



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMLANTASYON SÜRECİNDE EKSPRESE OLAN miRNA'LAR  
VE ÖNEMİ**

SEVTAP GÖKALP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

MANİSA-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# İMLANTASYON SÜRECİNDE EKSPRESE OLAN miRNA'LAR VE ÖNEMİ

HAZIRLAYAN: SEVTAP GÖKALP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

(Tez Danışmanı)

PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

(Jüri Üyesi)

PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

(Jüri Üyesi)

MANİSA-2016

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

**Sevtap GÖKALP**

## TEŞEKKÜR/ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez projemi destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi; Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Dekanlığı'na;

Yüksek lisans eğitim sürecim ve bu süreç içerisindeki hayatımda, eğitimime ve bakış açıma büyük katkıları olan, hiçbir zaman destek ve yardımlarını esirgemeyen, göstermiş olduğu özveri ve katkıların ötesinde, üzerimdeki manevi ve bilimsel desteğini her zaman hissettiğim sadece bir hoca değil Manisa'daki ailemin bir parçası olan tez danışman hocam *Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER*'e,

Yüksek lisans eğitim sürecimin tüm aşamalarında değerli bilgilerini aktaran, gelişimime destek olan ve yol gösteren Anabilim Dalı başkanımız *Prof. Dr. V. Sevinç İNAN* ve Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri *Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN* ve *Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU* hocalarıma;

Tez çalışmamda doku toplama sürecinde bana en büyük yardımcı yapan ve bu süreci tamamlamam için çok büyük özveri gösteren Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı *Asistan Doktoru Sedef Irmak*'a,

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca Manisadaki ailem olan ve her zaman maddi manevi yanımda olup destekçim olan sırtımı güvenle yaslayabildiğim *Canım Ev Arkadaşlarım*'a,

Hayatımda bir dönüm noktası olan İsveç yaşamımda tanıştığım sanki yıllardır tanıdığım ve hiç ayrılmayacağım dostum, kardeşim, ailem, gurum, kötü anlarımda beni toparlayan bana olması gerekenleri bıkmadan usanmadan her defasında yeniden anlatıp hatırlatan, ne zaman ihtiyacım olsa işini gücünü bırakıp farklı ülkelerde olsak da yardımına koşan, my babe ve buffalo'm *Moleküler Biyolog MSc. Sravani DEVARAKONDA*'ya,

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, beni yetiştiren, her istediğimi yapıp şımarıklıklarına katlanan, sevgi ve desteklerini biran bile eksik etmeyen, karşılıksız sevgi ve fedakârlıklarıyla sürekli yanımda olup sabırlarını sunan sevgili *ANNEM Gönül GÖKALP*, *BABAM Ufuk GÖKALP* ve *KARDEŞLERİM Candan ve Furkan GÖKALP*'e maddi ve manevi destekleri için teşekkürü bir borç bilirim.

**Sevtap GÖKALP**  
**MANİSA/2016**



## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Endometriyal bez ve stromal dokunun siklus günlerine göre histolojik değişimi.....	28
Tablo 2: Biyokimyasal reseptivite belirteçleri.....	42
Tablo 3: Uterus reseptivitesi ile ilgili belirteç moleküller.....	52
Tablo 4: Erken başvuru ya da araştırılması gereken durumlar.....	54
Tablo 5: İnfertil çiftlerde hikaye alımı.....	55
Tablo 6: İnfertil çiftin fizik muayenesi.....	56
Tablo 7: İnfertilite tetkiklerinin zamanlaması.....	57
Tablo 8: Ultrasonografide bakılacak özellikler.....	58
Tablo 9: Sebebi açıklanamayan infertilite tedavisinde denenen 45 çalışmanın analiz sonuçları.....	61
Tablo 10: İnsan dişi üreme sistemi organlarında en çok bulunan miRNA'lar.....	77
Tablo 11: Fertil Grubu Proliferasyon Dönemine Ait Hastaların Bilgileri.....	87
Tablo 12: Fertil Grubu Erken Sekresyon Dönemine Ait Hastaların Bilgileri.....	88
Tablo 13: İnfertil Grubu Proliferasyon Dönemine Ait Hastaların Bilgileri.....	89
Tablo 14: İnfertil Grubu Erken Sekresyon Dönemine Ait Hastaların Bilgileri.....	90
Tablo 15: Parafin Doku Takip Protokolü.....	93
Tablo 16: Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü.....	94
Tablo 17: İndirekt İmmünohistokimya Boyama Protokolü.....	97
Tablo 18: Fertil ve infertil olgulardan proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinden alınan örneklerde Dicer, Drosha, eIF2 $\alpha$ ve eIF2C (AGO-1) immunohistokimyasal yoğunluklarının dağılımları.....	129
Tablo 19: Fertil ve infertil olgulardan proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinden alınan örneklerde Dicer, Drosha, eIF2 $\alpha$ ve eIF2C (AGO-1) immunohistokimyasal dağılımlarının HSCORE değerleri.....	130

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kadın İç Genital Organları. ....	5
Şekil 2: Ovaryumun pelvis içi konumu.....	6
Şekil 3: Ovaryumun yapısı.....	7
Şekil 4: Kadın iç genital organları kan damarları ve lenfatikleri .....	8
Şekil 5: Tuba uterina yapısı.....	10
Şekil 6: Uterusun yapısı .....	11
Şekil 7: Uterusun pozisyonları .....	11
Şekil 8: Uterusun kısımları.....	12
Şekil 9: Uterus, tuba uterina ve ovaryum frontal kesiti .....	14
Şekil 10: Uterusun yapısı .....	14
Şekil 11: Menstrual siklus fazlarında uterus yapısı.....	18
Şekil 12: Uterus endometriyumunun arteriyal kan desteğini gösteren şematik diyagram.....	20
Şekil 13: Ovaryan ve uterin sikluslar .....	27
Şekil 14: Uterusun kan damarları.....	29
Şekil 15: Vajinal anatomi .....	30
Şekil 16: Vajinanın yapısı.....	31
Şekil 17: Hipotalamus-hipofiz-ovaryum aksisi.....	34
Şekil 18: Hipotalomo-hipofizer aksis'in cinsiyet hormonlarının sentezi üzerine etkisi .....	35
Şekil 19: Ovaryan siklus ve hormonal etkileri.....	37
Şekil 20: Ovaryan siklusun hormonal etkileşimleri (1. Gün) .....	38
Şekil 21: Ovaryan siklusun hormonal etkileşimleri (26-28. Gün).....	39
Şekil 22: Ovaryan fonksiyonlarında geribildirim mekanizmaları.....	40
Şekil 23: İmplantasyon mekanizması .....	41
Şekil 24: Feto-maternal mikroçevrede insan blastokisti, sinyalizasyon ve implantasyon sistemi.....	47
Şekil 25: Blastokist implantasyonu şematik gösterimi .....	47
Şekil 26: Moleküler implantasyon ve desidualizasyon.....	48
Şekil 27: Moleküler implantasyon ve desidualizasyon.....	48
Şekil 28: İmplantasyon basamaklarında etkili moleküller .....	49

Şekil 29: Embriyo endometriyum iletişimi .....	49
Şekil 30: Küretaj işlemi.....	85
Şekil 31: Endometriyal biyopsi.....	85
Şekil 32: Pipel kullanılarak endometriyal örnek alım işlemi.....	86
Şekil 33: Fertil ve infertil grupların proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait luminal epitel (LE), bez epiteli (BE) ve stromada (ST) Dicer, Drosha, eIF2 $\alpha$ ve eIF2C immunoreaktivitelerinin HSCORE analizi ile dağılımları.....	131
Şekil 34: Fertil grupların proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları .....	133
Şekil 35: İnfertil grupların proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları .....	133
Şekil 36: Fertil ve infertil grupların proliferasyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları .....	134
Şekil 37: Fertil ve infertil grupların erken sekresyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları .....	134
Şekil 38: Fertil ve infertil grupların proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları.....	135

## RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Tuba uterina histolojik kesit görüntüsü.....	9
Resim 2: Tuba uterina'nın tunika mukoza tabakası histolojik kesit (H&E) .....	10
Resim 3: Endometriyumun tabakaları.....	17
Resim 4: Proliferasyon dönemi endometriyum histolojik görünümü (H&E).....	21
Resim 5: Ovulasyon sonrası endometriyal bezlerde subnükleer glikojen vakuolleri (H&E).....	22
Resim 6: Sekresyon fazında endometriyum görünüm (H&E) .....	23
Resim 7: Uterin siklusun sınıflandırılması.....	25
Resim 8: LH 6. Günde endometriyal biyopsi örneğinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü.....	43
Resim 9: miRNA Biyogenezi.....	65
Resim 10: miRNA tarafından yapılan posttranskripsiyonel regülasyon mekanizması .....	66
Resim 11: miRNA'nın biyogenezi .....	67
Resim 12: Hücre-hücre mesajcıları olarak eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimcikler.....	69
Resim 13: Ekstraselüler veziküllerin biyogenezi ve alıcı hücre ile etkileşimleri .....	70
Resim 14: miRNA yolakları.....	71
Resim 15: Rotary mikrotom (Leica, RM2135).....	92
Resim 16: Laboratuvarda kullanılan sarf malzemeler .....	92
Resim 17: Laboratuvarda kullanılan sarf malzemeler .....	94
Resim 18: Laboratuvarda kullanılan sarf malzemeler .....	96
Resim 19: Olympus BX43 mikroskop .....	98
Resim 20: Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki endometriyum örneklerinde luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromaya (E-F) ait histokimyasal görünümü .....	102
Resim 21: Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki endometriyum örneklerinde luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromaya (E-F) ait histokimyasal görünümü .....	103
Resim 22: İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki endometriyum örneklerinde luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromaya (E-F) ait histokimyasal	

görünümü .....	104
Resim 23: İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki endometriyum örneklerinde luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromaya (E-F) ait histokimyasal görünümü .....	105
Resim 24: Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki Dicer immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	108
Resim 25: İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki Dicer immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	109
Resim 26: Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki Dicer immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	110
Resim 27: İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki Dicer immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	111
Resim 28: Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki Drosha immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	114
Resim 29: İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki Drosha immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	115
Resim 30: Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki Drosha immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	116
Resim 31: İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki Drosha immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	117
Resim 32: Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki eIF2 $\alpha$ immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	120
Resim 33: İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki eIF2 $\alpha$ immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	121
Resim 34: Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki eIF2 $\alpha$ immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	122

Resim 35: İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki eIF2 $\alpha$ immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	123
Resim 36: Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki eIF2C immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	125
Resim 37: İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki eIF2C immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	126
Resim 38: Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki eIF2C immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	127
Resim 39: İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki eIF2C immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları .....	128

## KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

Argonuate Protein	AGO
Assisted Reproductive Technology	ART
Bazal Vücut Isısı Ölçümü	BBT
Çift sarmal ribonükleik asit	ds-RNA
Diaminobenzidin	DAB
Dicer Like Potein	DCL
Dünya Sağlık Örgütü	WHO
Early Pregnancy Factor	EPF
Epidermal Büyüme Faktörü	EGF
Epidermal Büyüme Faktörü-Reseptörü	EGF-R
Estrodiol	E2
Exportin 5'in Homoloğu	HST
Fibroblast Büyüme Faktörü Alfa	$\alpha$ -FGF
Fibroblast Büyüme Faktörü	FGF
Folikül Uyarıcı Hormon	FSH
Glikodelin	PP14
Gonadotropin Realising Hormon	GnRH
Heparin Epidermal Büyüme Faktörü	HB-EGF
Hidrojen Peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Histerosalpingografi	HSG
Homebox Protein A10	HOXA10
Hua Enhancer 1 Enzimi	HEN1
Indian Hedgehog Gene	IHH
İmmün Cevap Geni	IRG-1
İmmün İle Düzenleyen Hormon 1	IIRH1
İn vitro Fertilizasyon	IVF
İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi	IVF-ET
İnsan Dicer Proteini	hsDicer
İnsan Koryonik Gonadotropin	hCG
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1	IGF-I
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2	IGF-II

İnterferon Gama	IFN- $\gamma$
İnterlökin-1 alfa	IL-1 $\alpha$
İnterlökin-1 beta	IL-1 $\beta$
İnterlökin-1	IL-1
İnterlökin-11 Reseptör	IL-11R
İnterlökin-8	IL-8
İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu	ICSI
İntrauterin İnseminasyon	IUI
Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	qRT-PCR
Koloni Uyarıcı Faktör	CSF
Large Granular Lymphocytes	LGL
Lariat Debranching	Ldbr
Lösemi İnhibitör Faktör	LIF
Lüteinizan Hormon	LH
Makrofaj İnflamatuvar Protein-1 Alfa	MIP-1 $\alpha$
MikroRNA	miRNA
Monosit Kemoatraktan Protein-1	MCP-1
Musin 1	MUC1
Natural Killer	NK
Ökaryotik Transkripsiyon Faktörü 2 alfa	eIF2 $\alpha$
Ökaryotik Transkripsiyon Faktörü 2 C	eIF2C
Östrojen Reseptör Knock-Out	ERKO
Phosphate Buffered Saline	PBS
Pik Sistolik Hız	PSV
Piwi Argonuate Zwille	PAZ
Plateler Aktive Edici Faktör	PAF
Polikistik Over Sendromu	PKOS
Progesteron Reseptör Knock-Out	PRKO
Prolaktin	Pr
Pulsatilité İndeksi	PI
Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted	RANTES
Ribonükleik Asit	RNA



RNA Integrity Number	RIN
RNA-İnduced Silencing Coplex	RISC
Synthetic RNA	siRNA
Taramalı Elektron Mikroskop	SEM
Temel Fibroblast Büyüme Faktörü	$\beta$ -FGF
Tip 1 Plasminojen Aktivatör İnhibitörü	PAI-1
Tiroid Uyarıcı Hormon	TSH
Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta-1	TGF- $\beta$ 1
Trofouteronektin	TUN
Trombosit Türevli Büyüme Faktörü Beta	PDGF- $\beta$
Tümör Nekroz Faktörü Alfa	TNF- $\alpha$
Vasculer Endotelial Growth Factor	VEGF

## İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY .....	2
3. GİRİŞ .....	3
4. GENEL BİLGİLER .....	5
4.1. KADIN GENİTAL ORGANLARI.....	5
4.2. Erkek ve Dişi Cinsiyet Hormonları.....	32
4.3. İmplantasyon .....	41
4.4. İnfertilite ve İnfertil Çiftlerin Değerlendirilmesi .....	53
4.5. MikroRNA (miRNA).....	63
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	82
5.1. Hasta Gruplarının Belirlenmesi.....	82
5.2. Hasta Grupları ve Örnek Alımı .....	84
5.3. Doku Örneklerinin Hazırlanması .....	91
5.4. İmmunohistokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi .....	98
5.5. RNA İzolasyonu ve Kalitesinin Ölçülmesi .....	99
5.6. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Protokolü	100
6. BULGULAR.....	101
6.1. Histokimyasal Sonuçlar .....	101
6.2. İmmunohistokimyasal Sonuçlar.....	106
6.2.1. Dicer İmmunoreaktivitesi.....	106
6.2.2. Drosha İmmunoreaktivitesi .....	112
6.2.3. eIF2 $\alpha$ İmmunoreaktivitesi .....	118
6.2.4. eIF2C İmmunoreaktivitesi .....	124
7. TARTIŞMA .....	136
8. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	145

9. KAYNAKLAR.....	147
10. EKLER .....	157
ÖZGEÇMİŞ .....	158



**Başlık:** İmplantasyon Sürecinde Eksprese Olan miRNA'lar ve Önemi

**Öğrencinin adı:** Sevtap GÖKALP

**Danışman:** Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

**Anabilim Dalı:** Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

## 1. ÖZET

**Amaç:** İnfertil olgularda menstrual siklusun proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerindeki miRNA profilinin çıkartılarak fertil olgular ile karşılaştırılması ve implantasyon sürecinde rol oynayan miRNA'ların belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** 25-38 yaşları arasında Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvuran fertil ve infertil olgulardan proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde alınan örnekler histolojik analiz için %10 formalin solüsyonuna, miRNA analizi için direkt olarak sıvı azot içine alınmıştır. Morfolojik analiz için hematoksilin-eozinle boyanmış, immunohistokimyasal analizi için anti-dicer, anti-drosha, anti-eIF2 $\alpha$ , anti-eIF2C dağılımlarına bakılmıştır. miRNA analizi, kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile, miR-17-5p, miR-23a, miR-23b, miR-542-3p, miR-21, miR-199a\*, miR-705, miR-20a, miR-26a, miR-125b, miR-200a/b/c analiz edilmiştir.

**Bulgular:** Dicer immunoreaktivitesinin fertil grupta sadece proliferasyon evresinde luminal epitelde pozitif, Drosha immunoreaktivitesinin proliferasyon döneminde negatif iken erken sekresyon döneminde luminal epitelde az şiddette boyandığı gözlemlendi. İnfertil grupta Dicer ve Drosha immunoreaktiviteleri grup içinde anlamlı değil iken, fertil gruba oranla immunoreaktivitelerin daha fazla olduğu saptandı. eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin hem fertil hemde infertil gruplarda olduğu, fakat dönemsel ve bölgesel farklılıklar olduğu belirlendi. eIF2C immunoreaktivitesi için ise her iki grupta ve tüm dönemlerde negatif olduğu saptandı.

**Sonuç:** İnfertil ve fertil gruplar arasında Dicer immunoreaktivitesinde anlamlı farklılığın olması, infertil grupta miRNA sentezinin tetiklendiğini düşündürdü. Fertil ile infertil olgular arasında miRNA biyogenezinde önemli olan moleküller açısından, farklı menstrual siklus dönemlerinde farklılıkların saptanması, implantasyon süreci hazırlığında endometriyal cevabın farklı olmasına sebep olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Kadın üreme sistemi, endometriyum, fertilité, infertilité, implantasyon, mikroRNA.

**Title:** The Role of miRNA's Expressions During Implantation  
**Student name:** Sevtaç GÖKALP  
**Supervisor:** Professor Doctor H. Seda VATANSEVER  
**Department:** Department of Histology and Embryology

## 2. SUMMARY

**Objective:** We aim to identify miRNAs that are expressed in endometrial biopsy samples which are taken during proliferation and early secretion periods in fertile and infertile cases, and analyse them in infertile cases with the implantation process.

**Material and methods:** Women who were in proliferation and early secretion periods, are between ages of 25-38 and they've applied to Celal Bayar University Hafsa Sultan Hospital in Obstetrics and Gynecology clinic. Some samples were taken up in 10% formalin solution for histological analysis, remaining samples directly put into liquid nitrogen for miRNA analysis. In histological analyses, samples're stained with hematoxylin-eosin for morphological analysis, for immunohistochemical analysis anti-dicer, anti-drosha, anti-eIf2 $\alpha$ , anti-eIF2C distribution were analysed. miRNA analyses were performed with quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR), miR-17-5p, miR-23a, miR-23b, miR-542-3p, miR-21, miR-199a\*, miR-705, miR-20a, miR-26a, miR-125b, miR-200a/b/c are identified.

**Results:** We found that proliferation phase of fertile group's luminal epithelium has Dicer immunoreactivity. Drosha immunoreactivity in proliferation phase of fertile group's was negative. There was weak Drosha immunoreactivity in early secretion phase of fertile group's luminal epithelium. Dicer, Drosha immunoreactivity in infertile group were nonsignificant. Their immunoreactivity were more than fertile groups. eIF2 $\alpha$  immunoreactivity was similar but there were differences between groups. eIF2C immunoreactivity was negative in all groups.

**Conclusion:** There're differences between Dicer immunoreactivity in infertile and fertile groups. These results showed that miRNA pathway can stimulate with this molecule in infertile group. These results help us to understand implantation process and preparation of implantation process.

**Keywords:** Female reproductive tract, endometrium, fertility, infertility, implantation, micro RNA.

### 3. GİRİŞ

Kadın üreme sistemi ovaryum, fallop tüpü, serviks ve uterusdan oluşur. Kadın üreme sisteminin düzgün gelişimi ve işlevi başarılı bir üreme için gereklidir. Başarılı bir implantasyon süreci için ise oosit ve sperm morfolojisi önemli olmakla beraber, fertilizasyonun sorunsuz gerçekleşmesi ve gelişen embriyonun tuba uterina içinde morula aşamasına kadar geldikten sonra implantasyon bölgesine ulaşması gerekmektedir. Tüm bu aşamalar gerçekleştiikten sonra implantasyon için ise endometriyumun kabul edilebilirliği, embriyonun da tutunması ön plana çıkar. Sebebi açıklanamayan infertil olgularda özellikle endometriyal problemlerin daha fazla olduğu görülmektedir.

İmplantasyon süreci hem endometriyum hem de embriyodan salgılanan faktörler ve bu faktörlere uygun olarak embriyo ve/veya endometriyum üzerindeki reseptörler aracılığı ile kontrol edilir. Fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim normal olarak gelişmesine rağmen endometriyal kabul edilebilirliğinin olmadığı durumlarda implantasyon gerçekleşmediğinden embriyonal ileri gelişim gerçekleşmemektedir.

Menstrüel siklus sırasında, insan endometriumu embriyo implantasyonuna hazırlık olarak geniş siklik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere uğrar. Bu işlemler, çoğunlukla ovarian steroidler tarafından düzenlenir ve çeşitli lokal gen ürünlerini eksprese eder ve enflamatuvar reaksiyon, apoptoz, hücre çoğalması, anjiyojenez, farklılaşma (doku oluşumu) ve dokunun yeniden yapılanmasını içerir.

MikroRNA (miRNA)'lar transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu kontrol eden küçük kodlanmayan RNA'lardır. 700'den fazla insan miRNA'sı tespit edilmiş olup hem normal hem de patolojik durumlarda hücre içi döngünün düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiş ve gen ekspresyonunun önemli epigenetik modülatörleri olarak ortaya çıkmıştır. Değiştirilmiş ve/veya anormal ekspresyonları tümerogenesis oluşturulması ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Son yıllardaki çalışmalar ile kadın üreme sistemi organlarında farklı dönemlerde farklı miRNA'ların farklı ekspresyonları olduğu gösterilmiş ve normal olarak düzenlenmesi ve anormal olgulardaki dağılımları ve rolleri araştırılmaya başlanmıştır.

Endometriyumda, miRNA'lar menstrüel siklus ile ilişkili dinamik değişikliklerde rollere sahip olduğu gösterilmiştir ve implantasyonda ve

patofizyolojide tekrarlayan düşük yapma ve endometriosis gibi üreme bozuklukları ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca dolaşan miRNA'nın endometriyal fonksiyonu modüle ettiği veya düzensiz endometriyal etkinliği yansıttığı yönünde görüşler de bulunmaktadır.

MikroRNA (miRNA'lar), gen ifadesinin anahtar düzenleyicileri olarak ortaya çıkmıştır ve onların değiştirilmiş ve/veya anormal ekspresyonları tümerogenesis oluşturulması ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Gen ekspresyon stabilitesinde miRNA'ların anahtar düzenleyici fonksiyonu göz önüne alındığında ve onların spesifik hedef genlerinin ve fonksiyonlarının belirlenmesinde koruyucuların gelişmesine yol açılabilir ve teröpatik stratejiler üreme hastalıkları ile ilişkili spesifik hedef genleri tarafından düzenlenir.

Kadın üreme sisteminin oluşturan organların farklılaşmış fonksiyonlarının düzenlenmesi de transkripsiyon, çeviri ve posttranslasyonel değişiklikler dahil olmak üzere birden fazla düzeyde gerçekleşmesi için kurulmuştur. Mikro-RNA (miRNA) aracılı posttranskripsiyonel gen regülasyonu normal doku gelişimi ve işlevi kontrol temel bir mekanizma olarak ortaya çıkmıştır. Gelişen kanıtlar kadın üreme sisteminin organları içindeki miRNA'ların bu organların düzgün fonksiyonu için gerekli hücrel yolları düzenleyerek çalıştığını ifade etmektedir.

İlk çalışmalar kadın üreme sisteminin organlarının gelişiminde miRNA'lar rolü üzerinde durmuştur. Dicer1 geni hasarlı olan farelerin steril olduklarını gösterilmiştir. Ayrıca bu farelerde uterus bezlerinin gelişiminde anomaliler ve sessiz östrojen tepkisi de bulunmaktadır.

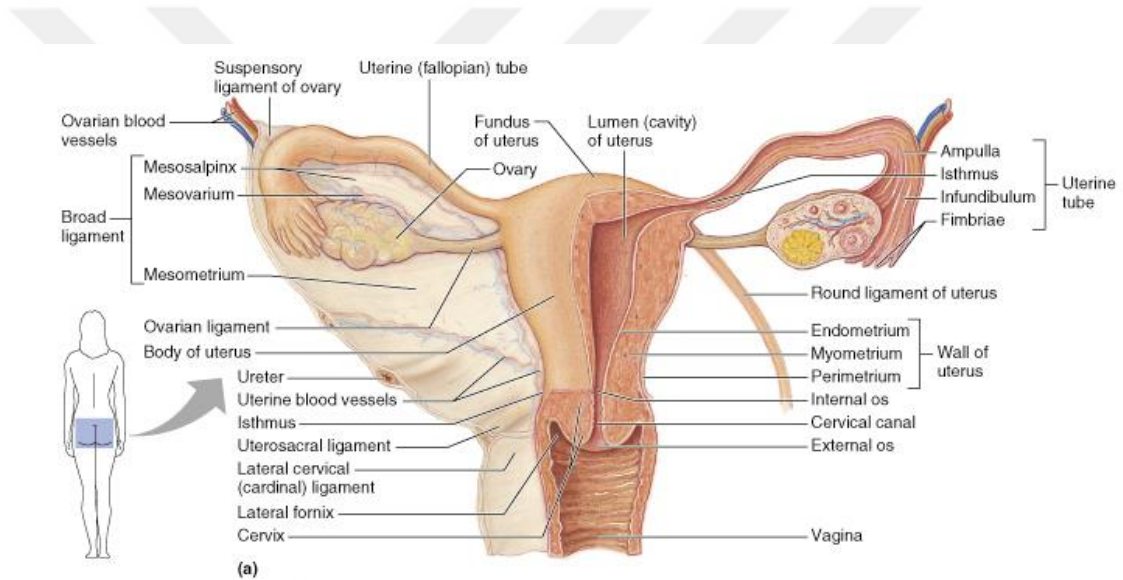
## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. KADIN GENİTAL ORGANLARI

Kadın genital organları iç genital organlar (organa genitalia interna) ve dış genital organlar (organa genitalia externa) olmak üzere iki gruba ayrılarak incelenir (Çelik 2011).

#### *Kadın İç Genital Organları*

İç genital organlar pelvis minor içerisinde yerleşmiş karın arka duvarına bağlar ile asılı olarak bulunurlar. Bu grupta ovaryum, tuba uterina, uterus ve vagina bulunur (Şekil 1).



Şekil 1: Kadın İç Genital Organları (Cummings 2001).

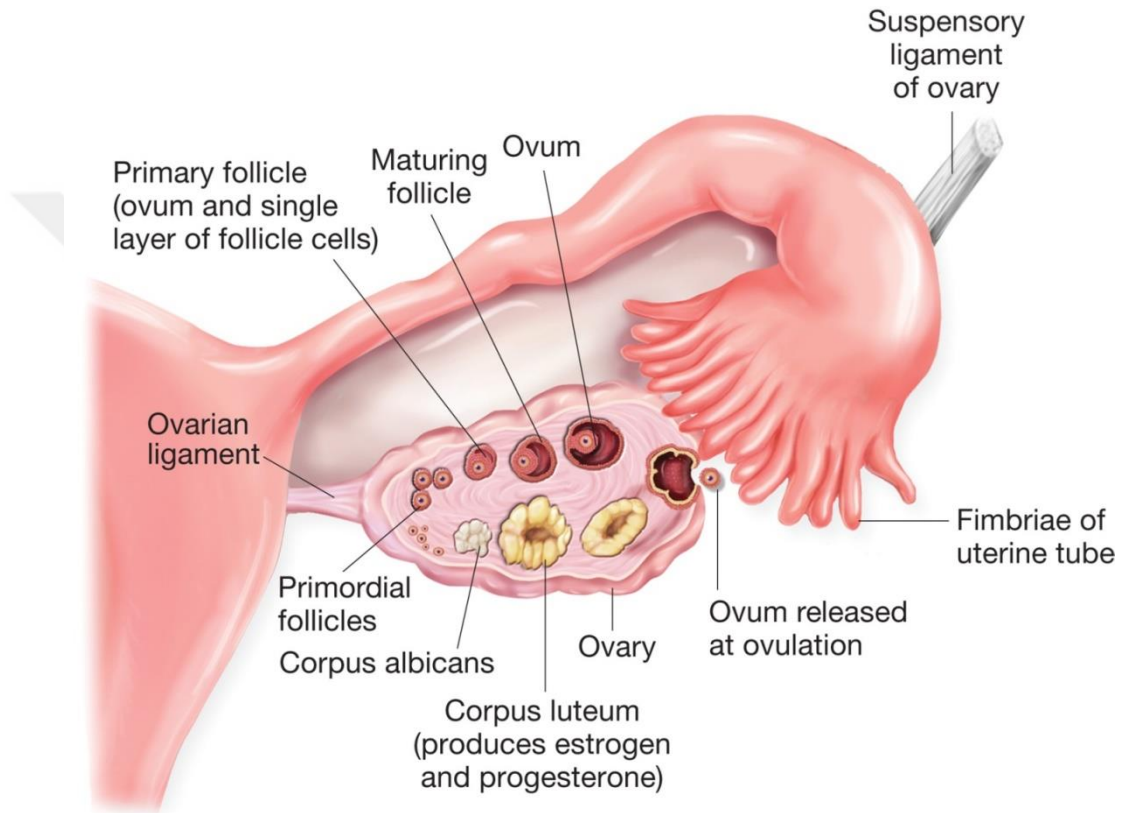
#### *Ovaryum*

Dişi üreme hücresi olan ovumu ve dişiye özgü seks hormonlarını (progesteron ve östrojen) üretmekle görevli olan ovaryumlar erkekteki testislerin karşılığıdır. Pelvis minor içerisinde fossa ovarica adı verilen çukurlukta yerleşmişlerdir. Pembemsi gri renkli olan ovariumların dış yüzü puberteden önce düzgün iken puberteden sonra ovulasyona bağlı olarak pürüzlü bir görünüm alır. Badem büyüklüğünde olan ovariumlar 4 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığında ve yaklaşık 5 gr ağırlığındadır (Çelik 2011) (Şekil 2).

Ovarium facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, extremitas tubaria ve extremitas uterina olmak üzere iki ucu ve margo liber ve margo



mesovaricus olmak üzere iki kenarı vardır. Ovaryum'u besleyen damarların (a. v. ovarica) etrafını periton sardığı için bir ligament şeklini almıştır. Tuba uterinaya tutunan ve lig. ovari suspensorium adı verilen bu bağ ovaryum'u asıci bir rol üstlenir. Ovaryum'un uterusu bakan ucu (extremitas uterina) ile uterusun üst dış köşesi arasında uzanan bağa ise lig. ovari proprium denir. Bu bağ sayesinde gebelik sırasında uterus ile birlikte ovariumun konumu da değişir (Çelik 2011) (Şekil 2).

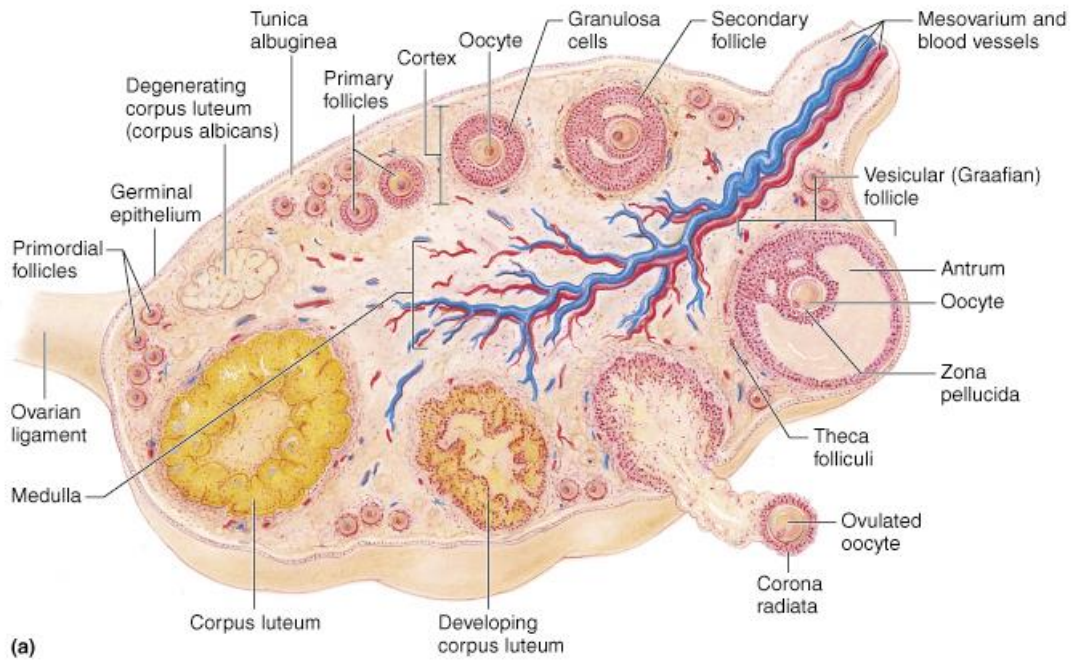


Şekil 2: Ovaryumun pelvis içi konumu (Gross 2012)

### ***Ovariumun Yapısı***

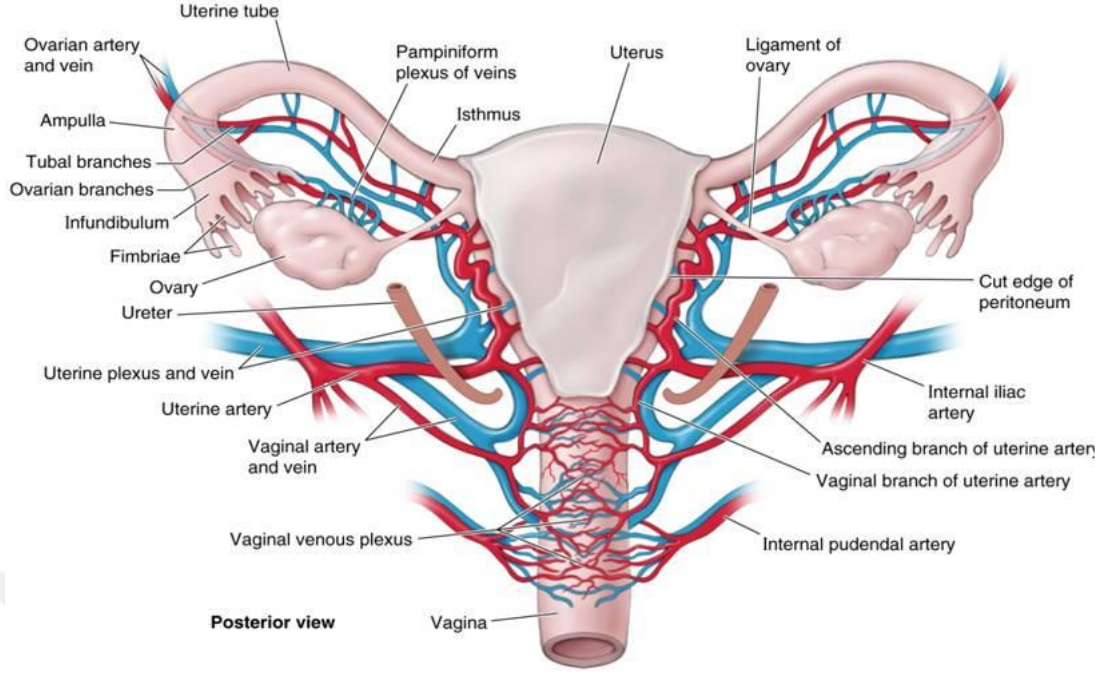
Ovariumlar dıştan peritoneum ile örtülüdür. Ancak bu periton puberteden itibaren değişikliğe uğrar ve yassı epitele dönüşür. Bu tabakanın altında kollagen liflerden zengin tunica albuginea denilen bir tabaka bulunur. Tunica albuginea'nın altında ovariumun esas dokusu bulunur. Bu doku dışta korteks ve içte medulla denilen iki kısma ayrılır. Korteks içerisinde çeşitli derecelerde gelişim gösteren foliküller ve bunların arasını dolduran bağ dokusu bulunur (Çelik 2011). Medullada gevşek bağ dokusu, damar ve sinirler bulunur. Puberteden önce korteksteki foliküller gelişmez ve primer follikül olarak kalır. Bunlar yaklaşık 400 000 tanedir ve

puberteden sonra çeşitli evrelerden geçerek Graaf folikülü'ne dönüşürler. Graaf folikülü olgunlaştıktan sonra içerisindeki ovum dışarı atılır (ovulasyon) ve Graaf folikülü korpus luteum halini alır. Korpus luteum progesteron hormonu salgılar ve fertilizasyon olursa hamileliğin ilk altı ayı süresince fonksiyon görür. Bundan sonra korpus luteum'un fonksiyonunu plasenta üstlenir. Fertilizasyon olmazsa korpus luteum kısa sürede (14 gün) ortadan kalkar ve korpus albicans'a dönüşür. Bir kadının doğurganlık süresince (menarş ve menapoz arası) yaklaşık 400 kez ovulasyon gerçekleşir (Çelik 2011) (Şekil 3).



**Şekil 3:** Ovaryumun yapısı (Cummings 2001)

Ovaryumların beslenmesini a. abdominalis'den çıkan a. ovarica'lar sağlar. Bu arter, lig. suspensorium içerisinde seyrederek hilum ovarii'den ovaryuma girer. Venleri ise arterleri takip ederek hilum ovarii'den çıkar. Önce plexus pampiniformis adı verilen bir venöz ağı, ardından da v. ovarica'yı oluşturur. V. ovarica, sol tarafta v. renalis'e sağ tarafta ise doğrudan v. cava inferiora dökülür. Lenf damarları ise nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aorticinlateralis'e açılır (Çelik 2011) (Şekil 4).



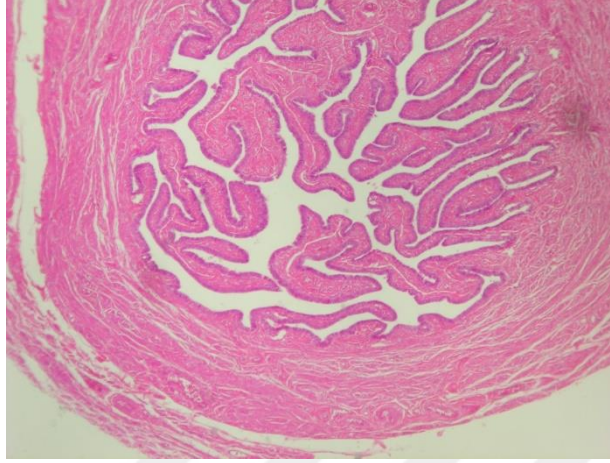
**Şekil 4:** Kadın iç genital organları kan damarları ve lenfatikleri (Kluwer 2010)

#### ***Tuba uterina (Salpinks, Fallop kanalı)***

Ovulasyonla karın boşluğuna atılan ovum'u yakalayarak uterusu iletmek ile görevli olan tuba uterina yaklaşık 10 cm uzunluğunda, 3 mm genişliğinde boru şeklinde bir tüptür. Lig. latum uteri'nin serbest olan üst kenarı boyunca uzanır. Lig. latum uteri'nin tuba uterina'ya yakın olan kısmına mesosalpinks denir. Tuba uterina'nın uterusu açılan deliğine ostium uterinum tuba, karın boşluğuna açılan deliğine ostium abdominale tuba denir. Uterusa yakın olan kısmı hemen hemen horizontal olarak laterale doğru seyreder. Daha sonra arkaya ve yukarı doğru ilerleyerek ovaryumun üst ucuna gelir (Çelik 2011).

Anatomik olarak tuba uterina'nın 4 kısmı vardır. Abdominal ucundaki en geniş kısma infundibulum denir. Distal ucunda peritoneal kaviteye açılır. Proksimal ucu ampullaya açılır. Huni şeklinde olan infundibulumun uçları fimbria denilen saçakları ihtiva eder. Bu saçaklardan bir tanesi daha uzun olup ovaryuma tutunur. Buna fimbria ovarica adı verilir. İnfundibulum, Graaf folikülün etrafını sararak ovulasyon anında ovumun tuba uterina'ya geçişini sağlarlar. İnfundibulumdan sonra gelen kısma ampulla denir. Tüpün en uzun bölgesi olup yaklaşık 7 cm uzunluğundadır. Ovumun fertilizasyonu burada gerçekleşir. Ampulladan sonra gelen tuba uterininin uterusu komşu, dar mediyal bölgesine isthmus denir. Tuba uterina'nın uterus duvarında

ilerleyen yaklaşık bir cm boyunda olan parçasına pars uterina (intramuralis) denir (Çelik 2011) (Şekil 5).



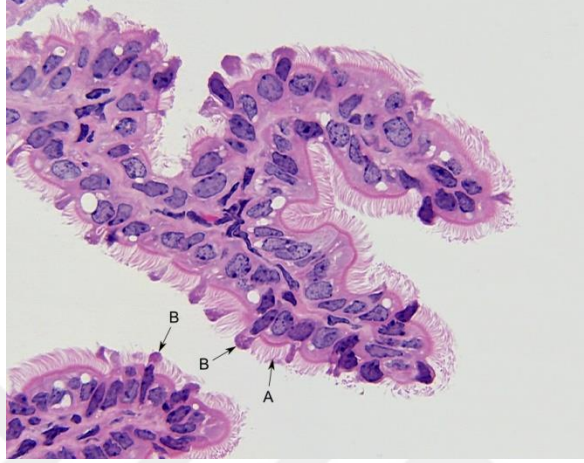
**Resim 1:** Tuba uterina histolojik kesit görüntüsü (CBÜ Histoloji-Embriyoloji AD.)

Tuba uterina'nın duvarı üç tabakalıdır. Dışta peritondan oluşan tunica serosa, ortada düz kaslardan meydana gelen tunica muscularis ve en içte ise tunica mucoza bulunur. Bununla birlikte, submukoza yoktur (Resim 1). Tunika serosa ya da periton, tuba uterinanın en dış tabakasıdır ve mezotelyumdan ve ince bir bağ dokusu tabakasından oluşmaktadır. Tunika muskularis, uzunluğunun çoğunda nispeten kalın bir iç sirküler tabakadan ve ince bir dış longitudinal (uzunlamasına) tabakadan oluşmaktadır. Bu tanakaların arasındaki sınır genellikle belirsizdir. Tunika mukoza, tuba uterinanın iç döşemesidir ve tuba uterinanın uzunluğu boyunca lümeneye uzanan longitudinal katlantılar sergiler. Ampulla bölgesinde katlantılar karmaşıklaşır, sayıca artar ve istmusa doğru gittikçe küçülür (Ross 2014).

