

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**HLA-G GENİNİN 3' UT BÖLGESİNDEKİ 14 BAZ ÇİFTLİK DELESYON
POLİMORFİZMİNİN FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

Evrin ÜNSAL

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN**

ANKARA

2007

HLA-G GENİNİN 3' UT BÖLGESİNDEKİ 14 BAZ ÇİFTLİK DELESYON POLİMORFİZMİNİN FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Üreme biyolojisinde maternal immün sistemin gelişen fetusu nasıl reddetmediği gizemini koruyan bir konudur. Bir seri çalışmanın sonucunda sınırlı sayıda polimorfizmi saptanmış olan HLA-G antijeninin insan preimplantasyon embriyosunda eksprese olabildiği ve immün düzenleyici rolü ile tolerogenik fonksiyonunun olduğu ortaya koyulmuştur. HLA-G molekülünün implantasyonun kontrolünde rol oynadığı artık bilinmektedir. Bu tez çalışmasında HLA-G geninde tanımlanmış olan 14 bç'lik delesyon polimorfizminin implantasyon başarısı ve gebelik üzerine etkileri değerlendirildi. 14 bç'lik delesyon polimorfizmini tarama yöntemi olarak PCR (Polimerase Chain Reaction) yöntemi kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen hastalar üç grup altında toplandı: Birinci grup (Grup 1); en az üç defa IVF denenmesine rağmen gebe kalamamış kadınlardan ($n_1=127$), ikinci grup (Grup 2); IVF ile gebe kalabilmiş kadınlardan ($n_2=76$), Üçüncü grup (Grup 3) ise kontrol grubu olup tıbbi bir destek olmadan gebe kalabilmiş fertil kadınlardan oluşturuldu ($n_3=80$). hla-g geninde tanımlanmış olan 14 bç'lik delesyon polimorfizminin her bir grup için dağılımları tespit edilerek değerlendirilmiştir. Homozigot yapıda delesyon, heterozigot yapıda delesyon ve hiç delesyon bulunmaması durumlarına ait sıklıklar bakımından gruplar arasında oransal olarak farklılıklar gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya koyulamamıştır ($p>0.05$). Sadece heterozigot bireylerin her üç grup için dağılımına baktığımızda heterozigotluk oranları arasında net bir farklılık belirlenmiştir. Çalışmanın sonucu olarak 14 bç'lik HLA-G polimorfizminin IVF ile gebelik elde etme bakımından bir etkisinin olmadığı ortaya koyulmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: DNA, FERTİLİZASYON, POLİMORFİZM, HLA-G, PCR, IVF

THE EFFECT OF THE 14 BASE PAIR DELETION POLYMORPHISM IN THE 3' UT REGION OF THE HLA-G GENE ON FERTILISATION

ABSTRACT

Why the maternal immune system does not reject the developing fetus remains a fundamental mystery of reproductive biology. The series of experiments presented here test the hypothesis that HLA-G antigen with limited polymorphism may be expressed in the human preimplantation embryos and immun regulation role and tolerogenic function of this gene was obtained. It is known that HLA-G molecule plays a crucial role in the implantation. In this study the effect of 14 bp deletion polymorphism of HLA-G gene on successful implantation and pregnancy was examined. PCR method was preferred to detect this polymorphism. Patients, attending this study, were grouped into three: The first group (Group 1) as no pregnancy although at least three or more IVF treatment ($n_1=127$), the second group (Group 2) successful pregnancy after IVF treatment ($n_2=76$) and the third group, fertil control group ($n_3=80$) was described. Although there were differences between frequency of homozygote deletion, heterozygote deletion and non deleted conditions, no statistically significant difference was obtained ($p>0.05$). If we consider only the distribution of heterozygote women among each three group, an obvious difference for heterozygote rates was detected. As a result of this study, it was revealed that 14 bp deletion polymorphism of HLA-G did not affect IVF pregnancy.

KEY WORDS: DNA, FERTILISATION, POLYMORPHISM, HLA-G, PCR, IVF

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamı planlamamda ve yürütmemde sabrını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e, yardımcı danışman hocam Sayın Prof. Dr. M. Hakan Şatıroğlu'na, bugünkü kariyerim ve bilgi birikimimi borçlu olduğum yegane kişi ağabeyim Sayın Doç. Dr. Volkan Baltacı'ya, çalışmalarımı destekleyen ailem; eşim Emrah Ünsal ve bebeğim Defne Ünsal'a, doktora eğitimim boyunca bana yardımcı olan iş arkadaşlarım; Özge Üner, Yasemin Aktaş ve Feriba Turhan'a teşekkür ederim. Manevi desteğini her zaman üzerimde taşıdığım canım anneme sonsuz teşekkürler.

Evrim Ünsal

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---------------|--|
| IVF | In vitro fertilisation (In vitro fertilizasyon) |
| HLA-G | Human Leukocyte Antigen-G (İnsan Lökosit Antijeni – G) |
| IGF | Insulin-like Growth Factor (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü) |
| PAF | Platelet Activating Factor (Trombosit Aktive Edici Faktör) |
| 3'UT | 3' untranslated (transle olmayan) |
| 5'UR | 5' upstream regulatory / promotor (promotor bölge) |
| mRNA | Messenger Ribonucleic acid (haberci Ribonükleik asit) |
| bç | Baz çifti |
| KOH | Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon |
| GnRH | Gonadotrophin Releasing Hormon (Gonadotropin Salgılatıcı Hormon) |
| OPU | Oocyte Pick Up (Yumurta Toplama) |
| ICSI | Intra Cytoplasmic Sperm Injection (Sitoplazma içine sperm enjeksiyonu) |
| LIF | Leukaemia Inhibitory Factor (Lösemi İnhibe Edici Faktör) |
| IL-4 | Interleukin- 4 (İnterlökin – 4) |
| IL-10 | Interleukin- 10 (İnterlökin – 10) |
| M-CSF | Macrophage Colony-Stimulating Factor (Makrofaj Koloni-Uyarıcı Faktör) |
| MHC | Major Histocompatibility Complex (Başlıca Doku Uyum Kompleksi) |
| APC hücreleri | Antigen-Presenting Cells (Antijen Tanıtıcı Hücreler) |
| KIR | Killer Inhibitory Receptor (Öldürücü İnhibitör Reseptörü) |
| NK Hücreleri | Natural Killer Hücreleri (Doğal Öldürücü Hücreler) |

| | |
|-----------------|---|
| LIR-1 veya ILT2 | Leukocyte Ig-like receptor 1 (Lökosit Ig- benzeri reseptör 1) |
| Met | Methyonin (Metiyonin) |
| Gln | Gluthamine (Glutamin) |
| H19 | Differentiation-Related Fetal RNA (Farklılaşma ile İlgili Fetal RNA) |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbant Assay (Enzim Bağlı Immünosorbent Ölçümü) |
| CIITA | Class II Transactivator (Sınıf II Transaktivatör) |
| IRF1 | Interferon Regulatory Factor (İnterferon Düzenleyici faktör) |
| NF-KB | Nuclear Factor - KB (Nükleer Faktör – KB) |
| JEG-3 | Human Placental Choriocarcinoma Cell Line (İnsan Plasental Koryokarsinoma Hücre Dizisi) |
| M8 | Melonoma Hücre dizisi |
| TH2 | T - Helper (T – Yardımcı) |
| TNF- α | Tumor Necrosis Factor- α (Tümör Nekroz Faktör- α) |
| IFN- γ | Interpheron – γ (interferon- γ) |
| WHO | World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü) |
| C | Cytosine (Sitozin) |
| T | Thymine (Timin) |
| G | Guanine (Guanin) |
| A | Adenine (Adenin) |
| U | Uracil (Urasil) |
| PCR | Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) |
| DNA | Deocsyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit) |
| EDTA | Ethylenediamineteraacetic acid (Etilendiaminteraasetik asit) |

| | |
|---------------|--|
| TBE | Tris Boric Acid (Tris Borik asit EDTA) |
| ESHRE | European Society of Human Reproduction and Embryology (Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Birliği) |
| RT-PCR | Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction (Ters Transkriptaz – Polimeraz Zincir Reaksiyonu) |
| EF-1 α | Elongation Factor-1 α (Uzama Faktörü-1 α) |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2-1. İnfertilite nedenleri ve çok merkezli verilere göre görülme sıklıkları. | 5 |
| Şekil 2.2. Preembrioların gelişim evreleri..... | 8 |
| Şekil 2.3. HLA genleri..... | 14 |
| Şekil 2.4. HLA-G geni ve ekspresyonu..... | 24 |
| Şekil 2.5. 14 bç'lik delesyon/insersiyon polimorfizminin alternatif splicing üzerine olan etkisi..... | 31 |
| Şekil 4.1. 14 bç'lik delesyon polimorfizminin incelendiği agaroz jel örneği..... | 37 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 4.1. HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki 14 bazlık delesyonun tez çalışmasına dahil edilen üç gruptaki dağılımı..... | 38 |
| Çizelge 5.1. Üreme öykülerine göre gruplandırılan kadınların HLA-G genotipleri..... | 51 |

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR..... | iii |
| SİMGELER DİZİNİ..... | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | v |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | vi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER | 4 |
| 2.1. İnsan in vitro fertilizasyon uygulamalarının tarihçesi: | 4 |
| 2.2. IVF yöntemine genel bakış ve uygulanan yardımcı teknikler: | 5 |
| 2.2.1. İnfertilite (kısırlık); | 6 |
| 2.2.2. Ovulasyon İndüksiyonu ve Yumurta Toplama..... | 6 |
| 2.2.3. Oosit toplama : | 7 |
| 2.2.4. Sperm hazırlama: | 7 |
| 2.2.5. Mikroenjeksiyon : | 7 |
| 2.2.6. Embriyo Kültürü : | 8 |
| 2.2.7. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi: | 9 |
| 2.3.1. IVF'te İmplantasyon Potansiyeli Yüksek Embriyonun Seçilmesi – Embriyonun Genetik Taraması | 11 |
| 2.3.2. IVF'te İmplantasyon Potansiyeli Yüksek Embriyonun Seçilmesi – İmmünolojik Değerlendirme..... | 11 |
| 2.4. İnsanlarda Major Histocompatibility Complex (MHC) | 13 |
| 2.4.1. Klasik Olmayan HLA Sınıf 1b Genleri..... | 14 |
| 2.5. HLA-G Geni | 16 |
| 2.6. Kodlayıcı Olmayan Bölgedeki HLA-G Polimorfizmleri..... | 17 |
| 2.7. HLA-G Ekspresyonu ve Fonksiyonu..... | 17 |

| | |
|---|----|
| 2.8. HLA-G'nin Genomik İmprintingi..... | 19 |
| 2.9. HLA-G'nin İnsan Üremesindeki Yeri..... | 20 |
| 2.10. HLA-G Molekülünün Genel Özellikleri..... | 20 |
| 2.11. HLA-G Geninin Yapısal Özellikleri..... | 23 |
| 2.12. HLA-G'nin İşlevleri..... | 25 |
| 2.13. HLA-G Geninin 3'UT Bölgesindeki 14 Baz Çiftlik Delesyon Polimorfizmi..... | 28 |
| 3. MATERYAL METOT | |
| 3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması..... | 32 |
| 3.2. Yöntemler..... | 32 |
| 3.2.1. DNA İzolasyonu | 32 |
| 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu..... | 33 |
| 3.2.3. Agaroz Jelin Hazırlanması..... | 35 |
| 4. BULGULAR | 36 |
| 5. TARTIŞMA | 40 |
| 6. KAYNAKLAR | 57 |
| 7.ÖZGEÇMİŞ | 70 |

1. GİRİŞ

In vitro fertilizasyon (IVF), ilk tüp bebeğin dünyaya geldiği 1978 tarihinden itibaren uygulanmakta olup bu zamana kadar çok hızlı gelişmeler göstermiş ve hala gelişmekte olan uygulamalı bir bilim alanıdır. IVF laboratuvarlarının öncelikli amacı, gebelik elde etmekte güçlük çeken ya da sağlıklı çocuk sahibi olmakla ilgili risk taşıyan eşlerin sağlıklı bebek sahibi olmalarına yardımcı olmaktır. IVF'te temel uygulamalar, gamet hücrelerinden embriyo elde etmek ve bu embriyoların kültür edilip gelişimlerini takip ederek anne rahmine transferi işlemlerini içermektedir. İnsan üremesinde embriyo implantasyonu oldukça kompleks ve tam olarak mekanizması ortaya koyulamamış bir olaydır. Yapılan çalışmalar transfer edilen embriyoların %70'inin implante olamadığını ve ancak %14'ünün sağlıklı bebekler olarak dünyaya gelebildiğini göstermiştir (Noci ve ark., 2004). Bu nedenle başarılı bir IVF uygulamasında gebeliği sağlayabilecek potansiyeldeki embriyonun seçimi son derece önem taşımaktadır. IVF'te elde edilen embriyoların ancak 2 ya da 3 tanesi hastaya transfer edilir. Embriyonun canlılığını belirleyen bir biyomarkerin bulunmasına şiddetle ihtiyaç vardır. Preimplantasyon embriyo gelişimi ve metabolizmasında bazı biyomoleküllerin büyük önemi olduğu gösterilmiş olmakla beraber hali hazırda birçok araştırma yapılmaktadır. En kaliteli embriyoyu seçme metodu hala embriyologlar için bir soru işaretidir. Tüp bebek merkezlerinde yaygın olarak transfer edilecek embriyolar morfolojik durumuna ve bölünme hızına bağlı olarak seçilmektedir ancak embriyonun canlılığı ve endometriyuma tutunabilme potansiyeli embriyo kalitesiyle birebir bağlantılı değildir. Embriyonun morfolojik olarak değerlendirilmesi ve hangi embriyonunun/embriyoların transfer için uygun olduğunun belirlenmesi için bazı morfolojik puanlama kriterleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında en yaygın kullanılan Lucinda L. Veek tarafından tanımlanmış olan embriyo değerlendirme kriterleridir (Veeck ve ark., 1999). Buna göre 3. gün embriyoları için: eşit büyüklükte blastomerleri olan ve sitoplazmik fragmentasyon içermeyen embriyolar birinci kalite, yine eşit büyüklükte blastomerleri olan ancak %10 civarında

sitoplazmik fragmantasyon içeren embriyolar ikinci kalite, blastomer büyüklükleri farklı olan ve değişik oranda fragmantasyon içeren embriyolar üçüncü kalite, blastomer büyüklükleri eşit veya eşit olmayan ve fragmantasyon oranı %10'un üzerinde olan embriyolar dördüncü kalite, büyüklükleri değişken olan az sayıda blastomer içeren ve %50'nin üzerinde fragmantasyonu olan embriyolar beşinci kalite olarak değerlendirilmiştir. Bu şekilde yapılan kalitatif sınıflandırma embriyonun canlılığı hakkında bir fikir vermekle birlikte implantasyon potansiyeli hakkında yeterli bir indikatör olamamaktadır. Sonuç olarak en kaliteli embriyoyu belirlemek için daha iyi bir indikatöre ihtiyaç vardır. Halihazırda, insan embriyosunun biyokimyasal fonksiyonunu ölçen rutin tedavilerde kullanılan bir marker bulunmamaktadır (Noci ve ark., 2004). Hem önceki hem de yeni yayınlanmış makalelerde preimplantasyon embriyo gelişimi ve metabolizmasında bazı moleküllerin öneminden bahsedilmiştir (O'Neil ve ark., 1987; Gardner ve Leese, 1993; Gardner ve ark., 2001; Hannis ve Edwards, 2003). Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G), Insulin-like growth factors (Liu ve ark., 1997) ve Platelet Activating Factor (PAF) (O'Neil ve ark., 1987) gibi bazı endojen faktörlerin preimplantasyon embriyolarının gelişimi ve implantasyonu üzerine etkili olduğu ortaya koyulmuştur.

Üreme biyolojisinde maternal immün sistemin gelişen fetusu nasıl reddetmediği gizemini koruyan bir konudur. Bir seri çalışmanın sonucunda sınırlı polimorfizmi olan HLA-G antijeninin insan preimplantasyon embriyosunda eksprese olabildiği ve immün düzenleyici rolü ile tolerogenik fonksiyonunun olduğu ortaya koyulmuştur. HLA-G molekülünün implantasyonun kontrolünde rol oynadığı artık bilinmektedir. Fuzzi ve grubunun yaptığı çalışmada sadece implante olabilen embriyoların HLA-G eksprese edebildikleri ve HLA-G negatif embriyolarla gebelik elde edilemediği ortaya koyulmuştur (Noci ve ark., 2005).

HLA-G geninin 3'UT (untranslated = transle olmayan) ve 5'UR (upstream regulatory / promotor = promotor) bölgelerindeki polimorfizmlerin, bazı gebelik komplikasyonlarında önemli olan ve HLA-G fonksiyonunu etkileyen HLA-G ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili olduğu bulunmuştur. HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki 14 baz çiftlik (bç) delesyon-insersiyon polimorfizminin, HLA-G mRNA'sının alternatif splicing'i ve HLA-G düzeyindeki farklılıklarla ilişkili olduğu ve ayrıca implantasyon ve gebelik süresince fetus ve annenin HLA-G ekspresyonunun immün düzenleyici rolünü etkilediği düşünülmektedir. (Hviid ve ark., 1999, 2003).

Bu tez çalışmasında; üç defa IVF denenmesine rağmen gebe kalamamış kadınlarda, IVF ile gebe kalabilmiş kadınlarda ve kontrol grubu olarak fertil kadınlarda 14 bç'lik delesyonun taranması amaçlanmış olup tez çalışması, bu polimorfizmin gruplar arasındaki implantasyon ve gebelik başarısı yönünden farklılıkların ortaya koyulmasını ve bu polimorfizmin Türk popülasyonuna ait hasta gruplarındaki sıklıklarının belirlenmesini sağlayacaktır.

2. GENEL KAVRAMLAR

2.1.İnsan in vitro fertilizasyon Uygulamalarının tarihçesi:

İn vitro fertilizasyon (IVF), yumurtaların ovaryumlardan aspire edildikten sonra sperm hücreleri ile laboratuvar ortamında birleştirilmesi sonucu oluşan embriyoların uterusu transferi işlemlerini içeren üremeye yardımcı bir yöntemdir (www.ccivf.com/glossary.html). İnsan IVF'ine yolculuk ilk tüp bebeğin dünyaya gelişinden yirmi yıl önce Ruth Fowler ve Robert Edwards'ın olgun dişi farelerin süperovulasyonu üzerine olan çalışmaları ile başlamıştır. Kısa bir süre sonra Robert Edwards 1962 ve 1965 yıllarında in vitro insan oosit maturasyonunun aşamalarını tanımlayan iki makaleyi yayınlamıştır. Bu yıllarda Edwards, John Paul ve Robin Cole ile birlikte in vitro olarak farklılaşabilen veya ölümsüz kök hücre dizilerini oluşturabilen ilk embriyonik kök hücreleri dünyaya tanıtmışlardır. Yine Edwards, Richard Gardner ile birlikte tavşanlarda preimplantasyon genetik tanıyı, blastokist enjeksiyonuyla elde edilmiş kimerik fareleri ve Barry Bavister ile in vitro maturasyon sağlanmış insan oositlerinde ilk döllemeyi göstermişlerdir (Gardner D.K. ve ark., 2004). Bu çalışmalar, insan IVF'i başta olmak üzere embriyo tanısıyla ilgili diğer modern dallar ve insan embriyonik kök hücrelerinin potansiyel kullanımını hedefleyen öncü çalışmalar olmuş ve yardımcı üreme tekniklerinde çığır açmıştır.

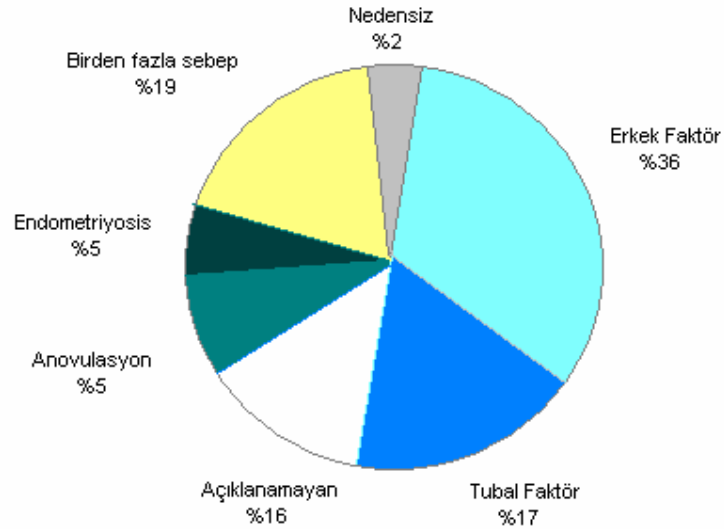
Robert Edwards'ın 1968 yılında Dr. Patrick Stoptoe'nin Lancet'te yer alan bir makalesini okuyup kendisiyle irtibata geçmesi, insan in vitro fertilizasyonu ile ilgili çalışmalarını oldukça hızlandırmıştır çünkü bir kadın doğum uzmanı olan Stoptoe bu yazısında fallopian ampulla laparoskopisi uygulamalarını anlatmaktadır. Edwards bu uygulamanın insan IVF'ini gerçekleştirmelerini sağlayabilecek bir uygulama olduğunu düşünüp Stoptoe'ye iş birliği önermiştir (Gardner D.K. ve ark., 2004). İlk uygulamalarını Lesley ve John Brown çifti üzerinde gerçekleştirmişlerdir ve Stoptoe öncelikle Lesley'den yumurtalarını laparoskopik yöntemle almıştır. Edwards yumurtaları laboratuvar ortamında eşinin spermi ile dölleyerek embriyo elde

etmiş ve bu embriyoları 64 hücre civarında (yaklaşık dört veya beşinci günde) uterusu yerleştirerek gebelik elde etmiştir. 25 Temmuz 1978 ilk tüp bebek Louise Joy Brown'ın doğum günü olup insan IVF tarihinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir (www.history1900s.about.com).

