

T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA DEATH RECEPTOR-4
(DR-4) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sevinç SÜRER

YÜKSEKLİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY

MERSİN-2010

T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA DEATH RECEPTOR-4
(DR-4) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

SEVİNÇ SÜRER

YÜKSEKLİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından BAP-SBE TBG (SS) 2008-10YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:171


MERSİN-2010

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Tekrarlayan Gebelik kayıplarında Death Receptor-4 (DR-4) gen polimorfizmlerinin araştırılması ” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

25/06/2010


Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY


Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Özlem İzci AY

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri Üyesi


Yrd. Doç. Dr. İsmail ÜN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 14.07.2010 tarih ve 2010.1213.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca, deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, beni pek çok konuda aydınlatan hocalarım Ana Bilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL'a, danışmanın Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY'a, Yrd .Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'a, Yrd. Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS'a, Doç. Dr. Ethem AKBAŞ'a, Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ'e ve hasta örneklerinin toplanmasını sağlayan Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan Yard. Doç. Dr. Filiz ÇAYAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmaları süresince birlikte aynı laboratuvarı paylaştığım başta Arş.Gör Fatma SÖYLEMEZ olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma ve arkadaşım Tkn.Hatice ÖZTÜRK'e ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan Dr. Özgür ÇOBAN'a yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tezin istatistik analizlerinin yapılmasındaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Mehmet Ali SUNGUR'a, çok teşekkür ederim.

Son olarak, tüm hayatım boyunca elimden tutan bütün zor günlerimde arkamda, iyi günlerimde yanımda olan ve hiçbir fedakarlığı benden esirgemeyen canım aileme sonsuz sevgilerimi sunar teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları	3
2.1.1. Endokrin Nedenler	4
2.1.1.1. Luteal Faz Defekti	4
2.1.1.2. Hipo/Hiperptiroidi	5
2.1.1.3. Tip II Diyabet (Diabetes Mellitus)	6
2.1.1.4. Polikistik Over Sendromu	6
2.1.1.5. Hiperprolaktinemi	6
2.1.1.6. Anatomik Nedenler	7
2.1.2. İmmünolojik Nedenler	8
2.1.2.1. Otoimmün Nedenler	8
2.1.2.2. Alloimmün Nedenler	9
2.1.3. Trombofili	10
2.1.4. Enfeksiyona Bağlı Nedenler	11
2.1.5. Çevresel Nedenler	11
2.1.6. Genetik Nedenler	12
2.2. Apoptoz	14
2.2.1. Apoptozun Gen Düzeyinde Düzenlenmesi	16

2.2.2. Apoptozda p53'ün İşlevi	18
2.2.3. Bcl2/Bax	19
2.3.4. Kaspazlar	20
2.3. Tümör Nekrosis Faktör (TNF)-İle İlgili Apoptosisi Başlatıcı Ligand	22
2.3.1. TRAIL Geninin Yapısı ve Özellikleri	22
2.3.2. TRAIL Geni Reseptörleri	24
2.3.3. TRAIL-R1 (Death Receptor-4)	25
2.3.4. TRAIL/TRAIL Reseptör Sinyal Yolağı	27
2.3.5. TRAIL ve Reseptörlerinin Fizyolojik Rolü	29
2.3.6. TRAIL'in Duyarlılık ve Direnç Mekanizması	30
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	31
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	31
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	31
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler	33
3.1.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler	33
3.1.3.2. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler	33
3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması	34
3.3. DR4 geni ekzon 3, ekzon 4 ve ekzon 5 polimorfizmlerinin belirlenmesi	35
3.3.1. DNA İzolasyonu	35
3.3.2. DR4 geni 3, 4 ve 5. Ekzonlarına Özgül Primerlerle Amplifikasyon	36
3.3.3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analizi	38
3.3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	39
3.4.5. Genotiplendirme	40
3.4. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. DR-4 Geni his141arg Polimorfizminin Gebelik Kaybı ile İlişkisi	43
4.2. DR-4 Geni thr209arg Polimorfizminin Gebelik Kaybı ile İlişkisi	46
4.3. DR-4 Geni glu228ala Polimorfizminin Gebelik Kaybı ile İlişkisi	49
4.4. İstatistiksel Bulgular	51
4.4.1. Ekzon 3 İçin İstatistiksel Bulgular	51
4.4.2. Ekzon 4 İçin İstatistiksel Bulgular	53

4.4.3. Ekzon 5 İçin İstatistiksel Bulgular	54
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	63
7. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Apoptozun Genel Mekanizması	16
Şekil 2.2. Apoptozun Major Düzenleyicilerinden Bazılarının Şematik Gösterimi	17
Şekil 2.3. p53 Geni Yapısal Haritası	18
Şekil 2.4. p53'ün Apoptozdaki Fonksiyon Modelleri	19
Şekil 2.5. TRAIL'in Trimerize Formunun Kristal Yapısı	23
Şekil 2.6. TRAIL Promotorunun 5' upstream Bölgesinin Şematik Gösterimi	24
Şekil 2.7. TRAIL ve Reseptörleri	25
Şekil 2.8. DR-4 Gen Yapısı	26
Şekil 2.9. Apoptoz Yolakları	28
Şekil 3.1. Ekzon 3 İçin Çoğaltılan Bölgenin Dizisi	37
Şekil 3.2. Ekzon 4 İçin Çoğaltılan Bölgenin Dizisi	37
Şekil 3.3. Ekzon 5 İçin Çoğaltılan Bölgenin Dizisi	37
Şekil 3.4. Bant Bölgeleri Belirlenirken Kullanılan Marker'ın Orijinal Görüntüsü	40
Şekil 4.1. Ekzon 3 İçin Hasta Grubuna Ait Örneklerin Fotoğrafı	45
Şekil 4.2. Ekzon 3 İçin Kontrol Grubuna Ait Örneklerin Fotoğrafı	45
Şekil 4.3. Ekzon 4 İçin Kontrol Grubuna Ait Örneklerin Fotoğrafı	48
Şekil 4.4. Ekzon 4 İçin Hasta Grubuna Ait Örneklerin Fotoğrafı	48
Şekil 4.5. Ekzon 5 İçin Kontrol Grubuna Ait Genotiplerin Fotoğrafı	51
Şekil 4.6. Ekzon 5 için Hasta Grubuna Ait Genotiplerin Fotoğrafı	51
Şekil 4.7. Ekzon 3 İçin Hasta ve Kontrol Grubunun Genotip Oranlarının Grafiği	52
Şekil 4.8. Ekzon 4 İçin Hasta ve Kontrol Grubunun Genotip Oranlarının Grafiği	53
Şekil 4.9 Ekzon 5 için Hasta ve Kontrol Grubunun Genotip Oranlarının Grafiği	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Tekrarlayan Gebelik Kaybı Nedenleri	4
Çizelge 3.1. Ekzon 3 İçin Görülen Genotipler	41
Çizelge 3.2. Ekzon 4 İçin Görülen Genotipler	41
Çizelge 3.3. Ekzon 5 İçin Görülen Genotipler	42
Çizelge 4.1. Arg141His Polimorfizmi İçin Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Genotipler	44
Çizelge 4.2. Thr209Arg Polimorfizmi İçin Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Genotipler	47
Çizelge 4.3. Glu228Ala Polimorfizmi İçin Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Genotipler	50
Çizelge 4.4. Kontrol ve Hasta Gruplarının Yaş Ortalamaları	51
Çizelge 4.5. Ekzon 3 İçin Hasta ve Kontrol Gruplarının Genotip Frekansları	52
Çizelge 4.6. Ekzon 4 İçin Hasta ve Kontrol Gruplarının Genotip Frekansları	53
Çizelge 4.7. Ekzon 5 İçin Hasta ve Kontrol Gruplarının Genotip Frekansları	54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor-1
AP1	Activator Protein-1
AP3	Activator Protein-3
aPCR	Aktive protein C rezistansı
ATP	Adenozin trifosfat
bp	Base Pair
°C	Santigrat Derece
Ca⁺²	Kalsiyum İyonu
CAD	Caspase Activating DNase
CD-95	Fas
CD-95L	Fas Ligandı
CGH	Comperative Genomic Hybridisation
DNA	Deoksi ribonukleik asit
CRD	Cystein Rich Domain
DBD	DNA Binding Domain
DC	Dendritik Cell
DcR1	Decoy Receptor 1
DcR2	Decoy Receptor 2
DES	Dietilstilbestrole
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
dk	Dakika
DR-3	Death Receptor-3
DR-4	Death Receptor-4

DR-5	Death Receptor-5
DR-6	Death Receptor-6
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ERK	Extracellular-signal regulating kinase
FLICE	FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme
FasL	Fas Ligand
FADD	Fas Associated Death Domain
FVL	Faktör V Leiden
GALNT14	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14
g	Gram
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
IGF	Insulin Growth Factor
IL	Interlökin
IFN	Interferon
IKK	I κ B kinase
ISRE	Interferon-stimulated response element
IUGR	Intra Uterin Growth Retardation
IVF	In vitro Fertilizasyon
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilo Dalton
LH	Luteinize Hormon
LFD	Luteal Faz Defekti
LTα	Limpotoksin α
LTβ	Limpotoksin β
mg	Miligram
Mg⁺²	Magnezyum İyonu
MgCl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
MPAK	Mitogen activated protein kinase

MTHFR	Metilen tetrahidrofolat redüktase
NK	Natural Killer
NF-KB	Nucler factor kapa-light-chain-enhancer of activated B
(NH₄)₂SO₄	Amonyum Sülfat
OD	Oligomerization Domain
OPG	Osteoprotegrin
PAI-1	Plazmojen akktivatör inhibitör-1
PCOS	Polikistik Over Sendromu
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Fosfat Tamponu
RFLP	Restriction Fregment Lenght Polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
RIP	Receptor Interacting Protein
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SLE	Sistemik Lupus Eritamatozis
s	Saniye
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
TAD	Transaktivation Domain
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-related Apotosis Inducing Ligand
TRAIL-R1	TRAIL Receptor 1
TRAIL-R2	TRAIL-Receptor 2
TRAIL-R3	TRAIL-Receptor 3
TRAIL-R4	TRAIL-Receptor 4
TGK	Tekrarlayan Gebelik Kaybı
TSH	Tiroid Stimulan Hormon
TGF-B	Transforming Growth Factor-B
TNF-R1	Tumor Necrosis Factor Receptor-1
TM	Transmembran Domain
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
UV	Ultraviole
Zn	Çinko atomu

ÖZET

Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Death Receptor-4 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

Tekrarlayan gebelik kaybı olgusu 3 ve daha fazla gebeliğin arka arkaya spontan olarak sonlanması sonucu meydana gelen gebeliğin en sık rastlanan komplikasyonlarından biridir. Tekrarlayan gebelik kaybı çocuk sahibi olmak isteyen kadınların %1' ini etkileyen klinik bir problemdir. Bazı klinisyenler bu olguyu, 2 gebelik kaybı ve üzeri olarak tanımlamakta bu da problemin insidansını %1'den %5'e kadar yükseltmektedir. Tekrarlayan gebelik kayıplarının %68'inde etken saptanamamaktadır. Nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı etiyolojik ve prognostik faktör tayininde en yetersiz kalınan konulardan biridir. Tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabilecek apoptotik mekanizmaların aydınlatılması ile ilgili çalışmalara literatürde nadir rastlanmaktadır. Apoptozu ligand reseptör etkileşimi ile gerçekleştiren DR-4 geni polimorfizmlerinin ise nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olguları üzerinde çalışılmadığı gözlenmektedir.

Canlılarda, *Tumor Necrosis-Factor related inducing ligand (TRAIL)*'in bir reseptörü olan *Death Receptor-4 (DR-4)*'ün reseptör-ligand etkileşimini gerçekleştirerek apoptotik mekanizmayı başlattığı bilinmektedir.

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniklerinde tekrarlayan gebelik kaybı tanısı konmuş ve daha önceki analizlerinde kromozomal düzeyde bir genetik değişim saptanmamış 70 hasta birey ve çocuk sahibi olan ve öyküsünde gebelik kaybı bulunmayan 70 kadın kontrol üzerinde DR-4 genine ait Arg141His (ekzon3), Thr209Arg (ekzon4) ve Glu228Ala (ekzon5) polimorfizmleri araştırıldı. Hasta ve kontrol gruplarına ait DNA'lar izole edilerek polimorfizmler PCR-RFLP yöntemi ile belirlendi.

Çalışma ile elde edilen verilerin istatistiksel analizi sonucunda Arg141His ve Glu228Ala polimorfizmleri ile tekrarlayan gebelik kaybı olguları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (ekzon 3 $p=0,673$, ekzon 5 $p=0,368$). Thr209Arg (ekzon 4) polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kaybı olguları arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki belirlendi ($p=0.012$). Hasta grubunda GG (homozigot mutant) genotipinin görülme oranının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0.009$). Kontrol grubunda ise CG (heterozigot) genotipinin görülme oranının hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0.002$).

Apoptotik mekanizmada önemli bir görevi olan DR-4 geninin, Thr209Arg polimorfizminin nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularında etken bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tekrarlayan gebelik kaybı, apoptoz, TRAIL, DR-4, polimorfizm.

ABSTRACT

The Investigation of Death Receptor-4 Gene Polymorphisms in Recurrent Pregnancy Loss

Recurrent pregnancy loss is defined as three or more consecutive pregnancy losses and it is the most common complication of pregnancy. Recurrent pregnancy losses affects 1% of women who want to have baby. But many clinicians define recurrent miscarriage as two or more losses so, this increases the scale of the problem from 1% to 5%. In 68% of recurrent pregnancy loss factors still can't be identified. Undefined recurrent pregnancy loss is one of the most inadequate subject in investigating etiological and prognostic factors. There is too little investigations about apoptotic mechanisms that may cause recurrent pregnancy losses in literature so the problem is still waiting to clarify. It is known that there is no investigation on undefined pregnancy loss about DR-4 gene which induces apoptosis with ligand-receptor interaction.

DR-4 gene which is a receptor of Tumor Necrosis Factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), initiate apoptotic mechanism by performing ligand-receptor interaction in human. The gene is located at chromosome 8 p21-22 and induces apoptosis with extrinsic pathway by cleaving TRAIL.

In this study, DR-4 gene Arg141His (ekson3), Thr209Arg (ekson4), Glu228Ala (ekson5) alterations were investigated from 70 control group and 70 women with recurrent pregnancy loss who were diagnosed in Mersin University, Medical Faculty, Gynecology and Obstetrics Clinics and who has no chromosomal abnormalities in previous analysis. DNA were isolated from 12-13 ml blood by Miller's sulting out method and alterations were determinated by PCR-RFLP analysis.

Statistical analysis sowed that, the patient and matched control populations were not differing in case of Arg141His and Glu228Ala alterations ($p=0,673$ $p=0,368$). However, there is a significant association between Thr209Arg alteration and recurrent pregnancy loss ($p=0,012$). Acording to statistical analysis, GG genotype (homozygote mutant) ratio in patients is significantly higher than control group ($p=0,009$). In contrast, in control group, the ratio of CG genotype (heterozygote) is significantly higher than patients ($p=0,002$).

With the results of this study, it is shown that there is no association between Arg141His and Glu228Ala alterations and recurrent pregnancy loss. But the results showed an exact apposite stuation in Thr209Arg alteration. The alteration is significantly assoiated with recurrent pregnancy loss. Our results suggest that, Thr209Arg alteration of DR-4 gene which has an important role in apoptotic mechanism may be associated with undefined recurrent pregnancy loss.

Key words: Recurrent pregnancy loss, apoptosis, TRAIL, DR-4, polymorphism.

1. GİRİŞ

Tekrarlayan gebelik kayıpları, birbirini izleyen en az iki ya da daha fazla gebeliğin 20. gebelik haftasından önce ve 500 gr fetal ağırlıktan düşük ağırlıkta spontan olarak sonlanması olup gebeliğin en sık rastlanan komplikasyonudur. Klinik olarak tanısı konulmuş tekrarlayan gebelik kayıp insidansı, % 0.5-1'dir. Tekrarlayan gebelik kayıplarının % 68'inde ise etken saptanamamaktadır (1). Tekrarlayan gebelik kayıplarına birçok etiyolojik neden sebep olabilmektedir. Bunlar aşağıda sıralanmaktadır:

- Endokrin Nedenler
- Anatomik Nedenler
- İmmünolojik Nedenler
- Trombofilik Nedenler
- Enfeksiyona Bağlı Nedenler
- Çevresel Nedenler
- Genetik Nedenler

Yukarıda sıralanan tüm bu nedenler ekarte edildikten sonra gebelik kayıplarına hala bir neden bulunamıyorsa, bu durum hem çiftler hem de klinisyen için ümit kırıcı bir durumdur. Çünkü gebeliğin devamının sağlanamaması için açık bir neden bulmak zordur (2). Nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpları birçok araştırmaya konu olan bir konu olsa da apoptotik mekanizmaların tekrarlayan gebelik kayıpları üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalara sınırlı sayıda rastlanmaktadır.

Apoptozis fizyolojik veya programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Apoptozis genellikle tek tek hücreleri etkiler. Birçok fizyolojik veya patolojik durumda aktive olur ve apoptozda inflamatuvar yanıt söz konusu değildir. B ve T hücrelerinin negatif seleksiyonu, self antijenleri tanıyan immün kompetan hücrelerin yıkımı, hormon bağımlı dokuların hormon yokluğunda involüsyonu gibi birçok fizyolojik olayda rol alır. Apoptozun kontrolündeki anormallikler ise başta kanser olmak üzere otoimmün hastalıklar ve dejeneratif hastalıkların oluşum mekanizmaları içinde yer almaktadır (3).

Apoptoz, çok hücreli organizmaların gelişimi ve normal hücre sel farklılaşması sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölüm şeklidir. Tümör nekroz faktör

(TNF) ailesindeki TNF ile Fas ligandlarını da içeren ve reseptörlerindeki ölüm domainleri vasıtası ile etkilerini gösteren belirli sitokinler tarafından uyarılmaktadır (4).

TNF-R ailesi reseptörler, tümör nekrozu ile ilgili apoptozu uyaran ligand (TRAIL) reseptörleri olan death receptor-4 (DR4) ve death receptor-5 (DR5) reseptörlerini de içine alan geniş bir reseptör ailesidir (4,5).

TRAIL, apoptozu uyaran DR4 (TRAIL-R1) ve DR5 (TRAIL-R2) reseptörlerine bağlanarak ekstrinsik yolla apoptozu tetikleyen bir ligandır (4). TRAIL in DR4 ve DR5 dışında bağlandığı üç reseptör (DcR1-TRAIL-R3, DcR2-TRAIL-R4 ve Osteoprotegerin-OPG) daha tanımlanmıştır. Ancak sadece DR4 ve DR5 apoptozu tetikleme işlevine sahiptir (6).

DR4 reseptörü 486 amino asitlik bir protein olup iki ekstraselüler sistence zengin ligand bağlanma bölgesi, tek bir transmembran heliks ve apoptozu uyaran bir sitoplazmik ölüm domaininden oluşmaktadır. Bu gen 8p21-22 kromozom bölgesinde lokalize olup SNP veri tabanına göre 7 farklı polimorfizmi bildirilmiştir. Bunlar; Thr209Arg, Glu228Ala, Thr33Ile, Pro105Arg, His141Arg, Asn297His, Arg441Lys polimorfizmleridir (7).

Bu araştırmada nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularında bir apoptotik uyarıcı ligand olan *Tumor Necrosis-Factor related inducing ligand (TRAIL)*'in bir hücresele reseptörü olan *Death Receptor-4 (DR-4)* geninin 3.ekson, 4 .ekson ve 5.eksonlarındaki sırasıyla Arg141His, Thr209Arg, Glu228Ala polimorfizmleri araştırıldı. Elde edilen verilerin tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabilecek, TRAIL tarafından uyarılan apoptotik mekanizmaların aydınlatılması bakımından literatüre katkıda bulunacağı ve polimorfizm saptanan olguların bundan sonraki gebeliklerindeki klinik uygulamalara da yön vereceği düşünülmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları

Sporadik gebelik kaybı üreme çağındaki kadınlar için belki de en yaygın tıbbi sorunlardan biridir. 20. gebelik haftasından önce meydana gelen gebelik kayıpları 'spontan abortus' olarak tanımlanır. Çocuk sahibi olmak isteyen kadınlarda, gebeliklerin yaklaşık % 25'i en az bir spontan abortus ile sonlanmakta, yine çocuk sahibi olmak isteyen kadınların en az % 50 sinin gebelikleri gestasyon evresine ulaşmadan sona ermektedir (8,9).

Embriyonik gelişim 3 dönemden oluşmaktadır. Bunlar; preembriyonik, embriyonik ve fetal dönemlerdir. Preembriyonik dönem yaklaşık olarak menstrual dönemin ilk gününden itibaren gebeliğin 5. haftasına kadar devam eder. Embriyonik dönem ise 6. ve 9. haftalar boyunca devam ederken, fetal dönem gebeliğin 10. haftasında başlar ve gebeliğin sonuna kadar devam eder (8,10). Embriyonun gelişiminden önce meydana gelen kayıplar 'anembriyonik kayıplar' olarak isimlendirilir. 6-10 haftalar arasındaki kardiyak aktivitesi olmayan embriyo kayıpları 'embriyonik ölümler' olarak tanımlanırken, 10. gebelik haftası sonrası oluşan embriyo kayıpları 'fetal ölüm' olarak tanımlanır. Bu ayrımları yapmak, gebelik kayıplarının altında yatan nedenlerin, gebelik haftasının ne olduğuna göre değişmesinden dolayı önemlidir. Örneğin anembriyonik kayıplar fetal ölümlere göre genetik yapıdaki değişimlerle daha çok ilintilidir. Aynı zamanda anembriyonik veya embriyonik kayıpların oranı fetal ölümlerin oranına göre daha yüksektir. Gebelik kayıplarının % 10 u ilk veya 2. trimesterde gerçekleşirken % 3 ten daha az gebelik kaybı ileri gebelik haftalarında meydana gelmektedir (8).

Gebelik kayıplarının büyük bölümü sporadiktir. Tekrarlayan gebelik kaybı ise viabilite sınırına ulaşmadan (20. Gebelik haftasından önce) veya 500 g fetal ağırlığın altında arka arkaya 3 ya da daha fazla gebeliğin sonlanması ve 1 canlı doğumdan fazla canlı doğumun olmaması şeklinde tanımlanır. Tekrarlayan gebelik kaybı durumu gebe kadınların % 0.5-1'inde oluşan klinik bir problemdir (10). Ancak birçok klinisyen tekrarlayan gebelik kaybını 2 ve daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlamakta bu da problemin skalasını % 1'den % 5'e kadar çıkarmaktadır (11).

Tekrarlayan gebelik kaybına neden olan etiyolojik nedenler tablo 2.1’de verilmektedir:

Çizelge 2.1. Tekrarlayan Gebelik Kaybı Nedenleri

Endokrin Nedenler	Trombofili
Luteal Faz Defekti Hipo/Hipertiroidi Diyabet Tip II (Diabetes Mellitus) Polikistik Over Sendromu (PCOS) Hiperprolaktinemi	Edinsel ve Herediter Trombofililer Kalıtsal Trombozlar
Anatomik nedenler	Enfeksiyona bağlı nedenler
Konjenital Malformasyonlar Uterin Leiomyomlar Uterin adezyonlar	Bakteriyel Enfeksiyonlar Viral Enfeksiyonlar Mikoplazma Enfeksiyonları
İmmünolojik nedenler	Çevresel faktörler
Otoimmün Nedenler Alloimmün Nedenler	Alkol, Sigara Kafein, İlaçlar ve Kimyasallar
	Genetik nedenler
	Kromozomal Anomaliler Moleküler Düzeyde Değişimler

2.1.1. Endokrin Nedenler:

2.1.1.1. Luteal Faz Defekti

Normal gebelik sürecinin erken dönemlerinde plasenta oluşmadan önce, korpus luteumdan progesteron salgılanır. Progesteronun yetersiz sentezlenmesi durumunda luteal faz defekti (LFD) gelişir. Endometriyal biyopsi ile saptanan histolojik gebelik günlemesi ile adet takvimi günlemesi arasında iki günden fazla fark olması durumunda luteal faz defektinden bahsedilir. Ayrıca luteal dönemde düşük progesteron düzeylerinin saptanması ile de luteal faz defekti tanısı konabilir (12). Luteal faz defekti tekrarlayan gebelik kayıplarının tartışmalı nedenleri arasındadır. Çünkü endometriyal biyopsilerin değerlendirilmesinde; konulan histolojik günleme tanısının değerlendiren kişiye göre farklı olabilmesi, hatta aynı preparatın farklı zamanlarda aynı kişi tarafından

değerlendirilmesinde bile belirgin fark olması nedeni ile, yöntemin dolayısıyla tanının güvenilirliği azalmaktadır (13).

