

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İN VİTRO FERTİLİZASYON PROGRAMINA ALINAN
İMLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN ENDOMETRİOZİSLİ
HASTALARIN VE AÇIKLANAMAYAN İNFERTİL
HASTALARIN MİD-SEKRETUAR ENDOMETRİYUMUNDA
KALSİYUM METABOLİZMASINDA İŞLEV GÖREN
PROTEİNLERİN EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ**

Tuba ÖZCAN METİN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ

MERSİN-2016

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İN VİTRO FERTİLİZASYON PROGRAMINA ALINAN
İMLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN ENDOMETRİOZİSLİ
HASTALARIN VE AÇIKLANAMAYAN İNFERTİL HASTALARIN
MİD-SEKRETUAR ENDOMETRİYUMUNDA
KALSİYUM METABOLİZMASINDA İŞLEV GÖREN
PROTEİNLERİN EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ

Tuba ÖZCAN METİN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2015-TP3-1209 nolu proje olarak desteklenmiştir.


Tez No: 46

MERSİN-2016

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

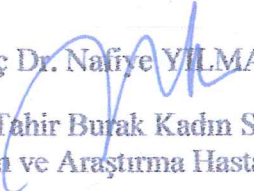
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “İn Vitro Fertilizasyon Programına Alınan İmplantasyon Başarısızlığı Olan Endometriozisli Hastaların ve Açıklanamayan İnfertil Hastaların Mid-Sekretuar Endometriyumunda Kalsiyum Metabolizmasında İşlev Gören Proteinlerin Ekspresyonunun İncelenmesi” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

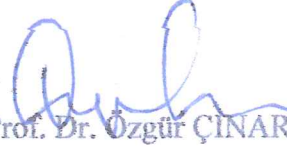
Tez Savunma Tarihi
26/07/2016


Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ
Mersin Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Ebru BALLI
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi


Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi

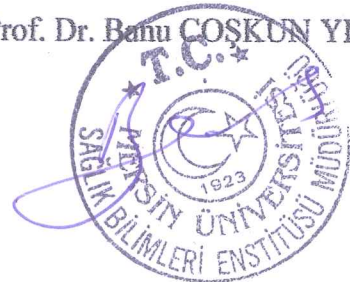

Doç Dr. Nafiye YILMAZ
Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı
Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Jüri Üyesi


Prof. Dr. Özgür ÇINAR
Ankara Üniversitesi
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 08.08.2016 tarih ve 2016/307 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, beni pek çok konuda aydınlatan, gösterdiği büyük sabrı ve emeğiyle bana bilim dünyasının kapılarını açan, çok değerli danışmanım Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ'a, gösterdikleri özveri ve bilimsel katkılarından dolayı Prof. Dr. Ebru BALLI, Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ ve Doç. Dr. Savaş AKTAŞ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde yer alan gruplardan materyal toplanması ve diğer aşamalarda desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İnfertilite sorumlusu değerli hocam Doç. Dr. Nafiye YILMAZ'a müteşekkirim. Desteğini ve katkılarını esirgemeyen MEÜ. Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. MEÜ. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. M. Emin ERDAL ve Arş. Gör. İlay BURAN'a teşekkür ederim.

Tezimin bulgularının istatistiksel analizleri aşamasındaki yardımlarından dolayı MEÜ. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Doç. Dr. Gülhan OREKİCİ TEMEL ve Yrd. Doç. Dr. Semra ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimi gibi zorlu bir süreçte acı ve tatlı pek çok anıyı paylaştığımız tüm asistan arkadaşlarıma yürekten sevgilerimi sunarım.

Sevgisini, ilgisini, anlayışını ve desteğini asla esirgemeyen sevgili eşim ve aileme en gönülden sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| KABUL VE ONAY..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER..... | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | x |
| ÖZET..... | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1. İnfertilite..... | 4 |
| 2.1.1. Tubal/Peritoneal İnfertilite Nedenleri..... | 4 |
| 2.1.1.1. Endometriozis..... | 5 |
| 2.1.3. Klinik semptomlar..... | 7 |
| 2.1.4. Endometriozis ve İnfertilite..... | 7 |
| 2.1.5. Endometriozis Tedavisi..... | 9 |
| 2.1.5.1. Medikal Tedavi..... | 10 |
| 2.1.5.2. Cerrahi Tedavi..... | 10 |
| 2.1.6. Açıklanamayan İnfertilite..... | 11 |
| 2.1.6.1. Açıklanamayan İnfertilitenin Olası Nedenleri..... | 11 |
| 2.1.6.2. Tedavi..... | 12 |
| 2.2. Kadın Genital Sistem..... | 12 |
| 2.2.1. Uterus Histolojisi..... | 13 |
| 2.2.1.1. Perimetrium..... | 13 |
| 2.2.1.2. Miyometriyum..... | 14 |
| 2.2.1.3. Endometriyum..... | 14 |
| 2.3. Menstrual Siklus..... | 15 |
| 2.3.1. Proliferatif Faz..... | 17 |
| 2.3.2. Sekretuar Faz..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 2.3.3. Menstrual Faz..... | 19 |
| 2.4. İmplantasyon..... | 19 |
| 2.5. Hücre İçi Kalsiyumun Önemi..... | 22 |
| 2.5.1. Blastokist implantasyon sürecinde Ca ⁺² 'un rolü..... | 23 |
| 2.6. Ca ⁺² kanalları..... | 24 |
| 2.6.1. TRP Kanalları..... | 25 |
| 2.6.1.1. TRPV6 Kanalı..... | 25 |
| 2.7. Sitozolden Ca ⁺² 'un uzaklaştırılması..... | 28 |
| 2.7.1. PMCA1..... | 28 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | |
| 3.1. Endometriyal Biyopsilerin Elde Edilişi ve Saklanması..... | 32 |
| 3.2. Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi..... | 32 |
| 3.3. Hematoksilen - Eozin Boyama Protokolü..... | 33 |
| 3.4. İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü..... | 34 |
| 3.5. Histolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme..... | 35 |
| 3.6. Total RNA izolasyonu..... | 35 |
| 3.7. Total RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması..... | 36 |
| 3.8. Total RNA'dan cDNA Sentezlenmesi..... | 37 |
| 3.9. RT-PCR Analizi..... | 38 |
| 3.9.1 Kullanılan Primer ve Problar..... | 38 |
| 3.9.2. RT-PCR Reaksiyon Ortamının Hazırlanışı..... | 39 |
| 3.9.3. RT-PCR Reaksiyon Şartları..... | 40 |
| 3.10. Dokuda Ca ⁺² konsantrasyonunun belirlenmesi..... | 40 |
| 3.11. İstatistiksel Analiz..... | 40 |
| 4. BULGULAR | |
| 4.1. Grupların Demografik Özelliklerinin Karşılaştırılması..... | 41 |
| 4.2. Doku Ca ⁺² konsantrasyon Ölçüm Sonucu..... | 41 |
| 4.3. Işık Mikroskopik Bulgular..... | 43 |
| 4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular..... | 46 |
| 4.4.1. İmmünohistokimyasal TRPV6 Ekspresyonu..... | 46 |
| 4.4.2. İmmünohistokimyasal PMCA1 Ekspresyonu..... | 54 |
| 4.5. RT- PCR Analiz Sonucu..... | 61 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 5. TARTIŞMA..... | 62 |
| 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... | 69 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 71 |
| EKLER | |
| EK-1..... | 83 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 84 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Endometriozisin anatomik yerlerini gösteren şematik resim..... | 5 |
| Şekil 2.2. Endometriozisli kadınlarda azalan fekundite ile ilişkili faktörler..... | 9 |
| Şekil 2.3. Kadın genital sistem histolojisi ve anatomisi..... | 13 |
| Şekil 2.4. Menstrual siklus evreleri..... | 16 |
| Şekil 2.5. İmplantasyon öncesi embriyo ve endometrium arasındaki erken siyalleşmeyi gösteren şematik resim..... | 20 |
| Şekil 2.6. TRPV6'nın yapısal organizasyonu..... | 26 |
| Şekil 2.7. Üreme dokularında Ca^{+2} transport genlerini gösteren şematik resim..... | 27 |
| Şekil 2.8. PMCA yapısının şematik resmi..... | 29 |
| Şekil 2.9. Ca^{+2} -ATPazlar taşıma döngüsünün şematik resmi..... | 30 |
| Şekil 4.1. Gruplar arası doku Ca^{+2} konsantrasyon düzeylerinin karşılaştırılması..... | 43 |
| Şekil 4.2. Kontrol grubu X600, H&E mikrografı..... | 43 |
| Şekil 4.3. Kontrol grubu X1200, H&E mikrografı..... | 44 |
| Şekil 4.4. Endometriozis grubu X600, H&E mikrografı..... | 44 |
| Şekil 4.5. Endometriozis grubu X1200, H&E mikrografı..... | 45 |
| Şekil 4.6. Açıklanamayan infertilite grubu X600, H&E mikrografı..... | 45 |
| Şekil 4.7. Açıklanamayan infertilite grubu X1200, H&E mikrografı..... | 46 |
| Şekil 4.8. TRPV6 immünboyamasına ait negatif kontrol X1200..... | 47 |
| Şekil 4.9. Kontrol grubu TRPV6 immünboyaması X600..... | 48 |
| Şekil 4.10. Kontrol grubu TRPV6 immünboyaması X1200..... | 48 |
| Şekil 4.11. Endometriozis grubu TRPV6 immünboyaması X600..... | 49 |
| Şekil 4.12. Endometriozis grubu TRPV6 immünboyaması X1200..... | 49 |
| Şekil 4.13. Endometriozis grubu GE'de TRPV6 immünboyaması X1200..... | 50 |
| Şekil 4.14. Açıklanamayan infertilite grubu TRPV6 immünboyaması X600..... | 50 |
| Şekil 4.15. Açıklanamayan infertilite grubu TRPV6 immünboyaması X1200..... | 51 |
| Şekil 4.16. Açıklanamayan infertilite grubu GE'de TRPV6 immünboyaması X1200..... | 51 |
| Şekil 4.17. Gruplar arası LE, GE ve stromada TRPV6 boyanma yoğunluğunun grafiksel karşılaştırılması..... | 52 |
| Şekil 4.18. Grup içi LE, GE ve stromada TRPV6 boyanma yoğunluğunun grafiksel karşılaştırılması..... | 53 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.19. PMCA1 immünboyamasına ait negatif kontrol..... | 55 |
| Şekil 4.20. Kontrol grubu PMCA1 immünboyaması X600..... | 56 |
| Şekil 4.21. Kontrol grubu PMCA1 immünboyaması X1200..... | 56 |
| Şekil 4.22. Endometriozis grubu PMCA1 immünboyaması X600..... | 57 |
| Şekil 4.23. Endometriozis grubu PMCA1 immünboyaması X1200..... | 57 |
| Şekil 4.24. Açıklanamayan infertilite grubu PMCA1 immünboyaması X600..... | 58 |
| Şekil 4.25. Açıklanamayan infertilite grubu PMCA1 immünboyaması X1200..... | 58 |
| Şekil 4.26. Gruplar arası LE, GE ve stromada PMCA1 immün işaretlenme yoğunluğunun grafiksel karşılaştırılması..... | 59 |
| Şekil 4.27. Grup içi LE, GE ve stromada PMCA1 immün işaretlenme yoğunluğunun grafiksel karşılaştırılması..... | 60 |
| Şekil 4.28. TRPV6 ve PMCA1 mRNA ekspresyon düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analizi..... | 61 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 3.1. TRPV6 ve PMCA1 için cDNA karışım miktarı..... | 37 |
| Çizelge 3.2. TRPV6 ve PMCA1 için cDNA sentezi PCR programı..... | 37 |
| Çizelge 3.3. RT-PCR’da kullanılan TRPV6 ve PMCA1 genlerinin primer ve prob dizileri..... | 38 |
| Çizelge 3.4. RT-PCR reaksiyon şartları..... | 39 |
| Çizelge 4.1. Grupların demografik özellikleri..... | 41 |
| Çizelge 4.2. Kontrol ve hasta gruplarının doku Ca ⁺² konsantrasyon düzeylerinin karşılaştırılması..... | 42 |
| Çizelge 4.3. Gruplar arası ve grup içi LE, GE ve stromada TRPV6 immün işaretlenme yoğunluğunun istatistiksel karşılaştırılması..... | 52 |
| Çizelge 4.4. Grup arası ve grup içi LE, GE ve stromada PMCA1 immün işaretlenme yoğunluğunun istatistiksel karşılaştırılması..... | 59 |
| Çizelge 4.5. Grupların mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması..... | 60 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------------------------|---|
| Ca⁺² | Kalsiyum iyonu |
| COX-2 | Siklooksijenaz-2 |
| EGF | Epidermal Büyüme Faktörü |
| ER | Endoplazmik Retikulum |
| FSH | Folikül Stimüle Edici Hormon |
| GdA | Glikodelin A |
| GnRH | Gonadotropin Releasing Hormon |
| GER | Granüllü Endoplazmik Retikulum |
| HB-EGF | Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü |
| ICP-MS | İndüktif olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi |
| IP₃ | İnozitol-1,4,5-trifosfat |
| IP₃R | IP ₃ Reseptörü |
| IUI | İntrauterin İnseminasyon |
| IVF | İn Vitro Fertilizasyon |
| LPA | Lizofosfatidik Asit |
| LH | Luteinleştirici Hormon |
| LIF | Lösemi İnhibitör Faktör |
| MUC1 | Musin 1 |
| PBS | Fosfatlı Tuz Tamponu |
| PKC | Protein Kinaz C |
| PLC | Fosfolipaz C |
| PMCA | Plazma Membran Ca ⁺² ATPaz |
| RT-PCR | Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RyR | Ryanodin Reseptörü |
| SR | Sarkoplazmik Retikulum |
| SERCA | Sarkoplazmik/Endoplazmik Retikulum Ca ⁺² -ATPazlar |
| TGF-β | Transforme Edici Büyüme Faktör-beta |
| TM | Transmembran |
| TRP | Transient Reseptör Potansiyel |
| TRPV6 | Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 6 |
| VKİ | Vücut Kitle İndeksi |

ÖZET

İn Vitro Fertilizasyon Programına Alınan İmplantasyon Başarısızlığı Olan Endometriozisli Hastaların ve Açıklanamayan İnfertil Hastaların Mid-Sekretuar Endometriyumunda Kalsiyum Metabolizmasında İşlev Gören Proteinlerin Ekspresyonunun İncelenmesi

Uterin endometriyumda Ca^{+2} iyonları gebeliğin başlaması ve devamı için gereklidir, fakat endometriyumda Ca^{+2} 'un düzenlenmesinin hücrel ve moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir. Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 6 (TRPV6) ve Plazma Membran Ca^{+2} ATPaz 1 (PMCA1), birçok dokuda aktif Ca^{+2} transport mekanizmasına katılır. Bu çalışmanın amacı, fertil ve infertil (endometriozis ve açıklanamayan infertilite) insan endometrial dokularda TRPV6 ve PMCA1 ekspresyonunu araştırmaktır.

Endometrial örnekler 14 fertil ve 27 infertil (12 endometriozis ve 15 açıklanamayan infertilite olmak üzere) olgudan alındı. Bu çalışmada real time RT-PCR, immünohistokimya ve ICP-MS kullanıldı. Mid-sekretuar faz sırasında, infertil ve sağlıklı fertil kontrol endometriyumunda TRPV6 ve PMCA1 mRNA ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Bu proteinlerin ekspresyonları değerlendirildi. Dokudaki Ca^{+2} konsantrasyonları ICP-MS ile belirlendi.

TRPV6 ve PMCA1 immün işaretlenme yoğunluğu, mid-sekretuar faz sırasında sağlıklı fertil hastalar ile karşılaştırıldığında infertil hastaların luminal ve glandular epitelinde anlamlı bir şekilde arttı. Gruplar arası TRPV6 ve PMCA1 mRNA ekspresyonunda anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Ca^{+2} konsantrasyonları da kontrol grubuna göre açıklanamayan infertil grupta anlamlı yüksek bulundu.

Çalışmamızın sonuçları, açıklanamayan infertil hastaların endometriyumunda TRPV6 ve PMCA1 protein ekspresyonunun bozulması ve Ca^{+2} konsantrasyonundaki farklılıkların, bu hastalarda infertilitenin potansiyel hücrel ve moleküler mekanizmalarından biri olabileceğini vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: Açıklanamayan infertilite, endometriozis, kalsiyum metabolizması, implantasyon başarısızlığı, infertilite

ABSTRACT

The examination of the expressions of proteins, functioning in calcium metabolism in the mid-secretory endometrium of the unexplained infertile and endometriosis patients with implantation failure, which undergoing In Vitro Fertilization programs.

Calcium ions (Ca^{2+}) in the uterine endometrium are essential for the establishment and maintenance of pregnancy, but the cellular and molecular mechanisms of Ca^{2+} regulation in the endometrium are not fully understood. Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) and Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase 1 (PMCA1) are involved in the active Ca^{2+} transport mechanism in many tissues. The aim of this study was to investigate TRPV6 and PMCA1 expression in fertile and infertile (endometriosis and unexplained infertility (UI)) human endometrial tissues.

Endometrial samples were obtained from 14 fertile and 27 infertile (12 endometriosis and 15 patients diagnosed with UI). This study utilized, real-time RT-PCR, immunohistochemistry and ICP-MS. Expression levels of TRPV6 and PMCA1 mRNA in the endometrium of infertile patients, as well as healthy fertile controls were measured during the mid-secretory phase. Expressions of TRPV6 and PMCA1 were evaluated. Ca^{2+} concentrations in tissues were determined by ICP-MS.

TRPV6 and PMCA1 immun labelling intensity was significantly higher in both luminal and glandular epithelial cells in infertile patients compared with healthy fertile patients during the mid-secretory phase. No significant differences were observed in these proteins mRNA expression among the groups. Ca^{2+} concentrations were also found to be significantly higher in the UI group compared to the control group.

Our results highlight that impaired expression of TRPV6 and PMCA1 protein expression and Ca^{2+} concentration differences in the endometrium of infertile patients with UI, might be one of the potential cellular and molecular mechanisms of infertility in patients with UI.

Keywords: Unexplained infertility, endometriosis, calcium metabolism, implantation failure, infertility

GİRİŞ

İnfertilite etyolojisi değerlendirildiğinde bunların yaklaşık %75'ini ovulatuvar bozukluklar, tubal tıkanıklık ve semen anormallikleri oluşturken; %25'i ise endometriozis veya açıklanamayan infertilite kaynaklıdır. Endometriozis, endometrial bez ve stromanın uterus dışında varlığı olarak tanımlanır. Endometriozisin prevalansı tam olarak bilinmemektedir, ancak doğurganlık çağındaki kadınlarda %2-10 arasında değiştiği tahmin edilmekte ve infertil kadınlarda ise %50'a kadar yükselmektedir (1, 2, 3).

İnflamatuvar sitokinler, büyüme ve anjiyogenik faktörler ve anormal eksprese olan genler tüm endometriozis ile ilişkili infertilitede potansiyel etiyolojik faktörler olarak araştırılmaktadır. Humoral ve hücrel bağışıklık faktörleri, ektopik endometrial implantların büyüme ve inflamatuvar davranışlarını düzenler ve embriyo implantasyonunu etkiler. Endometriotik implantlar, makrofajları cezbeden östradiol, progesteron, pro-inflamatuvar sitokinler (IL-1 β , IL-8, IL-6, and TNF α) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) salgılamaktadır. Endometriozisli kadınların periton sıvısının inflamatuvar/toksik etkilerinden spermlerin kalite ve fonksiyonu azalmaktadır. Periton sıvısındaki inflamatuvar hücrelerin sayısının artmasının sadece oosit ve sperm üzerinde değil, embriyo üzerinde de toksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, inflamasyon tubal fonksiyonu bozar ve tubal motiliteyi azaltır (4, 5).

Endometriozisli kadınların ötopik endometriyumunda endometrial reseptivite için gerekli olduğu bilinen birçok genin anormal eksprese edildiği bilinmektedir. Ancak, endometriyumda değişikliklere neden olan spesifik sinyaller ve mekanizmalar henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Hücre adezyon molekülleri/yolaklarındaki farklılıkların hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (6). Bir grup araştırmacı, endometriozisli kadınların endometriyumunda E-kaderin ekspresyonunun kontrol ile karşılaştırıldığında; endometrial epitel hücrelerinde mid-sekretuar faz sırasında yükselerek, geç sekretuar fazda ekspresyonunun azaldığını; β -katenin protein ekspresyonunun ise arttığını göstermişlerdir (7). Vimentin ekspresyonunun değişmediği bildirilmiştir (8). İntegrin altbirimleri ile etkileşen fokal adezyon kinazın mRNA ve protein ekspresyonu yine bu fazda artmaktadır (9). Östrojen reseptörleri bu hastaların endometriyumunda araştırılmış ve östrojen reseptör beta seviyesinin değişmediği (10),

bir diğ er ç alışmada ise glandular epitel hücrelerinde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (11). Endometriozisli infertil kadınların endometriyumunu ince yapı düzeyinde incelendiğinde, endometrial yüzeyin düzensiz bezler ile birlikte heterojenlik sergilediği, mitotik epitel ve stromal hücre sayısının azaldığı gösterilmiştir (12).

Açıklanamayan infertilite tanısı almış kadınlarda infertilite nedeni olarak uterin reseptiviteden şüphelenilmektedir. Bu kadınlarda hormon profili ve ovulatuvar siklus normal seyretmekte, organ patolojileri ve erkek faktör infertilitesine dair hiçbir kanıt bulunmamaktadır. Bu nedenle açıklanamayan infertilite tanısı alan kadınlarda endometrial reseptivite ile ilişkili hedef molekülleri araştırmak daha cazip hale gelmektedir. Ras-ilişkili protein Rap-1b; hücre büyümesi, hücre siklusu, farklılaşma ve anjiyogenez gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenlemede önemli rol oynamaktadır. Açıklanamayan infertil kadınların mid-sekretuar faz endometriyumunda Rap-1b ekspresyonunun arttığı ve nedeninin ise progesteron sinyalleşmesinin değişmesinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Rıyanodin reseptör fonksiyonunu ve hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) salınımını düzenleyen Ca^{+2} -bağlayıcı bir protein olan Sorcin'in, bu kadınların mid-sekretuar faz endometriyumunda ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bir başka ç alışmada fertil kadınlar ile karşılaştırıldığında bu fazda protein ekspresyonunun arttığı, stromada ise azaldığı saptanmıştır. Sorcin'in bu değişen ekspresyonunun, Ca^{+2} seviyelerinde dengesizliğe ve endometriyumun yetersiz fonksiyonuna yol açarak infertiliteye neden olabileceği düşünölmüştür (13). Anti-inflamatuar özelliği olan Apolipoprotein-A1 ve hücre adezyon ve invazyonu ile ilişkili hücre iskeletinin önemli düzenleyici olan Cofilin-1'in açıklanamayan infertil hastaların reseptif endometriyumunda ekspresyonunun değiştiği bildirilmiştir (14).

Ca^{+2} iyonları; hücre farklılaşması, mitoz, apoptoz, hücre döngüsü ilerlemesinin kontrolü, hücre motilitesi, protein katlanması, makrofaj aktivasyonu, Ca^{+2} ve potasyum kanallarının kontrolü gibi hücrenin fizyolojik fonksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. Ca^{+2} ligand/reseptör bağlanması ile hücre dışından alınan sinyalleri hücre içinde özgül yanıtla dönüştürerek ikincil haberci olarak görev yapmaktadır. Ca^{+2} 'un hücre içi konsantrasyonu ile pek çok hücresel fonksiyon kontrol edilmektedir (15, 16, 17).

Uterusta Ca^{+2} dengesinin korunması embriyo implantasyonu gibi pek çok fonksiyonlar için gereklidir. Embriyo implantasyonunun erken aşaması sırasında implante embriyonun ç evresinde Ca^{+2} 'un düzenlenmesinin başarılı implantasyon için

önemli olduğu vurgulanmıştır (18). Ca^{+2} sitoplazmaya kanal proteinleri aracılığıyla ile taşınmaktadır. Bu taşıyıcılar, Ca^{+2} bağlayıcı proteinleri kullanarak Ca^{+2} pompaları ile hücre membranından dışarıya Ca^{+2} 'u aktarırlar. Transient Reseptör Potansiyel Katyon Kanal Subailesi V üyeleri (TRPV5 ve TRPV6) böbrek ve intestinal epitel hücrelerinin apikal membranında eksprese olmaktadır ve transselüler transport sırasında Ca^{+2} alınımının mediatörleri olarak önerilmektedir (19). Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 6 (TRPV6), üreme organlarından uterus ve plasentadan eksprese edilmektedir. Uterusta TRPV6'nın, endometrial ve glandular epitel hücrelerinde eksprese edilmesinin üreme sisteminde fetal implantasyon, Ca^{+2} homeostazı ve endometriyal hücre üretimine katılabileceğini göstermektedir. Plasental TRPV6, fetusa Ca^{+2} transportunda önemli rol oynamaktadır (20). Plazma Membran Ca^{+2} ATPazlar (PMCA), sitozolün dışına Ca^{+2} 'u pompalayan ATP-bağımlı taşıyıcılardır. İnsanlarda ve diğer memelilerde, farklı genler tarafından kodlanan dört ana PMCA izoformu (PMCA1, 2, 3 ve 4) bulunmaktadır. PMCA1, ilk kez eritrosit membranında belirlenmiş ve Ca^{+2} iyonlarına yüksek affinitesi olduğu bulunmuştur. PMCA1, hücre içerisinde düşük sitozolik Ca^{+2} seviyesini koruyarak Ca^{+2} homeostazına katılmaktadır (21).

Endometriozis ve açıklanamayan infertilite, henüz fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılmamış bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda konu ile ilgili kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Ancak literatürde endometriozisli ve açıklanamayan infertilite öyküsü olan hastalarda Ca^{+2} homeostazında önemli rol oynayan TRPV6 ve PMCA1'in ekspresyonu ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla, endometriozisli ve açıklanamayan infertil hastaların mid-sekretuar faz endometriyumunda belirtilen proteinlerin ekspresyonlarındaki olası değişikliklerinin saptanması, infertilitenin nedenine yönelik açığa kavuşmayan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

Kontraseptif bir yöntem uygulamadan, haftada en az iki kez düzenli bir cinsel ilişkiye rağmen, bir yıl süreyle gebelik oluşmamasına infertilite adı verilmektedir. İnfertilite üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %15'inde görülmektedir. İnfertilitenin sıklığı ve nedenleri bir toplumdan diğerine farklılık gösterir. Çiftlerin %30-40'ında erkek kaynaklı, %40-45'inde kadın kaynaklı nedenler infertiliteye neden olur. Çiftlerin %10-15'inde ise günümüzdeki standart tanısıl testler ile tanı konulamadığı için bu durum açıklanamayan infertilite olarak isimlendirilir. İnfertilite, primer ve sekonder infertilite olmak üzere iki şekilde değerlendirilir. Daha önce hiç gebelik oluşmamışsa primer infertilite, buna karşılık daha önce canlı doğumla sonuçlanmış veya sonuçlanmasın en az bir gebelik oluşmuşsa sekonder infertilite olarak tanımlanmaktadır. Kadınlarda infertiliteye neden olan sebepler ovulatuvar bozukluk (%30-40), tubal ve peritoneal patolojiler (%20-40), açıklanamayan nedenler (%10-15), servikal ve immünolojik faktörler (%1-2) olarak bilinmektedir (22).

2.1.1. Tubal/Peritoneal İnfertilite Nedenleri

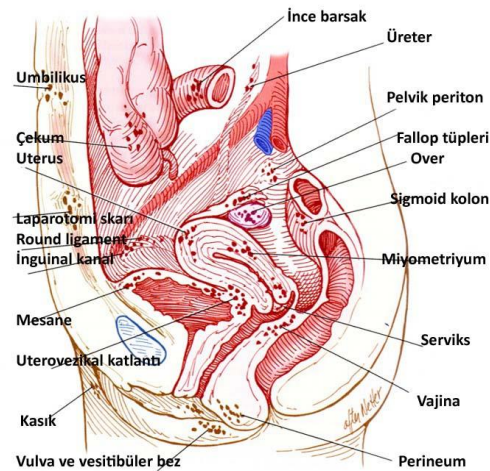
Tubal/peritoneal faktörler kadınlarda infertilitenin ikinci sık nedeni olarak görülmektedir. Fallop tüplerinin obstrüksiyonu enfeksiyon kaynaklı olabilir. Özellikle klamidya enfeksiyonları başta olmak üzere sık geçirilmiş pelvik inflamatuvar hastalık veya tüberküloz gibi hastalıklar tubal tıkanıklıklara veya tubalarda fonksiyon bozukluklarına yol açabilmektedir. Peritoneal faktör denilince fallop tüpleri, uterus, ovaryumlar, barsaklar, omentum ve diğer peritoneal yüzeyler arasındaki yapışıklıklar anlaşılmaktadır. Bu yapışıklıklar tuba fonksiyonu, tuba ile over ilişkisini bozabilir. Tuba-peritoneal infertiliteye sebep olabilecek patolojiler arasında sınıflandırılan endometriozis hem pelvik adezyonlara yol açarak hem de adezyondan bağımsız olarak infertilite etyolojisinde rol oynamaktadır (23).

2.1.1.1. Endometriozis

Endometriozis; endometrial bez ve stromanın uterus dışında (ektopik olarak) bulunması şeklinde tanımlanan, pelvik ağrı ve infertilite gibi iki önemli klinik probleme neden olan kronik bir jinekolojik hastalıktır (24). Doğurganlık yaş grubundaki kadınların %10'unu etkilemekte iken, kadın infertilitesi olgularının %50'sinde, kronik pelvik ağrısı olan kadınların ise %60'ında görülmektedir (25).

Endometriozis, pek çok rahatsızlığı içinde barındıran bir hastalıktır. Bu hastalık pek çok tabu, gecikmiş teşhisler, başarısız gelişigüzel tedaviler, bilinç eksikliği gibi durumlarla çevrelenmiş ve bazıları için kronik bir duruma dönüşen çok sayıda değişik bulguları içermektedir. Endometriozis problemi, hastanın semptomlarını kontrol altına almak, yaşam kalitesini düzeltmek ve fertilitasını sağlamak amacıyla, bu kadınlara yardım etmeye çalışan hekimlere kadar uzanmaktadır (26). “Hastalığın en kötü aşamalarında, bu hastalık, kadının iyilik halini tamamen olumsuz etkiler, hastanın tüm maneviyatı yıkılır ve ileride daha kötü acılar çekme korkusu ile yaşar...” Bu cümleler Louis Brotherson tarafından 1776'da yazılmıştır (27) ve bu cümleler 233 sene sonra günümüzde pek çok endometriozisli kadının yüzyüze kaldığı durumu tam olarak ifade etmektedir.