Mukozal döşeme iki çeşit hücreden meydana gelen tek katlı prizmatik epitelden oluşur. Bu epitel hücreleri silyumlu ve silyumsuz hücrelerdir (Resim 2). Bu hücreler, tek bir hücre tipinin farklı fonksiyonel evrelerini temsil etmektedirler. Silyumlu hücreler infundibulum ve ampulla bölgelerinde sayıca fazladır. Silyumların yaptığı dalga uterusu yönelmiştir (Ross 2014). Bu hareketler sayesinde ovum uterus'a doğru taşınır (Çelik 2011). Silyumsuz peg hücreleri salgı hücreleridir ve ovum için besleyici materyali sağlayan sıvıyı üretirler. Bu epitel hücreleri, özellikle östrojen olmak üzere hormon seviyelerinin değişimine yanıt olarak siklik bir şekilde foliküler fazda hipertrofiye, luteal fazda ise atrofiye uğrarlar. Hormonal siklus sırasında

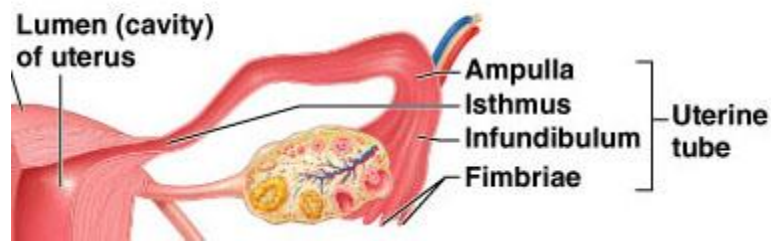


silyumlu hücrelerin silyumsuz hücrelere oranı da değişmektedir. Progesteron salgı hücrelerinin sayısını arttırırken, östrojen siliogenezi stimüle eder. Ovulasyon zamanında epitel 30 µm yüksekliğe ulaşır ve menstruasyonun başlamasından hemen önce uzunluğu yarıya düşer (Ross 2014).



**Resim 2:** Tuba uterina'nın tunika mukoza tabakası histolojik kesit (H&E).  
(<http://www.mikroskopie-forum.de> Erişim tarihi: 10 Aralık 2015)

Tuba uterina'nın beslenmesini a.uterina ve a.ovarica'dan gelen dallar sağlar. Venleri ise arterleri ile birlikte yandaş olarak seyredip v.uterina ve v.ovarica'ya dökülür (Çelik 2011).

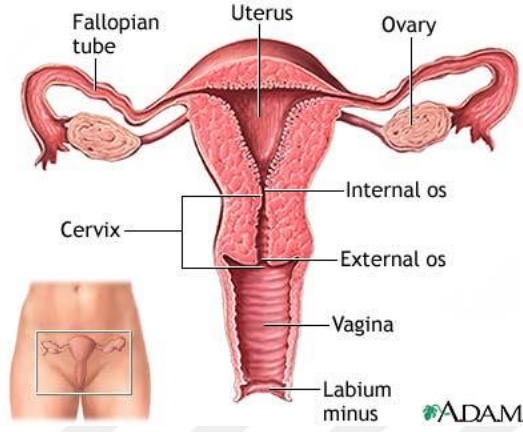


**Şekil 5:** Tuba uterina yapısı (Gross 2012)

### ***Uterus***

Ovumun tuba uterina'nın ampullasında fertilizasyonundan sonra gelip yerleştiği, tüm embriyonik ve fetal gelişimin gerçekleştiği (Ross 2014) ve doğuma kadar kaldığı, içi boş armut şeklinde bir organdır (Çelik 2011) (Şekil 6). Pelvis minor içerisinde, rektum'un önünde ve mesanenin arkasında yerleşmiştir. Doğurmamış kadınlarda 7,5 cm boyunda, 5 cm genişliğinde, 2,5-3 cm kalınlığında ve 30-40 gr

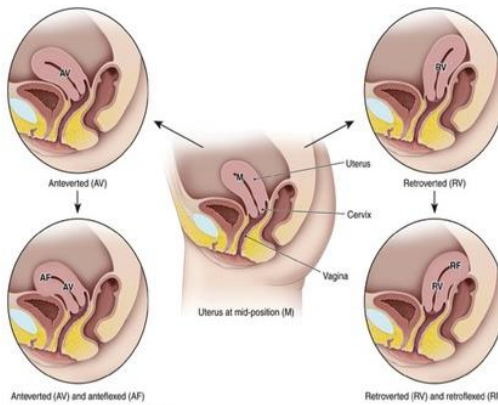
ağırlığındadır (Ross 2014; Çelik 2011). Hamilelik döneminde boyutları değişmektedir. Uterus normal olarak antevertio+antefleksio konumundadır (Şekil 7). Lümeni yassıdır ve tuba uterina'larla ve vagina ile devam eder (Ross 2014).



Şekil 6: Uterusun yapısı (White 2015)

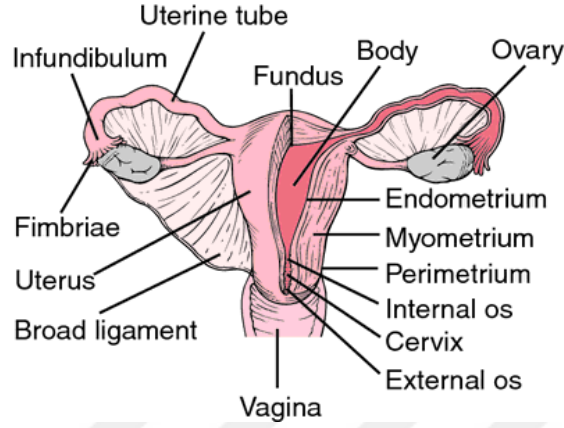
**Antevertio:** Uterusun eksenini pelvis eksenine ile aynı doğrultudadır. Uterusun uzun eksenini ile vagina'nın eksenini arasında açıklığı öne bakan yaklaşık 90°'lik bir açı oluşur. Uterus ve vagina arasındaki bu duruma antevertio denir.

**Anteflexio:** Uterusun serviksi, serviks ile korpusu arasında ortaya çıkan ve açıklığı öne bakan açıya anteflexio denir.



Şekil 7: Uterusun pozisyonları (<https://quizlet.com> Erişim tarihi: 10 Aralık 2015)

Uterus anatomik olarak korpus uteri ve serviks uteri olmak üzere iki kısımda incelenir (Ross 2014; Çelik 2011). Korpus uteri ile serviks uteri arasında kalan ve dıştan pek belirgin olmayan dar kısma isthmus uteri denir (Çelik 2011).



Şekil 8: Uterusun kısımları (Applegate 2000)

### ***Korpus Uteri***

Uterus'un 2/3 üst kısmını oluşturur (Çelik 2011). Uterusun büyük üst kısmıdır (Ross 2014). Mesane ile komşuluk yapan ön-alt yüzüne facies vesicalis adı verilir (Çelik 2011), bu yüzeyi düzdür (Ross 2014). Bu yüzü örten periton mesanenin üzerine atlar ve iki organ arasında bir çıkmaza neden olur. Bu çıkmaza excavatio vesico-uterina denilir. İnce barsaklarla komşu olan üst yüzüne ise facies intestinalis adı verilir. Alt yüze göre daha geniş ve konveks olan bu yüz arkada serviks uteri ve vagina üst bölümü ile devam eder. Bu yüzü örten periton tabakası da vagina arka-üst yüzünü örttüktan sonra rektuma geçerek ikisi arasında bir çıkmaza neden olur. Bu çıkmaza ise excavatio recto-uterina (Douglas çıkması) denilir. Uterus'un üst dış köşelerine tuba uterina'lar açılır. Bunların açıldığı köşeleri birleştiren hattın üzerinde kalan korpus kısmına fundus uteri adı verilir. Fundus uteri konveks yapıda olup periton ile kaplıdır. Barsak kıvrımları ve sigmoid kolon ile komşuluk yapar. Korpus uteri ile fundus uteri'nin birleştiği köşelere cornu uteri dextrum ve sinistrum denilir. Bu köşelere tuba uterina'larla birlikte ön ve aşağı kısmına lig. teres uteri, arka kısmına ise lig. ovari proprium tutunur (Şekil 8).

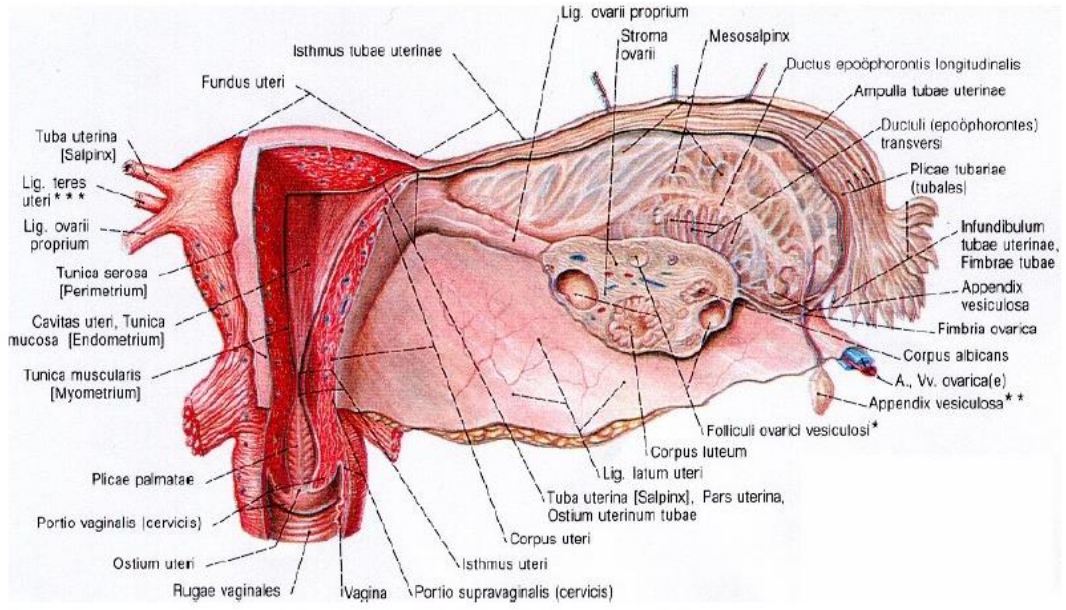
### ***Serviks Uteri***

Uterusun alttaki silindirik biçimli kısmıdır (Ross 2014) ve yaklaşık 2 cm uzunluğunda olup, uterus'un 1/3'lük alt bölümüdür (Çelik 2011). İsthmus uteri ile vagina arasında uzanır. Vaginanın üstünde kalan bölümüne portio supravaginalis, vaginanın içerisinde bulunan bölümüne portio vaginalis denir. Portio supravaginalis cervicis, ön tarafında bulunan bağ dokusundan oluşmuş parametrium aracılığı ile mesaneye komşuluk yapar. Parametrium aynı zamanda lig. latum uteri'nin iki yaprağı arasında yan tarafa doğru uzanır. A. uterina bu bağ dokusu içerisinde ilerleyerek serviks uteri'ye gelir. Portio supravaginalis arka tarafta periton ile örtülüdür.

Vagina ile devam eden serviks uterinin birleşme yerine portio vaginalis denilir. Burada bulunan uterusun vaginaya açılan deliğine ostium uteri (eksternal os) denir (Ross 2014; Çelik 2011) (Şekil 6). Bu delik doğurmamış bayanlarda yuvarlak iken doğurmuş bayanlarda transvers olarak uzanan bir yarık şeklindedir. Yarığın önünde kalan kısma labium anterius, arkasında kalan kısma labium posterius denir. Ostium uteri uterus'un içerisine doğru serviks kanalı ile devam eder. Portio vaginalis ile vagina üst kısmı arasında bulunan çıkmaza forniks vagina adı verilir. Dairesel şekilli olan bu çıkmazın ön kısmı pars anterior, arka kısmı pars posterior ve yan kısımlar ise pars lateralis olarak isimlendirilir. Pars posterior en derin çıkmazdır. Koitus esnasında meninin büyük bir kısmı buraya atıldığından dolayı receptaculum seminis de denilir.

Korpus uterinin iç boşluğuna cavitas uteri (internal os) denir (Ross 2014; Çelik 2011) (Şekil 6). Yaklaşık 6,5 cm kadardır. Üçgen şeklinde olan uterus kavitesinin tabanı fundus uteriye, tepesi ise serviks uteriye bakar. Köşelerine ise tuba uterinalar açılır. Uterus kavitesini vaginaya bağlayan kanala kanalis serviks uteri denir. Orta kısmı uçlarına göre daha geniş olan bu kanalın ön ve arka duvarında uzunlamasına birer çıkıntı bulunur. Bu çıkıntılardan yanlara doğru uzanan plikalara, plika palmatea denilir. Öndeki plikalar arkadaki plikaların arasında bulunan oluklara girerek kanalın iyice kapalı olmasını sağlarlar (Şekil 9).

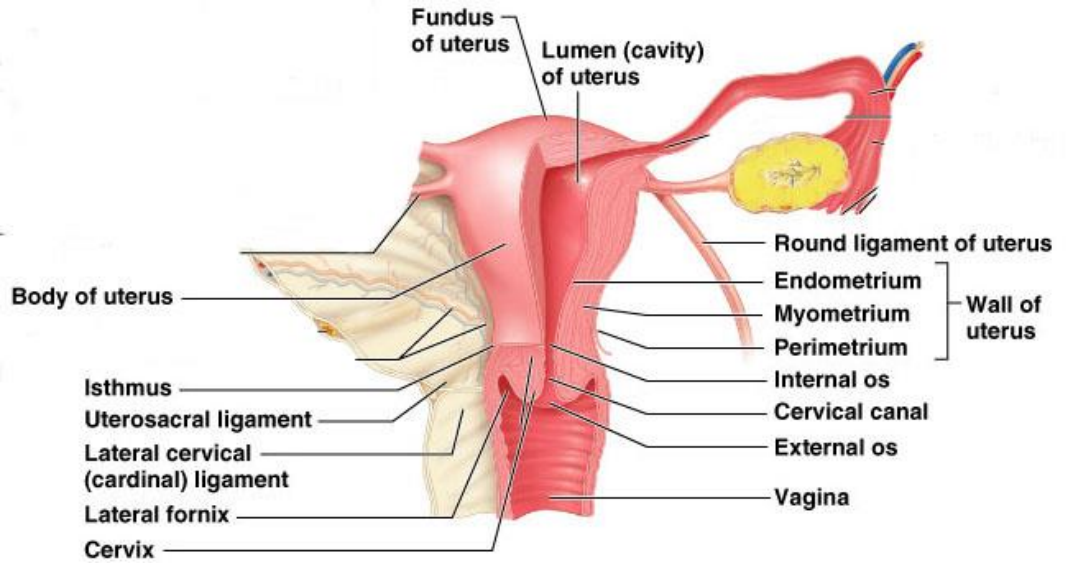




Şekil 9: Uterus, tuba uterina ve ovaryum frontal kesiti (Sobotta 1988)

### *Uterusun Yapısı*

Uterus duvarı dışta perimetrium, ortada miyometrium ve içte endometrium olmak üzere üç tabakadan oluşur (Şekil 10).



Şekil 10: Uterusun yapısı (Gross 2013)

### *Perimetrium (Tunika seroza)*

Dışta uterusun farklı bölümlerine göre ya seroza (bağ dokusu ve mezotelyum) ya da adventisya (bağ dokusu) yer alır (Junqueira 2009). Pelvik ve abdominal periton ile

devam eder. Mezotelyumdan ve ince bir gevşek bağ dokusu tabakasından meydana gelmektedir. Mezotelyumun altında bir elastik bağ doku tabakası belirgindir. Perimetriyum anterior yüzeyin bir kısmını kaplarken posteriyor yüzeyin tamamını kaplar. Anterior yüzeyin kalan kısmı bağ dokusu ya da adventisya ile kaplıdır (Ross 2014). Yanlarda lig. latum uteri olarak devam eder (Çelik 2011) (Şekil 10).

### ***Miyometrium (Tunika muskularis)***

Uterusun en kalın tabakası olup bağ dokusu ile ayrılmış (Junqueira 2009) düz kas liflerinden meydana gelmiştir (Çelik 2011) (Şekil 10). Bu tabakayı oluşturan düz kaslar, spiral, longitudinal ve sirküler tarzda düzenlenmiştir (Çelik 2011). Birbirinden ayırt edilemeyen üç düz kas tabakasından oluşmaktadır (Ross 2014). Kas tabakası hormonal etki ile değişiklik gösterir (Çelik 2011). Orta kas tabakası, çok sayıda büyük kan damarları (venöz pleksuslar) ve lenfatikler içermektedir ve stratum vaskulare adını alır. En kalın tabakadır ve sirküler ya da spiral örüntü ile hizalanmış iç içe geçen düz kas demetlerine sahiptir. İç ve dış tabakalarda bulunan düz kas demetleri uterusun uzun eksenine paralel şekilde oryante olmuşlardır (Ross 2014).

Rutin histolojik kesitlerde kas demetleri rasgele dizilmiş gibi görünürler. Uterin kontraksiyon sırasında miyometriyumun her üç tabakası fonksiyonel bir sınırtım gibi birlikte çalışır ve lümen içeriğini dar ağza doğru atar (Ross 2014).

Gebe olmayan uterusda düz kas hücreleri yaklaşık 50 µm uzunluğundadır (Ross 2014). Hamilelik döneminde kas fibrillerinin sayısı artar ve her bir kas lifi hipertrofiye uğrayarak büyür (Çelik 2011). Gebelik sırasında uterus büyük ölçüde genişler. Bu büyüme primer olarak varolan düz kas hücrelerinin hipertrofisi ile sağlanır ve düz kas hücreleri yaklaşık 500 µm uzunluğuna ulaşırlar. Sekonder olarak da diferansiye olmamış mezokimal hücrelerin farklılaşması ve varolan kas hücrelerinin bölünmesi ile yeni lifler oluşur. Bağ dokusunun miktarı da artar. Gebelik ilerledikçe uterusun duvarı fetusun büyümesi nedeniyle gerilerek gittikçe incilir. Doğumdan sonra uterus hemen hemen orijinal boyutuna geri döner. Bazı kas fibrilleri dejenere olur, fakat çoğu orijinal boyutlarına geri dönerler. Gebelik sırasında miyometriyumu sağlamlaştırmak için üretilen kollajen daha sonra kollajeni salgılamış olan hücreler tarafından enzimatik yıkıma uğratılır. Gebelik öncesine göre uterusun kavite büyük kalır ve kaslar kalın kalır (Ross 2014). Korpus luteumdan ve plasentadan salgılanan progesteron, uterus kaslarının kasılmasını

engellerken hipofizden salgılanan oksitosin uterus kaslarının kasılmasını artırır. Östrojen hormonu ise kas tabakasının normal hacmini koruması ve fonksiyonlarını sürdürmesi için gereklidir. Östrojen yoğunluğunda atrofi oluşur (Çelik 2011).

Uterusun gövdesiyle karşılaştırıldığında, serviks daha çok bağ dokusu ve daha az miktarda düz kas içermektedir. Servikste elastik fiberler bol miktarda iken, uterusun gövdesinde sadece miyometriyumun dış tabakasında fark edilebilir miktarda bulunmaktadır (Ross 2014).

### ***Endometrium (Tunika mukosa)***

Uterusun en iç tabakası olan endometrium yaklaşık 5 mm kalınlığında soluk kırmızı renkli bir yapıdır (Şekil 10). Yüzey epiteli tek katlı silyalı silindirik epitel özelliğindedir. Lamina propriası oldukça kalındır. Lamina propriada uterus bezleri bulunur. Ovarial siklusa bağlı olarak bu bezlerin yapısı değişmektedir (Çelik 2011).

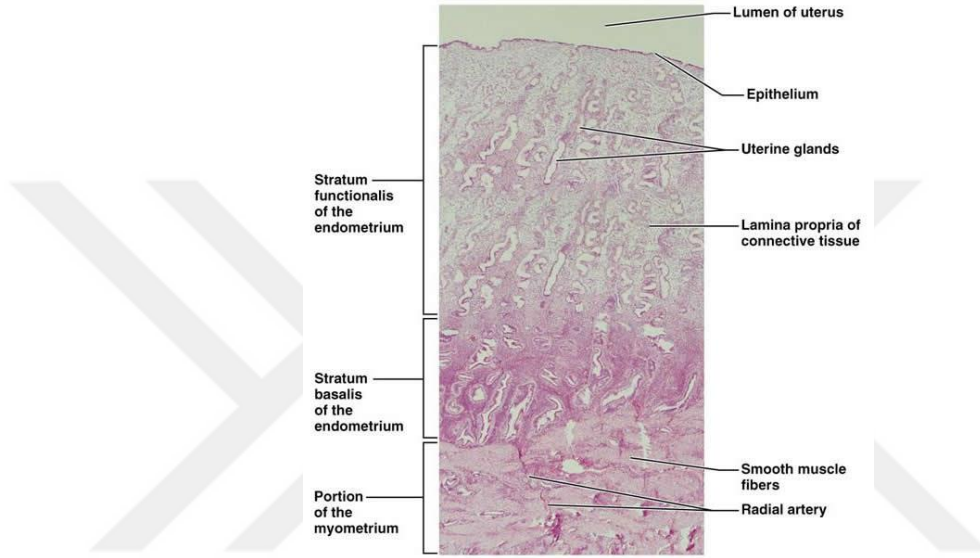
Menstrual siklusun fazları gerçekleşirken endometriyumun kalınlığı 1-6 mm arasında değişir. Endometriyum salgı hücrelerini ve silyumlu hücreleri içeren tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Yüzey epiteli uterus bezlerini oluşturmak üzere alttaki lamina propriya tabakasının yani endometriyal stromanın içine doğru invajine olur. Böylece oluşan basit tübüler bezler az sayıda silyumlu hücre içerirler ve endometriyumun derin kısmına doğru dallanırlar. Mezenkime benzeyen endometriyal stroma yüksek düzeyde selülerdir ve bol miktarda interselüler ara madde içermektedir. Tuba uterinada olduğu gibi, endometriyumu miyometriyumdan ayıran bir submukoza yoktur (Ross 2014).

Üreme çağında endometriyum her ay kendisini embriyo implantasyonuna ve sonrasında gelen embriyonik ve fetal gelişim olaylarına hazırlayan siklik değişimlere uğrar. Siklus sırasında endometriyumun salgı aktivitesindeki değişimler ovaryum folikülerinin olgunlaşmalarıyla korelasyon göstermektedir. Her siklusun sonu, endometriyumun bölgesel yıkımına ve dökülmesine eşlik eden mukozal damarlardan kanama ile karakterizedir.

Üreme çağında endometriyum yapısal ve fonksiyonel olarak farklı iki tabakadan oluşur (Ross 2014) (Resim 3):

**A) Endometrium basalis (Stratum bazale):** Endometriumun 1/3'lük taban kısmıdır. Menstrual sıklardan etkilenmez.

**B) Endometrium fonksiyonali (Stratum fonksiyonale):** Endometriumun 2/3 yüzey tabakası olup menstrual sıklardan etkilenir ve her 28 günlük dönemde yenilenir.



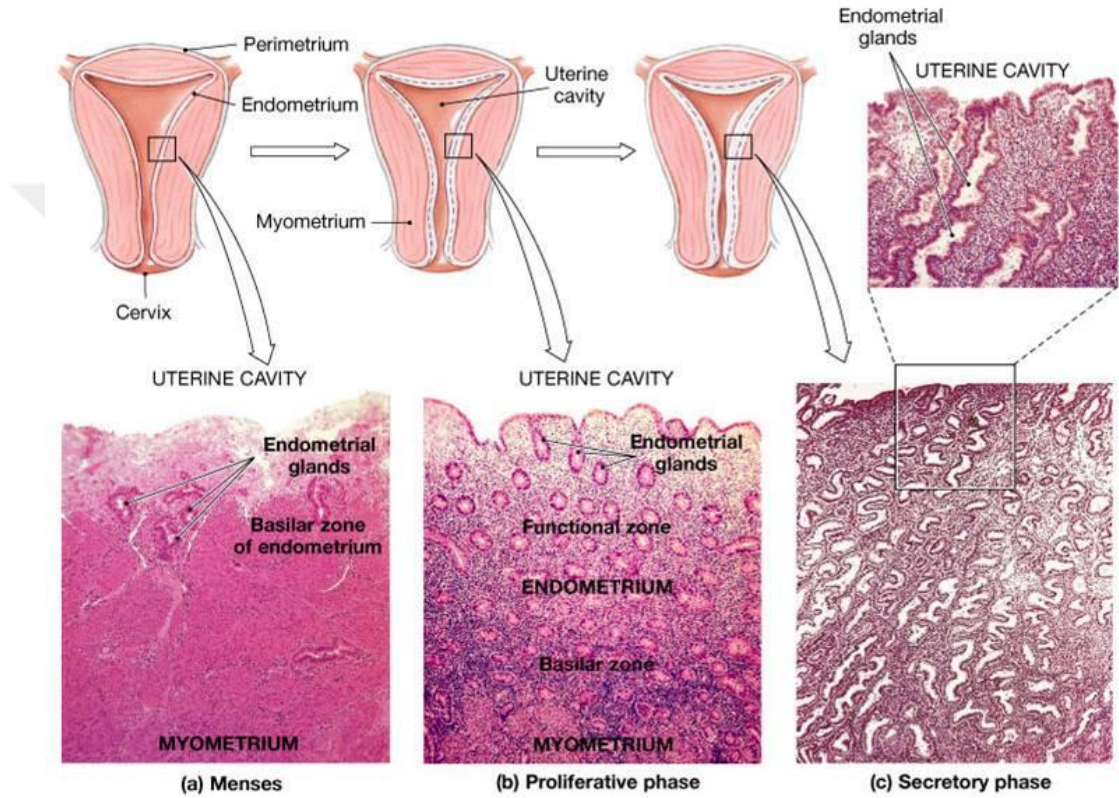
**Resim 3:** Endometriyumun tabakaları (<http://classes.midlandstech.edu> Erişim tarihi: 10 Aralık 2015)

### ***Menstrual Döngü***

Gebe olmayan kadınlarda puberteden itibaren başlayıp menapoz dönemine kadar devam eden menstrual siklus, uterus endometriumunda stratum fonksiyonale tabakasındaki gelişimsel evrelerin arka arkaya devam etmesiyle meydana gelen sürece denir (Çelik 2011; Ross 2014). Pitüiter bezin pars distalisinden salgılanan ve ovaryumun steroid salgılarını düzenleyen gonadotropinler tarafından kontrol edilmektedir (Ross 2014). Bu siklus ortalama 28 gün sürer (Ross 2014) fakat kadınlar arasında bu süre 20 günden kısa veya 45 günden uzun dönemlerde de olabilir (Çelik 2011). Doğurganlıkla menstrual döngü sıklığı arasında ilişki bulunur ve döngü bozukluğu olanlarda üreme yeteneği azalır. Yeni bir menstrual döngü başlangıcının ilk bulgusu 3-5 gün devam eden menstrüasyon kanamasıdır (Çelik 2011).

Menstrüel döngü boyunca endometriyuma ait üç dönem tarif edilir (Şekil 11) (Tablo 1):

- i) Proliferatif Dönem
- ii) Sekretuar Dönem
- iii) İskemik Dönem



**Şekil 11:** Menstrual siklus fazlarında uterus yapısı (<http://www.austincc.edu.tr> Erişim tarihi: 07 Aralık 2015)

Endometriyum geniş kapsamlı kan damarları sistemine sahiptir (Şekil 12). Uterin arterden, miyometriyumda anastomoz yapan 6-10 arkuat arter çıkar. Bu arterlerin dalları olan radial arterler endometriyumun bazal tabakasına girerler ve burada endometriyumun bu bölgesini besleyen küçük düz arterleri oluştururlar. Radial arterin ana kolu yukarı doğru devam eder ve yüksek düzeyde sarmal hale gelir. Bu nedenle bu artere spiral arter denmektedir. Spiral arterden çok sayıda arteriyol çıkar ve bunlar kapiller ağı desteklerken sıklıkla anastomozlaşırlar. Kapiller yatak, laküna adı verilen ince duvarlı dilate segmentler içermektedir. Endometriyumu

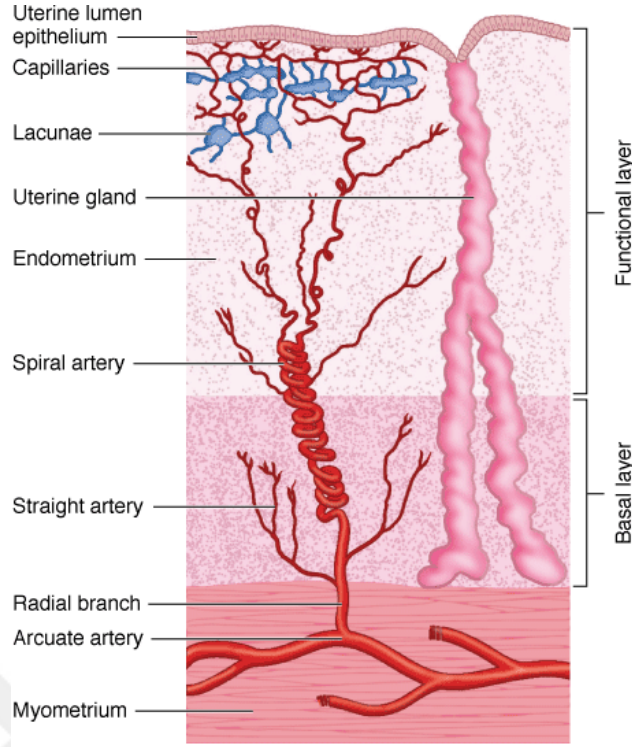


drene eden venöz sistemde de laküna bulunabilmektedir. Menstrual siklus sırasında düz arterler ve spiral arterlerin proksimal parçaları değişime uğramaz. Östrojenlerin ve progesteronun etkisi altında spiral arterlerin distal parçaları her menstrual siklusta dejenerasyona ve rejenerasyona uğrar (Ross 2014).

Menstrual dönemin ilk iki haftası overlerde folikülerin gelişme dönemidir ve bu evreye foliküler evre denir. Ovulasyon menstrual siklusun 14. gününde gerçekleşir. Döngünün süresi foliküler dönemin uzunluğuna göre değişir (Çelik 2011).

Ovariyan döngü östrojen ve progesteron tarafından kontrol edilen döngüsel endometriyumun yapısının büyümesini, değişmesini ve dökülmesini kapsar. Bu değişimler için steroid hormonlar en önemli görevi almasına rağmen lokal parakrin ve otokrin faktörler de önemlidir. Bu lokal faktörlerin en önemli kaynağı lökositlerdir. Menstrual döngünün zaman ve yerine göre endometriyumdaki lökosit sayısında ve tipinde değişim olur. Lökositler aynı zamanda implantasyon, serviks açılması ve doğumda da görev alır. Lökositlerin lokal olarak etkili olmasını sağlayan kemokinlerdir. Endometriyumda birçok fizyolojik ve patolojik olaya neden olan kemokinler aynı zamanda ovaryumların fonksiyonları (foliküler gelişim, ovulasyon, steroidogenesis, atrezi ve korpus luteum) için de önemlidir.

Miyometriyumda ovaryan döngüye paralel değişimler gösterir. Bu değişimler miyometriyumun kas hücre sayısı, aralarındaki gap junction ve kasılabilme özellikleridir.



**Şekil 12:** Uterus endometriyumunun arteriyel kan desteğini gösteren şematik diyagram (Junqueira 2009)

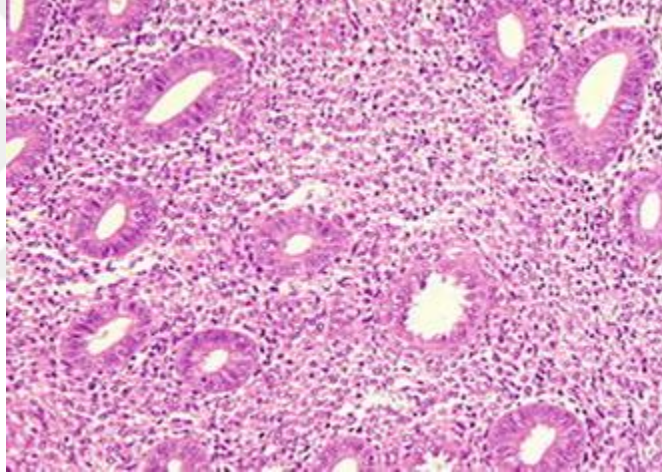
### ***Proliferasyon Safhası***

Menstrual kanamanın beşinci gününden itibaren başlar, 15. veya 16. güne kadar devam eder (Çelik 2011) ve foliküler maturasyon ile aynı anda gerçekleşir (Ross 2014). Uterus mukozası folikül uyarıcı hormon (FSH; Follicle Stimulating Hormone) etkisiyle kalınlaşır (Ross 2014; Çelik 2011). Uterus bezleri büyür. Fakat salgı yapmaz. Mukozayı besleyen kan damarları genişler.

Menstrual fazın sonunda endometriyum yaklaşık bir milimetre kalınlığında ince bağ dokusundan meydana gelir ve bu bağ dokusu uterus bezlerinin bazal kısımları ile spiral arterlerin alt kısımlarını içerir (Şekil 12). Bu tabaka stratum bazaledir. Dökülmüş olan tabaka ise stratum fonksiyonaledir (Ross 2014). Stratum bazaledeki stromal, endotelial ve epitelyal hücreler hızla prolifer olurlar ve aşağıdaki değişiklikler görülebilir:

- Bezlerin bazal bölgelerindeki epitelyal hücreler bezleri yeniden yapılandırılır ve soyulmuş olan endometriyal yüzeye göç ederek orayı kaplarlar.
- Stromal hücreler prolifer olurlar ve kollajen ile ara madde salgırlar.

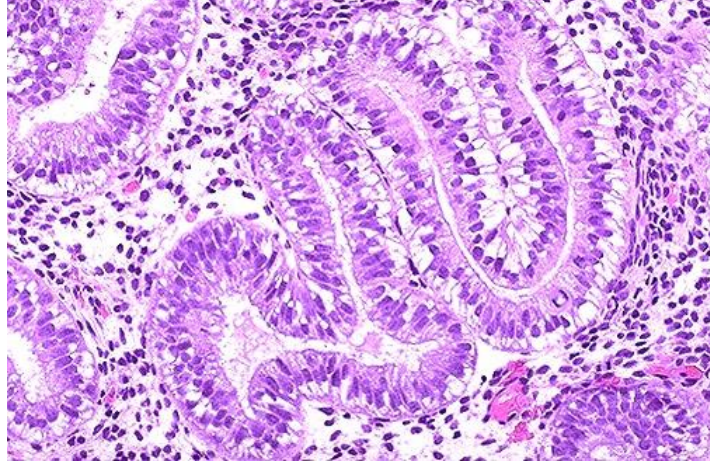
Genellikle 5 günden az sürdüğü kabul edilen menstrual siklusu takiben ortalama 10 gün süren (9-20 gün arasında) proliferatif dönemde artan östrojen seviyesi ile birlikte bezler, stroma ve damarlar eş zamanlı olarak çoğalır (Çelik 2011). Endometriyum yeniden oluşurken spiral arterler uzar. Bu arterler hafifçe sarmallaşır ve endometriyumun üst üçte birlik kısmına uzanmazlar (Ross 2014). Erken proliferatif (bu dönemin ilk üçte birinde) safhada bu üç bileşkenin eşit çoğalması söz konusuysen daha sonra bezler ve damarlar daha fazla çoğalarak orta ve geç proliferatif safhada kıvrımlı yapı kazanırlar (Ross 2014). Bezler dar lümen ve nispeten düz, hafif dalgalı görünümüne sahiptirler (Ross 2014). Bezlerin epiteli mitoz görülen, büyük ve koyu çekirdekli yalancı çok katlı silindirik epitelidir (Çelik 2011) (Resim 4).



**Resim 4:** Proliferasyon dönemi endometriyum histolojik görünümü (H&E) (Buy ve Ghossain 2013)

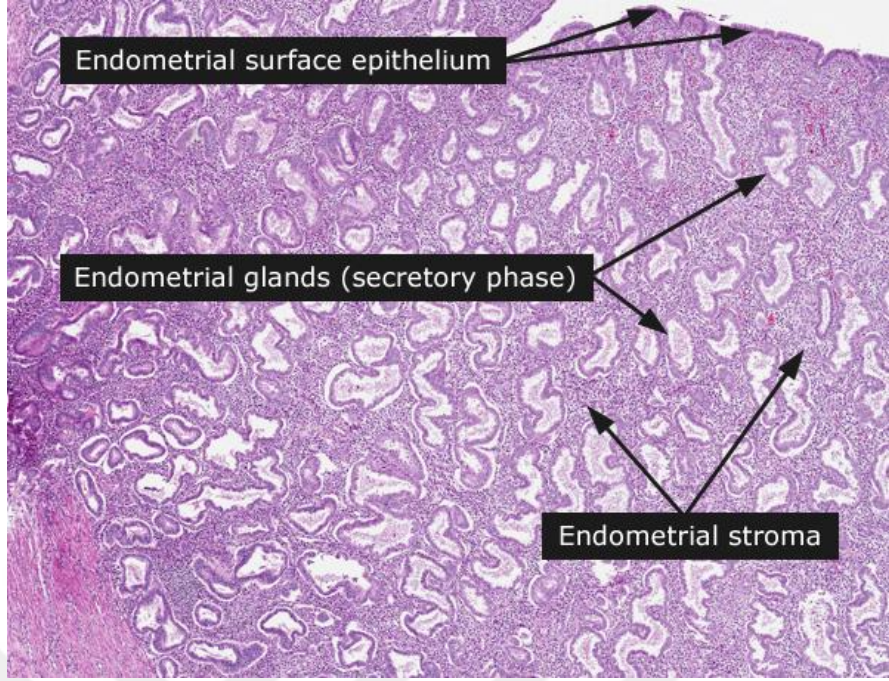
Proliferasyon döneminin son iki gününde mitozlar azalır, bezler daha fazla kıvrımlı olur, epitel hücrelerinin çekirdekleri altında glikojen boşlukları (subnükleer vakuol) oluşmaya başlar (Çelik 2011) (Resim 5). Rutin histolojik preparatlarda glikojenin uzaklaştırılması bazal sitoplazmaya boşluklu bir görünüm verir (Ross 2014).





**Resim 5:** Ovulasyon sonrası endometriyal bezlerde subnükleer glikojen vakuolleri (H&E) (Pernick 2012)

28 günlük bir siklusda luteinizan hormon (LH) tepe noktasına 14. günde ulaşır ve ovulasyon meydana gelir ve 14 gün sürecek olan luteal dönem başlar. Ovulasyonu takip eden ilk 24 ila 36 saat düzensiz subranükleer vakuollerin görüldüğü geç proliferasyon dönemi ara dönemdir. Östrojene bağlı değişikliklerin ardından ovulasyonunun olduğunun en önemli kanıtı ovulasyonu takip eden ikinci günde epitelde yaygın olarak subranükleer vakuollere sahip hücrelerin ortaya çıkmasıdır (Resim 5). Bu subranükleer vakuollerin endometriyum bezlerinin en az yarısında görülmesi ovulasyonun olduğunu kanıtlar. Daha sonraki günlerde bu vakuoller daha yukarıya hareket ederler ve ovulasyonun 5. gününde lümende salgı olarak görülürler. Ovulasyon sonrası beş ila dokuzuncu gün arasında lümende salgı bulunan ileri derecede kıvrımlı bezler ve ödemli stroma bulunur (Resim 6). Ovulasyon sonrası 10 ila 14. günde ise stromada belirgin spiral arteriyoller ve önce bunların çevrelerinde daha sonra gittikçe artarak yaygın hale gelen geniş sitoplazmalı desidua öncesi (predesidua) hücreleri ortaya çıkar. Bu dönemde bezlerde ileri derecede testere dişlerini andıran yuvarlak soluk içerikli epitel hücreleriyle döşelidir (Çelik 2011).



**Resim 6:** Sekresyon fazında endometriyum görünüm (H&E)  
(<http://www.proteinatlas.org>, Erişim tarihi: 08 Aralık 2015)

### ***Sekresyon Safhası***

Menstrual siklusun 15-16. günlerinde başlar ve bir sonraki menstrual siklusa kadar devam eder. Ovulasyondan sonra folikül yerinde oluşan korpus luteumdan progesteron salgılanır. Östrojenlerin ve progesteronun ardışık etkileri ile stromal hücrelerin desidual hücelere dönüşümü mümkün hale gelir (Ross 2014). Progesteronun etkisiyle uterus bezlerinde salgılama ortaya çıkar. Uterus mukozası süngerimsi bir görünüm alır ve implantasyon için uygun bir ortam hazırlanmış olur (Çelik 2011). Dönüşüm için gereken stimülasyon, blastokistin implantasyonudur (Ross 2014). Eğer fertilizasyon gerçekleşmiş ise uterusun bu durumu bir müddet daha devam eder. Fertilizasyon olmamış ise menstruasyon başlar (Çelik 2011). Bu dönüşümün sonucunda büyük, soluk ve glikojen bakımından zengin hücreler ortaya çıkar. Bu hücrelerin kesin fonksiyonları bilinmemekle birlikte, embriyonun beslenmesi için gerekli ortamı sağladıkları ve gebeliğin sonlanması sırasında plasantanın uterusun duvarından ayrılmasını kolaylaştıran özelleşmiş bir tabaka oluşturdukları açıktır (Ross 2014).

Endometriyum ödemli hale gelir ve sonunda yaklaşık 5-6 mm kalınlığına ulaşır. Bezler büyür ve kıvrıntılı hale gelirler, lümenleri salgı ürünleri ile dolduğu için sakküle (kesecikli) olurlar (Resim 6). Bez epiteli tarafından üretilen mukoid sıvı

implantasyonun gerçekleşmesi halinde gelişimi desteklemek üzere besin bakımından, özellikle de glikojen bakımından zengindir. Mitoz artık nadirdir. Bu aşamada görülen büyüme, epitelyal hücrelerin hipertrofisi, vaskülaritenin artması ve endometriyumun ödeminin sonucudur. Bununla birlikte, spiral arterler uzarlar ve daha fazla sarmal hale gelirler. Hemen hemen endometriyumun yüzeyine kadar uzanırlar (Resim 6) (Ross 2014).

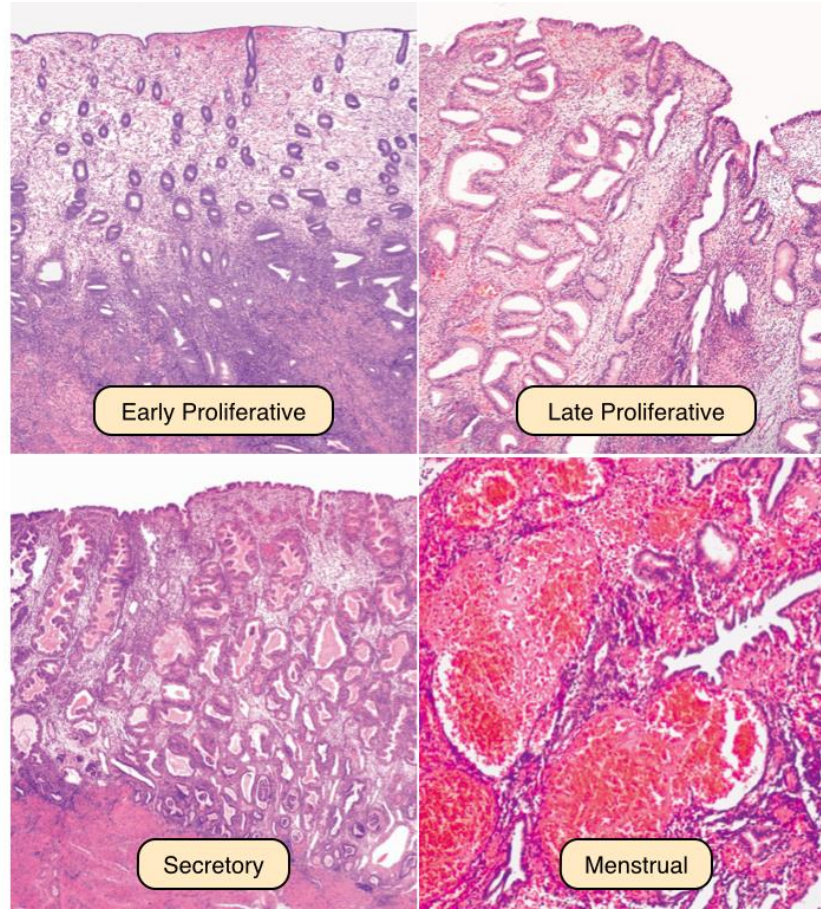
Sekretuar dönem sırasında, embriyonun implantasyonu için uterusun iyi tarif edilmiş bir kısa kabul dönemi (implantasyon penceresi) vardır ve bu dönemde interlökin-8 (IL-8; Interleukin-8) ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1; Monocyte Chemoattractant Protein-1) sentezinde azalma olur. Sekretuar dönemin sonuna doğru yükselen progesteron seviyesinin baskılayıcı etkisinin belirtisi olarak östrojen reseptörünün glandular ekspresyonu belirgin olarak azalır. Luteal dönemin son zamanlarında, endometriyum, ön hipofiz gibi prolaktin yapar, fakat endometriyal prolaktinin fonksiyonu bilinmemektedir. Progesteron, implantasyon sırasında lokal inflamatuvar cevabı azaltır. Eğer hamilelik gerçekleşirse IL-8 ve MCP-1 sentezinde azalma olurken interferon-gama (IFN- $\gamma$ ; Interferon gamma), platelet aktive edici faktör (PAF; Platelet Activating Factor) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ; Tumor Necrosis Factor-Alpha) sentezinde artış olur (Çelik 2011).