Endometriyal biyopsinin; invaziv, ağırlı ve pahalı bir yöntem olması nedeniyle serum progesteron seviyelerinin belirlenmesi tekrarlayan gebelik kaybı tanısında alternatif bir tanı yöntemi olarak önerilmektedir. Ancak prospektif, kontrollü bir çalışmada TGK tanısı alan hastalara uygulanan endometriyal biyopsi sonuçlarına göre olguların % 17'sinde LFD saptanırken bu hastalarda serum progesteron düzeyleri normal bulunmuştur (13). Sonuç olarak standart teşhis kriterlerinin olmaması, kontrollü çalışmalarda tekrarlayan gebelik kaybı etiolojisindeki olası rolünün ispatlanamaması ve LFD'ne yönelik tedaviye rağmen oranlarda iyileşme görülmemesi nedeniyle, LFD'nin tekrarlayan gebelik kayıpları üzerindeki rolü hala tartışmalıdır (14).

2.1.1.2. Hipo/Hipertiroidi

Hipertiroidi, tiroid bezinden aşırı tiroid hormonu salgılanması durumu iken, hipotiroidi tiroid bezinin az hormon salgılaması durumunda ortaya çıkan bir hastalıktır (15,16). Hipotiroidi ve hipertiroidi durumlarının her ikisi de üreme fonksiyonunda bozulmaya neden olduğu için, tekrarlayan gebelik kaybı olgularında özellikle subklinik hipertiroidi tanısı için serum tiroid stimulan hormon (TSH) düzeyinin değerlendirilmesi önerilmektedir (17).

Bazı araştırmalarda antitiroid antikorlarının da gebelik kaybı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Ancak randomize çalışmaların sonuçlarına göre, antitiroid antikorlarının tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkisi kesin olarak gösterilememiştir ve ayrıca antitiroid antikor pozitifliğinin günümüzde etkin tedavisi de mevcut değildir. Bu nedenle, tiroid otoantikor taramasının da tekrarlayan gebelik kaybı değerlendirmesi güncel algoritmasında yeri yoktur (18,19).

2.1.1.3. Tip II Diyabet (Diabetes Mellitus)

Diyabet tip II kanda sürekli yüksek düzeyde şeker (glukoz) bulunması durumunda ortaya çıkan bir hastalıktır (20,21). Kontrolsüz diyabet spontan abortus riskini üç kat arttırmaktadır. Yüksek HbA1c (glikolize hemoglobin) düzeyinin yüksek olarak görüldüğü, kontrolsüz diyabette tekrarlayan gebelik kaybı riski artmaktadır. Kan şekeri ve HbA1c seviyeleri normal olan kontrollü diyabette ise tekrarlayan gebelik kaybı riski normal popülasyondan farklı değildir (22).

2.1.1.4. Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PCOS), nedeni kesin olarak aydınlatılamamış bir yumurtlama bozukluğudur. Hastalıkta, her adet döngüsünde gelişerek çatlaması gereken folikül, gelişmesi yarıda kalarak yumurtalık dokusu içinde 3-10 milimetre çapında bir kiste dönüşür (23). PCOS olgularının % 36-56'sında tekrarlayan gebelik kaybı saptanmaktadır. PCOS olgularında gebelik kaybı; luteinize hormon (LH), testesteron, androstenedion artışı ve insülin direncine bağlanmaktadır. Bunun yanında fertil gruba göre de sadece insülin direnci (PCOS olmadan) olan olgularda da TGK sıklığı artmaktadır. Hiperinsülineminin bazı endometriyal proteinlerde (glikodelin ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-IGF) artış, uterin vasküler dirençte düşüklük yaratarak gebelik kaybına neden olduğu düşünülmektedir (24,25).

2.1.1.5. Hiperprolaktinemi

Hiperprolaktinemi, prolaktin hormonunun aşırı düzeyde salgılanması durumunda ortaya çıkan bir endokrin hastalıktır (26). Hiperprolaktinemi korpus luteum fonksiyonunu bozmakta ve erken gebelik ürününün gelişmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Tekrarlayan gebelik kaybı olgularında, erken gebelik döneminde prolaktin düzeyinde yükseklik hiperprolaktinemi olarak bilinmektedir. Ancak gebelik döneminde hiperprolaktinemi tedavisi verilen ve verilmeyen olguları içeren randomize kontrollü çalışma sonuçlarına göre, gebelik kaybının önlenmesi açısından anlamlı fark saptanamamıştır. Bu nedenle, rutin prolaktin taramasının TGK tanısındaki etkinliği tartışmalıdır (27,28).

2.1.2. Anatomik Nedenler:

Gebelik kaybı riskini arttıran uterusun anatomik anormallikleri; konjenital malformasyonlar, uterin leiomyomlar ve uterin adezyonlardır. Gelişimsel uterin anomaliler, gebelik kaybı ve obstetrik komplikasyonlarla ilişkilidir. Toplumda uterin anomali sıklığı (arcuat uterus hariç) yaklaşık %2 iken, tekrarlayan gebelik kaybı olgularında bu oran % 6-7'dir (29). Gebelik kayıplarına neden olan konjenital uterin malformasyonlarının patogenezi; net olarak açıklanamamakla birlikte azalmış intrauterin volüm ve vasküler yetersizlik TKG için, etiyolojik bir etken olarak sorumlu tutulmaktadır (30).

Unikorni uterus, rahim ve rahim ağzını orta hatta birleşerek oluşturan müller kanallarından birinin hiç olmaması durumudur (31). Unikorni uterusu olan kadınlarda gebelik sonuçları genellikle kötüdür. Tanı konulan gebelerin yaklaşık yarısında gebelik kayıpla sonuçlanmaktadır. Didelfis uterus, müller kanallarının orta hatta hiç yaklaşmaması ve birleşmemesi durumudur (32,33). Uterin didelfisli kadınların gebeliklerinin % 40'ı spontan kayıpla sonuçlanmaktadır. Bikornu uterus, müller kanallarının kısmi birleşmesi ancak hiç kaynaşmaması durumudur. Bikornu uterusu olan kadınlardan elde edilen verilerde erken gebelik kayıp oranı %30, tüm gebeliklerde fetal kayıp oranı % 40 bulunmuştur (34). Uterus iç boşluğunun bir septum ile iki ayrı bölmeye ayrıldığı olgular uterin septum olguları olarak adlandırılmaktadır. Uterin septum, en sık görülen uterin gelişim anomalisi olup tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda % 3.5 sıklıkta görülmektedir (35).

Dietilstilbestrole (DES), sentetik, non-steroid östrojen bir birleşiktir. DES son 30 yıl içinde spontan düşüklere ve hamileliğin diğer komplikasyonlarını önlemek için kullanılmıştır. Ancak ilerleyen yıllarda, DES kullanımının dişi üreme sistemi anormallikleri ile direkt olarak ilgili olduğu gösterilmiştir (36,37). Uterus içi DES'e maruz kalan kadınların yaklaşık % 70'inde gelişimsel uterin anomaliler saptanmıştır. Bu hastalardaki spontan gebelik kayıp oranı 2 kat ve ektopik gebelik oranı ise 9 kat artmaktadır (38).

Uterin myomların, tekrarlayan gebelik kaybı nedeni olduğunu gösteren kesinleşmiş kanıtlar yoktur. Myomların tekrarlayan gebelik kayıplarındaki etkisi bölgesel kan akım yetersizliğine bağlanmaktadır (39). Submükoz myomu kaplayan

endometriumun, steroid hormonlara cevap vererek gebelik kaybını arttırıp arttırmadığı bilinmemektedir. Bununla beraber submüköz myomların alınmasının düşük oranlarını azalttığına dair bulgular mevcuttur (40).

Gebelik kayıplarına neden olan anatomik nedenlerden bir diğeri de, küretaj sonrası oluşan intrauterin adezyonlardır. İntrauterin adezyonlardaki tekrarlayan gebelik kayıplarının mekanizması, azalmış fonksiyonel uterin hacim ve endometrial fibrozis ile plasental yetersizliğe neden olabilecek inflamasyondur (41). Bu hastalardaki gebelik sonuçları genellikle kötüdür ve % 40-80 spontan gebelik kaybı ile, % 25 oranında preterm doğum olarak kliniğe yansımaktadır (42).

2.1.3. İmmunolojik Nedenler:

Tekrarlayan gebelik kaybı etiyojisinde yatan immünolojik nedenler; otoimmün ve alloimmün nedenler olarak iki grupta incelenmektedir.

2.1.3.1. Otoimmün Nedenler

Sistemik lupus eritamatozis (SLE) deri, eklem, böbrek, kalp zarı, akciğer zarı gibi birçok doku ve organ enflamasyonu gibi bulgularla kendini gösteren ve bağışıklık sisteminin hatalı çalışması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. SLE, sebebi bilinmeyen gebelik kayıplarıyla ilişkilidir. Sistemik lupuslu kadınlarda görülen fetal ölümlerin hemen hepsi antifosfolipit antikor varlığı ile ilişkilidir. Konsepsiyon sırasındaki aktif hastalık durumu ve gebelik sürecinde başlayan SLE, gebelik kayıp riskini arttırmaktadır (43).

Her ne kadar tekrarlayan gebelik kayıpları olan kadınlar arasında antifosfolipit sendrom görülme sıklığı düşük ise de (% 3-5), bu bozukluk tekrarlayan gebelik kayıplarının potansiyel olarak tedavi edilebilen bir nedenidir. Antifosfolipit antikorları, düşük risk popülasyonundaki % 2' lik orana karşın tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda % 15 oranında artmış olarak görülür (44). Antifosfolipit sendromu ve tekrarlayan gebelik kaybı arasında nedensel bir ilişki tanımlanmamış olmasına rağmen, düşük doz aspirin heparin ve steroidler ile çeşitli teropatik çalışmalar yapılmıştır (45). Bir çalışmaya göre; aspirin ve düşük molekül ağırlıklı heparin kombinasyonu,

antifosfolipit antikorlu kadınlarda, gebelik kaybını % 54 oranında azaltmaktadır (46). Ancak steroidlerin tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda canlı doğum oranını arttırdığına dair bir kanıt henüz bulunmamaktadır (45). Tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda otoantikor sıklığı yüksektir. Tekrarlayan gebelik kaybına neden olduğu düşünülen bir diğer antikor ise antinükleer antikor olup, tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü gösteren olguların % 7'sinde yüksek düzeyde olduğu bilinmektedir. Ancak bu olgular için önerilen herhangi bir tedavi yöntemi henüz bulunmamaktadır (43). Tekrarlayan gebelik kaybı olgularında yüksek düzeyde ölçülen bir diğer antikor ise antitiroid antikor olup henüz tanısal bir belirteç değeri taşımamaktadır (47).

2.1.3.2. Alloimmün Nedenler

Gebelik kayıplarına neden olan bir diğer immünolojik etken ise fetusun immünolojik rejeksiyonudur (48). Öyküsünde tekrarlayan gebelik kaybı olan olguların, endometriyumunda yüksek oranda naturel killer (NK) hücrelere (CD16, CD56) rastlanılmaktadır. Normalde endometriyumda daha çok CD56bright NK hücreler bulunur ve bunların trofoblast öldürücü etkisi çok az olup, trofoblast büyüme ve gelişmesini desteklerler. Birçok çalışmada desidua CD56bright NK hücre defekti ve periferik kan mononükleer hücrelerinde yüksek NK hücre sitotoksitesi (CD56dim) durumu gebelik kaybı riskini arttırmaktadır (48,49).

Normal gebelik sürecinde, embriyonik dokulardaki paternal orjinli antijenlere karşı maternal immünolojik tanıma ve yanıt geliştirmektedir. Bu maternal alloimmün yanıtındaki anormallikler tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabilmektedir. Bu durum için ileri sürülen mekanizmalar; maternal sitotoksik antikor üretimi, maternal hücre aracılığıyla immün yanıtı önleyen bloke edici antikor üretiminin yetersizliği yani anne ve baba antijenlerinin ileri derecede benzer olması ve maternal-fetal yüzeyde işlem gören immün mekanizmalardaki sitokin regülasyonunun bozukluğudur (50).

Antipaternal lenfositik antikorlar, tekrarlayan gebelik kaybı nedeni olarak görülmektedir (50). Anne ve baba arasındaki major histokompatibilite kompleks insan lökosit antijenlerinin (HLA) artmış benzerliği, paternal kaynaklı fetal antijenlerin, anne tarafından tanınmasını engellemekte ve bazı bloke edici antikorların üretimine neden olmaktadır (51).

HLA-G, invaziv trofoblast hücrelerinde sentezlenir ve mononükleer hücrelerden sitokin üretimini kolaylaştırır. Serumda çözünebilir sitokin düzeylerin ölçülmesi, gebelik başarısını öngörmeye önemlidir (52).

Sitokinler; immün sistemin çalışmasını sağlayan, onları kontrol eden aracı ürünlerdir. Th1 hücresinde interlökin (IL)-2, interferon (IFN)- γ ve tümör nekroz faktörü TNF- α salıverilirken Th2 hücresinde IL-4 ve IL-10 salınır. Tekrarlayan gebelik kaybı olgularında; gebelik öncesi dönemde periferik kan mononükleer hücrelerde ve endometriyal hücrelerde, düşük zamanında desidua hücrelerinde daha çok Th1 sitokinleri salıverilmektedir (53). Ancak meta-analiz sonuçlarına göre, TGK olgularında IL-10, IFN- γ ve TNF- α düzeylerinde artış saptanmıştır (54).

2.1.4. Trombofili:

Normal gebelikte fibrinojen, faktör 2, 7, 10, 12 ve plazmojen aktivatör inhibitör (PAI-1) seviyelerinde artış ve protein S miktarında azalma sonucu, pıhtılaşma eğilimi artmaktadır. Trombofili ise tromboz eğiliminin arttığı bir grup pıhtılaşma bozukluklarını içermektedir (55). Koagülasyona artmış eğilim, edinsel veya kalıtsal olabilir. Son zamanlarda edinsel ve herediter trombofililerin TGK da önemine dikkat çekilmektedir. Bu grupta aktive protein C rezistansı (aPCR), protrombin mutasyonu, hiperhomosisteinemi, protein S, protein C ve antitrombin III eksiklikleri sayılabilir (56,57).

Kalıtsal trombozların en sık sebebi olan aPCR'nın % 95'inde, sebep bir nokta mutasyonudur (Faktör V Leiden, FVL). Bu mutasyon taşıyıcılarında tromboz riski; heterozigotlarda 5-10 kat, homozigotlarda 80-100 kat artmıştır. Tromboz riski; heterozigot protrombin mutasyon taşıyıcılarında (Faktör II G20210A) 2 kat, heterozigot AT-III eksikliğinde 20-50 kat, homozigot hiperhomosisteinemide (metilen tetrahidrofolat redüktaz) (MTHFR) de ise 2 kat artmıştır (58).

Kalıtsal trombofililerin sistemik tromboz ile bağlantısı bilinmekte olmasına rağmen, TGK üzerindeki etkisi halen yeterli çalışma ile gösterilememiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, 101 TGK'lı hastada üç trombofilik gen mutasyonu araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, kontrol grubu ile TGK grubu arasında trombofilik gen mutasyon taşıyıcılığı açısından fark bulunamamıştır (58). Ancak 31

çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analizde, fetal kayıp ile herediter trombofili taşıyıcılığı arasında değişken bir ilişki bulunduğu bildirilmektedir (59). Trombofilik mutasyonların gebelik üzerinde olumsuz etkilerini gösteren çalışmaların çoğunluğunun, retrospektif veriye dayalı olması ve hangi hemostatik testlerin uygulanması gerektiği hakkında henüz yeterli fikir birliği olmaması; trombofiliye yönelik testlerin, TGK nedenlerinin birincil incelemesinde kullanılmasını tartışmalı hale getirmektedir (60).

Preeklampsi, rahim içi gelişme geriliği (IUGR), ablasyo, fetal ölüm gibi komplikasyonları yaşayan kadınlar arasında trombofilik gen mutasyonlarından birinin bulunma ihtimali % 52 bulunurken, normal bireylerden oluşan kontrol grubunda aynı oran % 17 bulunmuştur. Bu tip geç komplikasyonların tüm gebeliklerde görülme olasılığının % 5 olması ve normal gruptaki gebeliklerde sorun oluşmaması trombofilik mutasyonlar ile TGK bağlantısını içeren iyi planlanmış yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir (61).

2.1.5. Enfeksiyona Bağlı Nedenler

Enfeksiyonların, tekrarlayan gebelik kayıplarındaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Ancak, enfeksiyona bağlı olarak tekrarlayan gebelik kaybı riskinin arttığını gösteren araştırmalara da rastlanmaktadır. Ralph SG ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, bakteriyel vajinozisin IVF tedavisi alan kadınlarda erken gebelik kaybı riskinin arttığı gösterilmiştir (62). Tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olduğu düşünülen enfeksiyonlar arasında; özellikle servisit, kronik veya tekrarlayan bakteriyel vajina enfeksiyonları ve pelvik enfeksiyonlar önemli yer tutmaktadır. Tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olan enfeksiyon etkenleri arasında ise mycoplazmalar, toxoplazma, rubella, sitomegalovirüs, herpes virüs ve listeria bulunmaktadır (63).

2.1.6. Çevresel Nedenler:

Sigara, alkol ve aşırı kahve tüketimi, gebelik kaybına hazırlayıcı çevresel faktörler olarak bilinmektedir. Sigara tüketiminin doza bağımlı olarak gebelik kaybı riskini günde 10 sigara içenlerde dahi arttırdığı belirtilmektedir. Etki mekanizması net

olarak bilinmemekle birlikte, nikotin, karbondioksit ve siyanid gibi sigara komponentlerinin, vazokonstriktif ve antimetabolik etkileriyle plasental yetersizliğe yol açtığı düşünülmektedir (64).

Günde 2 kadehin üzerinde alkol tüketimi, spontan gebelik kayıp riskini ikiye katlamaktadır (65). Ancak yine de, net olarak belirlenmiş bir sınır değeri yoktur. Aşırı kafein kullanımı ise (300 mg/gün'den fazla veya 3 bardak kahve), spontan gebelik kaybını yaklaşık olarak 2 kat düzeyinde arttırmaktadır (66).

Anestezik gazlar, perklor etilen (kuru temizleme solventi) ve diğer organik çözücüler ve ağır metallere (civa, kurşun) maruz kalmak da, gebelik kaybına neden olan çevresel faktörler arasında sayılabilmektedir (67,68).

2.1.7. Genetik Nedenler:

Tekrarlayan gebelik kaybı nedenleri arasında yer alan, genetik nedenler özellikle son yıllarda pek çok araştırmaya konu olmuştur. Bu yoğun ilgiye rağmen, halen TGK etiyolojisinde yer alan genetik nedenler tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Genetik nedenler arasında ilk sırayı kromozomal düzensizlikler almaktadır.

Kromozom anomalileri, spontan abortus örneklerinin % 50-70'inde görülmektedir (9). En yaygın anomaliler otozomal trizomiler (% 60), monozomi X (% 20) ve poliploidi (% 40) olarak bildirilmektedir. Otozomal trizomiler, gametogenez sırasında meydana gelen mayotik ayrılmama olarak tanımlanan, de novo değişimler sonucu ortaya çıkar. Bu olguların büyük çoğunluğunda, ebeveynlerin karyotipi normal olarak gözlenir. Abortus örneklerinde saptanan trizomilerin ise, %20-30'unu trizomi 16 oluşturmaktadır (69).

Kromozomal anomalilerin neden olduğu gebelik kayıpları; erken gebelik haftalarında en yüksek düzeyde gözlenirken, gebelik haftası ilerledikçe bu oran düşmektedir. Anembriyonik gebelik kayıplarındaki kromozomal anomali görülme oranı % 90 iken, 8-11 haftadaki gebelik kayıplarında bu oran % 50 ve 16 - 19 hafta gebelik kayıplarında ise % 30'dur (70). Kromozomal anomaliler, ölü doğumların veya 20 haftayı geçmiş gebelik kayıplarının en az % 6-12'sinde gözlenir (69,71). Malforme embriyoların 2/3'ü ve malforme fetusların 1/3'ü kromozomal anomaliler taşımaktadır (72). Karyotip olarak anormal abortus örneklerinin oranı, aynı zamanda maternal yaşla

doğru orantılı olarak yükselmektedir (73). Tekrarlayan gebelik kaybı olan anne adaylarında, düşüklerin kromozomal anomali taşıma oranı daha düşüktür ve düşüklerin 1/3 kadarında rastlandığı bildirilmektedir. İlk gebelik kaybında kromozomal anomali saptanan olguların daha sonraki gebelik kayıplarında anoploidi görülme oranı, artmış olarak karşımıza çıkmaktadır (74). Tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olan kromozomal anomalilerin görülme oranını ise;

- gebelik haftası,
- maternal yaş,
- malformasyonların varlığı ve
- gebelik haftasına göre küçük fetus oluşumu

gibi faktörler belirler. Erken gebelik haftalarında meydana gelen gebelik kayıplarında daha az rastlanan anoploidiler görülmesine rağmen, ileri gebelik haftalarında meydana gelen fetal ölümlerde rastlanan kromozomal anomaliler yaşayan doğumlarda sıkça görülen trizomi 21, 18 ve 13 gibi yaşamla bağdaşabilen anomalilerdir (69).

Tekrarlayan gebelik kayıplarının, % 3-5'inde dengeli kromozomal yeniden düzenlenmeler de görülmektedir. Bu tip anomalilerin görülme oranı, anne adayında baba adayına göre 2 kat fazladır. Dengeli kromozomal anomali taşıyan ve tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde, kromozomal anomalilerin % 50'si dengeli resiprokal tranlokasyonlar, % 24'ü Robertsonian translokasyonlar ve % 12'si ise anne adaylarında bulunan cinsiyet kromozom mozaizmleri olarak saptanmaktadır. Geriye kalan kısmı ise inversiyonlar ve diğer sporadik anomalilerdir (75). Bu olgularda, anne ve baba adayları fenotipik olarak normaldir ancak mayoz sırasında kromozomlar ayrılırken atipik olan kromozom segmentinin yavruya geçmesi durumunda gebelik kayıpları meydana gelmektedir (9).

Sperm anoploidisi de gelişen embriyoda anomali görülme oranını arttıran nedenlerden biridir. Carrell ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan bir çalışmaya göre; spermelerde 13, 18, 21, X ve Y kromozom anomalilerinin görülme oranının arttığı ve gebelik kayıplarına neden olduğu gösterilmiştir (76).

Tekrarlayan gebelik kayıplarının dikkate değer bir bölümü ise normal karyotipli olguları içermektedir. Bu olgularda ise moleküler düzeydeki genetik değişimler sorumlu tutulmaktadır. Tekrarlayan gebelik kaybı olguları üzerinde array tabanlı CGH (comperative genomik hybridisation) ile yapılan çalışmalarda normal karyotip

sonuçlarına rağmen, kromozomal delesyon ve duplikasyonlara rastlanmaktadır. Örneğin subtelomerik delesyonlara, nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularının %7'sinde rastlanmaktadır (77).

Hemoglobinopatiler, alfa talasemi, metabolik bozukluklar ve trombofililer gibi birçok tek gen bozukluğu da gebelik kayıplarına ve ölü doğumlara neden olmaktadır. Bu bozukluklardan bazıları gebeliğin 2. veya 3. periyotunda fetal ölümlere yol açmaktadır (69,78).