Unilateral veya bilateral overler, fossa overikalar, ligamentum latum, anterior ve posterior kuldesak, uterosakral ligamentler, pelvik periton başta olmak üzere, barsaklar, mesane, üreterler ve posterior vajinal fornikste derin infiltrasyon şeklinde yerleşim gösterebilirler (Şekil 2.1). Ayrıca pelvis dışında; beyin, böbrek, akciğerler, plevra ve laparotomi skarlarında da nadiren görülür (28, 29).



Şekil 2.1. Endometriozisin anatomik yerleşimlerini gösteren şematik resim (30).

Hastalığın etyopatogenezi net olarak bilinmemesine rağmen, hastalığın oluşumu ile ilgili bazı teoriler ortaya atılmıştır. Bunlar; retrograd menstruasyon, çöломik metaplazi-indüksiyon, vasküler/lenfatik yayılım teorileridir. Bu teorilerin hiçbiri tam olarak dışlanmamışsa da, endometriozis oluşumundaki ilk hamlenin, peritoneal implantların olduğu tipteki hastalığın gelişiminde, retrograd menstruasyon olduğu kabul edilmektedir (31, 32).

I. Retrograd Menstruasyon Teorisi:

Retrograd Menstruasyon teorisi 1920'lerde ortaya atılmıştır ve halen en yaygın kabul edilen teori olarak görülmektedir. Menstruasyon sırasında dökülen endometrial dokuların fallop tüpleri aracılığıyla periton boşluğuna taşındığını ve pelvik organların yüzeylerine implante olduğunu öne sürmektedir. Pek çok kanıt bu teorinin endometriozis patogenezinde temel mekanizma olduğunu desteklemektedir. Menstruasyon sırasında peritoneal sıvıdan elde edilen endometrial hücreler kültürde çoğaltılabilmekte ve peritonun mezotel yüzeyine tutunup penetre olabilmektedir. Kısa menstruel siklusu olan ve kanamanın uzun sürdüğü kadınlarda endometriozis riski artmıştır (33).

II. Çöломik Metaplazi- İndüksiyon Teorisi

Peritonda (çöломik kavite) farklılaşmamış veya endometrial dokuya dönüşme potansiyeli olan hücrelerin varlığına dayanarak ortaya atılmıştır. Bu teoriye göre endometriozis, periton ve plevrada lokalize olan çöломik epitelden kaynaklanan mezotelyal hücrelerdeki spontan metaplastik değişiklik sonucu oluşur. İndüksiyon teorisi ise çöломik metaplazi teorisinin genişletilmiş şeklidir ve peritona yayılmış endometrial debrisin, farklılaşmamış periton hücrelerini aktive ederek metaplaziye gitmesini sağlayan faktörler salgıladığını ileri sürer. Periton hücrelerinin kendiliğinden ya da bir etken yardımı ile metaplazi geliştirdiğini gösteren bir delil bulunmamaktadır (34).

III. Vasküler/Lenfatik Yayılım Teorisi

Pelvisten uzak organlarda ortaya çıkan endometriozis implantasyonlarını açıklamak amacıyla ortaya atılmış bir teoridir. Ekstra pelvik endometriozis odaklarında, endometrial hücrelerin uterin damar ve lenf sistemi ile taşınması nedeniyle olabilir. Ovaryan endometriozis gibi en sık görülen yerdeki bu hastalık, uterustan overlere olan

lenfatik akım ile açıklanabilir. Endometrial adenokarsinomun lenfatik yolla yayılma eğilimi, endometriyumun bu yolla kolaylıkla taşınabildiğini göstermektedir. Ayrıca uterus venlerine intravenöz olarak endometrial doku enjeksiyonu sonrası pulmoner endometriozis görülmüştür (35).

2.1.2. Klinik semptomlar

Endometriozis genellikle yerleştiği bölgeye göre klinik belirti ve bulgu veren bir hastalıktır. Endometriozisin en sık semptomları, daha çok menstruasyon sırasında şiddetlenen pelvik ağrı, disparoni, anormal menstruel kanama ve infertilitedir. Birçok endometriozisli kadın tamamen asemptomatiktir. Ancak subfertilitesi, dismenore ve disparoni veya kronik pelvik ağrısı olan kadınlarda endometriozisten şüphelenilmelidir. Ağrı, endometriozis ile ilişkili en sık görülen belirtiler arasındadır. Hastalarda ağrıya neden olan olası mekanizma; periton boşluğundaki inflamatuvar sitokinlerin etkisi, doku hasarı ile birlikte olan derin infiltrasyon ve endometriotik implantlardaki bölgesel kanamanın doğrudan ve dolaylı etkileri olabilir (36).

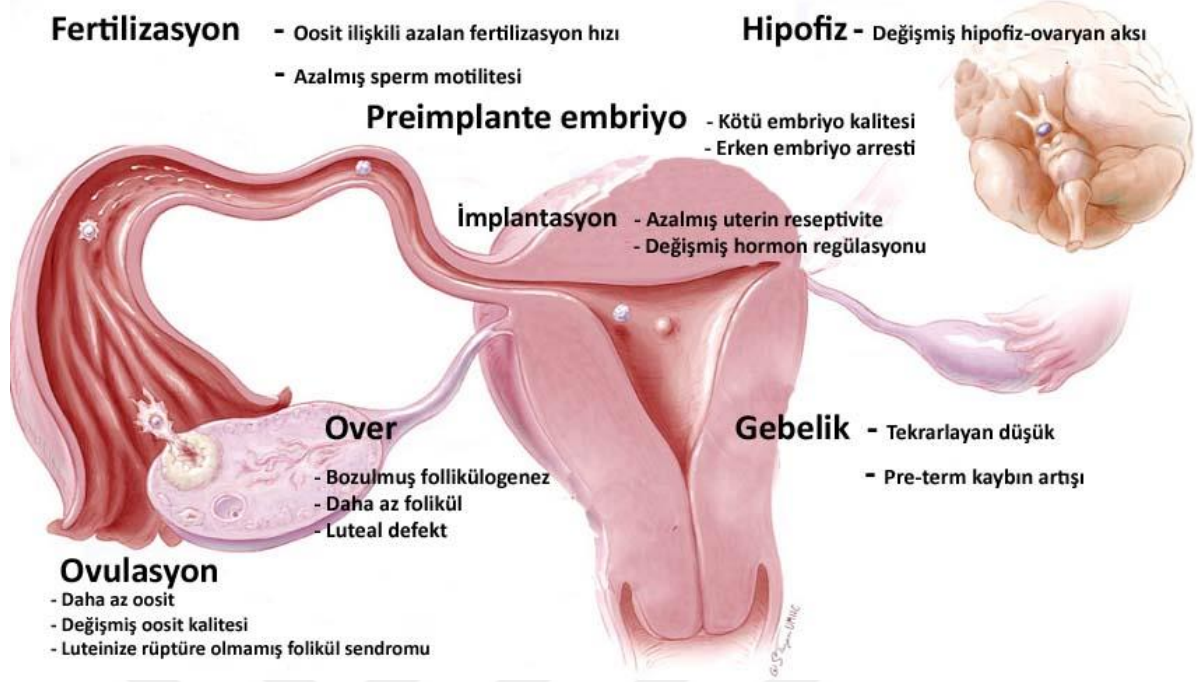
2.1.3. Endometriozis ve İnfertilite

Endometriozis ve infertilite ilişkisi karmaşık ve tartışmalıdır. Endometriozisi olan tüm kadınların infertilite problemi yaşamadığı gerçeği ve infertilitesi olan kadınların %50 kadarında endometriozis tanısının konulması, endometriozisli kadınlarda infertilite gelişiminde rol alan mekanizmaların karmaşıklığını vurgulamaktadır (37).

Endometriozis tanısı alan kadınlarda infertilitenin nedenine yönelik bilgiler hala netleşmemiştir. İleri evre endometriozisli kadınlarda bozulan pelvik anatominin tuboperitoneal adezyonlara neden olarak fertilitiyi düşürmesi beklenebilir (38). Endometriozisin infertiliteye neden olduğu mekanizmaları sorgularken, endometriozisi olan ve olmayan kadınlarda in vitro fertilizasyon (IVF) sonrası elde edilen gözlem sonuçlarını incelemek gerekmektedir. Endometriozisli kadınlarda IVF ile ilgili yapılmış birçok gözlemsel çalışmanın sonuçları farklıdır, ancak bu veriler değerlendirildiğinde; değerli bilgiler sunarlar. IVF sonrası elde edilen sonuçlara göre hastalığın oosit kalitesi, embriyogenez ve endometrial reseptivite gibi çeşitli basamaklarda fertilitiyi olumsuz

etkilediği düşünölmektedir. Normal pelvisli kadınlara göre hafif endometriozisli kadınlarda aylık fekundabilite oranları oldukça az bulunmuştur (39). Pellicer ve ark.'larının (40) yaptığı bir çalışmada endometriozisli kadınlardan toplanan oositlerin, endometriozisi olmayan kadınlardan elde edilenlere göre daha az sayıda blastomere sahip oldukları gözlenmiş, bu embriyolarda arrest ve anormal morfolojik gelişime daha sıklıkla rastlanmıştır. Endometriozisli kadınlardan elde edilen oosit sayısı, implantasyon ve fertilizasyon oranları, tubal faktör infertilitesi olan kadınlardan oldukça düşük bulunmuştur (41). Yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar, hem uyarılmış hem de uyarılmamış sikluslarda IVF sonrası fertilizasyon ve embriyo klivaj oranlarının, kontrole göre endometriozislilerde anlamlı oranda düşük olduğunu bildirmişlerdir (42, 43). Endometriozisli hastaların periton sıvısındaki çeşitli faktörler spermatozoonun oositi fertilize etme yeteneğini bozmaktadır. Bu hastaların periton sıvısındaki IL-6 ve reseptörü sperm hareketliliğini azaltmaktadır (44).

Uterin reseptivite hormonlar, sitokinler, adezyon molekülleri ve diğer faktörlerle düzenlenen gelişmekte olan embriyonun implantasyonunu sağlayan karmaşık bir süreçtir. Endometriozisli kadınların endometriyumunda homeobox geni HoxA10 ekspresyonunun azaldığı ve metilasyonunun değiştiği bildirilmiştir. Ayrıca, $\alpha\beta3$ integrin ekspresyonunun endometriozisli kadınların endometriyumunda yaklaşık %50'sinde azaldığı ve bazı durumlarda ekspresyonunun olmadığı saptanmıştır (45). Glikodelin A (GdA), osteopontin, lösemi inhibitör faktör (LIF) ve lizofosfatidik asit reseptör 3 endometriozisli kadınlarda ekspresyonu azalan diğer uterin belirteçlerdir (46, 47). Nitekim, endometriozis bir kadının üreme sisteminin her parçasını etkilemektedir (şekil 2.2).



Şekil 2.2. Endometriozisli kadınlarda azalan fekundite ile ilişkili faktörler (48).

Follikülogenez, endometriozisi olan kadınlarda bozulmaktadır. Preovulatuvar folliküllerin sayısı, follikül gelişimi, dominant follikül çapı ve folliküler östrodiol konsantrasyonları bu hastaların overlerinde azalmaktadır (49, 50). Endometriozis embriyo gelişimini de olumsuz etkilemektedir. Endometriozisli kadınlardan alınan periton sıvısında in vitro ortamda kültüre edilen fare embriyolarının iki hücreli evreden sonra gelişim hızının azaldığı belirtilmiştir (51). Benzer bir araştırmada, endometriozisli kadınların periton sıvısında kültüre edilen fare embriyolarının kontrol periton sıvısındaki embriyolar ile karşılaştırıldığında DNA fragmantasyonu ve apoptozisin arttığı gösterilmiştir (52). Ayrıca, bu hastaların periton sıvısı, sağlıklı donörlerden alınan spermin DNA fragmantasyonunu arttırmaktadır (53).

2.1.4. Endometriozis Tedavisi

Endometriozis tedavisindeki amaç, hastalığa bağlı olarak oluşan semptomların ortadan kaldırılması, fertilitenin sağlanması ve korunmasıdır. Endometriozis tedavisi ve takibi uzun süre gerektiren bir hastalıktır. Günümüzde uygulanan birçok tedavi seçeneği mevcuttur. Fakat, hangi tedavinin hangi hasta için daha uygun olduğuna karar verebilmek

için hastanın yaşı, semptomların şiddeti ve süresi, çocuk sahibi olma isteği, menopozal durumu gibi birçok faktör göz önüne alınmaktadır. Endometrioziste laparoskopi hem tanı hem de tedavi seçeneği sunabilmektedir. Tedavi, semptomların tedavisi (medikal tedavi) ve hastalığın kendisinin tedavisi (cerrahi tedavi) şeklinde iki grupta ele alınmaktadır (54).

2.1.4.1. Medikal Tedavi

Ağrılı semptomları gidermek, endometriozis odaklarının yayılımını ve boyutunu azaltmak endometrioziste medikal tedavinin amacını oluşturmaktadır. Medikal tedavinin infertiliteyi düzeltme etkisi tartışılabilir olsa da, semptomlara yönelik tedavinin etkili olduğuna dair elde kanıtlar vardır (54).

Analjezikler, oral kontraseptifler, Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) agonistleri, progesteronlar, androjenik ajanlar ve aromataz inhibitörleri kadınlarda tedavi seçeneği olarak düşünülmektedir. Analjezikler prostaglandinlerin üretimini azaltarak etki gösterir. Oral kontraseptifler dismenore ve pelvik ağrısı olan hastalarda ilk tedavi olarak kullanılabilir. Aromataz p-450 enziminin aktivitesini baskılayan aromataz inhibitörleri; ağrı tedavisi ovulasyon indüksiyonu ve IVF protokollerinde kullanılabilir (55). GnRH agonistleri; pitüiter GnRH reseptörlerine bağlanarak Luteinizan Hormon (LH) ve Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) sentez ve salınımını stimüle ederler. GnRH agonistleri tedavide üçüncü tercih olarak önerilmektedir (56). Progesteronlar endometriotik implantların büyümesini, ovaryan hormone üretimi ve gonadotropin sekresyonunu engelleyerek etki göstermektedirler (57). Anrojenik ajanlardan birisi olan danazolun ise androjenik aktivitesinden dolayı tedavide kullanımı sınırlıdır (58). Sonuç olarak, progestinler, danazol veya GnRH agonistleri ile tedavinin endometriozisle beraber olan ağrıyı tedavi etmede etkili olduğu birçok prospektif, randomize ve plasebo kontrollü çalışmada gösterilmiştir (59).

2.1.4.2. Cerrahi Tedavi

Cerrahide amaçlanan endometriotik dokuların eksizye edilmesi ya da yok edilmesi, adezyonların ortadan kaldırılması ve pelvik anatominin restorasyonudur. Cerrahi tedavi laparotomi veya laparoskopi ile yapılabilmektedir. Rektovajinal yerleşimli lezyonlarda

cerrahi ilk tercih olabilirken, endometriozis ile ilişkili infertilitesi olan hastalarda ilk tercih olarak düşünülmemelidir. Cerrahi komplikasyonlar ile birlikte yarar zarar oranları ele alınmalıdır (60).

2.1.5. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite; infertilite nedenleri için yapılan tetkikler sonucunda herhangi bir neden saptanamaması olarak tanımlanır. İnfertilitenin %10-15'inden sorumlu olan açıklanamayan infertilite tanısı, bir çiftin 24-36 ay boyunca gebeliği elde edememesi ve infertilite değerlendirmesi sonucunda infertilite nedeni olabilecek bir sebep bulunmaması ile konulur (61). İnfertilite değerlendirilmesinde; menstrual öykü, bazal vücut ısısı, üriner LH ölçümü, mid-luteal serum progesteron ölçümü ve endometrial biyopsi gibi ovulasyon varlığını tespit eden tetkikler, over rezervinin değerlendirilmesi, uterus ve fallop tüplerinin normal olup olmadığının değerlendirilmesi ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerinde yer alan parametreleri içeren semen analizi gibi tetkiklerin yapılması gerekmektedir (62, 63).

2.1.5.1. Açıklanamayan İnfertilitenin Olası Nedenleri

Fertilite tedavisinde yapılan testler, üreme sisteminin değerlendirilmesinde yetersiz kalmaktadır. Defektif endometrial reseptivite, oosit ve/veya sperm fertilizasyon kapasitesi ilgili problemler, luteinize rüptüre olmamış folikül sendromu, luteal faz defektleri, peritoneal makrofaj aktivitesinde artış ve bozulmuş peritoneal sıvı antioksidan fonksiyonunun açıklanamayan infertiliteye neden olabileceği belirtilmiştir (64, 65, 66). Spermilerin fonksiyonel kapasitesinin semen analizi ile tam olarak gösterilememesi ile sperm/zona pellusida penetrasyonunun başarılı şekilde olup olmadığı öngörülememektedir. Erkek faktörü olan bazı infertil olguların bu grupta değerlendirilmesinin temeli budur. β -defensin 126 proteinini kodlayan gende oluşan mutasyonun varlığı standart semen analizinde tespit edilememektedir. Buna rağmen, intrauterin inseminasyon (IUI) veya IVF tedavileri ile mutasyonun ters etkileri ortadan kaldırılabilmektedir (67). Açıklanamayan infertilite 35 yaş üstü kadınlarda daha sık görülmektedir; mantıksal olarak açıklanamayan infertilitenin en olası gizli nedenleri,

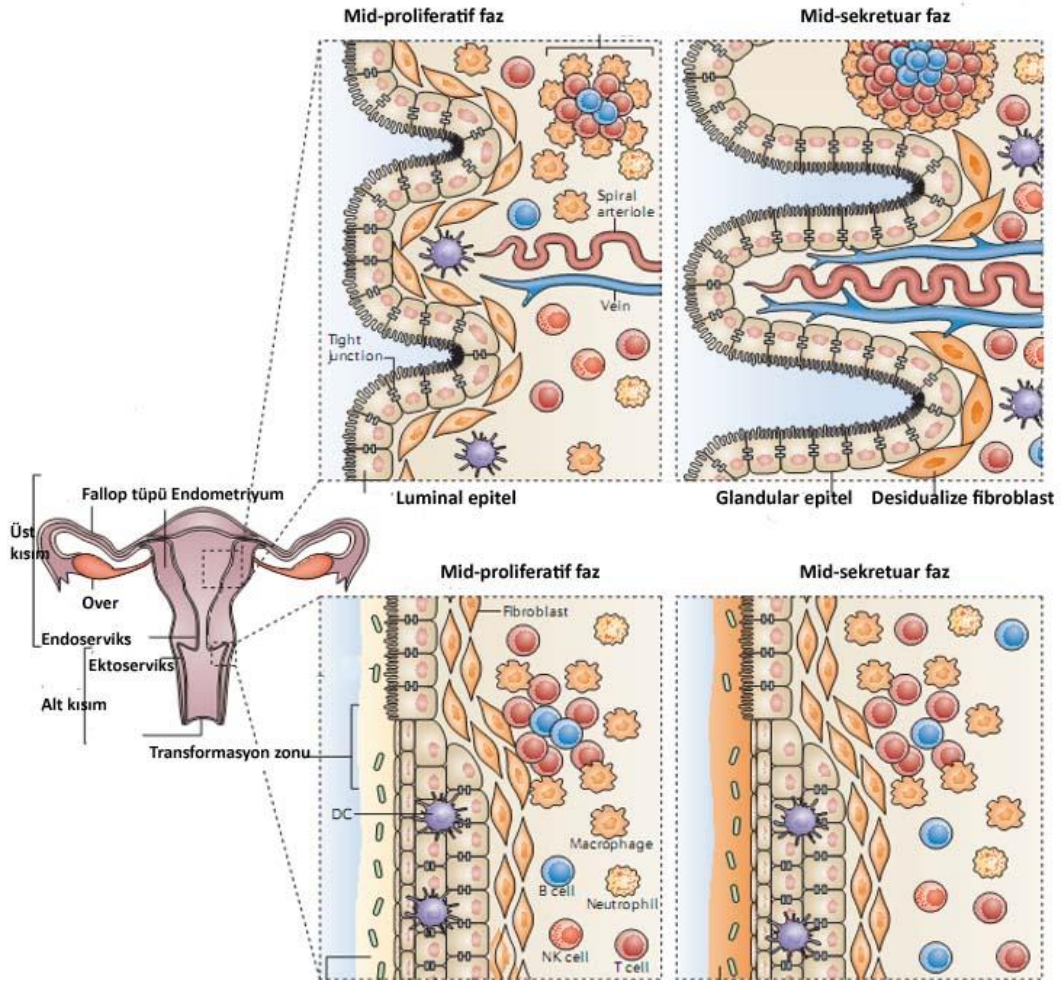
geçerli bir tanı testi olmayan gametlerdeki veya implantasyondaki anormallikler ile de olabilir. İnsan embriyolarının erken döneminde anöploidi sık görülmesine rağmen, embriyo ve trofektodermdaki bir genetik bozukluk erken gebelik kaybına neden olabilmektedir. Endometrial reseptivitedeki genetik anormallikler embriyonun apozisyon, adezyon veya invazyonunu etkilemekte ve implantasyon başarısızlığına neden olabilmektedir (68).

2.1.6.2. Tedavi

Doğurganlığı normal olan çiftlerde ortalama siklus fekundabilitesi %20-25 iken bu hastalarda siklus fekunditesi %2-4 arasında değişmektedir. Tedavi ampiriktir ve belirli zamanda karşılaşılan sperm ve oosit sayısını artırmaya yöneliktir. Hastanın yaşı ve infertilite süresi esas alınarak, klomifen sitrat ile IUI kombinasyonu, yine cevap alınamaması halinde gonadotropinlerin kullanıldığı siklusları takiben IVF önerilir. Bu basamaklar sıra ile 2-4'er siklus denenmeli ve başarısızlık durumunda bir sonraki ve daha kapsamlı tedavilere geçilmelidir (69).

2.2. Kadın Genital Sistemi

Kadın genital sistemi; menstrual siklus sırasında morfolojik değişikliklere uğrayan farklı anatomik bölgelerden oluşmaktadır. Uterus ve fallop tüplerini içeren üst bölge, vajina ve ektoserviksi içeren alt bölgelere ayrılır (Şekil 2.3) (70).



Şekil 2.3. Kadın genital sistem histolojisi ve anatomisi (70).

2.2.1. Uterus Histolojisi

Uterus, perimetriyum, miyometriyum ve endometriyum olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır.

2.2.1.1. Perimetriyum

Uterusu kaplayan visseral periton tabakası ya da dış seröz tabakası olan perimetriyum pelvik ve abdominal periton ile devamlılık gösterir. Mezotelyumdan ve ince bir gevşek bağ dokusu tabakasından meydana gelmektedir. Mezotelyumun altında bir elastik doku tabakası belirgindir. Perimetriyum anterior yüzeyin bir kısmını kaplarken posterior yüzeyin tamamını kaplar. Anterior yüzeyin kalan kısmı bağ dokusu ya da adventisya ile kaplıdır (71).

2.2.1.2. Miyometriyum

Miyometriyum, uterus duvarının en kalın tabakasıdır. Birbirinden ayırt edilemeyen üç düz kas tabakasından oluşmaktadır. Orta kas tabakası çok sayıda büyük kan damarları (venöz pleksuslar) ve lenfatikler içermektedir ve bu damardan zengin kısım ‘‘stratum vaskulare’’ adını alır. En kalın tabakadır ve sirküler ya da spiral seyirli iç içe geçen düz kas demetlerinden oluşur. İç ve dış tabakalarda bulunan düz kas demetleri uterusun uzun eksenine paralel şekilde düzenlenme gösterirler. Gebe olmayan uterusda düz kas hücreleri yaklaşık 50 µm uzunluğundadırlar. Gebelik sırasında uterus büyük ölçüde genişler. Bu büyüme primer olarak varolan düz kas hücrelerinin hipertrofisi ile sağlanır ve düz kas hücreleri yaklaşık 500 µm uzunluğuna ulaşırlar. Sekonder olarak da diferansiye olmamış mezenkimal hücrelerin farklılaşması ve varolan kas hücrelerinin bölünmesi ile yeni lifler oluşur. Bağ dokusunun miktarı da artar. Uterus serviksine doğru daralır ve kas dokusu yerini fibröz bağ dokusuna bırakır. Servikste miyometriyum daha az miktarda düz kas hücreleri ve bol miktarda elastik fiberler içermektedir (71).

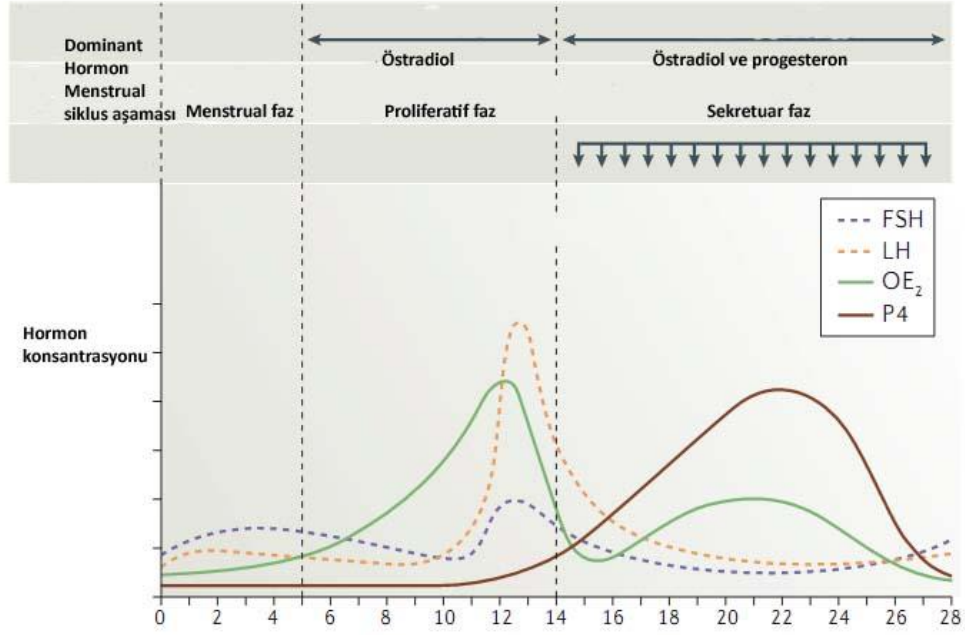
2.2.1.3. Endometriyum

Uterusun en iç katmanı olan endometriyum dinamik bir dokudur. Silyalı ve salgı yapan mikrovilluslu hücreler içeren tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Epitel hücrelerinin altında endometrial stroma adı verilen düzensiz sıkı bağ dokusu yapısında lamina propria bulunur. Menstrual siklusun sekretuar fazı sırasında prizmatik epitel hücreleri proliferasyon olarak lamina proprianın derinlerine doğru basit tüp benzeri çöküntüler yaparak uterus bezlerini oluştururlar. Böylece oluşan basit tübüler bezler az sayıda silli hücre içerirler ve endometriyumun derin kısmına doğru dallanırlar. Mezenkime benzeyen endometriyal stroma yüksek düzeyde selülerdir ve bol miktarda hücreler arası madde içermektedir. Stromada fibroblast, makrofaj, granüler lökosit ve lenfositler bulunur. Bu hücrelerin sayıları, aktivitesi, fonksiyon ve yapısı menstrual siklus ve gebelik boyunca değişmektedir. Fibroblastlar epitel altında yoğun bir tabaka oluşturarak yapısal destek sağlar Endometriyumu miyometriyumdan ayıran bir submukoza bulunmamaktadır (72, 71).

Endometriyum işlevsel olarak fonksiyonel ve bazal olmak üzere iki tabakadan oluşur. Fonksiyonel tabakanın yapısal mikroskobik özellikleri menstrüel döngünün evrelerine göre değişiklik gösterir. Bu tabaka da işlevsel özelliklerine göre iki katmandan oluşmaktadır. Üst 2/3 kısmı sıkı yapıdadır ve bezlerin daralmış boyun bölgelerini içerir, buraya kompakt tabaka (stratum kompakta) denir. Alt 1/3 kısmı ise daha geniştir ve salgıyla dolu bez gövdelerini kapsar. Süngerimsi yapıda olduğu için bu katmana süngerimsi tabaka (stratum spongiosum) denir. Fonksiyonel tabakanın damarlanması spiral arterler ile olmaktadır. Endometriyumun fonksiyonel tabakası östrojen ve progesteron hormon düzeylerindeki değişikliklerden ve spiral arterlerin kanlanmasıyla çok etkilenir. Menstrual döngünün sonunda bu kat kısmen ya da tümüyle dökülür. Bazal tabaka (stratum bazale), miyometriyuma komşu uterus bezlerinin son kısımlarını içeren 1/3 bazal bölümdür. Menstrual döngü sırasında dökülmez, menstruasyon sonrasında endometriyumun yenilenmesinden sorumludur. Bazal tabaka östrojen ve progesteron hormon kan düzeyinden etkilenmez. Endometriyum eşsiz bir kan damarları sistemine sahiptir. Uterin arterden, miyometriyumda anastomoz yapan 6-10 arkuat arter çıkar. Bu arterlerin dalları olan radial arterler endometriyumun bazal tabakasına girerler ve burada endometriyumun bu bölgesini besleyen küçük düz arterleri oluştururlar. Radial arterin ana kolu yukarı doğru devam eder ve yüksek düzeyde sarmal hale gelir. Bu nedenle bu artere spiral arter denmektedir. Spiral arterden çok sayıda arteriyol çıkar ve bunlar kapiller ağı desteklerken sıklıkla anastomozlaşırlar. Menstrual siklus sırasında düz arterler ve spiral arterlerin proksimal parçaları değişime uğramaz. Östrojen ve progesteronun etkisi altında spiral arterlerin distal parçaları her menstrual siklusta dejenerasyona ve rejenerasyona uğrar (73, 74, 71).

2.3. Menstrual Siklus

Menstruasyon; hipotalamus, hipofiz ve overler tarafından üretilen hormon etkileşimlerine yanıt olarak hücre içindeki çeşitli sinyal yollarının neticesinde ortaya çıkan etkilerin koordinasyonu sonucunda tek bir folikülün seçilerek olgunlaşması ve ovulasyonu ile sonuçlanan aylık döngü gösteren bir aktivitedir. Bu süreçte başlıca overden salgılanan steroid hormonların etkisi ile endometriyumda da değişiklikler olması sağlanarak implantasyon ve başarılı bir gebelik için hazırlık yapılmaktadır (75).



Şekil 2.4. Menstrual siklus evreleri (70).