2.2. IVF yöntemine genel bakış ve uygulanan yardımcı teknikler:

İlk tüp bebeğin doğumunun ardından geçen 27 yıl içerisinde IVF'te çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir. İlk başta tubal faktörün üstesinden gelmek için dizayn edilen IVF şimdilerde açıklanamayan infertilite, erkek infertilitesi, endometriyozis, overyan yetmezlik gibi problemlerin çözümünde de kullanılır hale gelmiştir (Stephoe ve ark., 1980, Templeton ve ark., 1996).

Dünyanın önde gelen bazı IVF merkezlerinin sonuçları değerlendirilerek elde edilen genel IVF endikasyonları ve görülme oranları Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (Brinsden ve ark., 2005).



Şekil 2.1.: İnfertilite nedenleri ve çok merkezli verilere göre görülme sıklıkları.

2.2.1. İnfertilite (kısırlık);

Çiftlerin çocuk sahibi olmayı istemelerine ve düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen en az bir yıl süreyle gebelik elde edememeleridir. Bu durumda infertilite nedeni ortaya koyulmalı ve probleme dayalı tedavi uygulanmalıdır. Yukarıda belirtilen nedenlerin çözümü IVF tedavisi olup bu bölümde genel anlamda IVF tedavisinin aşamaları ve kullanılan teknikler açıklanacaktır.

2.2.2. Ovulasyon İndüksiyonu ve Yumurta Toplama

IVF’te amaç; yumurtalıklardan olabildiğince çok sayıda ve iyi kalitede yumurta elde etmektir. Bunun için tedaviye alınan kadının yaş, kilo ve hormon seviyelerine bağlı olarak ovulasyon indüksiyonu protokolü düzenlenir. Kontrollü overyan hiperstimulasyon (KOH) denilen bu uygulama sırasında kullanılan ilaçların dozunun ayarlanması hem yeterli ve iyi kalitede yumurta elde etmek hem de kişiye sistemik bir zarar vermemek açısından çok önemlidir. Bu nedenle takip sırasında ultrason sonuçları ve hormonların artış durumuna göre ilaçların dozu değiştirilip ayarlanmaktadır.

Bu tedavi sırasında; doğum kontrol hapları, GnRH analogları (Lucrin/Decapeptyl) enjeksiyonları, gonadotropin (Follegon/ Puregon/ Menagon/ Gonal-F) enjeksiyonları uygulanmakta ve seri olarak hormon ve rahim içi ultrason tetkikleri yapılmaktadır. Bazen tedaviye kortizon ve metformin gibi ilaçlar da eklenebilmektedir. Uygun USG ve hormon şartları elde edildiğinde hCG (Pregnyl/ Profasi) enjeksiyonu yapıp 35,5-39 saat sonra yumurta toplama (OPU = oosit pick up) işlemi yapılmaktadır (Hohmann ve ark., 2003, Huisman ve ark., 2000, Kastrop ve ark., 2003).

2.2.3. Oosit toplama :

Yumurta toplama işlemi transvajinal ultrason eşliğinde yapılır. Bu işlem için vajina arka duvarından yumurtalıkların içine doğru bir iğne sokularak ultrason eşliğinde foliküldeki sıvı, yumurtaları elde etmek için bir test tüpüne aspire edilir. Stereo mikroskop altında yumurtalar follikül sıvılarından ayıklanarak toplanır ve uygun koşullarda (37°C, %5-6CO₂) iki saat süre ile inkübe edilir (Gardner, ve ark., 2004).

2.2.4. Sperm hazırlama:

Semendeki sperm konsantrasyonu, hareketlilik oranı ve morfolojisine bağlı olarak sperm gradiyent ya da swim up tekniklerinden biriyle hazırlanmaktadır. Gradyent yöntemi temel olarak dansite farklılığı esasına dayanmaktadır. Normal morfolojiye sahip olan sperm hücresi semen içerisinde dansitesi en yüksek olandır. Sperm hücresinin kromozomları son derece kondanse bir yapı gösterdiğinden normal morfolojili ve olgun sperm hücrelerinin dansitesi daha yüksek olacaktır. Bir semende düşük hareketliliğin, lökosperminin ve artık sperm hücrelerinin ayrıca antisperm antikörlerin varlığının olması gradiyent yönteminin kullanılmasını gerekli kılar. Sperm sayısı 20 milyon, hareketlilik oranının %50 ve progresif hareketli sperm oranının %30'un altında olması gradiyent yönteminin tercih edilmesine sebeptir. Daha iyi parametrelere sahip semen örnekleri için swim up tekniği uygulanabilmektedir. Bu teknikte direkt konsantre edilen semende sperm hücrelerinin uygun bir medyuma doğru yüzüp oradan toplanmaları şeklinde kaliteli sperm hücreleri elde edilebilmektedir (Gardner, ve ark., 2004, Vicdan ve ark., 1999).

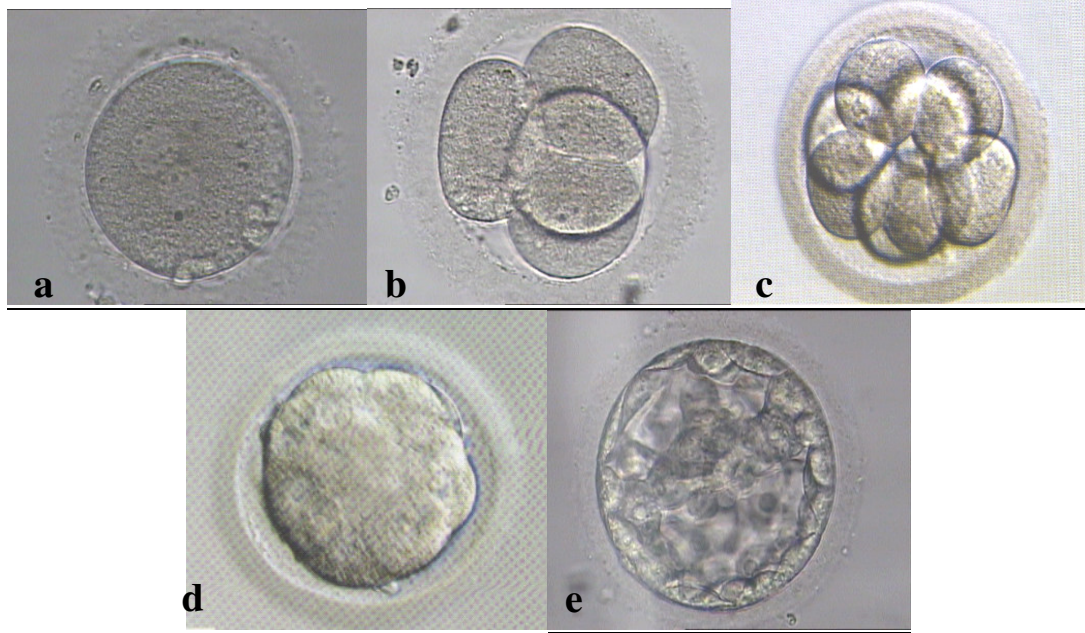
2.2.5. Mikroenjeksiyon :

Mikroenjeksiyon ya da Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) ilk olarak 1992 yılında Belçika'da Brussel Free University'de Palermo ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. ICSI, tek bir sperm hücresinin bir mikropipet aracılığıyla oosit sitoplazması içerisine yerleştirilmesidir.

ICSI uygulaması yapılacak oosit birinci polar cisimciğini atmış yani metafaz 2 aşamasında olmalıdır. ICSI yapılacak oositler bu işlemde önce hyaluronidaz enzimi aracılığıyla kümülüs hücrelerinden arındırılır ki hem oositin manipulasyonu kolaylaştırılır hem de polar cisimciğin atılıp atılmadığı net bir şekilde gözlenebilmiş olur (Vicdan K ve ark., 1999).

2.2.6. Embriyo Kültürü :

Embriyo kültürünün ilk aşaması fertilizasyon kontrolü olup bu değerlendirme ICSI işleminden 12-18 saat sonrasında yapılır ve bu gün embriyo kültüründe 1. gün olarak adlandırılır. Bu evrede incelenen oositler ya normal olarak fertilize olmakta veya fertilizasyon yokluğu ya da anormal fertilizasyon göstermektedirler. Kesin olarak ayrı iki pronükleusun varlığı normal fertilizasyonu gösterir (Şekil 2.2.a). Embriyonun bölünmeye başladığı gün 2. gün olarak adlandırılır ve bu evrede embriyolar 2-4 blastomerli evrededir (Şekil 2.2.b). Embriyo kültürünün 3. gününde 6-8 blastomerli olan embriyo (Şekil 2.2.c) 4. günde morula - kompaktlaşma (Şekil 2.2.d) evresinde olmaktadır. Kültürün 5. gününde blastokist evresindeki (Şekil 2.2.e) embriyolar gelişmektedir.



Şekil 2.2. : Preembriyoların gelişim evreleri. **a)** pronükleer aşama **b)** 4 blastomerli evre **c)** 8 blastomerli evre **d)** kompakt evre **e)** blastokist evresi.

2.2.7. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi:

İnsan fetusunun erken kaybı oldukça yaygın bir olaydır. Doğal tekiz fetusların yaklaşık %73'ü 6. haftaya ulaşmadan kayba uğramakta ve kalanların %90'ı doğumla sonuçlanmaktadır (Boklage ve ark., 1990). “Preembriyoların canlılığını sağlayan faktörler nelerdir?” sorusu pek çok araştırmacının gündemindedir. Öncelikle genetik sağlamlık implantasyonun gerçekleşmesi ve sağlıklı çocuk sahibi olmada kesin bir gerekliliktir. Ne yazık ki inkübatörlerde takip edilen embriyoların biyopsileri yapılarak incelenmeden genetik yapılarını bilebilmek mümkün değildir. Pek çok düşük kalite embriyo, normal ve sağlıklı fetuslar geliştirse de fragmentli ve arrest embriyolarda sayısal ve kromozomal anomalilerin daha sık olduğu görülmektedir (Baltacı ve ark., 2006). Diğer yandan yaşlı kadınlardan (≥ 36) elde edilen pek çok iyi morfolojili embriyolarda ölümcül genetik bozukluklar olduğu ortaya konmuştur (Munne ve ark., 1995). Bu durum, morfolojik sınıflandırma sisteminin transfer için en iyi embriyoyu seçmede faydalı olduğunu ancak gelişimsel olarak normal olan embriyoların seçiminde sınırlamalar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle transfer edilecek embriyonun seçimi en azından şimdiki koşullarda bazı küçük testlerle yapılmaya çalışılmaktadır.

Pek çok genetik bozukluğu olan embriyonun gelişimi erken dönemde durmaktadır. Pronükleer gelişimin ardından genetik bozukluğu olan embriyoların hızlı kaybı, sekiz hücre aşamasındaki embriyonun transfer için seçimini uygun kılmaktadır (Almeida ve ark., 1996). Değişik morfolojik kalitelerdeki preembriyolar sitogenetik açıdan incelendiğinde araştırmacılar, pronükleer aşamadaki anomali oranını %65, 2-4 hücre aşamasında %55 ve 5-8 hücre aşamasında ise %27 oranında tespit etmişlerdir. Kötü morfolojili embriyolar iyi olanlara göre neredeyse üç kat fazla genetik anomali göstermektedir. Embriyodaki genetik bozukluk oranını etkileyen diğer bir faktör de anne yaşıdır. Anne olma yaşı ilerledikçe embriyolardaki anöploid oranı artmaktadır.

IVF'teki son gelişmelere rağmen gebelik oranları önemli ölçüde arttırılamamış olup yüksek sayıdaki çoğul gebelik oranları hala önemli bir problem olmayı sürdürmektedir. Transfer edilecek embriyonun canlılığını ölçen kriterlerin kullanımı oldukça önemlidir. Yumurtanın gelişimi sırasında kaderini önceden belirleyebilmek transfer için en iyi embriyoların seçiminde yardımcı olabilir ancak ekstrasitoplazmik ve intrasitoplazmik morfolojilerine bakılarak yapılan bu non-invasive seçimin belirleyiciliği çok zayıftır. Son dönemde foliküler vaskülarizasyonun oositin gelişimsel kaderini öngörmeye belirleyici olduğu öne sürülmektedir (Borini ve ark., 2005).

Bu verilerden yola çıkılarak doğal seleksiyonun sekiz hücre aşamasının ötesinde erken fetal gelişim sırasında da sürdüğünü ön görebiliyoruz. Embriyonun kültür süresi uzatıldığında daha seçkin embriyoların ayırt edilebileceği düşünülerek standart 2-3. gün transferi yerine 4. günde morula ya da 5. günde blastokist transferi yapılarak daha yüksek oranda implantasyon elde edilmiştir (Huisman ve ark., 1994). Blastokist transferi en iyi embriyoları seçebilmek için olası diğer bir strateji olup anöploidi riskini de azaltmaktadır.

İmplantasyon şansını arttırmak amacıyla potansiyel embriyo seçimi için uygulanan başka bir yöntem ise erken klivaj kontrolüdür. ICSI sonrası 25-27. saatlerde yapılan ilk embriyo klivaj kontrolü ile klivaja giren embriyolar takip edilip transferi yapıldığında gebelik oranlarının arttığı bildirilmiştir (Petersen ve ark., 2001).

Pronükleer morfoloji değerlendirmesi de implantasyon potansiyeli yüksek olan embriyoların seçiminde kullanılabilir ancak diğer morfolojik yöntemlerle birlikte kullanılması önerilen bir yöntemdir (Tesarik ve ark., 2000).

2.3.1. IVF’TE İmplantasyon Potansiyeli Yüksek Embriyonun Seçilmesi – Embriyonun Genetik Taraması

Genetik yapısının normal olmasının embriyoların implantasyon başarısını arttırdığı gösterilmiştir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan yöntem preimplantasyon genetik tanı ve tarama testleridir. Preimplantasyon genetik tanı (PGT) implantasyon öncesi embriyolardan alınan hücre örneklerinde genetik testler yapılarak anneye sağlıklı embriyoların transfer edilmesi yöntemidir. İlk uygulama Handyside tarafından bildirilmiştir (Handyside ve ark., 1995).

PGT’nin temel zorlukları arasında en önemlisi tek ya da az sayıda hücreden genetik test yapılma zorunluluğudur. Tek hücrenin alınması (embriyo biyopsisi) ve kaybedilmeden genetik test için hazırlanması, sonuca kısa süre içinde (transfer gününden önce) ulaşılma zorunluluğu, testlerin tekrar edilme imkanının olmaması, sonuçların değerlendirilmesindeki güçlükler (mozaiklik, kontaminasyon vb) testin diğer önemli sınırlamaları arasındadır.

IVF sonrasında elde edilen iyi kalite embriyolarda anöploidi en yaygın anormalliktir ve poliploidi ve mozaikliğin aksine anöploidi embriyonel kalitenin artması ile azalma göstermemektedir. O halde klivaj oranları ve morfolojik parametreler dikkate alınarak embriyo transferi yapıldığında poliploidi ve mozaikliğin eliminasyonu sağlanabilir ancak anöploidili embriyoların ekarte edilmesi sağlanamaz (Munne ve ark., 1993). İyi kalite embriyonun transfer için seçilmesi kromozomal olarak anormal embriyo replasmanını azaltmaktadır.

2.3.2. IVF’te İmplantasyon Potansiyeli Yüksek Embriyonun Seçilmesi – İmmunolojik Değerlendirme

IVF’te elde edilen embriyoların ancak 2 ya da 3 tanesi hastaya transfer edilir. Bu bakımdan embriyonun canlılığını belirleyen bir biyomarkerın bulunmasına şiddetle ihtiyaç vardır. En

kaliteli embriyoyu seçme metodu hala embriyologlar için bir soru işaretidir. Hali hazırda kullanılmakta olan metot morfolojik embriyo sınıflandırmasıdır. Bu şekilde yapılan kalitatif sınıflandırma embriyonun canlılığı hakkında yeterli fikir vermemektedir.(Noci ve ark., 2004)

İnsan üremesinde embriyo implantasyonu oldukça kompleks ve tam olarak mekanizması ortaya koyulamamış bir olaydır. Transfer edilen embriyoların büyük bir çoğunluğu ($\geq\%70$) implante olamamakta, ancak $\%14$ 'ü sağlıklı bebekler olarak dünyaya gelmektedir (Noci ve ark., 2004). Hem önceki hem de yeni yayınlanmış makalelerde preimplantasyon embriyo gelişimi ve metabolizmasında bazı moleküllerin öneminden bahsedilmiştir (Gardner ve ark., 1993, Gardner ve ark., 2001, Hansis ve ark., 2003). Bununla birlikte bu metabolitlerden hiçbiri klinik uygulamalarda embriyo seçiminde rutin olarak kullanılmamıştır; ancak PAF'ın (Platelet-activating factor) embriyo canlılığının belirlenmesinde indikatör olarak kullanımı amaçlanmıştır (Roudebush ve ark., 2001, Roudebush ve ark., 2002).

İnsan embriyosunun biyokimyasal fonksiyonunu ölçen rutin tedavilerde kullanılan bir marker bulunmamaktadır (Noci I et al 2004). Embriyo implantasyonu doğada kolayca oluşabilen bir olay değildir. Fertilize olan yumurtaların $\%78$ 'i doğumla sonuçlanmazken konseptusların $\%62$ 'si gebeliğin 12. haftasından önce kaybedilmektedir. Embriyo implantasyonu IVF olgularında da başarıyı sınırlayan önemli bir faktördür. İmplantasyon olayındaki olası bir biyolojik problem de embriyonun bir organ transplantı gibi düşünüldüğünde HLA-G antijeninin immün düzenleyici rolü dikkatleri çekmektedir (Fuzzi B ve ark., 2002). HLA-G'nin embriyonun gelişim potansiyelini belirlemede marker olarak kullanılabileceğini göz önünde bulundurmak gerekmektedir.

Embriyo implantasyonunu doku transplantı olarak düşünecek olursak, sadece HLA-G eksprese eden embriyoların redde karşı koyabileceğini söyleyebiliriz. Genel olarak implantasyonda,

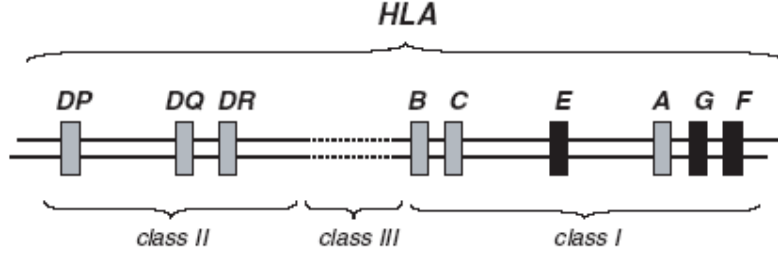
hormonların, sitokinlerin ve hücrelerin kompleks halde yürütücü bir rol üstlendikleri ortaya koyulmakta ve desidual hücrelerin Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), IL-4, IL-10 ve Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) gibi moleküllerin üretiminin önemi vurgulanmaktadır. Pek çok araştırmacı genel olarak kısırlık ve tekrarlayan düşük olgularında daha çok bu moleküller üzerinde yoğunlaşmaktadırlar. Ancak implantasyon sırasında fetal allograft toleransla ilgili olarak sitokinlerle ilişkilendirilmiş bir data bulunmamaktadır (Noci ve ark., 2004). Çözülebilir HLA-G1 molekülünün implantasyonun kontrolünde rol oynadığı ve implantasyonun, preembriyoların HLA-G sekresyonu ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. (Gardner, ve ark., 2004)

Gebelik süresince maternal immün sistem, semiallojenik fetusun doku ve hücreleri ile yakın temas halindedir. Gebe bir kadınının fetusunu reddetmemesini sağlamak amacıyla maternal immün sistemi düzenleyen özel mekanizmalar bulunmaktadır. Plasentadaki trofoblast hücrelerinden eksprese olan klasik olmayan HLA sınıf 1b moleküllerinin bu mekanizmalara katıldığı düşünülmektedir (Ishitani ve ark., 2003). Üzerinde en çok çalışılan HLA sınıf 1b geni HLA-G genidir. Fetustan köken alan trofoblast hücreleri HLA sınıf 1a ve 2 antijenlerini eksprese etmezler. Sadece HLA-C'nin zayıf ekspresyonu gözlenmiştir (King ve ark., 2000). Semiallojenik fetusun maternal kabulünü sağlayan HLA-G'nin blastokist aşamasındaki embriyodan da eksprese edildiği belirlenmiştir (Fuzzi B ve ark., 2002, Jurisicova, ve ark., 1996).