Günümüzde nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularında etkisi olabileceği düşünülen, genetik komponentlerden apoptotik mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalara nadir rastlanmaktadır. Bu araştırmada; apoptotik sinyal yollarında meydana gelebilecek genetik bozuklukların, tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabileceği düşünülmektedir.

2.2. APOPTOZ

Fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, biyoloji alanında olduğu kadar temel ve klinik tıp bilimlerinde de ilgi çeken bir konudur. Apoptoz, patolojik hücre ölümü olan nekrozdan farklı bir hücre sel süreçtir. Nekrozda; ATP miktarı azalmakta, hücre homeostazı hızla bozulmakta ve inflamasyon yanıtı gelişmektedir. Apoptoz ise, inflamasyon yanıtı olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan ve organizmada homeostazı koruyan bir olaydır (79,80,81,82). İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından “fizyolojik hücre ölümü” olarak tanımlandıktan sonra, yine ilk olarak Wyllie ve Kerr tarafından glukokortikoidlere maruz kalan timüs hücreleri üzerinde yapılan deneysel bir çalışma ile gösterilmiştir (83). Apoptozun moleküler mekanizmasını aydınlatmaya yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Temel mekanizma, hücre içi ve dışı sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi çeşitli olaylarla genetik olarak kodlanan apoptotik mekanizmaların aktive olması sonucu hücrelerin kendini yok etmesidir (84). Ayrıca apoptoz mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir.

Apoptozu etkileyen hücre içi uyarılar genel olarak: büyüme faktörleri, onkogenler ve tümör süpresör gen ürünleri olmak üzere üç ana grupta toplanabilir (79).

Apoptozu etkileyen uyarılardan bazıları aşağıdaki sıralanmaktadır:

- Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi
- Sitokinler
- Hücre içi kalsiyum miktarındaki artış
- Tumor Necrosis Factor (*TNF*)
- Transforming Growth Factor-B (*TGF-B*)
- Fas Ligand (*Fas/FasL*) sisteminin aktive olması
- DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması
- Viral-bakteriyal enfeksiyonlar
- Glukokortikoidler

Bu apoptotik uyarıcılardan özellikle protoonkogenlerin birçoğunun apoptozun regülasyonunda yer aldığı bilinmektedir (85). Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de apoptozu tetiklemektedir (86).

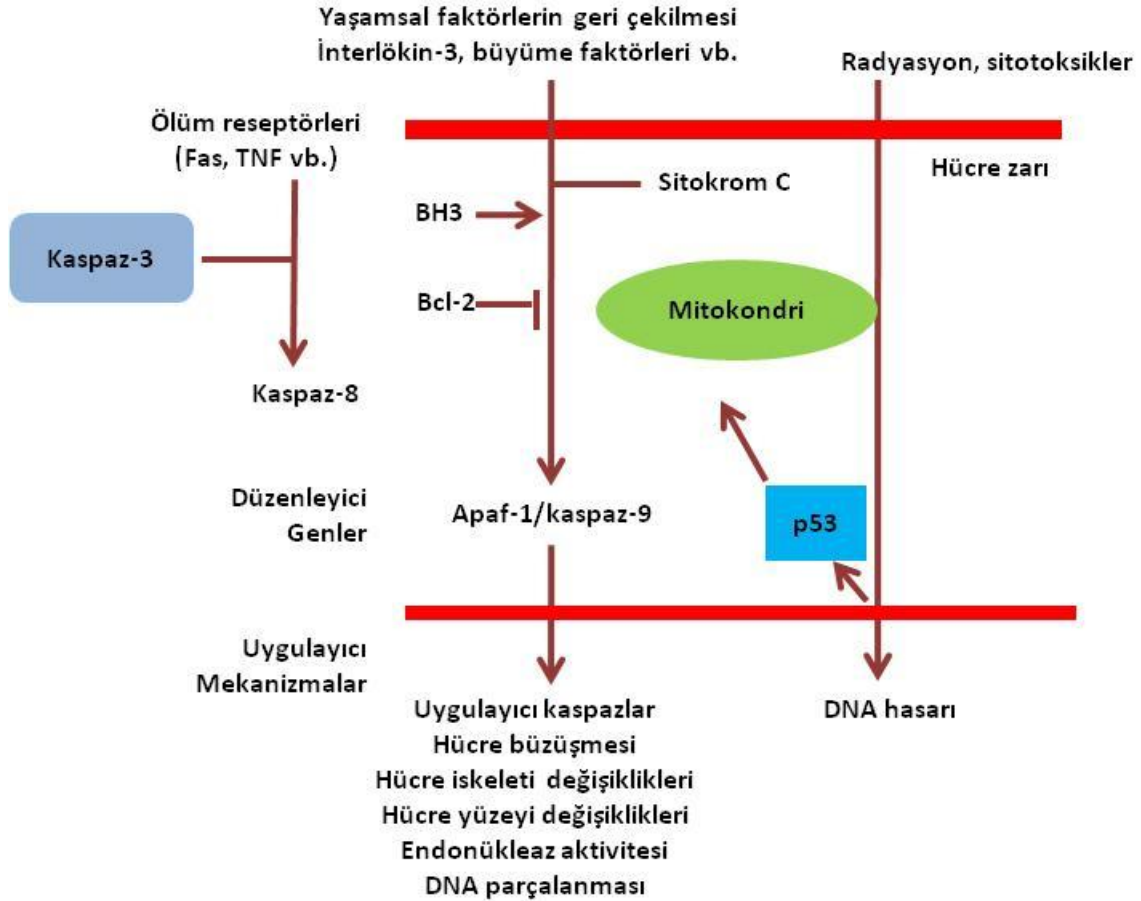
TNF ligand ve reseptör ailesinin üyeleri apoptotik süreçte kritik bir biçimde yer alırlar (87,88). Bu ailedeki ligandlar sayesinde; TNF, limpotoksin alfa ($LT\alpha$), Fas ligand, (*FasL*), Apo3L ve TNF ile ilgili apoptozis indükleyici ligand (*TRAIL*) apoptozisin major düzenleyicileridir. Apoptozun major düzenleyici işlevini üstlenmiş olan reseptörler ve ligandları şekil 2.2'de gösterilmektedir (89,90,91).

Diğer TNF-iliği ligand ve onların reseptörleri de belirli durumlarda apoptik hücre ölümünü başlatabilmektedir. Bunlar ligand ve reseptörler, $LT\alpha$ 1 $LT\beta$ 2 reseptör kompleksini içerirler. Bu kompleks $LT\beta$ reseptörü ($LT\beta$ R), CD40 reseptörü ve CD30 reseptörünün bir araya gelmesini sağlayarak apoptozu başlatır (92,93,94,95).

Apoptoz süreci; DNA hasarına karşı apoptotik genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir (81) (şekil 2.1). Bu süreçte belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar:

- Bcl-2 ailesi proteinleri,
- Kaspazlar ve
- Apaf-1 proteini (*Apoptotic protease activating factor-1*)dir.

Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı parçalanması, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklere neden olmaktadır (96).

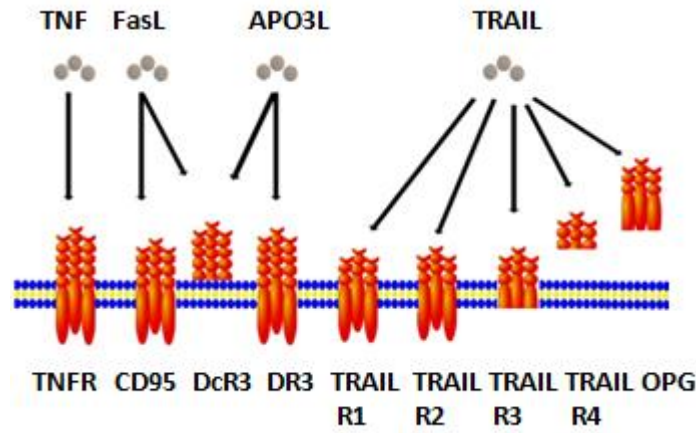


Şekil.2.1. Apoptozun genel mekanizması. Radyasyon, sitotoksikler gibi birtakım dış faktörler nedeni ile meydana gelen DNA hasarı hücre içinde p53 ün ekspresyon düzeyinin artmasına neden olmaktadır. p53 ya hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak hücreye DNA onarımı için gerekli zaman kazandırır ya da hücreyi apoptoza yönlendirir. Bir diğer taraftan Fas, TNF gibi apoptoz düzenleyicileri devreye girerek ligand reseptör bağlanmasını gerçekleştirir ve aktivasyon için kaspazları uyarır. Mitokondriyal yolak ise mitokondrinin dış membranında bulunan Bcl-2 gen ailesi proteinlerin aktivasyonu ile başlar. Bcl-2 ailesi proteinler yapılarında bulunan BH3 bölgeleri ile diğer proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinler ile ilişki içerisine girerek apoptozisi gerçekleştirir(96 nolu kaynaktan modifiye edilerek kullanılmıştır).

2.2.1. Apoptozun Gen Düzeyinde Düzenlenmesi

Apoptozun genetik kontrol mekanizması, ilk kez *Caenorhabditis elegans* isimli nematodun gelişim aşamalarında belirlenmiştir. *C. elegans*'ın gelişim sürecinde 1090 somatik hücre oluşmaktadır, buna karşılık bu hücrelerden 131'i ölmektedir (97). Bu

programlı hücre ölümünü gerçekleştiren genler, araştırmacılar tarafından ced-3 ve ced-4 olarak tanımlanmıştır. Bu genlerden biri ya da her ikisi de mutasyona uğradığı zaman bu ölmesi beklenen 131 hücre yaşamaya devam etmektedir (98,99,100).



Şekil.2.2. Apoptozun major düzenleyicilerinden bazılarının membran yüzeyindeki ligand-reseptör ilişkileri şeklinde gösterimi. Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) TNF ligandına bağlanarak, CD95 reseptörü Fas L (CD95L) ligandına ya da Decoy Receptor 3 (DcR3)'e bağlanarak, APO3L Death Receptor 3 (DR3) ya da Decoy Receptor 3 (DcR3)'e bağlanarak, TRAILR1, TRAILR2 reseptörleri Tumor Necrosis Factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)'e bağlanarak apoptozisi indükler(97 nolu kaynaktan modifiye edilerek kullanılmıştır).

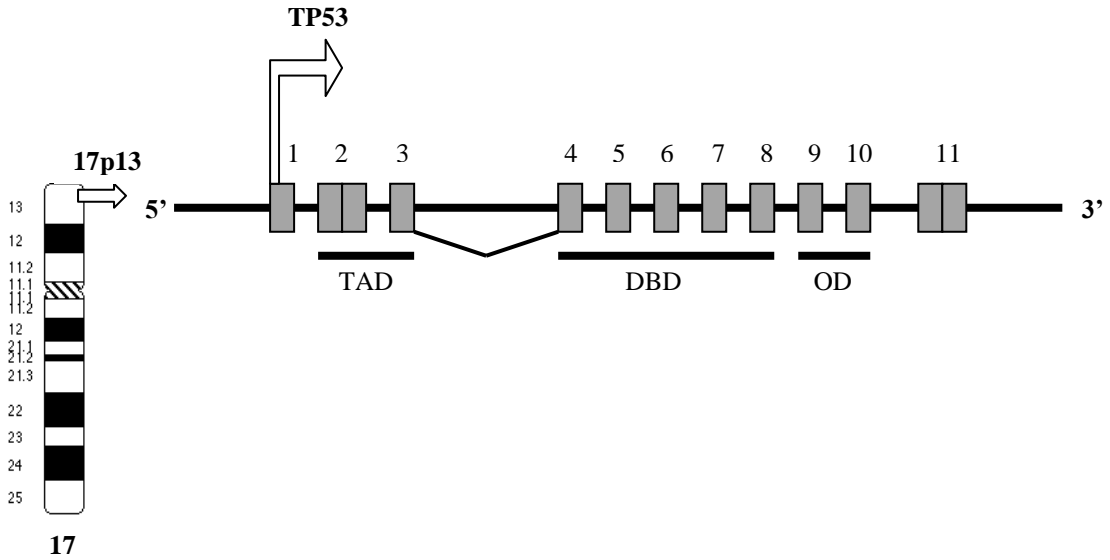
Ced-3 geni, bir sistein proteazı kodlamaktadır ve memelilerdeki sistein proteazlardan *Interleukin-1 β -Converting Enzyme (ICE)*'ye yapı olarak benzemektedir. Ced-4 ise, kalsiyuma bağlı bir proteini kodlamakta ve memelilerde Apaf-1 ile homoloji göstermektedir. Ced-9'un insandaki homologu olan Bcl-2 protoonkogen gen ailesi ise apoptozu durdurmaktadır (101,102).

Apoptozun düzenlenmesi, nematodlardan insana kadar çoğu aynı gen kontrol süreci ile oldukça sıkı bir biçimde korunmuştur. Apoptoz, gen ekspresyonu ile düzenlenebilmesine rağmen, süreç genotoksik hasar (kemoterapi, radyasyon vb) veya sitokinlerin olmaması gibi (eritropoietin vb) farklı uyarılarla da aktive olabilir. DNA tek veya çift iplik kırıkları ve nükleotit azlığı, DNA'ya bağlı transkripsiyon faktörü olarak p53 ile başlayan bir dizi olayı aktive etmekte ve hücre apoptotik yola girmektedir (81).

2.2.2. Apoptozda p53'ün İşlevi

Hücre döngüsü birbirini düzenli olarak takip eden çeşitli evrelerden (G1, S, G2, M, G0) oluşmaktadır. Her evre, döngüyü pozitif veya negatif olarak etkileyen çeşitli faktörler tarafından düzenlenmektedir. Negatif düzenleyici faktörlerin başında p53 geni (TP53) dolayısıyla bu genin kodlamakta olduğu p53 proteini gelmektedir. p53 geni 17. kromozomun kısa kolu üzerinde p13 bölgesinde yerleşmiş bir tümör baskılayıcı genidir. 20kb uzunluğunda olan bu gen, 11 ekzondan oluşmaktadır (şekil.2.3) (103.104).

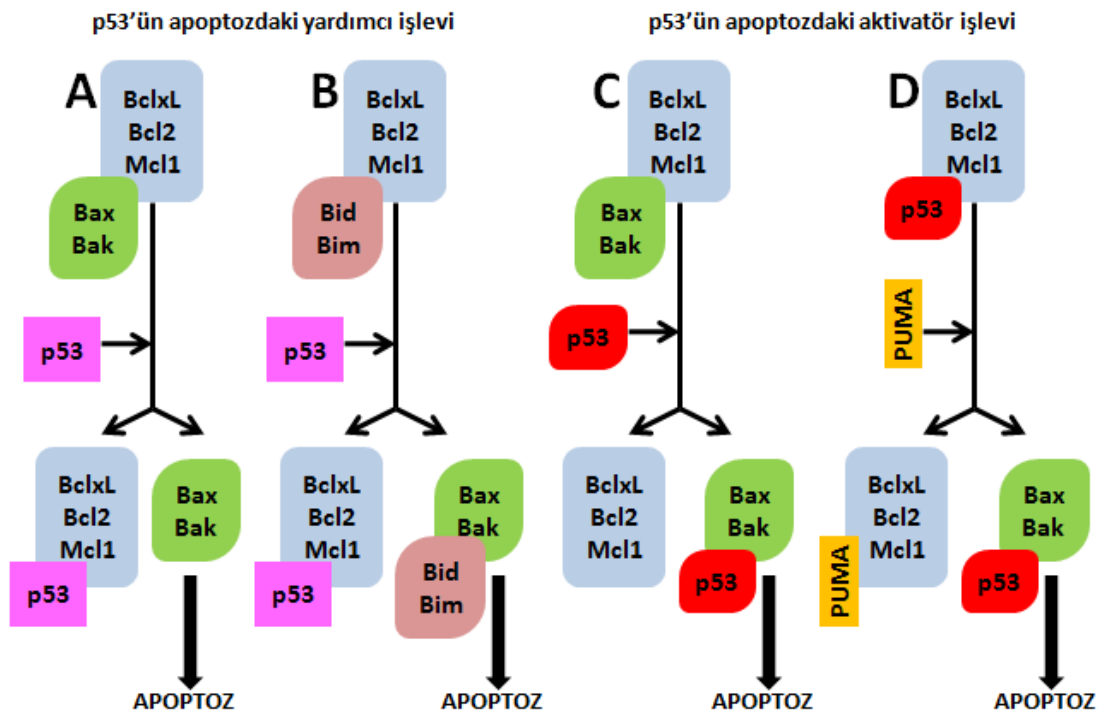
İnsanda apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon düzenleyici gen olan p53'ü aktive etmektedir. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre döngüsünün durmasını uyararak DNA hasar onarımı için zaman kazandırmakta ya da hasar onarılamıyorsa apoptoza yönlendirmektedir (105). Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl2/Bcl2 gen ürünlerinin ekspresyonlarını düzenlediği düşünülmektedir. p53 aynı zamanda, Bcl2/Bax ailesi üyelerini yardımcı olarak ya da bu aile üyelerini aktive ederek apoptozu gerçekleştirmelerini sağlamaktadır (106) (şekil.2.4).



Şekil 2.3. p53 Geni Yapısal Haritası ve TP53 Yapısında Bulunan İşlevsel Bölgeler. TAD: Trans activation domain, DBD: DNA Binding Domain, OD:Oligomerization domain

2.2.3. Bcl2/Bax

Bcl2/Bax üyesi genler, apoptozun genetik düzeyde düzenlenmesinden sorumlu bir diğer gen ailesidir (81,108). Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır (96). Bunlardan bazıları Bcl2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 gibi apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Bcl2/Bax ailesi üyesi proapoptotik genler; Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid gibi) olmak üzere iki alt aileye sahiptir (86).



Şekil.2.4. p53'ün apoptozdaki fonksiyon modelleri. Sol tarafta p53'ün apoptozu gerçekleştirmeye yardımcı rolü anlatılmaktadır. Bu modellerde p53'ün, BclxL, Bcl2 ve Mcl1 gibi anti-apoptik proteinlerle pro-apoptik proteinler arasındaki iletişimi engelleyerek apoptozu gerçekleştirmeye yardımcı olduğu düşünülmektedir. p53, pro-apoptik (Bak, Bax) proteinlerle anti-apoptotik proteinler (BclxL, Bcl2, Mcl1) arasındaki ilişkiyi bozarak Bak ve Bax'ı apoptozu gerçekleştirmeleri için serbest bırakmaktadır (A), ya da serbest aktivatör proteinler olan Bid ve Bim'in Bak ve Bax'a bağlanmasını sağlamaktadır (B). Sağ taraftaki modellerde ise p53 bir aktivatör protein olarak görev yapmaktadır. Anti-apoptotik proteinlere bağlı ve inaktif durumda olan pro-apoptotik proteinleri aktive ederek apoptozu tetikler (C). p53, apoptozu yardımcı bir başka protein olan PUMA ile yer değiştirerek Bak ve Bax'ı apoptozu gerçekleştirmek üzere aktive eder (107 nolu kaynaktan modifiye edilmiştir).

Bcl2/Bax gen ailesinin ürünleri; mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra, endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar (81,109). Örneğin; Bcl2' nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl2' nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax' ın daha fazla olması durumunda, hücre apoptoza girmektedir (110).

Son yıllardaki, hücrenin yaşamı ya da ölümü konusundaki araştırmalar dikkatleri mitokondri üzerinde toplamıştır (111). Mitokondriler çift zarlı organellerdir. Bcl-2, 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında yerleşmiştir (112). Bu proteinler, iyon alışverişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki yaparlar. Özellikle antiapoptotik genler içinde yer alan BclxL'in mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi koruduğu ve bu işlevi ile apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir(111). Bcl2 ailesinin bir diğer ilginç özelliği de, reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol etmesidir (112).

Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının "permeabilite geçiş poru" na doğru yönelirler ve buraya bağlanırlar. Bu bağlanma, seçici iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle, sitokrom c ve *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF, doğrudan kromatin kondensasyonunun ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1' in aktivatörüdür(81). Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks "apoptozom" olarak isimlendirilir (113). Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır(81). Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozun neden enerjiye gereksinim duyduğunu açıklamaktadır (109).

2.2.4. Kaspazlar

Proteolitik etkili kaspazlar, ölüm reseptörleri ve bunlarla bağlantılı çalışan adaptör moleküller ile birlikte apoptozda görev alan üç temel molekül grubudur(109,110).

Ölüm reseptörleri (death receptors); *Tumour Necrosis Factor (TNF)* reseptör gen ailesi üyesidir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm domaini (*Death Domain*) adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar (110). Bilinen altı tane ölüm reseptörü vardır. Bunlar; CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand)-R1, TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6 olarak isimlendirilir (114).

Adaptör proteinler, reseptör uyarımı ile oluşan hücre içi sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive etmektedir. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) karaciğerde yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Fas'ın etkisiyle kaspaz kaskadı aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (*caspas activated DNase; CAD*) aracılığı ile DNA yıkımına neden olmaktadır (110). Memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prokürsörler olarak bulunur. Kaspazlar, diğer adı ile ICE proteazlardır ve bir proteaz aktivasyon kaskadını başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol almaktadır. Bu sırada nükleazlar da aktive olarak DNA fragmentasyonu ve RNA degradasyonu gerçekleştirmektedir (115). Sitokrom c'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olmaktadır. Şimdiye kadar sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır (116,117). İnflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan ICE, prokaspaz-1 olarak isimlendirilmiştir. Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive etmektedir. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1,4,5,13), proteolizisin "başlatıcılar" (kaspaz 2,8,10) ve "uygulayıcılar" (kaspaz 3,6,7) olarak sınıflandırılırlar (86,110).

Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve hücreyi apoptoza yönlendirirler. Ancak başlatıcı kaspazlar apoptozu gerçekleştirmez sadece gerçekleştirecek olan kaspazları aktifleştirirler. Apoptozu gerçekleştiren uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler (110). Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır(84). Kaspaz aktivasyonu

hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (*IAP*) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir (110). Ayrıca *Inhibitors of Apoptosis(IAP)* ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilmektedir (81).

Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bu nedenle *c-asp-ases* adını almışlardır. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis şekillenmez ve apoptotik cisimcikler oluşur (81,113).

2.3. Tumor Necrosis Factor (TNF)-İle İlgili Apoptozisi Başlatıcı Ligand (TRAIL)/(Apo2L)

TRAIL (Apo2L)' in, TNF (Tümör Nekroz Faktör) protein ailesinin bir üyesi olduğu ve apoptozu kanser veya transforme hücrelerde indüklediği fakat normal hücrelere etki etmediği gösterilmiştir. TRAIL, apoptozu reseptörlerine bağlanarak tetikler. TRAIL'in apoptozu tetiklediği reseptörleri ise DR-4 (Death Receptor-4) ve KILLER/DR-5'dir (118).

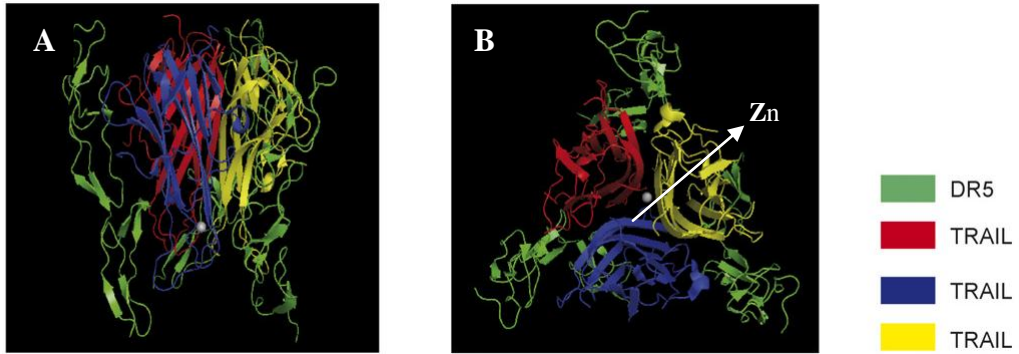
2.3.1. TRAIL Geninin Yapısı ve Özellikleri

TRAIL geni 3. kromozomun q26 bölgesinde lokalize olup, 5 ekzon ve 4 introndan oluşan 20kb uzunluğunda bir genidir. Ekzonlar sırasıyla 222, 138, 42, 106 ve 1245 baz çiftinden oluşmakta iken, intronlar sırasıyla; 8.2, 3.2, 2.3, 2.3 kb uzunluğundadır. TRAIL insanda; dalak, akciğer, prostat gibi birçok değişik dokuda eksprese edilmektedir. TRAIL bir tip II membran proteinidir. İnsanda 281, sıçanda 291 aminoasitten meydana gelir ve bu aminoasitlerin % 65 i ortaktır. C-terminal ucu oldukça iyi korunmuş sekanslara sahipken, N-terminal ucu iyi korunmamış sekanslara sahiptir. Buna ek olarak, TRAIL in sitoplazmik bölgede insan ve fare

dizileri arasında hiçbir korunum yoktur, bu durum N-terminal ucunun sitoplazmik kısmının hücrel sinyallerin taşınmasında yer almadığını gösterir (119,120).