Menstrual siklusun ortalama süresi 28 gündür. Bu döngü, hormon seviyesindeki değişiklikler ile karakterize edilen menstrual faz, proliferatif faz ve sekretuar faz olmak üzere fazlara ayrılmaktadır (Şekil 2.4). Menstrual siklusun başlangıcında, anterior hipofiz bezi tarafından salgılanan glikoprotein yapıda bir hormon olan FSH gelişmekte olan foliküldeki granüloza hücreleri ve ovaryan teka hücrelerini östradiol üretmek için uyarır. Proliferatif faz sırasında östradiol düzeyi artar ve ovulasyondan hemen önce pik yapar. Bunu, konsantrasyonunda hızlı bir düşüş takip eder. Östradiol düzeyindeki artış, anterior hipofiz bezi tarafından salgılanan LH salgılanmasını uyarır ve geç proliferatif faz sırasında LH pik yapar. 24-36 saat sonra ovulasyon gerçekleşir. Aynı zamanda, FSH düzeyi de az bir miktar artmaktadır. LH ve FSH düzeyleri erken sekretuar fazda hızla düşer. Ovulasyonun ardından, sekretuar faz sırasında korpus luteum progesteron ve östradiol kaynağıdır. Progesteron ve östradiol konsantrasyonları artarak sekretuar fazın ortasında pik yapar. FSH ve LH düzeyleri sekretuar faz süresince düşük kalır. Fertilizasyon gerçekleşmezse, korpus luteum gerileyerek östradiol ve progesteron düzeylerinde bir azalma ile endometrial dökülme ve kanamanın başlamasına neden olur (76, 70).

Endometriyum çoğalma (foliküler faz sırasında rejenerasyon), farklılaşma (luteal fazda) ve dökülme (menstrüasyon) gibi steroid kaynaklı aylık sıklusa uğramaktadır. Endometriyumun kompakt ve spongiyozum tabakası menstruasyonda yıkılır. Üst tabakanın yeniden rejenerasyonundan ise bazal tabaka sorumludur. Östrojen foliküler faz sırasında proliferatif değişikliklerden sorumlu iken, progesteron endometrial büyümeyi inhibe eder ve sekretuar faz sırasında endometrial bez ve stromal hücrelerin farklılaşmasını sağlar (77).

2.3.1. Proliferatif faz

Menstrual kanamayı izleyen 5-14. gün arasındaki evredir. Menstrual fazın sonu ve ovulasyon arasındaki süre olarak tanımlanmaktadır. Menstruasyonun başlaması ile hormonlara yanıt veren endometriyumun fonksiyonel tabakası dökülmeye başlamaktadır. Büyümekte olan foliküllerin granuloza hücrelerinden salınan östrojenin etkisi ile bazal tabaka rejenerasyon gösterir ve menstruasyon sırasında yitirilen fonksiyonel tabakanın yeniden yapılanmasını sağlar. Bu dönem proliferatif fazdır, hem bez epiteli hem de stromada hızlı çoğalma ile karakterizedir. Ovaryum folliküllerinin bir kısmının hızla büyümesiyle eş zamanlı başladığından bu evreye “folliküler faz” da denilmektedir. Proliferatif fazın başlangıcında, fonksiyonel tabaka kısa, düzgün ve dar lümenli bezler içermektedir. Östradiol düzeyinin yükselmeye devam etmesi ile bu fazın sonuna doğru bezler kısmen kıvrıntılı olurken, nispeten düzenli aralıklarını korumaktadır. Bezleri döşeyen epitel hücreleri oval nükleolus ve yoğun bazofilik sitoplazmaları ile yalancı çok katlı bir görünüme sahiptir. Stromal hücreler, oval nükleus ve dar sitoplazmalı, iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve Golgi aygıtı ile yüksek mitotik aktivite gösterirler. Küçük spiral arterler ve ince duvarlı venüller mevcuttur. Lenfositler damarların etrafında belirgin olmakla birlikte stromaya dağılmıştır (78).

Erken foliküler fazda overler hormonal olarak çok aktif değildirler. Büyüyen antral foliküllerin granuloza hücre tabakaları arttıkça aromataz aktivitesi sebebiyle östrodiol yapımı da artmaktadır. Kanda düzeyi artmaya başlayan östradiol negatif feedback ile FSH ve LH salınımını baskılamaktadır. Artan östradiol da endometriyumun proliferasyonuna neden olarak kalınlığını artırmaktadır. Endometriyum bu fazın sonunda 4-5 mm kalınlığa ulaşır (79).

2.3.2. Sekretuar faz

Ovulasyon ile mensturasyonun başlaması arasındaki süre olarak tanımlanır. Ovulasyondan hemen sonra, korpus luteumdan progesteron yapımı ve salınımı başlamıştır. Progesteron ve östrojen hormonları proliferatif fazda gelişmiş olan bezlere etki ederek bezleri daha da uyarır ve tübüler bezler genişleyerek gövdeleri kıvrıntılı hale gelir. Ovulasyon sonrası endometriyumdaki ilk değişim bez epitel hücrelerinin nükleuslarının altında vakuollerin oluşmaya başlamasıdır. Bu hücreler sekretuar fazın devamı boyunca değişken derecede vakuolizasyon göstermeye devam eder. Sitoplazmik vakuolizasyon, bezler uygun kıvrımlı bir hal aldığı sürece olan fizyolojik bir değişiktir. Bez epitel hücrelerinin apikal sitoplazması glikojen içerir. Spiral arterler endometriyal bezler ile eş zamanlı olarak uzar ve endometriyum yüzeyine kadar ulaşır. Endometrial stroma ödemli hale gelir ve endometriyum kalınlığı 7-8 mm ulaşır. Progesteronun etkisiyle uterin kavitedeki blastosist varlığından bağımsız olarak, fibroblastlar implantasyona hazırlık için desidualizasyon olarak bilinen belirgin fenotipik değişiklik gösterirler. Endometriyal stromal hücrelerin desidual hücrelere değişimi yuvarlak nükleus, GER ve Golgi sistemlerinde dilatasyon, genişleyen sitoplazmada glikojen ve lipid damlacıklarının birikimi ile ilişkilidir. Sekretuar fazın başı ve ortasında ince sitoplazmik uzantıları ödemli bağ dokuya uzanarak, glikojen ve diğer salgı ürünlerini ekstrasellüler boşluğa bırakırlar. Desidualize stromal hücreler ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesini sağlayan yoğun fagositik aktivite sergilerler. Ayrıca, trofoblast hücrelerinin denetimli çoğalmasını da sağlarlar (80).

Sekretuar aktivite faz ortasında belirgin hale gelir ve bez epitel hücrelerindeki bazal vakuoller nükleusu aşarlar. 4. haftaya kadar sekresyon bez lümenlerine verilerek, maksimuma ulaştığında bezlerde dilatasyon olmaktadır. 24-25. günlerde sekresyonun azalması ve bezlerin büzülmesi ile tırtıklı veya testere dişi bir görünüm sergilerler. Bez epitel hücreleri sekretuar fazın geri kalanı boyunca değişken derecede vakuolizasyon göstermeye devam edebilir. 21-22. günlerde spiral arterioller oldukça belirgindir. 23. günde spiral arteriollerini çevreleyen stromal hücrelerde hipertrofi ve mitoz gözlenir. 24. günde predesidual hücreler spiral arteriol etrafında belirginleşir. Bu hücreler fonksiyonallıkta oval şekilli iken poligonal şekilli olur ve sitoplazma eozinofiliktir. Sadece yüzey epiteli altında onlar içi şeklinde olabilmektedir. 26. günde, yüzey epitelinin altında ve damarların etrafındaki predesidual değişim, büyük tabakalar oluşturarak birleşir.

Predesidual reaksiyon ile birlikte, 24-28. günlerde stromada belirgin lenfosit infiltrasyonu ve dağınık nötrofilin varlığı inflamasyon anlamına gelmez. 27. günde endometriyum premenstrüeldir. Bezlerin taban kısmında apoptoz başlar. 28. günde fibrin küçük damarlarda oluşarak bunu eritrositlerin damarlardan stromaya girişi takip eder (81).

2.3.3. Menstrual faz

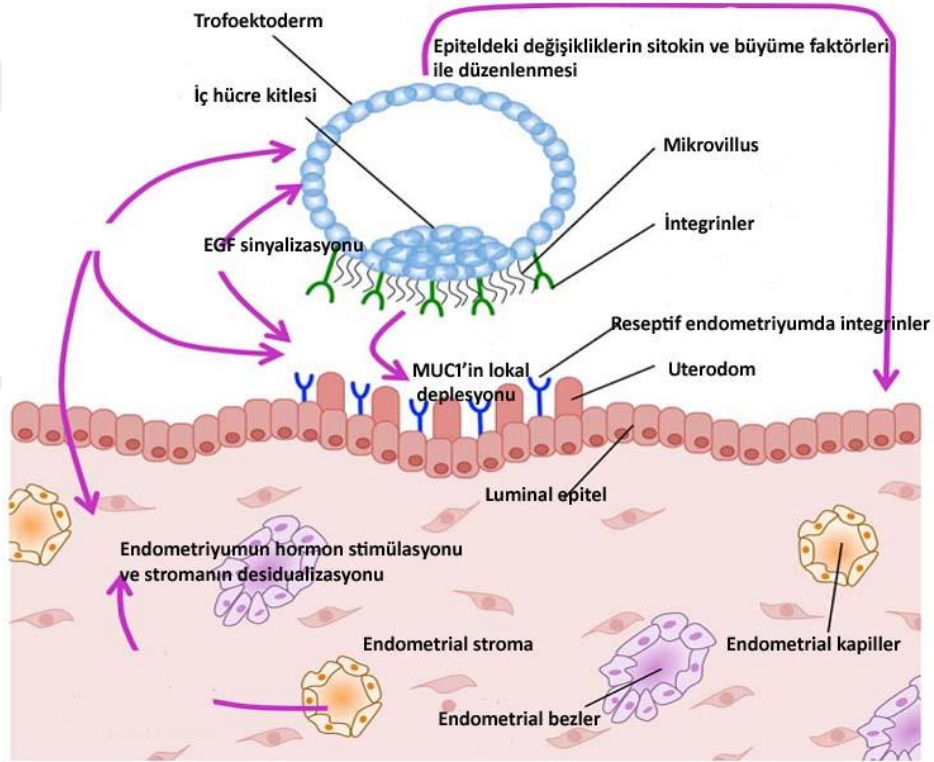
Fertilizasyon gerçekleşmez ise ovulasyon sonrasında 14. günde korpus luteumun fonksiyonu sona erer ve bunun sonucunda östrojen ve progesteron düzeyleri düşer ve menstruasyon başlar. Hormon düzeyine bağlı olarak fonksiyonel tabakanın kanlanması değişmektedir. Spiral arterlerin duvarları kasılıp gevşemeye başlar ve 2 gün sonra spiral arterlerin kasılmasına bağlı kan akımı engellenir. Fonksiyonel tabakanın oksijenlenmesinin kesilmesiyle oluşan iskemi endometriyumun fonksiyonel tabakasının bir kısmının nekrozuna neden olmaktadır. Spiral arter duvarındaki yırtılma sonucu endometriyum içine kanama olur. Nekrotik endometriyumun fonksiyonel tabakasından ayrılan epitel ve stromal hücreler ile birlikte uterus sıvısı da kan ile birlikte atılır. Menstruasyon ile atılan kan miktarı kadınlar arasında farklılık göstermektedir. Endometriyumun fonksiyonel tabakası tümüyle dökülür, geriye sadece bazal tabaka kalır. Bazal tabakadaki hücrelerin mukozayı yeniden oluşturmak için çoğalması ile endometriyum yeni bir döngüye hazırlanır (82).

2.4. İmplantasyon

İmplantasyon endometriyum ile embriyo arasında oluşan karmaşık bir diyalog çerçevesinde embriyonun desidüaya yapışması ve stromaya invaze olmasıdır. Bu diyalogu sağlayan, büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri, ekstrasellüler matriks proteinleri, sitokinler, prostaglandinler, iyon kanalları ve immunolojik faktörleri kapsayan komplike bir sistemdir. Bu sistemde meydana gelen herhangi bir aksaklık implantasyonu engellemektedir. İmplantasyon mekanizmaları tam olarak aydınlatılmadıkça endometrial uygunluğun kesin bir tanımını yapmak zordur (83, 84, 85).

Başarılı implantasyon, blastokist ve reseptif endometriyum arasındaki uyumu gerektirir. Endometriyum menstrual siklus süresince değişimler geçirir ve implantasyon

penceresi olarak adlandırılan çok kısa bir dönemde reseptiftir. İnsanlarda endometriyum menstrual siklusun mid-sekretuar fazında, ovulasyondan 6-8 gün sonra blastokist implantasyonuna reseptif hale gelir ve bu süreç 4 gün devam eder (86). İmplantasyon apozisyon, adezyon ve invazyon olmak üzere 3 aşamada sınıflandırılabilir. Apozisyon sırasında luminal epitelin apikal yüzeyinde pinopod (uterodom) olarak adlandırılan küçük uzantılar oluşur ve trofoblast hücreleri luminal epitel ile iletişim halindedir (Şekil 2.5). Adezyon, blastokist ve endometriyum arasındaki parakrin sinyalleşme ile olur. Adezyon tamamlandığında trofoblast, sitotrofoblast ve sinsityotrofoblasta farklılaşır. Embriyonun endometrial tarafında bulunan iç hücre kitlesi, endometrial stromaya invaze olur ve maternal damarlanma ile etkileşime girer (87).



Şekil 2.5. İmplantasyon öncesi embriyo ve endometriyum arasındaki siyalleşmeyi gösteren şematik resim (87).

İmplantasyon için luminal epitelin hazırlanmasında yer alan önemli bir dizi olaylar serisi bulunmaktadır. Luminal epitel yüzeyi biyolojik bir bariyer olan glikokaliks ile kaplıdır. Glikokaliks içerisinde adezyonu önleyen musin glikoproteinleri bulunmaktadır. Anti-adeziv molekülü musin 1 (MUC1), sekretuar epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde lokalize olur ve insanlarda mid-sekretuar faz sırasında ekspresyonu artar (88). Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastaların endometriyumunda

reseptif fazda MUC1'in anlamlı olarak daha düşük düzeylerde olduğu bildirilmiştir (89). Endometrial hücreler, hücre içi ve hücre dışı sinyallere yanıt olarak adezyon, göç ve invazyon gibi hücreyel süreçlere aracılık ettiği bilinen bir dizi integrin ailesine de ev sahipliği yapmaktadır. Yapılan çalışmalarda integrinlerin ekspresyonlarının siklusun mid-luteal fazında arttığı, reseptivite için önemli bir belirteç olduğu ve implantasyonun düzenlemesi ile ilgili rolleri araştırılmıştır (90). Kemirgen (91) ve insanlarda (92) $\alpha\beta3$ integrinin, implantasyon penceresi sırasında luminal ve glandular epitel hücrelerinde ekspresyonu gösterilmiştir. Açıklanamayan infertiliteye sahip hastalarda $\beta3$ integrin ekspresyonun geciktiği veya olmadığı, bunun da infertilite ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (93). Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörünün (HB-EGF), mid-sekretuar faz sırasında reseptif luminal epitelin apikal yüzeyinde bolca eksprese edildiği, embriyo ve endometriyum arasındaki erken diyalog sırasında önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca stromal ve epitel hücrelerinde eksprese edilen HB-EGF'nin desidual dönüşüm, glandular epitel sekresyonu ve endometrial hücre proliferasyonunu düzenlediği gösterilmiştir (94). GdA'nın sekretuar ve desidualize endometriyumda bol bulunan glikoproteinlerden birisi olduğu ve implantasyon için endometriyumun hazırlığında çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (95). Bastu ve ark.'larının (89) yapmış olduğu bir çalışmada, implantasyon penceresi sırasında, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan kadınların sağlıklı fertil kadınlar ile karşılaştırıldığında GdA'nın endometrial hücrelerde ve periferik kanda anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. GdA, tekrarlayan implantasyon başarısızlığını değerlendirmek için bir aday belirteç olarak görünmektedir. Notch ligand ve reseptörleri, mid-sekretuar faz sırasında luminal epitelin apikalinde lokalize olur ve endometriyum ve embriyo bağlanmasını kolaylaştırır (96). Bunun yanı sıra epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β), lösemi inhibitör faktör (LIF), E-kaderin, selektin, fibronektin, laminin, osteopontin, heparan sülfat proteoglikan, homeobox genleri HoxA10 ve HoxA11, Siklooksijenaz-2 (COX-2), interlökin 6 ve interlökin 11 gibi implantasyonda rolü olan pek çok endometrial belirteçler araştırma konusu olmuştur (97, 98).

Endometriyumda çok sayıda farklı iyon kanalları keşfedilmiştir. Bu iyon kanallarının fonksiyonel rolleri henüz tam olarak anlaşılammıştır. Endometriyumdaki iyon kanalları üzerinde çalışmalar halen sınırlı olsa da, bugüne kadar toplanan kanıtlar özellikle endometrial epitelde iyon kanallarının endometriyal reseptivite ve embriyo

implantasyonunun düzenlenmesinde önemli role sahip olduğunu ortaya koymuştur. İyon kanalları, iyonların hücre ya da organel membranları boyunca akışını sağlayan bir grup transmembran proteinden oluşmaktadır. Bu kanallar aracılığıyla iyon geçişleri; pH, Ca^{+2} sinyalizasyonu ve membran potansiyelinde değişikliklere neden olabilmektedir. Hücre çoğalması, göç, apoptoz, asit-baz dengesi, hücre hacminin düzenlenmesi, kas kontraksiyonu, nöronal sinyal iletimi ve epitel salgılama/emilim gibi bir çok fizyolojik süreçler için iyon kanalları gereklidir (99, 100).

2.5. Hücre İçi Kalsiyumun Önemi

Kalsiyum (Ca^{+2}), in vivo yaşam ve homeostaz için önemli bir iyondur. Hücre bölünmesi, hücre motilite, hormon sekresyonu, metabolizma, damar düz kasının kasılması/gevşemesi, sinir sisteminin işleyişi, protein döngüsü, gen ekspresyonu, apoptozis, oosit maturasyonu ve embriyo implantasyonu gibi süreçlerde işlevsel önemi bilinmektedir. Bu özelliği ile pek çok fonksiyonu kontrol etmesi hücre içindeki Ca^{+2} 'un düzenli olarak ayarlanmasına bağlı olmaktadır. Bütün organizmalarda hücre sitoplazmasında, hücre içi organellerde ve hücre dışı ortamda bulunmaktadır (101,102).

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun geçici bir şekilde artışı ile Ca^{+2} sinyali oluşur. Ca^{+2} sinyal oluşturma özelliği ile hücre içinde ve hücreler arası etkileşimde ikincil haberci olarak rol oynamaktadır. Hücre içerisinde Ca^{+2} 'un sinyal molekülü olarak fonksiyon görmesinin nedeni, hem hücre dışı ortama hem de hücre içinde depolayan yapılara göre hücre içi Ca^{+2} 'un çok düşük olmasıdır. Sitozoldeki Ca^{+2} konsantrasyonu yaklaşık 10^{-7} M seviyelerindedir. Hücre dışı sıvıda 10^{-3} M iken, endoplazmik retikulum (ER) gibi Ca^{+2} depolarında yaklaşık 5×10^{-4} M civarındadır. Bu nedenle, hücre dışından gelen sinyaller ile hücre sitoplazmasında serbest Ca^{+2} artışı gözlenir. Çeşitli uyarılar ile Ca^{+2} geçirgenliği çok az olan hücre membranı ve ER membranı geçirgen hale getirildiğinde, hem hücre içi ve dışı, hem de sitoplazma ve ER arasındaki Ca^{+2} gradiyenti yüzünden, Ca^{+2} iyonları hızlı bir şekilde sitoplazmaya doğru difüzyon yapar. Bu da Ca^{+2} artışına neden olur ve hücrelerdeki Ca^{+2} 'a duyarlı proteinlerin aktivasyonunu sağlar (103).

2.5.1. Blastokist implantasyon sürecinde Ca^{+2} 'un rolü

İmplantasyon sırasında maternal endometriyum ve konseptus trofoektodermi arasında hücre adezyonu için Ca^{+2} gereklidir. İntegrin, kaderin ve selektinler gibi hücre

adezyon molekülleri için bir aktivatör olarak rol oynamaktadır (104, 105).

Ca^{+2} gebeliğin başlaması ve devamı için gereklidir, ancak endometriyumda Ca^{+2} 'un düzenlenmesinin hüresel ve moleküler mekanizmaları tam olarak anlaşılmış değildir. 1994 yılından bu yana in vitro olarak etanol veya kalsitonin ile hücre içi Ca^{+2} uyarılmasının, blastokist gelişme hızını arttırdığı kabul edilmiştir. 2000 yılında, Tinel ve ark. blastokist appozisyonunu incelemek için bir model geliştirerek, endometrial hücrelerin blastokist olarak kullanılan model ile fiziksel teması sonucunda hücre içi Ca^{+2} seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir. Ca^{+2} 'daki bu artışın başarılı blastokist tutunması için çok önemli olduğu rapor edilmiştir. Blastosist ve epitel adezyonuna katılan moleküller başarılı bir implantasyona zemin hazırlayan, hücre içi Ca^{+2} sinyalizasyonunda çok önemli rol oynayan moleküllerdir. Bu moleküllerin bazıları fibronektin (FN), histamin, HB-EGF ve lizofosfatidik asit (LPA)'tir. 2002 yılında, Wang ve ark.; implantasyon sırasında, FN'nin sitoplazmik serbest Ca^{+2} seviyelerini hızla artırdığını ve ekstrasellüler matrikse blastokistin adezyonunu kolaylaştırdığını göstermiştir. FN reseptörleri aynı zamanda trofoblast gelişimi ve farklılaşması için çok önemli olan hücre içi sinyal kaskadlarını da başlatmaktadır. Blastokist ve epitel adezyonuna katılan bir diğer molekül histamindir. Liu ve ark., 2004 yılında HTR-8/SVneo (insan trofoblast hücre hattı)'nın histamin ile inkübasyonunun histamin tip-1 reseptörünü uyararak, fosfolipaz C (PLC) ve inozitol-1,4,5-trifosfat (IP_3) yolaklarının aktivasyonu ile hücre içi Ca^{+2} seviyesini artırarak trofoblast adezyon ve invazyonunu sağladığını göstermiştir. Genel olarak, histamin reseptörlerinin, IP_3 reseptörünün (IP_3R) uyarılması ile yavaş ama daha kalıcı Ca^{+2} yanıtlarını uyardığı bilinmektedir. HB-EGF, blastokistin implantasyonunda önemli rol oynayan başka bir moleküldür. Apozisyonun olduğu yerde fare endometrial epitel hücrelerinden eksprese edilmektedir. HB-EGF bağlayabilen ErbB1 ve ErbB4 olmak üzere iki reseptör bulunmaktadır. ErbB1'in protein tirozin fosforilasyonu ile hücre içi Ca^{+2} sinyalizasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada, fare blastokistinde sitozolik Ca^{+2} şelasyonu ya da protein kinaz C (PKC), kalmodulin veya N-tipi Ca^{+2} kanallarının inhibisyonunun, Ca^{+2} sinyalizasyonunu indükleyen HB-EGF'i bloke ettiği bildirilmiştir. LPA, sitozolik Ca^{+2} geçişlerini indükleyici G-proteini bağlı reseptörler aracılığı ile çalışan sinyal moleküllerinden birisidir. LPA ile fare blastokist uyarılması, HB-EGF reseptörlerinin transaktivasyonu ile trofoblast farklılaşmasını hızlandırmaktadır (106).

Hücre içi Ca^{+2} seviyesindeki veya Ca^{+2} mobilizasyonundaki artış; endometrial prostaglandin üretimi, epitel transportu, proteaz aktivitesi, epitelyal sıkı bağlantılar, HB-EGF sinyalleşmesi, blastokist-endometriyum adezyonunun düzenlenmesi gibi implantasyon ile ilgili çeşitli süreçleri olumsuz etkilemektedir (102).

Sonuç olarak, hücre içi Ca^{+2} sinyalizasyonu başarılı embriyo ve plasenta gelişimi ile sonuçlanan implantasyon öncesi ve sonrası blastosist gelişiminde ve implantasyonda anahtar rol oynamaktadır.

2.6. Ca^{+2} kanalları

Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişini sağlayan 3 tip Ca^{+2} kanalı bulunmaktadır. Bu iyon kanalları çeşitli uyarıların etkisi ile Ca^{+2} 'un plazma membranı ve endoplazmik retikulum (ER) membranlarından geçişini sağlarlar (103).

1. Voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları (VDCC)

Membran depolarizasyonu sonucu aktive olan kanallardır. Bu Ca^{+2} kanalları; aksiyon potansiyel oluşumu, nörotransmitter ve hormon salınımı, kas kasılması, sinaptogenez, Ca^{+2} bağımlı gen ekspresyonu, sinaptik plastisite ve hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerde plazma membranının depolarizasyonunu sağlarlar. Hücrenin dinlenme potansiyelinde kapalı iken sadece depolarizasyonda açıktırlar. Aktivasyon ve inaktivasyon kinetiklerine bağlı olarak L-tipi, P-tipi, Q-tipi, N-tipi ve T-tipi olmak üzere farklı tipte sınıflandırılırlar. Bunlardan L-tipi kanallar, desidualizasyon ve implantasyona katılmaktadır. Sığır endometriyal eksplantlarında, L-tipi kanal aktivasyonunun prostaglandin sentezini indüklediği gösterilmiştir (103).

2. Ligand Bağımlı Ca^{+2} Kanalları

Ligandların bağlanması ile aktive olarak Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Aynı zamanda birer reseptör olan bu kanalların bir kısmı kendilerine bağlanan bir ligand ile doğrudan aktive olurken bir kısmı da membran potansiyeli değişikliğinden etkilenmektedir. Bu kanalların bazıları, Ca^{+2} dışındaki katyonlara da geçirgendirler. Bu kanallar seçici olmayan katyon kanalları olarak da adlandırılırlar (103).

3. Depo Boşalması ile Aktive olan Ca⁺² Kanalları

Kasta SR ve kas dışındaki hücrelerde ER'un en önemli fonksiyonlarından birisi Ca⁺² deposu olmasıdır. Bu kanallar hücre depolarındaki Ca⁺²'un, Ca⁺² sinyali sonucu ya da farklı bir şekillerde boşalması ile aktive olan, hücre dışından hücre içine Ca⁺² geçişini sağlamaktadır. Ca⁺² depolarının boşalması ile aktive olarak, Ca⁺² sinyalini ve hücre içi Ca⁺² homeostazını düzenlerler. Geçici reseptör potansiyel (TRP) kanallarının bazılarının depo boşalması ile aktive olan kanallar olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Bu kanallar Ca⁺² iyonundaki değişikliklere, hücre içine membrandan Ca⁺² için giriş yolları oluşturarak ve organellerden Ca⁺² salınımını da düzenleyerek önemli katkıda bulunurlar. ER ve kas sarkoplazmik retikulum (SR), Ca⁺² deposudur. Depolardan Ca⁺² çıkışı inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörleri (IP3R) ve ryanodin reseptörleri (RyR) ile olmaktadır. Uyarılabilir olmayan hücrelerde, Ca⁺² sinyalini oluşturan mekanizma, IP3 etkili Ca⁺² salınımıdır. IP3, ER yüzeyindeki bulunan IP3R kanallarını aktive ederek Ca⁺²'a geçirgen hale getirir. Böylece sitozolde ani bir Ca⁺² artışı olur. Sarkoplazmik/Endoplazmik Retikulum Ca⁺²-ATPazlar (SERCA) Ca⁺²'u depoya, plazma membran Ca⁺² ATPaz (PMCA) pompaları ise hücre dışına uzaklaştırarak Ca⁺² iyonunu dengeye getirir. RyR ise voltaj bağımlı Ca⁺² kanallarından giren Ca⁺² tarafından aktive edilmektedir (103).

Endometriyumda voltaj-bağımlı Ca⁺² kanalları ve geçici reseptör potansiyel kanalları dahil olmak üzere iki tip kanal ailesi bulunmaktadır.

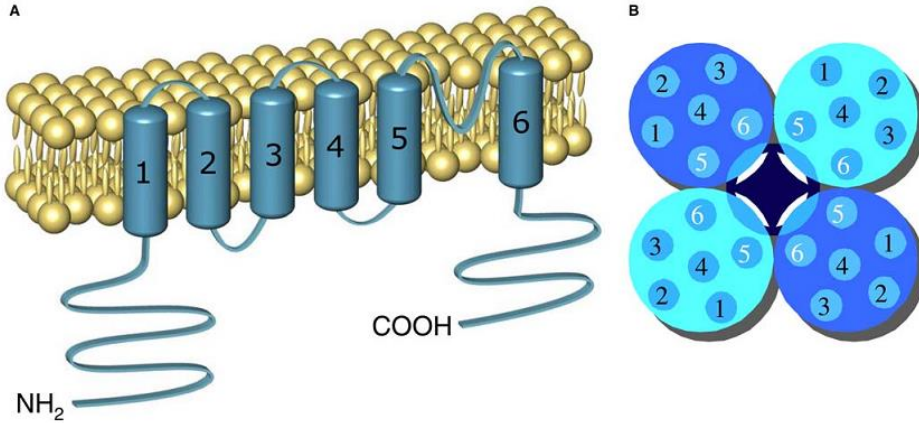
2.6.1. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanalları

TRP kanalları, endometriyumda da eksprese edilen voltaja bağımlı olmayan Ca⁺² geçirgen katyon kanalları ailesidir (104). Memelilerde 28 farklı TRP kanal genleri tanımlanmıştır. Amino asit benzerliklerine göre TRP kanalları 6 alt gruba ayrılmaktadır: **TRPC** (kanonik, TRPC1-7), **TRPM** (melastatin, TRPM1-8), **TRPV** (vanilloid reseptör, TRPV1-6), **TRPA** (ankirin zengin protein, TRPA1), **TRPP** (polisistin, TRPP2, TRPP3, TRPP5) ve **TRPML** (mukolipin, TRPML1-3) (105, 106).