### ***Menstruasyon Safhası***

Menstrual dönem, endometrium süperfisiyal tabakasının iskemisi sonucu ve proteolizisi sonucu endometriyumun dökülmesi ile karakterizedir. Proteolitik enzimler postovulatuvar periyodun ilk yarısında membrana bağlı lizozomlarda depo edilir. Menstrual döngünün 24-25. günlerinde, östrojen ve progesteron azalması ile bu lizozomların membran bütünlüğünün kaybolması sonucu, glandular, stromal hücreler ve vaskuler endotelyal hücrelerinin lizisi gerçekleşir (Çelik 2011). Fertilizasyon gerçekleşmezse korpus luteum yaklaşık 10 gün aktif olarak hormon üretir. Hormon düzeylerinin ani düşüşü ile stratum fonksiyonaleye kan desteğinde değişimler olur. İlk olarak spiral arterlerin duvarlarının birkaç saat süren periyodik kasılmaları stratum fonksiyonalenin iskemik hale gelmesine neden olur. Bezlerin salgılanması durur ve stromadaki ödemin azalması ayrıca beslenme azalmasına bağlı olarak ekstrasellüler sıvının azalması ve spiral arterlerin vazokonstrüksiyonu ile endometriyum yükseklik olarak büzüşür (Çelik 2011; Ross 2014). Yaklaşık iki gün



sonra, uzun süreli arteriyel kontraksiyon ve kısa süreli kan akımı nedeniyle yüzey epitelinde bozulma ve kan damarlarında rüptür meydana gelir (Ross 2014). Spiral arterler kapandığında kan stratum fonksiyoneliye değil stratum bazaleye akar. Kan, uterin sıvı ve stratum fonksiyonaleden dökülen stromal ve epiteliyal hücreler vajinal akıntıyı oluşturur. Endometriyumdan doku yamalar halinde ayrıldıkça venlerin, arterlerin ve bezlerin kopmuş uçları ortaya çıkar (Resim 7). Bu deskuamasyon, sadece stratum bazale kalana kadar devam eder (Ross 2014).



**Resim 7:** Uterin siklusun sınıflandırılması (<http://medcell.med.yale.edu.tr> Erişim tarihi: 08 Aralık 2015)

Menstrual kanama sırasında endometriyumda MCP-1, makrofaj inflamatuvar protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ; Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ ), IL-8 ve RANTES (Aktivasyon üzerine düzenlenen, normal T hücresi ekspresyonlu ve salınımlı; Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) üretiminde artış meydana gelir. Ayrıca, sekretuar dönemin son bölümünde endometriyumda

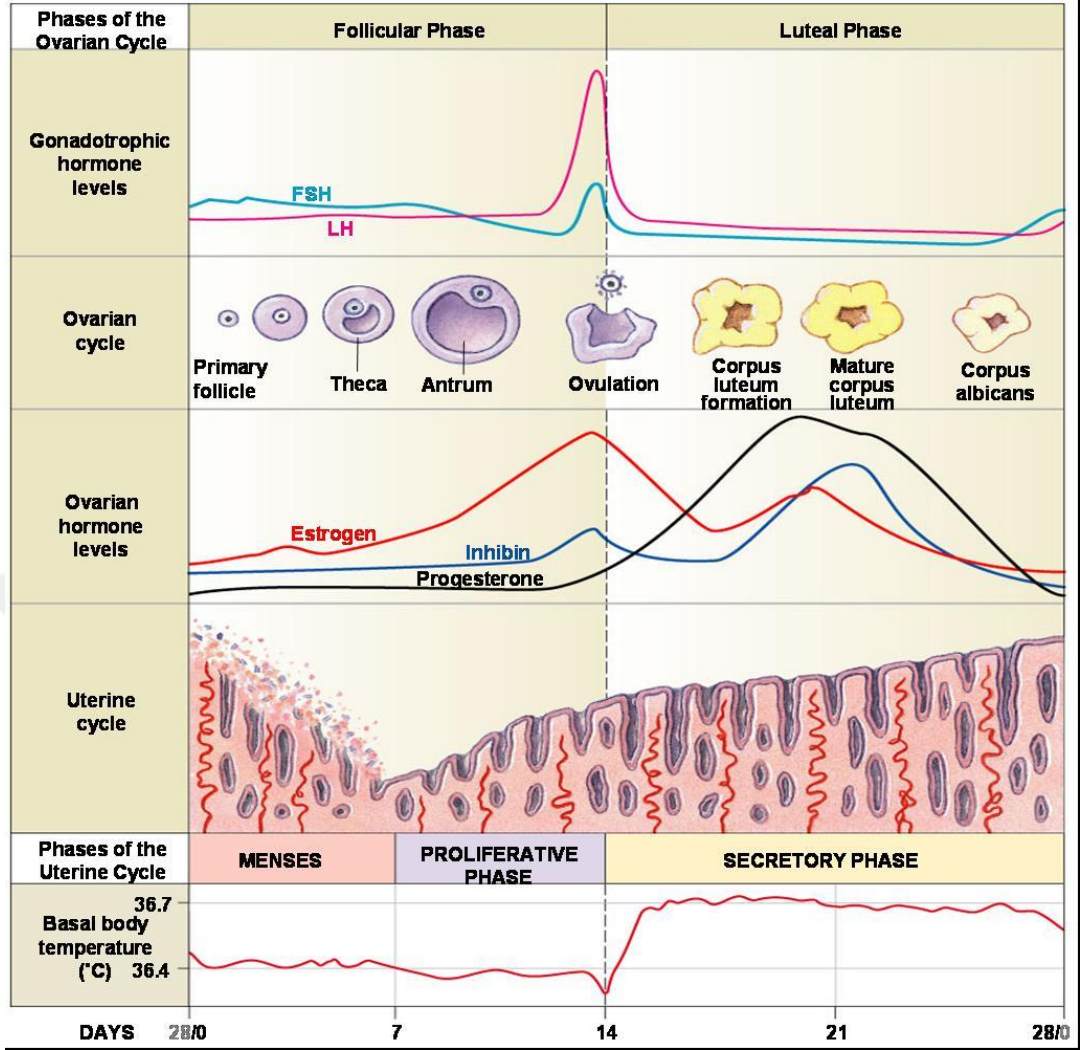
prostaglandin F2 $\alpha$  yapımında da artış olur. Bu artış, dejenere olmuş endometriumun dışarı atılmasına yardımcı olmak için lizozomlardan asit hidrolaz yapımını ve miyometriyal kontraksiyonu artırır. Vazokonstrüksiyon yavaş yavaş ilerlerken hasara uğramış damarlardan kan sızarak menstrual kanama başlar ve sonuçta bazal tabaka hariç endometriumun tümü uterustan dökülerek kanla dışarı atılır. Spiral arterlerin vazokonstrüksiyonunun ikincil döneminde kanama en aza indirgenir. Menstrual kanın büyük kısmı arteriyal kökenli iken ancak %25'i ven kökenlidir. Menstrüel kan, doku artıkları, prostaglandinler ve büyük miktarda endometriyal dokudan köken alan fibrinolizin içerir. Bu fibrinolizin pıhtıyı erittiği için normal bir menstrüel kanda eğer kanama çok fazla olmazsa pıhtılaşma olmaz (Çelik 2011). Arteriyal kan akımı spiral arterlerin duvarlarının gevşediği kısa periyotlar dışında sınırlandırılmıştır. Venlerin açık uçlarından devamlı olarak kan sızar (Ross 2014).

Menstrual kanamanın süresi genellikle 3-5 gün kadardır, fakat normal bir kadında 1 gün kadar kısa olabildiği gibi 8 gün kadar uzun da olabilir. Menstrual kan kaybı bir lekeden 80 mL'ye kadar olabilir fakat ortalama kayıp 30 mL civarında olup 80 mL'den fazla kayıp anormaldir. Alınan ilaçlar ve pıhtılaşmayı etkileyen hastalıklar dahil olmak üzere birçok faktör hem endometriumun kalınlığını hem de kanama miktarını etkiler (Çelik 2011).

Ovulasyon olmadığında (anovulatuvar siklus) korpus luteum oluşmaz ve progesteron üretilmez. Progesteron yokluğunda, endometriyum sekretuar faza geçmez ve menstruasyona kadar proliferasyon fazında kalır. İnfertilite olgularında endometriyum biyopsisi anovulatuvar siklusların ve ovaryum ve endometriyum ile ilgili diğer bozuklukların tanımlanmasında kullanılabilir (Ross 2014).

Fertilizasyon gerçekleşmemiş ise, kanamanın durması, yeni ovaryum foliküllerinin büyümesine ve olgunlaşmasına eşlik eder. Epitelial hücreler, bir sonraki siklusun proliferasyon fazı başlarken yüzey epitelini eski haline getirmek için hızlıca proliferasyon olurlar ve göç ederler (Ross 2014).

İmplantasyon meydana gelmişse ovulasyonun 14. gününden itibaren predesidua geniş sitoplazmalı epitel andıran desidua hücrelerine dönüşür. Bu hücrelerde özellikle implantasyon yerinde belirgin olmak üzere çekirdek şekil ve büyüklük farkı meydana gelebilir. Desidua oluşumu sadece uterus içi değil ektopik gebelikte de ortaya çıkabilir (Çelik 2011).



Şekil 13: Ovaryan ve uterin sikluslar (<http://www.austincc.edu.tr> Erişim tarihi: 07 Aralık 2015)

**Tablo 1:** Endometriyal bez ve stromal dokunun siklus günlerine göre histolojik değişimi (Çelik 2011).

Proliferasyon Dönemi	Bez Özellikleri	Stroma Özellikleri
Erken Dönem (4-7. Günler)	Kısa, dar lümenli bezler Kübik epitel, mitoz mevcut	Yoğun stroma yapısı içinde içsi ve yıldızlı hücreler
Orta Dönem (8-10. Günler)	Uzun, hafif kıvrımlı yapı Silindirik epitel, mitoz mevcut	Değişken miktarda ödemi, mitoz mevcut
Geç Dönem (11-14. Günler)	Kıvrımlı yapı, tabakalı silindirik epitel	Daha yoğun yapı içinde sık mitoz
Sekresyon Dönemi	Bez Özellikleri	Stroma Özellikleri
Erken Sekresyon Dönemi		
16-17. gün	Subnükleer glikojen vakuollerinin görülmesi ve yaygınlaşması	Belirgin değişme yok
18-19. gün	Glikojen vakuollerinin lümene doğru kayması	Belirgin değişme yok
19-20. gün	Lümenlerde salgının artan şekilde görülmesi	Belirgin değişme yok
Geç Sekresyon Dönemi		
21-22. gün Geç sekresyon dönemi	Lümenlerde salgının artan şekilde görülmesi	Yoğun ödem oluşması
23-24. gün Geç sekresyon dönemi	Değişken miktarlarda lümen salgısıyla beraber epitelde vakuoller lümen taraklanma	Spiral arteriyollerin belirginleşmesi ve çevrelerinde predesidua oluşumu
25-26. gün Geç sekresyon dönemi	Değişken miktarlarda lümen salgısıyla beraber epitelde vakuoller lümen taraklanma	Yüzey epiteli altında predesiduanın başlayarak yaygınlaşması
27. gün Premenstrüel dönem	Bez epiteli tabanlarında nükleer parçacıklar (apoptozis)	Fokal nekroz, belirgin lenfositler
28. gün Menstrüel dönemin başlaması	Kıvrımlanmanın korunduğu bezlerde parçalanma	Küçük damarlarda fibrin trombüsleri ve kanama başlaması

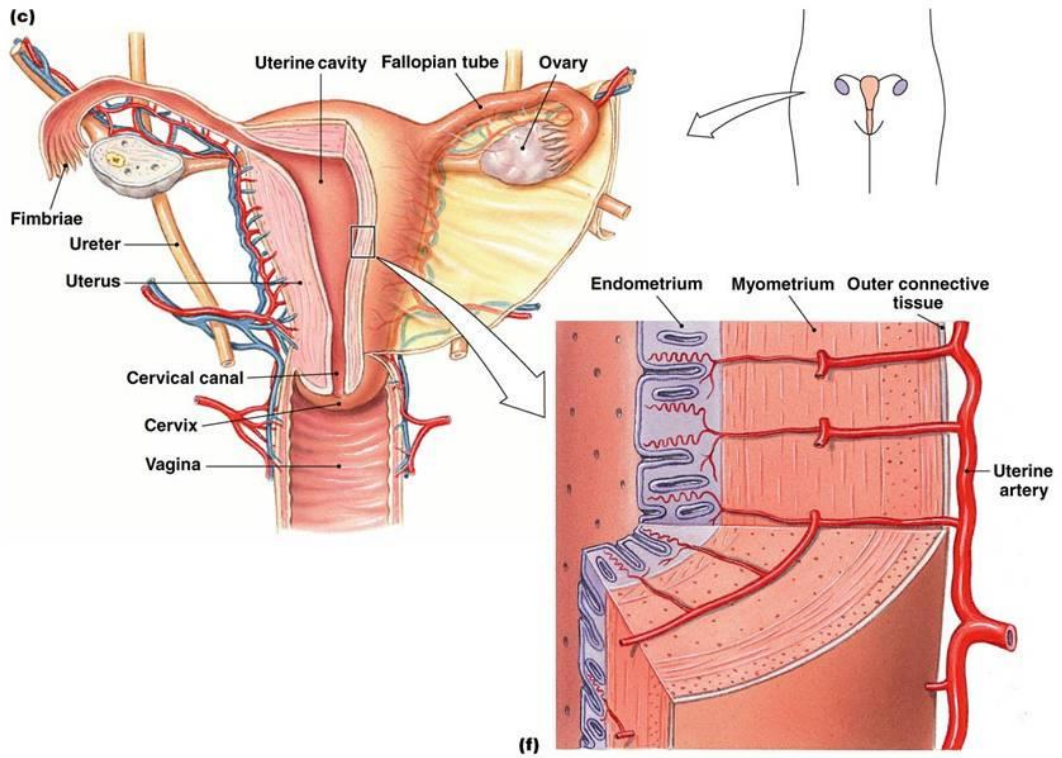
### ***Uterusun Kan Damarı ve Lenfatikleri***

Uterusun beslenmesini, a. uterina ve a. ovarica sağlar. Venler ise arterleri takip ederek lig. latum uteri içerisine girerler. Vv. uterinae v. iliaca interna'ya açılırlar (Şekil 14). Uterusun lenf drenajı üç ayrı yolu takip eder:

1- Fundus uteri, uterus üst kısmı ve tuba uterinadan gelen lenf damarları, ovaryumdan gelen lenf damarları ile birlikte nodi lymphatici aortici lateralis ve nodi lymphatici pre-aortici'ye açılır.

2- Korpus uterinin büyük kısmının lenf damarları, nodi lymphatici inguinales superficialis'e açılır.

3- Serviks uteri'nin lenf drenajı ise nodi lymphatici iliaca interni ve nodi lymphatici sacrales'e açılır.



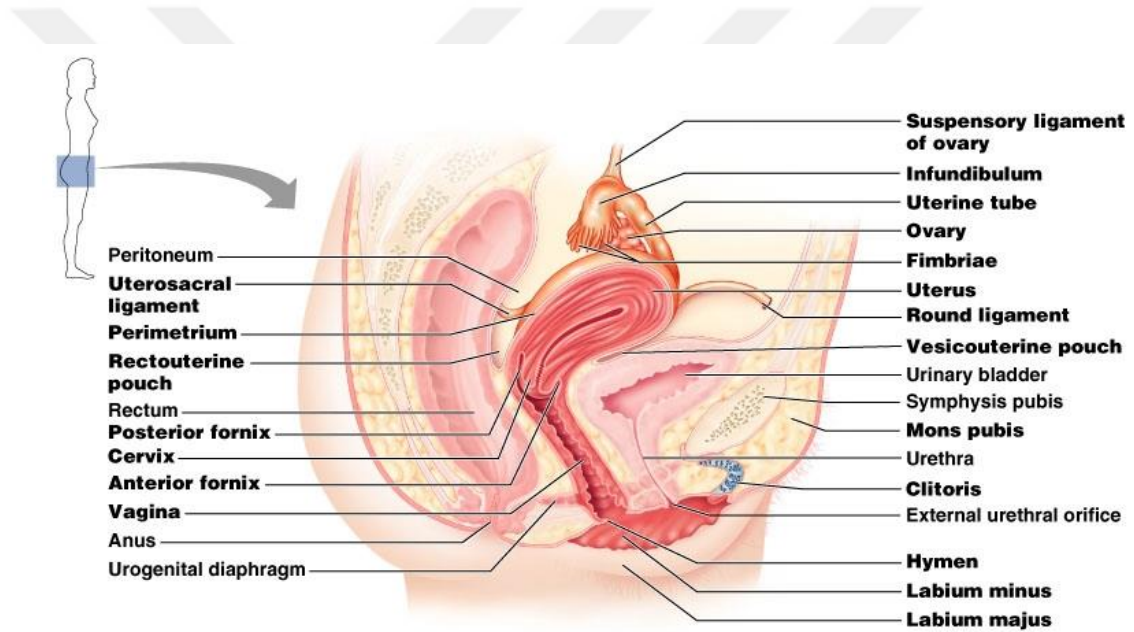
**Şekil 14:** Uterusun kan damarları (<http://www.austincc.edu.tr> Erişim tarihi: 07 Aralık 2015)

### ***Vagina***

Kadın cinsel birleşme organı olan vagina, serviks uteri ve vestibulum vagina arasında oblik olarak uzanan kas ve zardan yapılmış boru şeklinde bir organdır.



Önünde mesane ve üretra, arkasında rektum ve anal kanal bulunur. Vajinanın üst ucu serviks uteri'nin alt kısmını kuşatır ve aralarında forniks vagina denilen çıkmaz meydana gelir. Vajinanın ön ve arka olmak üzere iki duvarı vardır (Şekil 15). Arka duvar ön duvara göre daha uzundur. Vajinanın ortalama uzunluğu 8-10 cm kadardır. Vajinanın giriş deliğine ostium vagina denir ve vajinanın en dar yeridir. Burada hymen denilen kızlık zarı bulunur (Çelik 2011) (Şekil 16). Vajinanın ön ve arka duvarlarında uzunlamasına seyreden transvers katlantılar bulunur. Bu yapılardan yanlara doğru uzanan mukoza kıvrımlarına rugae vaginalis denir. Bunlar çok katlı yassı epitel ile döşelidir. Alttaki lamina propriyadan epitelyal tabakanın içine doğru bağ dokusu yapısındaki papillalar uzanır (Ross 2014).

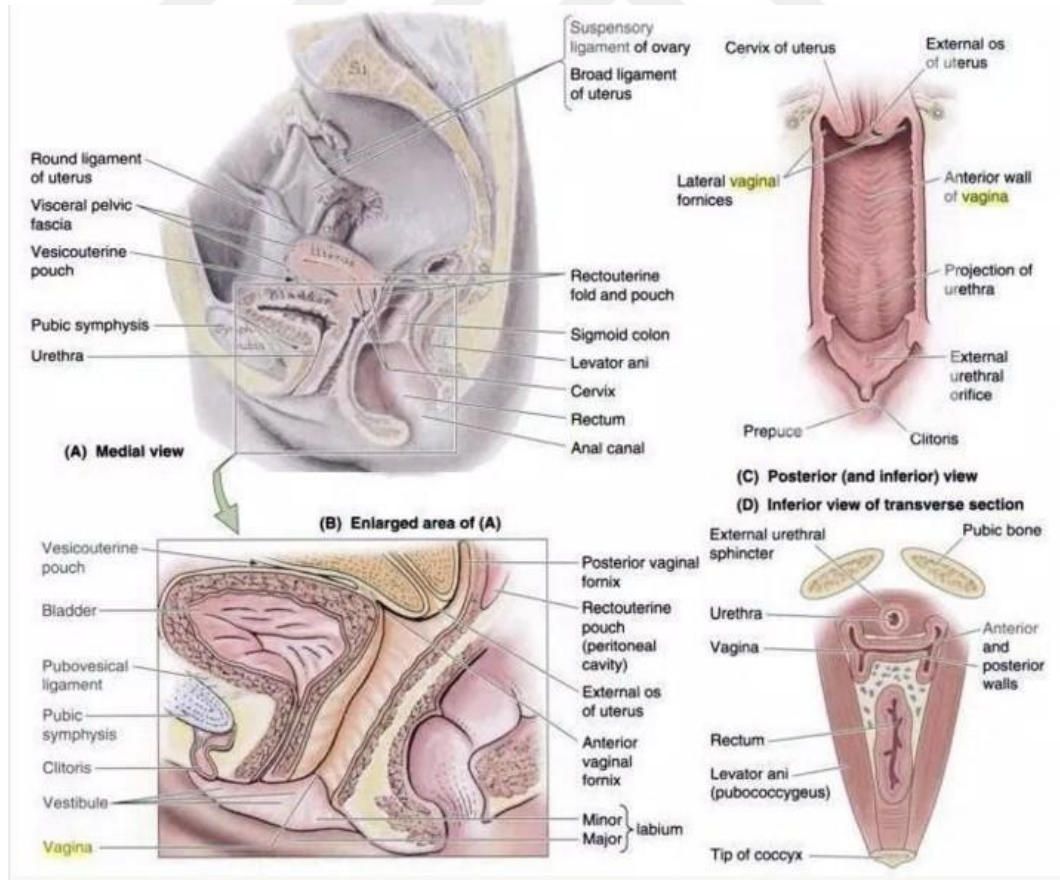


Şekil 15: Vajinal anatomi (Cummings 2004)

Vagina içte tunika mukoza, ortada tunika muskularis ve dışta da tunika spongiosa olmak üzere üç tabakalıdır.

Vajinanın mukozası açık kırmızı renkli olup daima ıslak ve kaygandır. Bu ıslaklığı ve kayganlığı uterustan gelen salgılar temin eder. Vajinada salgı bezi bulunmaz (Çelik 2011). Erişkin bir kadında vajina mukozasının epiteli çok katlı yassı epiteldir. Hücreleri az miktarda keratohiyalin içerebilir. Bununla birlikte, tipik keratinleşmiş epitellerde olduğu gibi, hücrelerin keratin plaklarına dönüşmesi ile izlenen aşırı keratinizasyon burada görülmez. Östrojen uyarısıyla, vajina epiteli

büyük ölçüde glikojen sentezleyip, biriktirir. Vajinal hücrelerin dökülmesiyle, bu glikojen vajina lümeninde depolanır. Vajinadaki bakteriler, glikojeni dönüştürerek vajinanın genelde düşük olan pH'sından sorumlu laktik asidi oluşturur (CBÜ Histoloji-Embriyoloji AD. ders notları, Vatanserver 2014). Vajinanın pH'sı 4-4,5'tir ve bu ortamda spermiumlar uzun süre canlı kalmaz. Bu pH aynı zamanda dışarıdan gelen bakteriler için de koruma sağlar (Çelik 2011). Vajinanın kas tabakası zayıftır (Çelik 2011) ve birbirlerinden kesin bir sınırla ayrılmayan iki düz kas tabakasından oluşur (CBÜ Histoloji-Embriyoloji AD. ders notları, Vatanserver 2014). En dışta kalan tunika adventisya, buna paracolpium denir (Çelik 2011), kalın elastik liflerden zengin tıkkız bağ dokusundan oluşur ve vajinayı çevre dokularla birleştirir. Vajinanın oldukça elastik olması, vajina duvarındaki bağ dokusu içinde bol miktarda elastik liflere bağlıdır. Bu bağ dokusunda yaygın bir venöz pleksus, sinir demetleri ve sinir hücresi grupları vardır (CBÜ Histoloji-Embriyoloji AD. ders notları, Vatanserver 2014).



Şekil 16: Vajinanın yapısı (Dote Anatomy 2009)

#### 4.2. Erkek ve Dişi Cinsiyet Hormonları

Erkek ve dişilerde, üreme fonksiyonunu sağlayan steroid ve protein yapılı çok sayıda hormon vücudun değişik dokularında (hipotalamus, hipofiz, gonadlar, böbreküstü bezi, yağ dokusu gibi) sentez edilebilmektedir. Çeşitli dış uyarılara karşı hipotalamus, gonadotropin salıcı hormon (GnRH; Gonadotropin Releasing Hormon) sentezleyerek hipofiz dokusuna yönlendirmektedir. Hipotalamustan salınan GnRH, hipofiz dokusunu uyararak gonadotropin hormonlarının; lütenize edici hormon (LH; Luteinizing Hormone) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) sentez ve salımını artırmaktadır. Gonadotropin hormonlar, gonadları (ovaryum ve testisler) uyararak üreme işlevinin ve steroid yapılı cinsiyet hormonlarının sentezinin kontrol edilmesini sağlamaktadır.

Dişi ve erkeklerde gonadların esas işlevi, üreme hücrelerinin olgunlaştırılması ve steroid yapılı cinsiyet hormonlarının sentez edilmesidir. Kadınlarda ovaryumlar oositin gelişmesi ve olgunlaşmasını sağlarken, östrojenlerin (östradiol ve östron) ve progesteron'un sentezini gerçekleştirmekte, üreme kabiliyetinin ve gebeliğin devamını sağlamaktadır.

Dişilerde böbrek üstü bezleri, sentezledikleri androjenlerin (testosteron, androstenodion) önemli bir kısmının perifer dokularda östrojenlere dönüştürülmesi nedeniyle önemli bir östrojen üretim kaynağı olarak üreme işlevine katkıda bulunmaktadır.

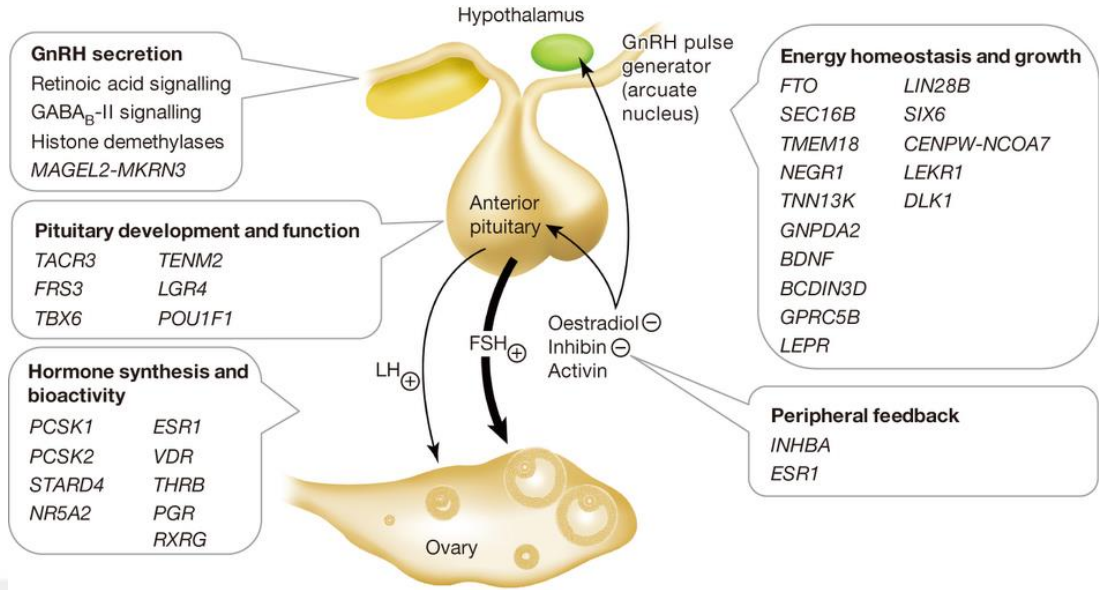
Steroid yapılı cinsiyet hormonları erkek ve dişilerde, üreme organlarının gelişmesini ve olgunlaşmasını, ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişimini ve sürdürülmesini, cinsel üreme döngüsünü kontrol etmektedir. Bu hormonlar değişik dokular üzerinde güçlü anabolik etkiler meydana getirebilmektedirler. Özellikle cilt, kemik, kas ve kan dokularında anabolik reaksiyonları uyararak bu dokuların gelişmesini sağlamaktadırlar.

Gonadotropinlerin seviyelerinin en belirgin olduğu zaman menstrual döngünün proliferasyon evresine uyar, LH salgısı ise menstrual döngünün tam ortasına denk gelir ve ovulasyonun gerçekleşmesini sağlar. Hipotalamustan pulsatif salgılanan GnRH, LH ve FSH hormonlarının ön hipofizden pulsatif olarak salgılanmasını uyarır. GnRH sekresyonu, dopamin, serotonin,  $\beta$ -endorfin ve norepinefrin tarafından düzenlenir. Hem FSH hem de LH folikülerdeki G-proteinle ilişkili reseptöre bağlanarak hücre içi steroidojenik akut düzenleyici protein miktarını artırır ve

sitokrom P450<sub>scc</sub> enzim sistemini aktive ederek over kökenli östrojen ve progesteron üretimini artırır.

Gonadotropinlerin salgısı, ovaryumlardan salgılanan östrodiol, progesteron ile glikoprotein olan inhibin A ve inhibin B (gonadal glikoprotein hormonlardır ve FSH sekresyonu azaltır) ile negatif ve pozitif geri bildirim mekanizması ile kontrol edilir. Foliküler fazın erken döneminde inhibin B piki olurken luteal fazın ortasında inhibin A piki oluşur. Foliküler fazın ortasında inhibin B düzeyinde yükselme aktivin sinyalini kapatmak için hipofiz gonadotropinini etkiler ve erken foliküler faz düzeylerine göre FSH biyosentezini baskılar. Luteal fazın sonunda inhibin A'da düşüş, FSH düzeylerinde yeniden artışı sağlayan ortamı yaratır.

Progesteron ve 17 $\beta$ -östrodiol hem hipofiz hem de hipotalamusta, inhibinler ise sadece hipofiz düzeyinde etkilidir (Şekil 17). Östradiol luteinizan hormonu artırır ve folikül stimüle eden hormon salınımını inhibe eder. Dişilerde serum östradiol düzeyinin artması, hipotalamo-hipofizer aksis üzerinde inhibitör etki göstererek GnRH, LH ve FSH salınımını azaltmaktadır. Dişilerde FSH, ovaryumlarda granüloza hücrelerinde reseptörüne bağlanarak östrojenlerin sentezini artırarak promordial hücrelerden folikül gelişimini uyarmakta ve graaf folikül oluşmakta, LH ise teka hücrelerini uyarak granüloza hücrelerinde 17 $\beta$ -östrodiol aromataz enzimi ile çevirmek için gerekli olan androstenedionun yapımını uyarır, graaf folikülünün yırtılmasını ve ovulasyonu sağlamaktadır.



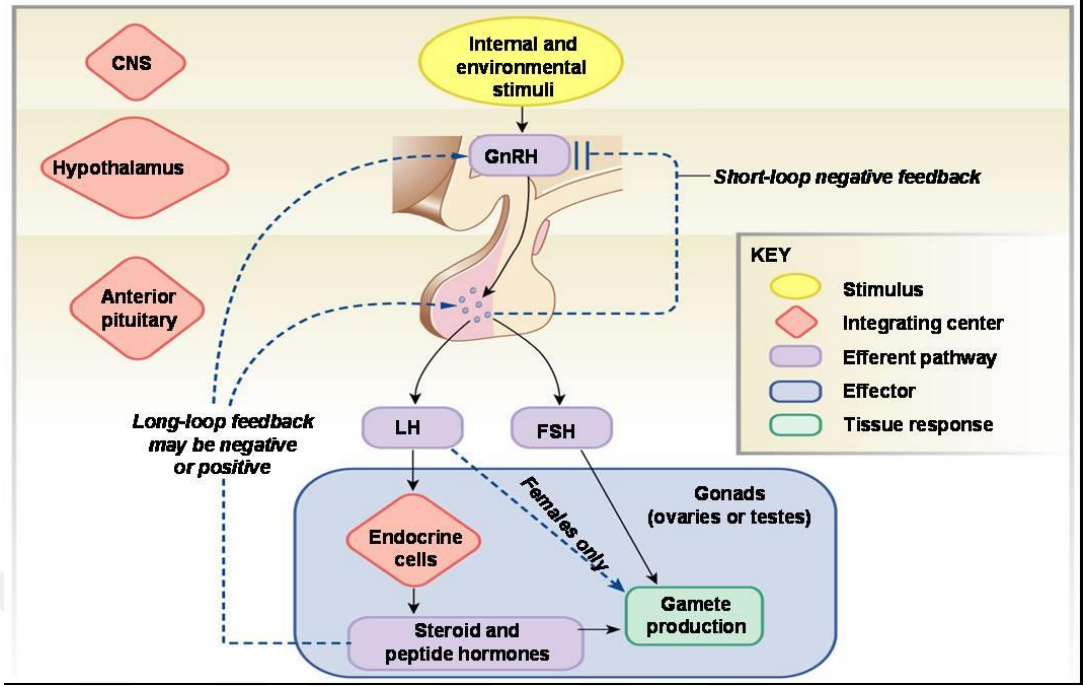
**Şekil 17:** Hipotalamus-hipofiz-ovaryum aksisi (Perry ve ark. 2014) (Nature 2014)

17 $\beta$ -östrodiol ana östrojen hormonudur. Fakat östrodiolden daha az biyolojik etkisi olan östron da önemli miktarda üretilir. 17 $\beta$ -östrodiol, hipotalamusa etki ederek GnRH sekresyon sıklığı ve miktarında artışlara neden olur.

Menstrual döngünün sekretuar döneminde östrojen ve progesteron, gonadotropik hormonların salgılanması üzerine sinerjik bir negatif geribildirim etki gösterirler.

Gonadotropik hormonlar tarafından uyarılmayan ovaryumlar tamamen inaktiftirler. 9-12 yaşlarında hipofiz giderek daha çok bu gonadotropik hormon salgılar. 11-15 yaşları arasında menstrüel döngünün başlaması ile LH ve FSH en yüksek düzeye ulaşır.

Dişilerde gebelik oluşumunu takiben korpus luteum progesteron sentezleyerek gebeliğin devamını sağlamaktadır (Şekil 18).



Şekil 18: Hipotalamo-hipofizer aksis'in cinsiyet hormonlarının sentezi üzerine etkisi (<http://www.austincc.edu.tr> Erişim tarihi:07 Aralık 2015)

### ***Steroid Hormonlar ve İmplantasyon***

**Östrojen**, folikülerin granüloza hücreleri ve ovulasyon sonrasında oluşan korpus luteum tarafından sekrete edilir. Hipofiz bezi, östrojenin negatif geribildirim etkisinin primer yeridir. Ovulasyon öncesi artmış östrojen pozitif geri bildirim mekanizması ile kan LH düzeyinde 6-10 ve kan FSH düzeyinde de iki-üç katına kadar artışa neden olur. Östrojen, menstrual döngünün ilerleyen proliferatif fazında, endometriyumun gelişimini sağlar ve çok sayıda mekanizma ile reseptiv pencereyi açarlar (Şekil 19):

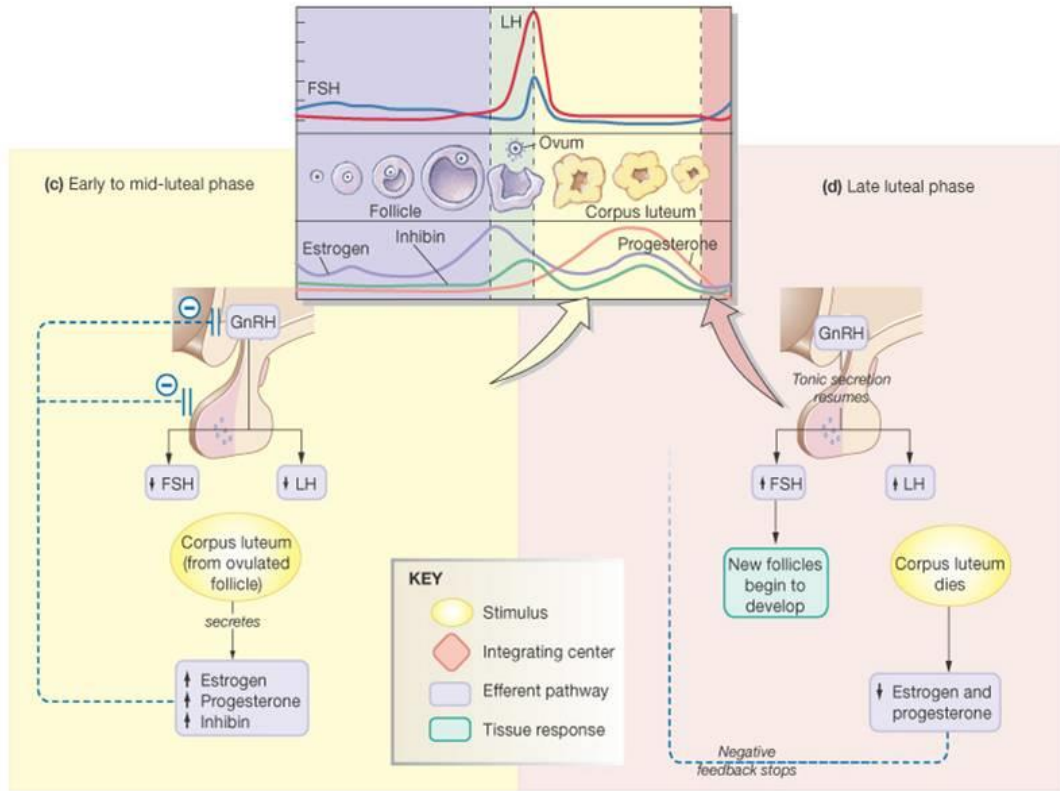
- Yüzeylerindeki negatif yükün kaybına, mikrovillusların kısalmasına ve moleküler kompozisyonundaki değişikliklerle 'mucin' kılıfın incelmeye neden olur.
- En az 12. ve 14. polipeptidlerin aynı zamanda östrojen ve progesteron reseptivlerinin sentezlerini stimüle eder.
- Luminal epitel hücreler üzerine etki ederek, onları blastokist sinyaline cevap verici veya duyarlı hale getirerek trofoektodermin luminal hücrelere yapışmasını sağlar.
- İmplantasyon işlemini aktive eden sitokinleri de içeren glanduler epitel salgıların salınımını stimüle eder.

**Progesteron**, ovulasyon sonrası korpus luteum tarafından salgılanır, hipotalamik opioid aktivitesini artırır ve FSH üretimini artıran ve LH üretimini azaltan GnRH dalga sekresyonu yavaşlatır ve uterusun salgılayıcı aktivitesini stimüle eder (Şekil 19):

- Stromada çok yoğun ödem üretir.
- Kan damarı hacmini 3 kat artırır.
- Pinopodların ve desiduanın oluşumunu sağlar.

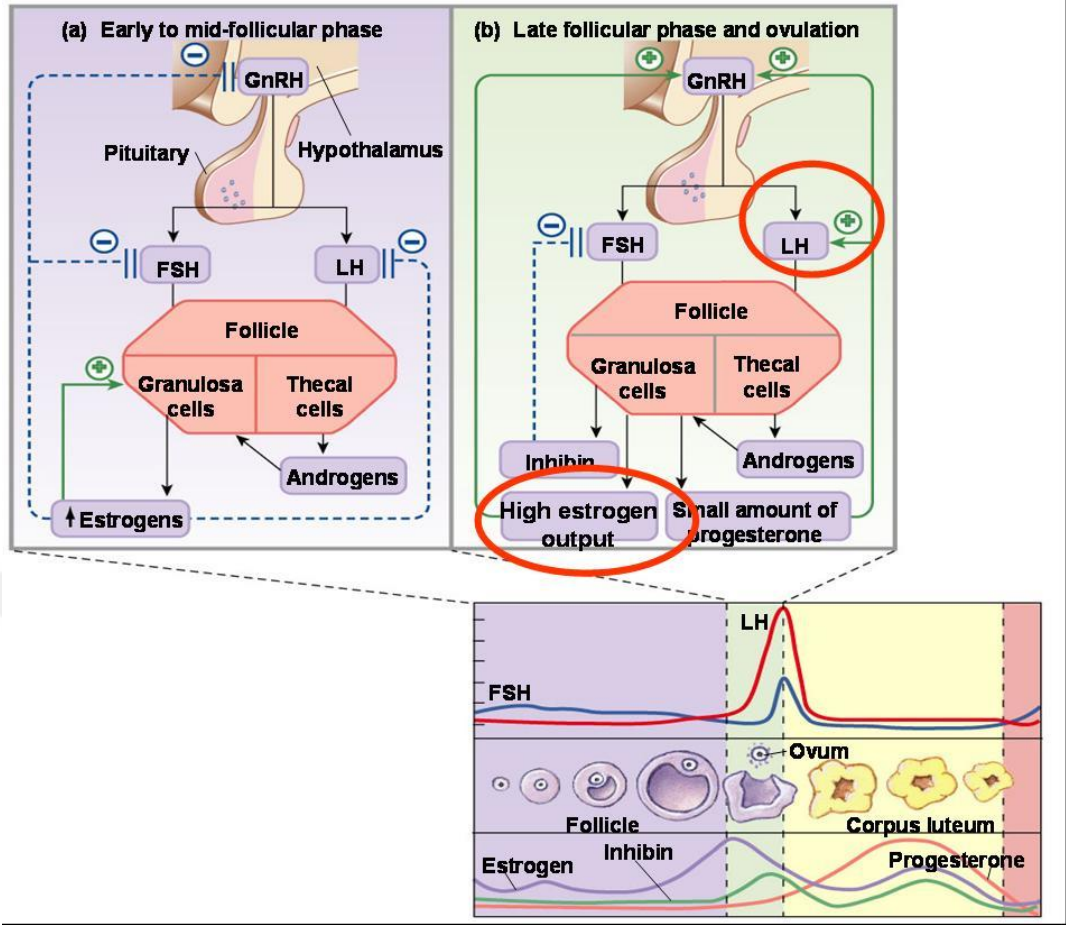
Steroidler, menstrual döngünün çeşitli basamaklarında sentezlenen uterin büyüme faktörlerinin hareketini düzenler: insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-I; Insulin-like growth factor 1), insülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF-II; Insulin-like growth factor 2), epidermal büyüme faktörü (EGF; Epidermal growth factor), heparin bağlayıcı EGF-benzeri büyüme faktörü (HB-EGF; Heparin binding-EGF like growth factor), fibroblast büyüme faktörü (FGF; Fibroblast growth factor), temel fibroblast büyüme faktörü ( $\beta$ -FGF; Basic fibroblast growth factor), fibroblast büyüme faktörü alfa ( $\alpha$ -FGF; fibroblast growth factor-alpha), transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGF- $\beta$ 1; Transforming growth factor beta-1), trombosit türevli büyüme faktörü beta (PDGF- $\beta$ ; Platelet-derived growth factor beta).