TRAIL geni, TNF ligand ailesinden Fas-ligand ile % 28, TNF- α ile % 23, LT- α ile % 23 ve LT- β ile % 22 özdeşlik gösterir (121,122).

TRAIL, TNF ailesindeki sistein kalıntısı, Cys230, olan tek proteindir ve bu durum TRAIL' in 3 molekülü arasındaki etkileşime olanak sağlar. Trimerik liganda sisteinler tarafından bağlanan çinko iyonu trimerizasyon ve optimum biyolojik aktivite için zorunludur (şekil 2.5).

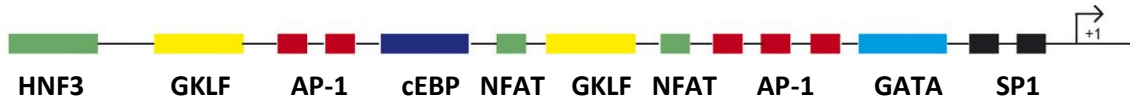


Şekil 2.5. TRAIL'in trimerize formunun kristal yapısı. A) TRAIL in trimerize formunun kendi reseptörü olan DR5 ile etkileşimdeki halinin kristal yapısı. B) Çinko atomunu TRAIL in trimer yapısının stabilitesi için gereklidir. (120 nolu makaleden modifiye edilerek kullanılmıştır).

TRAIL geni, 1. ekzonu 17 aminoasitten oluşan kısa sitoplazmik bir domaini ve 21-hidroforobik aminoasitten meydana gelen bir transmembran bir alanla karakterize bir gendir. Ekzon 5 ise 142 aminoasitlik C-terminal domaini kodlar. İnsan TRAIL geninin 5' upstream bölgesi, ilk kez Wang, Ji, Wang ve Evers (2000) ve Gong ve Almasan (2000) tarafından izole edilmiş ve klonlanmıştır. Genin promotor bölgesine ise birçok transkripsiyon faktörünün bağlanabildiği gösterilmektedir. Bunlardan bazıları AP1 (aktivator protein 1), AP3 (aktivator protein 3), AP3 (aktivator protein 3), ISRE (Interferon-stimulated response element)'dir (Şekil 2.6) (121,122).

TRAIL yeni izole edilmiş insan T hücrelerinde, B hücrelerinde, dendritik hücrelerde (DH) ve Natural Killer (NK) hücrelerde eksprese edilmez. Sadece sıçan NK

hücrelerinin bir kısmında hücre yüzeyinde eksprese edilir. Ekstrasellüler bölgesi bir exogenusa bağlı TRAIL füzyon proteini (LZ TRAIL) trimerizasyonu yöneten lösün fermuar (leucine zipper)'ını modifiye ederek yüksek biyolojik aktivite gösterir. TRAIL'in saflaştırılması işlemlerinde dithiothreitolün ilavesi TRAIL' in hiper oligomerizasyonunu arttırarak apoptozun indüklenmesi için yüksek potansiyel gösterir (123).



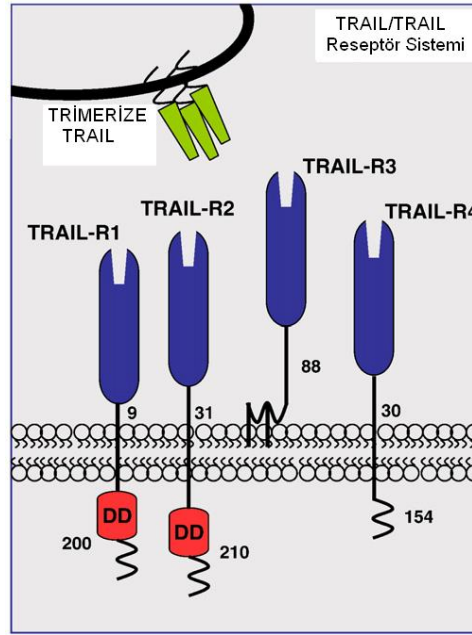
Şekil 2.6. TRAIL promotorunun 5'upstream bölgesinin şematize gösterimi.(120 nolu mkaleden modifiye edilerek kullanılmıştır).

TRAIL'in apoptotik etkisi trimerizasyon sonrası beş reseptöründen ikisi olan TRAIL-R1 (DR-4) ve TRAIL-R2 (DR-5) bağlanması ile gerçekleşmektedir. Diğer üç reseptörün fonksiyonları apoptozun inhibisyonu ve kemik emiliminin regülasyonudur (124,125).

2.3.2. TRAIL Geni Reseptörleri

TRAIL iki tip reseptörle etkileşime girer. Bunlar apoptozu tetikleyen 'ölüm reseptörleri' (Death Receptors) ve apoptozu engelleyen 'tuzak' (decoy) reseptörlerdir. Bu güne kadar 5 tane insan TRAIL reseptörü tanımlanmıştır. Bunlardan DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2) ölüm reseptörü olarak nitelendirilirken; TRID (DcR1), TRAIL-R3, TRAIL-R4 (DcR2) ise tuzak (decoy) reseptörler olarak nitelendirilir.(şekil 2.7). İlaveten çözülebilir bir reseptör olan osteoprotegrin de TRAIL reseptörleri arasında sayılmaktadır(126,127,128,129)

Farede insandaki DR-5 ile homoloji gösteren tek bir ölüm reseptörü bulunurken (mDR5), iki tane tuzak reseptörü mevcuttur. Bunlar, mDcR1 ve mDcR2 olarak isimlendirilirler (126,129).



Şekil 2.7. TRAIL ve reseptörleri. TRAIL in iki apoptozu tetikleyen ve 3 tane apoptozu engelleyen reseptörü membran yüzeyinde gösterilmiştir(130).

2.3.3. TRAIL-R1 (DEATH RECEPTOR - 4)

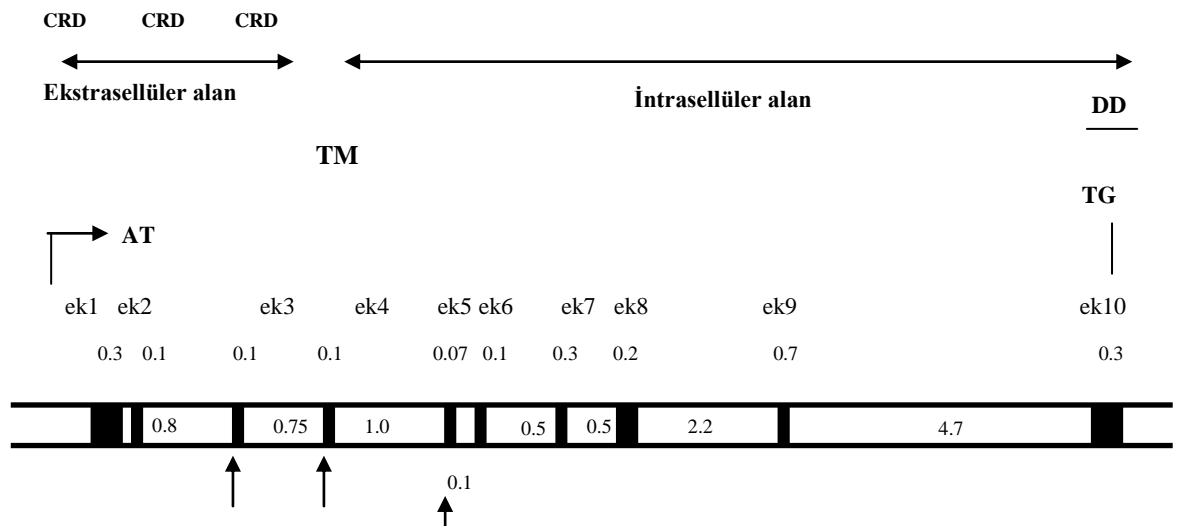
TRAIL-R1, 8. kromozomun p21-22 bölgesinde lokalize olan bir genidir. Ekstrasellüler sisteince zengin ligand bağlayıcı pseudopeptsten, tek bir transmembran heliksten ve TRAIL'i bağlayarak apoptozu başlatan sitoplazmik bir ölüm alanından oluşur (şekil.2.7) (131).

TRAIL-R1'in SNP (Single Nucleotid Polymorphism) veri tabanına göre 7 farklı polimorfizmi bildirilmiştir. Bunlar; Thr209Arg, Glu228Ala, Thr33Ile, Pro105Arg, His141Arg, Asn297His, Arg441Lys polimorfizmleridir (7). TRAIL-R1, TRAIL için ilk tanımlanmış reseptör olup, EST veritabanında ölüm alanı motiflerinin homolojisi araştırılırken ilk defa bulunmuştur (132). DR-4 bir tip I transmembran proteinidir, bir intrasellüler ölüm alanı içerir ve bu alan antiapoptik sinyalleri içeren diğer reseptörlerin ve tuzak reseptörlerin bağlanma bölgesinin üzerine apoptik mekanizmayı engaje eder (133).

TRAIL-R1 in sitoplazmik domaini, Fas'ın ve TNFR-1 (Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1) 'in ölüm domaini ile homolog diziler içerir. Diğer ölüm alanı taşıyan reseptörler gibi, TRAIL-R1'in ekspresyonu da apoptoz ile sonuçlanır. TRAIL-R1

merkezli apoptozda görev alan sinyal yollarında bazı uyuşmazlıklar mevcuttur. İlk yapılan çalışmalarda, TRAIL-R1'in ölüm reseptörleri ile ilişki içerisinde olan herhangi bir sinyal molekülü ile ilgili olmadığı gösterilmektedir (133). Daha yakın zamanda yapılan çalışmalarda, bu reseptörle adaptör moleküller FADD (Fas Associated Death Domain), TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein), FLICE (FADD Like İnterleukin-1 beta-converting enzyme) ve RIP (Receptor Interacting Protein) arasında net fakat zayıf bir ilişki olduğu gösterilmektedir (134,135). İlişkilerin zayıf olduğu gerçeği düşünülse de, TRAIL-R1 ve bu sinyal moleküller henüz karakterize edilememiş ek bir adaptör ile merkezlendirilmiş olabilir. Buna ek olarak, TRAIL-R1 sinyal kompleksinin FADD'ı TRADD'dan daha önce güçlendirdiği belirtilmektedir (135).

DcR1 ve DcR2 ise DR-4 ve DR-5'in ekstrasellüler bölgesi ile yakın homoloji gösterir. DcR2 fonksiyonel olmayan sitoplazmik bir ölüm domainine sahipken DcR1 membranda sitozolik bölgeyi kilitleyen glikofosfolipid-bağlı bir proteindir. TRAIL decoy reseptörlerine de bağlanıyor olmasına rağmen, FADD oluşturmaz ve apoptoz gerçekleşmez (136).



Şekil 2.8. DR4 Gen Yapısı. DR-4 gen yapısı, protein alanları ve tanımlanmış dizi varyasyonları gösterilmiştir. Ekzonlar siyah, intronlar beyaz dikdörtgenler şeklinde belirtilmiştir. Protein alanları yukarı kısımda TM:Transmembran alan, DD:ölüm alanı (death domain), CRD:sisteince zengin alan (cystein rich domain) gösterilmiştir.(137 nolu makaleden modifiye edilmiştir).

2.3.4. TRAIL / TRAIL Reseptör Sinyal Yolağı

Apoptozun gerçekleşmesi için iki ana yolak bildirilmiştir. Bunlar ‘intrinsik yolak’ (mitokondriyal yolak) ve ‘ekstrinsik yolak’ olarak isimlendirilirler. Apoptozda her iki yoldan da farklı uyarıcılara bağlı olarak yararlanır. TRAIL her iki yolağı da hücre tipine bağlı olarak aktive edebilir (138,139).

Ekstrinsik yolak, apoptozu hücre yüzeyinde DR-4 ve DR-5 in ligandı olan TRAIL’ e bağlanması ile indükleyen yolaktır. Ölüm reseptörlerinin TRAIL’ e bağlanması reseptörlerin trimerizasyonuna ve bir adaptör protein olan FADD’ ın bölgeye toplanmasına izin verir. Hemen ardından FADD, başlatıcı kaspaz 8 veya 10 (pro-kaspaz 8 veya 10) u toplayarak, DISC (Death Inducing Signaling Complex) grubunun oluşmasına öncülük eder. FADD aracılığı ile pro-kaspaz 8 in bölgeye toplanması, ikinci bir protein motifi olan “*death effector domain*” (DED) ile etkileşimi sayesinde gerçekleşir. Böylece başlatıcı kaspazlar, proteolizis ile aktive olurlar. Aktif kaspaz 8 veya 10 daha sonra efektör kaspaz 3’ e bağlanarak ölüm substratlarının bölünmesini gerçekleştirir. Tüm bunlar gerçekleşirken pro-kaspaz 8’ in bölgede toplanması yine DED içeren başka bir protein olan FLICE (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme) inhibitörü protein olan c-FLIP aracılığı ile inhibe olabilir (138,140). Hücrede c-FLIP, TRAIL aracılı apoptozda önemli bir inhibitör protein olarak görev alır. Kaspaz 8 in homoloğı olan c-FLIP, pro-kaspaz 8 ile yarışarak FADD a bağlanabilir ve böylece TRAIL tarafından uyarılan apoptozu engeller (şekil 2.9) c-myc ise bir tümör baskılayıcı (tumor supressor) gen olarak c-FLIP’in transkripsiyonunu baskılayarak Bax γ hücrelerini TRAIL’e karşı tekrar duyarlılaştırır(141). c-FLIP aynı zamanda NF-KB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)’yi ve ERK (extracellular-signal regulating kinase) sinyal yolağını aktive ederek hücrelerin hayatta kalmasını organize eder (142).

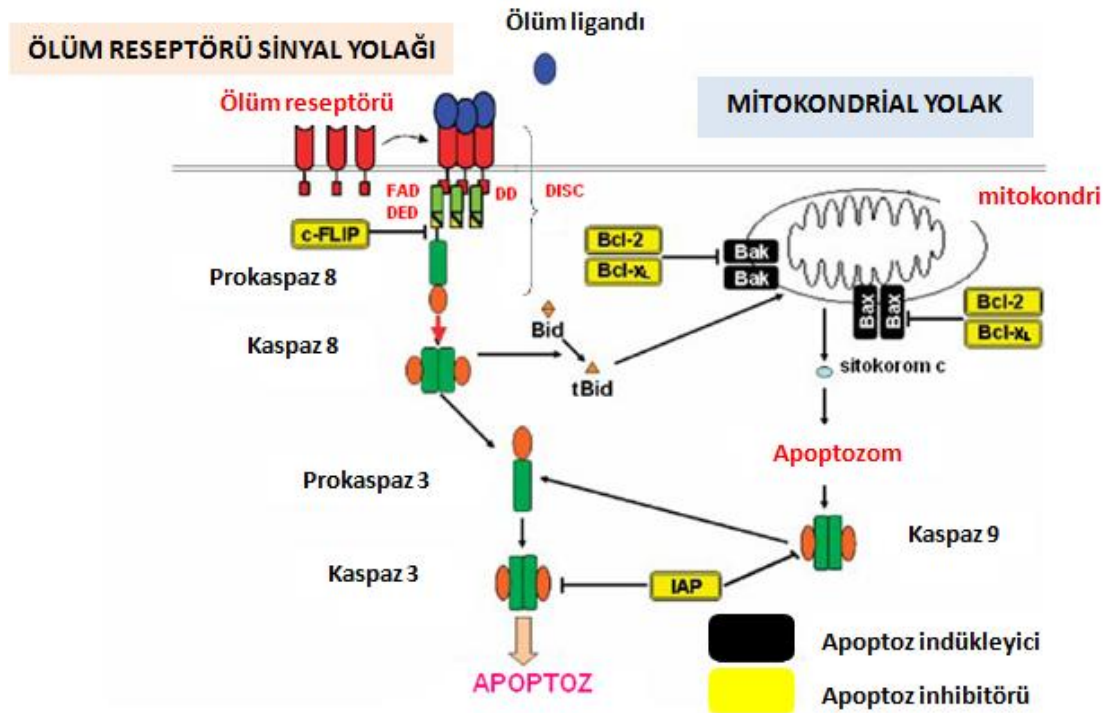
İntrinsik yolak (mitokondriyal yolak) DNA hasarına bağlı olarak apoptozu indükler. Mitokondriyal yolak, proteolitik kaspaz 8’in Bid’i aktive ederek tBid’e dönüştürmesiyle başlar (135).

tBid anti-apoptik Bcl-2 proteinlerini ayırarak uzaklaştırırken, pro-apoptik Bcl-2 aile üyelerini de aktive eder. Bu yolak, mitokondride pro-apoptik Bcl-2 protein ailesi

üyelerinden, Bak ve Bax'ı da kapsar ve antiapoptik Bcl-2 aile üyelerinden Bcl-2 ve Bcl-xL tarafından negatif olarak regüle edilir (137).

Bak ve/veya Bax'ın aktivasyonu mitokondri membran potansiyelinin değişimi ile sonuçlanır ve 'sitokrom c' nin serbest bırakılmasına öncülük eder. Sitozolde sitokrom c APAF-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1)'e bağlanarak kaspaz 9'un aktive olduğu 'apoptozom' u oluşturur. Böylece kaspaz 3, 6 veya 7'nin aktivasyonu gerçekleşir (143).

Tip I hücrelerde kaspaz 8'in aktivasyonu, kendisinden sonraki efektör kaspazların aktivasyonu için yeterlidir. Bu hücrelerde ekstrinsik yolak mitokondriye bağlıdır ve Bcl-2 tarafından bloke edilmez. Oysaki Tip II hücrelerde aktive olmuş kaspaz 8 veya 10'nun miktarı efektör kaspazların aktivasyonunu tetiklemek için yeterli değildir. Dolayısıyla apoptik programın kaspaz 8'in aktive ettiği mitokondriyal yolak aracılığı ile gerçekleşen bir amplifikasyon döngüsüne ihtiyacı vardır (144).



Şekil 2.9. Apoptoz yolları. Apoptoz için esansiyel olan ekstrinsik (ölüm-reseptörü aracılı) yolak ve intrinsik (mitokondriyal) yolak (135 nolu makaleden modifiye edilmiştir).

TRAIL, sadece efektör kaspazların aktivasyonuna ve apoptozun başlatılmasına öncülük etmez aynı zamanda nükleer faktör KB (NF-KB), JNK (c-Jun N-terminal kinase) veya MPAK (mitogen activated protein kinase)'lerin de aktivasyonunu içeren apoptik olmayan yolağı da indükler (145). NF-KB'nin aktivasyonunun DR-4 veya DR-5 in TRAIL e bağlanması ile gerçekleştiğı gösterilmiştir ve TRAIL in indüklediğı IKK (IkappaB kinase) aktivasyonunu yönetir (146). Son olarak aktif NF-KB, Mcl-1'i transaktive eder ve böylece hücreye hayatta kalma avantajı sağlar (147).

DR4/5-DISC kompleksinin üstüne TRAF2'nin bağlanması JNK'nin aktivasyonu için zorunludur ve bu aktivasyon anti-apoptik Bim'in fosforilasyonunu, kaspazların aktivasyonunu ve apoptozun başlamasını teşvik eder (148,149).

2.3.5. TRAIL ve Reseptörlerinin Fizyolojik Rolü

TRAIL efektör lenfositler tarafından eksprese edilen bir sitokindir. İmmün sistemin şekillenmesinde ve regülasyonunda rol oynar. TRAIL geni çıkartılmış fareler yaşamını sürdürebilir ve bu farelerde hiçbir hematolojik veya üreme ile ilgili bozukluk gözlenmez (150).

TRAIL in ekspresyon düzeyi yeni izole edilmiş lenfositlerde dikkat çekici düşüklüktedir. Sadece sıçan NK hücreleri saptanabilir düzeyde TRAIL eksprese eder ve bu muhtemelen yaşayan NK hücrelerindeki TRAIL ekspresyonunun interferon (IFN) salgılanması ile regüle edildiğini gösterir (151).

Dendritik hücrelerin (DC) interferon ile uyarılması TRAIL' in dendritik hücrelerde ekspresyonu ile sonuçlanır; bundan dolayı TRAIL, dendritik hücrelerin tümör hücrelerindeki sitotoksitesini artırır (152).

Böylece TRAIL' in interferonlar, dendritik hücreler ve natural killer hücreleri de kapsayan doğal bağışıklığın düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (153).

TRAIL reseptörleri çıkartılmış farelerde yapılan çalışmalar göstermiştir ki TRAIL reseptörleri doğal bağışıklık yanıtında negatif düzenleyicidir (150).

TRAIL reseptörlerinin kaybı, interferon- α ve interlökin-12'nin düzeylerinde artışa ve NF-KB aktivasyonuna neden olduğu bilinmesine rağmen bu reseptörlerin fizyolojik rolü tam olarak netlik kazanmış değildir. Tüm bunlara ek olarak TRAIL primer tümör gelişimine ve metastaza karşı immunosurveyans ile yarışır. Ayrıca TRAIL

otoimmün regülasyona da katılmaktadır. Sistemik Lupus Eritramozis hastalarında TRAIL'in çözülebilir formunun serum düzeyinde artış gözlenmiştir (154).

2.3.6. TRAIL in Duyarlılık ve Direnç Mekanizması

TRAIL apoptozu neredeyse tüm kanser hücrelerinde veya transforme hücrelerde indüklerken normal hücreler TRAIL' e direnç gösterir. TRAIL apoptozu farklı düzeylerde ve farklı sinyal yolları aracılığı ile indüklerken normal hücrelerin TRAIL' e karşı neden dirençli olduğunun altında yatan mekanizma hala belirsizliğini korumaktadır. Kanserli hücrelere oranla, normal hücrelerde decoy reseptörlerin ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğu ileri sürülmüş olsa da decoy reseptörlerin kanser hücreleri ile normal hücreler arasında TRAIL'in duyarlılığının nasıl saptandığı uzun süredir tartışılmaktadır (155).

Death reseptörlerin hipermetilasyonu gibi epigenetik değişiklikler akciğer kanserinde tanımlanmıştır. Death reseptörün ve kaspaz 8'in ekspresyon kaybı TRAIL in apoptozu indüklemesine direnç olarak sonuçlanmıştır. Ashkenazi ve arkadaşları death reseptörlerinin post translasyonel modifikasyonlarının, TRAIL in duyarlılığının modüle edilmesinde rol oynadığını bulmuşlardır (156).

Death reseptörlerin peptidil *O*-glikotransferaz GALNT14 tarafından *O*-glikosilasyonu DR-4 ve DR-5 in toplanmasını TRAIL'in indüklemesiyle hızlandırırken, bu durum kaspaz 8 in aktivasyonuna öncülük eder (157).

GALNT14'ün mRNA ekspresyonu pankreatik karsinoma, akciğer karsinoma ve melanoma hücrelerinde TRAIL in duyarlılığı ile ilintili bulunmuştur (158).

Intrinsik yolak, özellikle tip II hücrelerde TRAIL aracılı apoptoz için esansiyeldir. Proapoptik Bcl-2 aile üyelerinden Bax in aktivasyonu TRAIL aracılı apoptoz için gereklidir, çünkü Bax eksikliği TRAIL'e karşı direnç yol açar (159,160,161).