2.4. İnsanlarda Major Histocompatibility Complex (MHC)

İnsanlardaki MHC, 6. kromozomun kısa kolu üzerinde 4Mb büyüklüğünde olup 130 fonksiyonel geni vardır. Bunlardan en iyi tanımlananları klasik HLA 1a ve 2 genleridir (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ ve -DP) (MHC sekans konsorsiyumu, 1999) (Şekil 2.3.). Bunlar, organ transplantasyonu, antijen-peptid tanınması ve otoimmün hastalıklar ile ilgileri bakımından iyi bilinen tipleridir.

1980'lerin sonlarından itibaren klasik olmayan HLA sınıf 1b genleri de gündem oluşturmaya başlamıştır (Geraghty ve ark., 1987).



Şekil 2.3.: Klasik olmayan HLA sınıf 1b genleri (HLA-E, -F, -G) genleri, 1a (HLA-A, -B, -C) genleri gibi 6. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur. Ayrıca şekilde HLA sınıf 2 genleri (-DR, -DQ ve -DP) görülmektedir. HLA-G geni HLA-A genine yakın bir bölgede bulunmaktadır. HLA-E geni ise HLA-C ve HLA-A arasında iken HLA-F, HLA-G ve HLA-A'ya yakın bulunmaktadır. (MHC sekans konsorsiyum,1999)

2.4.1. Klasik Olmayan HLA Sınıf 1b Genleri

HLA sınıf 1b antijenleri (HLA-E, -F, -G) genel itibariyle sınıf 1a antijenlerine benzer. HLA sınıf 1b molekülleri, immün cevabın baskılanmasında ve uzun süreli immün toleransın oluşmasında etkindir (Ishitani ve ark., 2003, King ve ark., 2000, Geraghty ve ark., 1987, Carosella ve ark., 1999). HLA-G, sitotoksik T lenfositlerin cevabını baskılamakta ve NK hücrelerinin fonksiyonunu bozmaktadır. HLA-G tarafından transfekte edilen APC hücreleri (antigen-presenting cells) CD4+ T hücrelerinin proliferasyonunu önler. Çözülebilir HLA-G, Fas/FasL yolağı ile CD8+ T hücrelerinin apoptozisini uyarır. Ancak HLA-G'nin immün toleransı nasıl sağladığının mekanizmaları hala çözülmeye çalışılmaktadır.

HLA sınıf 1b genlerinin yapısı HLA sınıf 1a genleri ile oldukça benzerdir. Ancak, özellikle 3' ucunda (sitoplazmik kuyruk) olmak üzere bazı farklılıklar vardır. (Heinrichs ve ark., 1990) HLA-G'nin kısa sitoplazmik kuyruğu HLA-G'nin spontan endositozunu azaltan önemli bir faktördür

(Davis ve ark., 1997). HLA-E Sınıf I antijenlerinde olduğu gibi pek çok farklı doku ve hücre tiplerinde eksprese olmaktadır (Lee ve ark., 1998). HLA-E'nin bağlanma bölgesi (groove) HLA-G sinyal peptidine ilgisi oldukça yüksektir ve bu bağlanma HLA-E nin trofoblast hücrelerinden eksprese olması için önemlidir. HLA Sınıf I proteinlerinin hücre yüzeyinden ekspresyonu ve hücreler arası transportu endoplazmik retikulumdaki peptidlere bağlıdır. Öyle görülüyor ki HLA-E ye bağlanan pek çok peptid, nonamerler halinde olup HLA Sınıf I sinyal sekanslarından köken almaktadır. HLA-E molekülü peptid bağlanma bölgesinde tek bir aminoasit değişimi göstermektedir. HLA-E CD94/NKG2C reseptörü ile etkileşim halindedir ve NK hücrelerinin inhibisyonundaki muhtemelen en önemli moleküldür (Llano ve ark., 1998). HLA-G, killer inhibitory receptor (KIR) ile etkileşime girer ve HLA-E/G nonamerden gelen aktivasyon sinyalini dengeler ve böylece olası diğer yolların aktifleşmesi ile lizisi inhibe eder (Ishitani ve ark., 2003).

HLA-F nin fonksiyonu henüz bilinmemektedir. Ekspresyonu sadece plasentadaki invaziv sitotrofoblast hücrelerde belirlenmiştir ve zaten bunlar her üç HLA Sınıf I molekülünü de eksprese edebilen yegane hücre tipleridir. Bu bağlamda bu üç sınıf Ib molekülünün plasentada birbirleriyle etkileşim halinde işlevlerini sürdürdükleri düşünülebilir. HLA Sınıf Ib genlerinde nadir polimorfizm görülüyor olması, oldukça polimorfik olan HLA Sınıf Ia ve II genlerinin aksine bir durum göstermektedir. HLA-E de protein seviyesinde üç allel ve HLA-F de ise sadece iki allel bulunmaktadır ancak farklılık kısa sitoplazmik kuyrukla ilgilidir (He ve ark., 2004).

2.5. HLA-G Geni

HLA-G geni üzerinde yoğun bir şekilde çalışılıyor olmasına rağmen kristal yapısı daha yeni ortaya konulabilmiştir (Clements ve ark., 2005). HLA-G molekülünün dış kısmı $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ bölgelerinden (2-4 ekzonları) oluşmuştur. $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ peptid bağlanma bölgelerini içermektedir.

Lökosit Ig- benzeri reseptör I (LIR-1 veya ILT2) ve LIR 2 (veya ILT4) inhibitör reseptörleri için farklı bağlanma yerleri HLA-G nin $\alpha 3$ bölgesinde bulunmaktadır. Bu bölge klasik MHC Sınıf I moleküllerinden yapısal olarak farklıdır. HLA-G membran proteinlerinin tamamı transmembran bölge (ekzon 5) ile hücre membranına bağlanır. HLA-G, HLA Sınıf I antijenleri arasında özel bir yer almaktadır çünkü mRNA'sının alternatif splicing'i sonucu farklı membran ve çözülebilir izoformları meydana gelmektedir.

HLA-G molekülleri, çeşitli intraselüler proteinlerden köken alan peptidler ile bağlantılıdır. HLA-G proteinleri neredeyse tamamen monomorfik moleküller olup bugüne kadar sadece 4 amino asit polimorfizmi tanımlanmıştır. Bu bakımdan HLA-G geni insan genomundaki en çok genetik polimorfizm görülen HLA sınıf Ia ve 2 antijenlerinin aksine bir durum göstermektedir. HLA-G deki polimorfizmler 5' protomer bölgede ve 3' transle edilmeyen bölgede görülmektedir (Hviid ve ark., 1999, Hviid ve ark., 2003) .

2.6. Kodlayıcı Olmayan Bölgedeki HLA-G Polimorfizmleri

HLA-G geninin 5' UR ve 3' UT bölgelerindeki polimorfizm ve sekanslar'ın HLA-G ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. HLA-G transgenik fareler ile yapılan çalışmalarda HLA-G geninin transkripsiyon başlangıç bölgesinden 1.1 ve 1.4 kb uzaklıklar arasındaki bölgede önemli bir düzenleyici eleman bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bölgede aynı zamanda sekans polimorfizminin varlığı da belirlenmiştir. Ancak, bu polimorfizmin önemi ve fonksiyonu net bir şekilde ortaya koyulamamıştır. 725. pozisyondaki polimorfizmin, HLA-G'nin metilasyonu ve ekspresyonu ile alakalı olabileceği düşünülmektedir ancak yine de daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu bölgede tanımlanmış diğer polimorfizmlerden tez çalışmasına da konu olan 3'UT bölgesindeki sekizinci ekzondaki 3741 pozisyonundaki 14 bç'lik delesyon/insersiyon polimorfizmi (5' ATTTGTTTCATGCCT 3') ilk olarak Harrison tarafından

tanımlanmıştır (Harrison ve ark., 1993). Primatlarla yapılan MHC-G evrim çalışmalarına göre 14 bç'lik polimorfizm insersiyon değil delesyon polimorfizmidir. Bu delesyon polimorfizmi Kafkas popülasyonunda %55 oranında görülmektedir. Afrikalılarda ise delesyon polimorfizminin daha baskın olduğu ortaya koyulmuştur. Sonuç olarak null allelin dışında HLA-G geninin kodlayıcı bölgesindeki bilinen birkaç polimorfizmin HLA-G fonksiyonunu etkilediğine dair güvenilir bir data bulunmamaktadır. HLA-G geninin 3'UT ve 5'UR bölgelerindeki polimorfizmlerin, bazı gebelik komplikasyonlarında önemli olan ve HLA-G fonksiyonunu etkileyen HLA-G ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili olduğu bulunmuştur.(Hviid, 2005).

2.7. HLA-G Ekspresyonu ve Fonksiyonu

HLA-G'nin ekspresyonu sınırlıdır. HLA-G mRNA'sı pek çok farklı dokuda belirlenmiş olmasına rağmen HLA-G proteinin ekspresyonu sadece trofoblast hücrelerinde, bazı immün hücrelerde (çoğu zaman monositlerde) ve timusta belirlenmiştir.(Bouetiler, 2003, Cynthia, 1993) Timusta bazı medullar epitelyal hücrelerde, plasentada ise ekstravillöz sitotrofoblast hücrelerin tüm tiplerinde belirlenmiştir (Bouetiler, 2003, Jurisicova, 1996) Ancak kas liflerinde, akciğerde ve renal tübüler epitelyal hücrelerde de bazen HLA-G proteinin ekspresyonu olduğu belirlenmiştir. Klasik MHC moleküllerine kıyasla, HLA-G molekülünün en çarpıcı özellikleri: sınırlı polimorfizm olması (Morales, 1993) ve ekspresyonlarının plasenta ve insan gözü gibi immünolojik rolü olan dokularla sınırlı olmasıdır (Shukla, 1990, Ishitani 1992). HLA-G ayrıca gebelik süresince amniyotik sıvıda ve maternal kanda da bulunmuştur (Jurisicova, 1996). HLA-G'nin kadın ve erkek serum/plazmalarında bulunduğu düşünülmeyle birlikte normal koşullarda erkek ve gebe olmayan kadın plazmasında HLA-G olduğu konusunda karşıt görüşler vardır. (Wiendl, 2000, Lila, 2001, Creput, 2003) Ekzon 8'deki 14 bç'lik delesyon/insersiyon polimorfizmi hem HLA-G geninde hem de transkriptinde olabilmektedir. 14 bç'lik delesyon varlığında ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmüştür (Rousseau ve ark., 2003).

HLA-G molekülleri, öldürücü Ig-like 2 DL4 (KIR2DL4) ve ILT2, ILT4 reseptörleri ile direkt etkileşerek NK ve T hücreleri tarafından oluşturulan hücre lizisini inhibe etmektedir (Riteau 2001, Menier 2002). HLA-G $\alpha 1$ bölgesi NK hücrelerinin inhibisyonunda önemlidir. Ayrıca HLA-G $\alpha 1$ 'in Met76 ve Gln79 birimleri KIR2DL4 tanınmasına katılmaktadır.

Fetustan köken alan trofoblast hücrelerinde HLA-C'nin zayıf ekspresyonu hariç klasik HLA sınıf 1a ve 2 antijenleri eksprese olmaz (King, 1996, 2000). Bu sayede HLA-semiallogenik fetal hücreler maternal immün sistem ile direkt kontakt kurmazlar. Ancak HLA eksprese etmeyen hücreler NK hücreleri tarafından lizise uğrarlar. İnvaziv sitotrofoblast hücrelerinde ve yakınlarında monomorfik HLA-G molekülünün güçlü ekspresyonu ile HLA-E ve F nin plasentadaki ekspresyonu lizisi önler. HLA-F nin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte bugüne kadar bu molekülün ekspresyonu sadece invaziv trofoblast hücrelerinde belirlenmiştir. Aslında bu hücreler HLA sınıf1b moleküllerinin her üçünü de eksprese edebilen yegane hücrelerdir. Bu durum gebe kadının semiallogenik fetusu kabulünde bu klasik olmayan HLA antijenlerinin önemini ortaya koymaktadır (Ishitani ve ark., 2003).

Park ve arkadaşları HLA-G'nin primer fonksiyonunun antijen presentasyonu olmadığını ve NK hücreleri için inhibitör rollerinin olduğunu belirtmişlerdir. (Park ve ark., 2001)

2.8. HLA-G'nin Genomik İmprintingi

Genler transkripsiyon seviyesinde parental allelelerden sadece bir tanesinin eksprese olması sebebiyle, genomik imprinting ile susturulabilir. Genomik imprinting doku spesifik olabildiği gibi bazı durumlarda gelişim boyunca zamana bağımlı olabilir. Bu durum implantasyon öncesi ve sonrası gelişim aşamaları için incelenmiştir. Plasentadaki MHC antijenlerinin genomik

imprinting ile ilgili hayvan çalışmalarının sonuçları farklılık göstermektedir. Klasik HLA sınıf I ve sınıf II genlerinin hem maternal hem paternal fenotipleri farklı dokularda eşit ekspresyon gösterirken, birkaç çalışma yeni doğanların lökositlerini kullanıldığı paternal allellerin tiplerinin zorluklarından söz etmektedir. HLA-G geninin birinci trimester insan trofoblast hücrelerinden kodominant olarak eksprese olduğu ortaya koymuştur. İnsanlarda imprinting gösterildiği ilk genler Igf 2 reseptörünü ve H19'u (differentiation-related fetal RNA) kodlayan genlerdir. Genomik imprinting altında yatan mekanizmalar henüz net bir şekilde ortaya koyulabilmiş değildir. Genomik imprinting gerçekleşeceği genlerde fertilizasyondan önce parental allellerden biri transkripsiyonel olarak susturulduğu ve moleküler olarak işaretlendiği düşünülmektedir. Olgun gametlerde bölge-spesifik DNA metilasyonunun olduğu belirlenmiştir. Çünkü CpG dinükleotidlerinin yoğun olduğu DNA sekanslarının farklı birkaç tipi yumurtada spermde farklı bir düzende metillenmiştir. Genomik imprinting'in rolü hakkında birkaç hipotez bulunmaktadır. Moore ve Haig'e göre sadece paternal genomdan ekspresyon olması plasentanın gelişimini tetikleyebilir ve fetusun canlılık oranını arttırabilir ve paternal genomun korunması sağlanır (Moore ve Haig, 1991). Bu durumun tersi gebeliğin kötü gidişatını sınırlayarak maternal imprinted genler için doğru olabilir. Plasenta ve trofoblastın gelişimi ve büyümesi ile ilgili genomik imprinting çalışmalarda paternal genomun önemi vurgulanmaktadır. HLA-G'nin plasenta terminal döneminde metilasyonunun olduğunu söyleyen yayınlar olduğu gibi yine terminal dönemden alınmış ekstrasitotrofoblastlarda metile olmamış HLA-G tespit edilmiştir. HLA-G mRNA transkriptinin tamamı birinci trimester trofoblast hücrelerinde yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Bu formun ekspresyonu makrofaj ve sitokin salınan lenfositlerdeki değişimleri uyarmaktadır ve bu durum özellikle gebeliğin birinci fazında plasenta/fetus ve desidua arasındaki etkileşim açısından önemlidir. HLA-G geninin genomik imprinting mekanizmaları tam olarak ortaya koyulamamıştır ve paternal HLA-G allellerinin olası etkileri hala incelenmektedir (Hviid ve ark.,1998).

2.9. HLA-G'nin İnsan Üremesindeki Yeri

Bazı çalışmalarda preimplantasyon blastokistlerde HLA-G ekspresyonu belirlenmişse de bu konu hala tartışmalıdır (Jurisicova ve ark., 1996; Hiby ve ark., 1999; Fuzzi ve ark., 2002; Lierop ve ark., 2002; Sher ve ark., 2004; Noci ve ark., 2005; Yie ve ark., 2005). Toplam 148 blastokistin incelendiği çalışmada bunların %40'ında HLA-G mRNA'sı ve protein ekspresyonu belirlenmiştir ve HLA-G ekspresyonunun klivaj oranını arttırdığı öne sürülmüştür (Jurisicova ve ark., 1996). Bir başka çalışmada 25 çiftten alınan 108 adet 3. gün embriyosunun %44 ü HLA-G pozitif bulunmuştur (Cao ve ark., 1999). Hiby'nin 1999 yılında yaptığı çalışmada ise 2 hücre aşamasından blastokist aşamasına kadar hiçbir embriyoda HLA-G belirlenememiştir (Hiby ve ark., 1996). Ancak bu çalışmada sadece 11 embriyo incelenmiştir. Yine bir diğer çalışmada 8 hücre morula veya blastokist aşamasındaki embriyoların kültür süpernatantlarında üç değişik ELISA tekniği kullanılmasına rağmen HLA-G belirlenememiştir (Lierop ve ark., 2002).

Genel olarak bakıldığında ilgili çalışmaların sonucu olarak gebeliğin ilk trimesterinden sonuna kadar HLA-G'nin trofoblast hücrelerinden eksprese edildiği ortaya konmuştur. Hatta blastokist aşamasındaki embriyodan dahi eksprese olduğu belirlenmiştir.

2.10. HLA-G Molekülünün Genel Özellikleri:

HLA sınıf I molekülleri tümü 6. kromozomun kısa kolunda bulunan genler tarafından kodlanmaktadır (Riteau B ve ark., 2001). Bu bölge ~20-25 HLA sınıf 1 genini içermesine rağmen çok azı transkripsiyon ya da translasyona uğramaktadır. Bunların bir çoğu pseudogenler ya da gen fragmentleridir. Bu genler klasik (HLA sınıf Ia) ve klasik olmayan veya (HLA sınıf Ib) olmak üzere sınıflandırılmıştır (Hunt, J. S, 1987).

1. Klasik Grup (HLA sınıf Ia)

- HLA-A
- HLA-B
- HLA-C

1. Klasik Olmayan Grup (HLA sınıf Ib)

- HLA-E
- HLA-F
- HLA-G

HLA-G ilk olarak 1987'de Geraghty ve arkadaşları tarafından klonlanmış, (Geraghty ve ark., 1987) trofoblast hücrelerindeki varlığı ise Shirley Ellis, Suzan Kovats ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur (Ellis ve ark., 1990). Daha sonra Loke'un grubu HLA-C ve HLA-E'nin trofoblast hücrelerindeki varlığını ortaya koymuşlardır (King, 2000).

HLA-G, diğer sınıf I genlerinden farklı olarak kendine özgü promotor bölgesinin olması, çoklu splice olmuş izoformlarının bulunması, kısa bir sitoplazmik bölgesinin ve sınırlı polimorfizmlerinin varlığı gibi özelliklere sahiptir (Bouetiler, 2003).

- Tek bir promotor bölgesi vardır:

HLA-G'nin promotor bölgesi diğer HLA sınıf I promotorlarından farklıdır. HLA-G promotorunda Interferon Stimulated Responsive Element, X₂ ve Y boxes genleri yoktur ve enhancer A düzenleyici sekansı farklıdır. Bu farklılıklar, HLA-G promotorunun IRF1, NF-KB ve sınıf II transaktivatör (CIITA) gibi faktörler tarafından transaktivasyonunun yapılamamasına neden olur. Hormon bakımından zengin plasental ortam ve sitokinlerdeki HLA-G transkripsiyonu IL10 ve /veya Leukaemia Inhibitory Factor LIF tarafından in situ olarak kontrol edildiği düşünülmektedir.

- Çoklu splice olmuş izoformları vardır:

HLA-G geninin genel oluşumu diğer HLA sınıf I genlerine benzer. Ancak bu genlerin aksine HLA-G mRNA'sının alternatif splicing'i sonucu membran bağımlı ve çözülebilir izoformları olmak üzere farklı tipleri ortaya çıkmaktadır. Genelde sınıf 1a antijenleri membran bağımlıdır. Ancak sınıf 1b'nin üyelerinden HLA-G alternatif splicing yapar. Bugüne kadar yedi adet alternatif splice olmuş transkripti belirlenmiştir. Bunlardan dördü membran bağımlı iken üç tanesi çözülebilir formdadır. HLA-G1,-G2, -G3 ve -G4 izoformları hem sitoplazmik hem de transmembran bölgelere sahiptir.

- Sınırlı polimorfizm görülmektedir:

Gebeliğin ilk dönemlerinde ekstrasvillöz sitotrofoblast hücrelerinin hücre yüzeyinde HLA-G eksprese edildiğinde, HLA-G'nin paternal allelik formu maternal formdan farklı olabilir ve bu durum T hücrelerinin alloreaktif immün cevabını uyarabilir. HLA-G polimorfizmi de gebelik boyunca patojen enfeksiyonlara karşı korumada önemli rol oynar (Bouteiller, 1997). HLA sınıf 1a'nın aksine HLA-G çok az miktarda amino asit polimorfizmi gösterir. Bugüne kadar amino asit sekansları ile ilgili sadece 4 HLA-G allelinde farklılık tanımlanmıştır. Klasik sınıf 1 genleri ile kıyaslandığında en polimorfik gen olan HLA-G'dir.