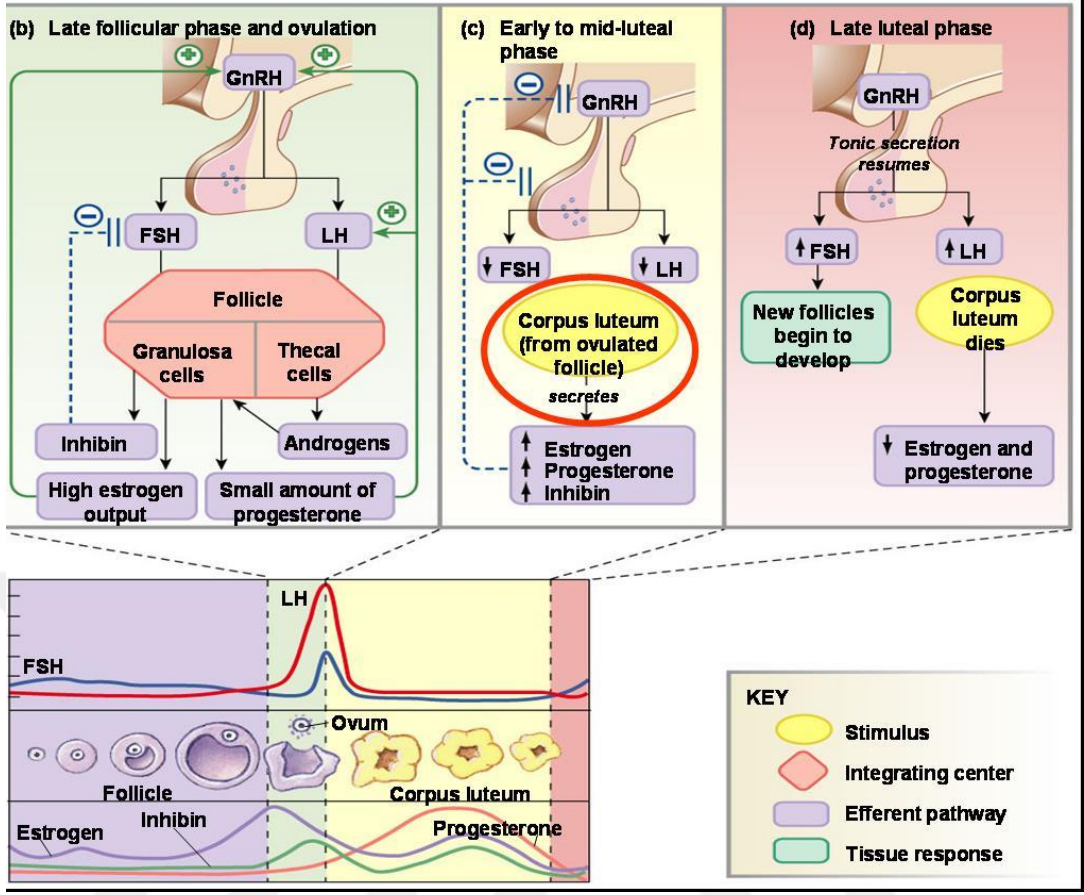


Şekil 19: Ovaryan siklus ve hormonal etkileri (<http://www.austincc.edu.tr> Erişim tarihi: 07 Aralık 2015)

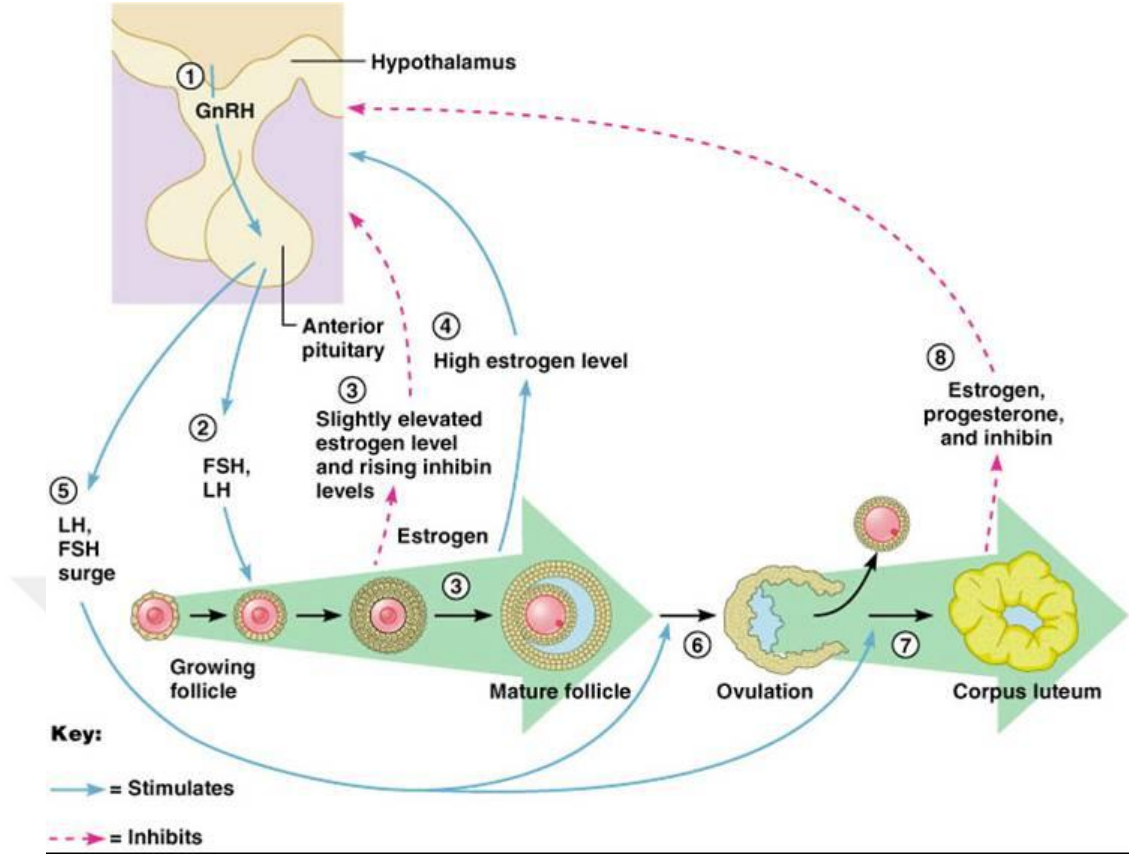




Şekil 20: Ovaryan siklusun hormonal etkileşimleri (1. Gün)  
 (<http://www.austincc.edu.tr> Erişim tarihi: 07 Aralık 2015)



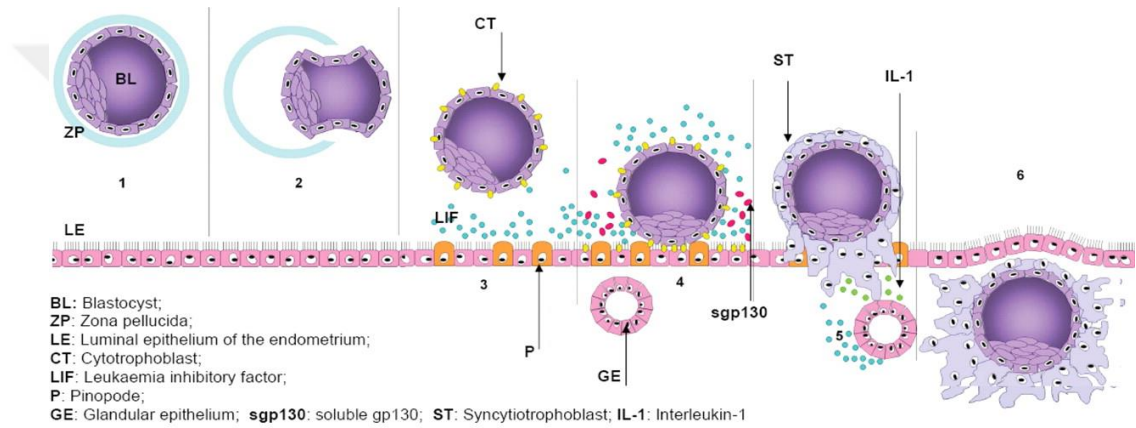
Şekil 21: Ovaryan siklusun hormonal etkileşimleri (26-28. Gün)  
<http://www.austincc.edu.tr> Erişim tarihi: 07 Aralık 2015)



Şekil 22: Ovaryan fonksiyonlarında geribildirim mekanizmaları (<http://www.austincc.edu.tr> Erişim tarihi: 07 Aralık 2015)

### 4.3. İmplantasyon

Embriyo, moruladan blastokiste giderken oksijen ve metabolik substratları içeren salgı içinde giderken uterusu geçiş yapar. İmplantasyon bölgesinde trofoektoderm hücreleri blastokistin zona pellusidası boyunca çıkarken, bu bölgeyi sindiren proteolitik enzimleri üreterek zonadan serbestleştirirler. Zonadan kurtulmada (hatching) uterus çevresindeki proteolitik enzimler de etkilidir ancak hatching'in moleküler temeli tam olarak açıklanamamıştır. Zonadan kurtulmuş blastokistin kalan hücre tabakaları sıkı bir fiziksel temas yaparlar ve implantasyon başlar (Elder ve Dale 2014) (Şekil 23).



**Şekil 23:** İmplantasyon mekanizması (<http://humupd.oxfordjournals.org> Erişim tarihi: 21.12.2015)

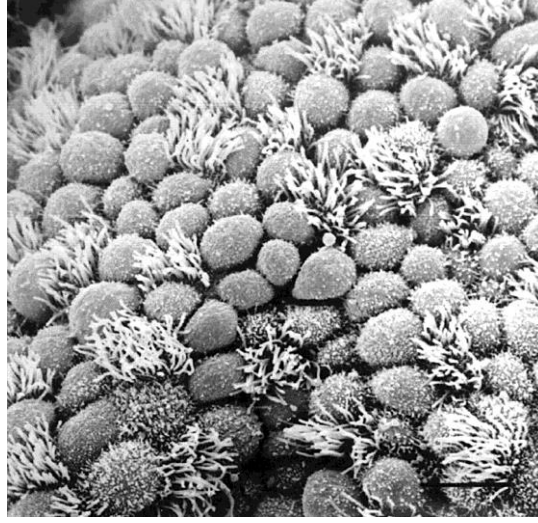
İnsan embriyosu yaklaşık olarak ovulasyon sonrası altıncı günde blastokist haline geldikten sonra implantasyon sürecine girer. Diğer türlerden farklı olarak, in vitro fertilizasyon (IVF) sikluslarından edinilen deneyime göre, insan embriyosu 6-8 hücre aşamasındayken implantasyon yeteneği kazanabilmektedir (Çelik 2011). Başarılı bir gebelik için implantasyon süreci yer ve zaman olarak dikkatlice koordine edilmelidir. Gebeliğin gerçekleşmesi için embriyo ve uterus gibi kompleks yapıların doğru etkileşimleri ve düzgün bir zaman sıralamasıyla olması gerekir. Özgün gelişimsel karakteristikler birçok farklı faktörler tarafından etkilenebilir (Elder ve Dale 2014). İmplantasyon gerçekleşmeden önce endokrin, otokrin ve parakrin mesajlarla endometrium ve embriyo; implantasyon için hazırlanır ve uygun ortam sağlanır. Örneğin, ejakülatta bulunan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF; Vascular Endothelial Growth Factor), endometriyumu uyararak implantasyon

sürecine katkıda bulunur (Feichtinger 1999). Bir diğer farklı örnek olan, fertilizasyondan 1-2 gün sonra maternal dolaşımında saptanan erken gebelik faktörü (EPF; Early Pregnancy Factor); embriyodan gelen sinyale yanıt olarak üretilir. Embriyoya karşı immünoşüpresyon sağlanması, hücre büyümesi ve çoğalması gibi değişik fonksiyonları vardır (Morton ve ark. 1992). Korpus luteum da progesteron hormonu aracılığıyla endometriuma gönderdiği mesajlarla uterusu gebeliğe hazırlamaktadır. Dolayısıyla maternal dokuların, gametlerin ve embriyonun bu son derece kritik olayın gerçekleşmesi için iletişimde bulunmaları ve bu iletişimin de çok düzenli bir şekilde yönetilmesi koşuldur (Kodaman ve Taylor 2004). Aksi durumda implantasyon ya gerçekleşmemekte ya da başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. İmplantasyon ovulasyon sonrası 7-10 günlerde, yaklaşık 48 saat civarında süren belirli bir zaman aralığı içerisinde gerçekleşir. Bu dönem "implantasyon penceresi" olarak tanımlanır. Bu dönemin sonlarında olan implantasyonlarda, erken spontan düşük riski artmaktadır (Wilcox ve ark. 1999). Bu dönemin dışındaki endometrium ise embriyo için kabul edici (reseptif) özellik göstermemektedir (Hoozemans ve ark. 2004). Endometrium reseptivitesini belirleyen biyokimyasal veya morfolojik belirteçler vardır (Tablo 2).

**Tablo 2:** Biyokimyasal reseptivite belirteçleri (Çelik 2011).

Hücre Adezyon Molekülleri	İntegrinler ( $\alpha\beta$ )	Trophonin/Tastin Musinler (MUG1)
Büyüme Faktörleri ve Sitokinler	Lösemi İnhibitör Faktör (LIF) Koloni Uyarıcı Faktör (CSF) Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) İnterlökin-1 (IL-1)	
Plasental Proteinler		
Siklinler (Cyclin E, p27)		
Ekstraselüler Matriks Proteinleri		

Morfolojik belirteç olarak ise endometriumda reseptif dönemde ortaya çıkan "pinopod" adı verilen kübik hücrelerdir (Resim 8). Bu hücreler olmaksızın implantasyon gerçekleşmez. Pinopodların endometrium reseptivitesinin saptanmasında, oosit bağış programlarında belirteç olarak kullanılabilecekleri öne sürülmüştür (Patnos ve ark. 2004; Nardo ve ark. 2002).



**Resim 8:** LH 6. Günde endometriyal biyopsi örneğinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (European Society of Human Reproduction and Embryology 2015)

Embriyonun endometriyal epitele bağlanmasını sağlayan implantasyon, ‘serbest’ zonadan ayrılmış blastokist ve endometriyum arasındaki etkileşme yoluyla başlatılır. Blastokist trofoektodermi endometriyumun epiteliyal hücrelerine direkt sinyal sağlayan insan koryonik gonadotropin (hCG; Human Chorionic Gonadotropin) salgılar. hCG, endometriyal epitelyuma bağlanan üç günlük embriyonun maternal sirkülasyonunda saptanabilir durumdadır (Örneğin ovulasyon sonrası 9-12 gün). Trofoektoderm hücreleri blastokistin epiteliyal hücreleri arasına göç ederler ve yer değiştirerek bazal membrana tutunurlar (Elder ve Dale 2014).

İmplantasyon üç aşamada incelenir (Çelik 2011):

- 1) Apozisyon
- 2) Adezyon
- 3) İnvazyon

Bu üç faz, uterus endometriyumun maksimum düzeyde alıcı olduğu periyotta olaylanır ki bu periyot “implantasyon penceresi” olarak bilinir (Elder ve Dale 2014).

#### ***Apozisyon: Embriyo ve Endometriyal Diyalog***

Embriyo ovulasyondan 3-4 gün sonra uterus girer ve 5-6. gününde genişlemiş blastokist olarak zona pellusida’dan kurtularak dışarı çıkar. Böylece zonadan ayrılmış blastokist uterus endometriyumuna yapışık hale gelir. Apozisyon şeffaf

görünen epitel hücre membranı çıkıntılar ve pinopodlarıyla kolaylaştırılır. Pinopodlar endometriyal bezlerin etrafını çevreleyen sıvıyı absorbe eder. Görünüşte progesterona bağımlı absorbe olsalarda sadece 2 veya 3 gün varlıklarını sürdürürler (ovulasyondan sonraki 5-7. günler) ve implantasyon penceresinin açıldığı morfolojik bir göstergesidirler (Nikas ve ark. 1995).

Uterus epitel hücre-hücre etkileşimine fiziksel bir bariyer olan glikoprotein (glikokaliks) ağı ile kaplanmıştır. Embriyo ilk önce bu glikokaliks bariyerini aşmak zorundadır. Glikokaliks bariyeri endometriyal hücreler tarafından eksprese edilen mucin proteinleri ve enzimatik yıkılma ile ortaya çıkan lokal, hücre dışı (ekstrasellüler) proteinler içermektedir. Apozisyon başarıyla tamamlandığı zaman adezyon molekülleri etkileşebilirler ve trofoektodermin embriyonik sitotrofoblast hücreleri endometriyal hücrelere yapışık hale gelir (Elder ve Dale 2014).

### ***Adezyon***

Ovulasyon sonrasındaki 6. ve 7. günlerde embriyonun endometriyuma tutunduğu düşünülür. Embriyo ve endometriyal adezyon molekülleri birbiriyle rahatça etkileştiği zaman embriyonik trofoblast hücreleri endometriyal epitel hücrelerine yapışırlar. İntegrin/tastin/trofin kompleksleri, heparin sülfat proteoglikanları, kadherinler, lektin, glikan ve glikan-glikan etkileşimlerini kapsayan çok sayıda adezyon molekül ailesinin insanda embriyo tutunmasında az çok rol oynadığı düşünülmektedir. İntegrin ailesi insan implantasyonunda yer alan ve anahtar rol oynayan adezyon faktörlerden biridir. hCG regulasyonunun integrin  $\alpha\beta 3$ , embriyoda interlökinler (IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'lerin yer aldığı) olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. İntegrinler, insan oositleri, erken embriyolar ve blastositler ayrıca glandular epitel tarafından da eksprese edilir. Bunlardan bazıları sabit bir oranda sentezlenirken ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ) diğerleri hücre döngüsünün evrelerinde farklı oranlarda sentezlenir ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 6$ ).  $\alpha v$  ailesi proteinleri eklenmiş olarak yer alsada, fibronektin, osteopontin, vitronektin ve ekstrasellüler matriksin diğer bileşenlerine bağlanırlar.

### ***İnvazyon***

7. ve 12. günler arası provillöz trofoblast farklılaşmaya başlar. Endometriyal değişim (stromal desidualizasyon) 12. gündeki ovulasyon sonrasında gerçekleşir

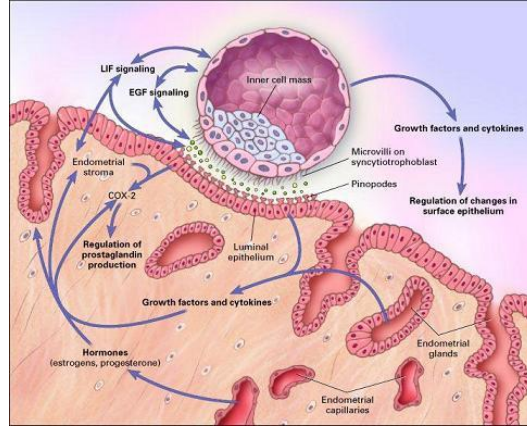
(Duc-Gorran ve ark. 1999). Trofoblast hücreleri anne ve fetus arasında kesişim noktası oluşturmak için uterusu fazlasıyla işgal ederler. Bu sayede besinler ve atıklar transfer edilir. Plasental dokunun uterusu stabilize etmesi ile ayrıca mekanik bir fonksiyonu da yerine getirmiş olurlar. Embriyonik trofoektoderm trofoblastların öncülleri olan sitotrofoblastlar ve mononükleer farklılaşmamış kök hücreleri içerirler. Bunlar şu alt ünitelere farklılaşır:

- Ortadaki invaziv trofoblastların uterus dokusuna göç etmesi.
- Villöz sinsityotrofoblastların hCG dahil olmak üzere plasental hormonları yapması.
- Bitişik trofoblast hücrelerin, plasentanın uterusu yapışmasını kolaylaştırması.

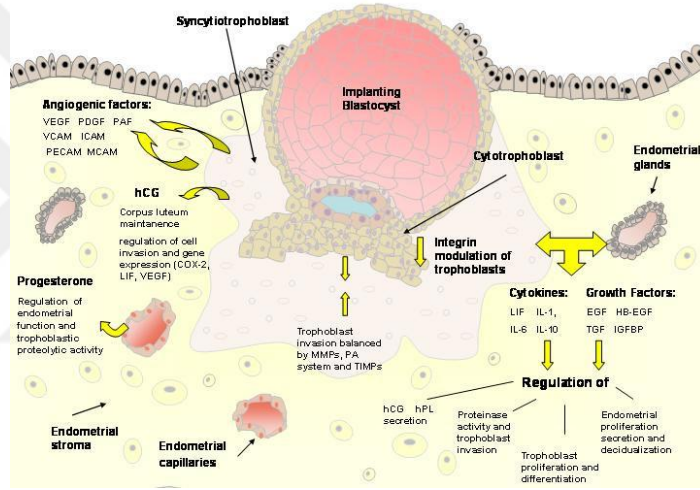
İnvaziv trofoblast hücreleri endometriyum ve miyometriyumun üst tabakalarını işgal ederek ekstrasellüler matriksi yeniden yapılandırır. Böylece uterusu spiral arterlerini seçici geçirgen hale getirir. Daha sonra artan maternal kanı plasentaya taşımak için genişlemiş az dirençli kanallara değişirler. Uterusun spiral arterlere doğru göç eden invaziv trofoblastlardan kendini koruması gerekir. Endometriyal stromanın 'desidua' olarak bilinen yoğun hücresel matrikse dönüşmesiyle plasentanın maternal kısmı oluşur. Desidualizasyon sırasında içi şeklindeki stromal fibroblastlar büyür ve daha yoğun salgı yapan desidual hücrelere farklılaşarak fibronektin ve lamininden zengin sert bir ekstrasellüler matriks oluştururlar. Bu değişim progesteronun etkisi altında meydana gelir. Bu reaksiyon hücrelerin etrafını saran spiral arterler etrafında gerçekleşir ancak daha sonra komşu hücrelere yayılır (Elder ve Dale 2014). Desidua hücrelerinin büyük çoğunluğu lökosit antijenleri eksprese eder. Endometriyumdaki beyaz kan hücrelerinin en büyükleri lenfositler (büyük granular lenfositler; LGLs: Large Granular Lymphocytes veya doğal öldürücü hücreler; NK: Natural Killer) ile daha az sayıdaki granular lökositler olan makrofajlar ve T hücreleridir. LGL'lerin sayısı ovulasyon ve implantasyon sırasında steroid hormonlarının da etkisiyle çarpıcı bir artış gösterir (King ve ark. 1998). Desiduanın invazif hale geçmesiyle fiziksel bir bariyer oluşturulur ve trofoblast hücrelerin yapışmasını sağlayan sitokin bir çevre yaratılır.



Desidualizasyonun ilk sinyalleri endometriyumun spiral arterlerinin etkin hale geldiği, normal menstrual döngüsünün en erken 23. günü görülebilir. Sonraki birkaç gün, progesteronun etkisiyle spiral arterleri çevreleyen stromal hücreler değişime uğrar ve predesidual hücrelere farklılaşırlar. Endometriyal stromanın bu progressif desidualizasyonu, varolan invazif trofoblastların uterus üzerine yerleşmesini sağlar ancak bu şiddetli progresyon implantasyon penceresini de bozar. Bu basamakta embriyo ilk olarak maternal immun sistemce tanınır hale gelir. Invazyon basamağı erken dönemdeki fetus ve anne arasındaki karmaşık biyolojik ihtiyaçların dengelenmesi için, zaman ve yer olarak koordine olmuş bir adezyon molekül ekspresyonunun kompleks düzenlenmesine ihtiyaç duyar. İnvazif hücrelerin kollajenaz kullanması ve plasminojen inhibitör tip 1 aktivatörü eksprese etmesi bu olayda plasminojen aktivatör sistemin yeraldığını gösterir, invazif hücreler bazal membran etkileşimleriyle ilgili olan integrinleri (tahminen laminin) kaybederek, fibronektin ve tip 1 kollajen ile ilişkili olan integrinleri kazanırlar. Trofoblast hücrelerinin dış tabakası, invazif hücreleri boylu boyunca kapatan çok nükleuslu sinsiyotrofoblast hücrelerin son tabakasını oluşturmak için birleşirler. Bu tabaka hızlı proliferasyon göstererek koryonik villusu oluştururlar (Koryon; embriyo ve ekstraembriyonik membrani çevreleyen tabakadır). Siklik AMP analogları ve hCG'nin de sitotrofoblast farklılaşmasını, plasental hormonları aktif olarak salgılayan sinsiyotrofoblast fenotipine yönlendirdiği gösterilmiştir. Koryonik villusların ekstrasellüler matriks ile temasta olduğu noktada, trofoblastların diğer bir grubu yapışık trofoblastları oluşturmak için sitotrofoblast tabakasından hızla çoğalır. Yapışık trofoblastlar, plasentanın uterusu tutunmasını kolaylaştıran fibronektin ve trofouteronektin (TUN) yaparlar. Yakın zamanda, dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ve lösemi inhibitör faktörünü (LIF) hCG sentezini aşağı çekecek şekilde, TUN salınımını ise yukarı düzenlediği gösterilmiştir. Bu hücreler ayrıca Urokinaz tip plasminojen aktivatör ve tip 1 plasminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) yaparlar. In vitro model sistemlerinde kullanıldığı deneyler, forbol esterlerinin trofoblastların invazyonunu artırdığını ve kültürlenmiş trofoblastlardaki PAI-1'i arttırdığı gösterilmiştir, uterus prostoglandin (PGF2 ve PGE2) steroidlerle düzenlenir ve desidualizasyonun oluşmasında düzenleyici rol oynarlar.



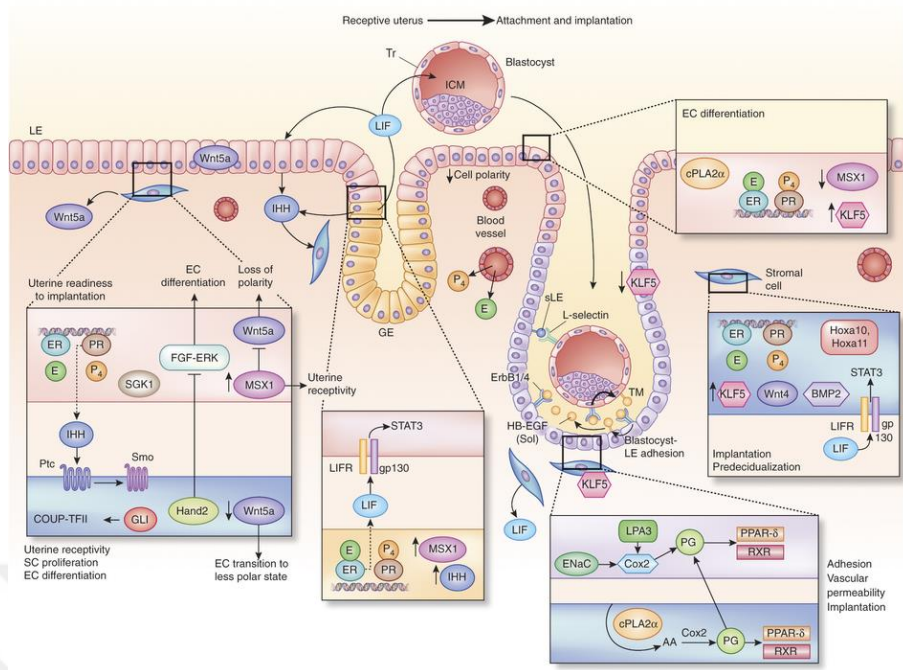
Şekil 24: Feto-maternal mikroçevrede insan blastokisti, sinyalizasyon ve implantasyon sistemi (Norwitz ve ark. 2001)



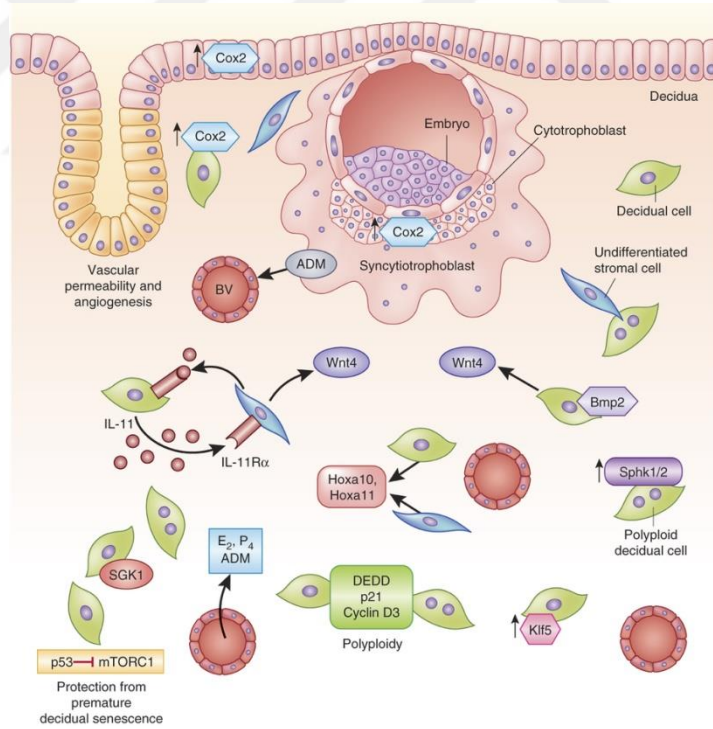
Şekil 25: Blastokist implantasyonu şematik gösterimi (Staun-Ram ve Shalev 2005)

### İmplantasyon Penceresi

Geçici implantasyon penceresinin varlığı rodent türlerde araştırılmıştır. Bu türlerde, pencere maternal olarak yönetilir ve alıcı faz 24 saatten kısadır. İnsanlarda bu pencere yaklaşık olarak beş gündür (28 günlük uterin döngüdeki 6. günden 10. güne kadar olan ovulasyon sonrası). Alıcı fazdaki açıklık sonlandırmadaki kadar net değildir. Farede ise zonadan kurtulan blastokist gebelik sırasında hem stromada ligand içeren integrin bağımlı (fibronektin, kollajen, laminin, vitronektin ve trombospondin vb. gibi) herhangi bir yüzeye hem de Matrigel gibi yapay substratlara bağlanırlar. Ancak insanlarda, trofoblast epitel protrusive penetrasyona maruz kalır ve bu işlemin embriyo ve endometriyum arasındaki çok fonksiyonlu etkileşimlerle düzenlenmekte olduğu düşünülmektedir.



Şekil 26: Moleküler implantasyon ve desidualizasyon (Jeeyeon ve ark. 2012)

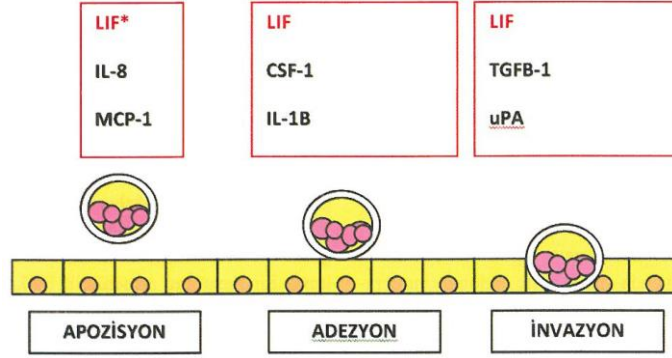


Şekil 27: Moleküler implantasyon ve desidualizasyon (Jeeyeon ve ark. 2012)

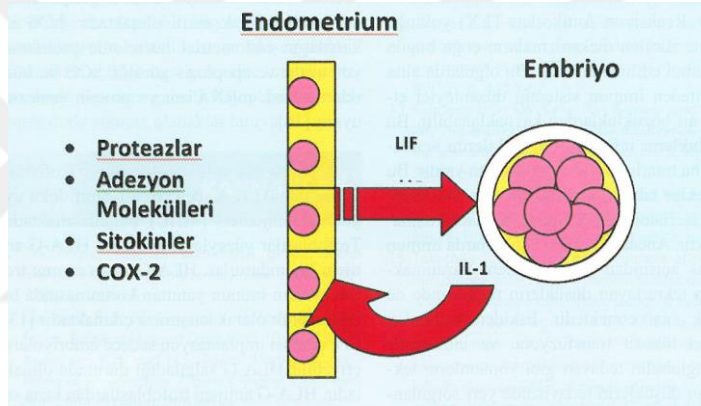
### İmplantasyonun Düzenlenmesi

İmplantasyonun her aşamasında değişik moleküler faktörler sorumluluk almaktadır (Çelik 2011) (Şekil 26-28). Embriyonal kutup ile endometriuma yaklaşan

embriyo ve endometrium arasında karşılıklı bir iletişim söz konusudur. Bu iletişim parakrin mekanizmalar ile olmaktadır (Çelik 2011) (Şekil 26, 27, 29).



Şekil 28: İmplantasyon basamaklarında etkili moleküller (Çelik 2011)



Şekil 29: Embriyo endometriyum iletişimi (Çelik 2011)

Başarılı bir implantasyon, blastokist ve endometriyum arasında hem senkronik gelişim hem de senkronize etkileşimi gerektirir. Embriyodan endometriyuma olan direkt sinyaller integrinleri artırır ve blastokist adezyonunu başlatırlar. Blastokist, besinleri uterusdan karşılar. Ancak büyümenin devamı için gebelik ürününün kendi vaskular sisteminde gelişmesi gerekir ve ilk basamak olarak uterus stromada da filizlenen ve kapiller gelişimi başlatan oldukça özel bir primer desidual reaksiyonu indükler. Desidualize olan stromal hücreler perisellüler fibronektin yaparlar. Endometriyal stromal hücreler ve yoğun lökosit infiltrasyonunun NK hücreleri ve makrofaj infiltrasyonuna dramatik bir dönüşümü söz konusudur (Elder ve Dale 2014). Maternal hormonlar sitokinler, adezyon molekülleri, prostoglandinler, metalloproteazlar ve bunların inhibitörleri ile anjiyogenik büyüme faktörleri

aracılığıyla embriyo ve endometriyum arasındaki etkileşimi etkiler. Bu işlemin gerisindeki moleküler mekanizmalar hayvan modelleri kullanılarak çalışılmıştır ve fare çalışmaları ile de reseptivite (LIF, HMX3), embriyoya cevap (COX2) ve desidualizasyona (IL-11R) neden olan genler tanımlamıştır. Cevap vermede rolü olan diğer tanımlanmış faktörler ise immün cevap geni (IRG- 1), progesteron reseptör knock-out (PRKO), östrojen reseptör knock-out (ERKO), homebox protein A10 (HOXA10), IHH (Indian Hegdehog gene) ve immün ile düzenleyen hormon 1 (IIRH1)'i kapsar. Östrojen ve progesteron reseptörler (IGF-1, epidermal büyüme faktörleri ve prostoglandinler dahil) ve onlarla etkileşen sinyal yolları önemlidir (Şekil 26, 27). İnsanlarda yapılan araştırmalar son zamanlarda reseptiv endometriyumu tanımlamak için, ART sonrası başarılı bir implantasyonu gerçekleştirebilecek mekanizmayı belirleyen faktörleri saptamakta kullanılan gen ekspresyonuna bakmak için mikroarray tekniği kullanılmaktadır (Simon ve ark. 2009; Sherwin ve ark. 2007).

Endometriumdaki LIF aktivitesi embriyonun endometriyumu tanınması için bir mesaj özeliği taşımaktadır (Kondera-Anasz ve ark. 2004). Endometriyumda LIF salgılanmaması ve özellikle implantasyon penceresi döneminde LIF çıkışının olmaması durumunda implantasyon gerçekleşmez. Fallop tüplerinde LIF'in beklenmedik şekilde artışı endometriyumu taklit eden bir yapı oluşturabilir ve implantasyon penceresi oluşturabilir (Keltz ve ark. 1996). Pelvik inflamatuvar hastalıklarda artan dış gebelik oranları bu tür bir moleküler değişiklikten de kaynaklanabilir (Attar 2004). Dolayısıyla, LIF; salgılanma özelliğine bağlı olarak üreme sisteminde önemli basamakların yürütülmesinde düzenleyici bir moleküldür.

Doğal olarak, Tablo 2'de de gösterildiği gibi belirteç olarak kullanılan ve kullanılmayan, ancak implantasyonda önemli rolleri olan çeşitli sitokinler bulunmaktadır. Örneğin, "epidermal büyüme faktörü" (EGF) ve EGF reseptörleri (EGF-R) implantasyon sürecinde blastokistin gelişmesi, trofoblastların proliferasyonu ve hatching gibi önemli gelişme basamaklarında etkili moleküllerdir (Wollenhaupt ve ark. 2004). Bu moleküller implantasyonun değişik basamaklarında daha yüksek yoğunluklarda salgılanabilir veya daha etkin rol oynayabilir.

Ovaryumlarda, fallop tüplerinde veya endometriyumda immün sisteme ait hücrelerin düzenleyici etkiler gösterdikleri düşünülmektedir (Jones ve ark. 2004).

Endokrin sistemin de bu düzenlemede temel bir rolü vardır. Reprodüktif dokulardaki düzenlemede özellikle östrojen ve progesteron hormonlarının doğrudan ve dolaylı etkileri olduğu bilinmektedir (Critchley ve ark. 2001).



**Tablo 3: Uterus reseptivitesi ile ilgili belirteç moleküller (Groll ve Lessley 2004).**

BELİRTEÇ	HÜCRE TİPİ	FONKSİYONU
Hormon/Reseptör		
Kalsitonin	Glandular ve luminal epitel	Embriyo kalitesini artırma
IGF-II	Glandular ve luminal epitel	Mitojen
Progesteron Reseptörü	Glandular epitel/stroma	Sekretuar aktivite/desidualizasyon
Sitokin/Büyüme faktörü/Reseptörleri		
CSF-1	Luminal epitel	Embriyo kalitesini artırma
LIF	Glandular ve luminal epitel	Embriyo kalitesini artırma
HB-EGF	Glandular ve luminal epitel	Embriyo kalitesini artırma
IL-1	Glandular ve luminal epitel	Embriyo kalitesini artırma
Hücre Adhezyon Molekülleri		
İntegrinler	Glandular ve luminal epitel	Hücre adhezyonları
Trophinin/Tastin	Glandular ve luminal epitel	Hücre adhezyonları
Ephrin A	Glandular ve luminal epitel	Hücre adhezyonları
L-selektin	Glandular ve luminal epitel	Hücre adhezyonları
MUC-1	Glandular ve luminal epitel	Anti adhezyon
Desidual Proteinler		
IGF-BP1	Desidua	Trofoblast invazyon kontrolü
Kadherin	Desidua	Bağlantı kurma/adhezyon
Transkripsiyon Faktörleri		
HOXA 10	Epitel ve stroma	Gen ekspresyonu regülasyonu
HOXA 11	Stroma	Gen ekspresyonu regülasyonu
Telomeraz	Epitel ve stroma	DNA tamiri
Yapısal Oluşumlar		
Pinopodlar	Luminal epitel	Yapışmayı sağlama
Uterin kan akımı	Uterus	Trofoblast invazyonu
Uterin kasılma	Myometriyum	Adhezyon
Serum Belirteç Molekülleri		
Glikodelin (PP14)	Glandular epitel	İmmünolojik supresyon
Progesteron	Korpus luteum	Desidualizasyon



#### 4.4. İnfertilite ve İnfertil Çiftlerin Değerlendirilmesi

İnfertilite genel anlamda sağlıklı popülasyona göre daha az gebe kalabilme kabiliyeti olarak tanımlanırken özgün anlamda bir çiftin korunmasız bir yıl cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememeleri şeklinde tarif edilmektedir (Çelik 2011). Çiftlerin yaklaşık %10-15'i infertilite tanısı almaktadır. Fekundabilite ise belli bir zaman diliminde bir toplulukta görülen konsepsiyon oranıdır. Normal fertil çiftlerde aylık konsepsiyon oranı %20'dir.

İnfertilitenin en sık nedenleri tubal peritoneal patoloji (%30-40), anovulasyon (%15) ve erkek faktörüdür (%30-40) ve geri kalan bölümünü sebebi açıklanamayan infertilite grubu oluşturmaktadır (Çelik 2011). Normal semen analizi, ovulasyon varlığı, normal uterin kavite ve bilateral tubal açıklık varlığında sebebi açıklanamayan infertilite tanısı konur. İnsidansı % 10-30 arasında değişmektedir.

İnfertilite için gerçekleştirilecek ilk tanısal testler; ovulasyonun dokümantasyonu, tubaların açıklığı ile uterus kavitesinin değerlendirilmesini ve semen analizini içermektedir (Çelik 2011).

Ovulasyon ile ilgili iki türlü test bulunmaktadır. İlki ovulasyonun ne zaman olacağını tahmin edilmesi testi, diğeri de ovulasyon olduktan sonra ortaya çıkan değişiklikler araştırılarak ovulasyonun o siklus için gerçekleşip gerçekleşmediği ortaya konulmaya çalışılması testidir.

Erkek infertilitesi üç ana başlık altında incelenmektedir: sperm üretim bozuklukları, sperm fonksiyon bozuklukları ve duktal sistemdeki anormallikler. Tedavi yaklaşımına göre ise erkek infertilitesi altı grupta toplanabilir: genetik nedenler (kromozomal anöploidi ve Klinefelter sendromu), gonadotropin yetmezliği (Hipotalamik ya da pitüiter yetmezliği olan erkekler sıklıkla hipogonadotropiktir ve azospermi ya da oligospermisi bulunur), anatomik nedenler (Ejekülatuar kanalların yokluğu ya da obstrüksiyonu, retrograd ejakülasyon ve varikosel de infertiliteyle birliktelik göstermektedir), enfeksiyon (Semptomatik bakteriyel enfeksiyon, cinsel yolla bulaşan hastalıklar), immünolojik ve idiyopatik nedenler. Erkek faktörlü infertilitenin %30'unun genetik kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Çelik 2011).

İnfertil çiftleri iki grupta incelemek mümkündür: tedavisiz gebe kalma şansı olmayanlar ve hipofertil olanlar. Tedavisiz gebe kalamayacaklara örnek olarak komplet tubal okklüzyonu olan kadınlar ve azospermik erkekler gösterilebilir.

Hipofertil grupta ise hafif endometriozis olguları, oligospermik erkekler ve açıklanamayan infertilitesi olan çiftler bulunmaktadır (Çelik 2011).

Bir yıl ve üzerinde korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik oluşmayan çiftlerde araştırma başlamalıdır. Ancak bireysel faktörlere bağlı olarak (Tablo 4) testler daha erken (bir yıldan önce) başlatılabilir.

**Tablo 4:** Erken başvuru ya da araştırılması gereken durumlar (Çelik 2011).

BAYAN
Yaş >35
Ektopik gebelik hikayesi
Bilinen tubal hastalık ya da pelvik inflamatuvar hastalık ya da cinsel yolla bulaşan hastalık hikayesi
Tubal veya pelvik cerrahi
Amenore ya da oligomenore
Fibroid varlığı
BAY
Testis iniş bozukluğu ya da orşioopeksi
Kemoterapi ya da radyoterapi
Ürogenital cerrahi öyküsü
Cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü
Varikosel

İnfertil çiftin değerlendirilmesinde detaylı bir hikâye ve fizik muayene önemli bir yer tutmaktadır (Tablo 5). Bunlar dışında özellikle sigara kullanımı ve vücut kitle indeksi (En fazla  $>30 \text{ kg/m}^2$ ) de dikkate alınmalıdır.