Antiapoptik Bcl-2 aile üyesi olan Mcl-1 son zamanlarda proapoptik Bcl-2 aile üyesi tBid ile etkileşime girerek TRAIL aracılı apoptozu engel olmasıyla önemli bir rol üstlendiği bulunmuştur (160). TRAIL duyarlılığı c-FLIP, Mcl-1, IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), ve Bcl-xl gibi antiapoptik moleküllerin transaktivasyonu ve NF-KB tarafından regüle edilebilir (162).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE TBG (SS) 2008-10YL kodlu proje olarak desteklenen ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan ve tekrarlayan gebelik kaybı olgularında DR4 gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bu çalışmada, hasta ve kontrol gruplarının oluşturulması Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirildi. Moleküler biyolojik analizler ise Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yapıldı.

Çalışmada, hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerden alınan kanlardan DNA eldesi Miller'in tuz çöktürme yöntemine göre yapıldı (163). Elde edilen DNA'lardan Death Receptor 4 (TNSFR10A) geninin ekzon 3 (Arg141His), ekzon 4 (Thr209Arg) ve ekzon 5 (Glu228Arg) polimorfizmlerine ait gen bölgeleri PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile amplifiye edildikten sonra *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) yöntemi uygulandı. Elde edilen PCR/RFLP ürünleri elektroforez ile görüntülendikten sonra saptanan polimorfizm verileri istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- ◆ Termal Cyclers (Techne Progene, Cambridge, UK)
- ◆ Elektroforez Tankı (Midicell EC-350)
- ◆ Elektroforez Güç Kaynağı (EC-135-90)
- ◆ Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallee, France)
- ◆ Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- ◆ Santrifüj (Nüve NF-800)
- ◆ Etüv (Nüve EN-500)

- ◆ Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- ◆ Vorteks (VELP)
- ◆ Hassas Terazi (AND)
- ◆ Mikropipet Seti (Eppendorf)
- ◆ Elektromanyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)
- ◆ Mikrodalga Fırın (Alaska)
- ◆ Derin Dondurucu (Arçelik-2031D)
- ◆ Buzdolabı (Arçelik-8188 NF)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ◆ EDTA (Sigma E-5134)
- ◆ Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)
- ◆ Sodyum Klorür (Riedel-de Haen)
- ◆ Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma L-5750)
- ◆ Tris Base (Sigma T-6066)
- ◆ Borik Asit (Carlo Erba 302177)
- ◆ Ethidyum Bromide (Sigma E-1510)
- ◆ Orange G (Sigma O-3756)
- ◆ Gliserol (Merck 4091)
- ◆ Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- ◆ Agaroz (LE Prone Basica 051342 PR)
- ◆ Taq DNA Polimeraz (MBI Fermentas EP 0402)
- ◆ BseGI (Fok I) (MBI Fermentas ER0872)
- ◆ Ade I (Dra III) (MBI Fermentas ER1232)
- ◆ Taq I (MBI Fermentas ER0671)
- ◆ Proteinaz K (Sigma P-2308)
- ◆ Gene Ruler 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas SM 0242)
- ◆ 2 mM dNTPmix (MBI Fermentas R0242)
- ◆ 10X PCR Buffer (MBI Fermentas B16)
- ◆ Bidistile Su (Sigma W-3500)

3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.1.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler

Nüklei Lizis Buffer

- Tris-HCl1.576 g
- NaCl23.4 g
- Na₂EDTA.....0.7 g

1 litre distile suya tamamlanıp çözüldükten sonra otoklavda steril edildi ve +4°C’de saklandı.

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi

10 g SDS, 100 ml distile suda çözüldü.

6 M NaCl Çözeltisi

35.5 g NaCl, 100 ml distile suda çözüldü.

TE Buffer

- Tris-HCl0.394 g
- Na₂EDTA.....0.093 g

250 ml distile suya tamamlanıp çözüldükten sonra otoklavda steril edildi ve +4°C’de saklandı.

Proteinaz K

Liyofilize 100 mg proteinaz-K, 10 ml steril distile su ile çözülerek 10 mg/ml’lik konsantrasyona getirildi ve –20 °C’de saklandı.

3.1.3.2. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler

10X TBE (Tris-Borat-EDTA)

- Tris Base108 g

- Borik Asit54.8 g
- Na₂EDTA5.44 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanarak çözüldü.

Elektroforez Yürütme Tamponu

10X TBE Buffer'dan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE içerisine 0.5 µg/ml konsantrasyonunda ethidyum bromide (EtBr) konularak hazırlandı.

Agaroz Jel Çözeltisi (% 3.5'luk)

8 g agaroz, 300 ml 1X TBE Buffer içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde EtBr eklendi.

Orange G Çözeltisi

- Na₂EDTA2 .232 g
- Orange G200 mg

60 ml gliserol ve 40 ml distile sudan oluşan solüsyon içerisinde çözüldü.

3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmaya, hasta grubu olarak klinik açıdan nedeni belirlenemeyen tekrarlayan gebelik kaybı tanısı konmuş ve önceden yapılan periferik kan sitogenetik analiz sonuçlarına göre kromozomal anomalisi olmayan 70 kadın birey ve kontrol grubu olarak sağlıklı ve öyküsünde gebelik kaybı olmayan 70 kadın birey olmak üzere toplam 140 bireyden alınan kan örnekleri dahil edildi.

Hem hasta hem de kontrol grubunu oluşturan bireylere ait bilgiler etik kurallara uygun olarak hazırlanan anket formları kullanılarak alındı. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden her bireyin bilgilendirilmiş onamı alındıktan sonra 7-8 ml periferik kan alınarak 1 ml, % 2'lik EDTA içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu.

3.3.DR4 geni ekson 3, ekson 4 ve ekson 5 polimorfizmlerinin belirlenmesi:

3.3.1. DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden alınan 7-8 ml periferik kan, üzerinde her birey için özel protokol numarası kaydedilen ve içerisinde 1 ml EDTA bulunan 15 ml'lik plastik tüplerde +4 °C'de saklandı. İzolasyon sırasında kros-kontaminasyonu önlemek için her bireyin özel protokol numarasını içeren transfer pipetleri kullanıldı. DNA izolasyonu için aşağıda sıralanan yöntem uygulandı:

1. Periferik kan örnekleri, steril distile su ile 13 ml'ye tamamlandı ve 2-3 dk karıştırılarak homojenize edildi
2. 10 dk 2000 rpm'de santrifüjlendi
3. Santrifüjlenen tüplerin supernatant kısımlarından belirli bir miktar, pelete temas etmemeye özen gösterilerek transfer pipeti ile alınıp atılarak üzerine yeniden steril distile su eklendi ve homojenize edildi
4. 10 dk 2000 rpm'de santrifüjlendi
5. Yukarıdaki işlemler tüm eritrositler parçalanarak supernatant berrak bir görüntü alana kadar tekrarlandı
6. Son santrifügasyon sonrası süpernatant atılarak elde edilen pelet üzerine 3 ml nüklei lizis buffer eklenerek lökositlerdeki DNA'nın serbest hale geçmesi sağlandı
7. Tüplere 200 µl % 10'luk SDS ve 150 µl proteinaz-K eklenerek homojenize edildi
8. Tüpler gece boyu 37 °C'de inkübe edildi
9. İnkübasyon sonrası tüplere 2 ml, 6 M amonyum asetat eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
10. 15 dk 3500 rpm'de santrifüjlendi.
11. Supernatant transfer pipeti ile alınarak başka bir boş tüpe alındı ve üzerine tamamlayacak şekilde soğuk saf etanol (% 99.8) eklenerek DNA'nın yoğunlaşması sağlandı.
12. Yoğunlaşmış görülebilir hale gelen DNA mikropipet ucuyla çekmeden, uca dikkatlice sarılarak içerisinde 500 µl TE buffer bulunan ependorf tüplerine alındı. DNA örneklerinin TE buffer içerisinde çözünüp homojen hale gelebilmesi için tüpler 37 °C'lik etüvde inkübe edildikten sonra moleküler analize kadar +4 °C'de saklandı.

3.3.2. DR4 geni 3, 4 ve 5. ekzonlarına özgül primerlerle amplifikasyon

Death Receptor 4 (TNFSFR10A) geninin ekzon 3 (His141Arg), ekzon 4 (Thr209Arg) ve ekzon 5 (Glu228Ala) polimorfizmleri ayrı ayrı değerlendirildi.

PCR ortamı 500 µl'lik steril bir ependorf tüpünde, thermal cycler'ın kapasitesi doğrultusunda bir örneklik olacak şekilde hazırlandı. Her bir örnek için hazırlanan PCR karışımı aşağıdaki gibidir:

• Bidistile Su	17 µl
• 10X PCR Buffer (without MgCl ₂)	2.5 µl
• 2 mM dNTPmix	2.5µl
• Primer (F)	0,5µl
• Primer (R)	0,5µl
• MgCl ₂	1,5µl
• Taq DNA Polimeraz	0,3µl
• Kalıp DNA	1.0µl
Toplam reaksiyon karışımı hacmi	25 µl

DR4 geni 3, 4 ve 5. eksonların PCR'ı için kullanılan primer dizileri aşağıda verilmektedir:

- DR4 geni ekson 3 His141Arg polimorfizmi için;
Forward 5' - ATC CTC TGG GAA CTC TGT GG-3'
Reverse 5' - TAC CAC TCC CAC CTT CAC TGC-3'
- DR4 geni ekson 4 Thr209Arg polimorfizmi için;
Forward 5' - GGT GGT GAG GAA AGG TCA AG-3'
Reverse 5' - ATG GGG TCA GGG CTG ATA G-3'
- DR4 geni ekson 4 Glu228Ala polimorfizmi için;
Forward 5' - CCC CTG CAG ATA CGA GGA G-3'
Reverse 5' - CAG GAA AAG ACA GGA GTC TCG-3'

DR4 geni ekzon 3'ün amplifiye edilen bölgesinin (230bp) baz dizisi ve primerlerin yerleşimi şekil 3.1'de, ekzon 4'ün amplifiye edilen bölgesinin (220bp) baz dizisi ve primerlerin yerleşimi şekil 3.2'de, ekzon 5'in amplifiye edilen bölgesinin (201bp) baz dizisi ve primerlerin yerleşimi ise şekil 3.3'te verilmektedir.

```
ATCCTCTGGGAACTCTGTGGCAATTCATTCATTGGCTTTTCTCTCCCTTCCCAGGATCTCATAG
ATCAGAA↑CATCCTGGAGCCTGTAACCGGTGCACAGAGGGTGTGGGTTACACCAATGCTTCCAACA
ATTTGTTTGCTTGCCTCCCATGTACAGCTTGTAATCAGGTACAGAATGTGTGGACCTCTTGTCCAG
AGGTGGAGTGAGGGGCAGTGAGGTGGGAGTGGTA
```

Şekil 3.1 Ekzon 3(rs6557634) polimorfizmi için çoğaltılan bölgenin dizisi. FokI kesim enziminin diziyi tanıdığı bölge mavi renkte ve ok işareti ile gösterilmektedir.

```
AAGGTCAAGGGACACGCAGGGAAACACATTCCCAAACCTTGTACTCTGTGCATCAGAT
GAAGAAGAGAGAAGTCCCTGCACCACGACCAGGAACACAGCATGTCAGTG↑CAAACCAGG
AACTTTCCGGAATGACAATTCTGCTGAGATGTGCCGGAAGTGCAGCAGAGGGTGTGAGACAA
CAGCCAAGGGGCTCCAGCAGCCTCAAAGAACCCACAGAAGC
```

Şekil 3.2. Ekzon 4(rs20575) polimorfizmi için çoğaltılan bölgenin dizisi. DraIII kesim enziminin diziyi tanıdığı bölge mavi renkte ve ok işareti ile gösterilmektedir.

```
ATCCACCTGGCCAGCTTTCCATCAAGAGTCCCCCCCCCTCCCTCCCTGTGTGTACCCAG
GTGCCCCAGAGGGATGGTCAAGGTCAAGGATTGTACGCCCTGGAGTGACA↑TCGAGTGTG
TCCACAAAGAATCAGGTACAAAGCCCACTGGGGAAGCCCCAGCTGCAGAGGAGACAGGGA
CCAGCAGCCCGAGACTCCTGTCA
```

Şekil 3.3. Ekzon 5(rs20576) polimorfizmi için çoğaltılan bölgenin dizisi. TaqI kesim enziminin diziyi tanıdığı bölge mavi renkte ve ok işareti ile gösterilmektedir.

DR4 geni 3, 4 ve 5. ekzonlarının polimorfik bölgelerinin ampifikasyonu için uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aşağıda belirtilen protokole göre yapıldı:

1. Yukarıda belirtilen miktarlarda ve her bir ekzon için özgül primerler kullanılarak steril bir ependorf tüp içinde hazırlanan PCR karışımı, üzerinde her bireye ait protokol numarası bulunan 0.5 ml'lik steril ependorf tüplerine eşit miktarlarda (21'er µl) konuldu.

2. Her tüpe, ait olduğu bireyin DNA'sından 1'er µl eklendikten sonra tüpler thermal cycler cihazında (Techne PTC) amplifiye edildi.

Her bir ekzonun amplifikasyonu için uygulanan PCR profilleri aşağıda verilmektedir:

Ekzon 3 (His141Arg) bölgesi için uygulanan PCR profili:

İlk denaturasyon	96°C, 2 dk
Denaturasyon	96 °C, 1,5dk
Bağlanma (annealing)	58 °C, 1,5dk
Uzama (extention)	72 °C, 1,5dk
Son uzama	72 °C, 7dk
Döngü sayısı	35

Ekzon 4 (Thr209Arg) bölgesi için uygulanan PCR profili:

İlk denaturasyon	96°C, 2 dk
Denaturasyon	96 °C, 1,5dk
Bağlanma (annealing)	59 °C, 1,5dk
Uzama (extention)	72 °C, 1,5dk
Son uzama	72 °C, 7dk
Döngü sayısı	35

Ekzon 5 (Glu228Ala) bölgesi için uygulanan PCR profili:

İlk denaturasyon	96°C, 2 dk
Denaturasyon	96 °C, 1,5dk
Bağlanma (annealing)	65 °C, 1,5dk
Uzama (extention)	72 °C, 1,5dk
Son uzama	72 °C, 7dk
Döngü sayısı	35

3.3.3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analizi

DR4 gen bölgelerindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde ekzon 3 için BseGI (FokI), ekzon 4 için Ade I (DraIII) ve ekzon 5 için TaqI restriksiyon enzimleri kullanıldı. Bu enzimlerin optimum aktivasyon gösterdikleri tamponlar ise sırasıyla FokI

için 1X Buffer Tango [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mMKCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.5mg/ml BSA], DraIII için 1X Buffer G [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mMKCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA] ve TaqI için 1X Buffer TaqI [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mMKCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA] tamponlarıdır.

DR4 geni 3, 4 ve 5 ekzonları için hazırlanan kesim reaksiyonu karışımları aşağıda verilmektedir:

Ekzon 3 için RFLP karışımı:

- dH₂O.....9.5 µl
- Buffer BseGI.....2.5 µl
- BseGI.....0.2 µl

Ekzon 4 için RFLP karışımı:

- dH₂O.....9.5 µl
- Buffer Ade I.....2.5 µl
- Ade I.....0.2 µl

Ekzon 5 için RFLP karışımı:

- dH₂O.....9.5 µl
- Buffer Taq I.....2.5 µl
- Taq I.....0.2 µl

Hazırlanan bu reaksiyon karışımı vortekslendikten sonra 20 örneğe 12'şer µl olacak şekilde bölündü ve çok kısa bir süre mikrosantrifüjlendikten sonra, BseGI enzimi ile kesilen örnekler 55°C' de 4-5 saat, Ade I enzimi ile kesilen örnekler 37°C' de 1 gece, Taq I enzimi ile kesilen örnekler 65°C' de 4-5 saat e edildi. İnkübasyon sonrasında tüm örnekler % 3'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu ve jel görüntüleme sistemi ile genotipler belirlendi.

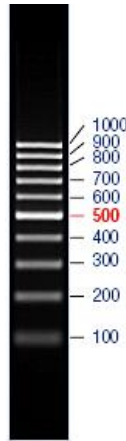
3.3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Amplifiye edilen ve RFLP uygulanan PCR ürünlerinin uzunluğunu belirlemek için aşağıdaki prosedüre göre hazırlanan agaroz jel elektroforezi uygulandı.

Her iki polimorfizm için de 8 g agaroz ve 300 ml 1X TBE solüsyonu bir beher içerisine konulup, mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar ısıtıldı. Daha sonra elektromanyetik karıştırıcıda yaklaşık 200 dev/dk, 15-20 dk biraz soğuyana kadar karıştırıldı. Karıştırma işlemi devam ederken 25 µl, 10 mg/ml'lik EtBr eklendi. Jel uygun ısıya düşünce, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine dikkatlice döküldü. Bu işlem sırasında özellikle jelde hava kabarcığı kalmamasına ve EtBr son derece kanserojen bir madde olduğu için jelin buharıyla mümkün olduğu kadar temas etmemeye dikkat edildi. Jel tamamen katılaştıktan sonra, dikkatlice taraklardan ayrılıp elektroforez tankına yerleştirildi.

PCR ile amplifiye edilen örneklerin her birine 10'er µl Orange-G çözeltilisi eklenip birkaç saniye mikrosantrifüjde 3500 rpm'de çevrildi.

Bu işlemi takiben her bir örnek bir mikropipet ile elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırayla bırakıldı. Ayrıca tek bir kuyucuğa da 4 µl marker eklendi. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak elektroforez cihazı, güç kaynağından 120 volt akım geçecek şekilde ayarlandıktan sonra çalıştırıldı ve örnekler yaklaşık 50-55 dk yürütüldü. PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi sırasında, moleküler ağırlık markerı olarak 1 µl, Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Fermantas) kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Gene Ruler 100bp DNA Ladder

3.3.5. Genotiplendirme

PCR ürünlerinin yürütüldüğü elektroforez jeli, jel görüntüleme sisteminde 260 nm dalga boyundaki UV ışıktaki görüntüleri. UV ışıktaki görünür hale gelen DNA bantlarının büyüklükleri marker ile karşılaştırılarak saptandı

DR-4 geninin ekzon 3 polimorfizmi için yapılan elektroforez sonucunda gözlenen bantların uzunlukları 230bp, 160bp, 70bp olarak belirlendi. Aşağıdaki tabloda bant bölgelerinin genotipleri gösterilmektedir (çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Ekzon 3 için görülen genotipler.

DR4 geni ekzon 3	Homozigot (yabanıl tip)	Heterozigot	Homozigot (mutant tip)
230	GG	-	-
230,160,70	-	GA	-
160,70	-	-	AA

DR-4 geninin ekzon 4 polimorfizmi için yapılan elektroforez sonucunda gözlenen bantların uzunlukları 220bp, 164bp, 56bp olarak belirlendi. Aşağıdaki tabloda bant bölgelerinin genotipleri gösterilmektedir (çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Ekzon 4 için görülen genotipler.

DR4 geni ekzon 4	Homozigot (yabanıl tip)	Heterozigot	Homozigot (mutant tip)
220	-	-	GG
220,164,56	-	CG	-
164,56	CC	-	-

DR-4 geninin ekzon 5 polimorfizmi için yapılan elektroforez sonucunda gözlenen bantların uzunlukları 201bp, 110bp, 91bp olarak belirlendi. Aşağıdaki tabloda bant bölgelerinin genotipleri gösterilmektedir (çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Ekzon 5 için görülen genotipler.

DR4 geni ekzon 5	Homozigot (yabani tip)	Heterozigot	Homozigot (mutant tip)
210	-	-	CC
210,110,91	-	AC	-
110,91	AA	-	-

3.4. İstatistiksel Analizler:

Death Receptor-4 geninin ekzon 3 (arg141his), ekzon 4 (thr209arg), ekzon 5 (glu228ala) polimorfizimleri ile nedeni belirlenemeyen tekrarlayan gebelik kayıpları arasındaki istatistiksel ilişkinin belirlenmesi amacıyla uygulanan istatistiksel testler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapıldı.

Yaş bakımından hasta ve kontrol grupları arasında farklılık olup olmadığı Independent Samples t test ile incelendi. Hastalık ile genotiplerin arasındaki ilişki ki-kare testi ile incelendi. Genotipler bakımından grupların Hardy-Weinberg dengesi kontrol edildi. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verildi.

İstatistik analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapıldı. İstatistik analizlerde $p < 0,05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Death Receptor-4 geninin ekzon 3 (Arg141His), ekzon 4 (Thr209Arg), ekzon 5 (Glu228Ala) polimorfizmlerinin Tekrarlayan Gebelik Kaybı ile ilişkisinin araştırıldığı bu çalışmada, çalışmanın deney grubunu Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniklerinde nedeni belirlenmeyen tekrarlayan gebelik kaybı tanısı konmuş, yaş ortalaması 29,0429 olan 70 kadın birey oluşturmaktadır. Kontrol grubunu ise yaş ortalaması 30,8857 olan sağlıklı şekilde doğum yapmış 70 kadın birey oluşturmaktadır.

DR-4 geninin her üç polimorfizmi için genotiplendirme yapılırken 70 kontrol ve 70 tekrarlayan gebelik kaybı olan olmak üzere toplam 140 kişiden oluşan araştırma popülasyonundaki her bireyin elektroforez sonuçları görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

4.1. Death Receptor-4 Geni Ekson 3 *his141arg* Polimorfizm Genotiplerinin Tekrarlayan Gebelik Kaybı İle İlişkisi

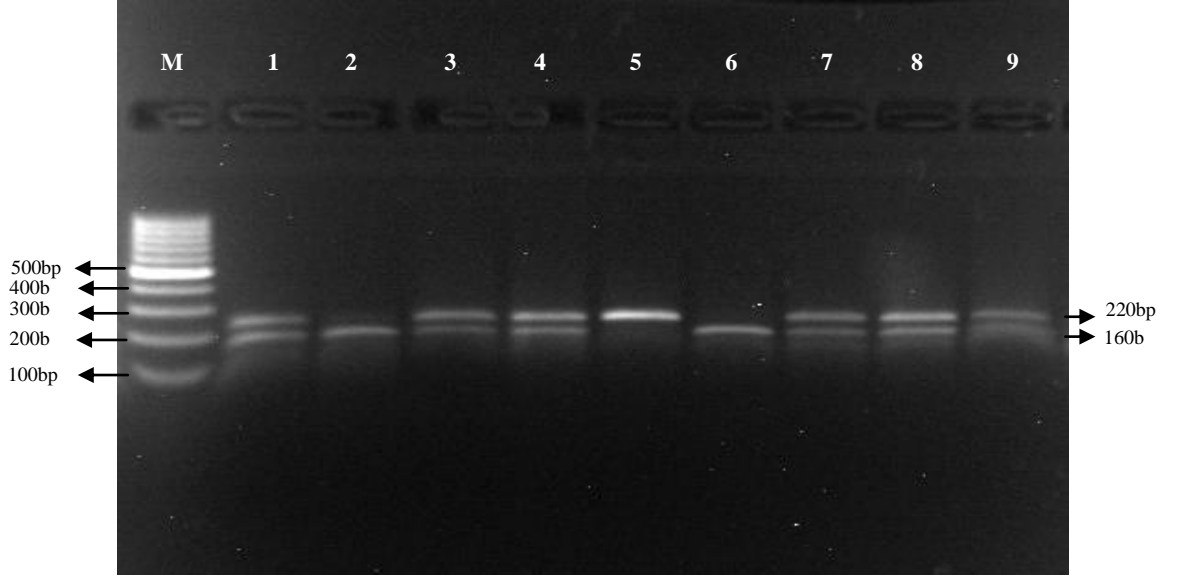
Death Receptor-4 geninin 3. ekzonu için yapılan genotipleme sonucunda 422. nükleotitte bir değişim saptandı. G → A dönüşümü olan ve DR-4 geninin ekstraselüler kısmında, 141. kodonda Arginin aminoasitinin Histidin aminoaitine değişimi ile sonuçlanan bu varyasyon, bir missense değişim olarak belirlendi. FokI kesim enzimi ile yapılan RFLP analizi sonucunda 230 bp'lik PCR amplifikasyon ürünü ya hiç kesilmedi (yabanıl tip), ya da eğer her iki allel de etkilenmişse 160 ve 70bp'lik iki küçük fragmana ayrıldı.

