 8, 1223–30
- [83] Tei, C., Maruyama, T., Kuji, N., Miyazaki, T., Mikami, M. ve Yoshimura, Y. , 2003, Reduced expression of $\alpha\beta$ 3 integrin in the endometrium of unexplained

- infertility patients with recurrent IVF-ET failures: improvement by danazol treatment, *Journal of assisted reproduction and genetics*, 20, 13–20
- [84] Lessey, B.A., Castelbaum, A.J., Sawin, S.W. ve Sun, J. , 1995, Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility, *Fertility and Sterility*, Elsevier Inc. 63, 535–42
- [85] Apparao, K.B.C., Lovely, L.P., Gui, Y., Lininger, R.A. ve Lessey, B.A. , 2002, Elevated Endometrial Androgen Receptor Expression in Women with Polycystic Ovarian Syndrome1, *Biology of Reproduction*, Oxford University Press (OUP). 66, 297–304
- [86] Thomas, K., Thomson, A., Wood, S., Kingsland, C., Vince, G. ve Lewis-Jones, I. , 2003, Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the association with subsequent treatment outcome, *Fertility and sterility*, 80, 502–7
- [87] Revel, A., Helman, A., Koler, M., Shushan, A., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Aingorn, H. ve Vlodaysky, I. , 2005, Heparanase improves mouse embryo implantation, *Fertility and Sterility*, 83, 580–6
- [88] Genbacev, O.D., Prakobphol, A., Foulk, R.A., Krtolica, A.R., Ilic, D., Singer, M.S., Yang, Z.Q., Kiessling, L.L., Rosen, S.D. ve Fisher, S.J. , 2003, Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface, *Science*, 299, 405–8
- [89] Achache, H. ve Revel, A. , 2006, Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation, *Human Reproduction Update*, 12, 731–46
- [90] Davidson, L.M. ve Coward, K. , 2016, Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation, *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, John Wiley and Sons Inc. 108, 19–32
- [91] Hey, N.A., Graham, R.A., Seif, M.W. ve Aplin, J.D. , 1994, The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78, 337–42
- [92] Meseguer, M., Aplin, J.D., Caballero-Campo, P., O'Connor, J.E., Martín, J.C., Remohí, J., Pellicer, A. ve Simón, C. , 2001, Human Endometrial Mucin MUC1 Is Up-Regulated by Progesterone and Down-Regulated In Vitro by the Human Blastocyst1, *Biology of Reproduction*, Oxford University Press (OUP). 64, 590–601
- [93] Serle, E., Aplin, J.D., Li, T.C., Warren, M.A., Graham, R.A., Seif, M.W. ve Cooke, I.D. , 1994, Endometrial differentiation in the peri-implantation phase of women with recurrent miscarriage: a morphological and immunohistochemical study, *Fertility and sterility*, 62, 989–96
- [94] Hey, N.A., Li, T.C., Devine, P.L., Graham, R.A., Saravelos, H. ve Aplin, J.D. , 1995, MUC1 in secretory phase endometrium: Expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients, *Human Reproduction*, Oxford University Press. 10, 2655–62
- [95] Horne, A.W., White, J.O., Margara, R.A., Williams, R., Winston, R.M.L. ve Lalani, E.N. , 2001, MUC 1: A genetic susceptibility to infertility?, *Lancet*, 357, 1336–7
- [96] Dentillo, D.B., Souza, F.R.P., Meola, J., Vieira, G.S., Yazlle, M.E.H.D., Goulart, L.R. ve Martelli, L. , 2007, No evidence of association of MUC-1 genetic polymorphism with embryo implantation failure, *Brazilian journal of medical and biological research* =

- Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 40, 793–7
- [97] Zhang, J., Chen, Z., Smith, G.N. ve Croy, B.A. , 2011, Natural killer cell-triggered vascular transformation: Maternal care before birth?, *Cellular and Molecular Immunology*, 8, 1–11
- [98] Chaouat, G., Dubanchet, S. ve Ledée, N. , 2007, Cytokines: Important for implantation?, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24, 491–505
- [99] Steck, T., Giess, R., Suetterlin, M.W., Bolland, M., Wiest, S., Poehls, U.G. ve Dietl, J. , 2004, Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer, *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 112, 69–73
- [100] Hambartsoumian, E. , 1998, Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation, *American Journal of Reproductive Immunology*, Blackwell Publishing Ltd. 39, 137–43
- [101] Brinsden MB, P.R., Alam, V., de Moustier, B. ve Engrand, P. , 2009, Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure, *Fertility and Sterility*, 91, 1445–7
- [102] Simón, C., Frances, A., Piquette, G., Hendrickson, M., Milki, A. ve Polan, M.L. , 1994, Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, The Endocrine Society. 78, 847–54
- [103] Lédée, N., Munaut, C., Aubert, J., Sérazin, V., Rahmati, M., Chaouat, G., Sandra, O. ve Foidart, J.M. , 2011, Specific and extensive endometrial deregulation is present before conception in IVF/ICSI repeated implantation failures (IF) or recurrent miscarriages, *Journal of Pathology*, 225, 554–64
- [104] Lim, K.J., Odukoya, O.A., Ajjan, R.A., Li, T.C., Weetman, A.P. ve Cooke, I.D. , 2000, The role of T-helper cytokines in human reproduction, *Fertility and sterility*, 73, 136–42
- [105] Linjawi, S., Li, T.C., Tuckerman, E.M., Blakemore, A.I.F. ve Laird, S.M. , 2004, Expression of interleukin-11 receptor α and interleukin-11 protein in the endometrium of normal fertile women and women with recurrent miscarriage, *Journal of Reproductive Immunology*, 64, 145–55
- [106] McIntyre, E. , 2010, Clinical Naturopathy: An Evidence-based Guide to Practice [Book Review], *Australian Journal of Medical Herbalism*, Elsevier Australia. 22, 156
- [107] Mukaddes Eşrefoğlu. , 2017, Embriyoloji, *İstanbul Tıp Kitabevleri*, 68–9
- [108] Mirkin, S., Arslan, M., Churikov, D., Corica, A., Diaz, J.I., Williams, S., Bocca, S. ve Oehninger, S. , 2005, In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation, *Human Reproduction*, Oxford University Press. 20, 2104–17
- [109] Haouzi, D., Assou, S., Dechanet, C., Anahory, T., Dechaud, H., De Vos, J. ve Hamamah, S. , 2010, Controlled Ovarian Hyperstimulation for In Vitro Fertilization Alters Endometrial Receptivity in Humans: Protocol Effects1, *Biology of Reproduction*, Oxford University Press (OUP). 82, 679–86