**Tablo 5:** İnfertil çiftlerde hikaye alımı (Çelik 2011).

Genel Bilgi	İnfertilite süresi İnfertilite doğası (primer ya da sekonder)
BAY	
Fertilite Hikayesi	Eski tetkikler ya da infertilite tedavisi Önceki eşlerle eski Fertilite ipuçları
Medikal Hikaye	Cinsel yolla bulaşan hastalıklar Epididimit Kabakulak orşiti Testiküler iniş bozukluğu Kronik hastalık ya da medikal tedavi İlaç/alkol kullanımı Rekürren idrar yolu enfeksiyonu Cerrahi Testiküler torsiyon Orşiopeksi Testiküler yaralanma Vazektomi
Meslek	Toksinlerle karşılaşma
Seksüel Hikaye	Libido azalması İmpotans Anejakülasyon
BAYAN	
Fertilite Hikayesi	Önceki ilişkilerde Fertilite durumu Önceki Fertilite araştırma ve tedavileri Kontraseptif kullanım süresi ve tipi
Menstrüel Hikaye	Düzeni Amenore Dismenore Ağır menstrüel kanama İntermenstrüel kanama
Obstetrik Hikaye	Önceki gebelik Düşük, gebelik sonlandırılması, ektopik gebelik

**Tablo 5: İnfertil çiftlerde hikaye alımı (Çelik 2011) (devam).**

Medikal Hikaye	Kronik hastalık (diyabet, hipertansiyon, renal hastalık) Bilinen endokrin hastalık (hipotroidi, PKOS) Cinsel yolla bulaşan hastalık hikayesi Bilinen endometriozis Galaktore Servikal smear Kullandığı ilaçlar
Cerrahi Hikaye	Tubal cerrahi Ovarian cerrahi Endometriozis için pelvik cerrahi Laparoskopi hikayesi Apendektomi
Seksüel Hikaye	İlişki sıklığı ve zamanlaması

Kadında ilk olarak fizik ve jinekolojik muayene yapılmalıdır. Erkek de ise öncelikli olarak semen analizi yapıp değerlendirilmelidir (Tablo 6).

**Tablo 6: İnfertil çiftin fizik muayenesi (Çelik 2011).**

	BAYAN	BAY
Genel Muayene	Boy, kilo, vücut kitle indeksi Kan basıncı Yağ ve kıl dağılımı Akne/galaktore	Boy, kilo, vücut kitle indeksi Kan basıncı
Lokal Muayene	Abdominal muayene Skar Abdominal kitle	Kasık muayenesi Herni
	Pelvik muayene İnspeksiyon Spekulum muayenesi Bimanuel muayene	Genital muayene Testis varlığı, yeri ve hacmi Epididimit Varikosel Penisin yapısal muayenesi

Kadın infertilite tetkileri ve zamanlamaları ise Tablo 7’da verilmiştir:

**Tablo 7:** İnfertilite tetkilerinin zamanlaması (Çelik 2011).

Histerosalpingogram	7-10. gün
Pelvik ultrasonografi	8-12. gün
Postkoital test	12-14. gün
Serum progesteron	21-23. gün
Endometriyal biyopsi	25-28. gün

Kadın infertilitesinin değerlendirilmesi;

1. Ovulasyonun değerlendirilmesi,
2. Pelvik ultrasonografi (USG),
3. Tubal fonksiyon testleri,
4. Genetik değerlendirme yapılmaktadır.

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde ise;

1. Semen analizi,
2. Genetik değerlendirme yapılmaktadır.

Ovulasyonun değerlendirilmesi infertil bir çiftin tanı ve tedavisinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Değerlendirme iki metodla yapılmaktadır. Birincisi direkt metodlardır ve transvajinal ultrason veya laparoskopi ile folikül rüptürünün veya kollapsının gözlenmesini içermektedir (Çelik 2011). İkincisi ise indirekt metodlardır ve idrar veya kanda LH ölçümü, östrojenin servikal mukusta veya vücut sıvılarında yaptığı değişiklikler, bazal vücut ısısı ölçümü (BBT), progesteron ya da metaboliti pregnanediolün ölçümüdür.

Bazal USG değerlendirmesi konjenital anomali, myom, ovarian kist ya da endometrioma tanısının konması için kullanılmaktadır. Reprodüktif sistemin değerlendirilmesinde transvajnal USG tercih edilen metottur. Özellikle menstrual siklusun preovulatuvar fazı boyunca (çoğunlukla siklusun 8-12. günleri) yapılması daha uygundur. Çünkü siklusun bu döneminde uterin korpus, endometrium, fallop tüpleri, overler ve foliküler gelişim hakkında bilgi edinilebilmektedir. Bu dönemde endometriyal kalınlık en az 7 mm olmalı, trilaminar görünüm gözlenmeli, uterin arter pulsatilite indeksi (PI) <3,0 olmalıdır.

Genel olarak overler değerlendirilirken şu özelliklere dikkat edilmelidir:

- Görünüm
- Boyutlar (Uzunluk (l), genişlik (w), derinlik (d))
- Hacim ( $l \times w \times d \times 0.5233$ )
- Yerleşim, dominant follikül, stromal ve foliküler dopler kan akım parametreleri USG’da bakılacak özellikler Tablo 8’de özetlenmiştir.

**Tablo 8:** Ultrasonografide bakılacak özellikler (Çelik 2011).

Bakılacak Alan	Gerekli Bilgiler
Uterus ve uterin kavite	Boyut
	Anomali/tümör
Endometrium	Kalınlık
	Görünüm
	Hidrosonografi (endikasyon varsa)
Uterin arter akım parametreleri	Pik sistolik hız (PSV)
	Pulsatilite indeksi (PI)
Ovarian morfoloji	Normal/polikistik/multikistik
	Pozisyon/mobilite
	Hacim/antral folikül sayımı
Foliküler boyut	
Ovarian stromal ve perifoliküler kan akım parametreleri	PSV
	PI
Tubal patens	Histerosalpingo kontrast sonografi
Pelvis	Serbest sıvı, kitle varlığı

Asemptomatik hastalarda tubal fonksiyon histerosalpingografi (HSG) ile değerlendirilmelidir. HSG uterin kavitenin boyutu ve şekli hakkında da bilgi verir. Tubal patens değerlendirmesinin potansiyel terapötik etkisi bilinmektedir. HSG sırasında lipiodol ile tubal flushing yapılmasının anlamlı olarak gebelik oranını arttırdığı bildirilmiştir (Çelik 2011).

Laparoskopi HSG sonucu anormal olan hastalarda gereklidir. Histeroskopi sadece endikasyon varlığında uygulanmalıdır. Laparoskopinin özellikle hafif orta şiddetteki endometriosis vakalarında ablatif tedavi sonrası fertilitiyi anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür.

Erkek infertilitesi için başlangıç testi semen analizidir. 2-3 günlük cinsel perhizi takiben 2 kez tekrar edilmesi önerilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2010 kriterlerine göre normal sperm konsantrasyonu  $>15 \times 10^6/ml$  olarak kabul edilmektedir (Çelik 2011).

İnfertil erkekte anormal semen bulguları ve cinsel disfonksiyon (azalmış libido, impotans) varlığında endokrin değerlendirme yapılmaktadır. Düşük testosteron düzeylerine eşlik eden yüksek FSH düzeyleri primer hipogonadizme, her iki hormonun düşüklüğü sekonder hipogonadizme neden olmaktadır.

Ejekülat hacmi düşük olan olgularda retrograd ejakülasyon ve ejakülatuar kanal obstrüksiyonunu ekarte etmek amacıyla postejekülatuar idrar tahlili ve transrektal ultrasonografi uygulanmaktadır.

İnfertil çiftin değerlendirilmesinde genetik testler de yer almaktadır. İnfertil kadın ve erkeklerde tespit edilmiş genetik anomaliler şunlardır:

- Sayısal kromozomal anomaliler (Turner sendromu, Klinefelter sendromu)
- Yapısal kromozomal bozukluklar
- Y kromozomunun uzun kolunda mikrolelesyon
- Bazı monogenik durumlarda gen mutasyonları

Kromozomal bozukluktan şüphelenildiğinde, tekrarlayan düşüklerde ve ciddi semen bozukluklarında (nonobstrüktif azospermi gibi) karyotip bakılmaktadır. Ciddi semen bozukluklarında AZF a, b, e delesyonu açısından da incelemektedir.

Bunlar dışında temel tanı yöntemlerine yardımcı olabilecek testler de bulunmaktadır:

**Ovülasyon İndüksiyonu Öncesi Over Rezerv Testleri:** Üçüncü gün FSH, E2, inhibin B, CC-challenge test, over volümü ve over biyopsisi. Prolaktin ölçümü de yükseklik gözleniyorsa TSH ve USG yöntemleri ile de önerilmektedir.



### **Fekundabiliteyle Korelasyonu Tam Olmayan Testler**

- Post koital test
- Tubal adezyonsuz hafif endometriozisin laparoskopik tanısı
- Servikal mukus penetrasyon testi
- Histeroskopi
- Anti sperm antikör değerlendirmesi
- Zonasız hamster yumurtası penetrasyon testi

### **Fekundabiliteyle Korelasyonu Olmayan Testler**

- Endometriyal günleme
- Varikosel değerlendirmesi
- Falloposkopi

### **Tanı ve Tedavinin Gereksiz Olduğu Durumlar**

- Tubal adezyonun olmadığı hafif endometriozis vakaları
- Luteal yetmezlik
- Antisperm antikörleri
- Anovülasyon veya disovülasyona neden olmayan hiperprolaktinemi.

### ***Sebebi Açıklanamayan İnfertilite***

Klasik olarak, infertilite pratiğinde kullanılan tüm standart tanısal testler normal sonuç veriyorsa o infertil çift “sebebi açıklanamayan infertil” tanımına alınmaktadır.

Sebebi açıklanamayan infertil çiftler teorik olarak;

• Toplumda fertilitenin normal dağılımının azalmış uç grubunu oluştururlar (Subfertilite)

• Fekunditeyi bozan, çiftlere ait defekt (1er) rutin infertilite araştırmalarıyla tespit edilememektedir.

Açıklanamayan infertil hastalarda yapılan çalışmalarda tedavi edilmeyen gruplarda siklus başına fekunditenin fertil çiftlere göre belirgin olarak azaldığı ve uzadığı bilinmektedir. Ayrıca, sebebi açıklanamayan infertil çiftlerde evlilik süresi uzadıkça ve kadın yaşı ilerledikçe gebelik elde etme şansı da düşmektedir (Dodson ve ark. 1987).

İnfertil popülasyonda açıklanamayan infertilite sıklığı bazal infertilite incelemelerinde kullanılan testlere göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle, infertil çiftlerin yaklaşık %15- 30'unun açıklanamayan infertil olarak tanımlandığı belirtilmektedir (Dodson ve ark. 1987; The ESHRE Capri Workshop 1996).

### ***Sebebi Açıklanamayan İnfertilitede Tedavi***

Sebebi açıklanamayan infertilitede fekundabiliteyi bozan faktörler standart testlerle açığa çıkartılmadığı ve düzeltilebilir bir bozukluk olmaması nedeniyle tedavide ampirik uygulamalar yapılmaktadır.

Sebebi açıklanamayan infertilite tedavisindeki ampirik uygulamalar (Tablo 9);

- i. Oral veya enjektabl medikasyonlarla superovulasyon (Klomifen sitrat ve gonadotropin)
- ii. İntrauterin inseminasyon (IUI)
- iii. İntrauterin inseminasyon+superovulasyon (Klomifen sitrat+IUI, Gonadotropin+IUI)
- iv. Yardımcı üreme teknikleri

**Tablo 9:** Sebebi açıklanamayan infertilite tedavisinde denenen 45 çalışmanın analiz sonuçları (Guzick 1998).

	Siklus başına gebelik oranları
Tedavi yok	1.3-4.1%
İÜİ (stimulasyonsuz)	3.8%
Klomifen	5.6%
Klomifen+İÜİ	8.3%
Gonadotropin	7.7%
Gonadotropin+İÜİ	17.1%
IVF	20.7%

### ***Yardımcı Üreme Teknikleri***

Günümüzde “yardımcı üreme teknikleri” olarak adlandırılan “IVF-ET” uygulandığı siklus başına en yüksek gebelik başarısı elde edilen infertilite tedavi yöntemidir. Tubal faktör ve şiddetli erkek infertilitesi gibi kesin endikasyonları dışında sebebi açıklanamayan veya hafif erkek faktörü olan subfertil çiftler genellikle IVF tedavisine alınmaktadır (Guzick 1998).

IVF’e alınan sebebi açıklanamayan infertil çiftlerde siklus başına elde edilen canlı doğum oranları %30’lar civarındadır. Bunun yanında, sebebi açıklanamayan subfertil çiftlerde doğal gebelik hızının yavaş olmasında alta yatan neden olarak fertilizasyon sırasındaki mekanizmalar ve buna neden gametlere ait gösterilemeyen faktörlerin etkisi nedeniyle IVF tedavisinde fertilizasyon işleminin ICSI ile yapılmasının fertilizasyon ve gebelik şansını arttırabileceği düşünülmektedir. IVF tedavisi yapılan hastalarda sık olmamakla birlikte konvansiyonel fertilizasyonda total fertilizasyon başarısızlığı görülse de, sebebi açıklanamayan infertil çiftlerde IVF’te rutin ICSI uygulamasının konvansiyonel fertilizasyon işlemine göre avantajı gösterilememiştir (Bhattacharya ve ark. 2001; Poehl ve ark. 2001).

Sebebi açıklanamayan infertil çiftlerde IVF ile diğer tedavi seçeneklerinin karşılaştırıldığı çalışmaların sonuçları IVF’in diğer yöntemlere göre belirgin etkin olduğunu göstermemiştir (Crosignani ve ark. 1991). Çok merkezli bir ESHRE çalışmasında sebebi açıklanamayan infertil çiftlerde siklus başı gebelik oranları tek başına gonadotropinlerle %15,2, gonadotropin ve IUI ile %27,4 ve IVF sikluslarında %25,7 olarak bildirilmiştir (Crosignani ve ark. 1991). Bir başka Avrupa çalışmasında da, sebebi açıklanamayan infertil hasta grubunda canlı doğum oranları sadece IUI ile %6, gonadotropin ve IUI ile %8,7 ve IVF sikluslarında %13 olarak kaydedilmiştir (Goverde ve ark. 2000). Ancak bu çalışmaların yapıldığı yıllardan sonra özellikle laboratuvar kültür ortamları olmak üzere laboratuvar yöntemlerinde değişimlerle IVF’in başarısının özellikle 35 yaş altı kadınlarda çok daha yüksek oranlara (% 38,9 canlı doğum) çıktığı gözlenmektedir.

#### 4.5. MikroRNA (miRNA)

mikroRNA'lar (miRNA) 20-25 nükleotid uzunluğunda, gen ifadesini transkripsiyon sonrası seviyede düzenleyen, proteine kodlanmayan RNA dizileridir (Kong ve Han 2005; Chiou ve ark. 2006) ki bunlar toplam RNA kütesinin sadece küçük bir bölümünü (%0,01) temsil etmektedir (Hull ve Nisenblat 2013). İlk kez 2001 yılında *Caenorhabditis elegans* üzerinde keşfedilmiş (Lee ve Ambros 2001), 2002 yılında Science dergisinde yılın çığır açan buluşu olarak seçilmiştir (Kennedy 2002) ve insan genomunun %30'undan fazlasının düzenlenmesi için tespit edilmiştir (Bartel 2009).

miRNA'lar düzenleyici RNA'ların kodlanmayan küçük bir sınıfıdır ki posttranskripsiyonel gen ekspresyonlarının düzenlenmesi ve normal biyolojik süreçlerde olmazsa olmaz rol oynamasına (Bartel 2004; Vasudevan ve ark. 2007) rağmen yanlış ekspresyonları birçok hastalıkla ilişkilidir. miRNA genleri öncelikle intergenik genlerin arasında ya da intronik genlerin içinde yerleşim gösterir. Daha az yaygın olmasına rağmen miRNA'lar intronların tamamında olduğu kadar eksonlarla da bulunmuştur (Berezikov ve ark. 2007; Saini ve ark. 2007).

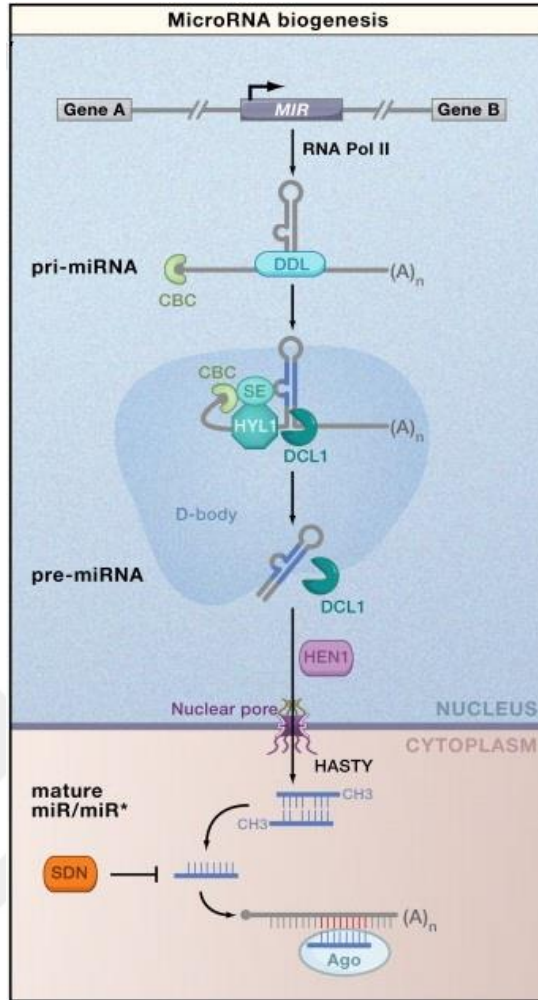
miRNA biyogenez ve fonksiyonunun genel hatları *Arabidopsis thaliana* üzerinde tanımlanmıştır (Resim 9). *Arabidopsis*'te miRNA/miRNA\* çift zincirli yapısını çekirdekte sentezlenen birincil miRNA'dan (pri-miRNA) dicer-benzeri enzim (DCL1; RNAz III sınıfı bir enzim) tarafından kesilir (Fang ve Spector 2007). Daha sonra küçük RNA metiltransferaz hua enhancer (HEN1) enzimi miRNA/miRNA\* çift zincir yapısının 3' ucuna metil ekleyerek kararlı hale getirir (Yu ve ark. 2005). miRNA'lar çekirdekten sitoplazmaya, exportin 5'in bir homoloğu olan hasty (HST) proteini yardımıyla taşınır (Vaucheret ve ark. 2004).

İnsan da ise; miRNA transkripsiyonu polimeraz II ya da III'e aracılık eder (Cai ve ark. 2004). miRNA transkripsiyonu pri-miRNA transkripti RNA-binding proteinle (DGCR8) bağlandığında çekirdekte başlar. Bu kompleks RNAaz III enzimi tarafından yaklaşık 70 nükleotidli stem-loop prekürsör miRNA'lara bölünür. Sonra pre-miRNA çekirdekte Eksportin 5 ve RAN-GTP ile sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya gelir gelmez ikinci RNAaz III enzimi, DICER ile pre-miRNA geçici yaklaşık 18-25 nükleotidli RNA ikilerine ve iki iplikli jenerasyon tek iplikli hale gelir (Resim 10). RISC, DICER, TRBP ve dört farklı Argonuate proteinlerden birinin birleşiminden oluşur (Hutvagner ve Simard 2008). RISC oluşur oluşmaz miRNA hedef RNA

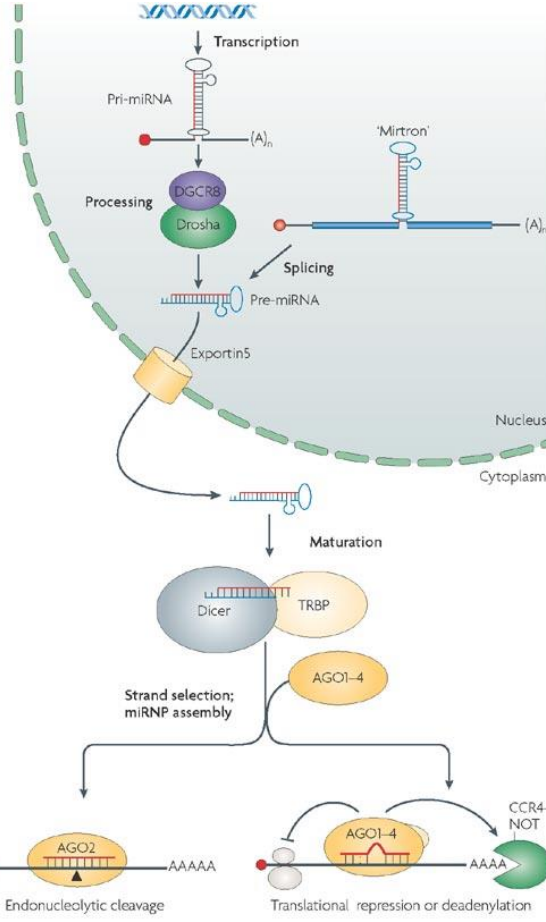
transkriptinin 30-UTR'ye bağlanır. Eğer miRNA 30-UTR bağlanması mükemmel baz eşleşmesi gösterirse, mRNA transkripti küçülür ve mRNA translasyonu gerçekleşmez. Eğer miRNA ve 30-UTR arasında baz çifti bağlanma homolojisi kusurlu olursa, mRNA translasyonu inhibe olur (Jackson ve Standart 2007). Bu büyük ihtimalle ya ökaryotik translasyonu başlatan faktör 6'nın (eIF6) 80S ribozomlarının toplanmasını önlenmesi ile RISC interaksiyonundan sonra meydana gelir (Jackson ve Standart 2007) ya da RISC başlamasından sonra inhibe olur (Chendrimada ve ark. 2007).

miRBase sekans database listelerinin en son versiyonu, 2216 olgun insan miRNA'sı da dahil olmak üzere 193 türde 141 olgun miRNA sekanslarını göstermektedir (Griffiths-Jones ve ark. 2008).

Hem normal hem de patolojik durumdaki endometriyumda çok sayıda miRNA tanımlanmıştır ve fonksiyonel çalışmalar bu dinamik dokularda miRNA düzenleyici yolları göstermiştir (Hull ve Nisenblat 2013). Son zamanlarda, dolaşan miRNA kökenlerine uzak bölgelerdeki hücelere etkileri gösterilmiştir (Valadi ve ark. 2007). Dolaşan miRNA'nın endometriyal hastalığı yansıtan noninvazif tanısal bilgi sağlayacağı olasılığı gibi endometriyal fonksiyon veya fonksiyon bozukluğu gösterebileceği olasılığı hipotezi ise hala tartışmalıdır (Hull ve Nisenblat 2013).



**Resim 9:** miRNA Biyogenezi (Voinnet 2009)



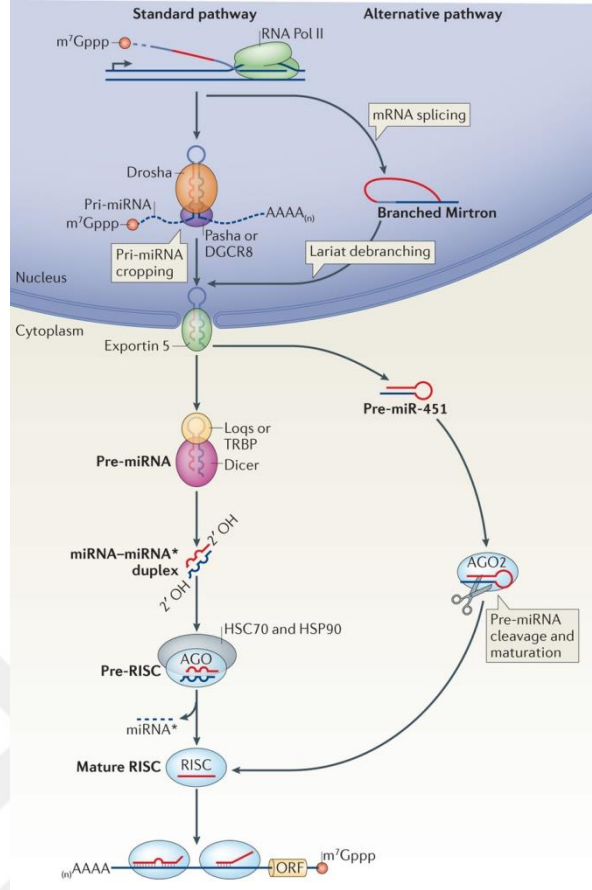
**Resim 10:** miRNA tarafından yapılan posttranskripsiyonel regülasyon mekanizması (Nature 2008)

### ***miRNA Biyogenezinin Düzenlenmesi***

Günümüze kadar miRNA biyogenezinde rol alan birçok transkripsiyon faktörü ve yardımcı etkenler tanımlanmıştır. Çalışmalara göre miRNA yoğunluğu; transkripsiyon, stabilite ve pri-miRNA süreçlerinde kontrol edilmektedir.

Çoğu miRNA'ların gen içi oryantasyon ya da komşu genlerin oryantasyonu için polimeraz II tarafından bağımsız olarak transkribe edildikleri düşünülmektedir. Buna rağmen, bazıları protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde de yer alırlar (Lee ve Ambros 2001). Kanonikal miRNA biyogenez yolağında DNA önce çekirdekte primer miRNA'ya transkribe edilir, daha sonra pre-miRNA'ya Drosha enzimi yardımıyla bağlanır. Buna alternatif olarak pre-miRNA hairpin yapıları Ldbr (lariat debranching) enzimi tarafından Drosha-independent mirtron yolağında birleşme ve kesme ile de oluşturulabilir (Ruby ve ark. 2007; Westholm ve Lai 2011) (Resim 11).



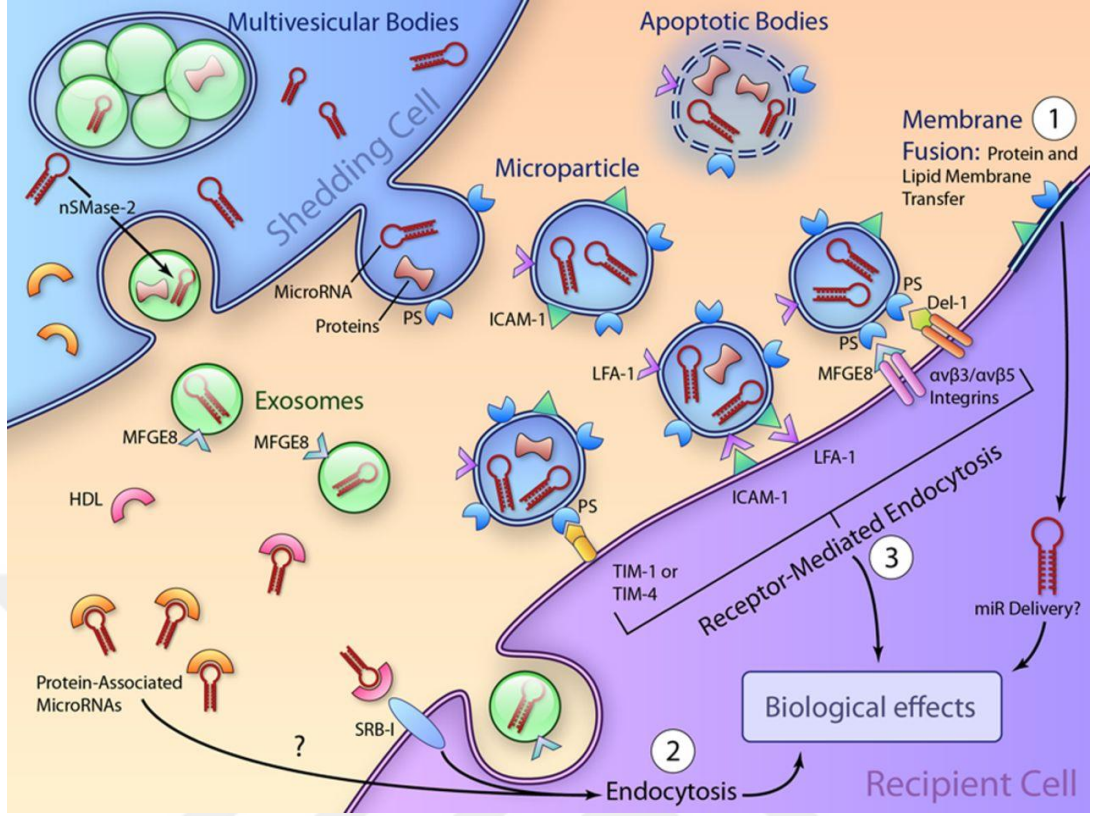


**Resim 11:** miRNA'nın biyogenezini (Nature 2014)

Pre-miRNA'lar hücre sitoplazmasına gönderilir, ileriki miRNA-miRNA duplex bağlanmalar DICER enzimi ile sitoplazmada gerçekleştirilir (Bartel 2004). Bu dupleksler gevşer ve model sarmal (quide strand-mature miRNA) Argonuate (Ago) proteinlerine RISC (RNA-induced silencing coplex) bölgesinden bağlanır (Resim 11). Memelilerde hedeflenen translyasyonel baskı, RISC kompleksinin seçilmiş mesajcı RNA'ların 30-transle olmayan bölgesine bağlanmasından etkilenir (Filipowicz ve ark. 2008). miRNA-RISC kompleksine bağlanmış etkisizleştirilmiş mRNA sitoplazmik yapılarda birikir ve P-bodiler olarak adlandırılır ve burada degrede edilirler ya da depolanırlar (Filipowicz ve ark. 2008). Genellikle miRNA hedeflenen mRNA'nın transkripsiyonunu baskırlar ancak nadir durumlarda miRNA hedef mRNA translyasyonunu stimüle edebilir (Vasudevan ve ark. 2007) (Resim 11). miRNA bağlı mRNA'nın da P-bodilerden açığa çıkmış ve translyasyonel olarak aktif hale gelmiş olabileceğine dair kanıtlar vardır (Bhattacharyya ve ark. 2006). miRNA düzenleyici mekanizmalar karmaşıktır; çoğu miRNA, birkaç yüz transkripti ve bazı miRNA'lar da bir hedef mRNA'yı düzenleyebilir (Bartel 2009). Ortak bir hedef

mRNA'sı ile miRNA, baskıcı etkisini yükseltmek için tek miRNA gen kümesinden birlikte transkribe edilebilir. Ayrıca, miRNA ve transkripsiyon faktörleri gen ekspresyonunu sıkı bir şekilde kontrol edilmesini sağlayan karşılıklı düzenleyici halkalar şeklinde oluşturulabilir (Flynt ve Lai 2008). miRNA bir hücreden serbest formunda mevcut sistemik kan dolaşımı içine, hücre membranından aktarılabilir.

Sirkülasyondaki miRNA mikro taşıyıcılar ve eksozom mikropartikül ve apoptatik cisimcikler gibi diğer lipoprotein kompleksleri içerisinde bulunmaktadır ve endojen RNaz aktivitesinden korunurlar (Hunter ve ark. 2008; Pegtel ve ark. 2010; Taylor ve Gercel-Taylor 2008; Valadi ve ark. 2007; Wang ve ark. 2010). Eksozomlar ve mikropartiküller, miRNA çevresinde endozomal ya da plazma membranının içeri doğru tomurcuklanmasıyla oluşturulurlar, daha sonra hücre membranı ile füzyon yoluyla dolaşıma transfer edilirler (Kosaka ve ark. 2010; Pegtel ve ark. 2010; Wang ve ark. 2010). Kalsiyum akımı, hücre iskeletinin yeniden yapılanması ve sfingomiyelinaz 2 aktivitesi (seramit biyosentezinde hız sınırlayıcı bir enzim) eksozomların ve mikropartiküllerin oluşumunu ve hücrelerden salınımını kontrol eder (Kosaka ve ark. 2010) (Resim 12).

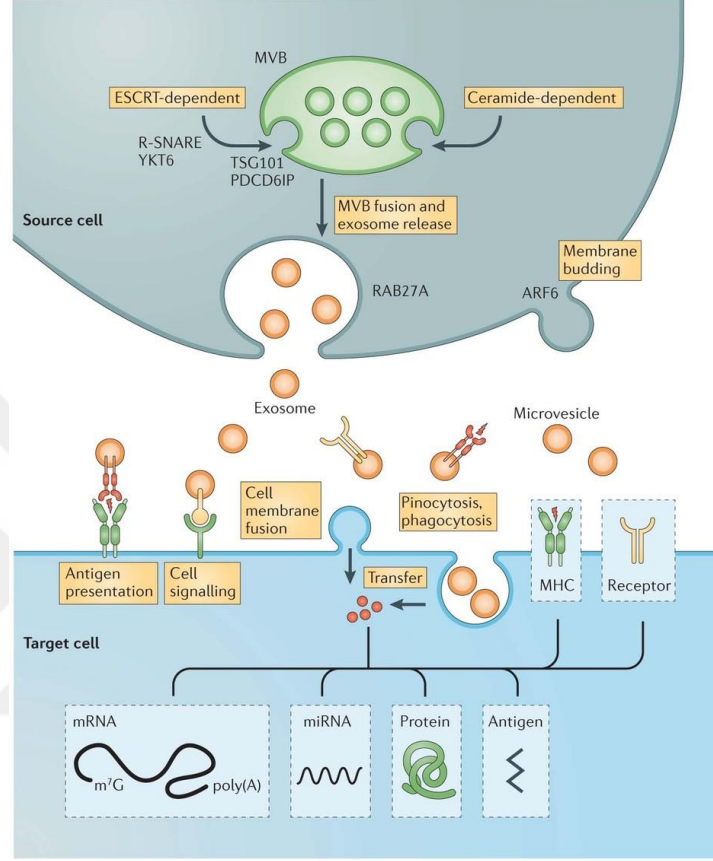


**Resim 12:** Hücre-hücre mesajcıları olarak ekzozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimcikler (Xavier Loyer ve ark. 2014)

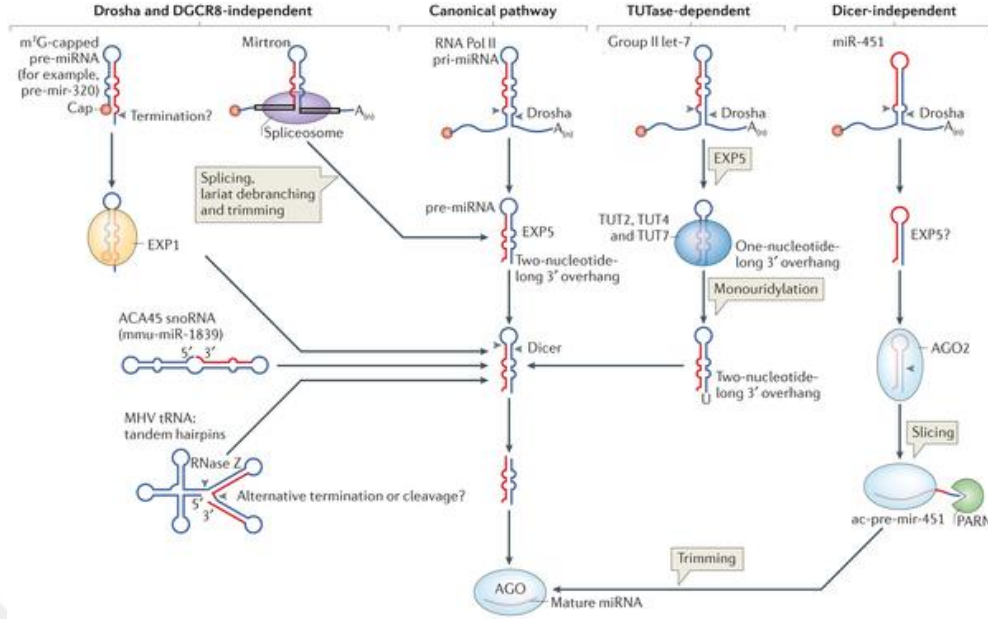
Ayrıca, farklı sitümlantlar sayıyı, kompozisyonu ve mikropartiküllerin kökenini değiştirir ve miRNA salınımını modifiye eder (Pula ve ark. 2008). Paketleme ve miRNA dışı nakil oldukça düzenli bir süreç olduğu varsayımı desteklemektedir. Ekstraveziküller plazmanın %90'ından fazlası ve serum miRNA, kandaki lipoprotein kompleksler ile birlikte ayrılır (Cortez ve ark. 2011). Yüksek yoğunluklu lipoprotein RISC kompleksinin Ago2 bileşeni ve nukleofosmin, damar dışı miRNA'larla damar içi transportta kompleks oluşturan bazı proteinlerdir (Vickers ve ark. 2011; Arroyo ve ark. 2011; Turchinovich ve ark. 2011; Wang ve ark. 2010).

Alıcı hücreler, endositoz ile ya da hücre zarı yüzeyi üzerinde miRNA bağlayıcı proteinleri tanıyabilen reseptörlere bağlanma yoluyla dolaşan miRNAları hücre içine alabilirler. Eksosomal miRNA, miRNA biogenesisizde kullanılan aynı sistem ile oluşturulur. Hüresel miRNA gibi, eksosomal miRNA da gen susturulmasını destekler ve hücre fizyolojinde yaygın değişiklikleri etkiler (Iguchi ve ark. 2010; Kosaka ve ark. 2010; Cortez ve ark. 2011). Benzer bir şekilde, miRNA-lipoprotein kompleksleri, hüresel cevabı indükleyen hedef genlerin ekspresyonunu değiştirir.

Örneğin, yüksek yoğunluklu lipoproteinlerle bağlı miRNA'ların hücresel miRNA havuzunu değiştirdiği ve seramid sinyal yolağının aktivasyonundaki miRNA hedeflerini baskıladığı gösterilmiştir (Vickers ve ark. 2011) (Resim 13).



**Resim 13:** Ekstraselüler veziküllerin biyogenezini ve alıcı hücre ile etkileşimleri (Nature 2013)



**Resim 14:** miRNA yollakları (Nature 2014)

### **Argonaut (AGO) Proteinleri**

miRNA'lar esas olarak, hedef RNA'yı kesen ve/veya translasyonu engelleyen AGO efektör proteinleri yoluyla işlev görürler (Valencia-Sanchez ve ark. 2006). AGO dört ana domain içerir; N-terminal domain, PAZ domain, MID domain ve PIWI domain (Peters ve Meister 2007). Bunların arasında, PAZ domaini miRNAların 3' uçlarına bağlanır, MID domain ise miRNA'nın 5' fosfatıyla etkileşimde bulunur (Hutvagner ve Simard 2008). PIWI domaini RNase H'inkine benzer bir yapı geliştirmiştir ve miRNA'ların onuncu ve onbirinci nukleotidlerine zıt bir pozisyondaki hedefi kesmek için slicer olarak rol oynar (Parker ve ark. 2005). Fakat, bitkiler ve hayvanlardaki bazı AGO'larda katalitik merkezdeki bazı anahtar aminoasitler mutasyona uğradığı için, bütün AGO'lar endonükleaz aktivitesine sahip değildir (Hutvagner ve Simard 2008). *Arabidopsis* 10 çeşit AGO'yu kodlar (Vaucheret 2008). Bunların herbiri farklı bir alttip küçük RNA'ya bağlanır ve farklı görevleri vardır (Mi ve ark. 2008). Bu kısmen küçük RNAların 5' nukleotidi tarafından belirlenir. Mesela, AGO1; 5' ucunda Urasil olan miRNA'ları tercih eder (Mi ve ark. 2008). Ek olarak, AGO'lar, fonksiyonel ayrılıklarına çeşitlilik katkı sağlayabilen mekana özel ekspresyon şekilleri sergilerler (Mallory ve Vaucheret 2010).

Argonaute-1 proteini insanlarda eIF2C1 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Koesters ve ark. 1999; Sasaki ve ark. 2003). eIF2C1 geni RNA interferansında rol oynayan Argonaute ailesi üyesi olan proteinleri kodlar. Kodlanan protein temel bir proteindir ve PAZ ve PIWI domainleri içerir. Bu protein Dicer1 ile etkileşime geçebilir ve kısa-interfering-RNA aracılı gen susturmada rol oynayabilir. Bu gen argonaute 3 ve argonaute 4 de dahil olmak üzere bu protein ailesi üyeleri ile yakın ilişkili küme şeklinde kromozom 1 üzerinde lokalizedir.

eIF2C1 fonksiyonu araştırmalarında model organizmalar kullanılmıştır. Uluslararası Knockout Fare Konsorsiyumu programının bir parçası olarak oluşturulan *Eif2c1<sup>tm1a(KOMP)Wtsi</sup>* olarak adlandırılan Knockout fare hattı, yüksek verimli mutageneze sahiptir ve hastalığın hayvan modellerini oluşturmak için kullanılmıştır (Skarnes ve ark. 2011; Dolgin 2011; Collins ve ark. 2007). Dişi ve erkek hayvanların delesyon etkilerini belirlemek amacıyla standart bir fenotip uygulanmıştır (Gerdin 2010; Van Der Weyden ve ark. 2011). Yirmi iki test mutant fareler üzerinde yapılmış ve iki önemli anormallik gözlenmiştir: homozigot mutantlar yaşayabilir durumdadır ve dişilerin kanlarında aspartat transaminaz düzeyleri azalmıştır (Gerdin 2010).

AGO1'in seviyeleri ve aktivitesi, onun doğru işlevinden emin olmak için düzenlenir. AGO1 miR-168in bir hedefidir (Vaucheret 2009). Dolayısıyla, AGO1'in kendisi geribildirim regülasyonunun bir parçasıdır.

Bir F-box proteini olan FBW2'nin aşırı ekspresyonu AGO1 protein seviyesini düşürür, ama transkriptleri böyle bir etkiye sahip değildir. Bunun aksine, *fbw2* mutasyonu AGO1 protein seviyelerini artırır, bu FBW2'nin AGO1'in negatif regülatörü olduğunu gösterir (Earley ve ark. 2010). AGO1, AGO1-miRNA birleşmesi bozulduğu zaman, otofaji yolağı vasıtasıyla da degrade edilebilir (Gibbins ve ark. 2012). AGO1'den gelen miRNA'ları ayırmak onların fonksiyonlarını düzenleyebilir.

### ***Dicer Enzimi***

Dicer, insanlarda bulunan DICER1 geni ile kodlanan bir enzimdir. Endoribonükleaz Dicer veya RNaz motifli helikaz olarak da bilinir. RNaz III ailesi üyesi olan Dicer, çift sarmal RNA (double stranded RNA-dsRNA) ve pre-mikroRNA

(pre-miRNA)'yı kısa çift sarmal RNA fragmentleri olarak adlandırılan küçük interfering RNA ve mikroRNA'lara ayırır. Bu fragmentler yaklaşık 20-25 baz çifti uzunluğunda olup 3' ucunda iki bazlık çıkıntıya sahiptir. Dicer RNA interferans için temel olan RISC'in (RNA ile indüklenen susturma kompleksi) aktivasyonunu kolaylaştırır. RISC Argonaute adı verilen bir katalitik birleşene sahiptir. Bu argonuate mRNA degrede edebilen bir endonükleazdır.

Dicer'in keşfi 2001 yılında yüksek lisans öğrencisi Emily Bernstein tarafından gerçekleştirilmiştir. Dicer, dsRNA transfeksiyonu ile RNAi yolağının başlamasından sonra RISC enzim kompleksi tarafından ayrılmasıyla keşfedilen yaklaşık 22 nükleotidlik RNA fragmentlerini üretebilme yeteneğindedir (Bernstein ve ark. 2001).