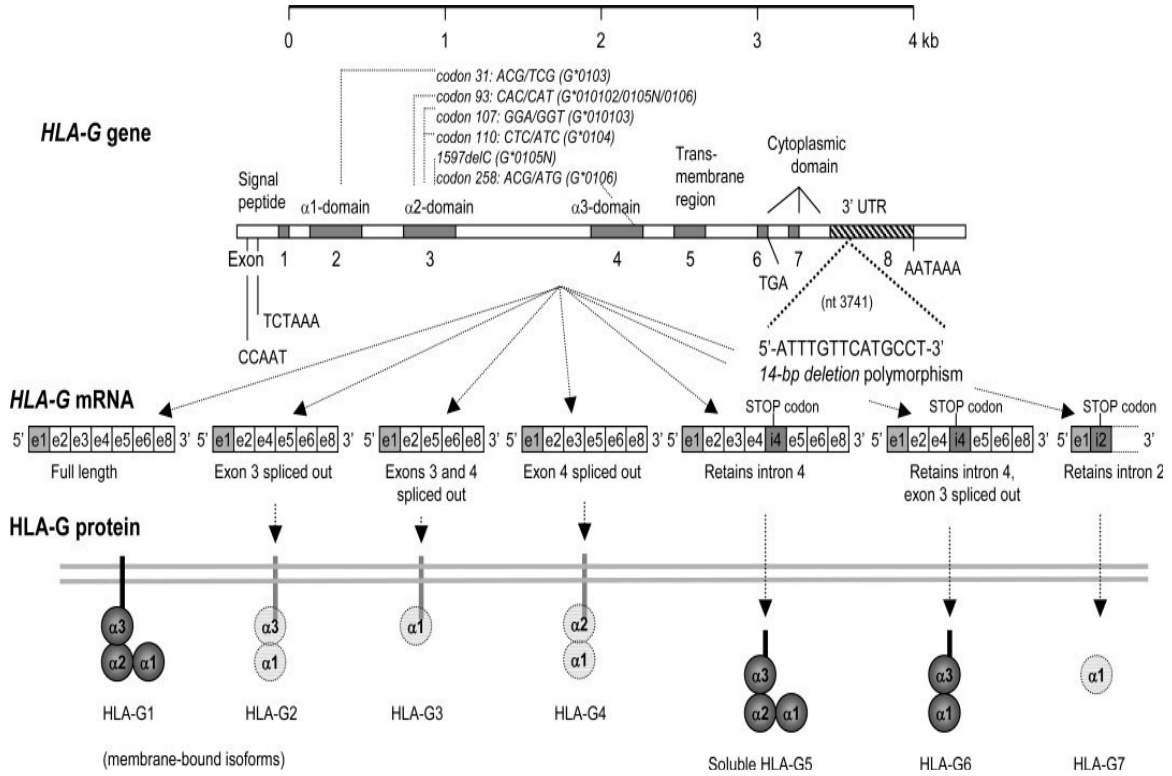
Son olarak sınıf 1a antijenleri her yerde bulunabilirler ancak sınıf 1b antijenleri doku-organ spesifiktirler ya da duruma göre eksprese olurlar. İnsan trofoblast hücreleri bir sınıf 1a antijeni (HLA-C) eksprese ederken sınıf 1b antijenlerinin üçünü de eksprese eder. HLA-C geni kısmen polimorfiktir ve eğer paternal alleller maternal allellerden farklı ise maternal anti-fetal immüniteyi uyarabilirler. HLA-C lokusundaki allelik farklılık gebeliğin sonlanması ya da infertiliteye neden olan bir faktör olarak görünmemektedir (Grimsley, 1997).

2.11. HLA-G Geninin Yapısal Özellikleri

HLA-G'nin genomik yapısı diğer sınıf 1 genlerine benzemesine rağmen pek çok bakımdan farklı özellikleri vardır. HLA-G geninin sekiz ekzonu vardır (Şekil 2.4.). Ekzon 1 sinyal peptid olup (endoplazmik retikulum girince atılır) $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ (sırasıyla; ekzon2, ekzon3, ekzon4) transmembran bölgedir. HLA-G'nin $\alpha 3$ bölümü, sitotoksik T lenfositlerindeki CD8 glikoproteinleri ile etkileşim halindedir. Beşinci ekzon hidrofobik transmembran kısmını kodlar. HLA-G klasik HLA sınıf 1 moleküllerinden altıncı ekzondaki dur kodonuyla farklılık gösterir. Dur kodonundan dolayı sitoplazmik kısmın büyük bir bölümü translasyona uğramaz. 30 aminoasidin transle olması gerekirken 6 aminoasit translasyona uğrar ki bu eksik translasyon HLA-G sitoplazmik kuyruğunun fosforilasyon bölgesi olan serin birimini ve tirozin kinazın substratı olan tirozin birimini kaybetmesine neden olur (Bouteiller ve Mallet, 1997). Bu durum hücre yüzeyinde HLA-G'nin uzun sürede eksprese olmasına ve döngüsünün yavaş olmasına neden olmaktadır. Ekzon5 ve intraselüler bölgeyi oluşturan ekzon 6 ve ekzon 7 diğer sınıf 1 genleri ile benzerdir (Joan, Hunt, 2005).

HLA-G molekülleri immün sistemin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamakta olup genin primer transkriptinin alternatif splicingi sonucu 7 adet protein izoformu oluşmaktadır. HLA'nın G1'den G4'e kadar olan mRNA formları membran bağımlı molekülleri, G5'ten G7'ye kadar olanlar ise çözülebilir molekülleri kodlamaktadır. HLA-G4 ve -G7 izoformları plasentada çok bulunmamaktadır (Carosella, 2000). HLA-G1, $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ bölgelerini içeren ekstraselüler kısmı ile diğer sınıf 1 genleri ile hemen hemen aynı yapıdadır. İkinci primer transkript, HLA-G2, $\alpha 2$ bölgesini kodlayan ekzon 3'ü içermez ve HLA sınıf 2 moleküllerinin yapısına daha benzer homodimerler oluşturabilirler (Ishitani ve Geraghty 1992). Proteinin membran ve intraselüler kısmının translasyonundan önce stop kodonunun (intron 4 bölgesinde) olması nedeniyle HLA-G1 ve HLA-G2 transkriptleri çözülebilir izoformlar ("çHLA-G1" veya "-G5" ve "çHLA-G2" veya

“-G6,”) olarak da eksprese olurlar. Ekzon 3 ve ekzon 4’ün olmadığı (HLA-G3) ve ekzon 4’ün olmadığı (HLA-G4) daha küçük olan diğer transkriptler de bulunmaktadır ancak transle olan proteinleri hücre yüzeyine ulaşamamaktadır (Bainbridge ve ark., 2000). Tamamı transkripsiyona uğramış G1 izoformu plasental dokularda en çok bulunan mesaj olup (Ishitani ve Geraghty 1992; Hiby ve ark., 1999) beklide hücre yüzeyinde eksprese olan tek izoformdur (Bainbridge ve ark., 2000; Mallet ve ark., 2000). çG1 ve çG2 proteinleri maternal-fetal yüzde daha çok bulunmaktadır (Hunt ve Orr 1992) ve gebelik boyunca maternal dolaşımında var olduğu belirlenmiştir (Rebmann ve ark., 1999; Hunt ve ark., 2000).



Şekil 2.4.: HLA-G geni ve ekspresyonu. HLA geni klasik HLA sınıf 1 genleri ile hemen hemen aynı yapıdadır. Ancak HLA-G'nin sitoplazmik kuyruğu daha kısadır ve kodlama bölgesinde daha fazla polimorfizm görülmektedir. HLA-G'nin 3' UT bölgesinde 14 baz çiftlik delesyon/insersiyon polimorfizmi bulunmaktadır. mRNA'nın alternatif splicing'i sonucu yedi

HLA-G mRNA ve protein izoformları oluşur. Bunun dışında çözülebilir HLA-G izoformları bulunmaktadır. bu çözülebilir izoformlar (HLA-G5, -G6, -G7) hücreler tarafından salgılanabilir. Daha kısa olan membran bağımlı izoformlar (HLA-G2, -G3, -G4) hücre yüzeyinden eksprese olurlar.

Ekzon 1-4 bölgesindeki bugüne kadar belirlenen 13 polimorfizm bulunmaktadır. Ekzon 8'in translasyon görülmeyen bölgesindeki 14 baz çiftlik delesyon/insersiyon polimorfizmi ilk olarak Harrison ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Şimdilerde de mRNA transkriptinin büyüklüğüne ve stabilitesine etkisi olduğu gösterilmiştir. 14 bç'lik insersiyonun varlığı G*01012 ve G*01013 mRNA'larının 3'UTR bölgesinde 92 bç'lik bir delesyonun oluşmasına neden olur. (Goncalves ve ark., 2001) 92 bç'lik delesyon JEG-3 hücrelerinde ve M8 hücre dizilerinde incelenmiş ve mRNA'nın daha stabil olması ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca alternatif splicing ürünlerinin ortamdaki miktarlarının, HLA-G'nin polimorfizmlerinden etkilenebileceği ortaya koyulmuştur (Hviid, 2003).

2.12. HLA-G'nin İşlevleri

HLA-G fonksiyon görmeyen evrimsel bir artık olarak nitelendirilirken (Parham, 1996), yeni çalışmalarla HLA-G proteinlerinin immün hücreleri düzenlediğini ve böylece gebelik uterusundaki immün ayrıcalığı kuran bir unsur olduğu ortaya koyulmuştur.

Wegmann ve arkadaşları gebe farede TH2 sitokin üreten lenfositlerin TH1 tipi sitokinlere tercih edildiğini ve ortamda daha çok bulduklarını ortaya koymuştur. Sonraki çalışmalarda TH2'nin tercih edilmediği durumlarda anti-enflamatuvar sitokinlerin gebeliği engellediği görülmüştür. Trofoblast hücre sinyallerinin T lenfositlerini bu anti-enflamatuvar sitokinlere karşı yönlendirmeleri semiallojenik fetusa maternal toleransı açıklamada bir fikir olarak ileri

sürülmüştür (Joan, 2004). Tekrarlayan spontan düşük olgularında da Th1 sitokin cevabı görülmektedir. Komplikasyonsuz gebeliği olan kadınlarda ise Th2 sitokin cevabı görülür.

HLA-G'nin T hücrelerini etkileyebileceği ile ilgili veri ilk olarak Sanders'ten gelmiştir ve HLA-G eksprese eden hücrelerin CD8 α eksprese eden hücelere bağlandığını göstermiştir. (Hunt, ve ark., 1987) bu veri şimdilerde Shirioshi tarafından desteklenmiştir.

Plasental çözülebilir HLA-G molekülü aktif haldeki CD8 T hücrelerinin apoptozisini uyarır. Villöz trofoblast pro-apoptotik çözülebilir HLA-G'yi sentezler ve desidua, kan veya intervillöz boşluktaki CD8 T hücrelerini apoptozise uğratarak paternal antijenlere olan direnci keser. Çözülebilir HLA-G, NK (naturel killer) hücrelerinin yol açtığı sitotoksitenin düşük regülasyonunu yapabilmektedir. Ayrıca endotelial hücrelerin aktivitesini de kontrol eder. Bu hücrelerin proliferasyon ve göçünü alt düzeyde tutar (Jurisicova,1996).

Yeni basılan yayınlarda, HLA-G ekspresyonunun hücreleri NK hücrelerinin lizisine karşı koruduğu bildirilmektedir (Riteau ve ark., 2001, Goncalves ve ark., 2001). NK hücreleri lenfosit hücreleri olup doğuştan itibaren immün sistemde yer alırlar. Bunun dışında HLA-G, desidua ve periferik kandaki mononükleer hücrelerdeki tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) ve Th1 sitokinlerin üretimini azaltır. Ayrıca HLA-G periferik kandaki mononükleer hücrelerin Th2 sitokin interlekin-4 (IL-4) üretimini uyarır (Kanai, 2001). Th1 tipi sitokinler allograft reddi uyarır ve Th2 tipi sitokinler ise Th1'i inhibe eder ve böylece fetusun canlılığını sürdürebilmesi ihtimalini artırır (Piccinni ve ark., 2001). Materno-fetal yüzeyde trofoblast hücreleri tarafından üretilen HLA-G'nin hem NK hücrelerinin işleyişine olan hem de Th1/Th2 arasındaki dengeyi sağlamak yönündeki biyolojik etkisi, implantasyon işleminde ve fetal allograft tolerans olayında önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Noci ve ark., 2004).

Bazı solid tümörlerde (Wiendyl ve ark., 2002), viral enfekte hücrelerde (Lozano ve ark., 2002), transplante edilmiş organlarda (Creput ve ark., 2003), cildin inflamatuvar hastalıkları (Khosrotehrani ve ark., 2001), multiple skleroz vakalarında serebral spinal sıvıda (Fainardi ve ark., 2003) hem membran bağımlı hem de çözülebilir HLA-G moleküllerinin bulunması, bu moleküllerin tolerogenik fonksiyonunu genelleştirmektedir.

Gebelik süresince, fetal trofoblast hücrelerinin maternal hücrelerle kontakt kurması sonucunda bazı materno-fetal yüzey etkileşimleri gerçekleşmektedir (Bouetiler ve ark., 1999). Bunlar:

- İlk etkileşim sinsidyotrofoblastlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Koryonik villusun en dış katmanı, intervillöz boşluktaki maternal kanla kontakt kurar.
- İkinci etkileşimde, fetal kökenli ekstrasvillöz trofoblastlar, desidüaya göç ederler ve çoğunlukla NK hücreleri, T hücreleri ve makrofajlar olmak üzere farklı maternal hücrelerle kontakt kurarlar.
- Üçüncü etkileşim ise endovasküler trofoblastlarla maternal kan arasında olup bu etkileşim maternal spiral arterlerin endotelial hücrelerinin yer değiştirmesiyle sağlanır.

Plasentadaki bu farklı trofoblast hücrelerinin sub-populasyonlarının çarpıcı bir özelliği; diğer pek çok somatik dokudan farklı olarak, bunların kendine özgü bir tip HLA sınıf I ekspresyonu yapmalarıdır (Grabowska ve ark., 1990). Çok öncelerde saptanan bir bilgi de; trofoblast hücrelerinin HLA-A ve HLA-B ekspresyonu yapamadıkları ancak HLA-G ekspresyonu yapabildikleridir (Bouetiler, ve ark., 1996).

Çözülebilir HLA-G1 molekülünün implantasyonun kontrolünde rol oynadığının belirlenmesi üzerine son dönem çalışmaları bu konu üzerine odaklanmıştır. İmplantasyonun preembriyoların HLA-G sekresyonu ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur (Fuzzi ve ark., 2002). Fuzzi ve

grubunun çalışmasına göre sadece implante olabilen embriyolar HLA-G eksprese edebilmektedir ve HLA-G negatif embriyolarla gebelik elde edilememektedir.

HLA-G molekülünün IVF'te implantasyon potansiyeli yüksek embriyoyu belirlemede biyokimyasal bir marker olarak kullanımı son dönem çalışmalarının temel hedefidir. Bu amaçla embriyonun transfer edilebilecek aşamadaki HLA-G ekspresyonunun varlığı net bir şekilde test edilebilmelidir. Eğer ekspresyonun varlığı 3. gün embriyosunda (6-8 hücre aşamasında) belirlenebilirse test süresi transfer işlemini sınırlamayacaktır. Önceden de bahsedildiği gibi embriyonun gelişim safhası ilerledikçe HLA-G ekspresyonu artacağından blastokist aşamasındaki embriyonun değerlendirilmesi daha kolay olacaktır ancak çabuk transferi gerektirdiğinden kısa süren bir tetkik gerekmektedir.

Gebelik oranlarını arttırmak amacıyla embriyodaki HLA-G'nin varlığını belirlemede en çok ELISA tekniği kullanılmaktadır. Kültür süpernatantlarının kullanıldığı bu teknik üzerinde çalışan araştırmacılar ELISA cihazını ve kitlerini IVF amaçlı özelleştirip patentini alarak embriyoda HLA-G tayinini rutin bir tedavi protokolü haline getirmeye çalışmaktadırlar (Sher ve ark., 2005a,b). Ancak bu konuda daha fazla veriye ihtiyaç vardır. Özellikle embriyonun HLA-G ekspresyonunu göstermek için moleküler düzeydeki çalışmaların artması gerekmektedir. Çalışmalar göstermiştir ki, HLA-G bazı insan oositleri ve preimplantasyon embriyolarının bazılarında blastokist aşamasına kadar mRNA ve protein seviyesinde eksprese edilmektedir. HLA-G mRNA'sının ekspresyon düzeyi düşük olduğundan moleküler düzeyde varlığını gösterebilmek için aynı gelişim aşamasındaki kardeş embriyolardan birkaç tanesini bir tüpte değerlendirmek gerekmektedir. Dolayısıyla bu tip çalışmalar sadece gamet, embriyo ve blastokist gibi gelişim aşamalarındaki ekspresyon varlığı hakkında bilgi vermektedir (Jurisicova ve ark., 1996). Blastokist aşamasında tek bir embriyodan ekspresyon gösterdiğini söyleyen bir çalışma

vardır (Jurisicova ve ark., 1996). Ancak HLA-G ekspresyonunun moleküler düzeyde belirlenmesinin rutin IVF prosedürlerine katılması için biyopsi ile alınan bir blastomerin karakterize edilmesi gerekmektedir. Gen düzeyinde rahatlıkla çalışılabilir hale gelmiş embriyonun bir blastomerinden mRNA ekspresyonu gösterebilen çok az yayın bulunmaktadır. Burada da bir hücre iskeleti bileşeni olan β -aktin gibi ekspresyon düzeyi yüksek moleküller belirlenebilmiştir. (Schwers ve ark., 2000)

2.13. HLA-G Geninin 3'UT Bölgesindeki 14 Baz Çiftlik Delesyon Polimorfizmi

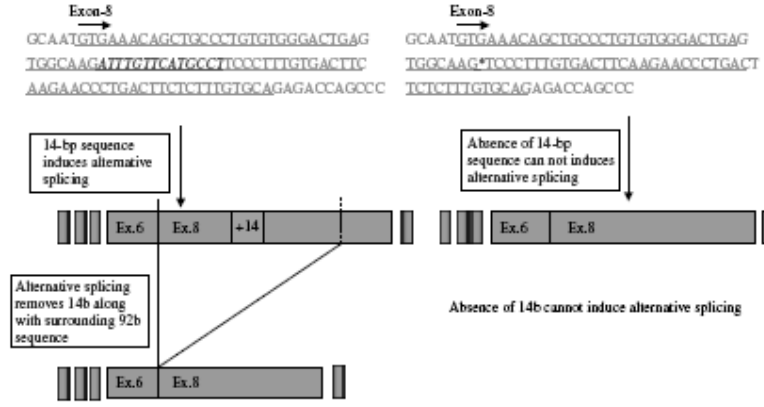
14bç delesyon/insersiyon polimorfizmi, HLA-G mRNA'sının alternatif splicing'i ve HLA-G düzeyindeki farklılıklarla ilişkilidir. Bu da implantasyon ve gebelik süresince fetus ve annenin HLA-G ekspresyonunun immün düzenleyici rolünü etkilemektedir (Hviid ve ark., 2005). Bu çalışmada HLA-G mRNA'sının düşük seviyede olması ile HLA-G*010102 allelini taşıyan birinci trimester trofoblast örneklerinde 3'UT bölgesindeki 14bç'lik dizinin varlığı arasında ilişki saptanmıştır.

Klasik HLA sınıf I genlerine kıyasla HLA-G düşük allelik polimorfizm gösterse de bazı patolojik durumlarda HLA-G geninin ekspresyon seviyesinin ve mRNA izoformlarının profilinin normale göre farklı olmasının bu sınırlı polimorfizmle ilişkisi olabileceği ortaya konmuştur. (O'Brien ve ark., 2001, Hviid, ve ark., 2002) HLA-G polimorfizminin düşük olmasına rağmen protein ekspresyonunun miktarını etkileyebileceği ve hatta bazı durumlarda gebeliğin oluşmasındaki bozukluklarla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Dünya Sağlık Örgütü, HLA-G*0105N olarak adlandırılan null allel de dahil olmak üzere 15 HLA-G allelinin olduğunu belirtmektedir (Villena ve ark., 1997). HLA-G allelik varyantları, HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki 14 baz çiftlik (bç) delesyon-insersiyon polimorfizminin bir sonucu olabilir. 14bç'lik HLA-G insersiyonunun varlığı exon 8'in başlangıcından kopan 92 bazlık fazladan bir splice oluşturduğu bilinmektedir.

HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki polimorfizm 14 bazlık delesyon ya da insersiyon şeklinde olup görülme sıklığı sırasıyla % 58 ve %42 olarak kaydedilmiştir (Harrison ve ark., 1993). Bu polimorfizmin önemli fonksiyonları olabileceği düşünülmektedir. Bu 14 bazlık polimorfizmin 3. exonda 93. kodondaki T mutasyonu ile ilişkili olduğu ve bunun da HLA-G transkriptinin miktarının düşük olmasına ve belki de preeklampatik plasentadaki alternatif splicingde varyasyonlara neden olabileceği düşünülmektedir (O'Brien ve ark., 2001). Bunlara ek olarak başka bir çalışma ile HLA-G allelik varyantları ile HLA-G mRNA izoform profilindeki farklılıkların ve 1. trimester trofoblast hücre popülasyonlarındaki HLA-G mRNA seviyelerinin arasındaki ilişki doğrulanmıştır.