2.6.1.1. TRPV6 Kanalı

TRPV6, epitel Ca⁺² kanalı (ECAC2) veya Ca⁺² taşıyıcı 1 (CaT1) olarak da bilinir (107). Hücre içine Ca⁺² alımını sağlayan, epitel hücrelerinin apikal membranında

lokalize olan Ca^{+2} kanalıdır (108). Altı transmembran bölge, transmembran segmentinden 5 ve 6 arasında Ca^{+2} poru oluşturan kısa bir bölge, hücre içi N- ve C- terminal bölgelerden oluşmaktadır (Şekil 2.6). N-terminal bölge birçok proteinlerde mevcut olan ve protein-protein etkileşimlerinde önemli bir rol oynayan üç ankirin tekrarı içermektedir. Ankirin tekrarları ile hücre iskeletine bağlanabilmektedir. N- ve C-terminal kuyrukları moleküler iskeletin bir parçası olarak işlev görebilen PDZ (Postsinaptik dansite-95, Drosophila diskleri-büyük protein, zonula okcludens protein 1) motifleri içerir. TRPV6'nın son dört aminoasiti PDZ-bağlayıcı motiflerdir. Bu etkileşim ile taşıyıcılar, iyon kanalları ve reseptörleri hücre içinde aktivitelerini düzenleyen sinyal molekülleri ile birleştirmektedir. Aynı zamanda N- ve C-terminal kuyrukları PKC, siklik adenosin monofosfat (cAMP)-bağımlı protein kinaz (PKA) ve Ca^{+2} /kalmodulin-bağımlı protein kinaz II (CaMKII) için çeşitli fosforilasyon bölgelerine de sahiptirler. Bu fosforilasyon bölgelerinin pek çoğu TRPV6'nın fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır (109, 110).



Şekil 2.6. (A) TRPV6'nın yapısal organizasyonu (B) Tetramerik (homo-hetero) yapısı (110).

TRPV6; duodenum, jejunum, ileum, böbrek, pankreas, prostat, testis, meme, tükürük bezleri, uterus ve plasenta dahil olmak üzere birçok dokuda eksprese olmaktadır (111, 112, 113).

Ca^{+2} , un sitozole alınışı başlıca TRPV5 ve TRPV6 olmak üzere son derece seçici kanallar aracılığı ile olmaktadır. Hücre içerisinde bulunan Ca^{+2} -bağlayıcı proteinler olan kalbindinler (kalbindin-D28k ve kalbindin-D9k), hücrenin apikalinden bazolateraline Ca^{+2} ,un taşınmasına aracılık ederler. Bu proteinler, Ca^{+2} artışına bağlı olarak ortaya

ve endometriyal hücre üretimine katılabileceğini göstermektedir (118).

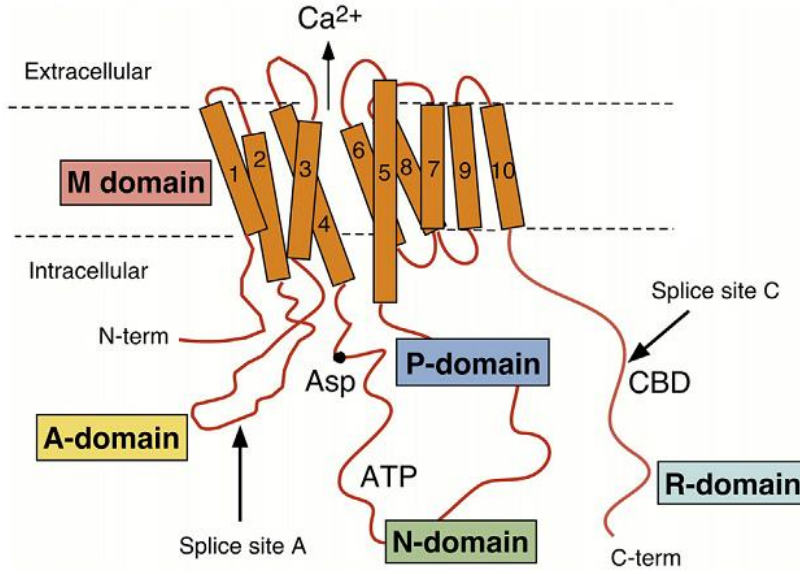
2.7. Sitozolden Ca^{+2} 'un uzaklaştırılması

Sitozolden Ca^{+2} 'un uzaklaştırılması yani hücre içindeki depolara Ca^{+2} 'un alınması; SERCA ile ER'a Ca^{+2} alınımının artması, Na^+-Ca^{+2} “exchange” (değiş-tokuş) ve hücre membranındaki PMCA ile hücre dışına Ca^{+2} 'un atılması ile olmaktadır (119).

2.7.1. PMCA1

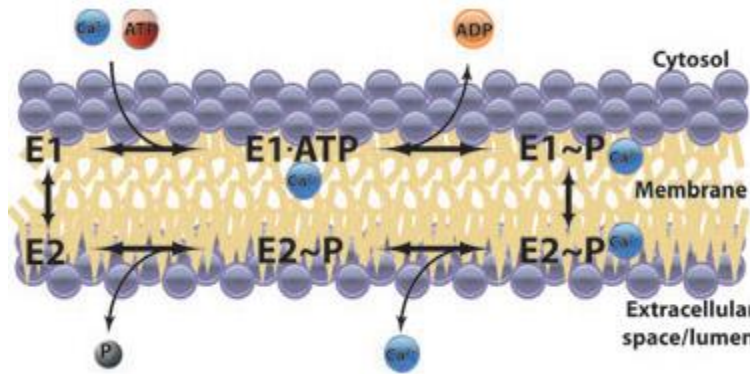
Ca^{+2} kanallarından birisi olan PMCA1, Ca^{+2} bağlayıcı proteinler ve diğer taşıyıcı sistemler ile birlikte çalışarak Ca^{+2} homeostazının kontrolünü sağlar (120, 121). Hücre Ca^{+2} 'un kontrolü hücrenin en önemli işlevlerinin düzenlenmesinde zorunlu bir ihtiyaç olmaktadır. Çünkü hücre içinde hassas bir denge halinde bulunan Ca^{+2} miktarının aşırı derecede artması, hücrelerdeki apoptotik yolağı tetiklemektedir (122). Plazma membranında PMCA ve Sarkoplazmik/Endoplazmik Retikulumda SERCA olarak bulunurlar. Ca^{+2} 'u sitozolden hücre dışı ortama veya organellerin lümenine aktarırlar. Bütün bu taşıma sistemlerinin uyumlu çalışması, Ca^{+2} 'un hücre yaşam gerekliliklerine göre düzenlenmesini sağlamaktadır (123).

PMCA, ilk olarak eritrosit membranında (Schatzmann, 1979) ve daha sonra çok sayıda diğer hücre tiplerinde karakterize edilmiştir (124). PMCA, 4 farklı gen (PMCA1-4) tarafından kodlanmaktadır ve pek çok varyantları spesifik doku dağılımı, hücrel lokalizasyon ve fonksiyonel çeşitliliğe neden olmaktadır. PMCA 1 ve PMCA 4 tüm dokularda eksprese olurken, PMCA 2 ve PMCA 3 özellikle beyin ve kalp gibi özelleşmiş dokularda eksprese olmaktadır (125). PMCA1, 10 transmembran (TM) bölge ve sitozolik alanda düzenlenmiş N- ve C- terminal uçlarından oluşmaktadır. Pompanın sitozolik kısmı üç ana bölge içermektedir: TM2 ve TM3 arasındaki kısım, uyarıcı asidik fosfolipid bağlayıcı bölge ve reaksiyon siklusu sırasında fosforile olan aspartat kalıntısı ve ATP bağlanma bölgesini içeren TM4 ve TM5 arasındaki intrasellüler kısım ve pompanın en önemli düzenleyici bölgesini içeren oldukça uzun C-terminal kuyruğudur. C-terminal kuyruğu da kalmodulin bağlayıcı bölge, protein kinaz C ve protein kinaz A için fosforilasyon bölgesi içermektedir (Şekil 2.8) (126).



Şekil 2.8. PMCA yapısının şematik resmi (126).

PMCA pompaları, sitozolik Ca^{+2} seviyesinin korunması için gerekli olan yüksek afinite, düşük kapasiteli enzimlerdir. Bu pompalar reaksiyon döngüsü sırasında bir ara madde aspartil-fosfat oluşumu ile karakterize edilen P tipi ATPaz ailesine aittir: pompanın iki yapısal durumu tanımlanmıştır. E1 durumunda, plazma membranının sitoplazmik tarafına yüksek bir afinite ile Ca^{+2} 'u bağlar. ATP ile değişmeyen aspartatın fosforilasyonu enzimin yapısal değişikliğini sağlar ve $E1\sim P \rightarrow E2\sim P$ değişimi olur. E2 durumunda Ca^{+2} afinitesi düşer, hücrenin dışına Ca^{+2} 'u bırakır. Ca^{+2} salınımından sonra E2-P ayrılarak E1 yapısına dönmektedir (Şekil 2.9) (127).



Şekil 2.9. Ca^{+2} -ATPazlar taşıma döngüsünün şeması (127).

PMCA1, tüm hücre ve dokularda eksprese edilmektedir ve yokluğu farelerde embriyonik ölüme yol açar (128). Yapılan çalışmalar; TRPV6 ve PMCA1'in uterus, plasenta, duodenum, böbrek ve beyinde Ca^{+2} homeostazının düzenlenmesinde bir rolü olduğunu göstermiştir (129, 130, 131). In situ hibridizasyon analizinde, domuzlarda PMCA1 mRNA'nın gebelik sırasında endometriyumun luminal ve bez epitel hücrelerinde ve stromal hücrelerde lokalize olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar erken gebelik sırasında endometriyumda Ca^{+2} çıkışını düzenleyen bu moleküllerin gebeliğin başlaması ve devamında önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadır (132). İnsan endometriyal PMCA1'in, endometriyal ve glandular epitel hücrelerinin sitoplazmasında eksprese edilmesinin insan üreme sisteminde fetal implantasyon, Ca^{+2} homeostazı ve endometriyal hücre üretimine katılabileceğini göstermektedir (118). İnsan plasentasında, PMCA1 sinsityotrofolblastlardan fetal tarafa Ca^{+2} 'un aktarılmasını sağlayan temel proteindir. Fonksiyonları, hücre içerisindeki fazla Ca^{+2} 'u ortadan kaldırarak sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu korumaktır. Preeklampitik plasentadan kültüre edilen sinsityotrofolblastlar tarafından Ca^{+2} taşınımının azaldığı, TRPV6 ve PMCA1 mRNA ve protein seviyelerinde de anlamlı derecede bir azalmanın olduğu gösterilmiştir. PMCA'nın ekspresyonunun azalmasının, oksidatif strese bağlı ATP'nin tükenmesine neden olduğu ve TRPV kanalları ve kalbindinlerin ekspresyonlarının azalması ile hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu artırdığı sonucuna varmışlardır (133).

Sonuç olarak, implantasyon sırasında TRPV6 ve PMCA1'in mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olsa da, bu Ca^{+2} kanallarının endometriyum ve blastokist adezyonunu düzenlemede önemli bir rolü olduğu aşikardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza Şubat 2015-Şubat 2016 tarihleri arasında Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı İnfertilite Polikliniğine başvuran, implantasyon başarısızlığı olan endometriozis ve açıklanamayan infertilite tanısı konmuş hastalar dahil edildi. Çalışma öncesi Hastane Eğitim Planlama ve Koordinasyon Kurulu onayı alındı. Çalışmamız 2015/35 sayılı karar ile Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'nın 29.01.2015 tarihli oturumunda görüşüldü ve onaylandı.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan anamnez alınarak, hastaların yaş, tıbbi öyküleri, boy, kilo, bazal hormon değerleri, menstrüasyon durumu, jinekolojik muayeneleri, infertilite süresi, infertilite için yapılan önceki tedaviler sorgulanarak çalışma formlarına (EK-1) kaydedildi. Tüm hastaların boy ve kiloları ölçüldü. Vücut ağırlığı (kg)/boy² (m) formülü ile vücut kitle indeksi (VKİ) hesaplandı. Çalışmada yer alan tüm hastaların Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu belirtilen kurallara uygun olarak hazırlandı ve araştırmacı tarafından okutularak hastaların doldurmaları sağlandı. Sekretuar faz ortasında (19-24. gün) alınan endometriyal biyopsiler; kontrol grubu (n=14), endometriozis (n=12) ve açıklanamayan infertilite grubu (n=15) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Ayrıca rutin tetkikler sırasında alınan kan örneklerinden hormon düzeyleri ve total Ca⁺² düzeyi ölçüldü. Endometrial tarihleme Noyes kriterlerine göre belirlendi (81).

Çalışmaya endometriozis ve açıklanamayan infertilite tanısı alan, düzenli menstrüel sikluslu (26-32), 38 yaş altı, muayene öncesi en az 2 ay GnRH agonistleri ya da seks steroidleri gibi hormonal tedavi almamış bireyler dahil edildi. Bilateral tubal oklüzyonu, endometriti, endometrial hiperplazisi, endometrial polipi ve myomu olan hastalar dahil edilmedi. Kontrol grubuna kontrasepsiyon istemi ile başvuran normal pelvik kaviteli fertil kadınlar alındı. İlk başvuruda tüm hastalar jinekolojik muayene ve transvajinal-USG ile değerlendirildi.

3.1. Endometriyal Biyopsilerin Elde EdiliŖi ve Saklanması

Hastalardan biyopsi kateteri ile endometrial örnekler alındı. Alınan endometrial doku örnekleri üç kısma ayrıldı. İlk kısım, immünohistokimyasal analiz için +4°C sıcaklıkta 0,1M'lık sodyum fosfat ile tamponlanan %4'lük paraformaldehit tespit solüsyonuna, ikinci kısım Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) analizi için RNAlater® solüsyonuna ve üçüncü kısım ise dokudaki Ca⁺² konsantrasyonunu belirlemek için 1,5 ml'lik deney tüplerine alındı.

+4°C sıcaklıkta 0,1M'lık sodyum fosfat ile tamponlanan %4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu içerisinde 24 saat fikse edilen endometriyal doku örnekleri +4°C sıcaklıkta 0,1 M'lık sodyum fosfat ile tamponlanan %0.1'lik paraformaldehit tespit solüsyonuna alındı. Rutin ışık mikroskopik doku takibi protokolüne uygun şekilde takip edilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklara gömülen dokulardan mikrotom ile poli-L-Lizin kaplı lamlara 3 µm'lik kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyama için hazır hale getirildi. RNAlater® solüsyonuna ve ependorflara alınan endometriyal doku örnekleri ise analiz edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2. Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi

Işık mikroskopik inceleme için uygun şekilde tespit edilen endometrial biyopsi örnekleri 2 saat akarsu altında yıkandıktan sonra aşağıdaki doku takip protokolüne alındı.

- Etil alkol (% 70) 15 saat
- Etil alkol (% 80) 45 dk
- Etil alkol (% 90) 45 dk
- Etil alkol (% 96) 45 dk
- Etil alkol (% 96) 45 dk
- Etil alkol (% 96) 45 dk
- Etil alkol (% 96) 45 dk
- Ksilol 15 dk
- Ksilol 15 dk
- Ksilol- Parafin (1:1) 1 saat
- Ksilol- Parafin (1:2) 15 dk

- Parafin 15 dk
- Parafin 2,5 saat
- Bloklama

3.3. Hematoksilen - Eozin Boyama Protokolü

Leica® RM2125RT marka rotary mikrotom ile non-adheziv lamlara 3 µm kalınlığında alınan kesitlere uygulanan işlemler aşağıda belirtilmiştir.

- Kesitler 60°C etüvde 1 saat deparafinize edildi.
- Ksilol 20 dk
- Ksilol 20 dk
- Etil alkol (% 96) 10 dk
- Etil alkol (% 90) 10 dk
- Etil alkol (% 80) 10 dk
- Distile su ile yıkanır.
- Mayer's Hematoksilen solüsyonunda 60 s tutuldu.
- Musluk suyu ile yıkandı.
- Amonyak solüsyonuna batırılıp çıkarıldı.
- Musluk suyu ile yıkandı.
- Asit alkol solüsyonuna batırılıp çıkarıldı.
- Musluk suyu ile yıkandı.
- Eozin solüsyonunda 35 s tutuldu.
- Etil alkole (% 80) batırılıp çıkarıldı.
- Etil alkole (% 90) batırılıp çıkarıldı.
- Etil alkole (% 96) batırılıp çıkarıldı.
- Kesitler 1 saat ksilolde tutuldu.
- Kesitler entellan ile kapatıldı.

3.4. İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü

Parafin bloklardan Leica® RM2125RT marka rotary mikrotom ile adeziv kaplı lamlara 3 µm'lik kesitler alındı. İmmünohistokimyasal işaretleme yapılarak, Olympus® BX50 (Olympus GmbH, Almanya) ışık mikroskobu ile incelenerek aynı mikroskoba eklenmiş Nikon® Coolpix5000 dijital kamera (Nikon Corp. Tokyo, Japonya) ile görüntülendi.

İmmünohistokimyasal işaretleme için;

- Kesitler 60°C etüvde deparafinize edildi.
- 3 kez 10'ar dk (3x10) ksilolde tutuldu.
- Etil alkol (% 96) 3 dk
- Etil alkol (% 90) 3 dk
- Etil alkol (% 80) 3 dk
- Etil alkol (% 75) 3 dk
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Kesitlerin çevreleri PAP pen ile çizildi.
- Antijenik özelliği tekrar kazandırmak için kesitler 0,01M sodyum sitrat çözeltisinde (pH: 6.0), 60°C'de bir gece inkübe edildi.
- Kesitler 20 dk soğuduktan sonra taze hazırlanmış 0,1 M fosfat tamponlu tuzlu su (Phosphate-Buffered Saline) ile 3x5 dk yıkandı.
- Endojen peroksit blokajı için %12,5'luk Hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonunda 12 dakika inkübe edildi.
- 0,1M PBS ile 3x5 dk yıkandı.
- Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyanmasını engellemek için kesitlerin üzerine protein blok solüsyonu damlatılarak 8 dakika inkübe edildi.
- Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırılarak sulandırılmış TRPV6 (*Biorbyte*, 1/100), PMCA1 (*Abcam*, 1/50) primer antikorları damlatılarak, +4°C'de kapalı nemli ortamda bir gece inkübe edildi. Negatif kontrol amacıyla ayrılan kesitlere primer antikor içemeyen bovin serum albumin (BSA) damlatıldı.
- 0,1M PBS ile 4x5 dk yıkandı.
- Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatılarak oda ısısında 30 dk. inkübe edildi.

- 0,1M PBS ile 3x5 dk yıkandı.
- Peroksidaz konjuge streptavidin solüsyonu ile oda ısısında 10 dk inkübe edildi.
- 0,1M PBS ile 3x5 dk yıkandı.
- Kesitlerin üzerine 3,3'-Diaminobenzidine tetrahidroklorür (DAB) damlatıldı ve boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 5-10 dk inkübe edildi. (Bu basamağın süresi her iki primer antikor için optimize edildi).
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Mayer's Hematoksilen ile 5 saniye zıt boyama yapıldı.
- Kesitler akarsuda berraklaşana kadar yıkandı.
- Etil alkol (% 75) 3 dk
- Etil alkol (% 80) 3 dk
- Etil alkol (% 90) 3 dk
- Etil alkol (% 96) 3 dk
- Kesitler kuruduktan sonra ksilolden 3x5 dk geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.5. Histolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme

Hematoksilen&Eozin boyama yöntemi ile boyanan ve anti-TRPV6 ve anti-PMCA1 primer antikorları ile işaretlenen kesitler ışık mikroskopik olarak incelenmiştir. TRPV6 ve PMCA1 antikorlarının boyanma yoğunluğunu karşılaştırmak için halka açık kullanımı olan Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) görüntü analiz yazılımı ile 16-bit renk formatına dönüştürülerek yapılmıştır. Gerçekleştirilecek analiz için kesitlere ait görüntüler, Olympus® BX50 mikroskobunun 40 büyütme objektifi kullanılarak alınmıştır. Buna göre her gruba ait bütün doku kesitlerinde beş farklı alanda luminal epitel, bez epiteli ve stromal hücreler değerlendirilmiştir. Boyanma yoğunlukları kontrol, endometriozis ve açıklanamayan infertil grupları arasında parametrik olarak karşılaştırılmıştır.

3.6. Total RNA izolasyonu

Endometriyal biyopsilerin RNA izolasyonu, “Ribozol RNA Extraction Reagent

(Amresco)” kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon sırasında aşağıdaki işlemler takip edildi.

a. Örneğin Homojenize Edilmesi

- -20°C’de muhafaza edilen dokular oda ısısında çözüldükten sonra enjektör ucu ile parçalandı. 50-100 mg doku başına 1 mL Ribozol Reagent eklenerek yine enjektör ucu ile parçalanıp vortekslendi.
- Oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.

b. RNA Eldesi

- 1 mL Ribozol başına 0,2 ml chloroform:isoamylalcohol, 24:1 (Amresco) eklendi ve 15 s vortekslendi.
- 13.000 rpm’de 10 dk +4°C’de santrifüjlendi.
- Üstte oluşan sıvı faz başka bir tüpe alındı.

c. RNA’nın çöktürülmesi

- Alınan sıvı fazının üzerine 0,5 mL isopropanol (Amresco) eklendi.
- Oda ısısında 10 dk bekletildi.
- 13.000 rpm’de 10 dk +4°C’de santrifüjlendi.
- Süpernatant atıldı ve pelet 1 ml % 80 ethanol (EtOH) ile yıkandı ve vortekslendi.
- 13.000 rpm’de 10 dk +4°C’de santrifüjlendi.

d. RNA Dilüsyonu

Süpernatant kısım atıldıktan sonra pelet 5-10 dk oda sıcaklığında kurutuldu. 40 µl distile su içinde çözüldü.

3.7. Total RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA konsantrasyonu ve saflığı 260 ve 280 nm’de spektrofotometrik olarak nanodrop yardımıyla ölçülmüştür. 1 µl DNase/RNase içermeyen moleküler su ile kör alındıktan sonra RNA’nın miktarını ve saflığını belirlemek için izole edilen her bir RNA örneğinden 1 µl alındı ve ölçüm yapıldı. Her 10 örnekte bir kör alınarak işleme devam edildi. RNA miktarlarının belirlenmesi için 260 nm’deki absorpsiyon değeri, kontamine protein miktarının belirlenmesi için de 280 nm’deki absorpsiyon değeri kullanılmıştır. Saf RNA eldesi için OD260/OD280 değerinin 1,8-2,0 arasında olması sağlanmıştır. Her

bir örnek için total RNA konsantrasyonu eşit olacak şekilde DNase/RNase içermeyen moleküler su kullanılarak seyreltildi.

3.8. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA eldesi için Çizelge 3.1'de miktarları belirtilen, son hacmi 100 µl olan bir karışım oluşturuldu. Hazırlanan karışımdan her örnek için 50 µl alındı ve üzerine RNA örneklerinden 5 µl eklendi. Referans örnek için, karışımdan 100 µl alındı ve 5 µl Taqman Control Human RNA (ABI 4307281) eklendi. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi (Çizelge 3.2). Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Çizelge 3.1. TRPV6 ve PMCA1 için cDNA karışım miktarı (100 µl'lik reaksiyon).

| | |
|------------------------------------|---------------|
| Nükleaz içermeyen H ₂ O | 30,5 µl |
| 5X RT Buffer | 16 µl |
| dNTP karışımı (2 mM) | 40 µl |
| MMV-RT (200 U/µl) | 1,0 µl |
| Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl) | 0,5 µl |
| Poly T (100 pmol/µl) | 10 µl |
| Reaksiyon toplamı | 100 µl |

Çizelge 3.2. TRPV6 ve PMCA1 için cDNA sentezi PCR programı.

| PCR | 1. Adım | 2. Adım | 3. Adım |
|---------------|---------|---------|---------|
| Sıcaklık (°C) | 37 | 95 | 4 |
| Süre (dk) | 60 | 5 | ∞ |

3.9. RT- PCR Analizi

Elde edilen cDNA'lardan, TRPV6, PMCA1 ve ACTB (housekeeping) gen ekspresyonları RT-PCR (ABI 7500, Applied Biosystems) cihazı ile "Comparative CT ($\Delta\Delta CT$)" analizi yapılarak belirlendi. Bu çalışma hazırlığı için bu genlerin her birinin primer ve prob dizaynı yapıp sentezletildi.

3.9.1. Kullanılan Primer ve Problar

Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak TRPV6 geninin "NM_018646.5, Homo sapiens transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 (TRPV6), mRNA", PMCA1 geninin "NM_001001323.1, Homo sapiens ATPase plasma membrane Ca^{+2} transporting 1 (ATP2B1), transcript variant 1, mRNA ve beta aktin geninin "NM_001101.3, Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA" dizilerinden primer ve prob dizileri oluşturuldu (Çizelge 3.3). Primer ve problar, "Metabion International AG, D-82152 Martinsried/Deutschland" tarafından sentezlendi.

Çizelge 3.3. RT-PCR'da kullanılan TRPV6 ve PMCA1 genlerinin primer ve prob dizileri.

| Gen | Primer ve Prob Dizileri |
|----------------|---|
| TRPV6 | F 5'-TGGTTCCTGCGGGTGG-3' R 5'- CCTGTGCGTAGCGTTGGAT-3' Pr 5'-FAM-ACAGGCAAGATCTCAACCGGCA-BHQ-1-3' |
| PMCA1 | F 5'-TTACGGGCGCCTGCAT-3' R 5'-TGAGGTTTACCCACAGCATCTG-3' Pr5'-FAM-A(pdC)T(pdC)AAGA(pdC)T(pdC)AC(pdC)G(pdC)TTA-BHQ-1-3' |
| β -Aktin | F 5'-GGCACCCAGCACAATGAAG-3' R 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3' Pr 5'-Yakima Yellow-TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-BHQ-1-3' |

Ekspresyon analizi için kullanılacak problemlerin her birinin 5' ucuna absorpsiyon dalga boyu değeri 495 nm ve emisyon dalga boyu değeri 520 nm olan floresan etiketli oligonükleotid probu 6-karboksifloresan (6-FAM), 3' ucuna ise problemler serbest halde iken floresan ışımaya engelleyen, absorpsiyon dalga boyu değeri aralığı 480-580 nm arasında olan "Black Hole Quencher-1 (BHQ-1)" soğurucu molekülü bağlandı. Ayrıca, prob dizisinde bulunan sitozinlerin yerine, prob erime sıcaklığı (T_m) derecesini artırmak için ($\sim 2,8^\circ\text{C}$), sitozin analogu olan C-5-propinil-deoksiribositozin (pdC) kullanıldı (134).

ACTB genine özgü prob "Yakima Yellow" işaretlidir. Değerlendirme sürecinde "VIC" olarak değerlendirilmesinin sebebi "Yakima Yellow" ile "VIC" in benzer dalga boylarında ışımaya yapmasıdır. Yakima Yellow maksimum emisyon değeri 549 nm'dir (135).

3.9.2. RT-PCR Reaksiyon Ortamının Hazırlanışı

Real-Time PCR reaksiyon ortamı, total 25 μl olacak şekilde hazırlandı.

- 12.5 μl , 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)
- Son konsantrasyon; TRPV6, PMCA1 ve ACTB primerlerinden 900 nmol olacak şekilde primerler kullanıldı. FAM ile işaretli TRPV6-Pr, PMCA1-Pr problemlerinden ve Yakima Yellow ile işaretli ACTB-Pr probundan 200 nmol olacak şekilde problemler kullanıldı.
- 2,5 μl cDNA örneği (~ 30 ng)
- 5 μl distile su

3.9.3. RT-PCR Reaksiyon Şartları

RT-PCR işlemi ve kantitasyon "ABI Prism 7500 RT-PCR (Applied Biosystems)" cihazı ve "SDS 2.0.6 software for 7500 RT-PCR Product (Applied Biosystems)" programı kullanılarak gerçekleştirildi (Çizelge 3.4)

Çizelge 3.4. RT-PCR Reaksiyon Şartları.

| Sıcaklık | Zaman-işlem | Döngü sayısı |
|----------|-------------------------|--------------|
| 50°C | 2 dakika ön inkübasyon | 1 |
| 95°C | 10 dakika aktivasyon | 1 |
| 95°C | 15 saniye denatürasyon | 40 |
| 60°C | 1 dakika bağlanma/uzama | 40 |

3.10. Dokuda Ca²⁺ konsantrasyonunun belirlenmesi

Biyopsi örnekleri (20-30 mg, kuru ağırlık) PFA dayanıklı numune kaplarında tartıldı. 1 mL nitrik asit, 0.1 mL H₂O₂ eklenerek yavaşça çalkalandı. Bu aşamada çepere yapışmaması için özen gösterildi. Her bir örnek analizi için bir blank (kör) çözelti hazırlandı. Numune kapları sıkıca kapatılarak mikrodalga parçalama ünitesine yerleştirildi. Her bir numunenin, 400 W, 10 dk mikrodalgada parçalanması sağlandı. 5 dakika soğuduktan sonra parçalanmış numune polipropilen tüpe aktarılarak ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlandı ve İndüktif olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) ile analiz edildi.