Dicer ortologları (birkaç baz değişikliği dışında homolog dizileri içeren) birçok organizmada bulunmaktadır (Jaskiewicz ve Filipowicz 2008). Bir yosun olan *Physcomitrella* çiçeklerinde bulunan 4 DICER proteininden biri olan DCL1b, miRNA biyogenezine dahil değildir fakat miRNA hedef transkriptlerinin kesilmesinde rol oynamaktadır. Böylece, miRNA'lar tarafından genlerin epigenetik susturulması gibi gen ekspresyonunun regülasyonu için yeni bir etki mekanizması keşfedilmiştir (Khraiwesh ve ark. 2010).

Kristal yapı açısından, Dicer ilk olarak bir protozoan olan *Giardia intestinalis*'de keşfedilmiştir. PAZ domaini ve 2 RNaz III domainleri X-ray kristalografi ile gösterilmiştir. Protein 82 kDa ağırlığındadır fakat bazı organizmalarda daha büyüktür. Örneğin, insanda bu protein 220 kDa ağırlığındadır. İnsanlarda bulunan Dicer'da *G. intestinalis* Dicer'ında bulunmayan en az 5 farklı domain bulunmaktadır. Bu domainler Dicer aktivitesinin düzenlenmesinde, çift sarmal RNA (dsRNA) ve RNA interferans protein faktörünün işleyişinde önemlidir (Lau ve ark. 2009). İnsan Dicer'ında Piwi Argonuate Zwiller (PAZ) domaini, iki katalitik RNaz III benzeri domain, dsRNA bağlanma domaini, ATPaz/RNA helikaz domaini ve fonksiyonu bilinmeyen DUF283 domaini bulunmaktadır (Myers ve ark. 2003).

#### ***Dicer'in Fonksiyonel Domainleri***

İnsan Dicer'inin (hsDicer veya DICER1 olarak da bilinir) Ribonükleaz III gibi sınıflandırılması, Helikaz ve PAZ (Piwi/Argonuate/Zwiller) domainlerini içermesine bağlıdır (Matsuda ve ark. 2000). Bu domainlere ek olarak, hsDicer 4 farklı

fonksiyonel domain içermektedir: 2 RNaz III domaini ve 2 çift sarmal RNA bağlayıcı domain (DUF283 ve ds RBD) (Lau ve ark. 2009; Hammond 2005). Güncel araştırmalar RNaz III katalitik enzimi dsRNA'nın etrafında yalancı dimerler oluşturarak çift sarmal şeritlerin ayrılmasını sağlarken, PAZ domaini dsRNA'nın 3' ucundaki 2 nükleotide bağlanma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Bu olay dsRNA sarmalının kısalması ile sonuçlanır. PAZ ve RNaz III domainleri arasındaki uzaklık bağlayıcı heliksin açısı ile belirlenir ve mikroRNA ürününün uzunluğunu etkiler (Macrae 2006). Her ne kadar spesifik bağlanma bölgesi tanımlanmamış olsa da dsRBD domaini dsRNA'ya bağlanır. Bu domain diğer düzenleyici proteinler (insanlarda TRBP, *Drosophila*'da R2D2 ve Loqs) ile birlikte çalışabilir ve böylece sRNA ürünlerinin spesifitesini kontrol eder (Cenik ve ark. 2011). Helikaz domaini uzun substratların işlenmesini sağlamaktadır (Cenik ve ark. 2011).

#### ***Dicer'in Tanı ve Tedaviye Yönelik Uygulamaları***

Dicer, tümörlerin vücut içinde enziminin ekspresyon seviyelerine bakılarak var olup olmadığını belirleme için kullanılabilir. Bir çalışmada kanser olan birçok hastada Dicer'in ekspresyon seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışma düşük seviyelerde Dicer ekspresyonunun düşük hasta sağ kalım süresi ile korele olduğunu da göstermiştir (Merritt ve ark. 2010). Tanı için kullanılmasının yanısıra, Dicer hasta tedavisinde de kullanılabilir. Bu gen susturması yoluyla intravenöz olarak yabancı siRNA enjeksiyonu ile yapılır (Kamlah ve ark. 2009).

siRNA'nın fare gibi memeli türlerinde iki şekilde aktarılabilceği gösterilmiştir. İlk yol, direkt olarak sistem içerisine enjekte edilmesiyle ki bu yol Dicer fonksiyonu gerektirmez. Diğer yol ise, Dicer tarafından siRNA olarak ayrılmış kısa saç tokası RNA yapısının plazmidlere tanıtılması ve onlar aracılı aktarılması yoludur (Life Technologies 2014).

Dicer kullanarak teröpatik siRNA üretilmesinin bir avantajı, şuanda kullanılan antikolar ve küçük molüküler inhibitörler ile kıyaslandığında hedeflerin özgüllüğü ve çeşitliliğini arttırmasıdır. Genel olarak, küçük molekül inhibitörleri, durdurulamaz yan etkileri ile birlikte spesifikliğı açısından zordur. Antikolar siRNA'lar kadar spesifiktir. Fakat yalnızca ligandlar veya yüzey reseptörlerine bağlanma yoluyla çalışmaları kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Diğer yandan, siRNA enjeksiyonunda ana engel hücre içi alımının düşük seviyelerde olmasıdır (Merritt ve ark. 2010).



Enjekte edilmiş siRNA kanda düşük bir stabiliteye sahiptir ve spesifik olmayan immün stimülasyonlara neden olur (Schiffelers ve ark. 2004). Ayrıca, miRNA üretimi teröpatik olarak spesifikliği azdır çünkü sadece 6-8 nükleotid baz çifti miRNA'nın mRNA'ya tutunması için yeterlidir (Chi ve ark. 2009).

### ***Dicer Benzeri Proteinler (Dicer Like Proteins-DCL)***

Bitki genomları dicer benzeri proteinleri kodlar ve bunlar hayvan ve böceklerdeki Dicer gibi benzer fonksiyon ve protein domainlerine sahiptir. Örneğin, model organizma olan *Arabidopsis thaliana*'da 4 dicer benzeri protein bulunmaktadır ve DCL1'den DCL4'e kadar isimlendirilmiştir. DCL1 miRNA jenerasyonu ve ters tekrarlardan gelen sRNA üretimi ile ilgilenmektedir. DCL2 viral bağışıklık ve savunmada yardımcı olan cis etkili antisens transkriptlerden siRNA oluşturur. DCL3 kromatin modifikasyonuna yardımcı siRNA üretir ve DCL4 post-transkripsiyonel düzeyde trans-etkili siRNA metabolizması ve transkript susturulması yer almaktadır. Buna ek olarak, DCL 1 ve 3, *Arabidopsis* çiçeklenmesi için önemlidir. Ancak *Arabidopsis*'de, DCL knockout edilmesi ciddi gelişimsel problemlere yol açmamıştır (Liu ve ark. 2009).

Dicer mekanizması birçok organizma için ortak bir savunma stratejisidir. Pirinç ve üzüm de dicer benzeri proteinler üretmektedir. Pirinç beş dicer benzeri protein üretir ve onlar *Arabidopsis*'de fonksiyonel ve gelişimsel olarak daha önemli rol oynamaktadır. Buna ek olarak, ekspresyon modelleri farklılıklar gösterebilir. *Arabidopsis*'de ekspresyon daha homojen iken pirincin farklı hücre tiplerinde farklıdır. Pirinç DCL ekspresyonu, kuraklık, tuzluluk ve soğuk gibi biyolojik stres koşullarından etkilenebilir. Böylece, bu stres etkenleri bitki viral direncini azaltabilir. *Arabidopsis* aksine, DCL proteinlerinin fonksiyon kaybı pirinçte gelişimsel defektlere neden olmaktadır (Liu ve ark. 2009).

### ***Drosha Enzimi***

Drosha sınıf II ribonükleaz III enzimidir (Filippov ve ark. 2000) ve insanlarda drosha (eski RNASEN) geni tarafından kodlanır (Filippov ve ark. 2000; Wu ve ark. 2000). Önerilen protein ismi Ribonuclease 3'dür, alternatif protein isimleri Drosha protein, Ribonükleaz III (RNaz III) ve p241'dir. Genin sinonim isimleri ise RN3, ETOH12, RNASEN, RANSE3L, RNASE3L, HSA242976 olarak da bilinir.

### ***Drosha Fonksiyonu***

Çift sarmal (ds) RNA-spesifik endoribonükleazların bulunduğu ribonükleaz III süper ailesi üyeleri ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde farklı RNA olgunlaşması ve bozulması yollarına katılabilir (Fortin ve ark. 2002). Drosha vücutta her dokuda bulunur, doku spesifik değildir (Wu ve ark. 2000). Rnase III drosha nükleus içi nükleazdır ve nükleusta miRNA prosesinin başlatılmasını sağlar (Lee ve ark. 2003).

Drosha mikro işlemci kompleksi olarak bilinen protein kompleksinin bir parçasıdır bu mikroişlemci kompleksi çift sarmal RNA bağlayıcı protein Pasha (DGCR8 olarak da bilinir) da bulundurmaktadır (Denli ve ark. 2004). Pasha Drosha aktivitesi için gereklidir. Pasha pri-miRNA'nın tek sarmal fragmentlerine bağlanma yeteneğine sahiptir ve bu doğru proses için gerekli bir basamaktır (Han ve ark. 2006).

İnsan drosha'sı 2000 yılında nükleer dsRNA ribonükleazının ribozomal RNA prokürsörlerinin prosesinde rol oynadığının bulunmasıyla klonlanmıştır (Wu ve ark. 2000). Prosese ve miRNA'nın aktivasyonuna katılan diğer iki insan enzimi Dicer ve Argonate proteinleridir.

Drosha ve Pasha pri-miRNA'dan pre-miRNA oluşum sürecinin gerçekleştiği hücre nükleusunda lokalizedir (Lee ve ark. 2003). Bir fraksiyonu, hücre döngüsünün S fazı esnasında nükleolusta translokate edilir. Ayrıca P-bodiler olarak bilinen GW-bodiler (GWBs)'inde de lokalizedir (Piskounova ve ark. 2011). Drosha ve Dicer ayrıca DNA hasarı yanıtında da yer almaktadır (Francia ve ark. 2012).

### ***Drosha'nın Klinik Önemi***

Drosha ve diğer miRNA prosesinde yer alan enzimler kanser prognozunda önemli olabilir (Slack ve Weidhaas 2008). Drosha ve Dicer miRNA prosesinin ana düzenleyicileri olarak rol oynamaktadırlar. Örneğin, bazı meme kanseri tiplerinde down-regüle oldukları gözlenmiştir (Thomson ve ark. 2006). Ancak, miRNA prosesi ve tümörögenез arasındaki ilişkinin doğası hala belirsizdir (Iorio ve Croce 2012).

### ***eIF2-α Translasyon Faktörü (Eukaryotic Initiation Factor-2α)***

eIF2-alfa bir translasyon başlatma faktörüdür. Sinonim isimleri EIF-2, eIF-2A ve EIF2S1'dir. Moleküler ağırlığı 36 kDa'dur. Protein sentezinin erken basamaklarında GTP ve başlatıcı tRNA ile üçlü kompleksi oluşturarak fonksiyon gösterir. Bu kompleks 40S ribozomal alt üniteye bağlanır ve bunu mRNA'nın 43S erken başlatma

kompleksini oluşturması takip eder. 80S başlatma kompleksi oluşturmak üzere 60S ribozomal alt biriminin bağlanma yerinde önce eIF-2'ye bağlanan GTP hidrolizi ve eIF-2-GDP ikili kompleksinin salınması gerçekleşir. eIF-2'yi geri donuşturmek ve katalize etmek için, eIF-2 bağlı GDP eIF-2B tarafından katalize edilen bir reaksiyon sonucu GTP ile değiştirilmelidir.

En az 4 kinaz tarafından fosforile edilir: PERK, GCN2, HRI ve PKR. Bu fosforilasyonu eIF-2/GDP/eIF-2B kompleksini stabilize eder ve GDP/GTP değişim reaksiyonu önler, boyunce başlangıçtan itibaren ardışık basamaklar arasında eIF-2 geri donuşumu bozar ve translasyonu genel inhibisyonuna yol açar.

eIF2- $\alpha$ 'nın bazı tiroid kanserlerinde ve bronko-alveolar adenokarsinomlarda up-regüle olduğu görülmüştür. Anormal fosforilasyonu ise Alzheimer hastalığı ve Epstein-Barr virusu enfeksiyonu ile ilişkilidir.

### ***Dişi üreme Sistemindeki miRNA'ların Profilleri, Düzenlenmesi ve Fonksiyonu***

Kadın üreme sistemindeki organlardaki spesifik miRNA'ların ifadesi, düzenlenmesi ve fonksiyonları daha yeni keşfedilmeye başlanmıştır. İlk rapor, Liang ve ark. (2007) tarafından, ticari kaynaklardan elde edilen 40 normal insan dokusundaki 345 miRNA'ların dağılımı ve ifadesi incelenmiştir. Tablo 10'da gorulduğu gibi en çok belirlenen miRNA'lar ovaryum, fallop tüpü, uterus ve serviksdedir.

**Tablo 10:** İnsan dişi üreme sistemi organlarında en çok bulunan miRNA'lar (Nothnick 2012).

OVARYUM	FALLOP TÜPÜ	UTERUS	SERVİKS
miR-26a	miR-26a	miR-26a	miR-26a
miR-125b	miR-26b	miR-26b	miR-26b
let7c	miR-21	miR-125b	miR-29a
		miR-16	miR-21
		let7c	miR-23b
			miR-24
			miR-99a

### ***Uterusda miRNA***

Ovaryum ve fallop tüpü gibi uterus da menstrual/östroz siklusu boyunca köklü değişikliklere uğrar. Yüksek proliferatif durumdan uterus geçişleri östrojen yüksek olduğu zaman blastosist implantasyonu için non-receptivedir, yüksek sekretuvar durumda progesteron yüksek olduğu zaman blastokist implantasyonu için reseptiftir. Bu hızlı değişim sürecinde endometriyal moleküler değişiklikler implantasyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynar. miRNA'nın ekspresyonunun global analizleri hem ovaryum hem de uterusda çok benzer miRNA profillerine sahip olduğunu göstermektedir (Shingara ve ark. 2005). Uterusdaki miRNA ekspresyonlarının belirlenmesi ve özel eksprese olan miRNA'ların fonksiyonel analizleri steroidler ve gebeliğe yanıt olarak uterus içinde meydana gelen fizyolojik değişikliklere ışık tutmuştur (Carletti ve Christenson 2009).

### ***İmplantasyonda miRNA***

Karmaşık yapısal ve biyokimyasal değişiklikler endometriyumda menstrual siklusun midsekretuvar aşamasında belli bir süre oluşan implantasyon penceresi sırasında endometriyal reseptiviteye etkilerini ortaya çıkartmaktadır (genellikle 28 günlük siklusun 19-23. günlerinde). Bu değişiklikler, desidualizasyon (progesterona tepki olarak stromal hücre farklılaşması) ile bağlantılı olarak, bir gebelik oluşturulması ve sürdürülmesi için bir önkoşul bulunmamaktadır (Harper 1992). Bozulmuş endometriyal reseptivite ve/veya desidual aberasyonların infertilite, fertilitte tedavi başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kaybını desteklediği düşünülmektedir (Macklon ve ark. 2006). Endometriyal reseptivite birçok denemede reseptiv endometriyumların belirteçleri tespit edilmesine rağmen hala tam anlaşılmamıştır ve hiçbir klinik kullanımı bulunmamaktadır (Horcajadas ve ark. 2007; Koot ve ark. 2012). Reseptivite belirteçlerin klinik açıdan kullanışlı olmasının gelişimine engel olması Salamonsen ve ark. (2013) tarafından tartışılmıştır. Son zamanlarda, implantasyon sırasında ve endometriyal reseptivitede epigenetik düzenleyici mekanizmaların rolü araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Munro ve ark. 2010). Kemirgen implantasyon modelleri implantasyon penceresinde miRNA aktivitesi için bir anlayış geliştirmiştir. Yeni nesil sekans çalışmaları fare endometriyumunda 563 disregüle mRNA, 62 disregüle miRNA ve olgun miRNA düzenlenmesinde artış tespit etmiştir ki bu geçikmeli implantasyon sergileyen

endometriyum ile karşılaştırıldığında aktif implantasyon durumunu sergiler (Su ve ark. 2010). Östradiol baskın pre-reseptiv fazdaki fare endometriyumu, progesteron baskın reseptiv faz ile karşılaştırıldığında 37 disregüle miRNA belirlenmiştir (Chakrabarty ve ark. 2007).

Primer insan endometriyal stromal hücre kültürlerin desidualizasyonu implantasyon sürecinde bir insan modeli oluşturabilmek için in vitro olarak indüklenebilmektedir. miRNAome analizi ile farklı olarak eksprese olan miRNA'ları identifiye edebilmek için desidualize ve nondesidualize insan endometriyal stromal hücreleri karşılaştırılmıştır (Estella ve ark. 2012; Qian ve ark. 2009). Bu miRNA'lar aktin filamanları için transkripti değiştirici elemanlar olarak tahmin edilmektedir, ki bunlar desidualizasyon sırasında oluşan hücresel farklılaşmanın anahtar protein belirteçleridir. Diğer transkript hedeflerinin desidualizasyon sürecine etkileri olduğu bilinmektedir, bunlar EGF, VEGF-A, TGF- $\beta$ 2 ve HOXA10 gibi (Estella ve ark. 2012; Giudice ve ark. 2002; Haouzi ve ark. 2009; Popovici ve ark. 2000).

miRNA'lar, implantasyon başarısızlığına neden olan faktörler olarak düşünülmüştür. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan kadınların mid-sekratuvar fazda olan endometriyumlarında yapılan miRNA dizi çalışmaları ile 13 disregüle miRNA belirlenmiştir (Revel ve ark. 2011).

Endometriyal reseptivite zorunlu olmasına rağmen, başarılı bir implantasyon ayrıca oosit ve embriyo kalitesine de bağlıdır (Cakmak ve Taylor 2011). Oosit ve embriyo gelişiminde rol oynayan miRNA'ların gebelikle ilgili bir dizi bozuklukla bağlantılı olduğu tanımlanmaktadır (Choudhury ve Friedman 2012; Hossain ve ark. 2012; Morales Prieto ve Markert 2011; Novakovic ve Saffery 2012).

miRNA'ların endometriyal reseptivite ve desidualizasyonda rollerini gösteren birçok çalışma olmasına rağmen önemli olduklarını dair yeterli kanıt bulunmamaktadır. Endometrial miRNA'ların keşfinin bu erken aşamasında, miRNAların implantasyon bozukluklarının teşhis belirteçleri veya implantasyon kusurları düzeltmek için yeni terapötik ajanlar olduğunun belirlenmesi için çalışılmaktadır.

### ***Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında miRNA***

Endometrial değişiklikler immün hücre popülasyonlarında (Quenby ve ark. 1999), proinflamatuvar, anti-inflamatuvar, anjiyojenik, sitokinler ve büyüme

faktörlerinin anormal ekspresyonları dahil olmak üzere önceden tekrarlayan düşük öyküsü olan kadınlarda bildirilmiştir (Banerjee ve ark. 2012). Transkriptom değişiklikler fertil kadınlar ile tekrarlayan düşük görülen kadınların sekretuvar fazdaki endometriyumları karşılaştırıldığında gösterilmiş ve ayrıca miRNA mikroarray çalışmalar ile tespit edilmiştir (Mokhtar ve ark. 2012). Bilindiği üzere, tekrarlayan düşük sorunu çeken kadınların endometriyumlarındaki miRNA ekspresyonlarını değerlendiren çalışmalar bulunmamaktadır.

### ***Üreme Hastalıklarında miRNA***

miRNA hücre farklılaşmasında bu kadar önemli rol oynarken, miRNA ekspresyonun düzensizliğinin hastalık yol açabileceğini düşünmek kolaydır. miRNA'nın ovariyen kanseri, endometriyal kanser, servikal kanser gibi çeşitli kanser tiplerinde önemli rol oynadığı, patoloji olarak iyi huylu uterin fibrot ve endometriyozis gibi hastalıklarda da rol oynadığı gösterilmiştir. Aslında miRNA normal duruma göre üreme organlarının hastalıklarında daha çok araştırılmıştır. Ovariyen kanseri kadın kanserleri içinde altıncı sırada yer almaktadır ve miRNA ekspresyonu birçok ovariyen kanser tipinde ve çeşitli kanser hücre hatlarında araştırılmıştır (Corney ve ark. 2007; Dahiya ve ark. 2008; Iorio ve ark. 2007; Nam ve ark. 2008; Yang ve ark. 2008; Zhang ve ark. 2008). Bugüne kadar predominant çalışmalar miRNA signatürlerin aydınlatılmasının hastalık teşhisinde kullanılabilmesine odaklanmıştır. Bu çalışmalar kanser dokularını normal dokular ile veya kanser hücre hatlarıyla karşılaştırmışlardır.

Uterusta endometriyal karsinogenez her yıl yaklaşık 40 000 kadını etkilemektedir. Boren ve ark. endometriyal adenokansinomları ve normal endometriyal dokulardaki miRNA ekspresyonunu test etmiş ve 13 miRNA'nın farklı olarak eksprese olduğunu açıklamışlardır (Boren ve ark. 2008). Bunlar mRNA'ların da bu iki doku arasında farklılık gösterdiğini açıklamış ve farklı eksprese olan mRNA'ların %9'un miRNA değişimine hedef olduğunu açıklamışlardır.

Endometriyozis, endometriyal dokuların uterin boşluğu dışında bulunmasıyla karakterize edilen bir hastalıktır ve bu durumda olan hastaların %30-40 oranında infertiliteye neden olmaktadır. Pan ve ark. (2007) insan normal endometriyum, eutopik endometriyum ve ektopik endometriyum örneklerinde miRNA mikrodizisi uygulamıştır. Kırık sekiz miRNA'nın farklı eksprese olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmada fertil ve infertil olgulardan endometriyal siklusun proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde endometriyal biyopsi örneklerinin alınması ve bu dokulardan eksprese olan mikro RNA'ların belirlenmesi amaçlanmıştır. Endometriyal problemlerden dolayı fizyolojik koşullarda implantasyon sürecinin gerçekleşmediği infertil olgularda menstrual siklusun proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerindeki miRNA profilinin çıkartılarak fertil olgular ile karşılaştırılması ve implantasyon sürecinde rol oynayan miRNA'ların belirlenmesi amaçlandı. Çalışma verileri ışığında kadın infertilitesi için yeni bir tedavi yöntemi bulunabileceği düşünülmüştür. Bu amaç doğrultusunda fertil ve infertil vakalardan alınan endometriyal biyopsi örneklerinde mikroRNA biyogenezinde nukleus içi ve dışı sitoplazmada rol alan moleküllerin dağılımlarının incelenmesi, belirlenen mikroRNA'ların ekspresyonlarının analiz edilmesi ve endometriyum dokusunun morfolojik incelenmesi amaçlandı.

Literatür taraması yapıldığında daha önceki çalışmalarda fertil olgularda kadın üreme sistemine ait miRNA'ların dağılımları incelenmiş olmasına rağmen, bu çalışmada infertil olgularda miRNA profilinin çıkartılacak olması çalışmanın özgün değeridir. Bununla beraber endometriyal problemlerden dolayı implantasyonun gerçekleşmediği durumların açıklanabilmesi ve fertil olgular ile infertil olgularda farklı menstrual dönemlerde miRNA dağılımlarının belirlenmesi ile ekspresyonlarının kontrolü ve analizi açısından ilk defa yapılmış olan bu çalışma bu açıdan da diğer çalışmalardan farklı olup, özgündür.

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 189-SBKAEK protokol numaralı 2014/10-17 sayılı onayı ile 25-38 yaşları arasında Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvuran fertil ve infertil olgulardan proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde toplam 30 hasta ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan histokimyasal ve immunohistokimyasal inceleme için gerekli olan tüm kimyasal malzemeler Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2014/006 no'lu proje ile desteklenmiştir.

### 5.1. Hasta Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmada 25-38 yaşları arasında Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvuran fertil ve infertil olgular kullanıldı.

Fertil gruptaki kadınlar en az bir çocuk sahibi olan, önceden herhangi bir rahim hastalığı tanısı almamış, disfonksiyonel uterin kanaması olan ve Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvurusu sırasındaki şikayetleri ile kanamasız dönemde küretaj veya endometriyal örnekleme yapılması gereken kişilerden seçildi.

İnfertil grup ise normal yolla hiç çocuğu olmayan, en az bir yıldır evli olan ve 12 ay süreyle korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen canlı çocuk sahibi olamayan kadınlardan seçildi.

Fertil ve infertil hasta grupları Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanı tarafından hastanın anamnez bulguları ile birlikte ultrason, radyolojik ve laboratuvar bulguları değerlendirilerek, hastalar çalışmaya alınmak üzere belirlendi. Tüm hastalardan örnek alımından önce bilgilendirilme yapıldı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanan hasta gönüllülük onam formu imzalatıldıktan sonra örnek alımı menstrual siklus döngüleri Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanı tarafından belirlendikten sonra yapıldı.

Örnek alımından önce hiperplazi, neoplazi, polip, myom vb gibi klinik problemi olan hastalar muayene sırasında tespit edilmesi sonucunda hasta çalışmaya dahil edilmemiştir. Bunlar dışında enfeksiyon ya da malignite geçiren çeşitli jinekolojik patolojilere sahip olanlar, sistemik hastalığı olanlar, hormon benzeri çeşitli ilaçlar



kullananlar, genitöüriner sistemde doğumsal defekti olanlar ve hasta bilgilendirilmiş gönüllü onam formu onamı alınamayan kişiler çalışmaya alınmamıştır.



## 5.2. Hasta Grupları ve Örnek Alımı

Çalışmada fertil ve infertil olmak üzere iki hasta grubu bulunmaktadır. Hastalar 25-38 yaş gruplarında olup 16 fertil (10 proliferasyon döneminde hasta+6 erken sekresyon döneminde hasta) ve 14 infertil (8 hasta proliferasyon döneminde hasta+6 erken sekresyon döneminde hasta) bulunmaktadır. Fertil gruplara dahil edilen hastalar en az iki yıl evli olup, en az bir canlı doğum öyküsü olanlardan oluşmaktadır. İnfertil gruplara dahil edilen hastalar bir ila sekiz yıl arasında evli olanlardan oluşmaktadır. Fertil ve infertil hasta gruplarına ait diğer özellikler Tablo 11, 12, 13 ve 14'de verilmiştir.

Endometrial örnekler, her biri hastanın tahmini siklus dönemine uygun olarak probe küretaj veya pipelleme yöntemiyle projede bulunan araştırmacılardan Prof. Dr. Tayfun Özçakır tarafından alındı.

Alınan endometriyal örnekler aşağıda verildiği dönemlerde ve Tablo 11-14'te verilen hastalardan alınmış olup çalışmada 4 grup bulunmaktadır:

Grup 1: Proliferasyon dönemi (fertil) (n=10)

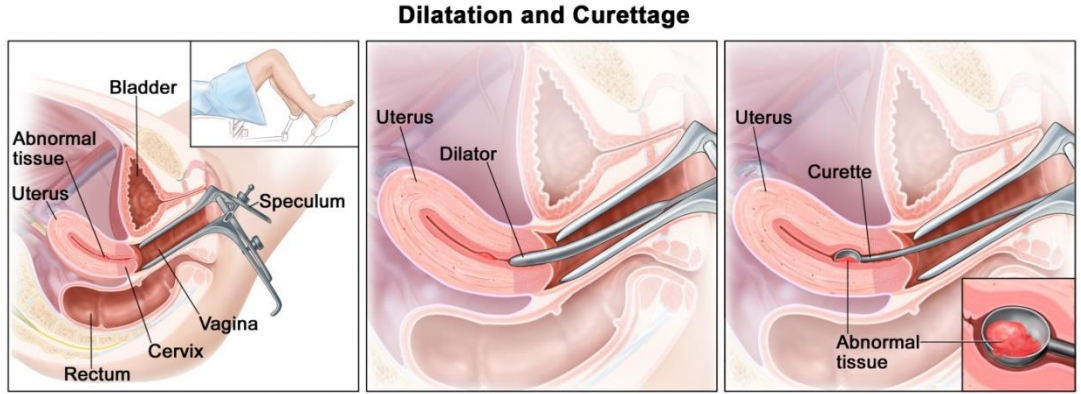
Grup 2: Erken sekresyon dönemi (fertil) (n=6)

Grup 3: Proliferasyon dönemi (infertil) (n=8)

Grup 4: Erken sekresyon dönemi (infertil) (n=6)

### ***Küretaj (Probe Küretaj)***

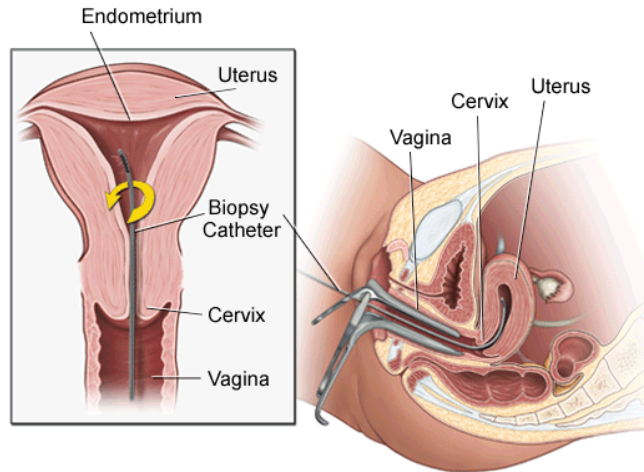
Probe küretajlar genel anestezi altında yapıldı. Hastalar işlem için en uygun pozisyon olan lithotomi pozisyonunda yatırıldı. Hastalar anestezi uzmanı bir hekim tarafından uyutuldu ve önce jinekolojik muayene yapıldı. Rahimin özellikleri anlaşıldıktan sonra vajinal spekulum yerleştirildi. Vajina ve serviks antiseptik solüsyonlar ile yıkandı. Daha sonra serviks yani rahim ağzı tenekulum ya da tek dişli adı verilen bir alet ile tutuldu ve tenekulum çekilerek rahimin düz bir hale gelmesi sağlandı. Buji adı verilen aletler yardımı ile rahim ağzı genişletilmeye başlandı (dilatasyon). Dilatasyon işlemi tamamlandıktan sonra plastik kanüller rahim ağzından geçirilerek, rahim boşluğuna ulaşıldı. Kanül yerleştirildikten sonra küretler ile kavite iyice temizlendi ve parçalar alındı. Vajina tekrar antiseptik solüsyon ile yıkandı ve spekulum çıkartıldı. Hasta anestaziden uyandırılarak ameliyathaneden çıkarıldı.



**Şekil 30:** Küretaj işlemi (<https://www.aacroundation.org> Erişim tarihi: 09.12.15)

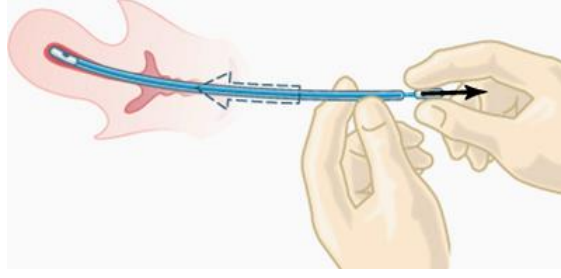
### ***Pipelleme***

Pipelle endometriyal örnekleme hastalara anestazi uygulanmadan yapıldı. Hastalar işlem için en uygun pozisyon olan lithotomi pozisyonunda yatırıldı. Hastalara vajinal spekulum yerleştirildi, serviks görünür hale getirildi ve jinekolojik muayene yapıldı. Rahimin özellikleri anlaşıldıktan sonra serviks tek dişli denilen alet ile tutuldu ve uterusun düz hale gelmesi sağlandı.



**Şekil 31:** Endometriyal biyopsi (<http://www.slideshare.net> Erişim tarihi: 09.12.15)

Pipel, kendinden negatif basınç uygulayan pistonu olan ince plastik, dispozibl bir kanülden ibaret bir sistemdir. Pipel yardımıyla endometriyum kazınarak örnek alımı gerçekleştirildi. Ardından tek dişli ve spekulum çıkartıldı. Hasta muayene bitirilip gönderildi.



**Şekil 32:** Pipel kullanılarak endometriyal örnek alım işlemi  
(<http://neuroanatomylec.blogspot.com.tr> Erişim tarihi: 09.12.15)



**Tablo 11:** Fertil Grubu Proliferasyon Dönemine Ait Hastaların Bilgileri

Adı Soyadı	Yaşı	Siklus Fazı	Siklus Süresi	Hastalık	Hormon Değerleri
1. HASTA	38	Proliferasyon	28+3	Düzensiz vajinal kanama	- FSH: 8.13 LH: 3.39
2. HASTA	37	Proliferasyon	Düzensiz	Adet düzensizliği	Progesteron: 0.29 E2: 122.57 Pr: 10.64 FSH: 14.43 LH: 7.35
3. HASTA	36	Proliferasyon	28	Ria çıkarılması ve muayene	Progesteron: 0.28 E2: 84.85 Pr: 4.38
4. HASTA	38	Proliferasyon	31	Rutin kontrol	- FSH: 4.51 LH: 4.12
5. HASTA	37	Proliferasyon	28	Anormal uterin kanama	Progesteron: 0.12 E2: 113.28 Pr: 7.46 TSH: 3.22
6. HASTA	38	Proliferasyon	28+3	Anormal uterin kanama	Progesteron: 0.25 Pr: 4.21 FSH: 11.17 LH: 2.29
7. HASTA	36	Proliferasyon	Düzensiz	Adet düzensizliği	Progesteron: 0.18 E2: 113.37 Pr: 6.13 FSH: 11.17 LH: 28.65
8. HASTA	35	Proliferasyon	Düzensiz	Adet düzensizliği	Progesteron: 1.02 E2: 223.51 Pr: 37.11 FSH: 26.28 LH: 13.48
9. HASTA	31	Proliferasyon	28	Rutin kontrol	Progesteron: 0.18 E2: 22.12 Pr: 5.19 TSH: 2.2
10. HASTA	38	Proliferasyon	Düzensiz	Adet düzensizliği	Beta HCG: 1.2

**Tablo 12:** Fertil Grubu Erken Sekresyon Dönemine Ait Hastaların Bilgileri

Adı Soyadı	Yaşı	Siklus Fazı	Siklus Süresi	Hastalık	Hormon Değerleri
1. HASTA	38	Erken Sekresyon	Belirsiz	Anormal uterin kanama	-
2. HASTA	38	Erken Sekresyon	Belirsiz	Anormal uterin kanama	-
3. HASTA	36	Erken Sekresyon	Düzensiz	Endometriyal kalınlaşma	FSH: 3.68 LH: 2.76 Progesteron: 6.02 E2: 107.93 Pr: 11.02
4. HASTA	33	Erken Sekresyon	28	Hemoglobin düşüklüğü	FSH: 2.5 LH: 2.69 Progesteron: 18.09 E2: 126.73 Pr: 4.03
5. HASTA	31	Erken Sekresyon	Düzensiz	Sık adet görme	FSH: 16.88 LH: 12.42 Progesteron: 0.68 E2: 34.31 Pr: 7.95
6. HASTA	36	Erken Sekresyon	28+3	Ara kanama	FSH: 4.41 LH: 2.42 Progesteron: 0.05 E2: 20.12 Pr: 7.11

**Tablo 13:** İnfertil Grubu Proliferasyon Dönemine Ait Hastaların Bilgileri

Adı Soyadı	Yaşı	Siklus Fazı	Siklus Süresi	Hastalık	Hormon Değerleri
1. HASTA	38	Proliferasyon	28+3	Kadın infertilitesi	+
2. HASTA	37	Proliferasyon	28+3	Kadın infertilitesi	+
3. HASTA	35	Proliferasyon	Düzensiz	Over kisti şüphesi ile dış merkezden yönlendirilmiş	FSH: 12.95 LH: 10.05 Progesteron: 0.55 E2: 25.32 Pr: 13.59 FSH: 30.26 LH: 30.24
4. HASTA	38	Proliferasyon	Düzensiz	Adet düzensizliği	Progesteron: 0.6 E2: 170.58 Pr: 12.74
5. HASTA	28	Proliferasyon	28+3	HSG çekimi	-
6. HASTA	26	Proliferasyon	28+3	HSG çekimi	-
7. HASTA	25	Proliferasyon	28+3	HSG çekimi	-
8. HASTA	32	Proliferasyon	28+3	HSG çekimi	FSH: 4.61 LH: 3.23 Progesteron: 0.42 E2: 30.32 Pr: 11.03

**Tablo 14:** İnfertil Grubu Erken Sekresyon Dönemine Ait Hastaların Bilgileri

Adı Soyadı	Yaşı	Siklus Fazı	Siklus Süresi	Hastalık	Hormon Değerleri
1. HASTA	32	Erken Sekresyon	28+3	Kadın infertilitesi	FSH: 8.33 LH: 4.44 Progesteron: 0.69 E2: 27.49 Pr: 17.05 FSH: 8.84 LH: 2.64
2. HASTA	35	Erken Sekresyon	28+3	Kadın infertilitesi	Progesteron: 0.79 E2: 50.63 Pr: 12.69 FSH: 13.24 LH: 12.41
3. HASTA	30	Erken Sekresyon	28+3	HSG çekimi	Progesteron: 0.19 E2: 54.67 Pr: 10.99
4. HASTA	25	Erken Sekresyon	Düzensiz	Trombofili paneli	+
5. HASTA	38	Erken Sekresyon	28+3	HSG çekimi	-
6. HASTA	30	Erken Sekresyon	28+3	HSG çekimi	-



### **5.3. Doku Örneklerinin Hazırlanması**

Çalışma kapsamında alınan örneklerin bir kısmı histolojik analiz için %10 formalin solüsyonuna, kalan örnekler ise miRNA analizi için direkt olarak sıvı azot içine alınarak saklandı.

Histolojik analizler için örnekler rutin parafin takip işleminden sonra morfolojik analizi için hematoksilin-eozin (H-E) ile boyanmış, immunohistokimyasal analizi için anti-ago1 (anti-eIF2C), anti-dicer, anti-drosha, anti-eIF2 $\alpha$  dağılımlarına bakılmıştır. miRNA analizleri için örneklerde RNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra RNA izolasyonu ve kalitesinin ölçülmesi kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile, belirlenen miR-17-5p, miR-23a, miR-23b, miR-542-3p, miR-21, miR-199a\*, miR-705, miR-20a, miR-26a, miR-125b, miR-200a, miR-200b, miR-200c analiz edilmiştir.

Fertil ve infertil vakalardan toplanan endometriyal biyopsi örneklerin histokimyasal, immunohistokimyasal ve miRNA analizleri için hazırlanması, verilerin analizi ve değerlendirme Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında kesit alma ve immunohistokimya laboratuvarında gerçekleştirildi. miRNA analizleri ise İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Doç. Dr. Bünyamin Akgül tarafından yapıldı.

#### ***Doku Örneklerinin Parafin Doku Takibi***

Endometriyal biyopsi örneklerinin bir kısmı histokimyasal ve immunohistokimyasal analiz için %10'luk formalin solüsyonu (Merck, UN2209) ile 24-48 saat tespit edildi. Formalin ile tespit edilen örnekler bir gece akar suda bekletildikten sonra rutin parafin takip protokolüne uygun olarak %60'da 30 dk, %70'de 30 dk, %80'de 30 dk, %100'de bir saat, %100'de bir saat şeklinde tutularak artan derecelerde alkol (Sigma-Aldrich, 32221-UN1170) serilerinde dehidratasyon yapıldı, 30 dk ksilen-alkol ve 50 dk ksilende (Merck, 28973363) şeffaflaştırma işleminden sonra, 30 dk ksilen-parafin ve birer saat parafin 1 ve parafin 2'den (Gurr, 36107 7E) geçirilerek parafine gömme işlemi gerçekleştirildi (Tablo 15). Örneklerden rotary mikrotom (Leica, RM2135) ile 5  $\mu$ m kalınlığında kesitler alındı. Kesitler histokimyasal boyamalar yapılabilmesi için rodajlı (Marienfeld, 1000200), immunohistokimyasal boyamaların yapılabilmesi için ise lizinli (Isotherm, 20141218) lamlara alındı.



**Resim 15:** Rotary mikrotom (Leica, RM2135) (CBÜ Histoloji-Embriyoloji AD.)



**Resim 16:** Laboratuvarda kullanılan sarf malzemeler (CBÜ Histoloji-Embriyoloji AD.)

**Tablo 15:** Parafin Doku Takip Protokolü

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Tespit</b>	% 10 formalin	24- 48 saat
<b>Fiksatifin Uzaklaştırılması</b>	Akar su	1 gece
<b>Dehidratasyon</b>	% 60 etil alkol	30 dakika
	% 70 etil alkol	30 dakika
	% 80 etil alkol	30 dakika
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 etil alkol	1 saat
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen-Alkol	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
<b>Emdirme - 60°C (Etüv)</b>	Ksilen-Parafin	30 dakika
	Parafin 1	1 saat
	Parafin 2	1 saat
<b>Gömme</b>	Parafin	

***Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü***

Parafin bloklardan rotary mikrotom ile beş mikrometre kalınlıkta alınan kesitler bir gece 60°C etüvde (Nüve, FN 400) deparafinize edildikten sonra, bir saat ksilen ile kimyasal deparafinizasyon işlemi uygulandı. Derecesi giderek azalan alkol serilerinden (%95, %80, %70 ve %60'lık alkol serisi) ikişer dakika süre ile geçirilerek suya getirilen kesitler önce Hematoksilen (Leica, 3801562E) solüsyonu ile altı dakika boyandı. Akar su altında beş dakika yıkanan kesitler %1 asit-alkol solüsyonu ile diferansiye edildikten sonra Eozin (Bio-Optica, 380610) boyası ile 1,5 dakika boyandı. Kesitler artan alkol serilerinden (%80 ve %95'lik alkol serisi) geçirilerek ksilen içine alındı. Ksilen içinde bir saat bekletilen kesitler entellan (Merck, UN 1866) kullanılarak lamel (Marienfeld, 01 01060) ile kapatıldı ve ışık mikroskop (Olympus BX43) altında incelendi ve fotoğrafları çekildi. Hematoksilen-Eozin protokolü Tablo 16'de verilmiştir.