14 bç'lik delesyon HLA-G transkriptinin alternatif splicing'inden sorumludur. 14 bç'lik dizi alternatif splicing'i uyarır ve 3' UT bölgesinden 92 bazın çıkmasına neden olur. Bu 92 bç'nin bulunmadığı olgun transkript stabil karakterdedir. HLA-G transkriptinin stabilitesi bozulduğunda HLA-G proteinini etkiler. 14 bç'lik dizi delesyona uğramışsa 92bç'lik dizi olgun transkriptte kalır ve transkriptin stabilitesi bozulur (Şekil 5). Bu durumun düşüklerle ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. mRNA stabilitesi 3' UT bölgesindeki AU'ca zengin kısımdan etkilenmektedir. Bu AU'ca zengin elementler AUUUA pentamerinden bir ya da birkaç kopya içermektedir ve mRNA'nın degradasyonuna yol açmaktadır. 14bç'lik dizinin AUUUG pentamerik başlangıcından dolayı AU pentamerik-benzeri etkiye sahip olduğu düşünülmekte olup bunun deadenilasyona katıldığı ve mRNA'nın bozunmasına neden olduğu düşünülmektedir. 92 bç'lik dizinin olmadığı transkriptte bu motifin yokluğu deadenilasyona yol açmakta ve böylece mRNA degradasyonuna karşı daha iyi bir direnç sağlanabilmektedir. Ancak 14bç'lik dizinin delesyonu veya insersiyonu halinde etrafındaki pentamerik dizinin silinmesi nedeniyle rolü tam olarak açıklanamamıştır. HLA-G mRNA stabilitesinin araştırıldığı çalışmalarda 92bç'lik dizinin olmadığı transkriptlerin bütün mRNA formlarına göre daha stabil (kararlı) olduğu belirlenmiştir

(Rousseau ve ark., 2003). HLA-G mRNA'sının ve proteininin seviyesinin düşük olması fonksiyon görmesini etkileyecektir.



Şekil 2.5.: 14 bç'lik delesyon/insersiyon polimorfizminin alternatif splicing üzerine olan etkisi

14 bç'lik delesyonun gebelikle ilişkisini araştıran çok az yayın bulunmaktadır. Ancak şimdiye kadar bu polimorfizmin gebelik ve immün düzenlenmeye olan etkisini ortaya koyabilen bir çalışma yoktur. Bu polimorfizm daha çok tekrarlayan düşük olgularında, preeklamptik plasenta olgularında taranmıştır. Farklı yerel toplumların polimorfizm sıklıkları değişiklik göstermiş ancak bu konuda geniş tabanlı bir çalışma bulunmamaktadır.

3. MATERYAL YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışma Özel Gen Art Kadın Sağlığı Tüp Bebek ve Üreme Biyoteknolojisi Merkezi Embriyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışma grubunu oluşturmak için adı geçen merkeze gelen tüp bebek hastalarından kan temin edilmiştir. Kontrol grubuna ait kanlar, Gölbaşı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Merkezi'ne gelen fertil kadınlardan sağlanmıştır. Çalışmaya katılan tüm hastalar bilgilendirilmiş ve çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarına dair onay formu alınmıştır.

Bu çalışmaya üç grup hasta alınmıştır. Birinci grup; üç defa IVF denenmesine rağmen gebe kalamamış kadınlardan, ikinci grup; IVF ile gebe kalabilmiş kadınlardan, üçüncü grup ise kontrol grubu olup fertil kadınlardan oluşmuştur. Toplam 283 kadın çalışmaya alınmış olup bunlardan, 127 kadın birinci grupta, 76 kadın ikinci grupta, 80 kadın üçüncü yani kontrol grubunda yer almıştır.

3.2. Yöntemler

Bu çalışmada 14 bç'lik delesyon polimorfizmini tarama yöntemi olarak PCR (Polimerase Chain Reaction) yöntemi kullanılmıştır. PCR ile delesyonu içine alan bölge çoğaltılmış ve örnekler ayırt etme gücü yüksek, düşük erime sıcaklığına sahip agaroz jele yüklenmiştir. Bantlar etidyum bromid ile görüntülenmiştir.

3.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışma gruplarını oluşturan hastalardan 1ml 0.5M Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) içeren tüplere 2ml kan örneği alınmıştır. Genomik DNA eldesi için ticari olarak elde edilen DNA

izolasyon kiti (Ultra Clean Blood Spin Kit, Mo Bio, katalog numarası: 12200-50) kullanılmıştır.

İzolasyon aşamaları aşağıdaki gibidir:

- 200µl EDTA'lı kan, 0.5ml'lik eppendorf tüp içerisine alınarak hücre lizisine yardımcı olmak amacıyla 20µl proteinaz K eklenir.
- Kaotropik tuz ve deterjan içeren lizis solusyonundan (B1 solüsyonu) 200 µl eklenerek hücre lizisi sağlanır.
- Tüp içeriği 15 saniye vortekslenerek karıştırılır.
- 65°C'de 15 dakika inkübe edilerek proteinler denature edilir.
- Tüpün kapağındaki buharlaşmış damlaları tüp dibinde toplamak için kısa bir süre santirfüj edilir.
- Denatüre olmuş proteinleri çökeltmek için 200µl B2 solüsyonu eklenerek vortekslenir ve spin edilir.
- Tüm karışım filtrelili tüpe alınır. 13 000 g x 1 dakika santirfüj edilir. Bu aşamada DNA spin filtredeki silika membrana bağlanır, denature olmuş protein ve RNA gibi istenmeyen hücre materyallerini içeren sıvı atılır.
- Spin filtre yeni bir tüp içine oturtulur, 50µl tuz bazlı B3 solüsyonu eklenerek bağlı DNA spin filtreden ayrılır.
- 13 000 g x 30 saniye santirfüj edilir. Spin filtre alınıp sıvı kısım atılır ve filtre yeniden aynı tüpe yerleştirilir. Böylelikle artık ve istenmeyen hücre materyalleri iyice uzaklaştırılmış olur.
- 500µl etanol bazlı B4 yıkama solüsyonu eklenerek tüm tuz artıkları uzaklaştırılır.
- 13 000 g x 30 saniye santirfüj edilir. Spin filtre alınıp sıvı kısım atılır ve filtre yeniden aynı tüpe yerleştirilir. 13 000 g x 30 saniye tekrar santirfüj edilerek spin filtre yeni bir tüp üzerine oturtulur.

- 200µl B5 solüsyonu eklenerek 65°C’de 5 dakika inkübe edilir. İçeriği 10mM’lık Tris olan bu solüsyon spin filtreden geçerken ortamda tuz olmadığı için DNA’yı ayırır ve toplama tüpüne geçmesini sağlar.
- 13 000 g x 1 dakika santirfüj edilir. Genomik DNA tüp içinde herhangi bir uygulama için hazır hale gelir.

Elde edilen DNA örnekleri gruplandırılıp +4°C’de saklanmıştır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışmada HLA-G geninin sekizinci ekzonundaki 14bç’lik delesyon polimorfizm bölgesini içine alan 224 bç’lik fragment amplifiye edilmiştir. DNA örnekleri 200ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde ayarlanarak kullanılmıştır. Primerlerin son konsantrasyonu 0.4pmol/µl olacak şekilde düzenlenmiştir. Forward primerin dizisi 5’-GTG TGG CTG TTA AGT TCA C-3’ (Operon, Almanya) ve reverse primerin dizisi 5’-GGA GGA TGC GTT AGC ATG A-3’ (Operon, Almanya)’dır. Diğer PCR bileşenleri; 1X PCR tamponu (Fermentas, Katalog Numarası: B33, Kanada), 0.2 mM dNTP (Fermentas, Katalog Numarası: R1121, Kanada), 2.5 mM MgCl₂ (Fermentas, Katalog Numarası: R0971 Kanada), 1 ünite Taq DNA polimerazdır (Fermentas, Katalog Numarası: EP0402, Kanada). PCR reaksiyonunun gerçekleştiği toplam hacim 25µl olup PCR bileşenlerine nükleazlardan arındırılmış distile su (Fermentas, Katalog Numarası: R0582, Kanada) eklenerek bu hacime ulaşılmıştır.

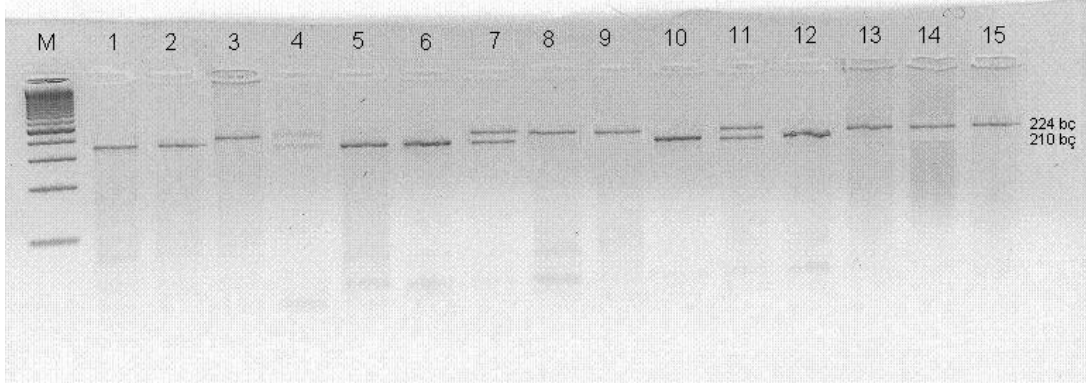
PCR reaksiyonu 94°C’de 2 dakikalık ön denatürasyon aşamasıyla başlatılıp, 94°C’de 30 saniye denatürasyon, 64°C’de 1 dakika hibridizasyon ve 72°C’de 2 dakika uzama aşamaları 30 döngü halinde devam ettirilmiş ve 72°C’de 10 dakika son uzama aşamasıyla bitirilmiştir.

3.2.3. Agaroz Jelin Hazırlanması

Bu çalışmada düşük erime sıcaklığına sahip yüksek ayırma gücü olan agaroz (Pronadisa, Katalog Numarası: 9021, İspanya) kullanılmıştır. Bu sayede 14bp'lik delesyon ayırt edilebilmiştir. %4'lük bu jelin hazırlanmasında TBE 10X (Tris Borik asit EDTA) kullanılmıştır. Ticari olarak elde edilen TBE 10X solüsyonu (Dr. Zeydanlı, Katalog Numarası: DZTBE10-1, Türkiye) distile su ile 1X olacak şekilde seyreltilmiştir. Kullanılan elektroforez tankının jel hacmine bağlı olarak 100 ml olacak şekilde %4'lük jel mikrodalga fırında eritilerek hazırlanmıştır. Jelin sıcaklığı 50-60°C'ye indiğinde 0.6µg/ml etidyum bromid (Sigma, Katalog Numarası: 46067, Almanya) eklenmiştir. Yatay jel tankına (Thermo EC330 midicell electrophoretic gel system) 100ml olarak hazırlanan jel dökülerek donması beklenmiş, örnekler Orange G (Metis, Türkiye) yükleme boyası ile karıştırılarak jelin kuyularına yüklenmiştir. Bant boylarını ölçebilmek amacı ile DNA markeri (Mass Ruler DNA Ladder, Fermentas, Katalog Numarası: SM0393, Almanya) kullanıldı. Elektroforez tankı 1X TBE ile uygun seviyeye kadar doldurulmuştur. Örnekler 100 volt akımda 30 dakika yürütülerek ultraviyole ışık ile değerlendirilmiştir.

4. ÇALIŞMA BULGULARI

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gurubu kadınlarda HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki 14 bazlık polimorfizm gösteren delesyonun genotipik dağılımının embriyo implantasyonu ve gebelik başarısı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalar üç grup altında toplanmıştır: Birinci grup (Grup 1); üç defa IVF denenmesine rağmen gebe kalamamış kadınlardan ($n_1=127$), ikinci grup (Grup 2); IVF ile gebe kalabilmiş kadınlardan ($n_2=76$), Üçüncü grup (Grup 3) ise kontrol grubu olup fertil kadınlardan oluşturulmuştur ($n_3=80$). Toplam 283 kadın çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen her bir guruba ait hastaların genotipik değerlendirmesi aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir: HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki 14 bazlık delesyonun hiç bulunmaması (normal), söz konusu delesyonun tek allele bulunması (heterozigot) ve her iki allele birden bulunması (homozigot) olarak değerlendirilmiştir. Söz konusu delesyonun değerlendirilmesinde HLA-G geninin sekizinci ekzonundaki 14bç'lik delesyon polimorfizm bölgesini içine alan 224 bç'lik fragment PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. Daha sonra bu amplifikasyon ürünlerinde söz konusu 14bç'lik delesyonun var olup olmadığı jel elektroforez ile gösterilmiştir. Bunun için erime sıcaklığı düşük, ayırma gücü yüksek bir agaroz jel (Pronadisa, katalog no: 9021, İspanya) kullanılmış, bantlar etidyum bromid ile görüntülenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.1. : 14 bç'lik delesyon polimorfizminin incelendiği agaroz jel örneği. M: Marker, 1,2,5,6,10,12 numaralı kuyularda 210 bç'lik bantlar görülmekte olup 14 bç'lik delesyonun mevcut olduğu örneklerdir. 3,8,9,13,14,15 numaralı kuyularda 224 bç'lik bantlar görülmekte olup bunlar delesyonun görülmediği normal örneklerdir. 4,7,11 numaralı örnekler 224 ve 210 bç'lik bantların her ikisini de göstermekte olup heterozigot örnekleri karakterize etmektedir.

Verilerin analizi SPSS (11.5) istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Durum değişkeni ile sonuç değişkeni arasında dağılım yönünden istatistiksel bir farkın olup olmadığı ise Khi-Kare testi ile araştırılmıştır. Frekans ve yüzde değerleri saptanarak bu iki değişkenin anlamlı bir birliktelik gösterip göstermediği ise Cramer's V katsayısı ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan p değeri <0,05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Üç grup altında toplanmış olan her bir hasta ve kontrol bireyleri için PCR işlemini takiben jel elektroforez ile HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki 14 bazlık delesyonun var olup olmadığı, homozigot yada heterozigot durumu tespit edilmiş ve tablo haline getirilmiştir (Çizelge 4.1.):

| Delesyonun Genotipik Dağılımı | | GRUPLAR | | | TOPLAM |
|-------------------------------|---|---------|--------|--------|--------|
| | | GRUP 1 | GRUP 2 | GRUP 3 | |
| Normal | # | 32 | 17 | 22 | 71 |
| | % | %45.1 | %23.9 | %31.0 | %100.0 |
| Heterozigot | # | 54 | 30 | 24 | 108 |
| | % | %50.0 | %27.8 | %22.2 | %100.0 |
| Homozigot | # | 41 | 29 | 34 | 104 |
| | % | %39.4 | %27.9 | %32.7 | %100.0 |
| TOPLAM | # | 127 | 76 | 80 | 283 |
| | % | %44.9 | %26.9 | %28.3 | %100.0 |

Çizelge 4.1. : HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki 14 bazlık delesyonun tez çalışmasına dahil edilen üç gruptaki dağılımı.

Birinci grup (Grup 1); üç defa IVF denenmesine rağmen gebe kalamamış kadınlardan ($n_1=127$), delesyon taşımayanların sayısı 32 (%45.1), heterozigot olan kadınların sayısı 54 (%50) iken homozigot delesyonlu olanların sayısı 41 (%39.4) olarak bulunmuştur. İkinci grup (Grup 2); IVF ile gebe kalabilmiş kadınlardan ($n_2=76$) delesyon taşımayan bireylerin sayısı 17 (%23.9), heterozigot olanlar 30 (%27.2) ve homozigot delesyonlu bireylerin sayısı ise 29 (%27.9) olarak bulunmuştur. Üçüncü grup (Grup 3) fertil kadınlarda ise delesyon taşımayan bireylerin sayısı 22 (%31) ve heterozigot olan bireylerin sayısı 24 (%22.2) iken homozigot delesyonlu bireylerin sayısı ise 34 (%32.7) olarak bulunmuştur.

Her üç grup için çalışmaya dahil edilen örnek sayıları istatistiksel olarak yeterli bulunmuştur. Gruplar öncelikle kendi içinde değerlendirildiğinde fertil olan kontrol gurubunda (Grup 3) saptanmış olan homozigot yapıda delesyon, heterozigot yapıda delesyon ve hiç delesyon bulunmaması durumlarına ait sıklıklar arasında oransal olarak farklılıklar gözlenmesine rağmen

istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya koyulamamıştır ($p>0.05$). Grup 1 ve 2 yine kendi içlerinde değerlendirildiğinde delesyonun bulunmaması, heterozigot yapıda bulunması veya homozigot yapıda bulunması durumları bakımından istatistiksel bir fark ortaya koyulamamıştır.

Her üç grup üyeleri söz konusu delesyonu taşıma (homozigot veya heterozigot) ya da taşıyama (normal) yönünden birbirleriyle karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Durum değişkeni ile (normal, heterozigot, homozigot olmak) sonuç değişkeni (Grup 1, Grup 2, Grup 3) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik tespit edilmemiştir (Cramer's $V=0,083$ ve $p=0,417$).

Sadece heterozigot bireylerin her üç grup için dağılımına baktığımızda IVF ile gebe kalamayan kadınlarla (Grup 1), IVF'e cevap veren kadınlar (Grup 2), ve fertil kontrol grubuna dahil olan kadınlar (Grup 3) için heterozigotluk oranları sırası ile (%50), (%27.8) ve (%22.2) olarak tespit edilmiş olup bu değerler arasında net bir oransal farklılık göze çarpmaktadır ($p=0.189$).

5. TARTIŞMA

İlk tüp bebek Louise Brown'nun 28 yıl önce doğumundan bu güne kadar IVF teknikleri ile 3 milyonu aşkın bebek dünyaya geldi. ESHRE'nin (European Society of Human Reproduction and Embryology = Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Birliği) 2002'deki yıllık konferansında sunulan rapora göre o yıl içinde 200 bin tüp bebek dünyaya gelmiştir. Bu rakam 1989 yılında toplanan ve dünya çapındaki ilk data olan deklarasyona göre 30 bin tüp bebeğin dünyaya geldiği düşünüldüğünde IVF yöntemlerine duyulan ihtiyaç ortaya çıkmaktadır. Dünya üzerindeki her 6 çiftten birinin kısırlık problemi vardır (<http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=806>). Taze embriyolarla (dondurma çözme işlemi yapılmamış) yapılan transferler sonucu elde edilen gebelik oranı genel ortalama olarak %25.1, doğum oranı ise %18.5 olarak verilmektedir. Ancak bu oranların ülkelere göre dağılımı gebelik için %13.6 ile %40.5 arasında ve doğum için %9.1 ile %37.1 arasında değişmektedir. Teknolojik ilerlemeler, daha yüksek gebelik ve doğum oranlarını sağlamak üzere IVF tekniklerinin geliştirilmesi için yoğunlaştırılmıştır. Öncelikli hedef gebelik ve doğum oranlarının arttırılması olup bu amaçla implantasyon olayının mekanizmasının çözülebilmesi ve gebelik oluşturabilme potansiyeli yüksek embriyoyu seçebilmeyi sağlayacak ve rutin tedavilerde kullanılabilecek bir biyomarker'in bulunması gerekmektedir. Bu konuyla ilgili olarak HLA-G ile ilgili çalışmalar git gide artmaktadır. Özellikle HLA-G geninin ekspresyonu ile ilgili çalışmalar başta olmak üzere bu genin polimorfizmlerini ortaya koyan çalışmalar gündemdedir. HLA-G geninin 3'UT bölgesindeki 14 bç'lik delesyon polimorfizminin genin transkriptinin stabilitesi üzerine ve ekspresyon düzeyine olan etkisinden dolayı bu polimorfizmle ilgili çalışmalar artmaktadır. Daha çok tekrarlayan düşük vakalarında bu polimorfizme bakılmakta olup gerek polimorfizmin farklı populasyonlarda farklı sıklıklar göstermesi gerekse çalışma grubunun genişletilmesi ihtiyacı sebebiyle biz de tez çalışmamızda bu polimorfizmin IVF olgularındaki sıklıklarını vermeyi uygun gördük.

Bu tez çalışmasında HLA-G geninde tanımlanmış olan 14 bç'lik delesyon polimorfizminin implantasyon başarısı ve gebelik üzerine etkileri değerlendirildi. Yapılmış çalışmalar söz konusu polimorfik değişikliklerin sadece implantasyon başarısı ve gebelikle değil aynı zamanda oluşmuş olan gebeliğin devamı üzerine de etki ettiğini ortaya koymuştur (Hunt ve ark., 2006). Tripathi söz konusu delesyonun normal fertil kadınlar ile tekrarlayan spontan düşük olgularından oluşan grup arasında sıklık farkını değerlendirdiği çalışmasında heterozigot delesyon taşıyan bireylerin tekrarlayan spontan düşük olgularında anlamlı ölçüde yüksek olduğunu ancak homozigot delesyonun iki grup arasında farklılık göstermediğini ortaya koymuştur. Tripathi tekrarlayan gebelik kaybının altında yatan mekanizmayı çözülebilir HLA-G'nin ışığı altında tartışmıştır (Tripathi ve ark., 2004). Tekrarlayan gebelik kayıplarında çözülebilir HLA-G delesyonuna ait heterozigozitenin yüksek bulunması gebelik başarısının olumsuz yönde etkilenmesine yol açmıştır. Ancak buna karşılık Hviid ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Tripathi'nin aksine fertil kontrol grubunda tekrarlayan düşük olgularına oranla heterozigot yapıda delesyon sıklığını daha yüksek bulmuştur. Hviid'in çalışmasındaki bu farkın çalışmaya dahil edilen hastaların etnik farklılıklarından ve hasta seçiminden kaynaklanabileceği öngörülmüştür (Hviid ve ark. 2002).