3.11. İstatistiksel Analiz

Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar için normal dağılım gösterenler için varyans analizi, normal dağılım göstermeyenler için Kruskal Wallis testleri kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren ölçümlerde varyansların homojenliği Levene testi ile test edilmiş olup varyansların homojenliği koşulunun sağlandığı durumda One Way ANOVA testi, koşulun sağlanmadığı durumlar için Welch testi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. Normal dağılım göstermeyen sürekli ölçümlerde gruplar arası farklılıklarda ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi ile test edilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler olarak minimum, maksimum, medyan, % 25-75 yüzdeler verilmiştir. Post Hoc analizler için Least Significant Difference (LSD) ile Bonferroni testleri kullanıldı. Kategorik değişkenler ise n (%) olarak gösterildi. p<0,05 istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Grupların Demografik Özelliklerinin Karşılaştırılması

Kontrol, endometriozisli ve açıklanamayan infertil hasta grubu yaş, vücut kütle indeksi (VKİ), progesteron, östradiol (E₂) ve kan Ca⁺² düzeyleri çizelge 4.1’de karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda, kontrol grubunun yaş ortalaması 30,1 ± 4,4; endometriozisli hastaların yaş ortalaması 29,3 ± 3,4; açıklanamayan infertil hastaların yaş ortalaması ise 30,9 ± 3,5 olarak belirlenmiştir. Üç grubun yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0,05). Gruplar arasında VKİ, progesteron, E₂ ve kan Ca⁺² düzeyleri açısından da istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kontrol, endometriozis ve açıklanamayan infertilite gruplarının demografik özellikleri.

| | Kontrol (n=14) Ortalama±S.D | Endometriozis (n=12) Ortalama±S.D | Açıklanamayan (n=15) Ortalama±S.D | P-değeri |
|-----------------------------|--|--|--|-----------------|
| Yaş | 30,1 ± 4,4 | 29,3 ± 3,4 | 30,9 ± 3,5 | 0,531 |
| VKİ (kg/m ²) | 24,24 ± 3,61 | 23,66 ± 2,59 | 24,49 ± 2,39 | 0,767 |
| Progesteron (ng/ml) | 19,6 ± 5,1 | 20,6±5,1 | 22,8±7,4 | 0,481 |
| E ₂ (pg/ml) | 102,8 ± 38,4 | 109,4±33,7 | 103,6±30,8 | 0,580 |
| Kan Ca ⁺² düzeyi | 9,37 ± 0,53 | 9,54 ± 0,24 | 9,54 ± 0,24 | 0,350 |

4.2. Doku Ca⁺² konsantrasyon düzeyi ölçüm sonucu

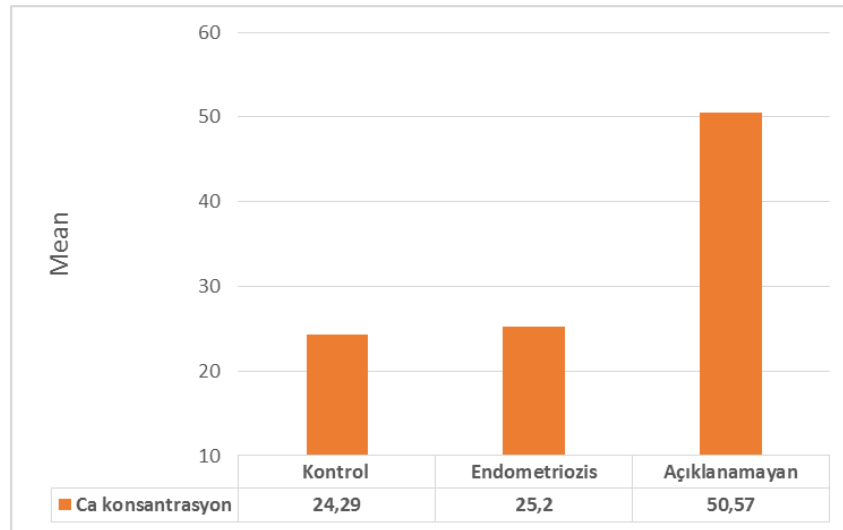
Dokuda Ca⁺² konsantrasyonu gruplar arası karşılaştırıldığında, kontrol grubu ve açıklanamayan infertilite grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu

($p=0,007$) tespit edilmiştir. Açıklanamayan infertilite grubunda doku Ca^{+2} konsantrasyon değeri ortalaması kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 1, Çizelge 4.2). Açıklanamayan infertilite ve endometriozis grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,001$). Açıklanamayan infertilite grubunda doku Ca^{+2} konsantrasyon değeri ortalamasının endometriozis grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (Çizelge 4.2, Şekil 4.1). Kontrol grubu ve endometriozis grubu arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.2: Kontrol ve hasta gruplarının doku Ca^{+2} konsantrasyon düzeylerinin karşılaştırılması.

*: Kontrol grubu ile olan farklılıkları; †: Endometriozis ile olan farklılıkları göstermektedir.

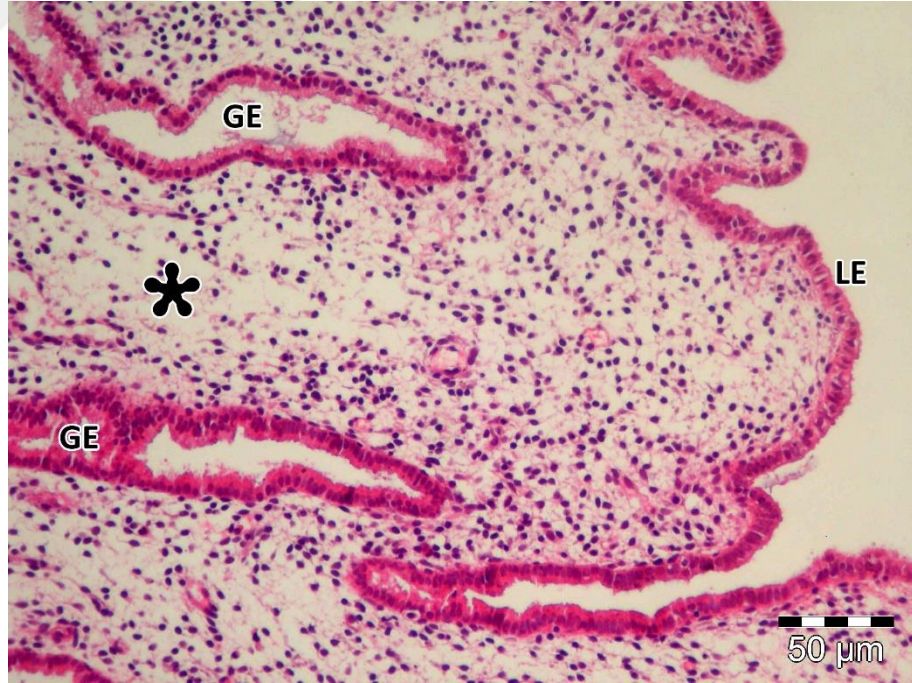
| | Kontrol (n=14) | | Endometriozis (n=12) | | Açıklanamayan (n=15) | | P-değeri |
|------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--|--------------|
| | Min- Max | Medyan [% 25-75] | Min- Max | Medyan [% 25-75] | Min- Max | Medyan [% 25-75] | |
| Ca^{+2} konst. (ppm) | 18,36- 65,90 | 24,29 [20,11- 25,55] | 20,18- 36,60 | 25,2 [22,4- 26,6] | 18,17- 60,40 | 50,57* [†] [40,67- 51,37] | 0,001 |



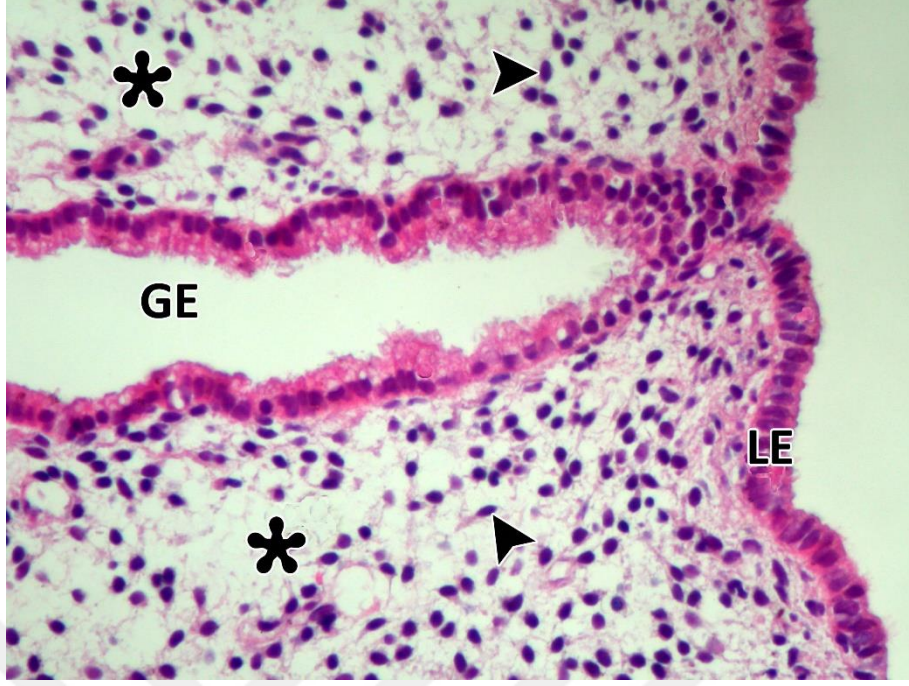
Şekil 4.1. Gruplar arası doku Ca^{+2} konsantrasyon düzeylerinin karşılaştırılması.

4.3. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol, endometriozis ve açıklanamayan infertil gruplarından alınan endometrial biyopsi dokularında morfolojik farklılığı değerlendirebilmek için Hematoksilen-Eozin boyaması yapıldı. Her üç grupta endometriyumun benzer morfolojide olduğu saptandı. Endometrial epitelin tek katlı silindirik hücrelerden oluştuğu, lamina propria içerisinde kıvrımlı basit tübüler bezlerin yerleştiği ve bezler arasında gevşek bağ dokusu yapısında stromanın oldukça ödemli olduğu izlendi. Stroma içerisinde; makrofajlar, lenfositler, granüler lökositler ve stromal hücreler ve kan damarları yerleşim göstermekteydi. Ödem nedeniyle, stromal hücreler 21-22. günlerde çıplak nükleus görünümündeydi. Bu değişikliklerle birlikte stromal hücrelerin, küçük nükleuslu ve belli belirsiz sitoplazmaları ile oldukça dağınık yerleşim gösterdiği dikkat çekmekteydi. Glandular epitel içerisinde yer yer salgı vakuollerinin olduğu, epitel hücrelerinin luminal yüzeylerinin oldukça düzensizleştiği ve lümende besleyici değeri yüksek mukoid salgıların varlığı tespit edildi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7).



Şekil 4.2. Kontrol grubu. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk) (X600).



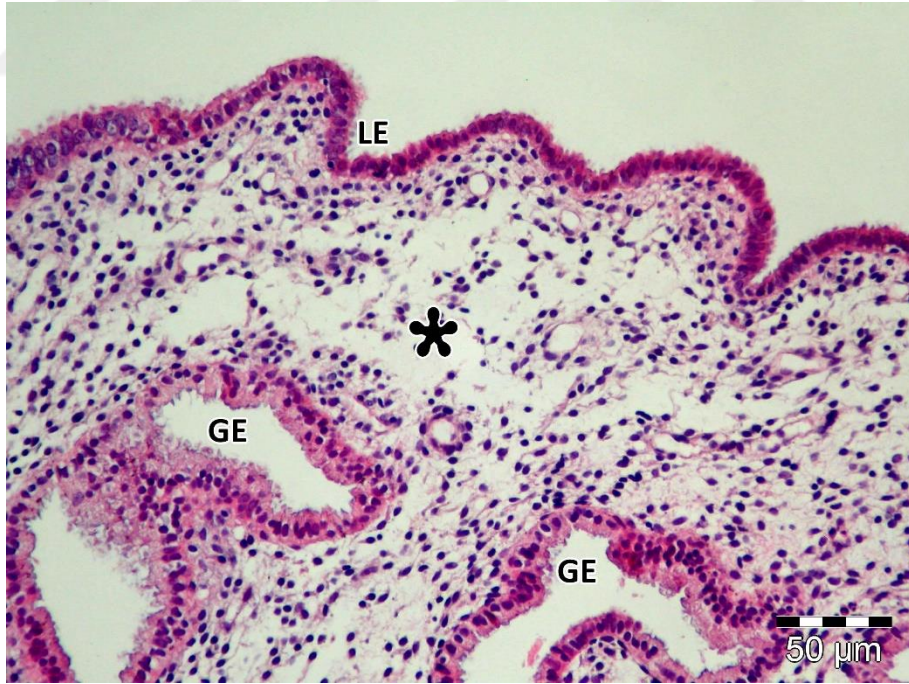
Şekil 4.3. Kontrol grubu. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X1200).



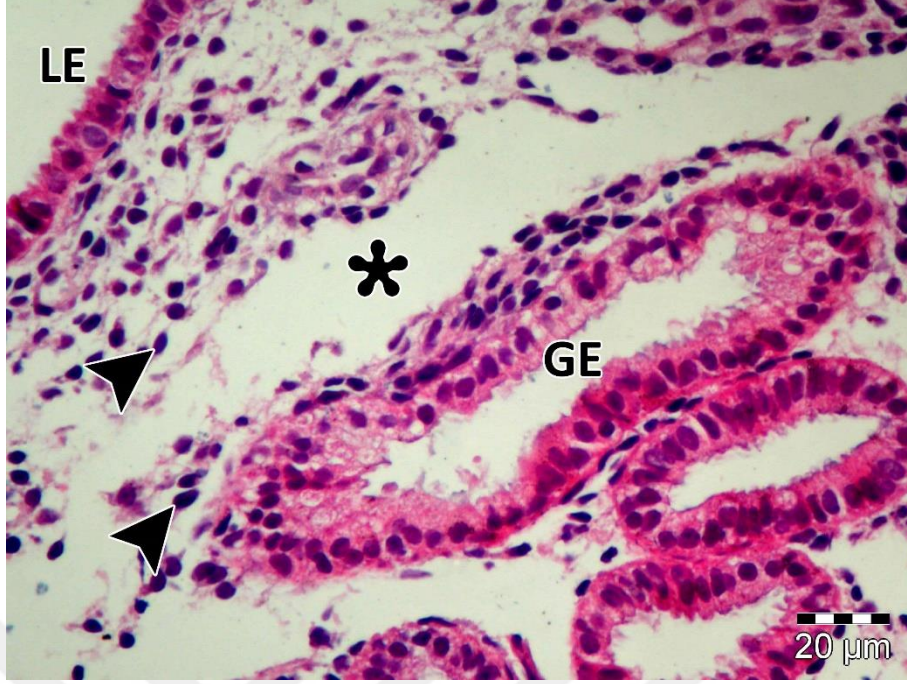
Şekil 4.4. Endometriozis grubu. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk) (X600).



Şekil 4.5. Endometriozis grubu. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X1200).



Şekil 4.6. Açıklanamayan infertilite grubu. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk) (X600).



Şekil 4.7. Açıklanamayan İnfertilite grubu. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X1200).

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

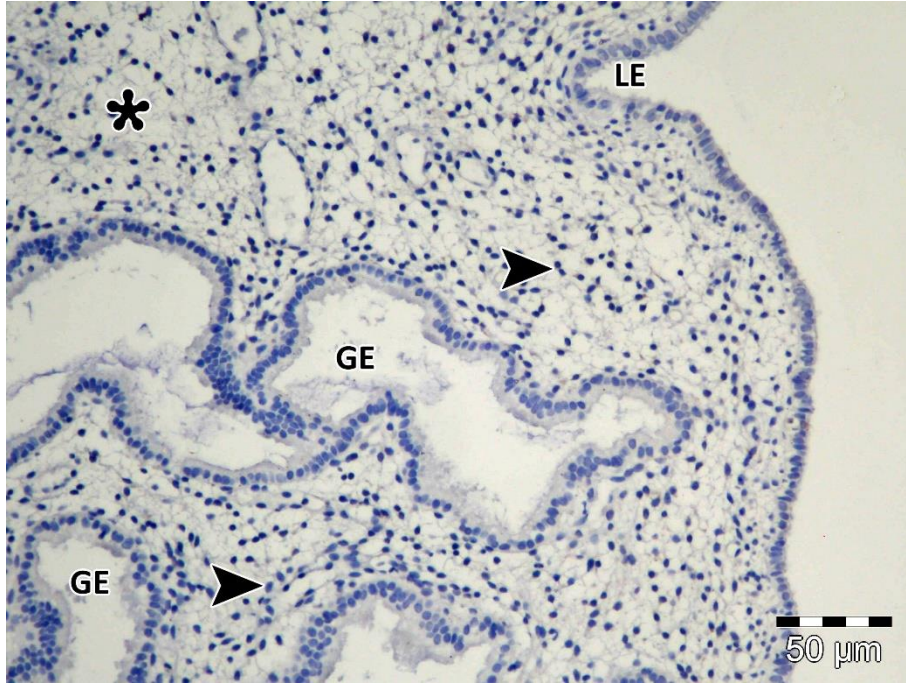
4.4.1. İmmünohistokimyasal TRPV6 Ekspresyonu

Çalışmamızda kontrol, endometriozis ve açıklanamayan infertil gruplarda TRPV6 protein ekspresyonu semi-kantitatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16). Primer antikor damlatılmayan negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi (Şekil 4.8).

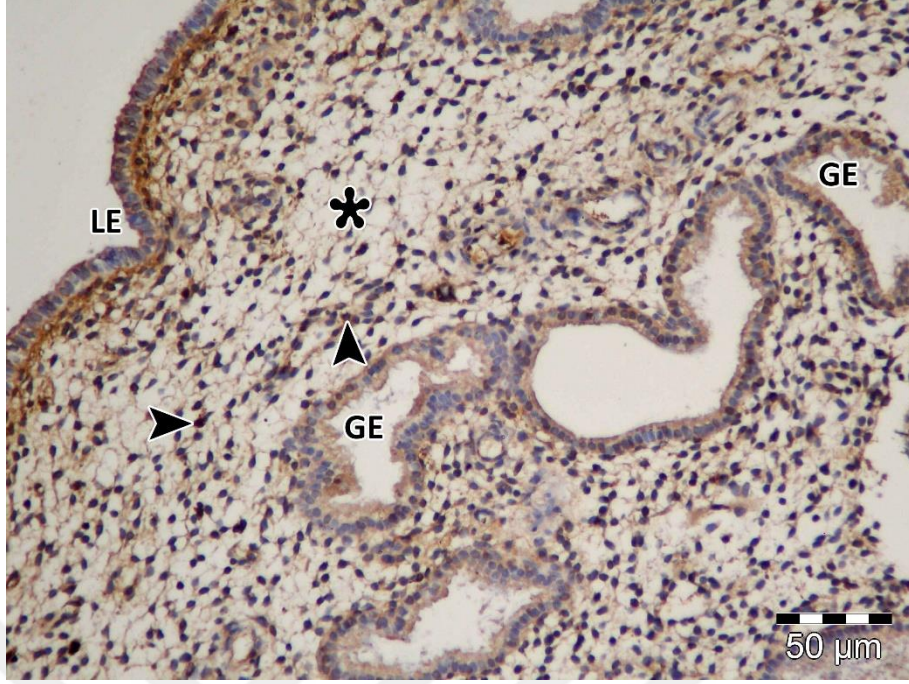
Endometrial luminal epitelde TRPV6 boyanma yoğunluğu, endometriozis ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ($p=0,005$) tespit edildi. Açıklanamayan infertil grup ile kontrol grubu arasında luminal epitelde TRPV6 boyanma yoğunluğu bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p=0,001$) (Çizelge 4.3). Glandular epitelde TRPV6 boyanma yoğunluğu, endometriozis ve açıklanamayan infertil grupları ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında endometriozis ($p=0,003$) ve açıklanamayan infertil grupta ($p=0,009$) anlamlı farklılık gösterdi. Şekil 4.17'de görüldüğü gibi TRPV6 boyanma yoğunluğu ortalaması, açıklanamayan infertil grupta endometriozis ve kontrol grubuna göre daha

yüksek bulundu. TRPV6 ekspresyonu luminal ve glandular epitel hücrelerinin sitoplazmalarında izlendi (Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16). Stromada, TRPV6 boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Çizelge 4.3, Şekil 4.17).

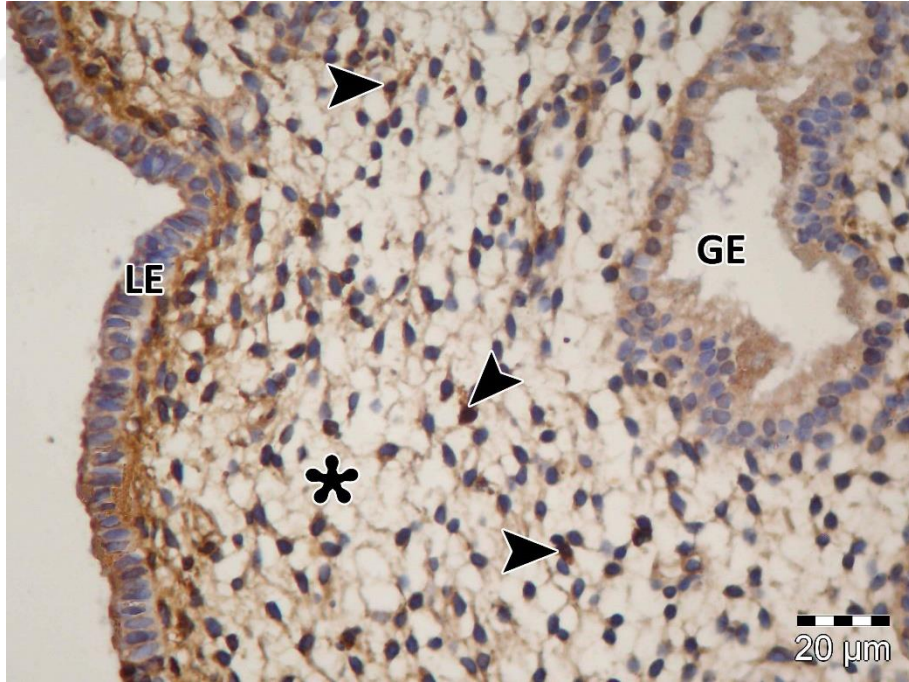
Kontrol grubunda luminal epitel, glandular epiteli ve stromada TRPV6 immün işaretlenme yoğunluğu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi (Çizelge 4.3, Şekil 4.18). Endometriozis grubunda luminal epitel, glandular epitel ve stromada TRPV6 boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olduğu; luminal epitel ile glandular epitel arasındaki farkın $p=0,039$; luminal epitel ile stroma arasındaki farkın $p=0,012$; glandular epitel ile stroma arasındaki farkın $p<0,001$ olduğu görüldü TRPV6 boyanma yoğunluğu ortalaması, en yüksek glandular epitelde gözlemlendi. (Çizelge 4.3, Şekil 4.17). Açıklanamayan infertil grupta ise TRPV6 boyanma yoğunluğu bakımından luminal epitel ile glandular epitel arasında anlamlı bir farklılık olmadığı ($p=0,289$), luminal epitel ile stroma arasında ($p=0,003$), glandular epitel ile stroma arasında ($p<0,001$) anlamlı fark olduğu tespit edildi. Bu grupta TRPV6 boyanma yoğunluğunun en yüksek glandular epitelde olduğu saptandı (Çizelge 4.3, Şekil 4.17).



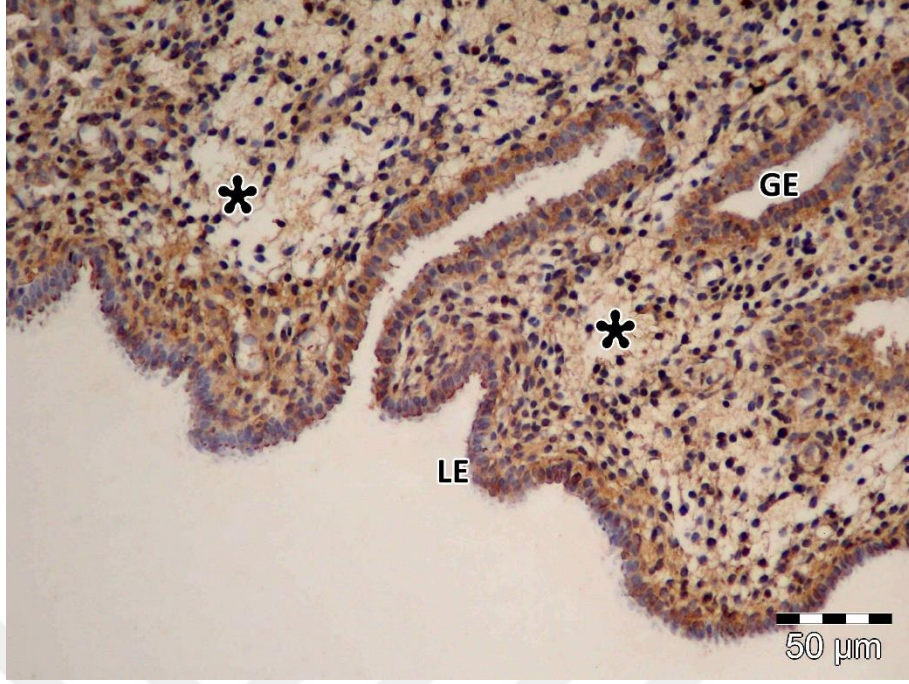
Şekil 4.8. TRPV6 immün boyanmasına ait negatif kontrol. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X600).



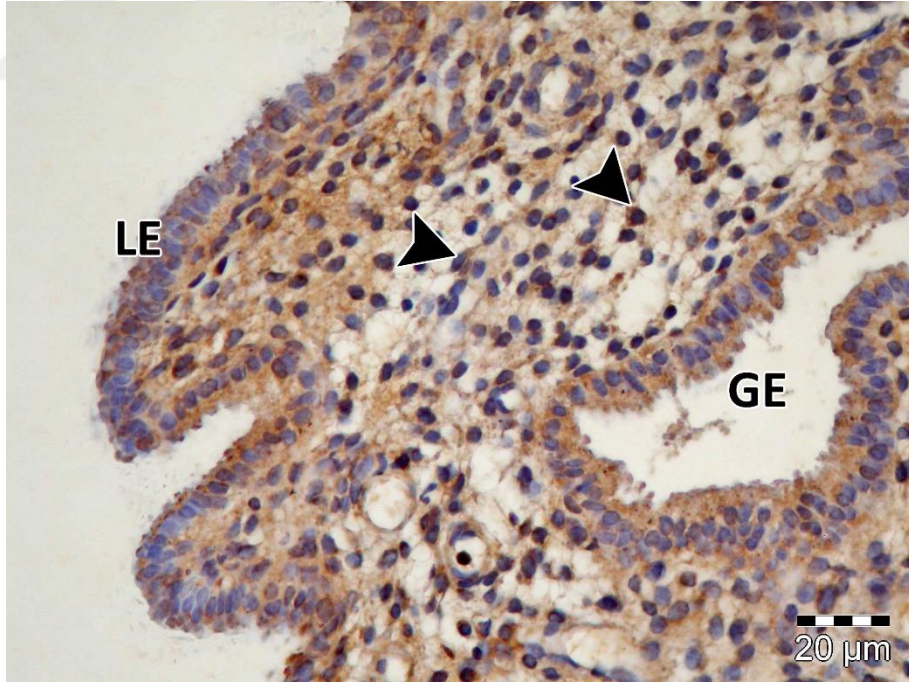
Şekil 4.9. Kontrol grubu TRPV6 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X600).



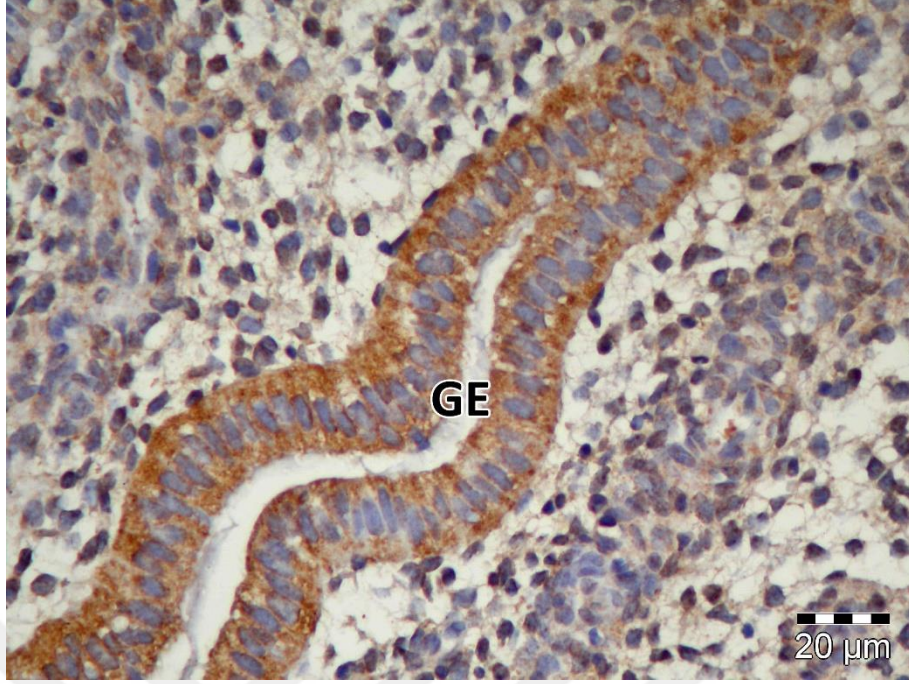
Şekil 4.10. Kontrol grubu TRPV6 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X1200).



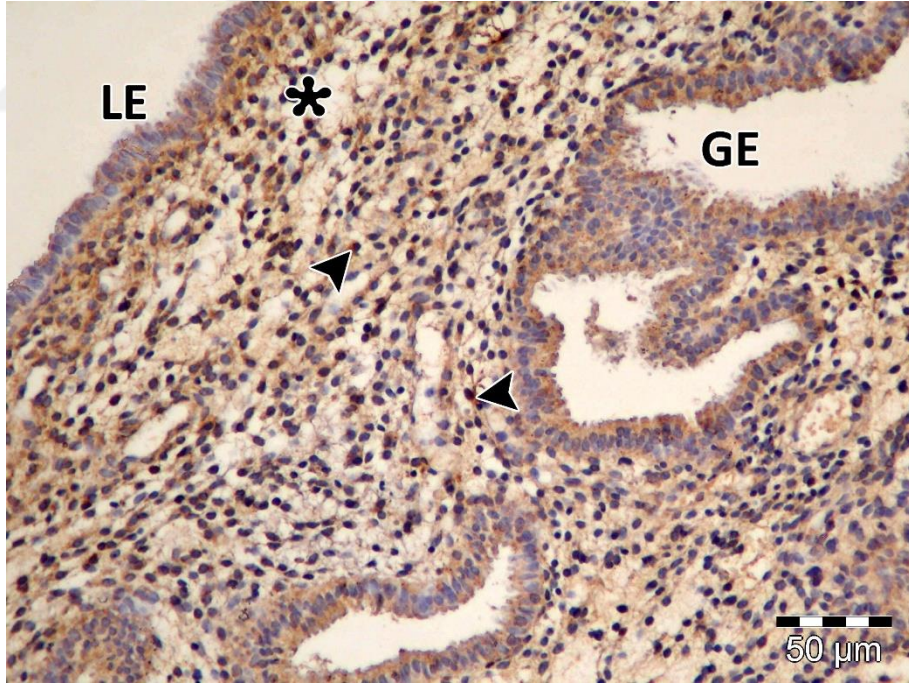
Şekil 4.11. Endometriozis grubu TRPV6 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), (X600).