**Resim 17:** Laboratuvarında kullanılan sarf malzemeler (CBÜ Histoloji-Embriyoloji AD.)

**Tablo 16:** Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
<b>Deparafinizasyon</b>	60° C etüvde	1 gece
<b>Kimyasal</b>	Ksilen	30 dakika
<b>Deparafinizasyon</b>	Ksilen	30 dakika
<b>Rehidratasyon</b>	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
	<b>Yıkama</b>	Akar su
<b>Boyama</b>	Hematoksilen	6 dakika
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dakika
<b>Diferansiyasyon</b>	Asit alkol	2-3 saniye
<b>Boyama</b>	Eosin	1,5 dakika
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dakika
<b>Dehidratasyon</b>	% 80 alkol	1 dakika
	% 95 alkol	1 dakika
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen	1 saat
<b>Kapama</b>	Entellan	

### ***İndirekt İmmünohistokimya Boyama Protokolü***

İmmünohistokimyasal analiz olarak rutin avidin-biotin indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanıldı. Lizinli lamlara alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C’ de bekletildikten sonra kimyasal deparafinizasyon için ksilende bir saat bekletildi. Rehidratasyon işlemi için ikişer dakika %95, %80, %70, %60 şeklinde azalan alkol serilerinden geçirildi. Sonra

hidrofobik immunohistokimya kalemi ile dokuların etrafı sınırlandırıldı ve üç defa beşer dakika fosfat tamponu (Phosphate buffer salin-PBS) (ScyTek, PBS500) ile yıkandı. Dokuların permeabilizasyonu için 15 dk 37°C'de (Nüve, EN 500) Tripsin (İnvitrogen, 00-3008) ile tutulan örnekler üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra dokuda bulunan peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dk %3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, UN 2014) ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı. Örnekler üzerine bloklama solüsyonu (İnvitrogen, 859043) ile bir saat inkübe edildikten sonra yıkama yapılmadan anti- eIF2C (anti-ago1) (Santa Cruz, 32360) 1/50, anti-dicer (Santa Cruz, sc-136979) 1/50, anti-drosha (Abcam, ab85027) 1/100 ve anti-eIF2 $\alpha$  (Santa Cruz, sc-11386) 1/50 dilüsyonlarında primer antikorları konularak bir gece (18 saat) +4°C'de (Bosch, KGN56A00NE) nemli ortamda inkübe edildi. Ertesi gün örnekler PBS solüsyonu ile üç defa yıkandıktan sonra biotinlenmiş ikincil antikor (İnvitrogen, 859043) ilave edilerek 30 dk inkübe edildi. Örnekler üç defa beşer dakika yıkandıktan sonra streptavidin-peroksidaz (İnvitrogen, 859043) ilave edilerek 30 dk oda sıcaklığında beklenildi. İmmunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB) (İnvitrogen, 859643) ile 2-5 dk boyandıktan sonra örnekler distile su ile yıkandı. Artalan boyaması amacı için örnekler Mayer's hematoksilen (Bio-Optica, 05-06002/L) ile 3-6 dk boyandıktan sonra %80 ve %95' lik alkollerden birer dakika geçirilip, ksilen ile 30 dk şeffaflaştırma yapılarak entellan (Surgipath) ile kapatıldı.

İmmünoaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile birer kesit kontrol boyaması için ayrıldı ve antikor ilavesi olmadan diğer basamaklar aynı şekilde uygulanarak boyama gerçekleştirildi. İndirek immunohistoperoksidaz yöntemine ait protokol Tablo 17'de verilmiştir.



**Resim 18:** Laboratuvarda kullanılan sarf malzemeler (CBÜ Histoloji-Embriyoloji AD.)

**Tablo 17: İndirekt İmmünohistokimya Boyama Protokolü**

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Deparafinizasyon</b>	60° C etüvde	1 gece
<b>Kimyasal Deparafinizasyon</b>	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
<b>Rehidratasyon</b>	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
<b>Yıkama</b>	Distile su	10 dakika
<b>Dokuların Etrafını Çizme</b>	Dakopen	
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>Permeabilizasyon</b>	Tripsin 37°C etüvde	15 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>Peroksidaz Aktivitesinin İnhibisyonu</b>	%3'lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>Bloklama</b>	Blok solüsyonu	10 dakika
<b>Antikor ile inkübasyon</b>	Primer Antikorlar	1 gece, 4°C de
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>İkincil antikor</b>		30 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>Avidin-biotin kompleksi</b>		30 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>Boyama</b>	DAB Kit	5 dk.
<b>Yıkama</b>	Distile su	3x5 dakika
<b>Zıt Boyama</b>	Mayer's hematoksilen	15 dakika
<b>Yıkama</b>	Distile su	3x5 dakika
<b>Dehidratasyon</b>	%80 alkol	1 dakika
	%95 alkol	1 dakika
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen	30 dakika
<b>Kapama</b>	Entellen	

#### 5.4. İmmunohistokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi

Boyamalar sonucu elde edilen immunoreaktivite yoğunlukları, kantitatif yöntemle yapılmış olup, pozitif boyanan hücre sayıları belirlenerek boyanma şiddetleri HSCORE ile değerlendirilmiştir. İmmunoreaktivite yoğunlukları zayıf (+), orta (++) , şiddetli (+++) ve kuvvetli pozitif (++++) olarak incelendikten sonra veriler HSCORE:  $\sum P_i (i+1)$  formülü üzerinden “ $P_i$ ” değeri boyanan hücre sayısını, “ $i$ ” değeri boyanma derecesine karşılık gelecek şekilde hesaplanarak tüm veriler GraphPad istatistiksel analiz programında ANOVA testi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel veriler mean $\pm$ SD olarak verilmiş ve  $p>0.05$  olan değerler karşılaştırma sonrasında anlamlı olarak kabul edilmemiştir.



**Resim 19:** Olympus BX43 mikroskop (CBÜ Histoloji-Embriyoloji AD.)



### **5.5. RNA İzolasyonu ve Kalitesinin Ölçülmesi**

miRNA analizleri için ise endometriyal biyopsi örnekleri steril şartlar altında alınarak kalsiyum ve magnezyum içermeyen tampon solüsyonu (fosfat tamponu) (Phosphate Buffered Saline-PBS) (Lonza, BE17-516F) içerisinde kan ve kan hücrelerinden arındırmak için hızlı bir şekilde yıkanıp steril kriyotüpler (Greiner Bio-One GmbH, 07190176) içerisine konulmuş ve sıvı azot içerisine alınmıştır. Dokulardan RNA ekstraksiyonu yapılanaya kadar ise  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

#### ***Dokulardan RNA İzolasyonu***

- Hastalardan alınan dokular mümkün olduğu kadar temiz, harici doku ve hücrelerden arındırılmış halde sıvı azotta dondurularak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.
- RNA izolasyonu için kullanılacak olan mirVana PARİS kit ile doku örnekleri hücre parçalama solüsyonu içine alınarak önceden soğutulmuş havanlar yardımıyla kısa sürede ezildi.
- Oluşan lizat mikrofüj tüplerine alınarak, üretici firma tarafından doku örneğinin miktarıyla orantılı olarak 2X denatüre edici solüsyon koyulduktan sonra örneklerin lizisi tamamlandı ve organik ekstraksiyon aşamasına geçildi.
- Organik ekstraksiyon için RNA lizatı üzerine asit:fenol:kloroform çözeltisi eklenerek vortekslendikten sonra maksimum hızda 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra 1/1,25 oranda lizat/etanol eklenerek lizat/etanol karışımı filtreden geçirilerek sonrasında yıkama aşamaları tamamlandı ve son basamakta elüsyon tamamlanarak RNA izolasyonu tamamlanmış oldu.

#### ***Total RNA Konsantrasyonu ve Kalite Kontrolü Belirleme***

- NanoDrop 1000A Spektrometer yardımıyla, elde edilmiş olan RNA'ların miktar ve saflık tayini yapıldı.
- A260/280 ve A260/230 değerlerinin 1,8-2,2 arasında olmasına özen gösterildi.
- Genomik DNA kontaminasyonunu elimine etmek için DNaz muamelesi yapıldı (Ambion, Turbo DNase).
- NanoDrop yöntemine ek olarak Bioanalyzer (Agilent) kullanılarak RNA miktar ve kalite kontrolü yapıldı.

- Bioanalyzer analizi sonrası RIN (RNA Integrity Number) sayılarının 8-10 arasında olmasına özen gösterildi.

### **5.6. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Protokolü**

- mirVana<sup>TM</sup> qRT-PCR miRNA Detection Kit protokolü gereği 10-25 ng RNA kullanıldı.

- qRT-PCR'in ilk aşaması reverse transkriptaz reaksiyonu kuruldu ve inkübasyon sonrası qRT-PCR aşamasına geçilerek kit içeriği kullanıldı ve eş-zamanlı RT-PCR (qRT-PCR) reaksiyonu kurularak belirlenen miRNA'ların varlığı ve miktarı incelendi.

- Rölatif kantitasyon yöntemi kullanılarak yapılacak hesaplamalarda U6 küçük RNA'sı normalizasyon için kullanıldı.

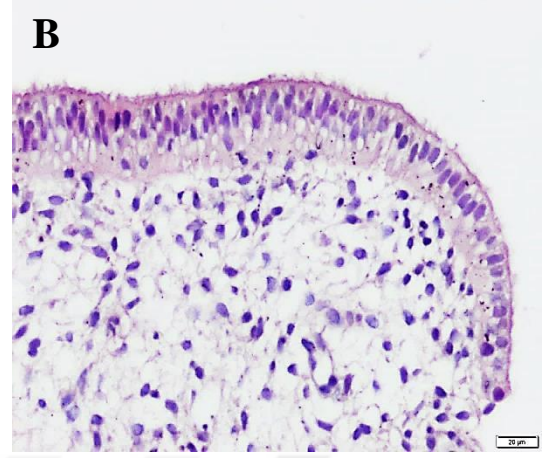
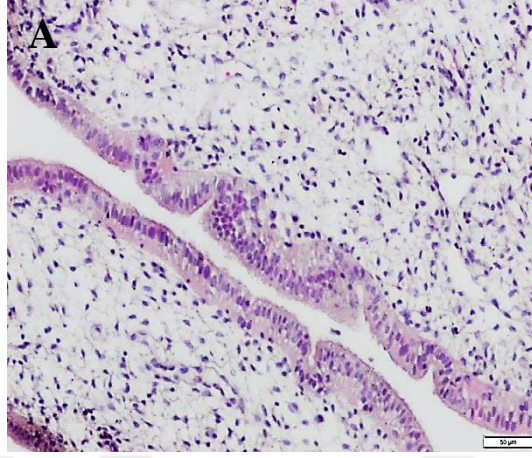
## 6. BULGULAR

### 6.1. Histokimyasal Sonular

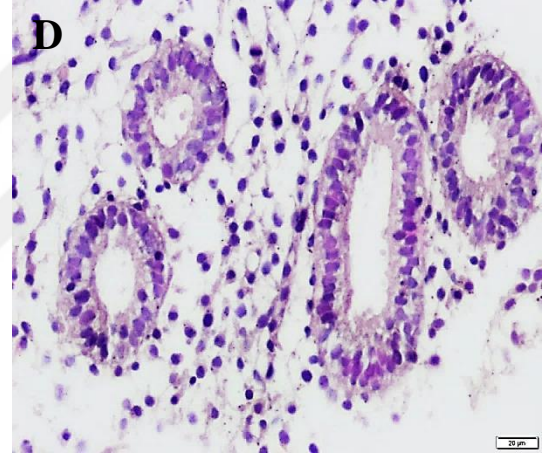
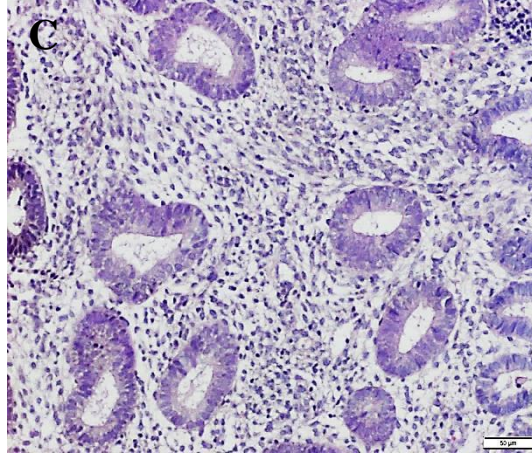
Hematoksilen ve eozin ile boyalı preparatlar incelendiğinde, tüm gruplarda endometriyuma ait luminal epitel, lamina propria ve lamina propriada bağ doku içerisinde bulunan bezler gözlemlendi (Resim 20-23). Fertil (Resim 20) ve infertil (Resim 22) olgulardan proliferasyon döneminde alınan doku kesitlerinde, luminal epitelin (Resim 20 A-B, Resim 22 A-B) tek katlı prizmatik epitel olduğu ve lamina propriada (Resim 20 E-F, Resim 22 E-F) bağ dokusu içerisinde bulunan bezlerin (Resim 20 C-D, Resim 22 C-D) yuvarlak şekilli oldukları, tek katlı prizmatik epitel ile döşendikleri gözlemlendi. Fertil (Resim 21) ve infertil (Resim 23) olgulardan erken sekresyon dönemine ait doku kesitlerinde ise, luminal epitellerin (Resim 21 A-B, Resim 23 A-B) tek katlı prizmatik epitel olduğu, lamina propriada (Resim 21 E-F, Resim 23 E-F) bağ dokusu arasındaki bez yapılarının (Resim 21 C-D, Resim 23 C-D) hafif kıvrıntılı olduğu, tek katlı alçak kübik hücreler ile döşeli olan bez epitellerinin bazal kısımlarında glikojen vakuollerinin olduğu gözlemlendi. Bu vakuollerin rutin parafin takip esnasında ksilenden geçirilerek yapılan şeffaflaştırma işlemi dolayısıyla içerikleri kaybolmuş ve içi boş boşluklar halde gözlenmiştir. Bu vakuollerin varlığı bez epitellerinin erken sekresyon dönemine ait olduklarını desteklemektedir.

## FERTİL PROLİFERASYON GRUBU H&E

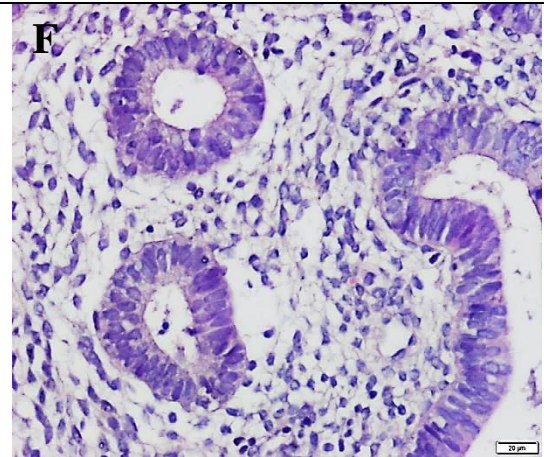
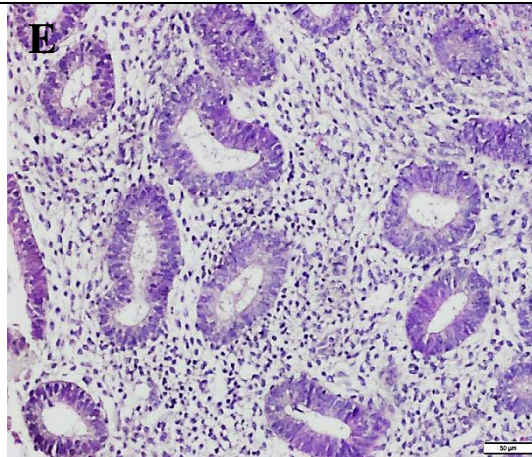
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli

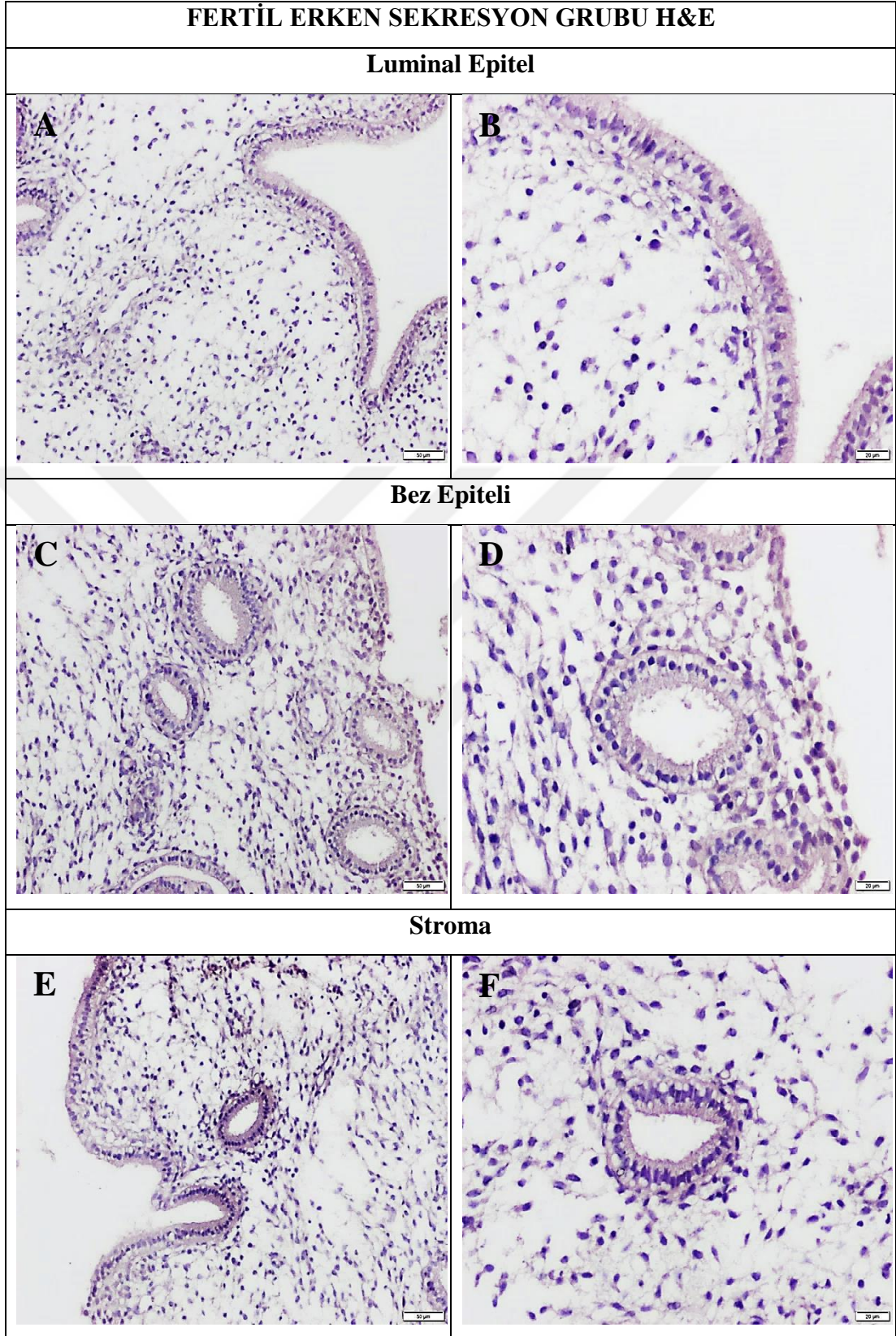


### Stroma



**Resim 20:** Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki endometriyum örneklerinde luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromaya (E-F) ait histokimyasal görünümü. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.



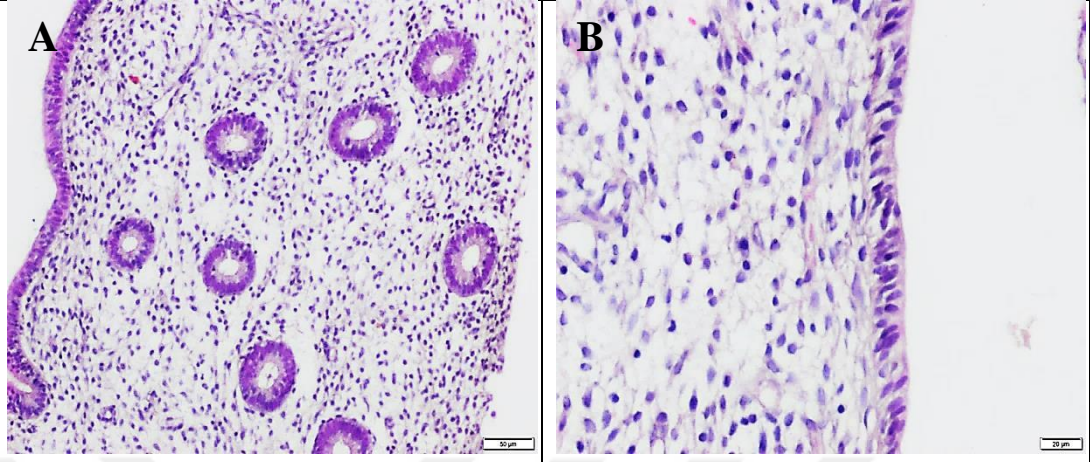


**Resim 21:** Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki endometriyum örneklerinde luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromaya (E-F) ait histokimyasal görünümü. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.

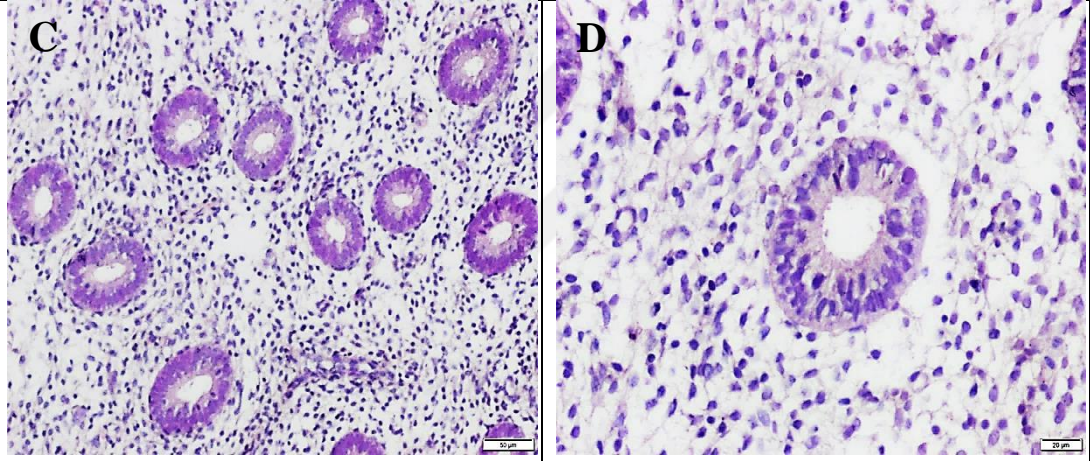


## İNFERTİL PROLİFERASYON GRUBU H&E

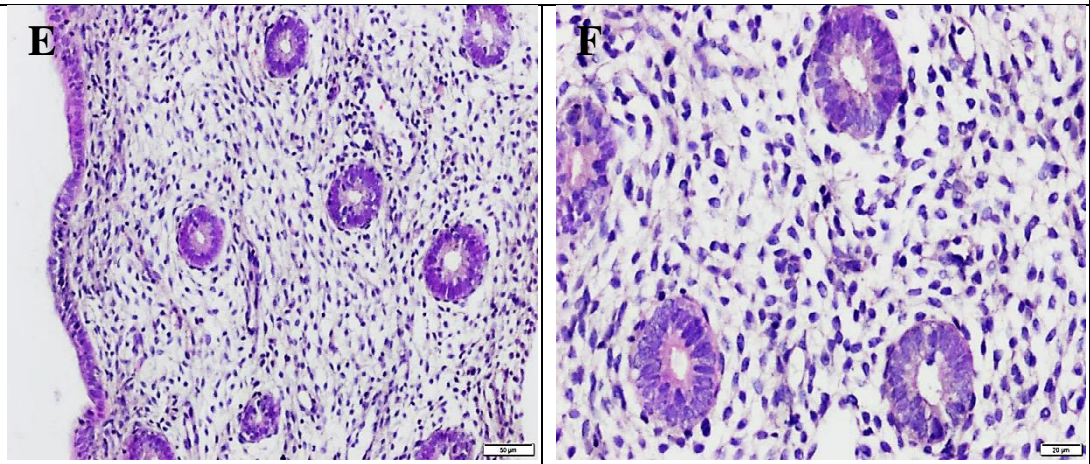
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli



### Stroma

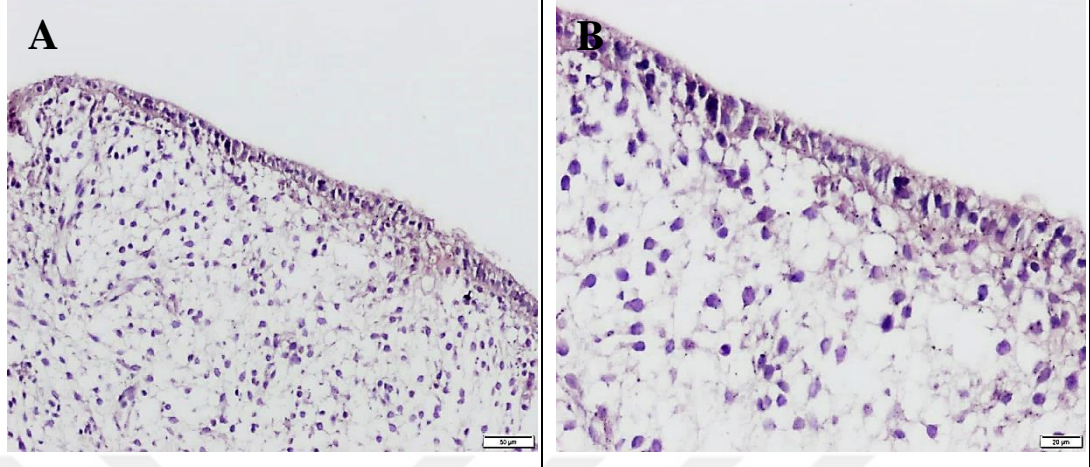


**Resim 22:** İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki endometriyum örneklerinde luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromaya (E-F) ait histokimyasal görünümü. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.

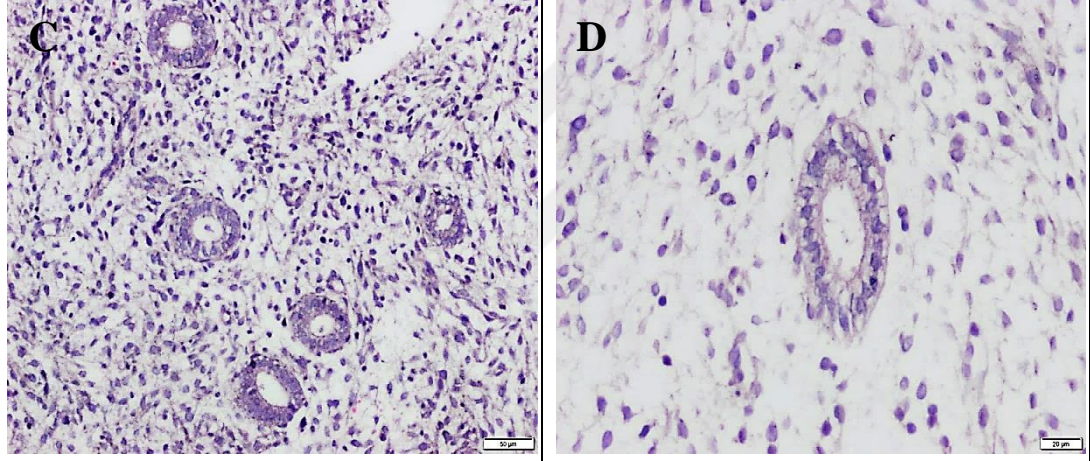


## İNFERTİL ERKEN SEKRESYON GRUBU H&E

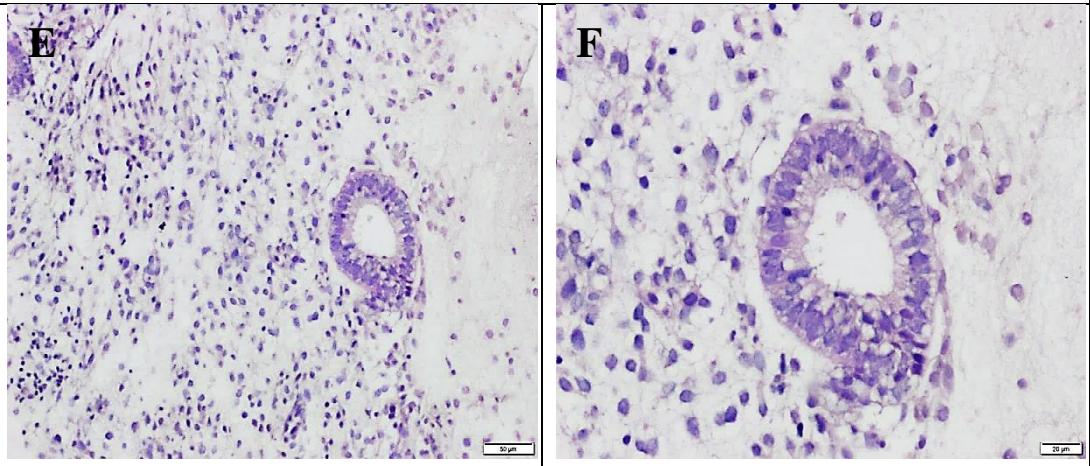
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli



### Stroma



**Resim 23:** İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki endometriyum örneklerinde luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromaya (E-F) ait histokimyasal görünümü. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.

## 6.2. İmmunohistokimyasal Sonuçlar

Fertil proliferasyon grubuna ait 10, fertil erken sekresyon grubuna ait 6 ve infertil proliferasyon grubuna ait 8, infertil erken sekresyon grubuna ait 6 vakadan alınan örneklerde Dicer, Drosha, eIF2 $\alpha$  ve eIF2C immunohistokimyasal dağılımları HSCORE değerlendirme yöntemi ile yapılmış ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

### 6.2.1. Dicer İmmunoreaktivitesi

Fertil grubundaki örneklerde, Dicer immunoreaktivitesi proliferasyon döneminde, luminal epitelde yer yer zayıf (-/+) şiddette boyanma gözlenir iken (Resim 24 A-B), bez epiteli ve stromada boyanmanın olmadığı (-) gözlendi (Resim 24 C-F). Luminal epitele ait boyanma HSCORE analizi ile değerlendirildiğinde  $17.53 \pm 6.55$  olarak saptandı (Tablo 19). Fertil grubun erken sekresyon döneminde ise hem luminal ve bez epitelinde hem de stromada Dicer immunoreaktivitesinin negatif (-) olduğu izlendi (Resim 26).

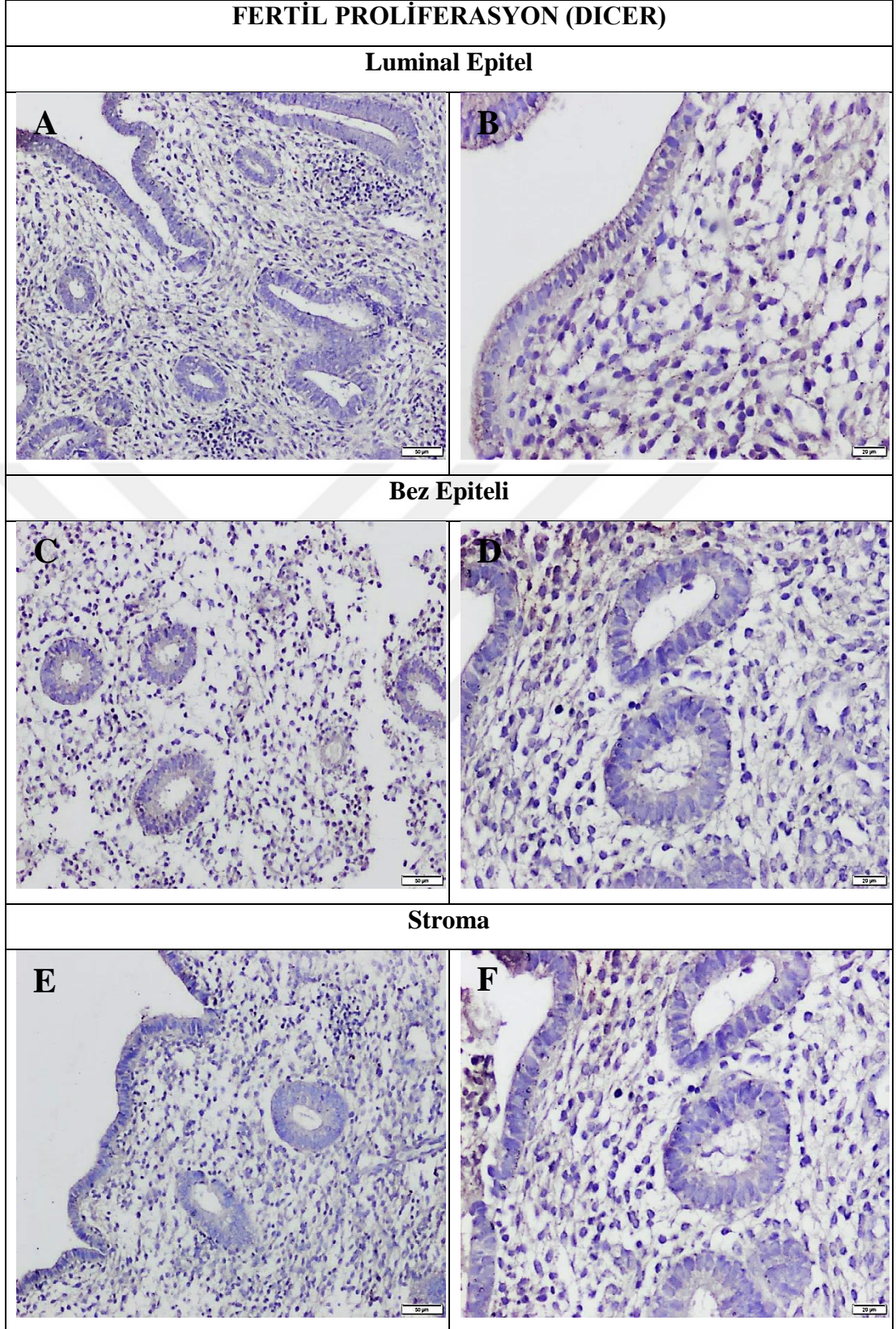
İnfertil gruptan alınan örneklerde Dicer immunoreaktivitesinin proliferasyon döneminde özellikle luminal ve bez epitelinde kuvvetli pozitif (+++) gözlenir iken, stromada Dicer boyanması orta şiddette (++) idi (Resim 25). HSCORE analizi değerlendirilmesi sonucunda Dicer immunoreaktivitesinin sırasıyla luminal epitelde  $354.44 \pm 153.75$ , bez epitelinde  $401.63 \pm 50.60$ , stromada  $112.77 \pm 90.42$  olduğu saptandı (Tablo 19). Dicer immunoreaktivitesinin infertil grupta erken sekresyon döneminde luminal epitelde yer yer orta şiddete (++) ama genel olarak zayıf şiddette (+) boyanma gözlenir iken (Resim 27 A-B), bez epiteli ve stromada boyanmanın zayıf şiddette (+) olduğu izlendi (Resim 27 C-F). Bu döneme ait HSCORE analizi ise sırasıyla luminal epitelde  $98.24 \pm 83.31$ , bez epitelinde  $148.03 \pm 99.12$  ve stromada  $50.15 \pm 32.48$  idi (Tablo 19).

Fertil grup proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde Dicer immunoreaktivitesi HSCORE analizleri karşılaştırıldığında hem luminal hem bez epiteli hem de stroma için istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ( $P > 0,05$ ). İnfertil grup proliferasyon ve erken sekresyon dönemleri karşılaştırıldığında ise, Dicer immunoreaktivitesi fertil gruptakinin aksine luminal ve bez epitelinde istatistiksel olarak anlamlı ( $P < 0,001$ ) iken, stromadaki boyanmanın anlamlı olmadığı belirlendi ( $P > 0,05$ ). Fertil ve infertil grup proliferasyon grupları karşılaştırıldığında



ise Dicer immunoreaktivitesinin hem luminal hem bez epiteli hem de stromada istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $P<0,001$ ). Fertil ve infertil grup erken sekresyon dönemleri karşılaştırıldığında ise, Dicer immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelleri ve stroma için anlamlı olduğu saptandı ( $P<0,001$ ).



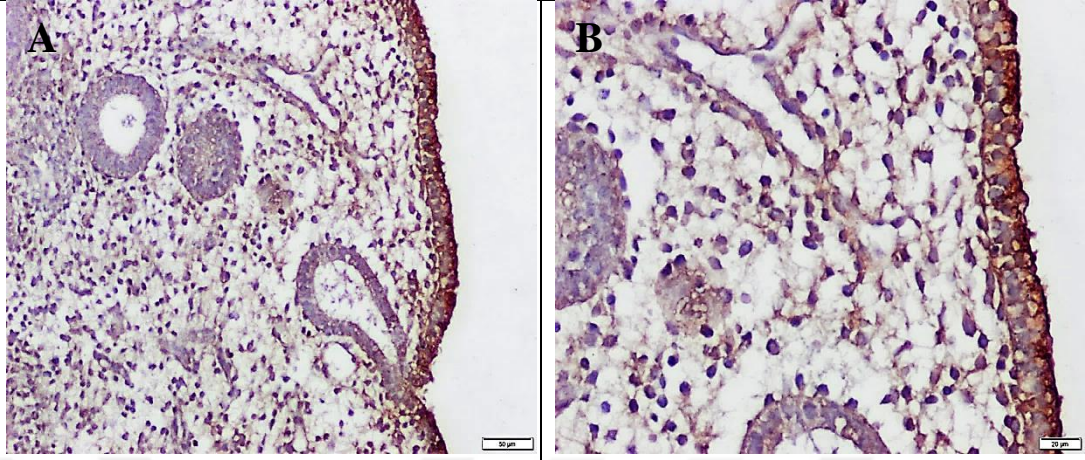


**Resim 24:** Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki Dicer immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.

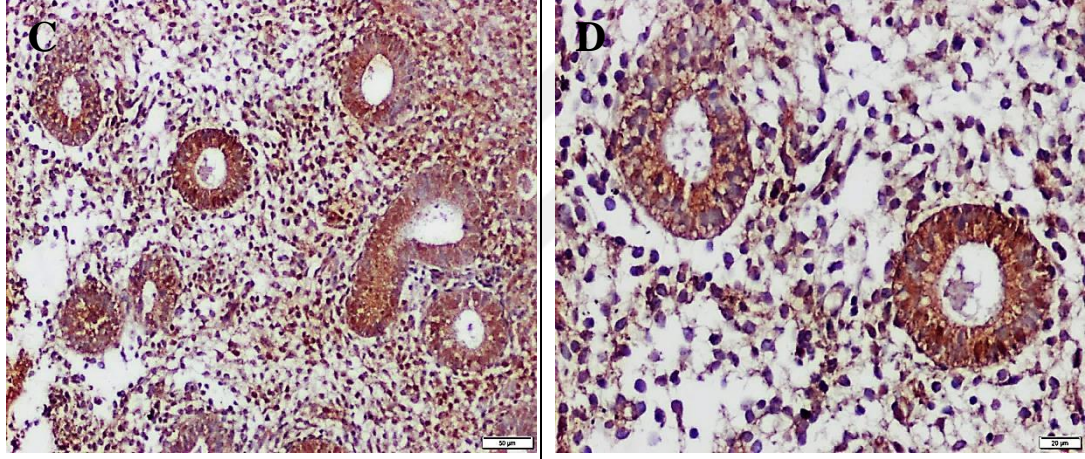


## İNFERTİL PROLİFERASYON (DICER)

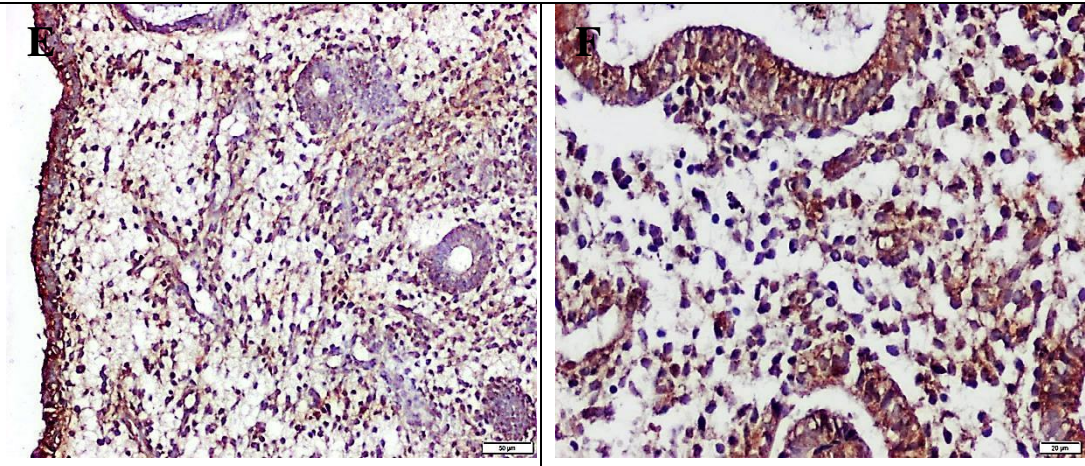
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli

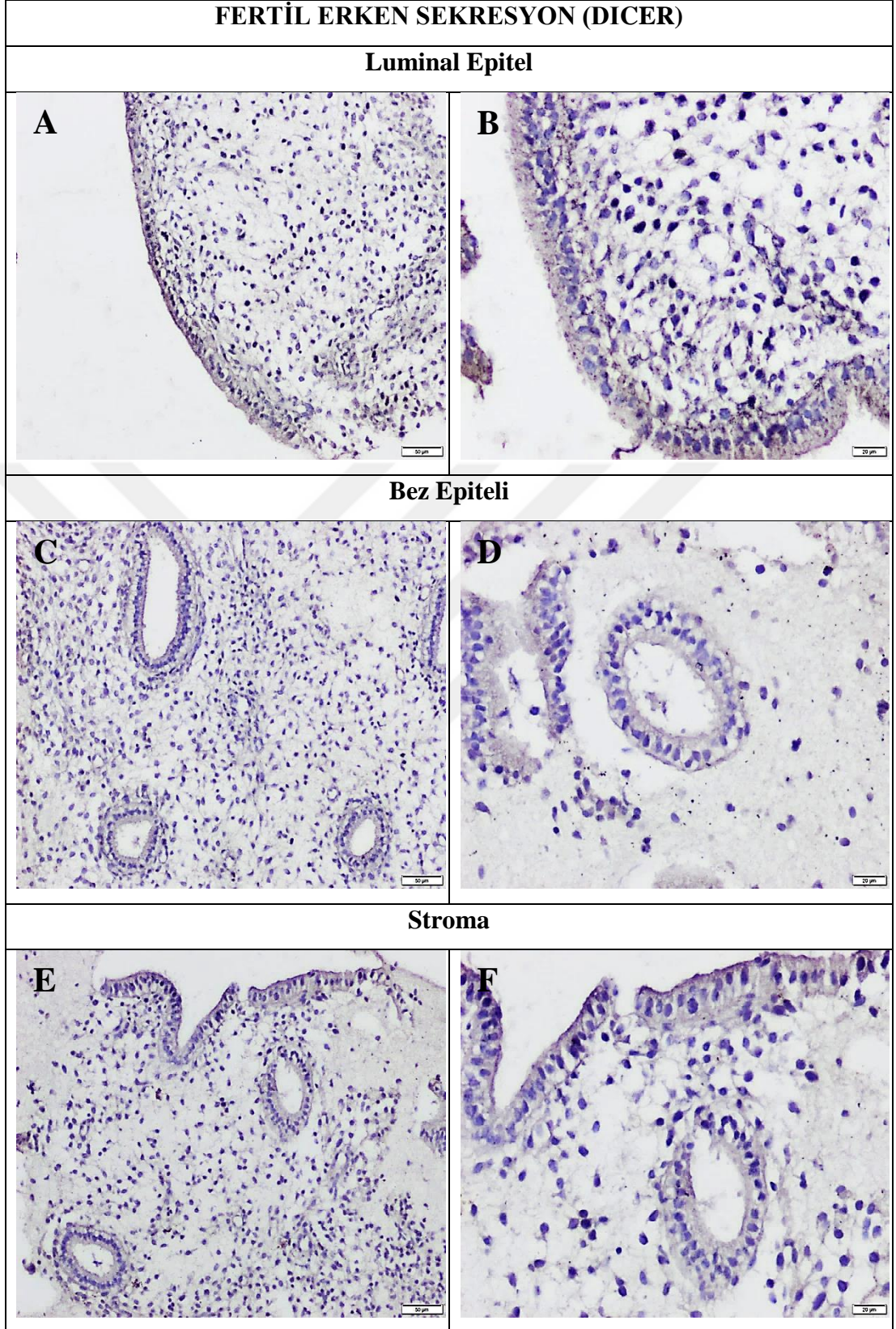


### Stroma



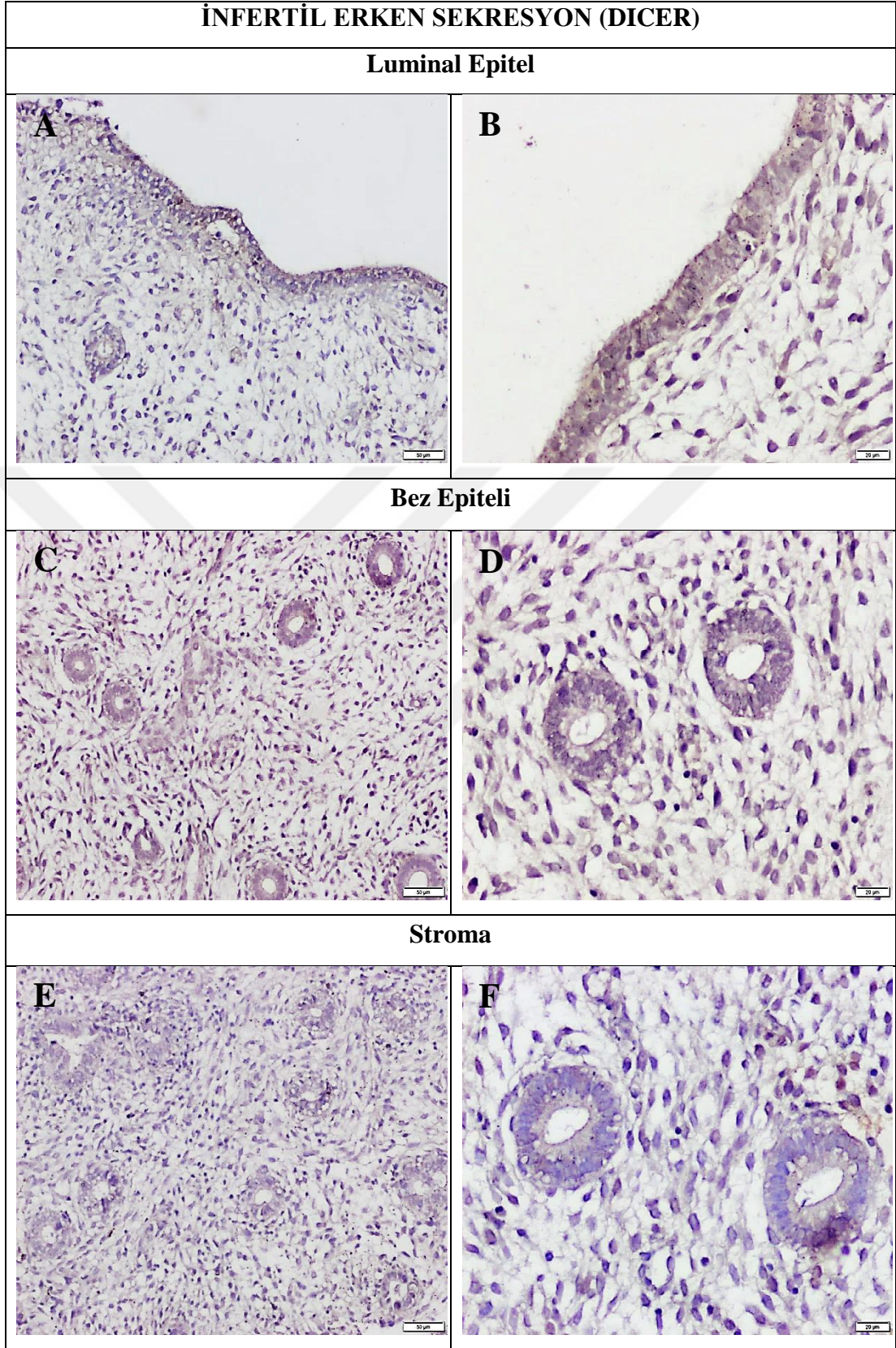
**Resim 25:** İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki Dicer immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.