HLA-G'nin çözülebilir izoformu, splicing sırasında dördüncü intronun olgun transkriptte kalması sonucu oluşmaktadır. Bu intronda "dur" kodonunun olması nedeniyle transmembran ve sitoplazmik bölgelerdeki translasyonu önlemekte ve çözülebilir formun oluşmasına neden olmaktadır. Çözülebilir HLA-G maternal ve fetal immün cevabı önemli ölçüde etkilemekte ve böylece maternal T hücrelerinin fetusa karşı alloimmün atağını azaltmakta ya da önlemektedir. Çözülebilir HLA-G1 aktifleşmiş CD8+ hücrelerinin apoptozisini de uyarmaktadır (Yang ve ark., 1996).

HLA-G ile gebelik başarısı arasındaki ilişki birçok araştırmacı tarafından ortaya koyulmakla birlikte asıl bağlantının gebeliğin başlayabilmesi mi (implantasyon) yoksa oluşmuş olan gebeliğin devam edebilmesi mi olduğu çok açık olmamakla beraber görünüşe göre fertilité sürecinin tamamını yakından etkilediği düşünölebilir. Hatta bazı çalışmalar embriyonel düzeyde HLA-G ekspresyonunun mevcut olmasının embriyonun implantasyon kapasitesini olumlu yönde etkilediğini ortaya koymuştur. (Fuzzi ve ark., 2002) HLA-G'nin IVF programlarında embriyonun implantasyon potansiyelini yansıtan bir marker olabileceğini öne süren Noci ve arkadaşları, HLA-G ekspresyonunun varlığı ile embriyo kalitesi arasındaki korelasyonu değerlendirmişlerdir (Noci ve ark.,2004).

Bu çalışmada mikroenjeksiyonu takiben 48 saat ve 72 saat sonra embriyoların kültür edildikleri medyumlardan alınan numunelerde ELISA ile HLA-G varlığı bakılmıştır. 66 hastanın 318 embriyosunun değerlendirildiği bu çalışmada 115 embriyo HLA-G pozitif (ekspresyon var) bulunmuştur. Çalışmada HLA ekspresyonunun pozitif olduğu 40 hastadan 9'unda gebelik elde edilmiştir. Bu oran kabaca HLA-G ekspresyonunun gebelik başarısını olumlu etkileyebileceği ya da embriyonun implantasyon potansiyelini yansıtabileceğini desteklememektedir. Ancak çalışma detaylandırıldığında; Noci ve arkadaşları vaka düzeyinde embriyo kültür medyumundaki HLA-G ekspresyonu ile embriyo morfolojisi arasında bir ilişki bulamamış veya embriyonun HLA-G eksprese edip etmeme durumunun siklulardan bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır (Noci ve ark., 2004). Diğer yandan Tesarik ve Braude'nin söylemlerine göre; insan embriyogenezinin ilk iki hücrelik dönemi maternal olarak aktarılan bilgiler kullanılarak posttranskripsiyonel seviyede düzenlenir ve embriyonik genomun aktivasyonu 4-8 hücre aşamaları arasında olur ki protein sentezi ve ileri embriyonik bölünmelerin gerçekteşmesi için bu süreç esastır (Tesarik ve ark., 1986; Braude ve ark.,1988). Bu bilgilerin ışığında, fertilizasyonu takiben yumurtanın DNA'sının aktive edilmesi 2. gün kültür medyumunda HLA-G taramasına olanak sağlayabileceği

düşünülmüş ancak yine İtalyan ekibin araştırmaları sonucu bu olayın sıkça görülmemesi nedeniyle desteklenmemiştir. Bunun aksine 3. gün medyumunda 10 embriyodan 4'ünde muhtemelen embriyonik genomun aktive olması sebebiyle HLA-G varlığı gözlenmiştir. Bu çalışmada blastokist aşamasındaki (5.gün) embriyoların kültür medyumunun değerlendirilmesine ait bilgi yoktur. Jurisicova 1996'da RT-PCR ile yaptığı çalışmada taradığı 148 blastokistin %40'ında HLA-G mRNA ağır zincirini belirlemiştir (Jurisicova ve ark., 1996). Hiby ise hiç ekspresyon bulamamıştır ancak 2 hücre aşamasından blastokist aşamasına kadar inceleme yaptığı çalışmada yalnızca 11 embriyoyu değerlendirmiştir (Hiby ve ark.,1999). İtalyan grubun çalışmasında da Jurisicova'yı destekler nitelikte bir sonuç elde edilmiş 3. gün değerlendirmelerinde 10 embriyonun 4'ünde HLA-G varlığı belirlenmiştir (Fuzzi ve ark.,2002). Jurisicova'nın yaptığı bir başka çalışmada ise blastokistte HLA-G mRNA'sının daha yüksek oranda (%90) bulunduğu bildirilmiş ancak bu çalışmada farklı bir RT-PCR yaklaşımı kullanılmış, düşük transkripsiyonel aktiviteyi elimine eden uzama faktörünün (EF-1 α) ekspresyonuna göre embriyolarda bir ön seçim yapılmıştır (Jurisicova ve ark.,1999). Bu çalışmanın bir başka amacı da HLA-G üretimi ile kültür edilen embriyoların kalitesi arasındaki ilişkiyi belirlemektir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı böylesi bir ilişki saptanmamıştır.

HLA-G son dönemde bazı araştırmacılar tarafından IVF ile gebelik elde etmede biyokimyasal bir marker olarak önerilmekte olup preembriyonik dönemde HLA-G ekspresyonunun varlığı kültür medyumunu örneklerinden ELISA tekniği ile bakılmaktadır (Sher ve ark., 2005a,b, Fuzzi ve ark., 2002). Sadece HLA-G eksprese eden embriyoların transfer edilmesi ile gebelik başarısını arttırma düşüncesini destekleyecek moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır. Gerek gamet hücrelerinin HLA-G eksprese edip etmediği gerekse preembriyonik dönemdeki embriyoların hangi aşamalarda HLA-G eksprese ettikleri konusundaki ilk moleküler çalışmalar Jurisicova ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (Jurisicova ve ark., 1996). Jurisicova, gamet ve farklı

gelişim aşamalarındaki preembriyoların HLA-G ekspresyonunu nested RT-PCR metodu ile belirlemeyi amaçlamıştır. Tek hücreden ekspresyon göstermenin teknik zorluklarından dolayı tek bir tüpte aynı gelişim aşamasındaki birden fazla embriyoyu değerlendirmeye almıştır. Blastokist aşamasındaki hücreleri, değişik klivaj aşamasındaki embriyolardan 5 embriyoyu ve 5-8 adet fertilize olmamış yumurtayı aynı tüpte değerlendirmiş, kontrol olarak JEG-3 (koryokarsinoma hücre dizisi) ya da kümülüs hücreleri olmak üzere ≈ 100 hücreyi analiz etmiştir. 49 çiftten elde edilen 164 blastokistin 71 tanesi (%43.3) HLA-G pozitif olarak bulunmuştur. Fertilize olmamış yumurtalarda da HLA-G ekspresyonu olduğunu belirlemiştir. Farklı çiftlerin 2-4, 5-8, 9-16 blastomerli ve morula aşamasındaki embriyolarının tek tüpte nested RT-PCR ile değerlendirilmesi sonucu bu embriyoların HLA-G eksprese ettikleri görülmüş, klivaj oranı ile HLA-G ekspresyonunun düzeyi arasında pozitif ilişki bulunmuştur. Embriyonun klivaj oranının başarılı gebelik oluşturabilme kapasitesini yansıttığı öngörüldüğünden (Sauer ve ark., 1987, Bolton ve ark., 1989) Jurisicova HLA-G eksprese eden hücrelerin seçiminin gebelik oranının artırılmasında önemli olabileceği yargısına varmıştır. Jurisicova'nın çalışması embriyonun HLA-G ekspresyonu moleküler düzeyde belirleyen bir çalışma olması bakımından son derece önemli bir çalışmadır ancak bu çalışmanın devamını getiren çok az araştırmacı vardır. Hiby ve arkadaşlarının 1999 yılında yayınlanan çalışmalarında 2 hücreli aşamadan blastokist aşamasına kadar 11 embriyoda nested PCR ile HLA-G ekspresyonuna bakılmış ve preembriyonik dönemdeki hiçbir embriyoda ekspresyon olmadığı kaydedilmiştir (Hiby ve ark., 1999). Hiby ayrıca sperm hücrelerinde HLA-G ekspresyonunun olmadığını da belirtmiştir ancak toplam altı semen örneğini değerlendirmeye almıştır. Literatürdeki moleküler düzeydeki çalışmaların azlığı ve bu çalışmalarda değerlendirmeye alınan vaka sayısının artırılması gereği açıkça ortadadır. Ayrıca embriyoları tek tek değerlendirmek implantasyon potansiyeli yüksek olan embriyonun seçilmesinde HLA-G varlığının belirleyici bir marker olarak kullanılıp kullanılmayacağı tartışmasını açığa kavuşturacaktır.

Embriyo implantasyonu doğal şartlarda kolayca oluşabilen bir olay değildir. Fertilize olan yumurtaların %78'i doğumla sonuçlanmaz ve konseptusların %62'si gebeliğin 12. haftasından önce kaybedilmektedir (Edmonds ve ark., 1982). Embriyo implantasyonu IVF olgularında da başarıyı sınırlayan önemli bir faktördür. İmplantasyon olayındaki olası bir biyolojik problem de embriyo bir organ transplantı gibi düşünüldüğünde HLA-G antijeninin immün düzenleyici rolü dikkatleri çekmiştir. Fuzzi ve arkadaşlarının 2002 yılında yayınlanan çalışmalarında sperm ve oosit kültür medyumlarının süpernatantlarından alınan 20 örnekte HLA-G antijeni bulunamamıştır. 48'i konvansiyonel IVF, 58'i ICSI protokolü uygulanan 101 IVF hastasının değerlendirmeye alındığı çalışmada 285 süpernatant incelenmiş ve kültür medyumunda HLA-G olup olmamasına göre iki grup oluşturulmuştur. HLA-G negatif embriyolarla yapılan transferler sonucu gebelik elde edilemezken HLA-G pozitif embriyolarla yapılan transferlerin %24'ünde gebelik elde edilmiştir (Fuzzi et al, 2002). Çalışmaya alınan hasta grubunun heterojenitesi göz önünde bulundurulduğunda %24'lük gebelik oranı tatmin edici görünmekle birlikte sonuçlar HLA-G ekspresyonunun gebelik elde etmedeki etkisi açısından oldukça iddialıdır. Fuzzi ve grubunun çalışmasında monoklonal antikor kullanılarak ELISA tekniği uygulanmış, spesifik RT-PCR tekniği uygulanmamıştır ve dolayısıyla farklı izoformlar ayırt edilememiştir.

Hem önceki hem de yeni yayınlanmış makalelerde preimplantasyon embriyo gelişimi ve metabolizmasında bazı moleküllerin öneminden bahsedilmiştir (O'Neil ve ark., 1987; Gardner ve Leese, 1993; Gardner ve ark., 2001; Hannis ve Edwards, 2003). Bununla birlikte bu metabolitlerden hiçbiri klinik uygulamalarda embriyo seçiminde rutin olarak kullanılmamıştır; yalnızca PAF'ın embriyo canlılığının belirlenmesinde indikatör olarak kullanımı amaçlanmıştır (Roudebush ve ark., 2001,2002).

Embriyoların HLA-G ekspresyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapan İtalyan grubun bir diğer çalışmasında ise HLA-G varlığı ile embriyo kalitesi ve gebelik oranlarını değerlendirmişler ve HLA-G'nin IVF programlarında embriyonun canlılığının belirlenmesinde potansiyel bir marker olduğunu öne sürmüşlerdir. İtalyan ekibin önceki araştırmalarında, klasik embryo takip metodunu (grup kültür: birden fazla embriyonun bir arada kültür edilmesi) kullanıp birden fazla (1-4 adet) embriyoyu aynı ortamda kültür ettiklerinden embriyoların ayrı ayrı HLA-G üretimini değerlendirememişler ve bu çalışmalarında her embriyoyu ayrı ayrı inceleyerek transfer ettikleri embriyolar hakkında da bilgi sahibi olmuşlardır. Bu çalışmada embriyo kültür medyumundaki HLA-G seviyesi ile embriyo morfolojisi arasında bir ilişki olup olmadığına da bakılmış ancak böyle bir ilişki bulunamamıştır. (Noci I et al 2004) Bu çalışmada temel amaç; IVF sikluslarında embriyoların kültür edildiği medyumlardan alınan örneklerde ELISA yöntemi ile çözülebilir HLA-G varlığının saptanması ve bunun embriyonun gelişimsel potansiyelini ölçmede bir marker olarak kullanımının sağlanması olarak planlanmıştır. Elde edilen ilk belirleme; embriyo kültüründeki HLA-G ekspresyonunun oluşumunun zaman isteyen bir olay olduğudur. İkinci gün medyumunda süpernatantların sadece %8.9'unda HLA-G sekresyonu saptanmış, üçüncü güne bakıldığında ise oran %36.2 olarak bulunmuştur. Gamet hücrelerinde ise (sperm ve yumurtalar) HLA-G bulunamamıştır.

Akla gelen bir diğer soru ise "HLA-G üretimi ile gebelik elde etme arasında bir ilişki var mı?" sorusudur. HLA-G pozitif embriyosu olmayan 52 vakanın hiçbirinde gebelik elde edilememesi bu korelasyonu ortaya koyuyor aslında. Bununla birlikte HLA-G eksprese eden embriyosu olan 40 hastadan sadece 9'unda gebelik elde edilmesi HLA-G taramasının pozitif belirlemede düşük bir değere sahip olduğunu göstermektedir. Eğer klinik gebelik elde etmede bir seçim metodu aranıyorsa řu üç belirlemenin birlikte yapılmasının uygun olacağı düşünülebilir. (i) *Kromozomal embriyo değerlendirmesi*: preimplantasyon genetik tarama sonucunda embriyoların %70

kadarının kromozomal olarak anormal olduğu ortaya konmuş olup (Pehlivan ve ark., 2003, Shenfield ve ark., 2003) kromozomal olarak anormal yapı gösteren yeni doğanların oranının düşük olması bu konseptusların implante dahi olamadıklarını göstermektedir. Pek çok HLA-G eksprese eden embriyo transferi sonucu gebelik elde edilememektedir çünkü bu embriyolar kromozomal anomali taşıyor olabilir. (ii) *endometriyal reseptivite*: IVF uygulamalarında endometriyum morfolojisinin değişikliğe uğradığı ortaya konmuştur. Bu nedenle bazı HLA-G pozitif embriyoların transfer edildiği olgularda endometriyal reseptivitedeki bu değişim gebeliği önüyor olabilir. (iii) *Embriyo transferi*: IVF programında embriyo transfer tekniği gebelik elde etmede en önemli işlemdir. Bu nedenle HLA-G pozitif embriyolar transfer ediliyor olmasına rağmen etkin transfer işleminin yapılamamasından dolayı ya da transfer işleminin başarısız bir şekilde yapılmasından dolayı gebelik elde edememek sürpriz bir sonuç değildir.

İtalyan ekibin daha önceki çalışmalarının da bir sonucu olarak bir çiftin farklı IVF sikluslarında HLA-G eksprese eden embriyo/embriyolar oluşturma ihtimali vardır. Bu belirleme parental genom düzenlenmelerinin, hangi embriyonun HLA-G eksprese edeceğinin belirlenmesinde önemli rol oynadığını ortaya koymakta olup bu hipotez daha önceki çalışmalarla da desteklenmiştir (Rebman ve ark., 2001, Hviid ve ark., 2004a,b).

Yüksek hassasiyetteki sandwich ELISA metodu kullanılarak insan embriyolarının salgıladığı HLA-G nin varlığı belirlenerek embriyo gelişiminin ve/veya IVF gebeliklerini analiz edilmesinin amaçlandığı bir başka çalışmada ise 137 IVF siklusundan toplanan 386 embriyo kültür mediumu örneği incelenmiştir. HLA-G varlığı belirlenmiş medyumdan alınan en az bir embriyonun transfer edildiği grubun HLA-G pozitif olarak değerlendirildiği çalışmada 386 embriyo kültür mediumu örneğinin 270 tanesinde (%69.9) çözülebilir HLA-G varlığı belirlenmiştir. Yaş, embriyo kalitesi ve droplet başına düşen embriyo sayısı HLA-G pozitif ve negatif gruplar

arasında kıyaslanmış bu parametreler bakımından farklılık bulunamamıştır. HLA-G pozitif grupta negatif gruba nazaran embriyo klivajı oranının anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. HLA-G pozitif grup örnekleri ortalama blastomer sayılarına bağlı olarak 4 ana gruba ayrılmış (Grup 1: ≤ 4 blastomer, Grup 2: $>4-6$ blastomer, Grup 3: $>6-8$ blastomer, Grup 4: >8 blastomer) bu gruplar arasındaki ortalama HLA-G konsantrasyonları kıyaslanmıştır. Çözülebilir HLA-G konsantrasyonu 1. grupta en düşük 4. grupta ise en yüksek değerde bulunmuştur.

Bu çalışmaya dahil edilen 137 çiftin 51'i sağlıklı bebek sahibi olmuş, 9'u spontan düşük yapmış ve 77'sinde gebelik elde edilememiştir. HLA-G pozitif embriyoların transfer edildiği hastalarda (%48.4) negatif gruba göre (%17.1) gebelik oranları daha yüksek kaydedilmiştir. Bu nedenle HLA-G'nin pozitif olmasının gebelik oranlarını yükseltmede embriyo klivaj oranlarından daha belirleyici olduğu ortaya koyulmuştur. Oluşan gebeliklerin %88'i HLA-G pozitif gruba aitken yalnızca % 16.2'si negatif gruba ait olduğu kaydedilmiştir (Yie ve ark., 2005).

Bu çalışmada ayrıca hem HLA-G ekspresyonu hem de embriyo klivaj oranı dikkate alınarak gruplandırma yapılmış ve genel gebelik oranları da incelenmiştir. Bu gruplar arasında HLA-G negatif ve düşük klivaj görülen grubu en düşük gebelik oranlarını (%15.3) gösterdiği belirlenmiştir. HLA-G pozitif ve yüksek klivaj oranlarına sahip grupta ise gebelik oranları en yüksek (%53.3) olarak kaydedilmiştir. Menicucci'nin HLA-G'nin embriyodaki varlığını immünohistokimyasal olarak belirlediği çalışmasında da embriyo klivaj oranı ile HLA-G varlığının pozitif korelasyonunu desteklemektedir (Menicucci ve ark., 1999). Bu çalışmada hem HLA-G ekspresyonunun hem de yüksek klivaj oranının görüldüğü grupta gebelik oranının en yüksek bulunması transfer edilecek embriyonun seçiminde bu iki parametrenin birlikte kullanılması gerektiğini ortaya koymaktadır (Yie ve ark., 2005).

Yüksek klivaj oranına sahip embriyoların yüksek konsantrasyonda HLA-G eksprese etmelerinin sebebi olarak Ped geninin ve onun ürünü olan Qa-2 antijeninin fare embriyolarının klivaj oranlarını etkilemesi bulgusuna (Warner ve ark., 1987a, Warner ve ark., 1987b) dayandırılmıştır. Çünkü HLA-G'nin Qa-2 antijeninin fonksiyonel homoloğu olabileceği öne sürülmüş (Cao ve ark., 1999) ve bu nedenle embriyoların HLA-G salgılamaları embriyo gelişimini arttırabilir sonucuna varılmıştır. Bu da grup halinde kültür edilen embriyoların klivaj oranlarının niye arttığı (Moessner ve ark., 1995, Almajor ve ark., 1996) bir açıklaması olabilir.

Bu çalışmada da sonuçların keskinliğini sınırlayan en büyük faktör embriyoların tek tek değil de grup halinde kültür edilip HLA-G pozitif gruplardan alınan rastgele embriyoların transferinin yapılmasıdır. Halbuki embriyolar tek tek kültür edilip sadece HLA-G pozitif embriyoların transferi yapılmış olsaydı verilen gebelik oranları ve diğer korelasyonlar farklı düzeyde olabilirdi. Ancak bu çalışmada araştırmacıların rapor ettikleri gebelik oranları bu koşullara göre yinede yüksek görünmekte.

Embriyo kültür medyumlarında belirlenen çözülebilir HLA-G'nin belirlenmesinin implantasyon ve gebelik oluşturma potansiyeli yüksek embriyonun seçiminde (Kovats ve ark., 1997) ve böylece daha az embriyo transferi yapılarak çoğul gebelik ihtimalinin azaltılmasında da rol oynayabileceği ihtimali bu konudaki çalışmaların kuvvetlendirilmesi gereğini orataya koymaktadır.