- [110] Koot, Y.E.M., Teklenburg, G., Salker, M.S., Brosens, J.J. ve Macklon, N.S. , 2012, Molecular aspects of implantation failure, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822, 1943–50
- [111] Koler, M., Achache, H., Tsafirir, A., Smith, Y., Revel, A. ve Reich, R. , 2009, Disrupted gene pattern in patients with repeated in vitro fertilization (IVF) failure, *Human Reproduction*, Oxford University Press. 24, 2541–8
- [112] Goodman, C., Jeyendran, R.S. ve Coulam, C.B. , 2009, P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure, *Fertility and Sterility*, 92, 494–8
- [113] Firouzabadi, R.D., Ghasemi, N., Rozbahani, M.A. ve Tabibnejad, N. , 2009, Association of p53 polymorphism with ICSI/IVF failure and recurrent pregnancy loss, *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 49, 216–9
- [114] Daikoku, T., Cha, J., Sun, X., Tranguch, S., Xie, H., Fujita, T., Hirota, Y., Lydon, J., DeMayo, F., Maxson, R. ve Dey, S.K. , 2011, Conditional deletion of MSX homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity, *Developmental Cell*, 21, 1014–25
- [115] Bastu, E., Demiral, I., Gunel, T., Ulgen, E., Gumusoglu, E., Hosseini, M.K., Sezerman, U., Buyru, F. ve Yeh, J. , 2019, Potential Marker Pathways in the Endometrium That May Cause Recurrent Implantation Failure, *Reproductive Sciences*, SAGE Publications Inc. 26, 879–90
- [116] Gene Cards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNC> [Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2020].
- [117] KEGG, https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04510 [Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2020].
- [118] Polte, T.R., Hanks, S.K. ve Naftilan, A.J. , 1994, Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II, *Journal of Cellular Biochemistry*, 55, 106–19
- [119] Zhao, X. ve Guan, J.L. , 2011, Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, NIH Public Access. 63, 610–5
- [120] Michie, H.J. ve Head, J.R. , 1994, Tenascin in pregnant and non-pregnant rat uterus: Unique spatio-temporal expression during decidualization, *Biology of Reproduction*, Biol Reprod. 50, 1277–86
- [121] Kida, H. , 1997, The change in tenascin expression in mouse uterus during early pregnancy, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Springer New York LLC. 14, 44–50
- [122] Lourenço, E.L.B., Muller, J.C., Boareto, A.C., Gomes, C., Lourenço, A.C., Palozzi, R.A.C., Prando, T.B.L., Junior, A.G. ve Dalsenter, P.R. , 2014, Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Derived from *Tropaeolum majus* L. in Rat Preimplantation Embryos: Evidence for the Dehydroepiandrosterone and Estradiol Role, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, Hindawi Limited. 2014

- [123] Noda, N., Minoura, H., Nishiura, R., Toyoda, N., Imanaka-Yoshida, K., Sakakura, T. ve Yoshida, T. , 2000, Expression of Tenascin-C in stromal cells of the murine uterus during early pregnancy: Induction by interleukin-1 α , prostaglandin E2, and prostaglandin F(2 α), *Biology of Reproduction*, Society for the Study of Reproduction. 63, 1713–20
- [124] Gene Cards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MME> [Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2020].
- [125] KEGG, https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04614 [Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2020]
- [126] Pijacka, W., Hunter, M.G., Broughton Pipkin, F. ve Luck, M.R. , 2012, Expression of renin-angiotensin system components in the early bovine embryo, *Endocrine connections*, 1, 22–30
- [127] Williams, P.J., Mistry, H.D., Innes, B.A., Bulmer, J.N. ve Broughton Pipkin, F. , 2010, Expression of AT1R, AT2R and AT4R and Their Roles in Extravillous Trophoblast Invasion in the Human, *Placenta*, 31, 448–55
- [128] Kurlak, L.O., Mistry, H.D., Cindrova-Davies, T., Burton, G.J. ve Pipkin, F.B. , 2016, Human placental renin-angiotensin system in normotensive and pre-eclamptic pregnancies at high altitude and after acute hypoxia-reoxygenation insult, *Journal of Physiology*, Blackwell Publishing Ltd. 594, 1327–40
- [129] Anton, L. ve Brosnihan, K.B. , 2008, Systemic and uteroplacental renin—angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies, *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, NIH Public Access. 2, 349–62
- [130] KEGG, https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04390 [Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2020].
- [131] Gene Cards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WWC1> [Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2020].
- [132] Pan, D. , 2010, The hippo signaling pathway in development and cancer, *Developmental Cell*, Howard Hughes Medical Institute. 19, 491–505
- [133] Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, A., Oren, M., Sudol, M., Cesareni, G. ve Blandino, G. , 2001, Physical Interaction with Yes-associated Protein Enhances p73 Transcriptional Activity, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 15164–73
- [134] Vassilev, A., Kaneko, K.J., Shu, H., Zhao, Y. ve DePamphilis, M.L. , 2001, TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm, *Genes and Development*, 15, 1229–41
- [135] Kaneko, K.J. ve Depamphilis, M.L. , 1998, Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors, *Developmental Genetics*, 22, 43–55
- [136] Chian, R.C., Nargund, G. ve Huang, J.Y.J. , 2017, Development of in vitro maturation for human oocytes: Natural and Mild approaches to clinical infertility treatment, *Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes: Natural and Mild Approaches to Clinical Infertility Treatment*. Springer International Publishing.