DR-4 geni ekzon 3 (*his141arg*) polimorfizmine ait bulgular hasta ve kontrol gruplarında incelendi. Elektroforz sonuçlarına göre genotipler belirlendi (şekil 4.1-4.2). 70 bireyden oluşan hasta grubunda 14 bireyin GG polimorfizmine (yabanıl tip), 35 bireyin GA polimorfizmine (heterozigot), 21 bireyin AA polimorfizmine (homozigot) sahip oldukları belirlendi. 70 bireyden oluşan kontrol grubu incelendiğinde, 13 bireyin GG polimorfizmine, 40 bireyin GA polimorfizmine, 17 bireyin AA polimorfizmine sahip olduğu belirlendi (Çizelge 4.1)

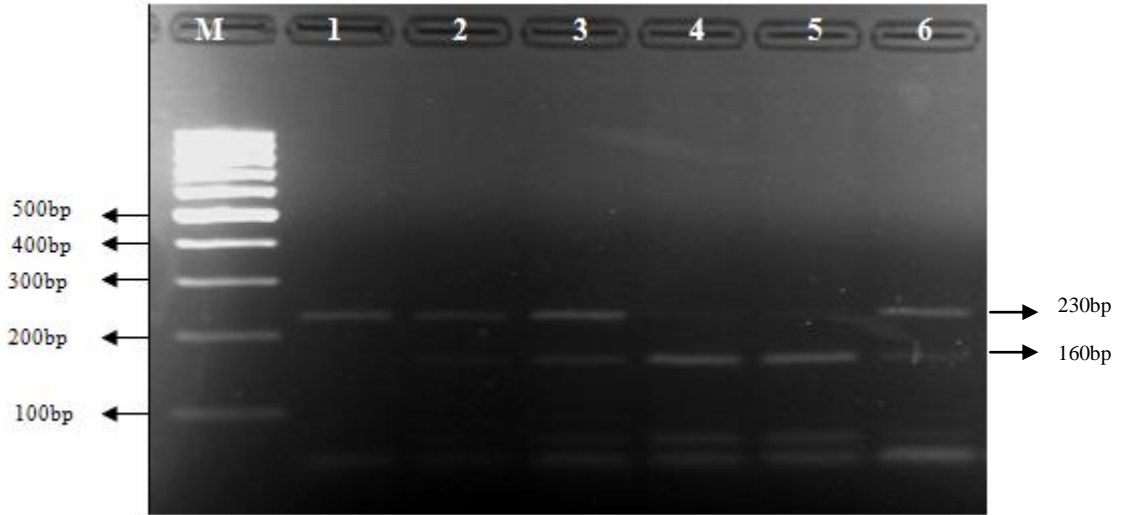
Çizelge 4.1. DR-4 geni 3.ekzon bölgesi (his141arg) için tekrarlayan gebelik kaybı olgu grubu (H) ve kontrol grubuna(K) ait genotipler.

No	Genotipler					
	G/G		G/A		A/A	
	H	K	H	K	H	K
1			+			+
2	+			+		
3				+	+	
4	+			+		
5	+			+		
6			+	+		
7			+	+		
8				+	+	
9				+	+	
10				+	+	
11			+	+		
12			+	+		
13			+	+		
14			+			+
15				+	+	
16			+	+		
17	+	+				
18					+	+
19			+	+		
20				+	+	
21			+	+		
22			+	+		
23				+	+	
24	+			+		
25				+	+	
26			+	+		
27		+			+	
28					+	+
29		+	+			
30			+	+		
31			+			+
32			+	+		
33					+	+
34					+	+
35				+	+	

No	Genotipler					
	G/G		G/A		A/A	
	H	K	H	K	H	K
36			+			
37		+	+			
38					+	+
39				+	+	
40		+	+			
41			+	+		
42			+	+		
43	+			+		
44	+			+		
45			+			+
46					+	+
47				+	+	
48			+	+		
49			+	+		
50			+	+		
51			+	+		
52			+	+		
53		+	+			
54	+			+		
55	+			+		
56			+	+		
57				+	+	
58	+	+				
59	+					+
60	+	+				
61			+			+
62			+			+
63			+			+
64	+			+		
65		+	+			
66		+	+			
67		+	+			
68					+	+
69	+			+		
70					+	+



Şekil 4.1. DR-4 geni ekson 3 (arg141his) polimorfizminin hasta grubuna ait genotiplerin elektroforez sonrası fotoğrafı. 1, 3, 4, 7, 8, 9 numaralı örnekler GA (heterozigot) genotipine sahip bireyler, 2 ve 6 numaralı örnekler AA (homozigot mutant tip) genotipine sahip bireyler, 5 numaralı örnek GG (homozigot yabancı tip) genotipine sahip birey.



Şekil 4.2. DR-4 geni ekson 3 (arg141his) polimorfizminin kontrol grubuna ait genotiplerin elektroforez sonrası fotoğrafı. 2, 3, 6 numaralı örnekler GA genotipine sahip bireyler, 4 ve 5 numaralı örnekler AA genotipine sahip bireyler, 1 numaralı örnek GG genotipine sahip birey.

4.2. Death Receptor-4 Geni Ekson 4 *thr209arg* Polimorfizmi Genotiplerinin Tekrarlayan Gebelik Kaybı İle İlişkisi

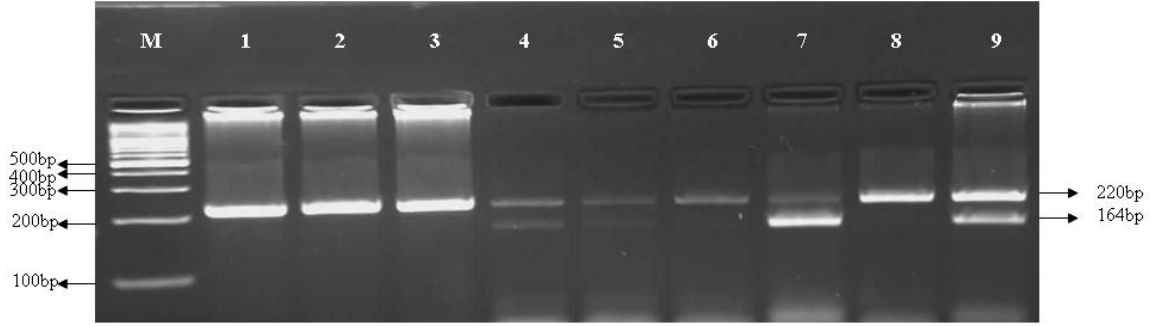
Death Receptor-4 geninin ekzon 4 için yapılan genotipleme sonucunda 626. nükleotitte bir değişim saptandı. C → G dönüşümü olan ve DR-4 geninin ekstraselüler kısmında, 209. kodonda Threonin aminoasitinin Arginin aminoasitine değişimi ile sonuçlanan bu varyasyon, bir missense değişim olarak belirlendi. DraIII kesim enzimi ile yapılan RFLP analizi sonucunda 220 bp'lik PCR amplifikasyon ürünü ya hiç kesilmedi (homozigot), ya da 64 ve 56bp'lik iki küçük fragmanlara ayrıldı(yabanıl tip).

DR-4 geni ekzon 4 (*thr209arg*) genotipine ait bulgular incelendi. Hasta ve kontrol gruplarına ait genotipler elektroforez ile belirlendi (şekil 4.3-4.4). 70 bireyden oluşan hasta grubunda 11 bireyin CC polimorfizmine, 40 bireyin CG polimorfizmine, 19 bireyin GG polimorfizmine sahip oldukları belirlendi. 70 bireyden oluşan kontrol grubu incelendiğinde, 9 bireyin CC polimorfizmine, 36 bireyin GC polimorfizmine, 25 bireyin GG polimorfizmine sahip olduğu belirlendi (çizelge 4.2).

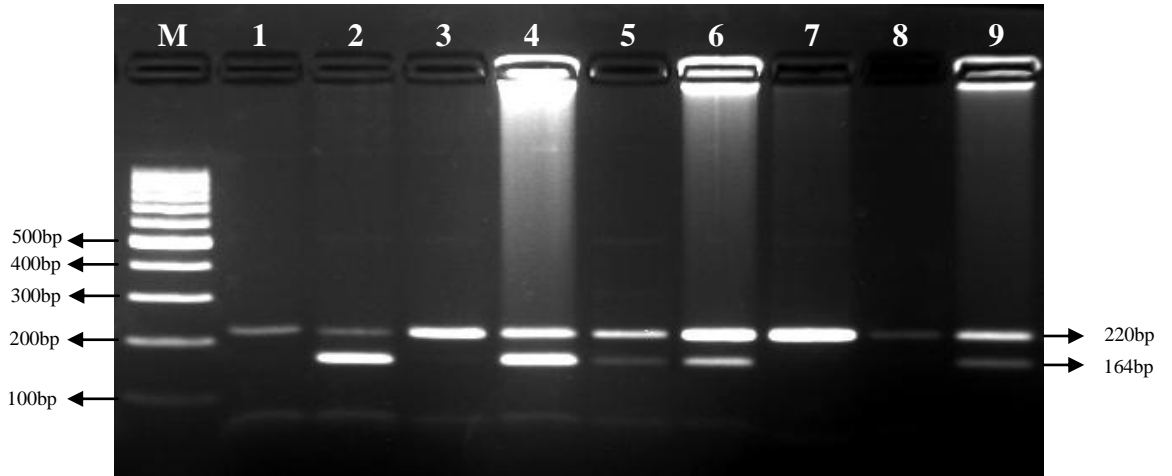
Çizelge 4.2. DR-4 geni 4.ekzon bölgesi (Thr209Arg) için tekrarlayan gebelik kaybı olgu grubu (H) ve kontrol grubuna(K) ait genotipler.

No	Genotipler					
	C/C		C/G		G/G	
	H	K	H	K	H	K
1					+	+
2					+	+
3		+			+	
4					+	+
5			+			+
6				+	+	
7			+	+		
8				+	+	
9	+					+
10				+	+	
11			+	+		
12			+	+		
13			+			+
14					+	+
15				+	+	
16				+	+	
17		+	+			
18					+	+
19				+	+	
20				+	+	
21				+	+	
22				+	+	
23			+	+		
24	+	+				
25					+	+
26			+	+		
27		+			+	
28					+	+
29		+	+			
30				+	+	
31					+	+
32				+	+	
33					+	+
34					+	+
35				+	+	

No	Genotipler					
	C/C		C/G		G/G	
	H	K	H	K	H	K
36			+	+		
37				+	+	
38					+	+
39				+	+	
40		+			+	
41	+					+
42			+	+		
43	+			+		
44			+	+		
45			+	+		
46				+	+	
47					+	+
48			+			+
49			+	+		
50				+	+	
51			+			+
52			+	+		
53		+	+			
54	+			+		
55	+					+
56	+			+		
57			+	+		
58				+	+	
59	+			+		
60	+	+				
61					+	+
62					+	+
63			+			+
64	+			+		
65				+	+	
66					+	+
67		+			+	
68					+	+
69				+	+	
70					+	+



Şekil 4.3. DR-4 geni ekzon 4 (thr209arg) polimorfizminin kontrol grubuna ait genotiplerin elektroforez sonrası fotoğrafı. 4, 5, 9 numaralı örnekler CG genotipine sahip bireyler, 1, 1, 2, 3, 6, 8 numaralı örnekler GG genotipine sahip bireyler, 7 numaralı örnek CC genotipine sahip birey.



Şekil 4.4. DR-4 geni ekzon 4 (thr209arg) polimorfizminin hastalara ait genotiplerin elektroforez sonrası fotoğrafı. 4, 5, 6, 9 numaralı örnekler CG genotipine sahip bireyler, 3 ve 7 numaralı örnekler GG genotipine sahip bireyler, 2 numaralı örnek CC genotipine sahip birey.

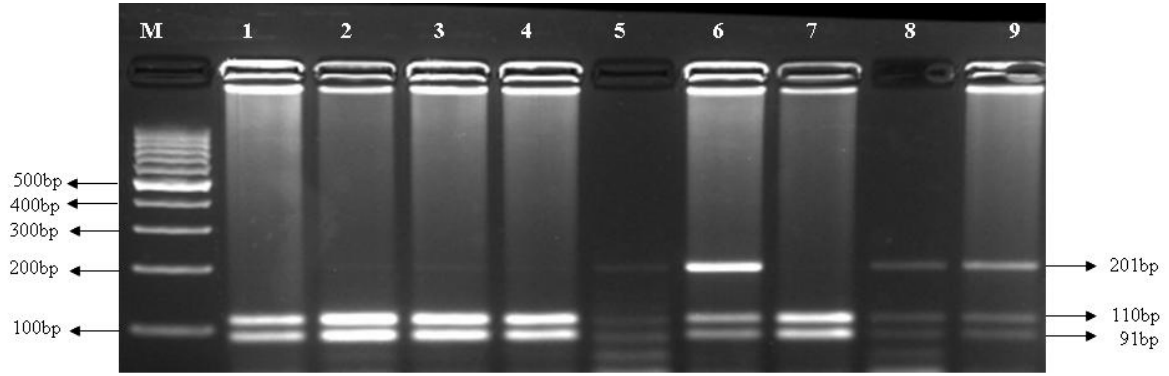
4.3. Death Receptor-4 Geni Ekson 5 *glu228ala* Polimorfizmi Genotiplerinin Tekrarlayan Gebelik Kaybı İle İlişkisi

Death Receptor-4 geninin ekzon 5 için yapılan genotipleme sonucunda, 683. nükleotitte bir değişim saptandı. A → C dönüşümüne neden olan ve DR-4 geninin ekstraselüler kısmında, 228. kodonda Glutamin aminoasitinin Alanin aminoasitine değişimi ile sonuçlanan bu varyasyon, bir missense değişim olarak belirlendi. TaqI kesim enzimi ile yapılan RFLP analizi sonucunda 201 bp'lik PCR amplifikasyon ürünü ya hiç kesilmedi (homozigot), ya da 110 ve 91bp'lik iki küçük fragmana ayrıldı(yabanıl tip). Death Receptor-4 geni ekzon 5 (*glu228ala*) genotipine ait bulgular incelendiğinde, 70 bireyden oluşan hasta grubunda 46 bireyin AA polimorfizmine, 22 bireyin AC polimorfizmine, 2 bireyin CC polimorfizmine sahip oldukları belirlendi. 70 bireyden oluşan kontrol grubu incelendiğinde, 38 bireyin AA polimorfizmine, 30 bireyin AC polimorfizmine, 2 bireyin CC polimorfizmine sahip olduğu belirlendi (Çizelge 4.3).

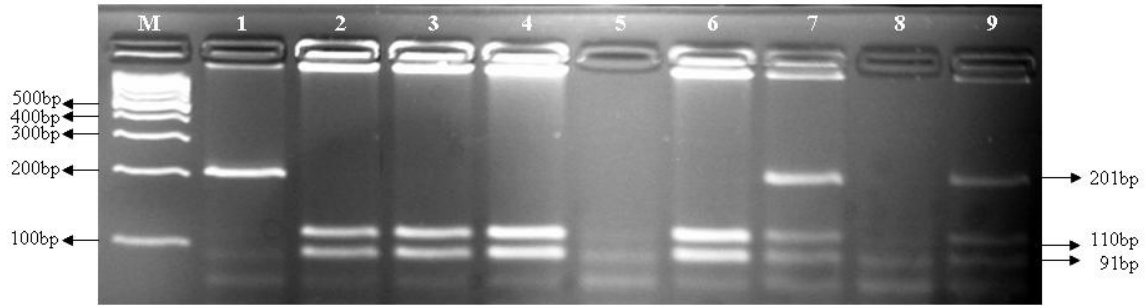
Çizelge 4.3. DR-4 geni 5.ekzon bölgesi (Glu228Ala) için tekrarlayan gebelik kaybı olgu grubu (H) ve kontrol grubuna(K) ait genotipler.

No	Genotipler					
	C/C		A/C		A/A	
	H	K	H	K	H	K
1					+	+
2		+	+			
3			+			+
4				+	+	
5			+			+
6					+	+
7				+	+	
8				+	+	
9		+			+	
10					+	+
11				+	+	
12					+	+
13					+	+
14			+	+		
15				+	+	
16			+			+
17					+	+
18			+	+		
19			+			+
20				+	+	
21				+	+	
22				+	+	
23	+			+		
24			+			+
25			+	+		
26					+	+
27					+	+
28			+			+
29				+	+	
30					+	+
31			+			+
32			+	+		
33			+	+		
34				+	+	
35					+	+

No	Genotipler					
	C/C		A/C		A/A	
	H	K	H	K	H	K
36		+		+	+	
37					+	+
38					+	+
39		+		+	+	
40					+	+
41					+	+
42					+	+
43					+	+
44					+	+
45		+		+	+	
46			+			+
47		+	+	+		
48		+		+	+	
49					+	+
50			+			+
51	+			+		
52					+	+
53			+			+
54	+					+
55	+					+
56	+					+
57	+			+		
58			+			+
59				+	+	
60				+	+	
61					+	+
62			+			+
63			+	+		
64				+	+	
65				+	+	
66			+			+
67					+	+
68				+	+	
69				+	+	
70			+			+



Şekil 4.5. DR-4 geni ekzon 5 (glu228ala) polimorfizminin kontrol grubuna ait genotiplerin elektroforez sonrası fotoğrafı. 1, 2, 3, 4, 7 numaralı örnekler AA genotipine sahip bireyler, 6, 8, 9 numaralı örnekler AC genotipine sahip bireyler, 5 numaralı örnek CC genotipine sahip birey.



Şekil 4.6. DR-4 geni ekzon 5 (glu228ala) polimorfizminin hasta grubuna ait genotiplerin elektroforez sonrası fotoğrafı. 2, 3, 4, 6, 8 numaralı örnekler AA genotipine sahip bireyler, 7 ve 9 numaralı örnekler AC genotipine sahip bireyler, 1 numaralı örnek CC genotipine sahip birey.

4.4 İstatistiksel Bulgular

4.4.1. Ekzon 3 İçin İstatistiksel Bulgular

Yapılan istatistiksel analiz sonucu yaş bakımından hasta ve kontrol grupları arasında farklılık olup olmadığı belirlendi, $p=0.180$ (çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Kontrol ve hasta gruplarının yaş ortalamaları.

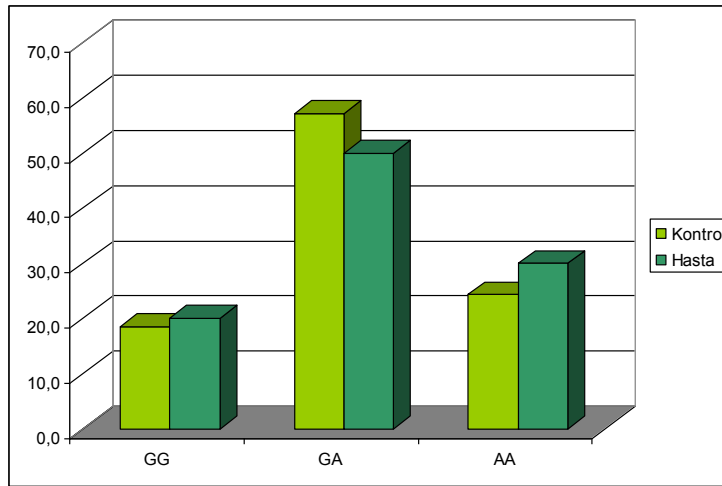
	GRUP	N	Ortalama	Standart Sapma
YAŞ	kontrol	70	30,8857	7,38495
	hasta	70	29,0429	8,74011

Yapılan istatistiksel incelemede; kontrol ve hasta gruplarının ekzon 3 (arg141his) polimorfizmi açısından Hardy Weinberg dengesinde olduğu saptandı. Kontrol grubu için $p=0.220$, hasta grubu için $p=0,933$.

Yapılan istatistiksel inceleme sonucunda, ekzon 3 polimorfizmi ile hastalık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı, $p=0,673$ (çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Ekzon 3 için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansları.

DR-4 Ekzon 3 (arg141his) Genotipleri	GRUP			
	Kontrol		Hasta	
	N	Oran (%)	N	Oran (%)
GG	13	18.6	14	20.0
GA	40	57.1	35	50.0
AA	17	24.3	21	30.0



Şekil.4.7. Hasta ve kontrol gruplarının ekzon 3 açısından genotip frekanslarının grafiksel gösterimi.

4.4.2. Ekzon 4 İçin İstatistiksel Bulgular

Yapılan istatistiksel incelemede kontrol ve hasta gruplarının Hardy Weinberg dengesinde olduğu saptandı. Kontrol grubu için $p=0,476$, hasta grubu için $p=0,225$.

Yapılan istatistiksel analiz sonucu ekzon 4 ile hastalık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır, $p=0,012$.

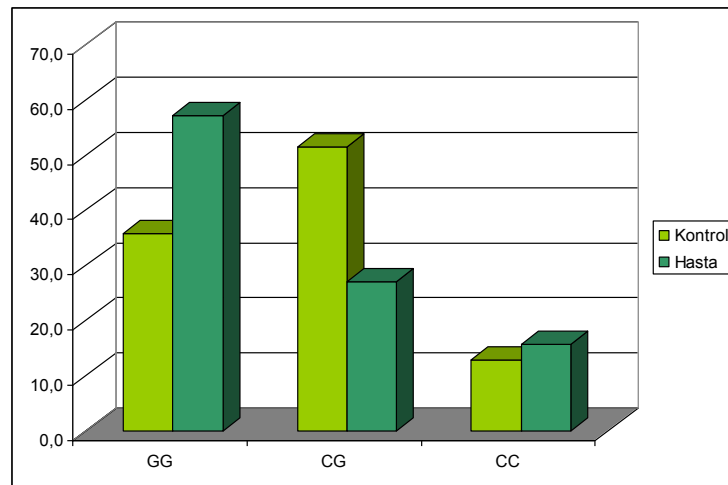
Kontrol grubunda; GG genotipinin görülme oranı %35,7 (25/70), hasta grubundakine göre %57,1 (40/70) istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktür, $p=0,009$.

Kontrol grubunda; CG genotipinin görülme oranı %51,4 (36/70), hasta grubundakine göre %27,1 (19/70) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir, $p=0,002$.

Kontrol grubunda; CC genotipinin görülme oranı %12,9 (9/70), hasta grubundaki orana göre % 15,7 (11/70) benzerdir, $p=0,629$ (Çizelge 4.7) (Şekil 4.7).

Çizelge 4.6. Ekzon 4 için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansları.

DR-4 Ekzon 4 (thr209arg) Genotipleri	GRUP			
	Kontrol		Hasta	
	N	Oran (%)	N	Oran (%)
GG	25	35.7	40	57.1
CG	36	51.4	19	27.1
CC	9	12.9	11	15.7



Şekil 4.8. Hasta ve kontrol gruplarının ekzon 4 açısından genotip frekanslarının grafiksel gösterimi.

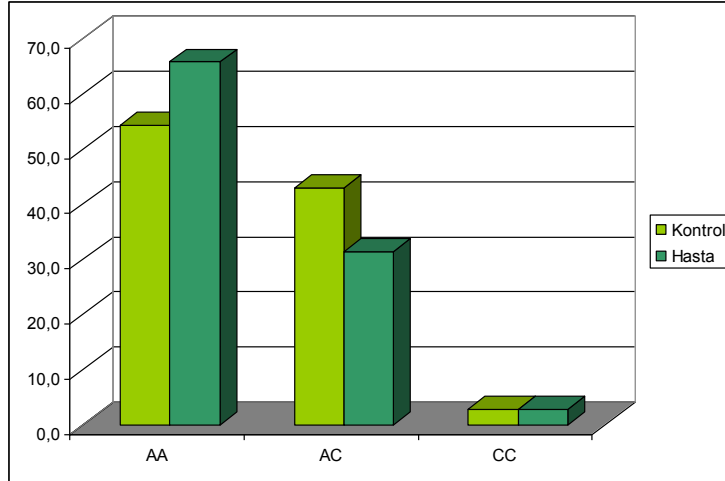
4.4.3. Ekzon 5 İstatistiksel Bulgular

Yapılan istatistiksel incelemeye göre, kontrol ve hasta gruplarının Hardy Weinberg dengesinde olduğu saptandı (kontrol grubu için $p=0,166$, hasta grubu için $p=0,743$).