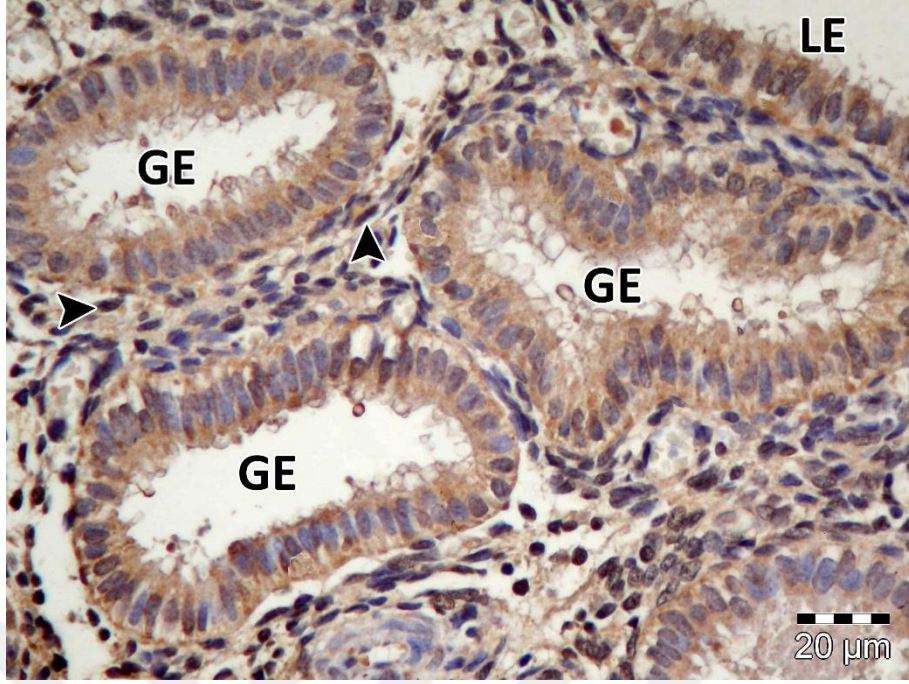
Şekil 4.12. Endometriozis grubu TRPV6 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), stromal hücre (ok başı), (X600).



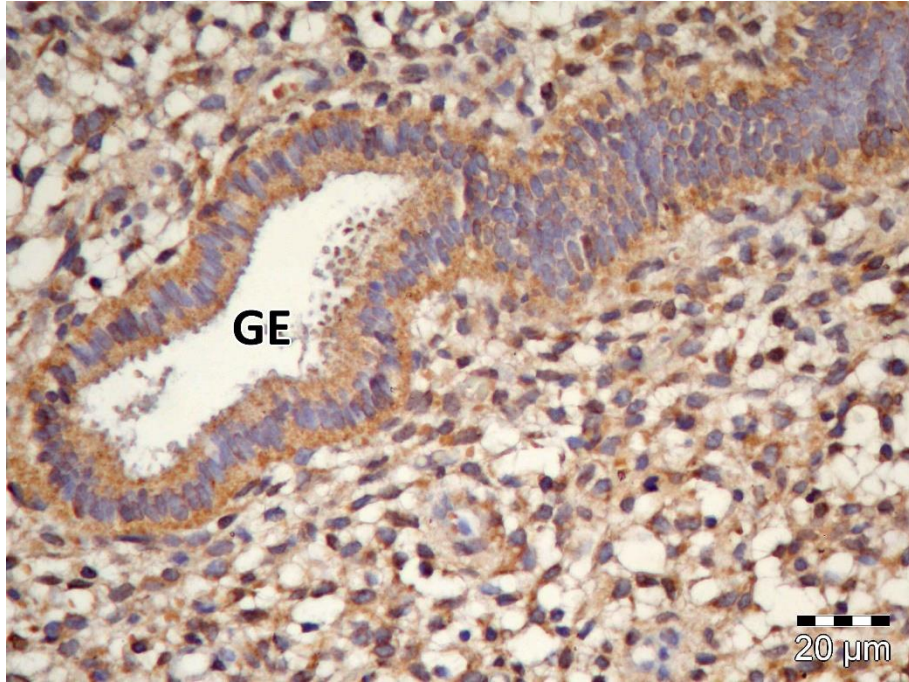
Şekil 4.13. Endometriozis grubu glandular epitelinde (GE) TRPV6 immün boyaması (X1200).



Şekil 4.14. Açıklanamayan infertilite grubta TRPV6 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), ödemli stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X600).



Şekil 4.15. Açıklanamayan infertilite grupta TRPV6 immünboyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), stromal hücre (ok başı) (X1200).

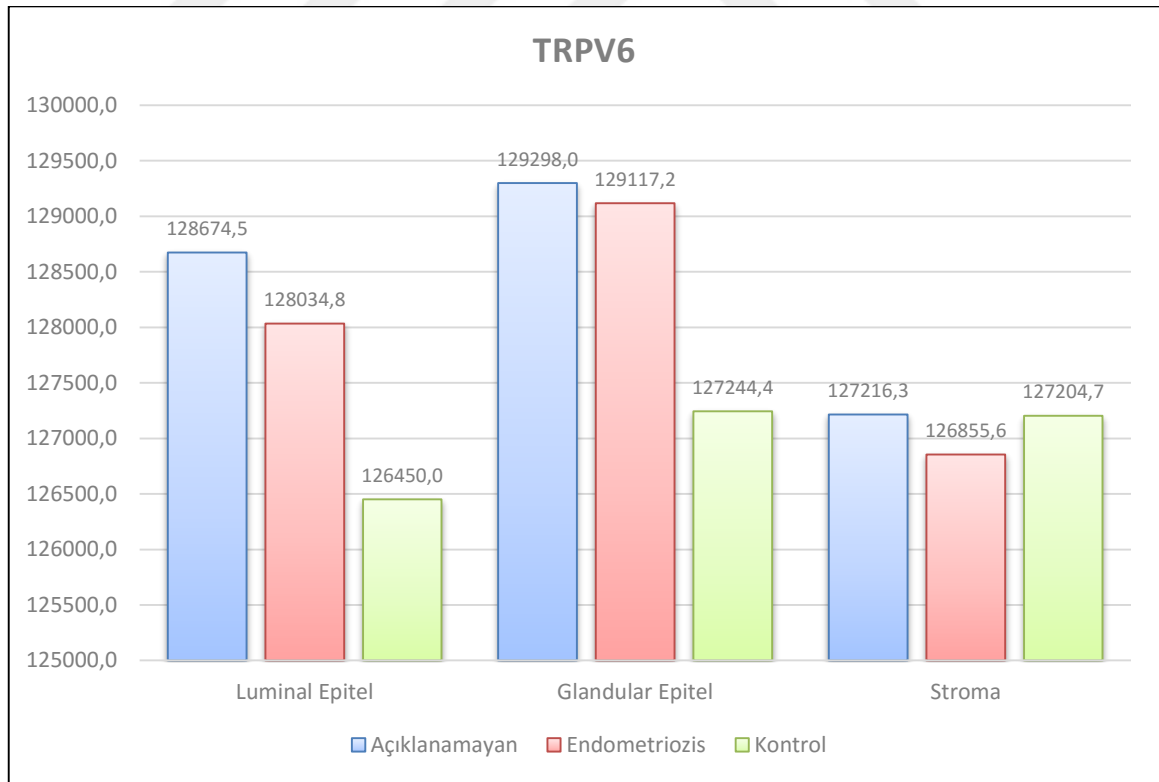


Şekil 4.16. Açıklanamayan infertilite grubu glandular epitelinde (GE) TRPV6 immünboyaması (X1200).

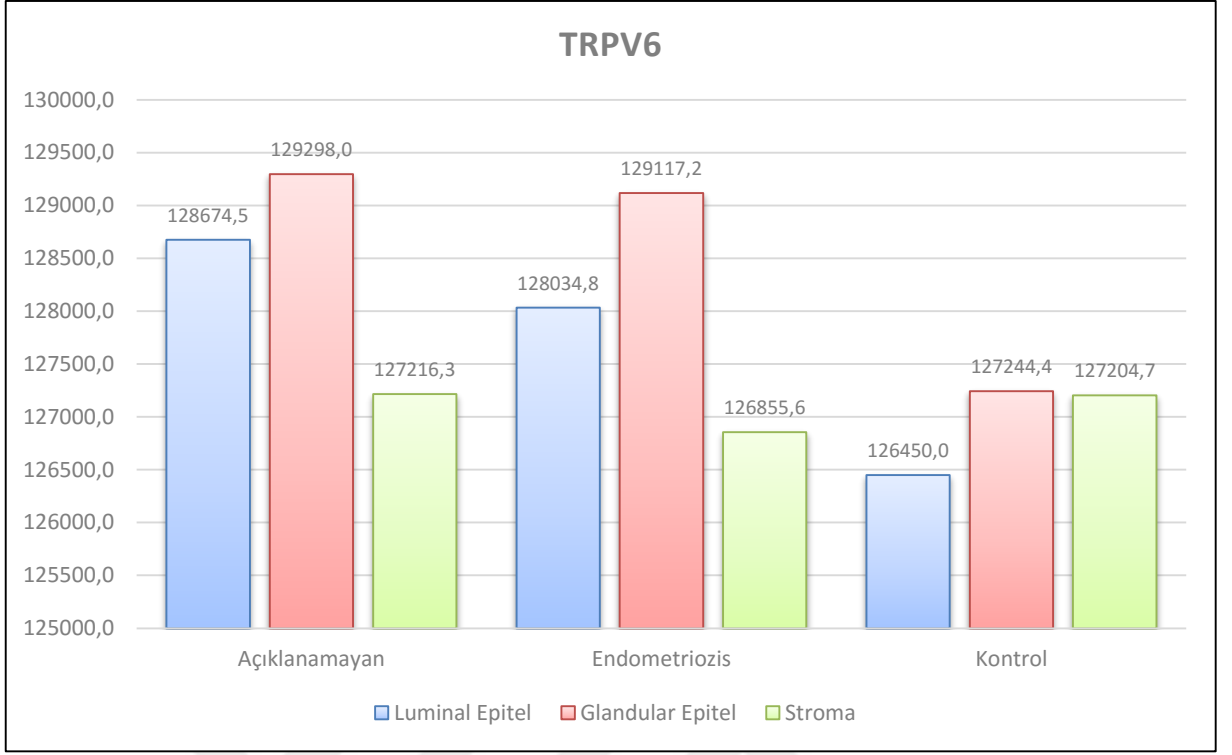
Çizelge 4.3. Gruplar arası ve grup içi LE, GE ve stromada TRPV6 immün işaretlenme yoğunluğunun istatistiksel karşılaştırılması.

| TRPV6 | | Luminal Epitel | Glandular Epitel | Stroma | Grup içi karşılaştırma için P Değerleri | | | |
|---|--------|------------------------|------------------------|------------------------|---|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | | (A) Ortalama± SS | (B) Ortalama± SS | (C) Ortalama± SS | Gene I | A-B | A-C | B-C |
| Gruplar | | | | | | | | |
| Açıklanamayan | =I | 128.674,5± 1.840,17 | 129.298,0± 2.052,76 | 127.216,3± 754,07 | <0,00 1 | 0,28 9 | 0,00 3 | <0,00 1 |
| Endometriozis Grubu | =II | 128.034,8± 1.437,35 | 129.117,2± 1.503,13 | 126.855,6± 358,19 | 0,001 9 | 0,03 2 | 0,01 1 | <0,00 1 |
| Kontrol Grubu | =III | 126.450,0± 1.042,14 | 127.244,4± 1.304,22 | 127.204,7± 490,60 | 0,090 | 0,35 9 | 0,10 5 | 1 |
| Grup içi karşılaştırma için genel P değeri | | 0,001 | 0,004 | 0,210 | | | | |
| Gruplar arası Karşılaştırmalar | | | | | | | | |
| | I→II | 0,298 | 0,767 | 0,133 | | | | |
| | I→III | 0,001 | 0,009 | 0,951 | | | | |
| | II→III | 0,005 | 0,003 | 0,067 | | | | |

General Linear Model Repeated Anova (Wilks' Lambda-Huynh-Feldt) - Univariate (ANOVA) Analysis of Variance (Bootstrap) - İkili Karşılaştırmalar için: LSD - Bonferroni - SS: Standart Sapma



Şekil 4.17. Gruplar arası TRPV6 immün işaretlenme yoğunluğunun; luminal epitel, glandular epitel ve stroma arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması. Post hoc ile gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.



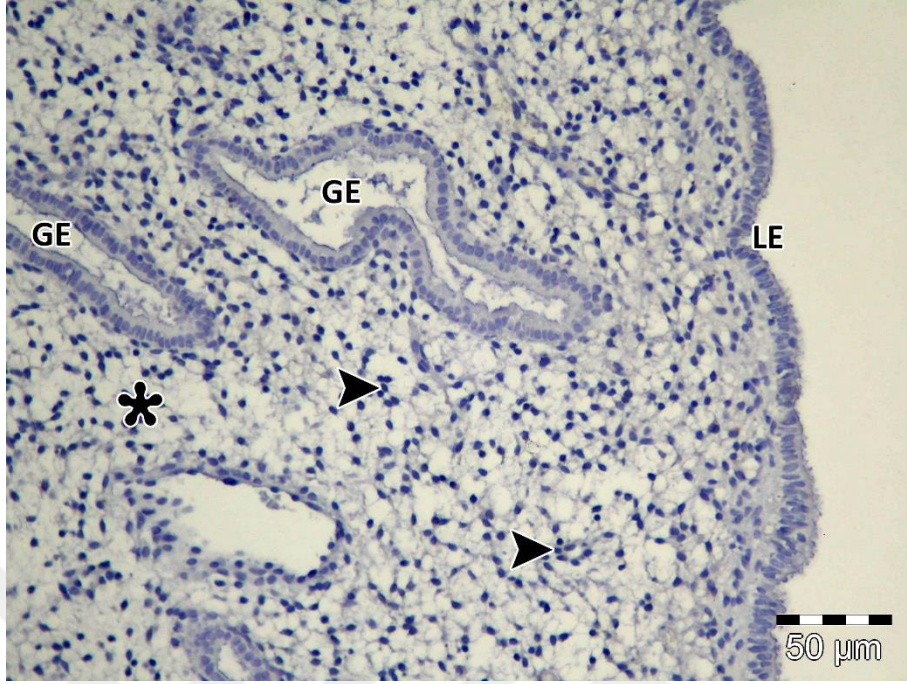
Şekil 4.18. Grup içi TRPV6 immün işaretlenme yoğunluğunun; luminal epitel, glandular epitel ve stroma arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması. Post hoc ile gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.

4.4.2. İmmünohistokimyasal PMCA1 Ekspresyonu

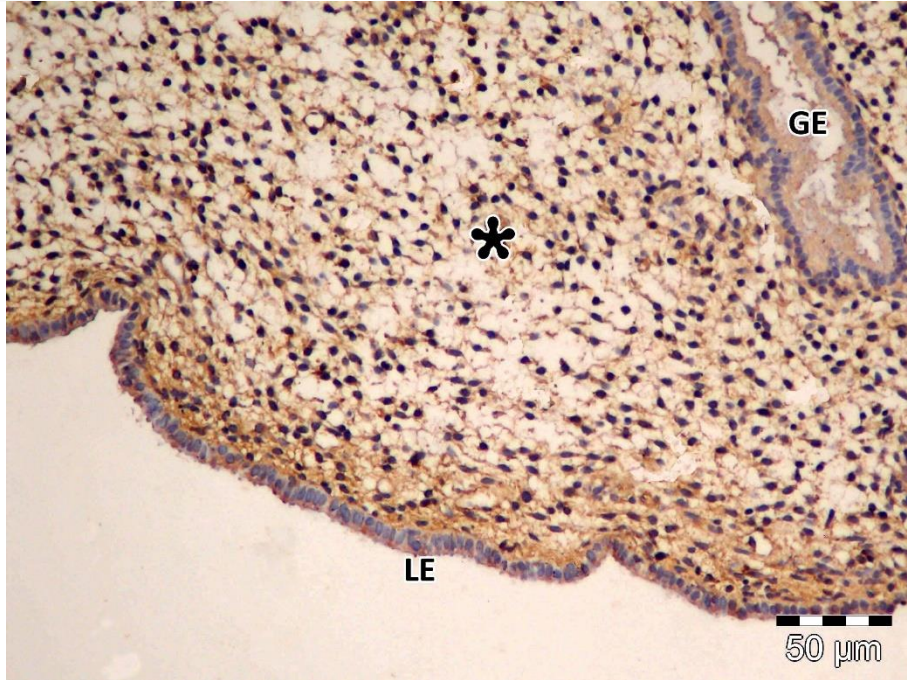
Çalışmamızda kontrol, endometriozis ve açıklanamayan infertil gruplarda PMCA1 protein ekspresyonu semi-kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.20, 4.21 4.22, 4.23, 4.24, 4.25). Primer antikor damlatılmayan negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi (Şekil 4.19).

Luminal epitelde PMCA1 boyanma yoğunluğu endometriozis, açıklanamayan infertilite ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlemlendi. Endometriozis ve kontrol grupları arasında luminal epiteldeki anlamlı farkın $p=0,001$, açıklanamayan infertilite grubu ile kontrol grupları arasındaki ise anlamlı farkın $p=0,003$ olduğu tespit edildi. PMCA1 boyanma yoğunluğunun, açıklanamayan infertil grubun luminal epitelinde diğer iki gruba kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı (Çizelge 4.4). Glandular epitelde PMCA1 boyanma yoğunluğu gruplar arası karşılaştırıldığında hem endometriozis ve kontrol grupları arasında ($p=0,002$), hem de açıklanamayan infertilite ve kontrol grupları arasında ($p=0,028$) anlamlı fark olduğu saptandı. Glandular epitelde PMCA1 boyanma yoğunluğu ortalaması, endometriozis ve açıklanamayan infertil gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu (Çizelge 4.4, Şekil 4.26). PMCA1 ekspresyonu luminal ve glandular epitel hücrelerinin sitoplazmalarında izlendi. Stromada PMCA1 boyanma yoğunluğu bakımından endometriozis, açıklanamayan infertilite ve kontrol grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Çizelge 4.4, Şekil 4.26).

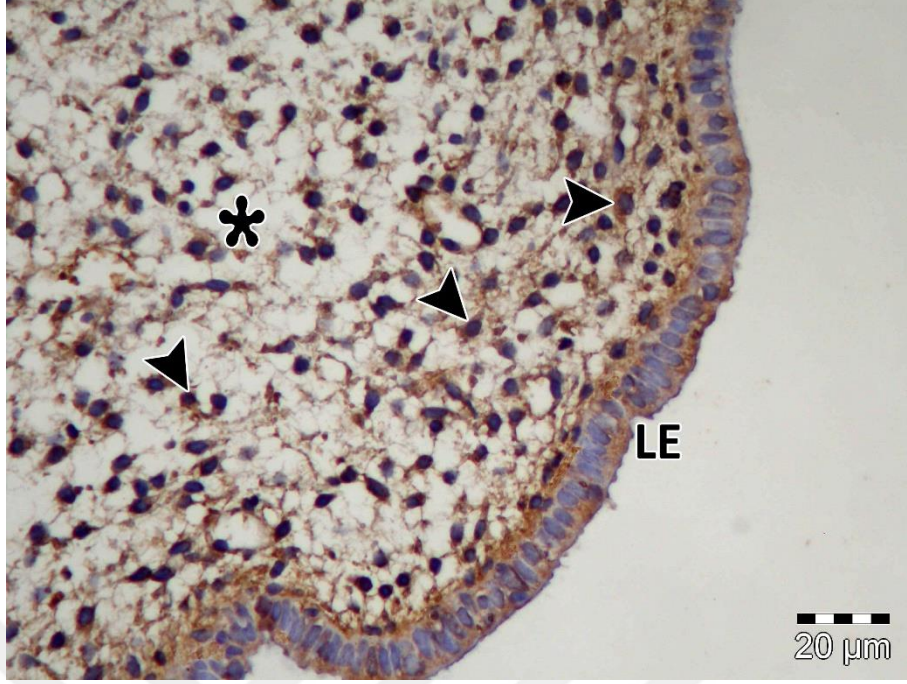
Endometriozis grubunda luminal epitel, glandular epitel ve stromada PMCA1 boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olduğu ($p=0,003$); luminal epitel ile glandular epitel arasındaki farkın $p=0,001$; glandular epitel ve stroma arasındaki farkın $p=0,001$ olduğu gözlemlendi. Luminal epitel ile stroma arasında anlamlı bir farklılık göstermedi ($p=0,207$). Açıklanamayan infertil grupta luminal epitel, glandular epitel ve stromada boyanma yoğunluğu bakımından anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p=0,070$). Kontrol grubunda ise luminal epitel, bez epiteli ve stromada PMCA1 boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olduğu ($p=0,006$); luminal epitel ile bez epiteli arasındaki farkın $p=0,004$; luminal epitel ve stroma arasındaki farkın $p=0,006$ olduğu gözlemlendi. PMCA1 boyanma yoğunluğunun en yüksek bez epitelinde olduğu belirlendi (Çizelge 4.4, Şekil 4.27).



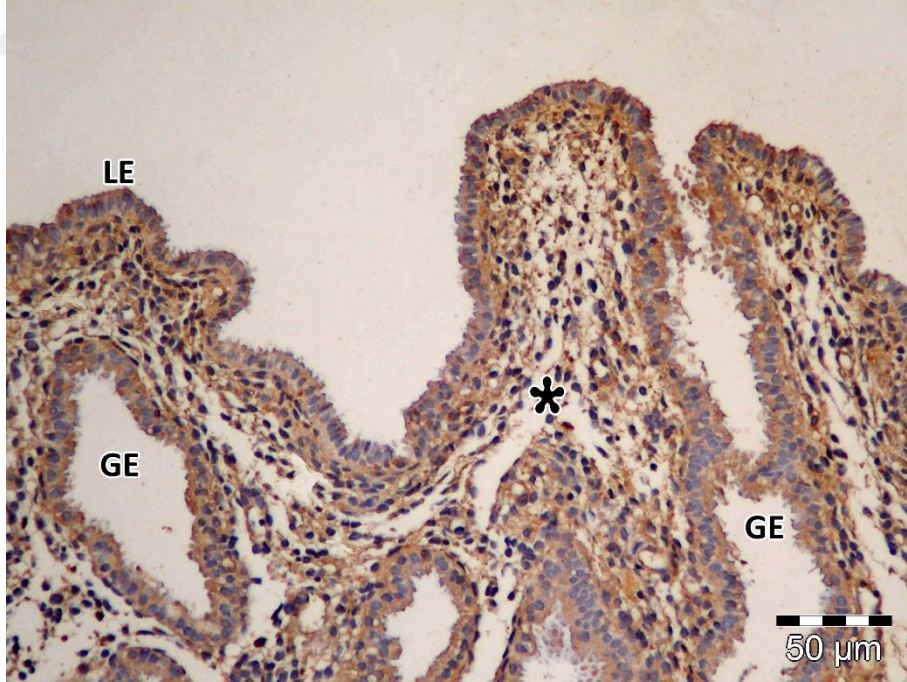
Şekil 4.19. PMCA1 immün boyamasına ait negatif kontrol. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X1200).



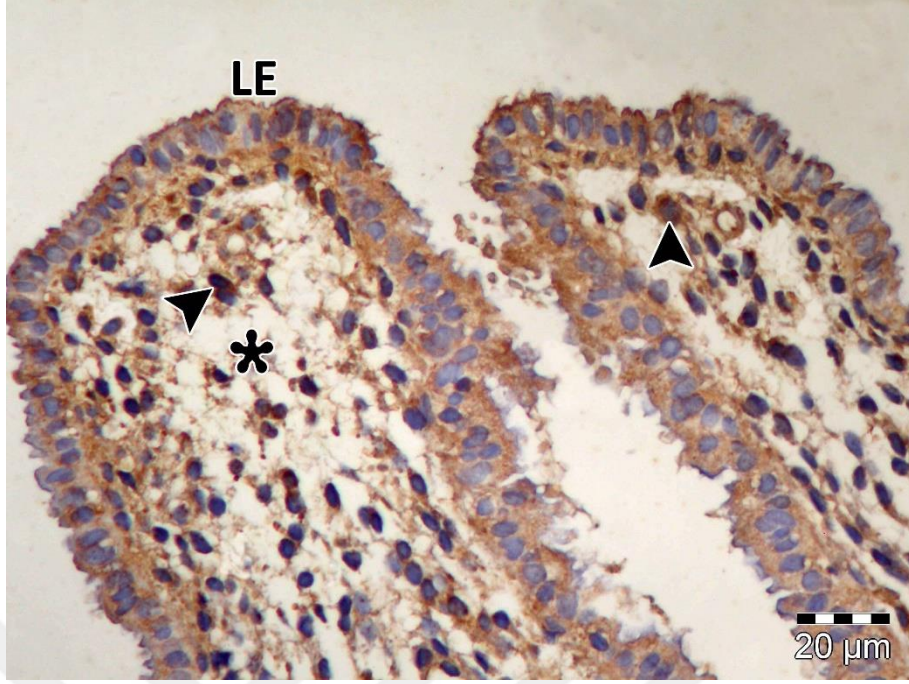
Şekil 4.20. Kontrol grubu PMCA1 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X600).



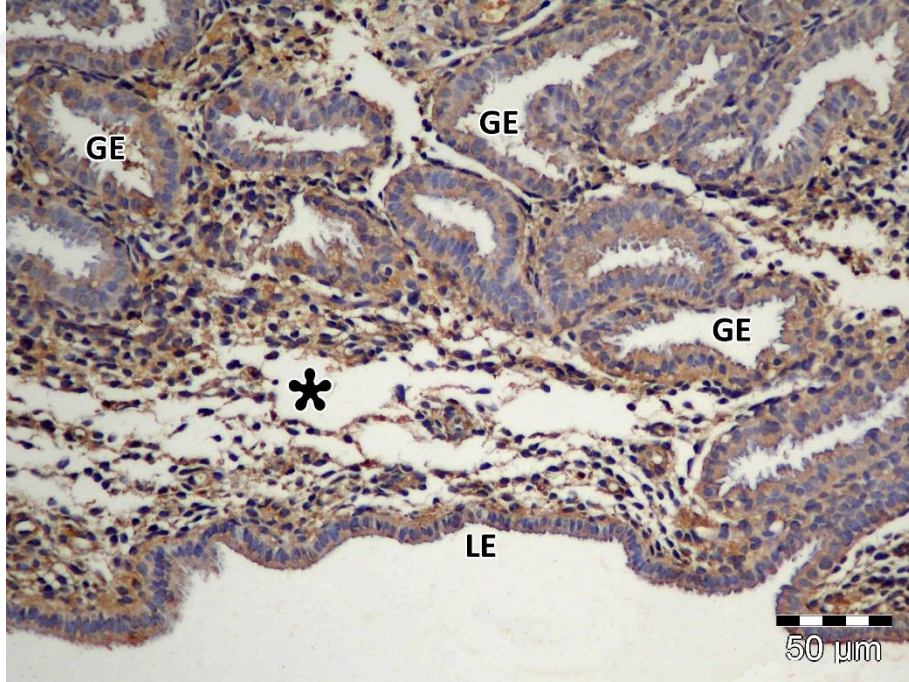
Şekil 4.21. Kontrol grubu PMCA1 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X1200).



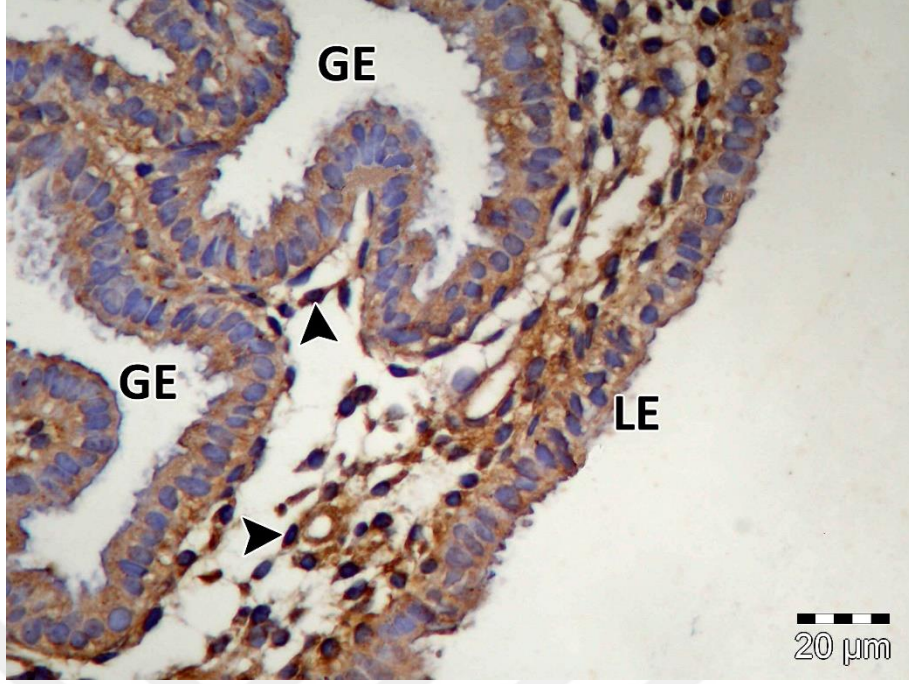
Şekil 4.22. Endometriozis PMCA1 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), stroma (asterisk) (X600).



Şekil 4.23. Endometriozis PMCA1 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), stroma (asterisk), stromal hücre (ok başı) (X1200).



Şekil 4.24. Açıklanamayan infertilite grubu PMCA1 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), stroma (asterisk) (X600).

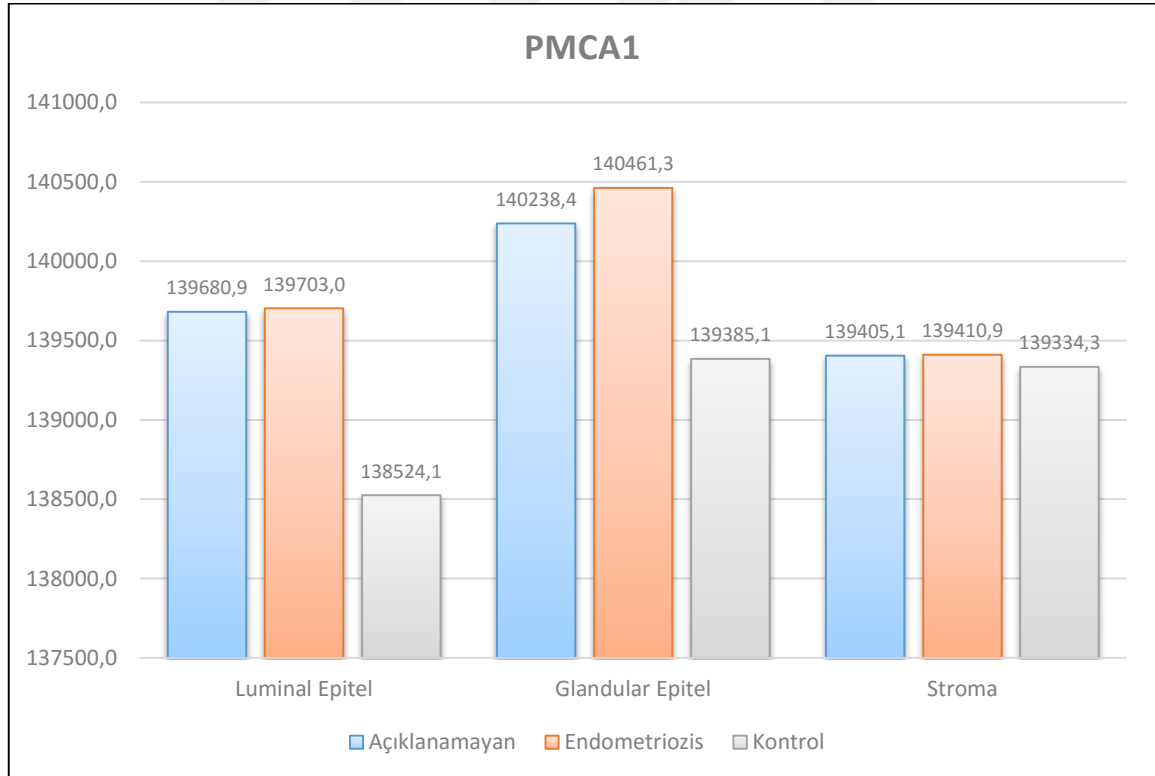


Şekil.4.25. Açıklanamayan infertilite grubu PMCA1 immün boyaması. Luminal Epitel (LE), Glandular Epitel (GE), stroma (asterisk) (X600).