- [137] Nishioka, N., Inoue, K. ichi, Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E.M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H. ve Sasaki, H. , 2009, The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass, *Developmental Cell*, 16, 398–410
- [138] Manoj, P. , 2014, Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas, *Mitochondrial DNA*, Taylor and Francis Ltd. 27, 742–6
- [139] Kim, T.G., Jeong, S.Y. ve Cho, K.S. , 2014, Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer Verlag. 98, 6105–13
- [140] Takahashi, K., Yan, I.K., Kim, C., Kim, J. ve Patel, T. , 2014, Analysis of Extracellular RNA by Digital PCR, *Frontiers in Oncology*, 4
- [141] Tadmor, A.D., Ottesen, E.A., Leadbetter, J.R. ve Phillips, R. , 2011, Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR, *Science*, 333, 58–62
- [142] Lo, Y.M.D., Lun, F.M.F., Chan, K.C.A., Tsui, N.B.Y., Chong, K.C., Lau, T.K., Leung, T.Y., Zee, B.C.Y., Cantor, C.R. ve Chiu, R.W.K. , 2007, Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 13116–21
- [143] Day, E., Dear, P.H. ve McCaughan, F. , 2013, Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine, *Methods*, 59, 101–7
- [144] Shen, F., Sun, B., Kreutz, J.E., Davydova, E.K., Du, W., Reddy, P.L., Joseph, L.J. ve Ismagilov, R.F. , 2011, Multiplexed quantification of nucleic acids with large dynamic range using multivolume digital RT-PCR on a rotational SlipChip tested with HIV and hepatitis C viral load, *Journal of the American Chemical Society*, 133, 17705–12
- [145] Belgrader, P., Tanner, S.C., Regan, J.F., Koehler, R., Hindson, B.J. ve Brown, A.S. , 2013, Droplet digital PCR measurement of HER2 copy number alteration in formalin-fixed paraffin-embedded breast carcinoma tissue, *Clinical Chemistry*, 59, 991–4
- [146] White, R.A., Blainey, P.C., Fan, H.C. ve Quake, S.R. , 2009, Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing, *BMC Genomics*, 10
- [147] Podlesniy, P., Figueiro-Silva, J., Llado, A., Antonell, A., Sanchez-Valle, R., Alcolea, D., Lleo, A., Molinuevo, J.L., Serra, N. ve Trullas, R. , 2013, Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer disease, *Annals of Neurology*, 74, 655–68
- [148] Noyes, R.W., Hertig, A.T. ve Rock, J. , 1975, Dating the endometrial biopsy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 122, 262–3
- [149] Coutifaris, C., Myers, E.R., Guzick, D.S., Diamond, M.P., Carson, S.A., Legro, R.S., McGovern, P.G., Schlaff, W.D., Carr, B.R., Steinkampf, M.P., Silva, S., Vogel, D.L. ve Leppert, P.C. , 2004, Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status, *Fertility and Sterility*, 82, 1264–72
- [150] Xia, Y., Wen, H.Y. ve Kellems, R.E. , 2002, Angiotensin II Inhibits Human Trophoblast Invasion through AT1 Receptor Activation, *Journal of Biological Chemistry*, 27, 277