Amerikalı grup Sher ve arkadaşları da kültür medyumundan ELISA tekniği ile HLA-G pozitif embriyoların seçilerek transferi sayesinde IVF'te gebelik oranlarını arttırma yönünde çalışmalar (Sher ve ark., 2004, 2005) yapan öncü gruplardan olup mikroenjeksiyonu 46 saat takiben alınan kültür medyumundan HLA-G salınımına bakıp implantasyon potansiyeli yüksek embriyoyu

seçerek transfer etmenin önemini vurgulamaktadırlar. Sher ve arkadaşlarının bulguları Noci'nin HLA-G ekspresyonu ile embriyo morfolojisi arasında bir ilişki olmadığı sonucunu (Noci I ve ark., 2005) desteklememektedir. Sher, 482 kadının embriyolarını değerlendirmeye aldığı çalışmasının (Sher ve ark., 2005) sonuçlarını, Noci'nin çalışma grubunun sayısal azlığından dolayı daha güvenilir bulmakta. Sher ayrıca IVF laboratuvarları eğer HLA-G pozitif embriyoların seçilerek transferini rutin bir yöntem olarak kullanacaksa, embriyoları grup kültürü yerine tek tek kültür edilmesi gerektiğini orataya koymaktadır.

Sher ve arkadaşları 2005 yılında yayınlanan bir başka çalışmalarında 201 kadının ICSI sonrası embriyolarında HLA-G varlığını incelemişler ve en az bir HLA-G pozitif embriyonun transfer edildiği sikluslar için gebelik oranlarının % 71 (<39 yaş) ve %52 (39-43 yaş) transfer edilen tüm embriyoların HLA-G negatif olduğu sikluslarda gebelik oranlarının % 15 (<39 yaş) ve %5 (39-43 yaş) olduğunu rapor etmişlerdir (Sher ve ark., 2005)

Görüldüğü üzere yapılan çalışmaların genel kanısı HLA-G molekülünün preembriyonik dönemde de eksprese olduğu ve implantasyon sürecinde önemli rol oynayan bir molekül olduğu yönündedir. Ancak çalışmaların rapor ettiği oranlar birbirlerine göre farklılık göstermekte ve çalışma planlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda yapılan ve yapılacak çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Oldukça polimorfik bir yapı gösteren HLA geni ayrıntılı olarak incelenmiş ve varyantları belirlenmiştir. Son dönemlerde maternal HLA-G genotipi ve/veya polimorfizmler ve (tekrarlayan) spontan düşükler arasında ilişkiyi destekleyen çalışmalar artmaktadır (Hviid ve ark., 2002, Pfeiffer ve ark., 2001). Üç veya daha fazla tekrarlayan spontan düşüğü olan kadınlarda HLA-G geninin sekizinci ekzonunda 3' UT bölgesindeki 14bp'lik delesyon/insersiyon polimorfizminin homozigot sıklığının fertil kontrol grubu kadınlara göre yüksek olması dikkatleri bu polimorfizmin üzerinde toplamıştır.

Önceki çalışmalarında 14 bç'lik polimorfizminin homozigot delesyonun oranının, üç veya daha fazla tekrarlayan spontan düşüğü olan kadınlarda fertil kontrol kadınlara göre yüksek olduğunu belirleyen Hviid ve arkadaşları (Hviid ve ark., 2002) bu delesyonun farklı IVF gruplarındaki durumunu incelemek ve tekrarlayan spontan düşük vakalarına daha ayrıntılı sonuçlar vermek üzere yeni bir çalışma planlamışlardır. Gebelik başarısı ile HLA-G geni polimorfik delesyonu arasındaki ilişkiyi vurgulayan Hviid ve arkadaşları yaptıkları çalışmaya dahil ettikleri kadınları 4 ayrı guruba ayırmış: 3 ve daha fazla IVF denemesine rağmen gebe kalamayan hastalar (n=14), IVF denemesi sonrası ikiz gebe kalan kadınlar (n=15), 3 ve üzerinde gebelik kaybı bulunan kadınlar (n=61) ve ikiden fazla gebelik ve doğumu olan fertil kontrol gurubu (n=93) olarak sınıflandırmışlardır (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1.: Üreme öykülerine göre gruplandırılan kadınların HLA-G genotipleri

| HLA-G genotipi (3'UT bölgesi polimorfizmi) | Başarısız ≥ 3 IVF denemesinin ardından gebelik elde edilememiş. (n=14) | İlk IVF denemesinin ardından ikiz gebelik elde edilen grup (n=15) | ≥ 3 tekrarlayan spontan düşük (n=61) | Fertil kontroller (≥ 2 gebelik ve doğum) (n=93) |
|--|---|---|---|---|
| -14bç/-14bç | 5 (%35.7) | 6 (%40) | 19 (%31.1) | 31 (%33.3) |
| -14bç/+14bç | 5 (%35.7) | 9 (%60) | 27 (%44.3) | 52 (55.9) |
| +14bç/+14bç | 4 (%28.6) | 0 (%0.0) | 15 (%24.6) | 10 (%10.8) |

* **-14bç/-14bç** : delesyon yok

* **-14bç/+14bç** : delesyon heterozigot

* **+14bç/+14bç** : delesyon homozigot

Hviid ve arkadaşları çalışma gruplarını dizayn ederken 3 ve daha fazla IVF denemesine rağmen gebe kalamayan kadınları gebelik başarısı en kötü olan grup olarak ele alırken ikiz gebe kalan grubu ise gebelik başarısı yüksek olan hasta gurubu olarak kabul etmiştir. Buna göre gebelik başarısı en yüksek grupta 14 bç'lik delesyon homozigot olarak mevcut iken yine aynı grupta

delesyonun hiç bulunmadığı kişi sayısı 0 (sıfır) olarak bildirilmiştir. Diğer yandan gebelik başarısı en kötü olan grupta 14 bç'lik delesyonun homozigot, heterozigot veya yokluğu arasında anlamlı bir fark ortaya koyulamamıştır. Yine fertil kontrol gurubu ile kıyaslandığında 3'ten fazla gebelik kaybı bulunan olgularda delesyonun dağılımı farklı bir oran sergilemektedir. Bu oranların diğer çalışma sonuçlarından farklı olması veya benzer olması yine sözkonusu delesyonun polimorfik davranışından ve toplumsal farklılıklardan kaynaklanabileceğini ortaya koymaktadır. Yine aynı şekilde kendi çalışma gurubumuzda IVF ile gebelik elde edilemeyen guruba ait sonuçlarla Hviid ve arkadaşları'nın benzer gruptan elde ettikleri sonuçlar kıyaslandığında söz konusu delesyonun dağılım sıklığının benzer özellikler gösterdiği gözlenmiştir. Ancak Hviid ve arkadaşlarının çalışmasında IVF'e cevap veren grupta delesyonsuz normal olgunun bulunmaması ve fertil kontrol gurubunda ise oldukça düşük oranda (%10.8) bulunması bizim bulgularımızdan önemli bir farklılık olarak dikkati çekmektedir. Bu farkın Hviid ve arkadaşları'nın çalışma gurubundaki vaka sayısının azlığından ve etnik farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür (Hviid ve ark., 2004).

Gerek kendi sonuçlarımız ve gerekse Hviid ve arkadaşlarının sonuçları dikkate alındığında IVF yöntemi uygulanarak gebelik sağlanan grup ile fertil kontrol grubunda homozigot delesyon oranının yüksek bulunması söz konusu delesyonun implantasyon üzerine beklenen negatif etkisine ters düştüğü söylenebilir. Zira HLA-G genindeki 14 bç'lik delesyonun mRNA stabilitesini bozarak ekspresyon düzeyini olumsuz yönde etkilemesi öngörülmektedir. Ancak daha net sonuçlara ulaşmak için vaka sayılarının artırılması ve yeni polimorfizmlerin ortaya koyulması veya değişik populasyonlara (ırk veya coğrafi farklılıklar yönünden) ait çalışmaların planlanması gerekir.

Hviid ve arkadaşları, HLA-G genotipinin tekrarlayan spontan düşük olgularının yanı sıra IVF olgularında da kadın subfertilitesinde önemli olabileceğini öne sürmektedirler. Tekrarlayan spontan düşüklere HLA-G polimorfizmlerin potansiyel önemini ortaya koyan birkaç çalışma (Pfeiffer ve ark., 2001, Aldrich ve ark., 2001) olmakla birlikte bu çalışmalarda 14 bç'lik delesyon/insersiyon polimorfizmi incelenmemiştir. Bu polimorfizm pre-eklampatik vakalarda irdelenmiş (O'Brien ve ark., 2001), yeni bir çalışmada ise gebelik kayıplarında bakılmıştır (Ober ve ark., 2003). 162 çiftin değerlendirildiği bu çalışmada fetal kayıp ile 14 bç'lik delesyon/insersiyon polimorfizmi arasında ilişki bulunamamıştır. Fetal kayıp oranlarıyla ilişkili bulunabilen yegane polimorfizm transkripsiyon başlangıç bölgesinin -725 upstream kısmında bulunan tek nükleotid (C→G) polimorfizmdir. Bu polimorfizm sadece 14bç'lik delesyonun olduğu haplotiplerde belirlenmiştir. Farklı ırkların ve farklı coğrafi bölgelerde birbirinden izole yaşayan insanların arasında HLA haplotiplerinde farklılıklar olduğuna işaret edilmektedir.

Hviid ve arkadaşlarının çalışmalarında HLA-G mRNA'sının düşük seviyedeki ekspresyonu ile HLA-G*010102 allelini taşıyan birinci trimester trofoblast örneklerindeki 14bç'lik sekansın varlığı ve HLAG mRNA'sının düşük seviyede olması arasında ilişki bulunmuştur. 14bç'lik sekansı içeren allellerde 8. ekzonun ilk 92 bç'inin olmadığı ekstradan HLA-G mRNA izoformları belirlenmiştir. Böylece 14 bç'lik polimorfizmin HLA-G mRNA'sının stabilitesini etkileyebileceği ortaya koyulmuştur (Hviid ve ark., 2003 Rousseau ve ark., 2003). 14bç'lik polimorfizm, farklı HLA-G izoformlarının ekspresyon düzeylerini etkileyebilen diğer sekans varyasyonları ile ilişkilidir. Bu ilişki linkage disequilibrium (farklı lokuslardaki genler arasındaki tesadüfi olmayan ilişki) olarak nitelendirilmektedir. Burada ortaya koyulan bulgular, HLA-G ve IVF ile ilgili olan bağımsız üç çalışma ile de desteklenmektedir. Birinci çalışmada, HLA-G mRNA'sının ekspresyonunun var olduğu erken insan embriyolarında HLA-G transkriptinin olmadığı embriyolara kıyasla klivaj oranı yüksek bulunmuştur (Jurisicova ve ark., 1996). İkinci çalışmada

ise sadece çözülebilir HLA-G nin pozitif olduğu embriyoların transferi sonucu başarılı implantasyon sağlanmıştır (Fuzzi ve ark., 2002). Üçüncü çalışmada ise IVF ile elde edilen erken gebelik ve gebelik öncesi kan örneklerinde çözülebilir HLA-G belirlenmiştir. Erken gebelik tecrübesi olan 20 kadında, başarılı sürekli gebeliği olan 37 kadına göre çözülebilir HLA-G seviyesi oldukça düşük bulunmuştur. Feto-maternal yüzeyde HLA-G nin en önemli fonksiyonları NK hücrelerinin oluşturduğu lizisi inhibe etmek ve normal (komplikasyonsuz) gebeliklerde olduğu gibi T-helper (Th1) den Th2 sitokin profiline dönüşü sağlamasıdır. Bazı HLA-G genotipleri ile ilişkili HLA-G ekspresyonundaki değişiklikler bu mekanizmalara ve böylece gebelik oranlarına etki edebilmektedir. Ancak HLA polimorfizmlerinin üreme ile bağlantısının netleşmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Hviid'in 2002 yılındaki çalışmasında beklenilenden daha fazla heterozigot yapıda 14bç'lik polimorfizm kaydedilmiştir. Bu durum bu polimorfizmin gebeliğin ve fetal canlılığın sağlanmasında önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Fertil kadınlardaki bu heterozigotluk yüksek iken tekrarlayan spontan düşük olgularında +14bç/+14bç homozigot genotip oranının yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirtilmiştir. Tekrarlayan düşük olgularında kadının +14bç/+14bç genotipte ve eşinin -14bç/+14bç genotipte olma sıklığı %13 iken fertil grupta % 12'dir. Tekrarlayan düşük olgularında +14bç/+14bç homozigot annenin +14bç/+14bç fetusunun olma ihtimali %18 iken fertil grupta ise %5'dir. Hem annenin hem de fetusun heterozigot olması tekrarlayan düşük olgularında %22 iken fertil grupta %32'dir. Annenin +14bç/+14bç homozigot yapıdansa heterozigot olması, heterozigot yapıda fetusun oluşmasına ve gebelik başarısının artmasına neden olmaktadır. Bu durum, 14bç'lik sekansın HLA-G mRNA izoformlarının konsantrasyonları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Annenin HLA-G genotipi maternal fetal etkileşimler açısından oldukça önemlidir (Hviid ve ark 2002).

14bç'lik dizi ile HLA-G m-RNA izoformunun patterninin ve konsantrasyonunun değişimi arasında direkt ilişki vardır (14). G*01013 (+14bç) ve G*0105N (+14bç) gibi bazı HLA-G allelleri düşük sekresyon yapan alleller olarak bilinirler. G*01041 (-14bç) gibi yüksek sekresyon yapan allelelerin çözülebilir HLA-G'nin plazmadaki seviyesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. G*01013/G*01041 genotipli probandın plazmasında çözülebilir HLA-G çok düşük miktarda tespit edilmiş olup düşük sekresyon yapan allelelerin, yüksek sekresyon yapan allelelere dominant olabileceği öne sürülmektedir. Heterozigot genotip yapıda, düşük sekresyon yapan allelelerin, yüksek sekresyon yapan allelelere dominant olması çözülebilir HLA-G'nin miktarını düşürmektedir. Tripathi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, fertil kontrol grubu kadınlarda -14bç/-14bç, tekrarlayan düşük olgularına kıyasla yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada dikkat çekici olarak tekrarlayan düşük olgularında heterozigot yapı yüksek bulunmuş ve bu durum çözülebilir HLA-G miktarının azalmasına bağlı olarak gebeliğin olumsuz etkilendiği sonucuna dayandırılmıştır.

HLA-G geni düşük polimorfizm göstermesine rağmen bu polimorfizmler protein ekspresyonunun düzeyini etkileyebilir ve bazı olgularda gebelik bozuklukları ile ilgili olabilir düşüncesi pek çok çalışma ile desteklenir hale gelmiştir. (O'Brian ve ark., 2001, Hviid ve ark., 2002) HLA-G'nin allelik varyantları bu 14 bç'lik delesyon polimorfizmi ile karakterize olabileceği öne sürülmektedir (Rousseau ve ark., 2003). 14bç'lik insersiyonun varlığı ekzon 8'in transkripsiyon başlangıç bölgesinden 92 bazın çıktığı ekstra bir splice varyantı oluşturur. Bu delesyonun HLA-G mRNA'sının stabilitesi üzerine olan etkisini analiz için Rousseau ve arkadaşları HLA-G*010102 alleli ile transfekte edilen M8 melanoma hücre dizileri ve JEG-3 koryokarsinoma hücre dizilerini incelemişlerdir. 92 bç'lik delesyonu olan HLA-G mRNA'larının tüm mRNA formlarına nazaran daha stabil olduğunu yani mRNA degradasyonuna karşı daha dirençli olduğunu saptamışlardır (Rousseau ve ark., 2003).

14bç'lik delesyon polimorfizmi ile ilgili olarak yapılan araştırmalar literatürde belli grup araştırmacıların ardışık çalışmalarının bulguları olarak dikkati çekiyor. Farklı coğrafi bölgelerde bu polimorfizmin sonuçlarının ortaya koyulması ve çalışma gruplarının genişletilmesi bakımından bu tez çalışması destekleyici niteliktedir. Ancak implantasyon oranlarını arttırabilmek için HLA-G ile ilgili moleküler çalışmaların artması gerekmektedir. Özellikle günümüzde teknik zorlukları olan tek bir blastomerden ekspresyon çalışmalarının sistematığının oturtulması, HLA-G eksprese eden ve dolayısıyla implantasyon potansiyeli yüksek embriyoların seçilerek transfer edilmesini sağlayacak önemli bir aşamadır. Tek bir blastomerden DNA elde edilerek embriyoların genetik tanısının koyulması (PGT) artık rutin tanı ve tedavi yöntemlerinin arasına girmiştir. 14bç'lik delesyon polimorfizminin embriyolarda bakılarak morfolojik kriterlerle ilişkisi ortaya koyulabilir ve doğru embriyoyu seçme metotlarının araştırılmasına ışık tutabilir. Tüm bunların tek tek veya birlikte kullanılmasının implantasyon ve gebelik başarısını arttırmada eşlere sağlayacağı faydanın daha net ortaya konyulabilmesi için şüphesiz ki araştırmaların arttırılması ve çeşitlendirilmesi gereklidir. kendi çalışmamızın konuyla ilişkili olarak diğer çalışmalarla birlikte bilgi havuzuna katkı sağlamasının yanısıra söz konusu polimporfizmin toplumdan topluma farklılık gösterebileceği göz önüne alındığında türk toplumuna ait dağılımı yansıtması diğer bir getirisi olmuştur.

KAYNAKLAR

- Aldrich C.L., Stephenson M.D., Karrison T. et al. (2001) HLA-G Genotypes and Pregnancy Outcome in Couples with Unexplained Recurrent Miscarriage. *Mol Hum. Reprod.* 7:1167–72.
- Almajor M., Bejar C., Kafka I., Vaffe H. (1996) Pregnancy Rates After Communal Growth of Preimplantation Human Embryos In Vitro. *Fertil Steril*; 66:394 –7.
- Almeida P.A., Bolton V.N., (1996). The Relationship Between Chromosomal Abnormality In The Human Preimplantation Embryo and Development In Vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 8-235
- Arnaiz-Villena A., Martinez-Laso J., Alvarez M., Castro M.J., Varela E., Gomez-Casado E., Suarez B., Recio M.J., Vargas-Alarcon G., Morales P.: Primates MHC-E and -G Alleles. *Immunogenetics* 46:251, 1997.
- Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL 2000*b* The short forms of HLA-G are unlikely to play a role in pregnancy because they are not expressed at the cell surface. *J Reprod Immunol* 47:1–16
- Baltacı V, Şatıroğlu H, Kabukçu C, Ünsal E, Aydınuraz B, Üner Ö, Aktaş Y, Çetinkaya E, Turhan F, Aktan A (2006). Relationship Between Embryo Quality and Aneuploidies. *Reproductive BioMedicine Online*; 1. Vol 12. No 1. 2006 77-82
- Boklage C.E. (1990). Survival Probability of Human Conceptions from Fertilization to Term. *Int. J Fertil.* 35-75
- Borini A., Lagalla C., Cattoli M., Sereni E., Sciajno R., Flamigni C., Coticchio G. (2005). Predictive Factors for Embryo Implantation Potential. *RBM Online*. Vol: 10 No: 5, 653-668
- Braude P., Bolton V., Moore S. (1988) Human Gene Expression First Occurs Between The 4 and 8 Cell Stages of Preimplantation Development. *Nature* 332, 459-461.

- Brinsden P.R. (2005). Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. Taylor and Francis. 24, United Kingdom.
- Cao W., Brenner C.A., Alikani M., Cohen J. ve Warner C.M. (1999) Search for a Human Homologue of The Mouse Ped Gene. *Mol Hum Reprod* 5,541–547.
- Carosella E.D., Dausset J. and Rouas-Freiss N. (1999) Immunotolerant Functions of HLA-G. *Cell. Mol. Life Sci.* 55,327–333.
- Carosella E.D., Paul P., Moreau P., Rouas-Freiss N. (2000) HLA-G and -E: Fundamental and Physiopathological Aspects. *Immunol. Today* 21:532.
- Clements C.S., Kjer-Nielsen L., Kostenko L., Hoare H.L., Dunstone M.A., Moses E., Freed K., Brooks A.G., Rossjohn J. ve McCluskey J. (2005) Crystal Structure of HLA-G: a Nonclassical MHC class I Molecule Expressed at the Fetal-Maternal Interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102,3360–3365.
- Creput C., Durrbach A., Menier C., Guettier C., Samuel D., Dausset J., Charpentier B., Carosella E.D. ve Rouas-Freiss N. (2003) Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression In Biliary Epithelial Cells is Associated with Allograft Acceptance in Liver-Kidney Transplantation. *J. Hepatol.* 39, 587–594.
- Cynthia M.S., Harry T.O. (1993), Maternal Fetal Interactions: The Rol of The MHC Class 1 Molcule HLA-G, *Critical Rewievs in Immunology*, 13, 207-224
- Davis D.M., Reyburn H.T., Pazmany L., Chiu I., Mandelboim O. ve Strominger J.L. (1997) Impaired Spontaneous Endocytosis of HLA-G. *Eur. J. Immunol.* 27,2714–2719.
- Edmonds D.K., Lindsay K.S., Miller J.F., Williamson E., Wood P.J. (1982) Early Embryonic Mortality in Women. *Fertil Steril.*38, 447-453.
- Ellis S (1990) HLA-G: At The Interface. *Am. J. Reprod. Immunol.* 23, 84-86.
- Fainardi E., Rizzo R., Melchiorri L., Vaghi L., Castellazzi M., Marzola A., Govoni V., Paolino E., Tola M.R., Granieri E. et al. (2003) Presence of Detectible Levels of

- Soluble HLA-G Molecules in CSF of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Relationship with CSF Soluble HLA-I and IL-10 Concentrations MRI Findings. *J. Neuroimmunol.* 142, 149-158.
- Fuzzi B., Rizzo R., Criscuoli L., Noci I., Melchiorri L., Scarselli B., Bencini E., Menicucci A., Baricordi O.R. (2002) HLA-G Expression in Early Embryos is a Fundamental Prerequisite for the Obtainment of Pregnancy. *Eur. J. Immunol.*, 32, 311-315
- Gardner D.K. and Leese H.J. (1993) Assessment of Embryo Metabolism and Viability. In A.O. Trounson, D.K.Gardner (eds) *Handbook of In Vitro Fertilisation*. CRC Pres, Inc. Boca Raton, FL, 195-211.
- Gardner D.K., Phil D., Lane M., Stevens J and Schoolcraft W. B. (2001) Non-invasive Assessment of Human Embryo Nutrient Consumption as a Measure Of Developmental Potential. *Fertil. Steril.* 76, 1175-1180
- Gardner, D.K., Weissman, A.C., Howles, M., Shoham, Z. (2004). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. Taylor and Francis. Preface xi. United Kingdom.
- Geraghty D.E., Koller B.H. ve Orr H.T. (1987) A Human Major Histocompatibility Complex Class I Gene That Encodes a Protein with Shortened Cytoplasmic Segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84,9145–9149.
- Grabowska A., Carter N. ve Loke Y.V. (1990) Human Trofoblast Cells in Culture Express an Unusual Major Histocompatibility Complex Class-1 Like Antigen. *Am. J. Reprod. Immunol.* 23, 10-18
- Grimsley C., ve Ober C. (1997) Population Genetic Studies of HLA-E: Evidence for Selection. *Hum. Immunol.* 52, 33–40
- Handyside A.A., (1995) Cleavage stage human embryo biopsy. *Human Reproduction*; Update 1,3.