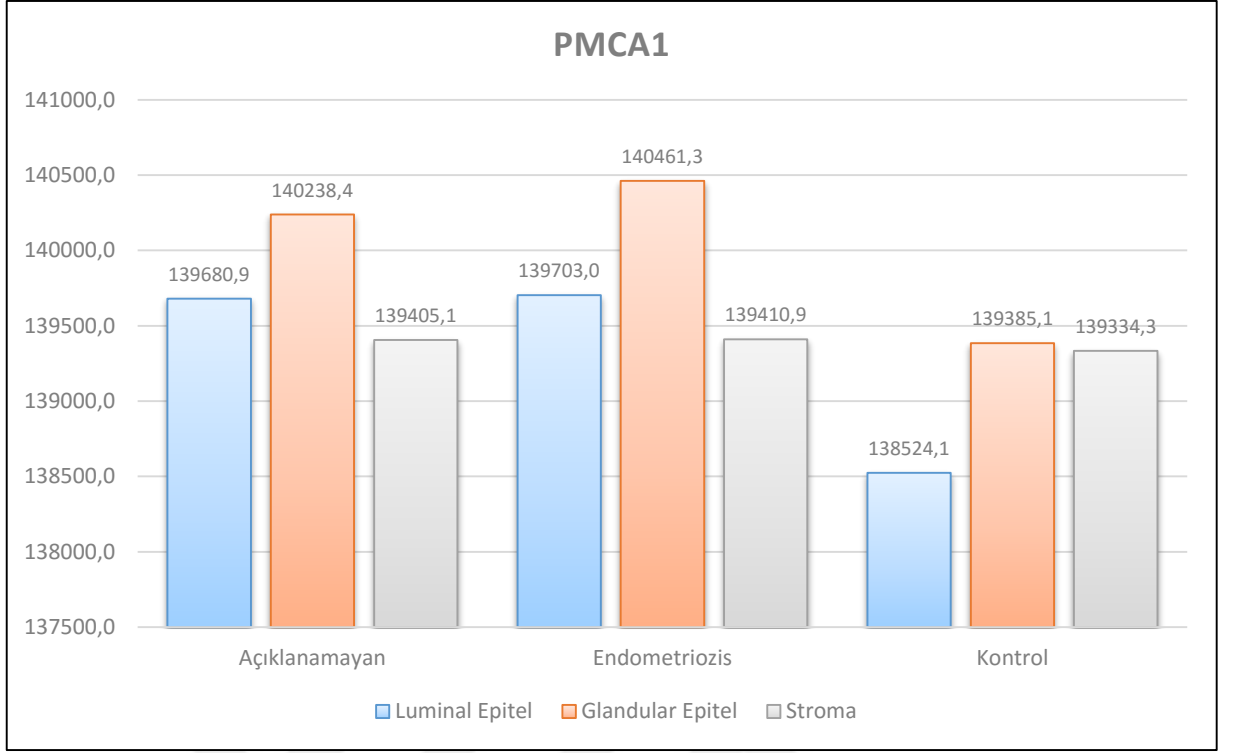
Çizelge 4.4. Gruplar arası ve grup içi LE, GE ve stromada PMCA1 immün işaretlenme yoğunluğunun istatistiksel karşılaştırılması.

| PMCA1 | | Luminal Epitel | Glandular Epitel | Stroma | Genel P Değeri | Grup içi karşılaştırma için P Değerleri | | |
|--|--------|-------------------|---------------------|-------------------|----------------|---|-------------|-------------|
| | | (A) | (B) | (C) | | A-B | A-C | B-C |
| Gruplar | | Ortalama± SS | Ortalama± SS | Ortalama± SS | | | | |
| Açıklanamayan (n=15) | =I | 139.680,9± 898,07 | 140.238,4± 1.152,21 | 139.405,1± 734,96 | 0,070 | 0,09 | 0,29 | 0,05 |
| Endometriozis Grubu (n=12) | =II | 139.703,0± 829,18 | 140.461,3± 875,48 | 139.410,9± 391,99 | 0,003 | 0,00 | 0,20 | 0,00 |
| Kontrol Grubu (n=14) | =III | 138.524,1± 685,46 | 139.385,1± 820,13 | 139.334,3± 309,33 | 0,006 | 0,00 | 0,00 | 0,85 |
| Grup içi karşılaştırma için genel P değeri | | <0,001 | 0,016 | 0,914 | | | | |
| Gruplar arası Karşılaştırmalar | | | | | | | | |
| | I→II | 0,950 | 0,584 | 0,984 | | | | |
| | I→III | 0,003 | 0,028 | 0,721 | | | | |
| | II→III | 0,001 | 0,002 | 0,606 | | | | |

General Linear Model Repeated Anova (Wilks' Lambda-Huynh-Feldt) -Univariate (ANOVA) Analysis of Variance (Bootstrap) - İkili Karşılaştırmalar için: LSD - Bonferroni - SS: Standart sapma



Şekil 4.26. Gruplar arası PMCA1 immün işaretlenme yoğunluğunun; luminal epitel, glandular epitel ve stroma arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması. Post hoc ile gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.



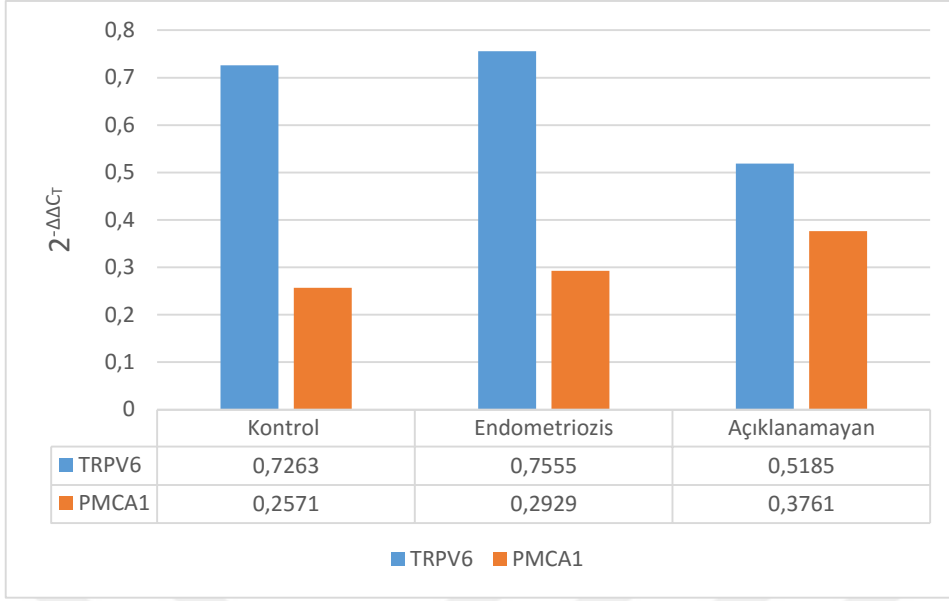
Şekil 4.27. Grup içi PMCA1 immün işaretlenme yoğunluğunun; luminal epitel, glandular epitel ve stroma arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması. Post hoc ile gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.

4.5. RT- PCR Analiz Sonucu

Kontrol, endometriozis ve açıklanamayan infertilite grupları arasında TRPV6 ve PMCA1'e ait mRNA ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.28).

Çizelge 4.5. Kontrol, endometriozis ve açıklanamayan infertilite gruplarının mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

| | Kontrol (n=14) Ort±SS | Endometriozis (n=12) Ort±SS | Açıklanamayan (n=15) Ort±SS | P değeri |
|--------------|--------------------------------------|--|--|-----------------|
| TRPV6 | ,73±,37 | ,76±,27 | ,52±,32 | 0,116 |
| PMCA1 | ,26±,32 | ,29±,50 | ,38±,63 | 0,806 |



Şekil 4.28. TRPV6 ve PMCA1 mRNA ekspresyon düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ analizi.

TARTIŞMA

Endometrial reseptivitenin başarısı; embriyo implantasyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörleri (HOXA10, STAT3, p53), büyüme faktörleri, sitokinler (HB-EGF, LIF, prokinetikin 1, IL-1, IL-11), hücre adezyon molekülleri ve ligandlarının ($\alpha\beta3$ integrin, trophinin, L-selektin ligandı) düzenli ekspresyonuna bağlıdır. İmplantasyon sırasında infertilitenin potansiyel belirteçlerini ve moleküler mekanizmalarını belirlemek amacıyla birçok genin ekspresyonu araştırılmıştır. Mid-sekretuar faz sırasında bazı proteinlerin ekspresyonundaki farklılıklar, endometrial reseptivite ile ilgili kusurlar ve/veya pre-reseptif fazdan reseptif faza geçiş sırasında endometrial farklılaşma sürecinde değişikliklerden sorumlu olabilmektedir (136, 137).

Veri tabanı üzerinden infertil kadınların endometriyumunda hücre lokalizasyon (%21.1), ekstrasellüler bölgede lokalize olan (19.2), transport (%18.8) ve transport aktivitesine (%13.1) katılan regülasyonu bozulmuş önemli sayıda gen tespit edilmiştir. Regülasyonu bozulan transporta katılan genlerin önemli bir oranını (%9.9) iyon transport genleri oluşturmaktadır. Bu genler arasında Ca^{+2} bağımlı hücre-hücre adezyon mekanizmalarına katılan katenin; gap junction, sıkı bağlantılar, Ca^{+2} sinyalleşmesi ve fokal adezyona katılan hücresel sinyal yolları ile ilişkili PKC; ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesine katılan matriks metalloproteinazlar, hücre iskeletinin yapısal komponenti olan aktin olmak üzere birçok gen ailesi yer almaktadır (138).

Bu çalışmada endometriozis ve açıklanamayan infertil hastalardan ve kontrol vakalarından alınan endometrial dokuların hematoksilen eozin boyamasında; endometrial epitelin tek katlı silindirik hücrelerden oluştuğu, lamina propria içerisinde kıvrımlı basit tübüler bezlerin yerleştiği ve bezler arasında gevşek bağ dokusu yapısında stromanın oldukça ödemli olduğu, glandular epitel içerisinde yer yer salgı vakuollerinin varlığı, epitel hücrelerinin luminal yüzeylerinin oldukça düzensizleştiği tespit edildi. Işık mikroskopik incelemede kontrol ve hasta grupları arasında morfolojik olarak belirgin bir fark gözlenmedi. Kontrol ve hasta gruplarının yaş, VKİ, E_2 , progesteron, infertilite süreleri, kan Ca^{+2} düzeyleri gibi klinik özellikleri de iki grup arasında benzerlik göstermekteydi.

Açıklanamayan infertil kadınlarda Ca^{+2} bağımlı hücre içi proteaz olan kalpain 6 ve ekstrasellüler matrikse hyaluronik asiti bağlayan hyaluronan-bağlayıcı protein 2'nin ekspresyon profili de fertil kontrollerden farklıdır. Cofilin-1, apolipoprotein-A1 (apoA-1), Ras-ilişkili protein Rap-1b, ve RAN GTP-bağlayıcı nükleer protein ekspresyonu, bu kadınların mid-sekretuar faz endometriyumunda artmıştır. İmmünlökalisasyon çalışmalarında hücre adezyon ve invazyonu ile ilişkili aktin hücre iskeletinin önemli düzenleyicisi olan Cofilin-1'in, açıklanamayan infertil hastaların erken sekretuar faz endometriyumu ile karşılaştırıldığında mid-sekretuar faz endometriyumunda stroma, glandular ve luminal epitelde ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Aktin organizasyonun düzensizliğinin endometriozisin nedensel faktörlerinden biri olduğu ileri sürülmektedir. İnfertil kadınların reseptif fazında Cofilin-1 ekspresyonunun artmasının, uygun olmayan aktin polimerizasyonu ve depolimerizasyondan kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir. İmplantasyon sırasında önemli rolü olan adezyon molekülleri ve inflamatuvar mediatörlerin sentezlenmesini inhibe edebilen, inflamatuvar özelliğe sahip apoA-1'in, ötopik endometriyumda anormal ekspresyonu ile birlikte, endometriozisli hastaların endometriyumunda immünreaktivitesinin luminal epitelde arttığı ve glandular epitelde azaldığı bildirilmiştir. Açıklanamayan infertil hastaların mid-sekretuar endometriyumunda ise stroma, luminal ve glandular epitelde apoA-1 ekspresyonunda önemli bir artışın olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada apoA-1 ekspresyonundaki artışın, endometriozis ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı gibi infertilite ile ilişkili patolojilerin nedeni olabileceği sonucuna varılmıştır. Bunun gibi implantasyon sırasında önemli rol oynayan pek çok proteinin moleküler mekanizmasının anlaşılabilmesi için açık kapılar bulunmaktadır (139).

Çalışmamızda kontrol, endometriozis ve açıklanamayan infertilite grupları arasında TRPV6 ve PMCA1'e ait mRNA ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Kontrol ve hasta grupları protein ekspresyonu karşılaştırıldığında; TRPV6 ve PMCA1 ekspresyonunun endometriozis açıklanamayan infertil hastaların endometrial luminal ve glandular epitelinde arttığı gözlemlendi. Endometriozis ve açıklanamayan infertil hasta gruplarında; grup içinde luminal epitel, glandular epitel ve stroma karşılaştırıldığında, luminal epitel ve glandular epitelde immün işaretlenme yoğunluğu stromaya göre fazlaydı.

Ca^{+2} ekzositoz, kasılma, metabolizma, transkripsiyon, çoğalma ve apoptozis dahil olmak üzere birçok farklı biyolojik fonksiyonları uyaran bir hücre içi sinyaldir (140). Endometriyumda Ca^{+2} 'un hücrel ve moleküler düzeyde etkinliği ve düzenleme mekanizmaları tam olarak anlaşılmış değildir. Kemirgen (141) ve domuz (132) gibi türlerde TRPV6; implantasyon, gebeliğin devamı, fetal gelişim ve Ca^{+2} desteğinde önemli rol oynamaktadır. Sprekeler ve ark., (115) yapmış olduğu çalışmada, sığır endometriyumunda TRPV6 ve Ca^{+2} bağlayıcı protein olan kalbindin-9k ekspresyonunun luminal ve glandular epitelde olduğunu, buradaki lokalizasyonlarının epitel içinde Ca^{+2} 'a talep ve transportunda artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Domuzlarda luminal Ca^{+2} konsantrasyonu yaklaşık gebeliğin 12. gününde östrojen ile artış göstermektedir. Epitel hücrelerine hücre içi Ca^{+2} iyonlarının akışı çeşitli endokrin, parakrin ve otokrin faktörleri aktive eden hücre içi sinyal yollarında ikincil haberci olarak rol oynayabilmektedir. Gebelik sırasında luminal epitel blastokistin hücre yüzeyine bağlanması için integrinler dahil pek çok hücre adezyon moleküllerini eksprese etmektedir. Çünkü integrin-aracılı hücre adezyonu, hücre içi Ca^{+2} iyonları ile indüklenebilir ("iç-dış" sinyalleşme). Gebelik sırasında TRPV6 aracılığıyla luminal epitele taşınan Ca^{+2} iyonları, luminal epitel ve blastosist arasındaki hücre adezyonunu etkileyebilir (142). Gebeliğin başlaması ve devamında uterus ve konseptus arasındaki hücre-hücre etkileşimlerinde hücre adezyonu için Ca^{+2} iyonlarının varlığı gerekmektedir. Hücre içi Ca^{+2} homeostazının düzenlenmesi ekstrasellüler alan ve hücre içi depolardan Ca^{+2} girişini gerektirir. Ca^{+2} sinyalizasyonundaki değişikliğin proliferasyon, göç, invazyon ve metastaz gibi malign fenotiplerin ekspresyonunu dinamikleştirmektedir (143). Endometrial hücre fonksiyonunun bozulması ve implantasyon başarısızlığı, Ca^{+2} homeostazı ve uygun sinyalizasyondaki hataların sonucunda mümkün olabilir. Çalışmamızda, immünohistokimyasal boyamalar neticesinde TRPV6 boyanma yoğunluğunun endometriozis ve açıklanamayan infertil grupların luminal epitelinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi. Bu bilgiler ışığında, bu gruplarda immünopozitif hücrelerin boyanma yoğunluğunun kontrol grubuna göre artmış olması, Ca^{+2} sinyalizasyonundaki işlevsel bozukluğun TRPV6 kanal fonksiyonunun değişmesine neden olarak, integrin aracılı hücre adezyonunu olumsuz etkilediğini işaret edebilir. Nitekim endometriozis ve açıklanamayan infertil hastalarda anormal $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu olduğu bildirilmiştir (144).

Endometrial luminal ve glandular epitel, gebelik sırasında histotrof olarak adlandırılan uterin salgıların üretiminde oldukça aktiftir. Bu salgı konseptus gelişimi, implantasyon ve plasenta üzerinde etkili taşıyıcı proteinler, enzimler, büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matris proteinlerini içermektedir (145, 146). Özellikle, glandular epitel salgı aktivitesi, gebeliğin ortasında fetal büyüme arttıkça hızla artmaktadır. Böylece Ca^{+2} iyonları endometriyumda çeşitli salgı moleküllerinin ekzositoz ile salgılanmasını etkileyebilir, ki bu da Ca^{+2} 'un ekzositoza katıldığını göstermektedir (119, 117). Eksik glandüler aktivitenin genellikle "salgı faz defekti" olarak tanımlanan, insanlarda erken gebelik kayıplarının altta yatan nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir ve kütle spektrometresi kullanılarak yapılan proteomik çalışmalar, fertil kadınların uterin luminal sıvısında bulunan proteinlerin, infertil kadınlar ile karşılaştırıldığında değiştiğini göstermiştir (147, 148). Glandular epitel ve stroma arasındaki parakrin etkileşim insanlarda blastokist implantasyonu için önemli olan stromal hücre desidualizasyonu ve reseptif endometriyum için gerekli olabilir. İyonlar, su ve büyük moleküller için transepitelyal paraselüler permeabilite, ince bağırsak ve böbrek de dahil olmak üzere pek çok doku ve organlardaki sıkı bağlantıların düzenlenmesi ile ayarlanmaktadır. Bu nedenle sıkı bağlantılardaki değişen ekspresyon ile transepitelyal paraselüler permeabilitesindeki bir değişiklik uterus lümenine Ca^{+2} iyonlarının salgılanmasını sağlayabilir. Bazı kanıtlar domuz, koyun ve insanlarda implantasyon süresince endometrial sıkı bağlantıların değiştiğini göstermektedir. Endometrial epitelyal sıkı bağlantıların dinamik düzenlenmesi endometriyumda Ca^{+2} salgı aktivitesini etkiliyor olabilir (132). Bu çalışmada TRPV6 ve PMCA1 immün işaretlenme yoğunluğunun glandular epitelde kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı derecede artmış olduğu tespit edildi.

Başarılı embriyo implantasyonu için, embriyo, endometrial epitel ve stromal hücreler arasında etkili bir iletişim gereklidir. TRP kanalları epitel ve stromal hücreler arasında hücreler arası sinyalizasyonda önemli rolü olan potansiyel oyunculardır. Bu Ca^{+2} geçiren iyon kanallarının desidualizasyona katıldığı gözlenmektedir (149). Ancak, insan endometrial epitel ve stromal hücrelerde TRP kanalları dağılımı hakkında bilgiler oldukça azdır. Yapılan bir çalışmada menstrual siklusun luteal fazında elde edilen endometrial biyopsilerde TRPV6'nın ekspresyonu mRNA seviyesinde belirlenirken primer endometrial stromal hücre kültüründe belirlenemediğini, bu iyon kanallarının ek analizi için seçici farmakolojik ajanların eksikliğini spesifik antikörlerin sınırlı olmasından

kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Endometrial biyopsilerdeki luminal ve glandular epitel hücreleri, kan damarları ve sinir liflerindeki bilinmeyen fraksiyonu saflaştırılmış kültürlerde TRP kanallarındaki önemli düşüşün bir açıklaması olabilir. Bu da biyopsilerde RNA'ları belirlenebilir iken, saf stromal hücre kültürlerinde TRPV6'nın olmamasını yansıtmaktadır (150). Bu çalışmada ise stromada TRPV6 antikoru ile bazı hücrelerin işaretlendiği, TRPV6 boyanma yoğunluğu bakımından endometriozis ve açıklanamayan infertil gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

Diyabet, osteoporoz, hiperkalsiüri, hipertansiyon, kanser ve nörodejeneratif hastalıklarda farklı PMCA alt birimlerinin değişen ekspresyonları, hastalığın patolojik sonuçlarında önemli rol oynadığını göstermektedir (151, 152, 153, 125). Curry ve ark.'larının (154) yaptığı bir çalışmada PMCA1 ve PMCA4'ün, MDA-MB-231 meme kanser hücre hattında Ca^{+2} sinyalizasyonu ve hücre ölüm yollarının düzenlenmesinde farklı rolleri olduğunu rapor etmişlerdir. Lee ve ark., (155) meme kanser hücre hattında, Aung ve ark., (156) ise kolon kanser hücre hattında PMCA1'in aşırı eksprese olduğunu; gen transkripsiyonu, hücre farklılaşması ve çoğalmasında değişikliklere neden olabileceğini bildirmişlerdir. Apoptozisten kurtulma yeteneği olan kanser hücresinin özelliklerinden biri, PMCA'nın aşırı eksprese olması ile hücre ölümünü aktive eden hücre içi Ca^{+2} seviyelerinin sürekli artışını engelleyerek apoptotik direnci sağlamaktır. Sitoplazmada Ca^{+2} seviyesinin sürekli artması (157), mitokondriyal Ca^{+2} alımının artması (158) ile Ca^{+2} pompalarının potansiyeli için kanser hücrelerinin apoptozise duyarlı hale gelmesinde açık kanıt sağlamaktadır. B-hücre lenfoma 2 (bcl2)'nin varlığını sürdürme etkisi, hücre içi Ca^{+2} seviyesini azaltarak, daha sonra mitokondriye Ca^{+2} alımını ve apoptotik yolların aktivasyonunu azaltır (159, 160). Yapılan bir çalışmada, preeklampsili hastaların plasentalarından kültüre edilen sinsityotrofoblastlarda PMCA1 protein ekspresyonu ve ATP sentaz seviyesinin önemli ölçüde azaldığı; bu pompalar aracılığıyla hücre dışına yetersiz Ca^{+2} salınımı ve muhtemelen preeklampitik plasentalarda hipoksiye neden olan ATP eksikliğinin ise oksidatif strese bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (133). Bruce ve ark. (161), oksidatif stresin sıçan pankreatik hücrelerde sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu artırarak, PMCA'nın inhibisyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda ise endometriozis ve açıklanamayan infertil grupta PMCA1 boyanma yoğunluğunun luminal epitel ve glandular epitelde kontrol grubuna

kıyasla oldukça arttığı gözlemlendi. Bu genin kodladığı protein ekspresyonunun artması, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyon dengesini bozarak, farklı transkripsiyon programlarının sitozolik Ca^{+2} seviyesindeki kontrolü yeniden kazanmak için bu pompaları aktive ettiğini ve bazal sitozolik Ca^{+2} seviyesindeki dengeyi sağlayamaması durumunda belki de fertilité üzerindeki olumsuz etkisini gösteren önemli bir kanıt olarak düşünülmektedir.

İn situ hibridizasyon analizleri gebelik sırasında domuz endometriyumunda PMCA1'in özellikle luminal epitel ve glandular epitelde ekspresse olduğunu, stromada ise zayıf ekspresse olduğunu göstermiştir. Moleküler düzeyde Ca^{+2} iyonunun hücre dışına transportunu sağlayan mekanizmaların rolünün tam olarak anlaşılamadığı ve daha fazla çalışma yapılması gerektiği vurgulanmıştır (132). Çalışmamızda ise stromada PMCA1 antikoru ile bazı hücrelerin işaretlendiği, boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

Kadın genital sisteminde özellikle endometriyum dokusunda metallerin etkilerini değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Wistar albino ratlarda kurşun, çinko ve cıva gibi metallerin endometrial değişiklikleri tetikleyebileceği ve uterotrofik deneylerde östrojen benzeri etki sergilediği bildirilmiştir. Bu nedenle, in vitro ve in vivo çalışmalar bazı metallerin endometrial homeostazı değiştirme ve uterin epitel hücre büyümesini uyarabileceğini göstermiştir (162). Atomik absorpsiyon spektrometri ile malign over dokularında Ca^{+2} seviyelerinin benign dokulardan biraz daha yüksek olduğu, kanser endometrial dokuların Ca^{+2} seviyelerinde ise bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Benign endometrial dokulardaki Ca^{+2} konsantrasyonlarının ortalamasının yaş ağırlık bazında 343-330 mg/kg olduğu gösterilmiştir (163). Cunzhi ve ark., (164) serviks kanserinde doku Ca^{+2} konsantrasyonunun sağlıklı dokular ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşük olduğunu bildirmiştir. İnsan meme biyopsilerinde; sağlıklı ve tümör dokuları karşılaştırıldığında Al, Ca, Cu, K, Mg, Mn, P ve Zn gibi farklı elementlerin İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES) ile konsantrasyonlarında anlamlı farklılığın olduğu gözlemlenmiştir. Tümör dokularında Ca^{+2} birikimi mikrokalsifikasyonların varlığının göstergesidir. Kalsiyum hidroksiapatit kristalleri çevre hücrelere kanserin yayılmasında aktif rol oynayabilir ve bu da komşu dokuda Ca^{+2} birikimini açıklayabilir, şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca bu bileşik MCF-7 ve Hs578T hücre hattı ve normal insan meme epitel hücre hattında mitozu artırır. Tümör dokularında Mg, K ve P hücre proliferasyon hızını desteklemek için metabolik enerji üretim ve

transportuna katılmaktadır (165). Hücre membranı boyunca iyonik gradientin korunması için Na-K gereklidir. Nasiadek ve ark. (166) yaptığı çalışmada normal uterin dokular ile karşılaştırıldığında uterin kanser dokularında Ca^{+2} konsantrasyonunda önemli artış olduğunu göstermişlerdir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, fertil ve infertil endometrial biyopsilerde, Ca^{+2} konsantrasyonunu inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, dokudaki Ca^{+2} konsantrasyonu gruplar arası karşılaştırıldığında açıklanamayan infertil hasta grubunda, kontrol ve endometriozis grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı. Bu hastalarda Ca^{+2} konsantrasyonundaki bu değişikliğin nedenlerinden birinin, hücrede Ca^{+2} düzeyindeki artışla ilgili olabileceği ve bu artışın da Ca^{+2} 'un etkin olduğu sinyalizasyon yollarında işlevsel kayba neden olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak, çalışmamızdan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; endometriozis ve açıklanamayan infertil hastalarda TRPV6 ve PMCA1 protein ekspresyonunun bozulmasının, implantasyon ile ilgili çeşitli süreçleri olumsuz etkileyebileceği, özellikle açıklanamayan infertil hastalarda Ca^{+2} konsantrasyonunun da değiştiği, bu durumun da infertilitenin potansiyel hücresel ve moleküler mekanizmalarından biri olabileceği düşünüldü.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, implantasyon başarısızlığı olan endometriozisli ve açıklanamayan infertil hastaların mid-sekretuar faz endometriyum dokuları ışık mikroskopik, immünohistokimyasal, moleküler ve kütle spektrometresi inceleme sonuçları fertil grubun endometriyum dokuları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde aşağıda belirtilen sonuçlara varılmıştır.