- [151] Zhu, H.Y., Ge, T.X., Pan, Y. Bin ve Zhang, S.Y. , 2017, Advanced Role of Hippo Signaling in Endometrial Fibrosis: Implications for Intrauterine Adhesion, *Chinese Medical Journal*, Medknow Publications. 130, 2732–7
- [152] Strakova, Z., Kruss, S., Morris, K. ve Reed, J. , 2010, Members of the Hippo Pathway Are Regulated in the Uterus During the Menstrual Cycle, *Biology of Reproduction*, Oxford Academic, 83, 363–363
- [153] Chen, H., Song, Y., Yang, S., Fu, J., Feng, X. ve Huang, W. , 2017, YAP mediates human decidualization of the uterine endometrial stromal cells, *Placenta*, W.B. Saunders Ltd. 53, 30–5
- [154] Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. ve Turner, C. , 1988, Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton, *Annual Review of Cell Biology*, 4, 487–525
- [155] Lo, S.H. , 2006, Focal adhesions: What’s new inside, *Developmental Biology*, Academic Press Inc. 294, 280–91
- [156] Chen, Q., Zhang, A., Yu, F., Gao, J., Liu, Y., Yu, C., Zhou, H. ve Xu, C. , 2015, Label-free proteomics uncovers energy metabolism and focal adhesion regulations responsive for endometrium receptivity, *Journal of Proteome Research*, American Chemical Society. 14, 1831–42
- [157] Kaneko, Y., Lecce, L. ve Murphy, C.R. , 2009, Ovarian hormones regulate expression of the focal adhesion proteins, talin and paxillin, in rat uterine luminal but not glandular epithelial cells, *Histochemistry and Cell Biology*, 132, 613–22
- [158] Nicholson, M.D.O., Lindsay, L.A. ve Murphy, C.R. , 2010, Ovarian hormones control the changing expression of claudins and occludin in rat uterine epithelial cells during early pregnancy, *Acta Histochemica*, 112, 42–52
- [159] Jalali, B.M., Likso, P., Andronowska, A. ve Skarzynski, D.J. , 2018, Alterations in the distribution of actin and its binding proteins in the porcine endometrium during early pregnancy: Possible role in epithelial remodeling and embryo adhesion, *Theriogenology*, Elsevier Inc. 116, 17–27
- [160] Erikson, D.W., Burghardt, R.C., Bayless, K.J. ve Johnson, G.A. , 2009, Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1, Osteopontin) Binds to Integrin Alphavbeta6 on Porcine Trophectoderm Cells and Integrin Alphavbeta3 on Uterine Luminal Epithelial Cells, and Promotes Trophectoderm Cell Adhesion and Migration1, *Biology of Reproduction*, Oxford Academic. 81, 814–25

EKLER**EK 1. ETİK KURUL BELGESİ**

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



Sayı : 1419
Konu: Doç. Dr. Tuba GÜNEL hk.

Tarih : 23.10.2018

Sayın Doç. Dr. Tuba GÜNEL
Fen Fakültesi

İlgi : Fen Bilimleri Enstitüsünün 05/10/2018 gün ve 286582 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve İrem Gülfem ALBAYRAK' ın yürüteceği 2018/1373 dosya numaralı "In Vitro Fertilizasyon Sonrası Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı ile İlişkili Endometrial Gen Anlatım Analizi" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/10/2018 tarih ve 17 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Ekl: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itifetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"In Vitro Fertilizasyon Sonrası Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı ile İlişkili Endometriyal Gen Anlatım Analizi"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Tuba GÜNEL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnsan Genetiği			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Diğer ise belirtiniz :				
	TEK MERKEZ	ÇOK MERKEZLİ	ULUSAL	ULUSLAR ARASI	
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"In Vitro Fertilizasyon Sonrası Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı ile İlişkili Endometriyal Gen Anlatım Analizi"
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	08.10.2018	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>		Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
	DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 17	Tarih: 12/10/2018		
	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde görevli Doç. Dr. Tuba GÜNEL' in sorumluluğunda ve İrem Gülfem ALBAYRAK' in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **	İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyostatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

- * :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığında izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığının iznine tabi değildir.