Yapılan istatistiksel incelemeye göre ekzon 5 polimorfizmi ile hastalık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0,368$) (çizelge 4.8) (şekil 4.8).

Çizelge 4.7. Ekzon 5 için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansları.

DR-4 Ekzon 5 (thr209arg) Genotipleri	GRUP			
	Kontrol		Hasta	
	N	Oran (%)	N	Oran (%)
AA	38	54.3	46	65.7
AC	30	42.9	22	31.4
CC	2	2.9	2	2.9



Şekil 4.9. Hasta ve kontrol gruplarının ekzon 5 açısından genotip frekanslarının grafiksel gösterimi.

5. TARTIŞMA

Tekrarlayan gebelik kayıpları; birbirini izleyen en az iki ya da daha fazla gebeliğin 20. gebelik haftasından önce ve 500 gr fetal ağırlıktan düşük ağırlıkta spontan olarak sonlanması olup, gebeliğin en sık rastlanan komplikasyonlarından biridir (8).

Klinik olarak tanısı konulmuş tekrarlayan gebelik kayıp insidansı, %0.5-1'dir ve obstetrikte etiyolojik ve prognostik faktör tayininde en yetersiz kalınan konulardan biri olmaya devam etmektedir. Çünkü tekrarlayan gebelik kayıplarının %68'inde hala etken saptanamamaktadır (9,10). İster sporadik isterse habituel olsun, beklenen bir bebeğin kaybı, bir çift için oldukça sıkıntılı ve üzücü bir durumdur. Hasta bunu takiben tanının ne olduğunu araştırmaya, bundan sonraki gebeliklerinin ne olacağını öğrenmeye çalışır ve böyle bir durumun tekrarlanmaması için iyi bir tıbbi destek ister. Ancak tekrarlayan gebelik kaybı olgularında klinik araştırmalar sorunun nedenini çok nadir ortaya koyabilmektedir (11). Sonuç olarak tekrarlayan gebelik kayıpları, nedenleri tam olarak açığa kavuşmamış, nitelik kazanmamış bir sorun olarak çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin karşısına çıkmaya devam etmektedir.

Tekrarlayan gebelik kayıplarının nedenleri arasında, genetik aberasyonlar özellikle de kromozomlarda meydana gelen yapısal ya da sayısal bozukluklar önemli bir yer tutmaktadır. Kromozomal anomaliler gebelik kaybı örneklerinin %50-70'inde gözlenmektedir. Ancak diğer etiyolojik nedenler de dahil edildiğinde tekrarlayan gebelik kaybı olgularının yarıdan fazlası hala açıklanamamış değildir. Bu durum tüm dünyada gizemini koruyan bir klinik sorun olarak birçok araştırmaya konu olmaktadır.

Bu araştırmanın çıkış noktası klinik tüm anormallikler ekarte edildikten sonra, kromozomal açıdan hiçbir anomali taşımayan gebelik kaybı örneklerinin ve yine kromozomal açıdan normal ebeveynlerin etkilendiği tekrarlayan gebelik kaybı olgularının altında yatabilecek, olası diğer genetik nedenlerden apoptik mekanizmanın, tekrarlayan gebelik kaybı olguları üzerinde etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

Apoptozis, fizyolojik veya programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır ve genellikle tek tek hücreleri etkiler. Birçok fizyolojik veya patolojik durumda ortaya çıkar ve apoptozda inflamatuvar yanıt söz konusu değildir. B ve T hücrelerinin negatif

seleksiyonu, kendilerine ait antijenleri tanıyan immün kompetan hücrelerin yıkımı, hormon bağımlı dokuların hormon yokluğunda involüsyonu gibi bir çok fizyolojik olayda rol alır (7,13).

Apoptozun kontrolündeki anormallikler ise başta kanser olmak üzere otoimmün hastalıklar ve dejeneratif hastalıkların oluşum mekanizmaları içinde yer almaktadır (12,13,14).

Apoptozun tetiklenmesi ya hücre içi sinyal ileti yollarının ya da ölüm reseptörlerinin (death receptor) uyarılması gibi hücre dışı etkenlerle sağlanmaktadır. İster hücre dışı ister hücre içi etkenler tarafından tetiklensin, apoptozda temel mekanizma hücre proteinleri aspartat rezidülerinden parçalayan proteazlar yani kaspazlar ile hücre yıkımının gerçekleştirilmesidir. Bu durumda apoptozda işlev gören temel proteinler kaspazlar, adaptör proteinler, tümör nekroz faktör (TNF-R) ve reseptörleri, Bcl-2, bax ve bak gibi proteinler olarak sıralanabilir (11,12).

Hücrede apoptotik sürecin uyarılmasını sağlayan birçok yüzey reseptörü eksprese edilmektedir. Bu reseptörlerden biri olan TNF-R ailesi reseptörler, tümör nekrozu ile ilgili apoptozu uyaran ligand (TRAIL) reseptörleri olan Death Receptor-4(DR4) ve Death Receptor-5 (DR5) reseptörlerini de içine alan geniş bir reseptör ailesidir ve bu ailenin üyelerinin pleiotropik etkisi vardır (13,14).

Tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabileceği düşünülen apoptotik mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalara literatürde kısıtlı sayıda rastlanmakta, apoptoz mekanizmasında güçlü bir rolü olan TRAIL geni reseptörlerinden DR-4 geni ile nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olguları arasında bir ilişkinin var olup olmadığına ilişkin hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Tüm bunların yanı sıra TRAIL geni ve reseptörleri apoptotik mekanizmada yer alan önemli genler olmalarından dolayı, kanser araştırmalarında büyük ilgi gören genler olup, birçok kanser çeşidi ile bu genler arasındaki bağlantılar bilim adamları tarafından sıkça masaya yatırılmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmektedir:

Tanja Langsenlehner ve arkadaşları (2007), DR-4 Glu228Ala polimorfizminin prostat kanserinde metastaz için artmış bir risk faktörü olabileceğini göstermişlerdir (164).

Pankreas kanserli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada ise DR-4 -392G>T polimorfizminin artmış pankreas kanser riski ile ilgili olduğu Meilin Wang ve arkadaşları (2008) tarafından gösterilmektedir (165).

Bernd Frank ve arkadaşları (2005), meme kanserli hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada DR-4 geninin Thr209Arg ve Glu228Ala polimorfizmlerinin meme kanseriyle herhangi bir bağlantısı olmadığını göstermektedir (166).

DR-4 geninin lokalize olduğu 8. kromozomun 8p21-22 bölgesi allelik kaybın akciğer kanserine yol açtığı Wistuba ve arkadaşları (1999) tarafından gösterilmektedir (167).

Bu bilgiden yola çıkarak Michael J. Fisher ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (2001), DR-4 geninin C626G ve G422A polimorfizmlerinin akciğer kanserli hastalarda dikkate değer düzeyde artmış olduğu gösterilmektedir (168).

Kolorektal kanseri ile DR-4 geni C626G ve A683C polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada Bernd Frenk ve arkadaşları (2006), A683C polimorfizmi ile kolorektal kanseri arasında bir ilişkinin olmadığını ancak C626G polimorfizminde heterozigot allelin hastalıkla kuvvetli bir ilişkisinin olduğunu göstermektedir.

Peter Horak ve arkadaşları DR-4 geni G422A, C626G ve A1322G polimorfizmleri ile over kanseri arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını göstermektedir (169).

Markus J. Dechant ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada kemik tümörleri ile DR-4 geni C626G polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu böylece osteosarkom oluşumunda bu polimorfizmin bir risk faktörü olabileceği gösterilmektedir (170).

Apoptotik mekanizmada önemli bir düzenleyici olarak görev alan DR-4 genine ait polimorfizmler yukarıda da belirtildiği gibi bir çok kanser türü ile ilişkilendirilmektedir. Aşağıda ise literatürde kısıtlı olarak yer aldığı belirtilen açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularında apoptotik mekanizmalar ile ilgili birkaç çalışma özetlenmektedir:

Bir apoptik protein olan TNF- α 'nın fare modellerinde tekrarlayan gebelik kayıplarını arttırdığı Chaouat ve arkadaşları (1990) tarafından gösterilmektedir. TNF- α

inhibitörlerinin, tekrarlayan gebelik kayıplarına sahip olgularda canlı doğum oranını arttırdığı ise Wingen ve ark (2008) tarafından saptanmıştır (171).

Xue-Wen Yu ve arkadaşları (2007), erken gebelik kaybı olan Çinli kadınlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bir TNF aile üyesi olan TNFR1 gen polimorfizmlerinden 1. ekzondaki CCA-CCG ve promotor bölgesindeki AGA-AGC polimorfizmlerinin erken gebelik kayıplarıyla ilgili olmadığı gösterilmektedir(172).

Rosemary J. ve arkadaşları (2007), gebelik sırasında uterin spiral arterlerinin yeniden düzenlenmesinde endotelial ve düz kas hücrelerinin kaybının altında yatan mekanizmanın TRAIL tarafından tetiklenen apoptozis ile ilgili olup olmadığını araştırdılar. Araştırmanın sonunda TRAIL ve reseptörlerinin trofoblastlarda ve insan aortik düz kas hücrelerinde eksprese olduğunu flow sitometri ve immunohistokimya yöntemleriyle gösterdiler. Bu çalışmaya göre, trofoblastlar tarafında üretilen TRAIL' in düz kas hücrelerinde apoptozise neden olduğu ve böylece gebelik sırasında spiral arter yeniden düzenlenmesinde düz kas hücre kaybında, TRAIL merkezli apoptozis mekanizmasının yer aldığı gösterilmektedir (173)

Teresa A. Phillipis (1999), insan plasentasında TRAIL ve reseptörlerinin eksprese olduğunu göstermektedir. Ancak bizim kurduğumuz hipoteze tam zıt olarak kurdukları hipotezlerinde, TRAIL ve reseptörlerinin FasL ile işbirliği yaparak programlı hücre ölümü tanımına ters olarak aktive edilmiş hücre ölümü olarak adlandırılan bir oluşumla lenfosit proliferasyonunu kısıtladığı ve böylece gebeliğe karşı gerçekleşecek immünolojik yanıtı plasentayı koruduğunu göstermektedir (174)

Apoptozisde açık bir görevi olan ve bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün Arg→Pro polimorfizmi nedeni belirlenmemiş tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda Detleif Pietrowski ve arkadaşları (2004) tarafından araştırıldı ve nedeni belirlenmemiş tekrarlayan gebelik kayıplarıyla bu polimorfizm arasında önemli bir bağlantı bulundu (175).

Tüm bu literatür ışığında nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olguları ile apoptozu, intrinsik yolakla tetikleyen TRAIL geni reseptörlerinden DR-4 geni Ag141His (rs6557634), Thr209Arg (rs20575), Glu228Ala (rs20576) polimorfizmleri arasında bir ilişkinin var olup olmadığı bu araştırmanın hipotezini oluşturmaktadır.

Yaşları 20 ile 42 arasında değişen nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda DR-4 gen polimorfizmlerinin saptanması amacıyla ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR yöntemi kullanıldı. Amplifiye olan gen bölgesindeki tek nükleotidlik değişimler ise RFLP yöntemi ile saptandı. Her bir örnek elektroforez yöntemi ile agaroz jel üzerinde yürütüldükten sonra 240nm dalga boyundaki UV görüntüleme cihazı kullanılarak genotipler belirlendi. Elde edilen verilerin anlamlılıkları istatistiksel olarak test edildi.

DR-4 geni polimorfizminin nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularıyla olan ilişkileri araştırılırken PCR ve RFLP yöntemlerinin tercih edilmesinin sebebi; tek nükleotidlik değişimleri (SNP) saptamak açısından araştırmanın yapıldığı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında her iki yöntemin de oldukça oturmuş ve başarılı yöntemler olarak kullanılmasıdır. Ayrıca yapılan literatür taramasında DR-4 genine ait tek nükleotidlik değişimlerin yani polimorfizm çalışmalarının, hemen hemen tüm araştırmalarda PCR ve RFLP yöntemleri tercih edilerek başarı ile yürütüldüğü gözlemlendi.

Tekrarlayan gebelik kayıplarında, DR-4 geni Arg141His polimorfizmini belirlemek için gerçekleştirilen PCR ve RFLP çalışmalarımız sonucunda hasta grubundan 14 bireyin GG genotipine, 35 bireyin GA genotipine, 21 bireyin AA genotipine sahip olduğu saptandı. Kontrol grubundan ise 13 bireyin GG genotipine, 40 bireyin GA genotipine, 17 bireyin AA genotipine sahip olduğu saptandı. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması nedeni ile Arg141His polimorfizmi ile nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı gözlemlendi ($p=0,673$). Elde edilen veriler, over kanserli hastalar üzerinde yapılan çalışmada Peter Horak ve arkadaşları (2005) tarafından desteklenmektedir. Marita S. Ve arkadaşları (2005), baş-boyun kanseri olguları ile yaptıkları araştırmada, Arg141His polimorfizminin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdiler. DR-4 reseptörünün liganda bağlandığı bölgede bulunan 3. ekzonundaki Arg141His polimorfizmi ile ilgili çelişkili bulgular olması nedeni ile bu polimorfizmin apoptotik mekanizmayı gerçekten etkileyip etkilemediği ile ilgili kesin bir bilgiye henüz ulaşılmış değildir (173,174).

Tekrarlayan gebelik kayıplarında, DR-4 geni Thr209Arg polimorfizmini belirlemek için gerçekleştirilen PCR ve RFLP çalışmalarımız sonunda hasta grubundan 40 bireyin GG genotipine, 19 bireyin CG genotipine, 11 bireyin CC genotipine sahip olduğu belirlendi. Kontrol grubunda ise 25 bireyin GG genotipine, 36 bireyin CG genotipine, 9 bireyin CC genotipine sahip olduğu belirlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda GG genotipi açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olması nedeni ile GG genotipinin nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularında anlamlı olduğunu göstermektedir ($p=0.009$). Thr209Arg polimorfizminin Bernard Frank ve arkadaşları (2006), tarafından kolorektal kanserli hastalarda yaptıkları çalışma ile heterozigot genotipinin kolorektal kanser riskini dikkat çekici derecede düşürdüğünü gösterilmesi ile bulgumuz desteklenmektedir. Chen B. Ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları bir meta-analizde, DR-4 genine ait 3 polimorfizm analiz edildi. Bu meta-analizde toplam 9 araştırma incelendi. Bunlardan 8'inde 2941 adet kanser vakası ve 3358 adet kontrol grubu üzerinde yapılan çalışmalarla C626G polimorfizmi, 3 çalışmada toplam 736 kanser vakası ve 668 kontrol grubu ile yapılan çalışmalarla A1322G polimorfizmi ve 3 çalışmadan da toplam 1550 kanser vakası ve 2257 kontrol grubu ile yapılan çalışmalarla A683C polimorfizmi tanımlandı. Her üç polimorfizmde tüm kanser tipleri ile arasında güçlü bir ilişki olduğu tanımlandı. Özellikle C626G polimorfizmde heterozigot genotipin (CG genotipi) kontrol gruplarında hastalara göre önemli derecede yüksek olduğu istatistiksel olarak gösterildi. Bu meta-analiz bulguları bizim elde ettiğimiz bulgularla birebir örtüşmektedir. Markus J. Dechant ve arkadaşları (2004), kemik tümörü örneklerinde ve hücre hatlarında yaptıkları çalışmada DR-4 geninin 3, 4 ve 5. ekzonlarındaki polimorfizmleri araştırdılar. Bunlardan 4. ekzondaki Thr209Arg polimorfizminin bu çalışmada gösterildiği gibi hastalıkla anlamlı derecede ilişkili olduğunu gösterdiler. Ancak, Bernard Frank ve arkadaşları (2005), meme kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada, Thr209Arg polimorfizminin hastalıkla bir ilişkisinin olmadığını göstermektedir. Bu bulgu, bizim çalışmamızda elde edilen veriler ile çelişmektedir. Hazra A. ve arkadaşları (2003), meme kanserli hastalarda yaptıkları çalışmalarında meme kanseri ile Thr209Arg polimorfizmi arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu gösterdiler (164,169).

Tüm bu araştırmalara genel olarak bakıldığında Thr209Arg polimorfizmi araştırmacılar tarafından ilgi gören bir polimorfizm olarak karşımıza çıkmaktadır.

Ancak hala polimorfizmin bozulmuş apoptotik süreçle olan ilişkilerini tanımlamada çelişen çalışmalar karşımıza çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar ve bizim bulgularımız doğrultusunda DR-4 geninin ekstrasellüler alanında ligand-reseptör interaksiyonunun gerçekleştiği bölgede bulunan 4. ekzondaki bu polimorfizmin, reseptörün fonksiyon kaybına uğramasına ya da yanlış bir fonksiyon kazanmasına neden olduğunu ve bu nedenle tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Tekrarlayan gebelik kayıplarında, DR-4 geni Glu228Ala polimorfizmini belirlemek için gerçekleştirilen PCR ve RFLP çalışmalarımız sonucunda hasta grubundan 46 bireyin AA genotipine, 22 bireyin AC genotipine, 2 bireyin CC genotipine sahip olduğu saptandı. Kontrol grubundan ise 38 bireyin AA genotipine, 30 bireyin AC genotipine, 2 bireyin CC genotipine sahip olduğu saptandı. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması nedeni ile Glu228Ala polimorfizmi ile nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı gözlemlendi ($p=0,368$). Bernar Frank ve arkadaşları (2006), kolorektal kanserli hastalarda yaptıkları bir araştırmada Glu228Ala polimorfizminin hastalıkla ilişkisinin olmadığını göstermektedir. Bu bulgu bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Ancak, Stephan Wolf ve arkadaşları (2006), kronik lenfositik lösemi, mantle hücreli lenfoma, prostat kanseri, baş-boyun kanseri ve meme kanseri olguları üzerinde yaptıkları çalışmada 395 tümörlü dokuda bu allel değişimini saptadıklarını gösterdiler. Tanja Lengsenlehner ve arkadaşları (2008), prostat kanseri üzerinde yaptıkları araştırmalarında bu polimorfizmin radyoterapi gören hastalarda radyoterapi sonrası metastaz için bir risk faktörü olabileceğini gösterdiler. Glu228Ala polimorfizminin apoptotik mekanizmada önemli bir değişim yaratıp yaratmadığı, yapılan farklı çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmiş olması nedeni ile hala netliğe tam anlamıyla kavuşmamış bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır (164,172,174).

Tüm bu bulgular ışığında, nedeni açıklanamayan ve çocuk sahibi olmak isteyen çiftleri olumsuz yönde etkileyen tekrarlayan gebelik kayıplarının, apoptotik mekanizmalar ile bir ilgisinin olup olmadığı araştırıldı.

Apoptotik mekanizmada önemli bir düzenleyici reseptör gen olan DR-4'ün 4. ekzonunda yer alan Arg141His ve Glu228Ala polimorfizmlerinin nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularıyla arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki

saptanmazken, Thr209Arg polimorfizminin gebelik kayıpları ile anlamlı bir ilişkisinin olduğu gösterildi. DR-4 reseptör geninin ekstrasellüler bölgesinde yer alan ve ligand-reseptör etkileşiminde rol alan 4. ekzonda hasta grubunda GG genotipinin (homozigot mutant genotip) dikkat çekici düzeyde yüksek, kontrol grubunda ise CG genotipinin (heterozigot genotip) dikkat çekici düzeyde yüksek olduğunun ifade edildi. Elde edilen bulgular doğrultusunda klinik açıdan bir tanı konulamayan ve kromozomal bir anomalisi bulunmayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularında DR-4 geni, Thr209Arg polimorfizminin reseptörün liganda bağlanma bölgesinde bir fonksiyon bozukluğuna neden olabileceğini böylece anne adaylarında apoptotik mekanizmanın, beklenen normal fizyolojik işlev/işlevlerinin kaybı ile gebeliğin kaybı yönünde katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Nedeni açıklanamayan, kromozomal açıdan herhangi bir düzensizliği bulunmayan tekrarlayan gebelik kaybı tanısı konmuş 70 kadın ve 70 kontrol grubu üzerinde Death Receptor-4 geni Arg141His, Thr209Arg ve Glu228Ala polimorfizmleri araştırıldı. Elde edilen verilere göre yapılan istatistiksel analizler, Arg141His ve Glu228Ala polimorfizmlerinin tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olmadığını gösterdi ($p=0,673$, $p=0,368$). Thr209Arg polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında ise anlamlı bir ilişki olduğu belirlendi ($p=0,009$).

Nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olguları, tüm dünyada aydınlatılmayı bekleyen önemli bir sağlık sorunudur. Bunun nedeni ise, tekrarlayan gebelik kayıplarının yarıdan fazlasında belirgin bir neden gösterilememesidir. Tekrarlayan gebelik kaybı olguları üzerinde birçok araştırma yapıyor olmasına rağmen apoptotik yolda meydana gelebilecek problemlerin tekrarlayan gebelik kayıplarına yol açıp açmadığı konusunda çok nadir araştırma yapıldığı gözlenmektedir.

Bu çalışmada apoptotik yolda önemli bir görevi olan DR-4 geninin ekzon 3, ekzon 4, ekzon 5 bölgelerindeki polimorfizmlerin tekrarlayan gebelik kaybına neden olup olmadığı araştırıldı. Ekzon 4 bölgesindeki Thr209Arg polimorfizminin hastalıkla arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu belirlendi. Thr209Arg polimorfizminin bulunduğu ekzon 4 bölgesi genin ekstraselüler bölgesinde reseptör ligand etkileşiminde rol alan bir bölgedir. Bu bölgede Thr209Arg polimorfizminin bir fonksiyon bozukluğuna neden olabileceği ve apoptotik mekanizmayı olması gereken işleyişinden dışarı çıkararak gebeliğin sonlanmasında etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, tekrarlayan gebelik kaybı olgularında, apoptotik süreçte yer alan diğer efektör moleküllerdeki moleküler değişimlerinde araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. **Preston FE., Rosendaal FR.** Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *The Lancet*. **1996** ;348: 913-916.
2. **Lee RM, Silver RM.** Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Semin Reprod Med* **2000** ; 18:443-440.
3. **Hızel N.** Apoptoz (Programlanmış-Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*. **1997**; 6:196-7.
4. **Elizabeth S, Henson JB, Johnston SB, Gibson C.** The role of TRAIL death receptors in the treatment of hematological malignancies. *Leukemia & Lymphoma*. **2008**; 49 :27 – 35.
5. **Ishibashi M, Ohtsuki T.** Studies on search of bioactive natural products targeting TRAIL signaling leading to tumor cell apoptosis. *Med.Res.Rev*. **2008**; 285: 688-714.
6. **Sayers TJ, Murphy WJ.** Combining proteasome inhibition with TNF-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL) for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. **2006**; 551: 76-84.
7. **Frank B, Hemminki K, Wirtenberger M, Bermejo JL, Bugert, Klaes R, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Bartram CR, Burwinkel B.** The rare ERBB2 variant Ile654Val is associated with an increased familial breast cancer risk. *Carcinogenesis*. **2005**; 26: 643–647.
8. **Miller JF, Williamson E, Glue J.** Fetal loss after implantation: a prospective study. *Lancet*. **1980**; 2:554-556.
9. **Silver RM, Branch DW.** Sporadic and recurrent pregnancy loss. In: Reece AE, Hobbins J, ed. *Clinical Obstetrics: The Fetus and the Mother*. Oxford: Blackwell Publishing; **2007**:143–160.
10. **Frias AEJ, Luikenaar RA, Sullivan AE.** Poor obstetric outcome in subsequent pregnancies in women with prior fetal death. *Obstet Gynecol*. **2004**;104:521–526.
11. **Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U.** The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* **2003**; 189: 397–400.
12. **Porter TF, Scott JR.** Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2005**; 19:85-101.
13. **Tulppala M, Bjorses UM, Stenman UH, WahlstromT, Ylikorkala O.** Luteal phase defect in habitual abortion . progesterone in saliva. *Fertil Steril* **1991**;56:41-44.
14. **Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L.** An informative protocol for the investigation of the recurrent miscarriage: Preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod* **1994**;9:1328-1332.
15. **Prummel MF, Wiersinga WM,** Thyroid autoimmunity and miscarriage. *Eur J Endocrinol* **2004**; 150: 751–55.
16. **Rushworth FH, Backos M, Rai R., Chilcott IT, Baxter N, Regan L.** Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. *Hum Reprod* **2000**; 15: 1637–39.
17. **Glinoe D, Riahi M, Grun JP, Kinthaert J.** Risk of subclinical hypothyroidism in pregnant women with asymptomatic autoimmune thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab* **1994**; 79:197-204.