1. Endometriozis, açıklanamayan infertilite ve kontrol grubuna ait endometriyum doku örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirmesinde belirgin bir farklılık gözlenmedi. Bu konuda planlanacak ultrastrüktürel çalışmaların yararı olabileceği düşünüldü.
2. Kontrol ve hasta gruplarının yaş, VKİ, E2 ve progesteron, infertilite süreleri, kan Ca^{+2} düzeyleri gibi klinik özellikleri gruplar arasında benzerlik göstermekteydi.
3. Ca^{+2} homeostazında önemli rol oynayan TRPV6 immünreaktivitesinin, endometriozis ve açıklanamayan infertil hastaların endometrial luminal ve glandular epitelinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi. Bunun nedeninin, Ca^{+2} sinyalizasyonundaki hataların TRP kanal fonksiyonunda değişikliğe yol açarak, uterus ve konseptus arasındaki sinyal iletiminin düzenlenmesinde etkin rolü olan hücre adezyon moleküllerine olumsuz etkileri sonucunda gerçekleşebileceği düşünüldü. Bu durum infertilitenin nedenine yönelik açığa kavuşmayan mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.
4. PMCA1 immün işaretlenme yoğunluğunun, endometriozis ve açıklanamayan infertil grupların luminal ve glandular epitelinde kontrol grubuna kıyasla oldukça arttığı gözlemlendi. Bu genin kodladığı protein ekspresyonunun artması, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyon dengesini bozarak, farklı transkripsiyon programlarının sitozolik Ca^{+2} seviyesindeki kontrolü yeniden kazanmak için bu pompaları aktive ettiğini ve bazal sitozolik Ca^{+2} seviyesindeki dengeyi sağlayamaması durumunda fertilité üzerinde olumsuz etkisini gösteren önemli bir bulgu olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle TRPV6 ve PMCA1'in, hücre adezyonu ve sinyal yolları ile ilişkili proteinler ile birlikte ele alınarak bu mekanizmanın aydınlatılması gerekmektedir.
5. TRPV6 ve PMCA1 antikorları ile stromadaki bazı hücrelerin işaretlendiği, TRPV6 boyanma yoğunluğu bakımından endometriozis ve açıklanamayan infertil gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı

tespit edildi. Endometrial epitel ve stromal hücreler arasındaki iletişimde bu proteinlerin rollerinin araştırılması için kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

6. Kontrol, endometriozis ve açıklanamayan infertilite grupları arasında TRPV6 ve PMCA1'e ait mRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.
7. Dokudaki Ca^{+2} miktarı gruplar arası karşılaştırıldığında açıklanamayan infertil hasta grubunda, kontrol ve endometriozis grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı. Bu hastalarda Ca^{+2} konsantrasyonundaki bu değişikliğin nedenlerinden birinin, hücrede Ca^{+2} düzeyindeki artışla ilgili olabileceği ve bu artışın da Ca^{+2} 'un etkin olduğu sinyalizasyon yollarında işlevsel kayba neden olabileceği düşünüldü. Bu nedenle in vitro çalışmalar ile bu hastaların endometrial hücrelerinde Ca^{+2} düzeyinin ölçülmesi de bu işleyişler için temel bilgi üretebilir. Ayrıca infertil hastalarda implantasyon sürecinde endometriyumda doku Ca^{+} konsantrasyonundaki değişikliklerin potansiyel etkilerini inceleyen ek çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışmada, endometriozisli hastaların ve açıklanamayan infertilite tanısı konmuş hastaların endometriyumlarında mid-sekretuar fazda Ca^{+2} metabolizmasında rol oynayan TRPV6 ve PMCA1'in proteinlerin ekspresyonlarındaki değişikliklerin saptanması ve embriyo implantasyonundaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Standart tanısal testler ile açıklanamayan infertilite tanısı alan hastalarda ve patogenezin belirsizliği dolayısıyla uygun, yan etkisi az medikal veya cerrahi tedavi seçenekleri bulunamayan endometrioziste infertilitenin nedenine yönelik açığa kavuşmayan mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. Ca^{+2} homeostazını düzenleyen moleküllerin insan üremesindeki etkilerinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi ve mekanizmalarının biyokimyasal, genomik ve proteomik verileri kullanan klinik ve temel bilim araştırmaları ile mümkün olabileceği kanısındayız. Bu hastaların endometriyumunda implantasyon sırasındaki aksaklıkların nedeninin Ca^{+2} metabolizmasında olan değişim ile ilgili olabileceği ve yardımcı üreme teknikleri tedavilerinin geliştirilerek bu yönde düzenlenmesinin fertiliteye katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Fadhlaoui A, Bouquet de la Jolinière J, Feki A.** Endometriosis and infertility: how and when to treat? *Front Surg*, **2014**; 2;1:24.
2. **Holoch KJ, Lessey B.** Endometriosis and Infertility. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, **2010**; 53(2):429-438.
3. **Acién P, Velasco I.** Endometriosis: A Disease That Remains Enigmatic. *ISRN Obstet Gynecol*, **2013**; 17:242149.
4. **Piva M, Horowitz G, Sharpe-Timms KL.** Interleukin-6 differentially stimulates haptoglobin production by peritoneal and endometriotic cells in vitro: a model for endometrial peritoneal interaction in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**; 86:2553-61.
5. **Macer ML, Taylor HS.** Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am*, **2012**; 39(4):535-49.
6. **May KE, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM.** Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. *Hum Reprod Update*, **2011**; 17(5):637-53.
7. **Matsuzaki S, Darcha C, Maleysson E, Canis M, Mage G.** Impaired down-regulation of E-cadherin and beta-catenin protein expression in endometrial epithelial cells in the mid-secretory endometrium of infertile patients with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, **2010a**; 95:3437–3445.
8. **Kyama CM, Overbergh L, Mihalyi A, Meuleman C, Mwenda JM, Mathieu C, D’Hooghe TM.** Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. *Fertil Steril*, **2008**; 89:301–310.
9. **Mu L, Zheng W, Wang L, Chen XJ, Zhang X, Yang JH.** Alteration of focal adhesion kinase expression in eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril*, **2008**; 89:529–537.
10. **Rey JM, Pujol P, Dechaud H, Edouard E, Hedon B, Maudelonde T.** Expression of oestrogen receptor-alpha splicing variants and oestrogen receptor-beta in endometrium of infertile patients. *Mol Hum Reprod*, **1998**; 4:641–647.
11. **Hudelist G, Keckstein J, Czerwenka K, Lass H, Walter I, Auer M, Wieser F, Wenzl R, Kubista E, Singer CF.** Estrogen receptor beta and matrix metalloproteinase 1 are coexpressed in uterine endometrium and endometriotic lesions of patients with endometriosis. *Fertil Steril*, **2005a**; 84:1249–1256.
12. **Fedele L, Marchini M, Bianchi S, Dorta M, Arcaini L, Fontana PE.** Structural and ultrastructural defects in preovulatory endometrium of normo-ovulating infertile women with minimal or mild endometriosis. *Fertil Steril*, **1990**; 53:989–993.

- 13. Manohar M, Khan H, Sirohi VK, Das V, Agarwal A, Pandey A, Siddiqui WA, Dwivedi A.** Alteration in endometrial proteins during early- and mid-secretory phases of the cycle in women with unexplained infertility. *PLoS One*, **2014**; 18:9(11).
- 14. Brosens JJ, Hodgetts A, Feroze-Zaidi F, Sherwin JR, Fusi L, Salker MS, Higham J, Rose GL, Kajihara T, Young SL, Lessey BA, Henriot P, Langford PR, Fazleabas AT.** Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. *Mol Hum Reprod*, **2010**; 16(4):273-85.
- 15. Clapham DE.** Calcium Signaling. *Cell*, **2007**; 131(6):1047-58.
- 16. Mukherjee S, Brooks WH.** Stromal interaction molecules as important therapeutic targets in diseases with dysregulated calcium flux. *Biochim Biophys Acta*, **2014**; 1843(10):2307-14.
- 17. Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD:** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2000**; 1:11-21.
- 18. Lee GS, Jeung EB.** Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2007**; 293(1):132–138.
- 19. Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ.** The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium*, **2003**; 33:497-507.
- 20. Kim HJ, Lee GS, Ji YK, Choi KC, Jeung EB.** Differential expression of uterine calcium transporter 1 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1b during rat estrous cycle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2006**; 291:234-241.
- 21. Strehler EE, Caride AJ, Filoteo AG, Xiong Y, Penniston JT, Enyedi A.** Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann N Y Acad Sci*, **2007**; 1099:226-36.
- 22. Kışınışı HA, Gökşin E, Durukan T ve ark.** Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Ed. Ankara: Güneş, **1996**; 1119-1129.
- 23. Miller JH, Weinberg RK, Canino NL, Klein NA, Solues MR.** The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*, **1999**; 181:952.
- 24. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D’Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E.** ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*, **2005**; 20:2698–2704.
- 25. Rogers PA, D’Hooghe TM, Fazleabas A, Gargett C, Giudice L, Montgomery GW, et al.** Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. *Reprod Sci*, **2009**; 16:335-46.

- 26. Vercellini P, Fedele L, Aimi G, Pietropaolo G, Consooni D, Crosignani PG.** Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. *Human Reprod*, **2007**; 22(1):266-71.
- 27. Brotherson L.** Dissertio medica inauguralis de utere inflammatione ejusdem. Edinburgh, Balfour and Smellie, **1776**; 16-22.
- 28. Vassiliadis S, Relakis K, Papageorgiou A, Athanassakis I.** Endometriosis and infertility: a multi-cytokine imbalance versus ovulation, fertilization and early embryo development. *Clin Dev Immunol*, **2005**; 12(2):125-9.
- 29. Sinha AK, Agarwal A, Lakhey M, Mishra A, Sah SP.** Incidence of pelvic and extrapelvic endometriosis in Eastern region of Nepal. *Indian J Pathol Microbiol*, **2003**; 46(1):20-30.
- 31. Oral E, Arici A.** Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, **1997**; 24: 219-33.
- 32. Matarese G, De Placido G, Nikas Y, et al.** Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends Mol Med*, **2003**; 9:223-28.
- 33. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG and Talbert LM.** Retrograd menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*, **1984**; 64:151- 4.
- 34. Vignali M, Infantino M, Matrone R, et al.** Endometriosis: novel etiopathogenetic concepts and clinical perspectives. *Fertil Steril*, **2002**; 78:665-78.
- 35. Valle, R.F.** Endometriosis: current concepts and therapy. *Int J Gynaecol Obstet*, **2002**; 78:2, 107-119.
- 36. Sinha AK, Agarwal A, Lakhey M, Mishra A, Sah SP.** Incidence of pelvic and extrapelvic endometriosis in Eastern region of Nepal. *Indian J Pathol Microbiol*, **2003**; 46(1):20-3.
- 37. Germeyer A, Giudice LC.** How does endometriosis cause infertility? In: Tulandi T, Redwine D. Endometriosis: Advanced and Controversies. New York, NY: Marcel Dekker, **2004**; 9:151-66.
- 38. Hemmings R, Falcone T. Endometriosis. In: Falcone T, Hurd WW, editors.** Clinical Reproductive Medicine and Surgery. Philadelphia: Mosby Elsevier Publishers. **2007**; 729-45.
- 39. Brosens I.** Endometriosis and the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **2004**; 81:1198-1200.
- 40. Pellicer A, et al.** The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J Reprod Fertil Suppl*, **2000**; 55:109-19.
- 41. Bernhart K, Dunsmoor-SR, Coutifaris C.** Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **2002**; 77:1148-1155.

- 42. Arici A, Oral E, Bukulmez O, Duleba A, Olive DL, Jones EE.** The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril*, **1996**; 65:603-607.
- 43. Cahill DJ, Hull MG.** Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Hum Reprod*, **2000**; 6:56-66.
- 44. Yoshida S, Harada T, Iwabe T, Taniguchi F, Mitsunari M, Yamauchi N, Deura I, Horie S, Terakawa N.** A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis. *Hum Reprod*, **2004**; 19:1821-1825.
- 45. Donaghay M, Lessey BA.** Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med*, **2007**; 25:461-475.
- 46. Giudice LC, Telles TL, Lobo S, Kao L.** The molecular basis for implantation failure in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, **2002**; 955:252-264.
- 47. Wei Q, St. Clair JB, Fu T, Stratton P, Nieman LK.** Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. *Fertil Steril*, **2009**; 91:1686-1691.
- 48. Stilley JA, Birt JA, Sharpe-Timms KL.** Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. *Cell Tissue Res*, **2012**; 349(3):849-62.
- 49. Doody MC, Gibbons WE, Buttram VC Jr.** Linear regression analysis of ultrasound follicular growth series: evidence for an abnormality of follicular growth in endometriosis patients. *Fertil Steril*, **1988**; 49:47-5.
- 50. Tummon IS, Maclin VM, Radwanska E, Binor Z, Dmowski WP.** Occult ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility. *Fertil Steril*, **1988**; 50:716-720.
- 51. Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M.** Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, **1992**; 167:265-270.
- 52. Mansour G, Abdelrazik H, Sharma RK, Radwan E, Falcone T, Agarwal A.** L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertil Steril*, **2009a**; 91:2079-2086.
- 53. Mansour G, Aziz N, Sharma R, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A.** The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. *Fertil Steril*, **2009b**; 92:61-67.
- 54. Işıkoğlu M, Attar E.** Endometriosis Tedavisi. Nobel Tıp Kitabevleri, **2007**; 315-322.
- 55. Tuech JJ, Rousselet MC, Boyef J et al.** Endometrial cyst of the ovary. casereport and review. *Fertil Steril*, **2003**; 234-6.

- 56. Surrey ES, Silverberg KM, Surrey MW et al.** Effect of prolonged gonadotropin-releasing hormone agonist therapy on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer patients with endometriosis. *Fertil Steril*, **2002**; 78(4): 699-704.
- 57. Kistner RW.** The use of progestins in the treatment of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, **1998**; 75:264-278.
- 58. Riis BJ, Christiansen C, Johansen JS et al.** Is it possible to prevent bone loss in young women treated with luteinizing hormone-releasing agonists. *Clin Endocrinol Metab*, **2000**; 70:920-924.
- 59. Fedele L, Bianchi S, Bocciolone L, et al.** Buserelin acetate in the treatment of pelvic pain associated with minimal and mild endometriosis: a controlled study. *Fertil Steril*, **2003**; 59:516-521.
- 60. Redwine DB.** Conservative laparoscopic excision of endometriosis by sharp dissection: life table analysis of reoperation and persistence of recurrent disease. *Fertil Steril*, **2001**; 56:628-634.
- 61. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.** Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, **2008**; 89(6):1603.
- 62. Randolph JF, Ying YK, Maier DB, Schmidt CL.** Comparison of real time ultrasonography, hysterosalpingography and laparoscopy/hysteroscopy in the evaluation of uterine abnormalities and tubal patency. *Fertil Steril*, **1986**; 46:828.
- 63. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.** Optimal evaluation of the infertile female. *Fertil Steril*, **2006**; 86:264-7.
- 64. Leach RE, Moghissi KS, Randolph JF, Reame NE, Blacker CM, Gingburg KA et al.** Intensive hormone monitoring in women with unexplained infertility: evidence for subtle abnormalities suggestive of diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*, **1997**; 68:413-20.
- 65. Templeton AA, Penney GC.** The incidence, characteristics, and prognosis of patients whose infertility is unexplained. *Fertil Steril*, **1982**; 37:175-182.
- 66. Blacker CM, Ginsburg KA, Leach RE, Randolph J, Moghissi KS.** Unexplained infertility: evaluation of the luteal phase; results of the National Center for Infertility Research at Michigan. *Fertil Steril*, **1997**; 67:437-42.
- 67. Tollner TL, Venners SA, Hollox EJ, Yudin AI, Liu X, Tang G, et al.** A common mutation in the Defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Sci Transl Med*, **2011**; 3:92ra65.
- 68. Clancy KB.** Reproductive ecology and the endometrium: physiology, variation, and new directions. *Am J Phys Anthropol*, **2009**; 140 Suppl 49:137-54.
- 69. Speroff L, Fritz MA, editors.** Female Infertility Clinical gynecologic endocrinology and infertility. *Lippincott Williams & Wilkins*, **2011**; 1185-9.

- 70. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV.** The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol*, **2015**; 15(4):217-30.
- 71. Ross MH and Pawlina W.** *Histology: A Text and Atlas*. 7th Ed., LWW, **2015**; 848-849.
- 72. Heller D. The normal endometrium.** In: Heller D, editor. *The endometrium: a clinicopathologic approach*. New York: Igaku-Shoin Medical Publishers. **1994**; 56–75.
- 73. Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HOD.** Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev*, **2006**; 27:17-46.
- 74. Speroff L, Fritz MA.** *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams & Wilkins, **2005**.
- 75. Clancy KB.** Reproductive ecology and the endometrium: physiology, variation, and new directions. *Am J Phys Anthropol*, **2009**; 140(49):137-54.
- 76. Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S.** The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci*. **2011**; 124(3-4):229-36.
- 77. Strassmann BL.** Energy economy in the evolution of menstruation. *Evol. Anthropol*, **1996**; 5:157–164.
- 78. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K.** Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reprod Biomed Online*, **2014**; 28(6):714-22.
- 79. Öktem Ö, Urman B.** Reprodüktif Yaşam Siklusu: Follikülojeniz ve Menstruasyon. *J Turk Soc Obstet Gynecol*, **2012**; 9(1):1-24.
- 80. Gellersen B, Brosens JJ.** Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*, **2014**; 35(6):851-905.
- 81. Noyes RW, Hertig AT, Rock J.** Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril*. **1950**; 1:3-25.
- 82. Gartner LP, Hiatt JL.** Female Reproductive System. *Color Textbook of Histology*. 2nd Ed., **2001**; 461-487.
- 83. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK:** Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science*, **2002**; 296:2185-2188.
- 84. Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ.** Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol*, **2009**; 85(1):4-19.

- 85. Norwitz ER, Schust, DJ and Fisher SJ.** Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*, **2001**; 345:1400-8.
- 86. Salamonsen LA, Evans J, Nguyen HP, Edgell TA.** The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success. *Am J Reprod Immunol*, **2016**; 75(3):218-25.
- 87. Davidson LM, Coward K.** Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **2016**; 108(1):19-32.
- 88. Aplin JD, Meseguer M, Simon C, et al.** MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans*, **2001**; 29:153–156.
- 89. Bastu E, Mutlu C, Yasa C, et al.** Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. *Fertil Steril*, **2015**; 103:1059-1064.
- 90. Aplin JD, Kimber SJ.** Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol*, **2004**; 2:48.
- 91. Srinivasan KR, Blesson CS, Fatima I, et al.** Expression of alphaVbeta3 integrin in rat endometrial epithelial cells and its functional role during implantation. *Gen Comp Endocrinol*, **2009**; 160: 124-133.
- 92. Merviel P, Evain-Brion D, Challier JC, et al.** The molecular basis of embryo implantation in humans. *Zentralbl Gynakol*, **2001**; 123:328–339.
- 93. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Sun J.** Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril*, **1995**; 63:535–542.
- 94. Stavreus-Evers A, Aghajanova L, Brismar H, et al.** Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Mol Hum Reprod*, **2002**; 8:765–769.
- 95. Seppala M, Taylor RN, Koistinen H, et al.** Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev*, **2002**; 23:401-430.
- 96. Cuman C, Menkhorts E, Winship A, et al.** Fetal-maternal communication: the role of Notch signaling in embryo implantation. *Reproduction*, **2014**; 147:75–86.
- 97. Singh M, Chaudhry P, Asselin E.** Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol*, **2011**; 210(1):5-14.
- 98. Thouas GA, Dominguez F, Green MP, Vilella F, Simon C, Gardner DK.** Soluble ligands and their receptors in human embryo development and implantation. *Endocr Rev*, **2015**; 36(1):92-130.

- 99. Ruan YC, Chen H, Chan HC.** Ion channels in the endometrium: regulation of endometrial receptivity and embryo implantation. *Hum Reprod Update*, **2014**; 20:517-529.
- 100. Liu X, Zhang D, Wang T, et al.** Ion/water channels for embryo implantation barrier. *Physiology*, **2014**; 29:186–196.
- 101. Carafoli E.** The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2003**; 4: 326–332.
- 102. Rizzuto R, Pozzan T.** Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences, *Physiol Rev*, **2006**; 86:369–408.
- 103. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al.** Calcium signalling-an overview. *Semin Cell Dev Biol*, **2001**; 12(1):3-10.
- 104. Dorr J, Fecher-Trost C.** TRP channels in female reproductive organs and placenta. *Adv Exp Med Biol*, **2011**; 704:909–928.
- 105. Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B.** Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol*, **2005**; 1:85–92.
- 106. Hoenderop JG1, Nilius B, Bindels RJ.** ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca²⁺ transport. *Biochim Biophys Acta*, **2002**; 1600(1-2):6-11.
- 107. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V.** The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, **2002**; 108:595–598.
- 108. Vennekens R, Voets T, Bindels RJ, Droogmans G, Nilius B.** Current understanding of mammalian TRP homologues *Cell Calcium*, **2002**; 31:253-264.
- 109. Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ.** The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium*, **2003**; 33(5-6):497-507.
- 110. Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ.** TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate. *Pflugers Arch*, **2005**; 451(1):181-92.
- 111. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ.** Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev*, **2005**; 85: 373-422.
- 112. Weber K, Erben RG, Rump A, Adamski J.** Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*, **2001**; 289: 1287-1294.

- 113. Kim HJ, Lee GS, Ji YK, Choi KC, Jeung EB.** Differential expression of uterine calcium transporter 1 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1b during rat estrous cycle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2006**; 291: 234-241.
- 114. Choi KC, An BS, Yang H, Jeung EB.** Regulation and molecular mechanisms of calcium transport genes: do they play a role in calcium transport in the uterine endometrium? *J Physiol Pharmacol*, **2011**; 62(5):499-504.
- 115. Sprekeler N, Kowalewski MP, Boos A.** TRPV6 and Calbindin-D9k-expression and localization in the bovine uterus and placenta during pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*, **2012**; 10:66.
- 116. Lee GS, Jeung EB.** Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2007**; 293:132-138.
- 117. Choi Y, Seo H, Kim M, Ka H:** Dynamic expression of calcium-regulatory molecules, TRPV6 and S100G, in the uterine endometrium during pregnancy in pigs. *Biol Reprod*, **2009**; 81(6):1122-1130.
- 118. Yang H, Choi KC, Hyun SH, Jeung EB.** Coexpression and estrogen-mediated regulation of TRPV6 and PMCA1 in the human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Reprod Dev*, **2011**; 78: 274-282.
- 119. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL.** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2003**; 4:517-529.
- 120. Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M.** Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **2001**; 36:107-260.
- 121. Strehler EE1, Caride AJ, Filoteo AG, Xiong Y, Penniston JT, Enyedi A.** Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann N Y Acad Sci*, **2007**; 1099:226-36.
- 122. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P.** Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, **2003**; 4:552-565.
- 123. Missiaen L, Robberecht W, van den Bosch L, Callewaert G, Parys JB, Wuytack F, Raeymaekers L, et al.** Abnormal intracellular ca(2+) homeostasis and disease. *Cell Calcium*, **2000**; 28(1):1-21.
- 124. Schatzmann HJ.** ATP-dependent Ca⁺⁺-extrusion from human red cells. *Experientia*, **1966**; 22: 364-365.
- 125. Giacomello M, De Mario A, Scarlatti C, Primerano S, Carafoli E.** Plasma membrane calcium ATPases and related disorders. *Int J Biochem Cell Biol*, **2013**; 45(3):753-62.
- 126. Strehler EE.** Plasma membrane calcium ATPases: From generic Ca(2+) sump pumps to versatile systems for fine-tuning cellular Ca(2+). *Biochem Biophys Res Commun*, **2015**; 460(1):26-33.

- 127. Brini M1, Cali T, Ottolini D, Carafoli E.** The plasma membrane calcium pump in health and disease. *FEBS J*, **2013**; 280(21):5385-97.
- 128. Okunade GW1, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, et al.** Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem*, **2004**; 279(32):33742-50.
- 129. Barley NF, Howard A, Callaghan D, Legon S, Walters JR.** Epithelial calcium transporter expression in human duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2001**; 280: 285-290.
- 130. Tribe RM, Moriarty P, Poston L.** Calcium homeostatic pathways change with gestation in human myometrium. *Biol Reprod*, **2000**; 63: 748-755.
- 131. Stauffer TP, Guerini D, Celio MR, Carafoli E.** Immunolocalization of the plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in the rat brain. *Brain Res*, **1997**; 748: 21-29.
- 132. Choi Y, Seo H, Shim J, Yoo I, Ka H.** Calcium extrusion regulatory molecules: differential expression during pregnancy in the porcine uterus. *Domestic Animal Endocrinology*, **2014**; 47:1–10.
- 133. Haché S1, Takser L, LeBellego F, Weiler H, Leduc L, Forest JC, Giguère Y, Masse A, Barbeau B, Lafond J.** Alteration of calcium homeostasis in primary preeclamptic syncytiotrophoblasts: effect on calcium exchange in placenta. *J Cell Mol Med*, **2011**; 15(3):654-67.
- 134.** Metabion International AG, Reporter/Quencher combinations. Erişim: http://www.metabion.com/products/zna_prices.php. Erişim tarihi: 03.05.2016.
- 135. Kuchta T, Krascenicsová K, Bánréti G.** Optimization of fluorescence measurement in duplex real-time PCR with TaqMan probes labeled with VIC and quenched by TAMRA. *Biotechniques*, **2007**; 42(2):147-149.
- 136. Aghajanova L, Altmae S, Bjuresten K, Hovatta O, Landgren BM, Stavreus-Evers A.** Disturbances in the LIF pathway in the endometrium among women with unexplained infertility. *Fertil Steril*, **2008a**; 91:2602–2610.
- 137. Aghajanova L, Simón C, Horcajadas JA.** Are favorite molecules of endometrial receptivity still in favor? *Expert Rev Obstet Gynecol*, **2008b**; 3:487–501
- 138. Altmäe S1, Martínez-Conejero JA, Salumets A, Simón C, Horcajadas JA, Stavreus-Evers A.** Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility. *Mol Hum Reprod*, **2010**; 16(3):178-87.
- 139. Manohar M, Khan H, Sirohi VK, DasV, Agarwal A, Pandey A, et al.** Alteration in Endometrial Proteins during Early- and Mid-Secretory Phases of the Cycle in Women with Unexplained Infertility. *Plos One*, **2014**; 9(11): e111687.

- 140. Baczyka D, Kingdom JCP, Uhlén P.** Calcium signaling in placenta. *Cell Calcium*, **2011**; 49: 350–356.
- 141. Suzuki Y, Kovacs CS, Takanaga H, Peng JB, Landowski CP, Hediger MA.** Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport. *J Bone Miner Res*, **2008**; 23(8):1249-1256.
- 142. Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N.** The regulation of integrin function by Ca(2+). *Biochim Biophys Acta*, **2000**; 1498:91-98.
- 143. Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ.** Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. *Nat Rev Cancer*, **2007**; 7(7):519-30.
- 144. Franasiak JM, Holoch KJ, Yuan L, Schammel DP, Young SL, Lessey BA.** Prospective assessment of midsecretory endometrial leukemia inhibitor factor expression versus $\alpha\text{v}\beta 3$ testing in women with unexplained infertility. *Fertil Steril*, **2014**; 101(6):1724-31.
- 145. Roberts RM, Bazer FW.** The functions of uterine secretions. *J Reprod Fertil*, **1988**; 82:875–892 147.
- 146. Bhusane K, Bhutada S, Chaudhari U, Savardekar L, Katkam R, Sachdeva G.** Secrets of Endometrial Receptivity: Some Are Hidden in Uterine Secretome. *Am J Reprod Immunol*, **2016**; 75(3):226-36.
- 147. Spencer TE.** Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Semin Reprod Med*, **2014**; 32(5):346-57.
- 148. Dimitriadis E, Stoikos C, Stafford-Bell M, et al.** Interleukin-11, IL-11 receptor alpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J Reprod Immunol*, **2006**; 69:53–64.
- 149. Sakoff JA, Murdoch RN.** Alterations in uterine calcium ions during induction of the decidual cell reaction in pseudopregnant mice. *J Reprod Fertil*, **1994**; 101:97–102.
- 150. De Clercq K, Held K, Van Bree R, Meuleman C, Peeraer K, Tomassetti C, Voets T, D'Hooghe T, Vriens J.** Functional expression of transient receptor potential channels in human endometrial stromal cells during the luteal phase of the menstrual cycle. *Hum Reprod*, **2015**; 30(6):1421-36.
- 151. Brini M, Carafoli E.** Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev*, **2009**; 89:1341–1378.
- 152. Roberts-Thomson SJ, Curry MC, Monteith GR.** Plasma membrane calcium pumps and their emerging roles in cancer. *World J Biol Chem*, **2010**; 1:248–253.
- 153. Lehotsky J, Kaplan P, Murin R, Raeymaekers L.** The role of plasma membrane Ca²⁺ pump (PMCA) in pathologies of mammalian cells. *Front Biosci*, **2002**; 7:53–84.
- 154. Curry MC, Luk NA, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR.** Distinct regulation of cytoplasmic calcium signals and cell death pathways by different plasma membrane calcium ATPase isoforms in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Biol Chem*, **2012**; 287(34):28598-608.

- 155. Lee WJ, Roberts-Thomson SJ, Holman NA, May FJ, Lehrbach GM, Monteith GR.** Expression of plasma membrane calcium pump isoform mRNAs in breast cancer cell lines. *Cell. Signal*, **2002**; 14:1015-1022.
- 156. Aung CS1, Kruger WA, Poronnik P, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR.** Plasma membrane Ca²⁺-ATPase expression during colon cancer cell line differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **2007**; 355(4):932-6.
- 157. Roderick HL1, Cook SJ.** Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*, **2008**; 8(5):361-75.
- 158. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P.** Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*, **2009**; 1787(11):1342-51.
- 159. Thomenius MJ, Distelhorst CW.** Bcl-2 on the endoplasmic reticulum: protecting the mitochondria from a distance. *J Cell Sci*, **2003**; 116(22):4493-9.
- 160. Ferrari D, Pinton P, Szabadkai G, Chami M, Campanella M, Pozzan T, Rizzuto R.** Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca²⁺ handling in apoptosis. *Cell Calcium*, **2002**; 32(5-6):413-20.
- 161. Bruce JI and Elliott AC.** Oxidant-impaired intracellular Ca²⁺ signaling in pancreatic acinar cells: role of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2007**; 293: 938–50.
- 162. Guyot E, Solovyova Y, Tomkiewicz C, Leblanc A, Pierre S, El Balkhi S, Le Frère-Belda MA, Lecuru F, et al.** Determination of Heavy Metal Concentrations in Normal and Pathological Human Endometrial Biopsies and In Vitro Regulation of Gene Expression by Metals in the Ishikawa and Hec-1b Endometrial Cell Line. *PLoS One*, **2015**; 10(11):e0142590.
- 163. Yaman M, Kaya G, Simsek M.** Comparison of trace element concentrations in cancerous and noncancerous human endometrial and ovary tissues. *Int J Gynecol Cancer*, **2007**; 17(1):220-8.
- 164. Cunzhi H, Jiexian J, Xianwen Z, Jingang G, Shumin Z, Lili D.** Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma. *Biol Trace Elem Res*, **2003**; 94(2):113-22.
- 165. Millos J, Costas-Rodríguez M, Lavilla I, Bendicho C.** Multiple small volume microwave-assisted digestions using conventional equipment for multielemental analysis of human breast biopsies by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*, **2009**; 77(4):1490-6.
- 166. Nasiadek M, Krawczyk T, Sapota A.** Tissue levels of cadmium and trace elements in patients with myoma and uterine cancer. *Hum Exp Toxicol*, **2005**; 24(12):623-30.

ZEKAI TAHİR BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANA BİLİM DALI

REPRODÜKTİF ENDOKRİNOLOJİ VE İNFERTİLİTE BİLİM DALI

HASTA TAKİP FORMU

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| | Tarih: |
| Adı-Soyadı: | Bazal Hormonlar: |
| Protokol no: | Adetin 3. günü: |
| Doğum Tarihi: | FSH: |
| Boy/Kilo: | LH: |
| Önceki Tedavi: | E₂: |
| Geçirilen Ameliyat: | PRL: |
| | Biyopsi günü |
| | Progesteron: |
| | E₂: |
| Primer/Sekonder İnfertilite: | Jinekolojik Muayene: |
| Adet Düzeni: | Pelvik USG: |
| Evlilik/İnfertilite Süresi: | HSG: |
| Sistemik Hastalık: | L/S: |
| Önceki Tedavi: | H/S: |
| Total Ca⁺²: | IVF siklus sayısı: |

ÖZGEÇMİŞ

31.05.1984 tarihinde Bucak'ta doğdu. 2003-2007 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimini aldı. 2010 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2010 yılında MEÜ. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı ve halen eğitime devam etmektedir.