EK 2. BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

In Vitro Fertilizasyon Sonrası Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı ile İlişkili Endometriyal Gen Anlatımı Analizi

- Kabul etmeniz halinde katılacağınız bu çalışma bir araştırmadır.
- Araştırmanın amacı in-vitro fertilizasyon (IVF) yöntemi sonucu tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili olabilecek genleri incelemektir.
- Araştırmamızda sizin üzerinizde herhangi bir tedavi veya bir işlem denenmeyecek, herhangi bir madde verilmeyecek, sadece bir defaya mahsus olarak sizden bir hekim tarafından endometriyum örneği alınacaktır.
- Alınan örnek laboratuvarında analiz edilecektir.
- Gönüllü olarak sizin araştırma üzerinde herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır.
- Araştırma boyunca sizden maddi katkı talep edilmeyecektir.
- Sizin için herhangi bir rahatsızlık veya risk oluşturmayacak bu çalışma, kısa dönemde size bir fayda da sağlamayacaktır. Ancak uzun dönemde IVF yöntemi sonucu tekrarlayan gebelik kayıplarının sebeplerinin bulunmasına katkı sağlayacağı için çalışma önem arz etmektedir.
- Araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlı olup araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz. Reddetmeniz halinde yararınıza engel ya da cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır.
- İzleyiciler, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar size ait tıbbi bilgilere ulaşılabilir ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.
- Siz veya yasal temsilciniz bilgilendirilmiş olur formunu imzalamakla bunu kabul etmiş olacaksınız.
- Ayrıca kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlar da gizli tutulacaktır.
- Araştırma esnasında sizi ilgilendirecek bir bilgi söz konusu olduğunda siz veya yasal temsilcinize derhal haber verilecektir.
- Araştırma hakkında ek bilgiye Dr. Tuba Günel'den (Tel: 0212 4555700/15473) ulaşabilirsiniz.
- Araştırmamız siz dahil 48 kişi için yapılacaktır.

"Bu bilgilendirmeden sonra böyle bir araştırmaya "gönüllü" olarak katılmak üzere davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam araştırmacı ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin, gizlilik içinde, bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile korunacağı güvencesi verildi. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında da kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Tarafıma bir ücret ödenmeyecektir.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde gönüllü olarak yer alma

kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bilgilendirilmiş gönüllü onam formunun bir örneğinin bana verileceğini de biliyorum."

"In Vitro Fertilizasyon Sonrası Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı ile İlişkili Endometriyal Gen Anlatımı Analizi" başlıklı araştırma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Gönüllü Adı Soyadı

Tarih

İmzası

Tanık Olan Kişinin Adı Soyadı

Tarih

İmzası

Açıklama yapan doktorun adı, soyadı

Tarih

İmzası

EK 3. HASTA TAKİP FORMU**HASTA TAKİP FORMU**

TARİH:

HASTANIN;

ADI:

SOYADI:

YAŞI:

KRİTERLER	EVET/HAYIR	AÇIKLAMA
Oral kontraseptif kullanımı	<input type="checkbox"/>	
Rahimiçi kontraseptif kullanımı	<input type="checkbox"/>	
Tıbbi geçmişinde infertilite öyküsü bulunuyor mu?	<input type="checkbox"/>	
IVF tedavisi sonrası en az üç defa embriyo transferinde başarısızlık yaşanmış mı?	<input type="checkbox"/>	
Normal hormon rezervine mi sahip?	<input type="checkbox"/>	
Hormon stimülasyonuna iyi cevap veriyor mu?	<input type="checkbox"/>	
Normal uterin kavitesine ve endometriyal kalınlığa sahip mi?	<input type="checkbox"/>	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	İrem Gülfem ALBAYRAK
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	06.12.1995
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	iremgulfemalbayrak@ogr.iu.edu.tr
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Albayrak, İ.G., Zarnagh, F.A., Karamustafaoğlu Balcı, B., Baştu, E., Günel, T., Endometrial gene expression profiling of recurrent implantation failure after in vitro Fertilization, <i>36th virtual Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)</i> , 2020	