- 18. Rushworth FH, Backos M., Rai R., Chilcott IT, Baxter N, Regan L.** Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. *Hum Reprod* **2000**; 15:1637-9.
- 19. Esplin MS, Branch DW, Silver R, Stagnaro-Green A.** Thyroid autoantibodies are not associated with recurrent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* **1998**; 179:1583-6.
- 20. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG.** Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med* **1988**; 319: 1617-23.
- 21. Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J, Siddiqi TA.** Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* **1994**; 84: 515-20.
- 22. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG.** HICHD-DIEP Study: incidence of spontan abortion among normal women with insulindependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl JMed* **1988**; 319:1617-1623.
- 23. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L.** Polycystic ovaries and recurrent miscarriage a reappraisal. *Hum Reprod* **2000**; 15: 612-615.
- 24. Jakubowicz DJ, Seppala M, Jakubowicz S.** Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**; 86:1126-33.
- 25. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L.** Polycystic ovaries and recurrent miscarriage areappraisal. *Hum Reprod* **2000**; 15:612-5.
- 26. Hirahara F, Andoh N, Sawai K, Hirabuki T, Uemura T, Minaguchi H.** Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. *Fertil Steril* **1998**; 70: 246-252.
- 27. Dlugi AM.** Hyperprolactinemic recurrent spontaneous pregnancy loss: A true clinical entity or a spurious finding? *Fertil Steril* **1998**; 70:253-5.
- 28. Gurbuz B, Yalti S, Ficicioglu C, Ozden S, Yildirim G, Sayar C.** Basal hormone levels in women with recurrent pregnancy loss. *Gynecol Endocrinol* **2003**; 17:317-21.
- 29. Makino T, Hara T, Oka C, Toyoshima K, Sugi T, Iwasaki K, Umeuchi M, Iizuka R.** Survey of 1120 Japanese women with a history of recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **1992**;44:132.
- 30. Leible S, Munoz H, Walton R, Sabaj V, Cumsille F, Sepulveda W.** Uterine artery blood flow velocity waveforms in pregnant women with mullerian duct anomaly: a biologic model for uteroplacental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol* **1998**;178:1048.
- 31. Homer HA, Li TC, Cooke ID.** The septate uterus: A review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril* **2000**; 73:1-14.
- 32. Woolf RB, Allen WM.** Concomitant malformation.The frequent simultaneous occurrence of congenital malformations of the reproductive and urinary tracts.*Obstet Gynecol.* **1953**; 2:236-265.
- 33. Rock JA, Jones HW Jr.** The double uterus associated with an obstructed hemivagina and ipsilateral renal agenesis. *Am J Obstet Gynecol.* **1980**; 138:339-342.
- 34. Propst AM, Hill JA.** Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* **2001**;18:341.

- 35. Homer HA, Li TC, Cooke ID.** The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril* **2000**;73:1.
- 36. Nevvbold RR.** Diethylstilbestrol and environmental estrogens influence the developing female reproductive system. *Endocrine Disruptors*. CRC press, **1999**; 39-55 pp.
- 37. Sangvai M, Thie J, Hofmann GE.** The effect of intrauterine diethylstilbestrol exposure on ovarian reserve screening. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1997**; 177:568-572.
- 38. Goldberg JM, Falcone T.** Effect of diethylstilbestrol on reproductive function. *Fertil Steril* **1999** ;72:1.
- 39. Vollenhoven BJ, Lawrence AS, Healy DL.** Uterine fibroids: a clinical review. *Br J Obstet Gynaecol* **1990**;97:825.
- 40. Li TC, Mortimer R, Cooke ID.** Myomectomy: a retrospective study to examine reproductive performance before and after surgery. *Hum Reprod* **1999**;14: 1735-1740.
- 41. Patton PE, Novy MJ.** Reproductive potential of the anomalous uterus. *Semin Reprod Endocrinol* **1998**;66:217.
- 42. Al-Inany H.** Intrauterin adhesions. An update. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2001**;80:986.
- 43. Fausett MB, Brach DW.** Autoimmunity and pregnancy loss. *Seminars Reprod Endocrinol* **2000**;18:379.
- 44. Rai RS, Regan L, Clifford K, Pickering W, Dave M, Mackie I.** Antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. *Hum Reprod* **1995**;10:2001-2005.
- 45. Cowchock FS, Reece EA, Balaban D, Branch DW, Plouffe L.** Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *Am J Obstet Gynecol* **1992**;166:1318-1323.
- 46. Empson M, Lassere M, Craig JC, Scott JR.** Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: a systematic review of therapeutic trials. *Obstet Gynecol* **2002**; 99:135-144.
- 47. Pratt DE, Kaberlein G, Dudkiewicz A, Karende V, Gleicher N.** The association of antithyroid antibodies in euthyroid nonpregnant women recurrent first trimester abortions in the next pregnancy. *Fertil Steril* **1993**; 60:1001-1005.
- 48. Clifford K, Flanagan AM, Regan L.** Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod* **1999**; 14:2727-30.
- 49. Michou VI, Kanavaros P, Athanassiou V, Chronis GB, Stabamas S, Tsilivakos V.** Fraction of the peripheral blood concentration of CD56+/CD16-/CD3- cells in total natural killer cells as an indication of fertility and infertility. *Fertil Steril* 2003; 80(Suppl 2):691-7.
- 50. McIntyre JA, Faulk WP, Nichols-Johnson VR, Taylor CG.** Immunologic testing and immunotherapy in recurrent spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* **1986**;67:169.
- 51. Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JW, Haines RF.** Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol* **1981**;141: 987.
- 52. Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, Van der Ven H, Van der Ven K.** The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* **2001**; 7:373-8.

- 53. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Omu A, Al-Shamali E, Ashkanani L.** Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Hum Reprod* **2001**; 16:2219-26.
- 54. Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, Gogorza S, Testa R.** Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. *Am J Reprod Immunol* **2004**; 52:36-41.
- 55. Adelberg A, Kuller J.** Thrombophilias and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol Survey* **2002**;57:703-709.
- 56. Sanson BJ, Friederich PW, Simioni P.** The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C-, and protein S-deficient women. *Thromb Haemost* **1996**; 75:387-8.
- 57. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK.** Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: A meta-analysis. *Fertil Steril* **2000**; 74:1196-9.
- 58. Pauer HU, Voigt-Tschirschwitz T, Hinney B, et al.** Analyses of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand.* **2003**;82: 942-947.
- 59. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I.** Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* **2003**;361:901-908.
- 60. Regan L, Rai R.** Thrombophilia and pregnancy loss. *J Reprod Immunol* **2002**;55:163-180
- 61. Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N.** Increased frequency of genetic thrombophilia in woman with complications of pregnancy. *New Engl J Med* **1999**;340:9-13.
- 62. Ralph SG, Rutherford AJ, Wilson JD.** Influence of bacterial vaginosis on on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. *BMJ* **1999**;319:220-223.
- 63. Summers PR.** Microbiology relevant to recurrent miscarriage. *Clin Obstet Gynecol* **1994**;37:722-729.
- 64. Armstrong BG, McDonald AD, Sloan M.** Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Public Health* **1992**;82:85.
- 65. Harlap S, Shiono PH.** Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. *Lancet* **1980**;173.
- 66. Srisuphan W, Bracken MB.** Caffeine consumption during pregnancy and association with late spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* **1986**;154:14.
- 67. Gardella JR, Hill JA.** Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* **2000**;18:407.
- 68. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW.** Retinoic acid embryopathy. *New Engl J Med* **1985**;313:837.
- 69. Wapner RJ, Lewis D.** Genetics and metabolic causes of stillbirth. *Sem Perinat.* 2002;26:70–74.
- 70. Geraedts JPM.** Chromosomal anomalies and recurrent miscarriage. *Infertil Reprod Med Clin North Am.* **1996**; 7: 677–688.
- 71. Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P.** Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat Diagnosis.* **2005**;25: 894–900.
- 72. Byrne J, Warburton D, Kline J.** Morphology of early fetal deaths and their chromosomal characteristics. *Teratology.* **1985**; 32: 297–315.

- 73. Eiben B, Bartel I, Bahr-Porsch S.** Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet.* **1990**; 47: 656–663.
- 74. Hassold T.** A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* **1980**;32: 723–730.
- 75. Tharapel AT, Tharapel SA, Bannerman RM.** Recurrent pregnancy losses and parental chromosome abnormalities: a review. *Br J Obstet Gynaecol.* **1985**;92: 899–914.
- 76. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L.** Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* **2003**;101:1229–1235.
- 77. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L.** Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Gene.* **2004**;41: 241–248.
- 78. Chui DH, Wayne JS.** Hydrops fetalis caused by alpha-thalassemia: an emerging health care problem. *Blood.* **1998**;91: 2213–2222.
- 79. Ganea D.** Apoptosis and the immune response. *Bioscience* **1996**;113: 46705.
- 80. Bylinsky G.** Cell suicide: the birth of a mega- market. *Fortune* **1995**; 131:75-6.
- 81. Israels LG, Israels ED.** Apoptosis. *The Oncologist* **1999**; 4: 332-9.
- 82. Nagata S.** Fas ligand-induced apoptosis. *Ann. Rev. of Genetics* **1999**; 33: 29-55.
- 83. Kidd VJ.** Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annual Review of Physiology* **1998**; 60:533-73.
- 84. Hampton MB, Orrenius S.** Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* **1998**; 8: 1-5.
- 85. Thompson EB.** The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annual Review of Physiology* **1998**; 60:575-600.
- 86. Budihardjo I, Oliver HLM.** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1999**; 15:269-90.
- 87. Cosman, D.** A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* **1994**; 12: 440–455.
- 88. Van PL, Abbas, AK.** Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr. Opin. Immunol*,**1996**; 8: 355–361.
- 89. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, Ashkenazi A.** Identification of a ligand for the death-domaincontaining receptor Apo3. *Curr. Biol* **1998**;8: 525–528.
- 90. Wiley SR, SchooleyK, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Davis Smith T, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG.** Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **1995**;3: 673–682.
- 91. Marsters SA, Pitti RM, Donahue CJ, Ruppert S, Bauer KD, Ashkenazi A.** Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr. Biol* **1996**; 6: 750–752.

- 92. Amakawa R, Hakem A, Kundig TM, Matsuyama T, Simard JJ, Timms E, Wakeham A, Mittrucker HW, Griesser H, Takimoto H, Schmits R, Shahinian A, Ohashi P, Penninger JM, Mak TW.** Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell* **1996**;84: 551–562.
- 93. Hess S, Engelmann H.** A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J. Exp. Med.* **1996**; 183: 159–167.
- 94. Bergamo A, Bataille R, Pellatdeceunynck C.** CD40 and CD95 induce programmed cell death in the human myeloma cell line XG2. *Br. J. Haematol.* **1997**; 97: 652–655.
- 95. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology* **1998**; 60:619-42.
- 96. Renehan AG, Booth C, Potten CS.** What is apoptosis, and why is it important? *Br. Med. Journal.* **2001**; 322: 1536-8.
- 97. Mahmood Z, Shukla Y.** Death receptors: Targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* **2010**; 316: 887-99.
- 98. Hart S.** The drama of cellular death. *Bioscience* **1994**; 44:451-5.
- 99. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B.** Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**; 266 :699-717.
- 100. Kaipia A, Hsueh AJW.** Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology* **1997**; 59:349-63.
- 101. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** *Molecular Biology of The Cell.* New York: Garland Publishing. **1994**: 1076:613-169.
- 102. Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: Signaling and Modulation. *Science* **2001**; 281:1305-8 1998.
- 103. Levine AJ, Momand J, Finlay CA.** The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **1991**; 351; 453-6.
- 104.** CDKN1A, CDKN1b, CDKN1C [www.dsi.univ-paris.fr/genatlas].
- 105. Benchimol S, Lamb P, Crawford LW, Sheer D, Sowst TB, Bruns GA, Peacock J.** Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somatic Cell Molecular Genetic.* **1985**; 115: 505-10.
- 106. Chen X.** The p53 family: Same response, Different signals? *Molecular Medicine Today.* **1999**; 5: 387-92.
- 107. Vousden KH, Lu X.** Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2002**; 2: 594–604.
- 108. Chao DT, Korsmeyer SJ.** BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* **1998**; 16:395-419.
- 109. Hetts SW.** To die or not to die. *JAMA* **1998**; 279:300-7.
- 110. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ.** Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest* **2000**; 117:1771-7.
- 111. Büyükgebiz O, Caferler JS.** Apoptoz. Sendrom **2001**; 13:102-7.

- 112. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE.** Viruses and Apoptosis. *Annual Review of Microbiology* **1999**; 53: 577-628.
- 113. Johnson DE.** Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* **2000**; 14: 1340-44.
- 114. Eichhorst ST, Krammer PH.** Derangement of apoptosis in cancer. *The Lancet* **2001**; 358: 345-6.
- 115. King KL, Cidlowski JA.** Cell cycle regulation and apoptosis. *Ann Rev.Phys.* **1998**;60: 601-17.
- 116. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ.** Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS)* **2001**; 98: 13884-8.
- 117. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM.** Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry* **2000**; 69: 217-45.
- 118. Adams C, Totpal K, Lawrence D, Marsters S, Pitti R, Yee S.** Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5. *Cell Death Differ* **2008**; 15: 751-761.
- 119. Gong, B, Almasan A.** Genomic Organization and Transcriptional Regulation of Human Apo2/TRAIL Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **2000**; 278: 747-752.
- 120. Manzo F, Nebbioso A, Miceli M, Conte M, De Bellis F, Carafa V, Franci G, Tambarco PF, Altucci L.** TNF-related apoptosis inducing ligand: Signaling of a smart molecule. *Int J. Biochem Cell Biol.* **2009**; 413: 460-6.
- 121. Baetu, TM, Kwon, H, Sharma, S, Grandvaux, N, Hiscott, J.** Disruption of NF-kappaB signaling reveals a novel role for NF-kappaB in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression. *J. Immunol.* **2001**; 167, 3164-3173.
- 122. Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., et al.** Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat. Med.* **2005**; 11 : 77-84.
- 123. Ashkenazi A, Herbst RS.** To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest.* **2008**; 118: 1979-1990.
- 124. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG.** The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* **1997**; 7: 813-820.
- 125. Emery JG, McDonnell P, Brigham-Burke M, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR.** Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **1998**; 273: 14363-14367.
- 126. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA.** Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* **1999**;104: 155-162.
- 127. Blankenstein T.** The role oftumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17: 180-186.
- 128. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P.** TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol.***2000**; 2: 241-243.

- 129. Burns TF, El-Deiry WS.** Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach. *J Biol Chem.* **2001**; 276: 37879–37886.
- 130. Holoch PA, Griffith T.** TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies. *Eur J. Pharmacol.* **2006**; 625:63-72.
- 131. Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A. de Vos AM.** Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell.* **1999**; 4: 563–571.
- 132. Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V. M.** The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science.* **1997**; 276:111–113.
- 133. Chawla-Sarkar M., Bae S.I., Reu F.J., Jacobs B.S, Lindner D.J., Borden E.C.** Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **2004**; 11: 915–923.
- 134. Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., Hood, L.** Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kB pathway. *Immunity.* **1997**; 7: 812–830.
- 135. Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D. V.** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cel.* **1995**; 1 81: 495–504.
- 136. Dechant.M.J., Fellenberg.J., Scheuerpflug. C.G, Ewerbeck V., Debatin K.M.** Mutation analysis of the apoptotic 'Death Receptors' and the adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in osteosarcoma tumor samples and osteosarcoma cell lines. *J Biol Chem.* **2004**;413:217-220.
- 137. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T . et al.** BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* **2001**; 8: 705–711.
- 138. Zhang L, Fang B.** Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Therapy* **2005**;12:228–237.
- 139. Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, Gil-Go´mez G, Brady HJ.** Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* **2006**; 281: 5750–5759.
- 140. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Kramer PH, Peter ME, Tschopp J.** Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature.* 1997; 386:517-520.
- 141. Kataoka T.** The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol.* **2005**; 25: 31–58.
- 142. Khanbolooki S, Nawrocki ST, Arumugam T, Andtbacka R, Pino MS, Kurzrock R et al.** Nuclear factor-kappaB maintains TRAIL resistance in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **2006**; 5: 2251–2260.
- 143. Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ.** Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* **2002**; 168: 1356–1361.
- 144. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG.** The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* **1997**; 7: 813–820.

- 145. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF et al.** Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med.* **1997**; 186: 1165–1170.
- 146. Deng Y, Lin Y, Wu X.** TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIA BLO. *Genes Dev.* **2002**; 16: 33–45
- 147. Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, Kuang AA, Ho M, Morici LA et al.** TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity.* **2006**; 21: 877–889.
- 148. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C et al.** Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* **1998**; 273: 14363–14367.
- 149. Finnberg N, Gruber JJ, Fei P, Rudolph D, Bric A, Kim SH et al.** DR5 knockout mice are compromised in radiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* **2005**; 25: 2000–2013.
- 150. Finnberg N, Klein-Szanto AJ, El-Deiry WS.** TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *J Clin Invest.* **2008**; 118: 111–123.
- 151. Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM.** Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Me.* **2002**; d 8: 808–815.
- 152. Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Martinez-Valdez H, Medeiros LJ, Younes A.** Inhibition of heat shock protein 90 function by 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin in Hodgkin's lymphoma cells down-regulates Akt kinase, dephosphorylates extracellular signal-regulated kinase, and induces cell cycle arrest and cell death. *Clin Cancer Res.* **2006**; 12: 584–590.
- 153. Gliniak B, Le T.** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res.* **1999**; 59: 6153–6158.
- 154. Grosse-Wilde A, Voloshanenko O, Bailey SL, Longton GM, Schaefer U, Csernok AI et al.** TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *J Clin Invest.* **2008**; 118: 100–110.
- 155. Hotte SJ, Hirte HW, Chen EX, Siu LL, Le LH, Corey A et al.** A phase 1 study of Mapatumu mab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res.* **2008**; 14: 3450–3455.
- 156. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA et al.** Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest.* **1999**; 104: 155–162.
- 157. Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, Bigosch C, Kandioler D, Ludwig C et al.** Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ.* **2003**; 10: 356–364.
- 158. Jin X, Wu XX, Abdel-Muneem Nouh MA, Kakehi Y.** Enhancement of death receptor 4 mediated apoptosis and cytotoxicity in renal cell carcinoma cells by subtoxic concentrations of doxorubicin. *J Urol.* **2007**; 177: 1894–1899.
- 159. Kim M, Liao J, Dowling ML, Voong KR, Parker SE, Wang S et al.** TRAIL inactivates the mitotic checkpoint and potentiates death induced by microtubule-targeting agents in human cancer cells. *Cancer Res.* **2008**; 68: 3440–3449.
- 160. Kim M, Park SY, Pai HS, Kim TH, Billiar TR, Seol DW.** Hypoxia inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by blocking Bax translocation. *Cancer Res.* **2004**; 64: 4078–4081.

- 161. Kim SH, Kim K, Kwagh JG, Dicker DT, Herlyn M, Rustgi AK et al.** Death induction by recombinant native TRAIL and its prevention by a caspase 9 inhibitor in primary human esophageal epithelial cells. *J Biol Chem* . **2004**; 279: 40044–40052.
- 162. Kim SH, Ricci MS, El-Deiry WS.** Mcl-1: a gateway to TRAIL sensitization. *Cancer Res*. **2008**; 68: 2062–2064.
- 163. Miller SA, Dykes DD, Polesky HI.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. **1988**; 16:12-15.
- 164. Langsenlehner T, Langsenlehner U, Renner W, Karin SK, Kripl P, Hofmann G, Clar H, Pummer K, Mayer R.** The Glu228Ala Polymorphism in the Ligand Binding Domain of Death Receptor 4 is associated with increased risk for prostate cancer metastases *The Prostate*. **2008**; 68:264 -268.
- 165. Wang M, Wang M, Gheng G, Zhang Z, Fu G, Zhang Z.** Genetic variants in the death receptor 4 gene contribute to susceptibility to bladder cancer. *Mutat Res*. **2008**; 661: 85-92.
- 166. Frank B, Hemminki K, Shanmugam SK, Meindl A, Klaes R, Schmutzler RK, Wappensch Miller SA, Dykes DD, Polesky HI.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. **1988**; 16:12-15. **midt B, Untch M, Bugert P, Bartram BC, Burwinkel B.** Association of Death Receptor 4 haplotype 626C-683C with an increased breast cancer risk. *Carcin*. **2005**; 164:1975-1977.
- 167. Frank B, Shanmugam SK, Beckmann L, Hemminki K, Brener H, Hoffmeister M, Chang-Claud J, Burwinkel B.** Death Receptor 4 variants and colorectal cancer risk. *Can.Epi.Bio Pre*. **2006**; 1158:1055-9965.
- 168. Michael JF, Arvind K, Virmani LW, Richard A, Jeffrey CH, Steven MP, Timothy R. R, David S, Adi G, Wafik S.** Nucleotide Substitution in the Ectodomain of TRAIL Receptor *DR4* Is Associated with Lung Cancer and Head and Neck Cancer. *Clin. Can. Res*. **2001**; 7:1688-1697.
- 169. Horak P, Pils D, Roessler M, Tomeks S, Eland K, Zeillinger R, Zielinski C, Krainer M.** Common Death Receptor polymorphisms do not predispose to ovarian cancer risk. *Gynecologic Oncology*. **2005**; 97:514-518.
- 170. Dechant MJ, Fellenberg J, Scheuerpflug GC, Ewerbeck V, Debatin MK.** Mutation analysis of the apoptotic “Death Receptors” and the adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in osteosarcoma tumor samples and osteosarcoma cell lines. *Int.J.Cancer*. **2007**; 109:661-667.
- 171. Winger EE, Reed LJ.** Treatment with Tumor Necrosis Factor Inhibitors and Intravenous Immunoglobulin Improves Live Birth Rates in Women with Recurrent Spontaneous Abortion. *Am.J.Reprod.Immunol*. **2008**; 60:8-66.
- 172. Xue WY, Li X, Ren YH, Cheng Li X.** Tumour necrosis factor- α receptor 1 polymorphisms and serum soluble TNFR1 in early spontaneous miscarriage. *Cell Bio. International*. 2007; 31:1396-1399.
- 173. Rosmary J, Lynda KH, Freeman A, Philip NB, Aplin DJ, Whitley JG, Cartwright EJ.** Fetal derived trophoblast use the apoptotic cytokine Tumor Necrosis Factor- α -related-inducing ligand to smooth muscle cell death. *Circ.Res*. **2007**;100:834-841.
- 174. Phillips TA, Ni J, Hunt SJ.** Death-Inducing Tumour Necrosis Factor (TNF) Superfamily Ligands and Receptors are Transcribed in Human Placentae, Cytotrophoblasts, Placental Macrophages and Placental Cell Lines. *Placenta*. **2001**;22;663-672.
- 175. Pietrowski D, Bettendorf H, Riener EK, Keck C, Hefler AL, Hubber CJ, Tempfer C.** Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumour suppressor gene. *Hum.Rep*. **2005**; 10:848-851.

ÖZGEÇMİŞ

- 06/11/1984 tarihinde Mersin’de doğdu
- İlköğretimini Salim Güven İlkokulu ortaöğretimini Özel Akdeniz Palmiye Koleji’nde tamamladı
- Liseyi İçel Anadolu Lisesi’nde tamamladı
- 2003-2007 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Lisans eğitimini aldı
- 15/09/2007 tarihinde Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak lisansüstü eğitimine devam etmektedir.