- Hansis C., Edwards R.G. (2003) Cell Differentiation in the Preimplantation Human Embryo. *Reprod. Biomed. Online.* 6, 215-220
- Harrison G.A., Humphrey K.E., Jakobsen I.B. ve Cooper D.W. (1993) A 14 bp Deletion Polymorphism in The HLA-G Gene. *Hum Mol Genet* 2, 2200.
- He X., Xu L., Liu Y. and Zeng Y. (2004) Identification of a Novel HLA-F Allele—HLA-F*010102. *Tissue Antigens* 63,181–183.
- Heinrichs H. and Orr H.T. (1990) HLA Non-A,B,C Class I Genes: Their Structure and Expression. *Immunol. Res.* 9,265–274.
- Hiby S.E., King A., Sharkey A., Loke Y.W. (1999) Molecular Studies of Trophoblast HLA-G: Polymorphism, Isoforms, Imprinting and Expression in Preimplantation Embryo, *Tissue Antigens*, 53, 1-13
- Hohmann F.P., Macklon N.S., Fauser B.C. (2003) A Randomized Comparison of Two Ovarian Stimulation Protocols with Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Antagonist Cotreatment for In Vitro Fertilization Commencing Recombinant Follicle-Stimulating Hormone On Cycle Day 2 or 5 with the Standard Long GnRH Agonist Protocol. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan;88(1):166-73.
- Huisman G.J., Alberda A.T., Leerentveld R.A. et al., (1994) A Comparison of In Vitro Fertilization Results After Embryo Transfer After 2, 3 and 4 Days of Embryo Culture. *Fertil. Steril.* 61-970
- Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH. (2000) Implantation Rates After In Vitro Fertilization and Transfer of a Maximum of Two Embryos That Have Undergone Three To Five Days of Culture. *Fertil Steril.* Jan;73(1):117-22.
- Hunt J. S., Andrews G.K. ve Wood G.W. (1987) Normal Trophoblasts Resist Induction of Class I HLA. *J. Immunol.* 138, 2481–2487
- Hunt J.S., Orr H.T. (1992) HLA and Maternal-Fetal Recognition. *FASEB J.* 6:2344–2348

- Hunt J.S., Jadhav L., Chu W., Geraghty D.E., Ober C. (2000) Soluble HLA-G Circulates In Maternal Blood During Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183:682–688
- Hviid T.V., Sørensen S. ve Morling N. (1999) Polymorphism in The Regulatory Region Located More Than 1.1 Kilobases 5' to The Start Site of Transcription, The Promoter Region, and Exon 1 of The HLA-G Gene. *Hum. Immunol.* 60, 1237–1244.
- Hviid T.V., Hylenius S., Hoegh A.M., Kruse C., Christiansen O.B. (2002) HLA-G Polymorphisms in Couples with Recurrent Spontaneous Abortions. *Tissue Antigens* 60:122,
- Hviid T.V., Hylenius S., Rørbye C. ve Nielsen L.G. (2003) HLA-G Allelic Variants are Associated with Differences in The HLA-G mRNA Isoform Profile and HLA-G mRNA Levels. *Immunogenetics* 55, 63–79.
- Hviid T.V.F., Hylenius S., Lidhard A., Christiansen O.B. (2004) Association Between Human Leukocyte Antigen-G Genotype and Success of In Vitro Fertilization and Pregnancy Outcome, *Tissue Antigens*, 64, 66-69
- Hviid T.V.F. (2005) HLA-G in Human Reproduction: Aspects of Genetics, Function and Pregnancy Complications *Human Reproduction Update Advance Access published November 9, 1-24*
- Ishitani A., Geraghty D.E. (1992) Alternative Splicing of HLAG Transcripts Yields Proteins with Primary Structures Resembling Both Class I and Class II Antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:3947–3951
- Ishitani A., Sageshima N., Lee N., Dorofeeva N., Hatake K., Marquardt H. and Geraghty D.E. (2003) Protein Expression and Peptide Binding Suggest Unique and Interacting Functional Roles for HLA-E, F, and G in Maternal Placental Immune Recognition. *J. Immunol* 171,1376–1384.

- Joan S.H., Margaret G.P., Ramsey H. M.I., Carole O. (2004), HLA-G and Immune Tolerance in Pregnancy, *The FASEB Journal*, 19, 681-693
- Joan S.H., Margaret G.P., Ramsey H.McI. ve Carole O. (2005), HLA-G and Immune Tolerance in Pregnancy, *The FASEB Journal*, 19, 681-693
- Joan S H., Daudi K.L., Ramsey H. McI. and Pedro J. M., (2006) The Role of HLA-G in Human Pregnancy, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(Suppl 1):1-8
- Juriscicova A., Casper R.F., MacLusky N.J., Mills G.B., Librah C.L. (1996) HLA-G Expression During Preimplantation Human Embryo Development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 161-165
- Juriscicova A., Antenos M., Kapasi K., Merano J., Casper R.F., (1999) Variability in The Expression of Trophoectodermal Markers Beta-Human Chorionic Gonadotrophin, Human Leukocyte Antigen-G and Pregnancy Specific Beta-1 Glycoprotein by The Human Blastocyte. *Hum Reprod* 14, 1852-1858.
- Kanai T., Fujii T., Unno N., Yamashita Y., Hyodo H., Miki A., Hamai Y., Kozuma S. ve Takatani Y. (2001) Human Leukocyte Antigen-G Expressing Cells Differently Modulate The Release of Cytokines from Mononuclear Cells Present In The Desidua Versus Peripheral Blood. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45, 94-99.
- Kastrop P.M., Weima S.M., Van Kooij R.J., Te Velde E.R. (1999) Comparison Between Intracytoplasmic Sperm Injection And In-Vitro Fertilization (IVF) with High Insemination Concentration After Total Fertilization Failure In a Previous IVF attempt. *Hum Reprod.* Jan;14(1):65-9.
- Khosrotehrani K., Le Danff C., Reynaud-Mendel B., Dubertret L., Carosella E.D. ve Aractingi S. (2001) HLA-G Expression in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 117, 750-752.

- King A., Boocock C., Sharkey A.M., Gardner L., Beretta A., Siccardi A.G. ve Loke Y.W. (1996) Evidence for The Expression of HLA-C Class I mRNA and Protein by Human First Trimester Trophoblast. *J. Immunol.* 156 ,2068–2076.
- King A., Burrows T.D., Hiby S.E., Bowen J.M., Joseph S., Verma S., Lim P.B., Gardner L., Le Bouteiller P., Ziegler A. et al. (2000) Surface Expression of HLA-C Antigen by Human Extravillous Trophoblast. *Placenta* 21, 376–387.
- Kovats S., Main E.K., Librach C., Stubblebine M., Fisher S.J., DeMars R. (1990) A Class I Antigen HLA-G, Expressed in Human Trophoblast. *Science*;248:220 –3.
- Le Bouetiler P., Rodrigez A.M., Mallet V., Girr M., Guilladeux T. ve Lenfant F. (1996) Placental Expression of HLA Class I Genes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35, 216—225.
- Le Bouteiller P. ve Mallet V. (1997), HLA-G and Pregnancy, *Reviews of Reproduction* 2, 7–13.
- Le Bouetiler P., Solier C., Pröll J., Aguerre-Girr M., Fournel S. ve Lenfant F. (1999) Placental HLA-G Protein Expression In Vivo: Where and What for? *Hum. Reprod. Update*, 5, 223-233
- Le Bouetiler P., Legrand-Abravanel F., Solier C.. (2003) Soluble HLA-G1 at The Materno-Foetal Interface – A Review. *Placenta*, 17, 10-12.
- Lee N., Llano M., Carretero M., Ishitani A., Navarro F., Lopez-Botet M. and Geraghty D.E. (1998) HLA-E is a Major Ligand for The Natural Killer Inhibitory Receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,5199–5204.
- Lila N., Rouas-Freiss N., Dausset J., Carpentier A. ve Carosella E.D. (2001) Soluble HLA-G Protein Secreted by Allo-Specific CD4+ T cells Suppresses The Allo-Proliferative Response: A CD4+ T Cell Regulatory Mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98,12150–12155.

- Liu H.C., He Z.Y., C.A. Mele C.A., Veeck L.L., Davis O.K., Rosenvaks Z. (1987)
Expression of IGFs and Their Receptors is a Potential Marker for Quality. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38, 237-245.
- Llano M., Lee N., Navarro F., Garcia P., Albar JP., Geraghty D.E. ve Lopez-Botet M. (1998)
HLA-E-Bound Peptides Influence Recognition by Inhibitory and Triggering CD94/NKG2 Receptors: Preferential Response to an HLA-G Derived Nonamer. *Eur. J. Immuno.* 28,2854–2863.
- Lozano J.M., Gonzales R., Kindelan J.M., Rouass-Freiss M., Caballos R., Dausset J., Carosella E.D. ve Pena J. (2002). Monocytes and T Lymphocytes in HIV-1 Positive Patients Express HLA-G Molecules. *AIDS.* 16, 347-351.
- Mallet V., Proll J., Solier C., Aguerre-Girr M., DeRossi M., Loke O. et al.Y.W., Lenfant F., Le Bouteiller P. (2000) The Full Length HLAG1 and No Other Alternative Form of HLA-G is Expressed at The Cell Surface of Transfected Cells. *Hum Immunol* 61:212–224
- Marchall-Brass-Goncalves R., Roua-Freiss N., Connan F., Chopin J., Dausset J., Carosella E.D., Kirsezenbaum M. ve Guillet J. (2001). A Soluble HLA-G Protein That Inhibits Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. *Transplant Proc.* 33, 2355-2359.
- Menicucci A., Noci I., Fuzzi B., Crisculi L., Scarselli G., Barricordi O., et al. Non-Classic sHLA Class I in Human Oocyte Culture Medium. *Hum Immunol* 1999;60:1054 –7.
- Menier C., Riteau B., Carosella E.D. ve Rouas-Freiss N. (2002) MICA Triggering Signal For NK Cell Tumor Lysis is Counteracted by HLA-G1-Mediated Inhibitory Signal. *Int. J. Cancer.* 100, 63–70.
- Moessner S., Dodson W.C. (1995) The Quality of Human Embryo Growth is Improved when Embryos are Cultured in Groups Rather Than Them Separately. *Fertil Steril*;64:1034–5.

- Moore T., Haig D., (1991), Genomic Imprinting in Mammalian Development: A Parental Tug of War, *Trends. Genet.* 7: 45
- Morales P., Corell A., Martinez-Laso J., Martin-Villa J.M., Varela P., Paz-Artal E., Allende L.M., Arnaiz-Villena A. (1993) Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A, *Immunogenetics*, 38, 323-331
- Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J,. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Human Reproduction* (1993); 2: 2185-91.
- Munne S, Alikani M, Tomkin G et al. 1995. embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.* 64-382
- Noci I, Fuzzi B., Rizzo R., Melchiorri L., Criscuoli L., Dabizzi S., Biagiotti R., Pellegrini S., Menicucci A.ve Baricordi O.R.. (2004) Embryonic Soluble HLA-G as a Marker of Developmental Potential Embryos. *Hum. Reprod.* 20, 138-146.
- Ober C., Aldrich C.L., Chervoneva I. et al. (2003) Variation in The HLA-G Promoter Region Influences Miscarriage Rates. *Am. J. Hum. Genet.:* 72: 1425–35.
- O'Brien M., McCarthy T., Jenkins D., Paul P., Dausset J., Carosella E.D., Moreau P. (2001) Altered HLA-G Transcription In Pre-Eclampsia is Associated with Allele Specific Inheritance: Possible Role of The HLA-G Gene in Susceptibility to The Disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1943,
- O'Neil C., Gidley-Baird A.A., Amit A.J., Saunders D.M. (1987) Use of Bioassay for Embryo Derived PAF as a Means of Assessing Quality and Pregnancy Potential of Human Embryos. *Fertil. Steril.* 47, 969-975
- Parham P. (1996) Immunology: Keeping Mother at Bay. *Curr. Biol.* 6, 638–641

- Park B., Lee S., Kim E., Chang S., Jin M., ve Ahn K. (2001) The Truncated Cytoplasmic Tail of HLA-G Serves a Quality Control Function in Post-ER Compartments. *Immunity* 15, 213–224
- Petersen C.G., Mauri A.L., Ferreira R., Baruffi R.L., Franco Junior J.G. (2001). Embryo Selection by The First Cleavage Parameter Between 25 and 27 Hours After ICSI. *J. Assit. reprod.* 4. 209-12
- Pfeiffer K.A., Fimmers R., Engels G., Van Der Ven H, Van Der Ven K. (2001) The HLA-G Genotype is Potentially Associated with Idiopathic Recurrent Spontaneous Abortion. *Mol Hum Reprod*: 7: 373–8.
- Piccinni M.P., Scaletti C., Vultaggio A., Maggi E. ve Romagnani S. (2001). Defective Production of LIF, M-CSF and Th2-Type Cytokines by T Cells at Feto Maternal Interface is Associated with Pregnancy Lost. *J. Reprod. Immunol.* 52, 35-43.
- Rebmann V., Pfeiffer K., Passler M., Ferrone S., Maier S., Weiss E., Grosse-Wilde H. (1999) Detection of Soluble HLA-G Molecules in Plasma and Amniotic Fluid. *Tissue Antigens* 53: 14–22
- Riteau B., Menier C., Khalil-Daher I., Martinozzi S., Pla M., Dausset J., Carosella E.D. ve Rouas-Freiss N. (2001a) HLA-G1 Co-Expression Boosts The Hla Class I-Mediated NK Lysis Inhibition. *Int. Immunol.* 13,193–201.
- Riteau B., Rouas-Freiss N., Menier C., Paul Dausset J., Carosella E.D. (2001b). HLA-G2, -G3 and -G4 Isoforms Expressed As Nonmature Cell Surface Glycoproteins Inhibit NK and Antigen-Specific CTL Cytolysis. *J. Immunol.* 166, 5018-5026.
- Rousseau P., Disorde M.L., Mouillot G., Marcou C., Carosella E.D., ve Moreau P.(2003), The 14 bp Deletion-Insertion Polymorphism in the 3_ UT Region of the HLA-G Gene Influences HLA-G mRNA Stability, *Human Immunolgy*, 64, 1005-1010

- Roudebush W.E., Winger J.D., Jones A., Wright G., Kort H.J., Massey J.B. (2001) Embryonic Platelet-Activating Factor: an Indicator of Embryo Viability. *Hum. Reprod.*, 16, 163
- Roudebush W.E., Winger J.D., Jones A.E., Toledo A.A., Kort H.J., Massey J.B., Shapiro D.B. (2002) Embryonic Platelet-Activating Factor: an Indicator of Embryo Viability. *Hum. Reprod.* 17, 1306-1310
- Schwes S. Ehlich A., Kobsch S., Missel A., Löffert D. (2000) Single Cell PCR and RT-PCR: Amplification Specificity. Data Qiagen tarafından bu çalışma grubundan alınarak internet sitesinde yayınlanmıştır. www1.qiagen.com/literature/qiagennews/0300/single-cell%20PCR%20and%20RT-PCR.pdf
- Sher G., Keskinetepe L., Jefery D., Brian A.A., Ahlering P., Batzofin J., Gingsburg M.S. (2005a), Soluble Human Leukocyte Antigen G Expression in Phase I Culture Media at 46 Hours After Fertilization Predicts Pregnancy and Implantation from Day 3 Embryo Transfer, *Fertil. Steril.* 83, 1410-1413
- Sher G., Keskinetepe L., Batzofin J., Fisch J., Brian A.A., Ahlering P., Gingsburg M.S. (2005b), Influence of ICSI-Derived Embryo sHLA-G Expression on Pregnancy and Implantation Rates: a Prospective Study, *Hum. Reprod.*, 20, 83, 1359-1363
- Shukla H., Swaroop A., Srivastava R., Weisman S.M. (1990) The mRNA of a human class I gene HLA G/HLA 6.0 exhibits a restricted pattern of expression. *Nucleic Acids Res.* 18, 2189
- Stephens P.C., Edwards R.G., Purdy J.M. (1980). Clinical Aspects of Pregnancies Established with Cleaving Embryos Grown In Vitro. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 87. 757-768
- Templeton A.A., Morris J.K., Parslow W. (1996). Factors that affect the outcome of in vitro fertilization treatment. *Lancet.* 348. 1402-1406

- Tesarik J., Kopecny V., Plachot M., Mandelbaum J. (1986) Activation of Nucleolar And Extra Nuclear RNA Synthesis and Changes in The Ribosomal Content of Human Embryos Developing In Vitro. *J Reprod Fertil* 78, 463-470.
- Tesarik J., Junca A.M., Hazout A., Aubriot F.X., Nathan C., Cohen-Bacrie P. and Dumont-Hassan M. (2000). Embryos with High Implantation Potential After Intracytoplasmic Sperm Injection Can Be Recognized By A Simple, Non-Invasive Examination of Pronuclear Morphology. *Hum. Reprod.* Vol. 15, No. 6, 1396-1399
- Vicdan K, Işık A.Z. (1999). *İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipulasyon Uygulamalarında Laboratuvar.* Çağdaş Medikal Kitabevi. 92-94. Ankara.
- Wiendyl H., Behrens L., Maier S., Johnson M.A., Weiss E.H. ve Hohlfeld R. (2000) Muscle Fibers In Inflammatory Myopathies and Cultured Myoblasts Express The Nonclassical Major Histocompatibility Antigen HLA-G. *Ann. Neurol.* 48, 679–684.
- Wiendyl H., Mitsdoerffer M., Hofmeister V., Wischhusen J., Bornemann A., Meyermann R., Weiss E.H., Melmes A. ve Weller M. (2002). A Functional Role of HLA-G Expression In Human Gliomas: An Alternative Strategy of Immune Escape. *J. Immunol.* 168, 4772-4780.
- Warner C.M., Gollnick S.O., Goldbard S. (1987) Linkage of The Preimplantation Embryo Development (PED) Gene To The Mouse MHC. *Biol Reprod*; 36:606 –10.
- Warner C.M., Gollnick S.O., Glaherty L., Goldbard S.B. Analysis of Qa-2 Antigen Expression by Preimplantation Mouse Embryos: Possible Relationship to The PED Gene Product. *Biol Reprod* 1987;36:611– 6.
- Veeck L.L. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*, The Parthenon Publishing Group, 1999, London
- www.ccvf.com/glossary.html
- www.history1900s.about.com/od/medicaladvanceissues/a/testtubebaby.htm

Yang Y., Chu W., Geraghty D.E., Hunt J.S., (1996) Expression of HLA-G in Human Mononuclear Phagocytes and Selective Induction by IFN-gamma, J Immunol 156, 4224-4231

Yie S., Balakier H., Motamedi G., Librach C.L. (2005) Secretion of Human Leukocyte Antigen-G by Human Embryos is Associated with a Higher In Vitro Fertilization Pregnancy Rate. Fertil. Steril. 83, 30-36

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Kayseri’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara’da tamamladı.1997 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 1997-2001 yılları arasında 3 yılı Tüp Bebek Ünitesi'nde olmak üzere Başkent Üniversitesi Hastanesi'nde görev yaptı. 1998-2000 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansını tamamladı. 2001-2002 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Planlaması, İnfertilite ve Üreme Sağlığı Merkezi'nde Embriyolog olarak çalıştı. Yine 2001-2002 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı ve Tüp Bebek Ünitesi'nden embriyoloji laboratuvarında çalışma yeterliliği sertifikasını aldı. 2003 yılından beri Gen Art Kadın Sağlığı Tüp Bebek ve Üreme Biyoteknolojisi Merkezi'nde Embriyolog olarak görev yapmaktadır.