**Resim 26:** Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki Dicer immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50  $\mu$ m; B, D, F: 20  $\mu$ m.





**Resim 27:** İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki Dicer immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.

### 6.2.2. Drosha İmmunoreaktivitesi

Fertil grup hastaların proliferasyon dönemine ait örneklerinde Drosha immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelleri ile stromada negatif (-) olduğu (Resim 28 A-D), erken sekresyon döneminde Drosha immunoreaktivitesinin sadece luminal epitelde olduğu ve zayıf şiddette (+) boyanma gözleendiği, bez epiteli ve stromada boyanmanın gözlenmediği görüldü (Resim 30). Bu döneme ait yapılan HSCORE analizi sonucunda Drosha boyanmasının fertil erken sekresyon luminal epiteline ait boyanmada  $128.53 \pm 41.57$  olduğu saptandı (Tablo 19).

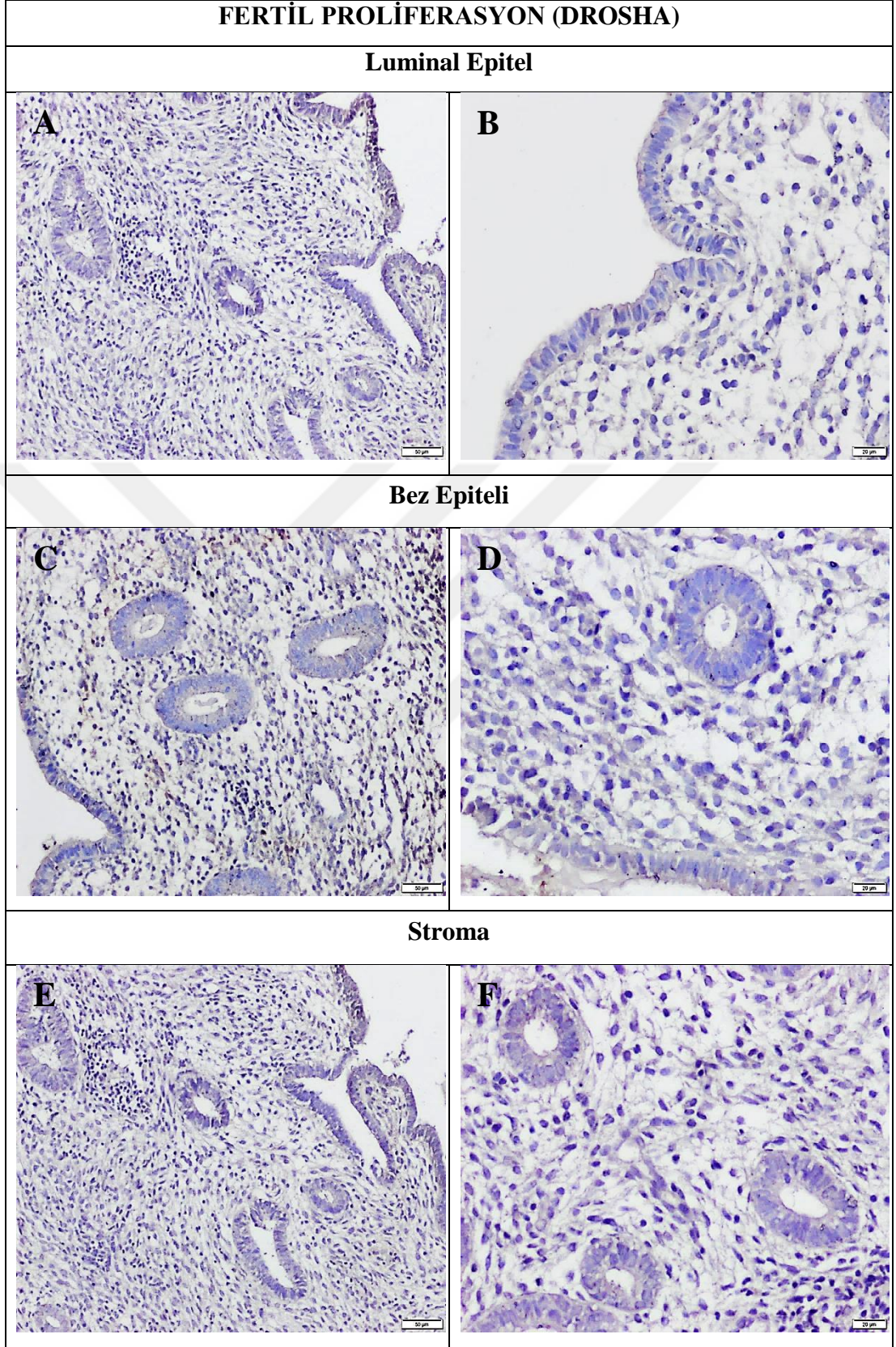
İnfertil gruba ait örneklerde Drosha immunoreaktivitesinin proliferasyon döneminde, luminal epitelde orta şiddete (++), bez epitelinde yer yer orta şiddette (++) genellikle zayıf şiddette (+) boyanma gözlenirken, immunoreaktivitenin stromada ise zayıf şiddette (+) pozitif olduğu gözleendi (Resim 29). İmmunoreaktivitelerin infertil proliferasyon HSCORE değerlerinin sırasıyla luminal epitelde  $251.29 \pm 94.31$ , bez epitelinde  $147.05 \pm 91.64$  ve stromada  $67.96 \pm 25.01$  olduğu saptandı (Tablo 19). İnfertil grup erken sekresyon dönemine ait örneklerde ise, Drosha immunoreaktivitesinin luminal epitelde yer yer orta şiddette (++), genellikle zayıf şiddette (+), bez epitelinde zayıf şiddette (+), stromada ise nadiren zayıf şiddette (+) iken genel olarak negatif olduğu (-) gözleendi (Resim 31). HSCORE analizleri sonucunda ise, erken sekresyon döneminde luminal epitelde  $128.94 \pm 75.87$ , bez epitelinde  $90.01 \pm 64.92$  ve stromada ise  $81.29 \pm 49.91$  olduğu saptandı (Tablo 19).

Fertil ve infertil grup proliferasyon dönemlerine ait örneklerde Drosha immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında infertil grupta hem luminal hem bez epitellerinde hem de stromada boyanmanın fertil gruba oranla daha fazla olduğu, istatistiksel olarak bu farkın luminal ve bez epitelleri için anlamlı ( $P < 0,001$ ) olduğu ancak stroma için anlamlı olmadığı saptandı ( $P > 0,05$ ). Fertil grupta erken sekresyon dönemindeki Drosha boyanmasının sadece luminal epitelde olduğu, infertil grupta ise her üç bölgede (luminal epitel, bez epiteli ve stroma) boyanmanın gözleendiği ve infertil gruptaki boyanmaların fertil gruba oranla daha fazla olduğu saptandı. Bu farklılık istatistiksel olarak bez epiteli ve stroma için anlamlı ( $P < 0,001$ ) iken, luminal epitel için anlamlı olmadığı saptandı ( $P > 0,05$ ). Fertil grupta proliferasyon ve erken sekresyon dönemleri karşılaştırıldığında boyanmanın sadece erken sekresyon döneminde luminal epitelde olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $P < 0,01$ ). İnfertil grup proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerindeki boyanmalar

karşılaştırıldığında ise, luminal ( $P<0,001$ ) ve bez ( $P<0,05$ ) epitelleri için anlamlı iken, stroma için anlamlı olmadığı belirlendi ( $P>0,05$ ).





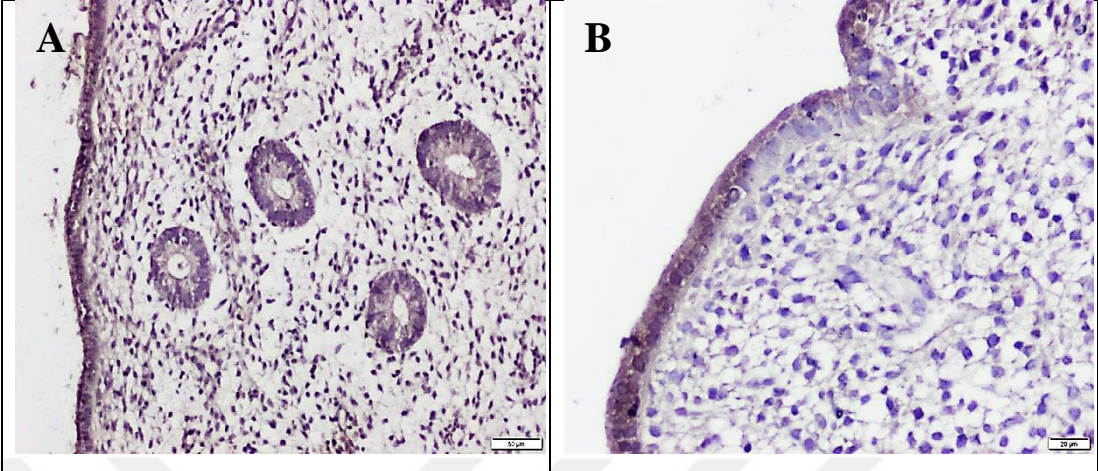


**Resim 28:** Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki Drosha immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.

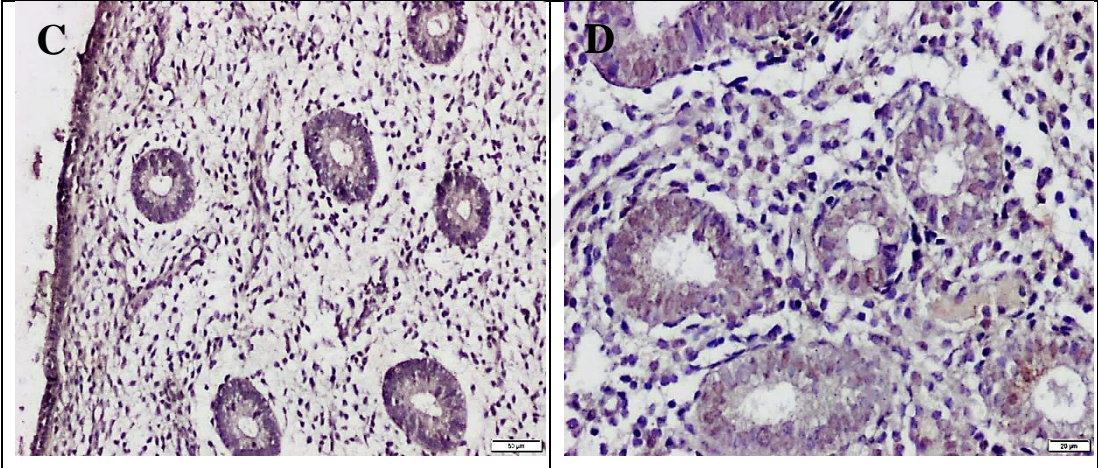


## İNFERTİL PROLİFERASYON (DROSHA)

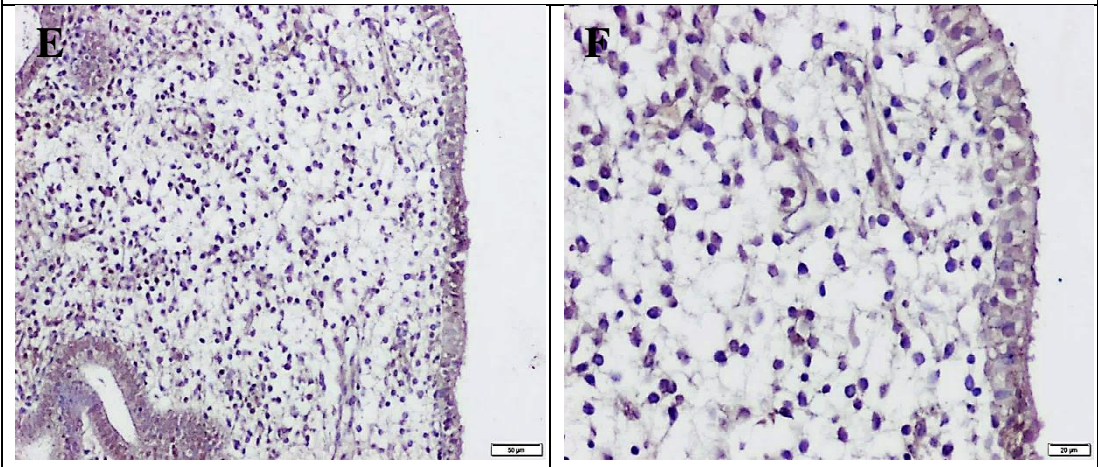
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli

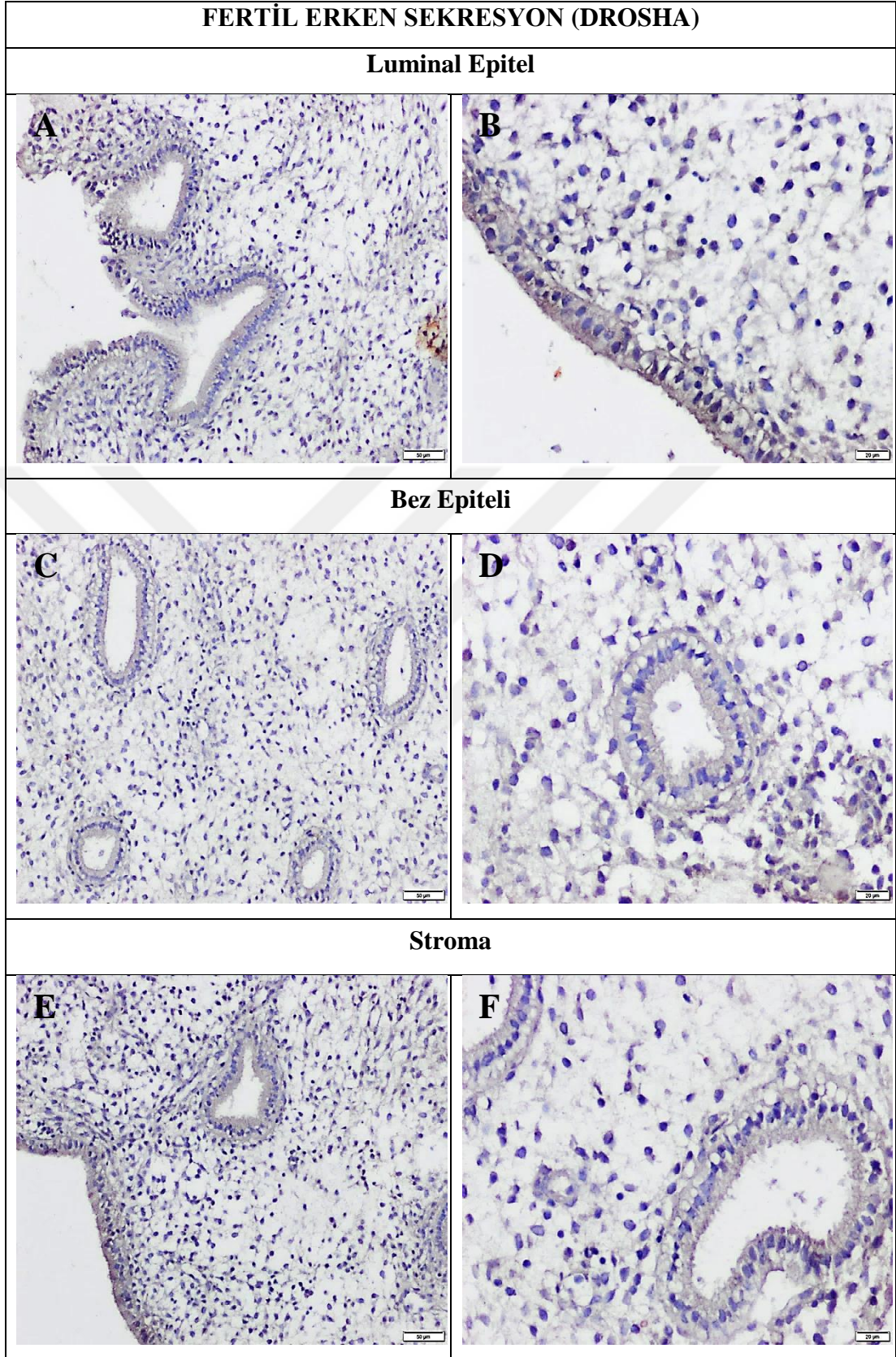


### Stroma



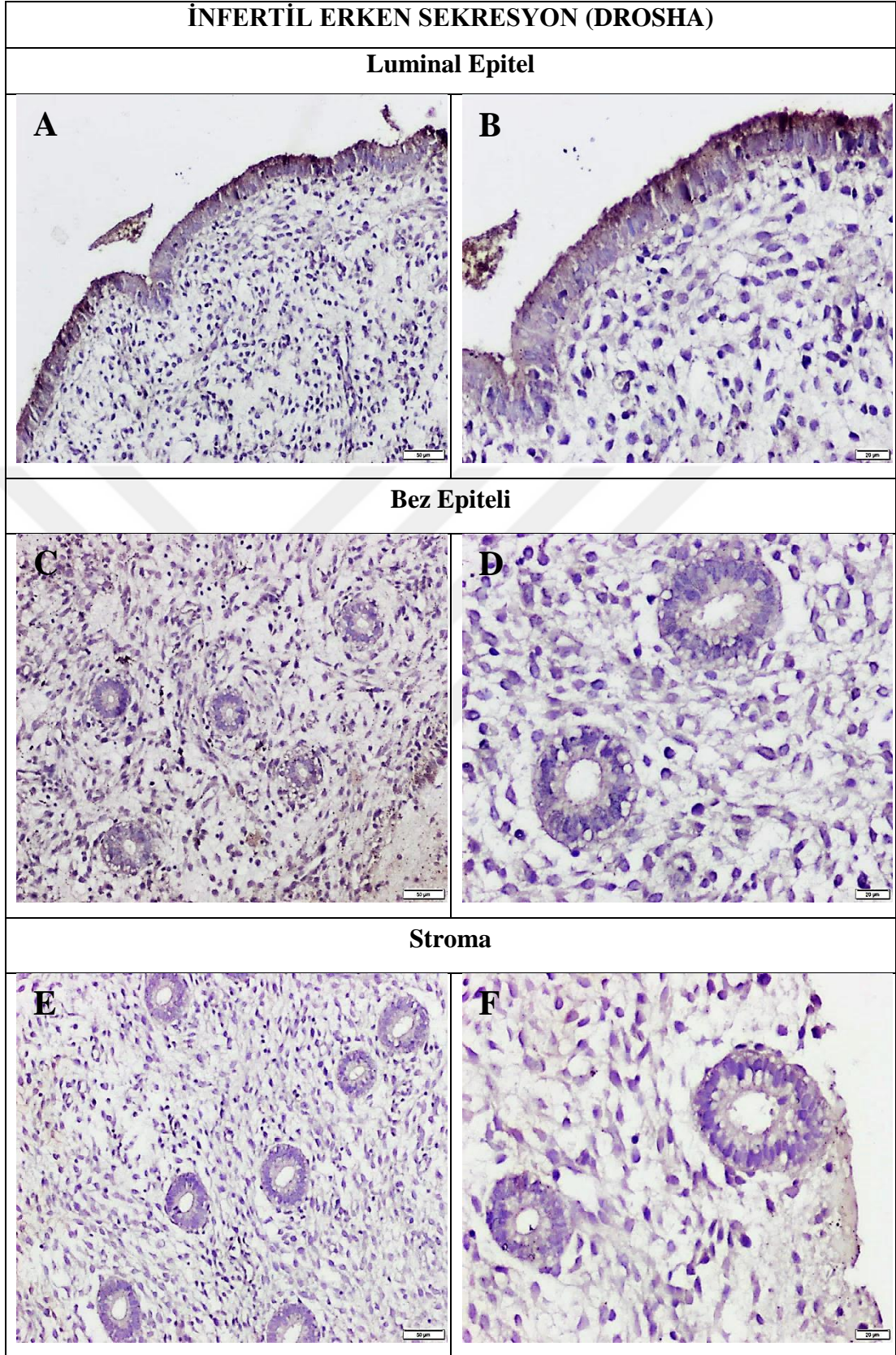
**Resim 29:** İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki Drosha immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.





**Resim 30:** Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki Drosha immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.





**Resim 31:** İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki Drosha immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.

### 6.2.3. eIF2 $\alpha$ İmmunoreaktivitesi

Fertil grup hastaların proliferasyon döneminde eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin, özellikle stromada kuvvetli pozitif (+++) iken, luminal ve bez epitellerinde zayıf şiddette pozitif (+) olduğu gözlemlendi (Resim 32). Fertil grupta proliferasyon dönemine ait eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin HSCORE değerleri ise sırasıyla luminal epitelde 40.07 $\pm$ 24.60, bez epitelinde 57.37 $\pm$ 35.07 ve stromada 386.14 $\pm$ 112.28 olarak saptandı (Tablo 19). Fertil grubun erken sekresyon döneminde eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin, hem luminal ve bez epitellerinde hem de stromada orta şiddette pozitif (++) olduğu gözlemlendi (Resim 34). Fertil grup erken sekresyon dönemindeki eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin HSCORE analizi sonrasında ise, luminal epitelde 100.77 $\pm$ 76.92, bez epitelinde 65.53 $\pm$ 26.32 ve stromada 37.13 $\pm$ 2.82 olduğu görüldü (Tablo 19).

İnfertil gruba ait proliferasyon döneminde eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin, luminal epitelde zayıf şiddette (+) ve stroma kuvvetli şiddette pozitif (+++) iken, bez epitelinde boyanmanın negatif (-) olduğu görüldü (Resim 33). Proliferasyon dönemine ait örneklerin HSCORE analizi sonucunda ise luminal epitelde 101.83 $\pm$ 78.73 ve stromada 326.34 $\pm$ 144.74 olduğu hesaplandı (Tablo 19). İnfertil grup erken sekresyon döneminde eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin, stromada kuvvetli pozitif (+++) iken, luminal ve bez epitellerinde zayıf şiddette pozitif (+) olarak gözlemlendi (Resim 35). eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin HSCORE değerlendirilmesi sonucunda luminal epitelde 96.63 $\pm$ 57.42, bez epitelinde 111.68 $\pm$ 59.59 ve stromada 261.46 $\pm$ 128.99 olduğu saptandı (Tablo 19).

Fertil grupta eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin proliferasyon dönemine göre luminal ve bez epitellerinde erken sekresyon döneminde arttığı, stromadaki boyanmanın ise erken sekresyon döneminde azaldığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin HSCORE değerleri karşılaştırıldığında ise luminal epitelde anlamlı olmadığı (P>0,05), bez epitelinde (P<0,05) ve stromada (P<0,001) anlamlı olduğu saptandı. İnfertil grup proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerindeki eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında, luminal epitel ve stromadaki dağılımlar benzer iken, bez epitelinde erken sekresyon döneminde eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin artmış olduğu görüldü. eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin infertil grupta proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait dağılımları

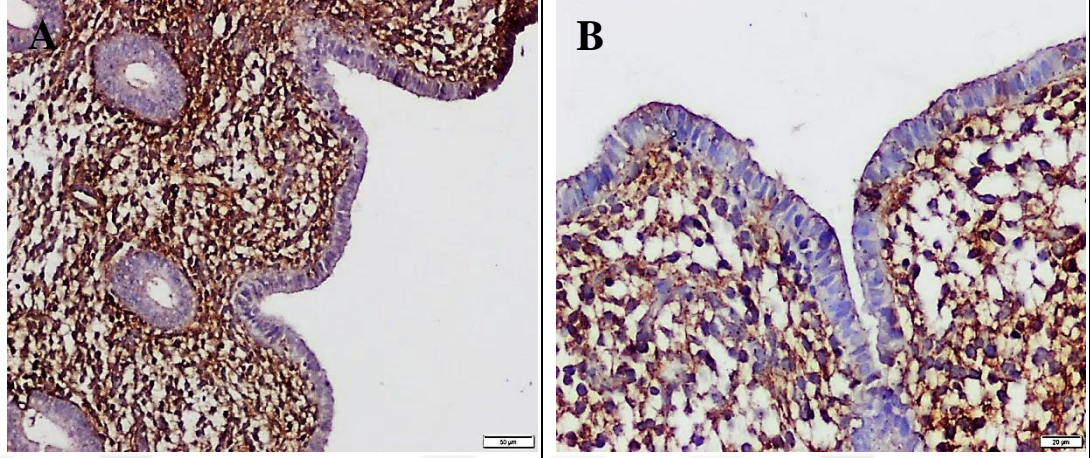
karşılaştırıldığında luminal epitel ve stroma için anlamlı olmadığı ( $P>0,05$ ), bez epiteli için ise anlamlı olduğu saptandı ( $P<0,001$ ).

Fertil ve infertil gruplardaki eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesi proliferasyon dönemindeki dağılımları karşılaştırıldığında, luminal epitel ile stromadaki boyanmaların benzer olduğu, bez epitelinde ise eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin infertil grupta fertil gruba oranla daha az olduğu ve boyanmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ( $P>0,05$ ). Fertil ve infertil gruplardaki eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesi erken sekresyon dönemindeki dağılımları karşılaştırıldığında ise fertil grupta luminal ve bez epitelindeki boyanmanın infertil gruba oranla daha fazla olduğu, ancak bu boyanmanın HSCORE değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı olmadığı saptandı ( $P>0,05$ ). Stromadaki eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin ise infertil grupta fertil gruba oranla daha fazla olduğu ve HSCORE karşılaştırmalarının ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $P<0,001$ ).

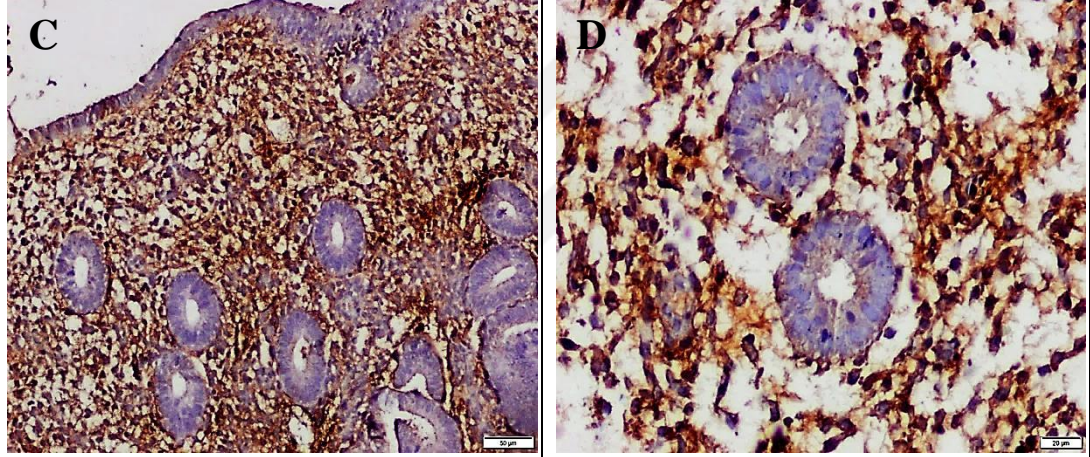


## FERTİL PROLİFERASYON (eIF2 $\alpha$ )

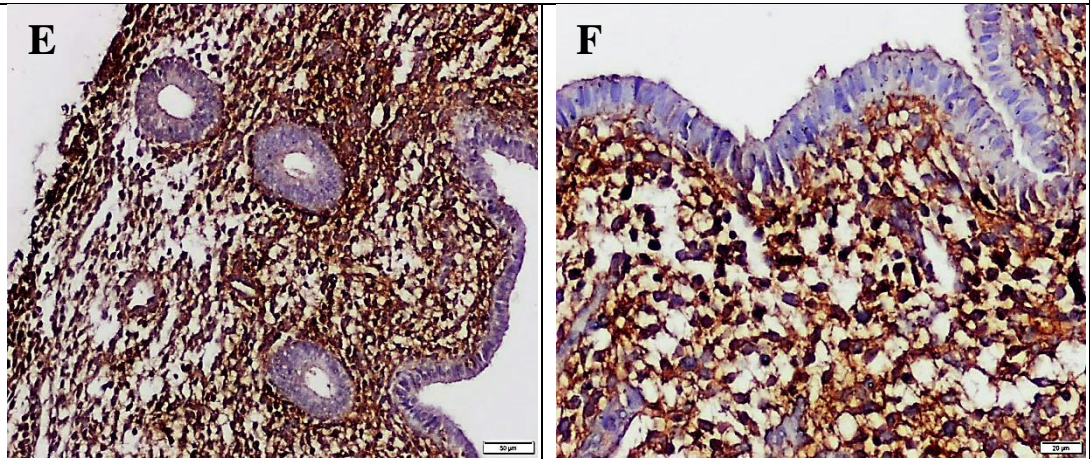
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli



### Stroma

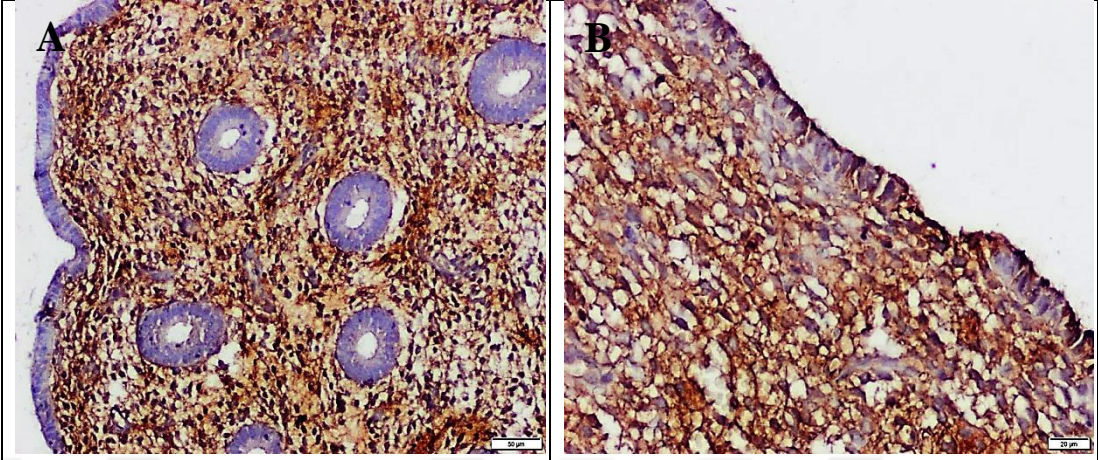


**Resim 32:** Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50  $\mu$ m; B, D, F: 20  $\mu$ m.

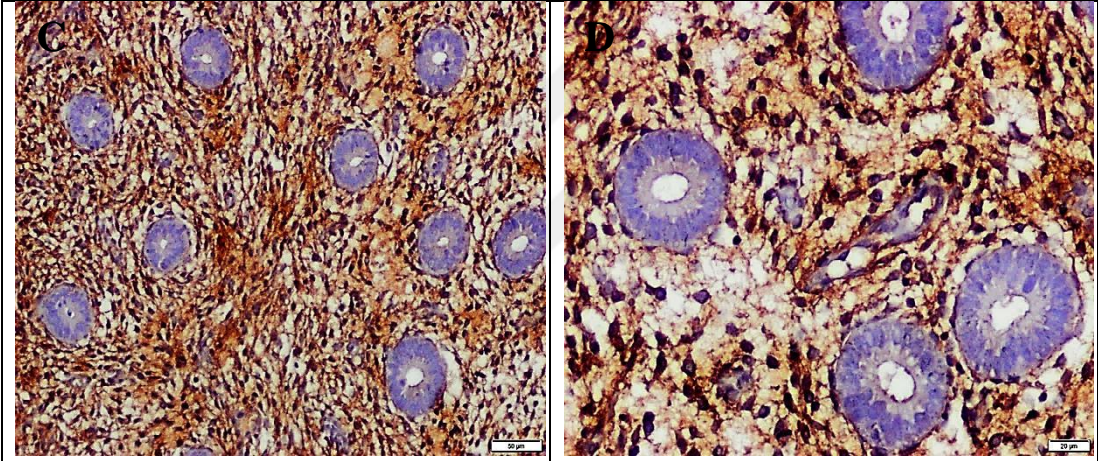


## İNFERTİL PROLİFERASYON (eIF2 $\alpha$ )

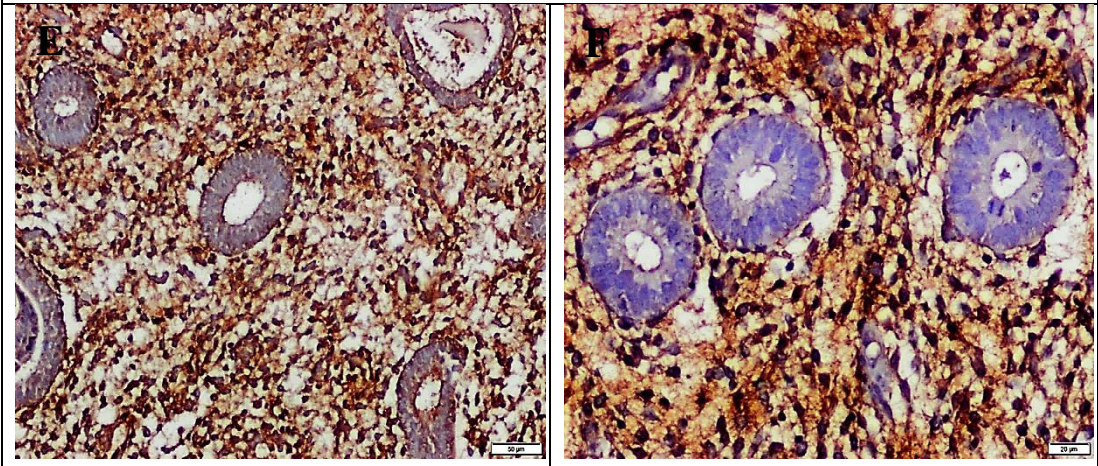
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli



### Stroma

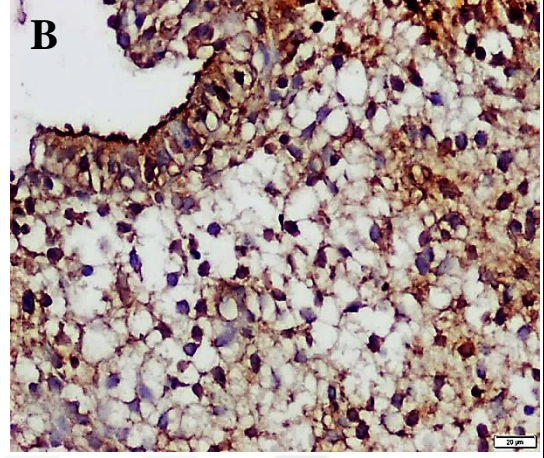
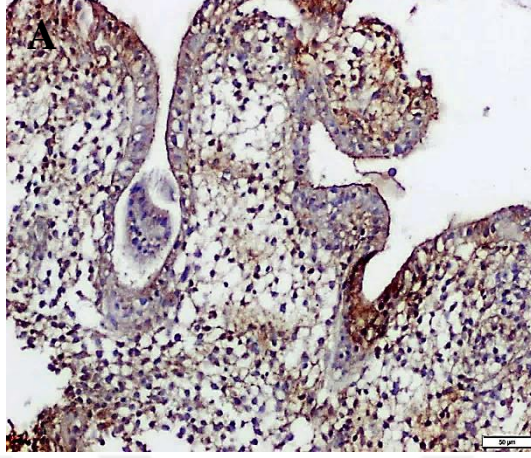


**Resim 33:** İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50  $\mu$ m; B, D, F: 20  $\mu$ m.

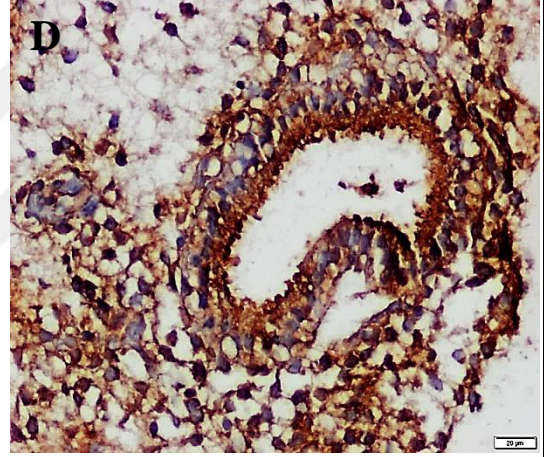
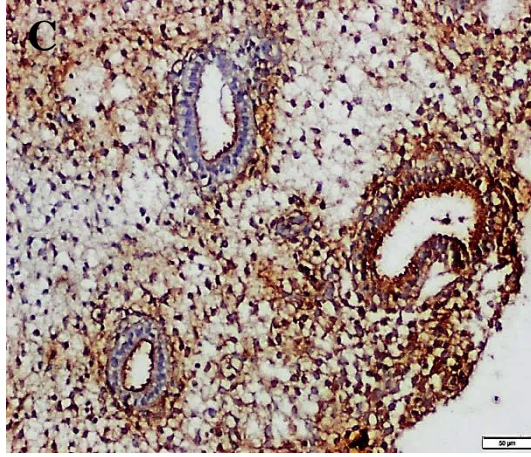


## FERTİL ERKEN SEKRESYON (eIF2 $\alpha$ )

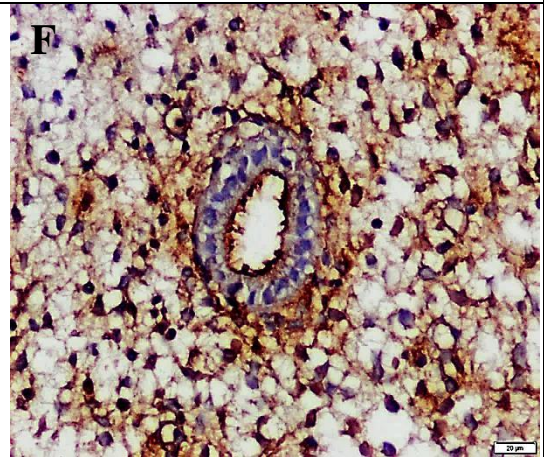
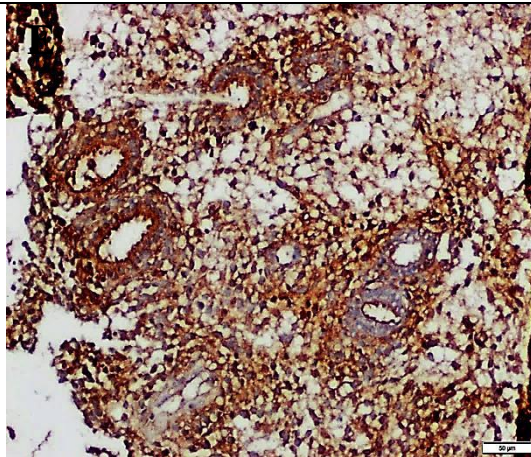
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli



### Stroma

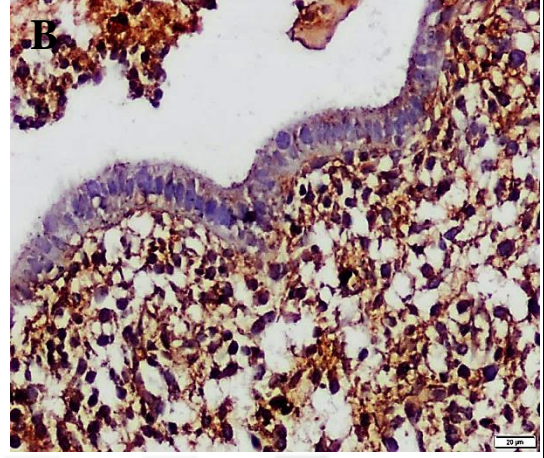
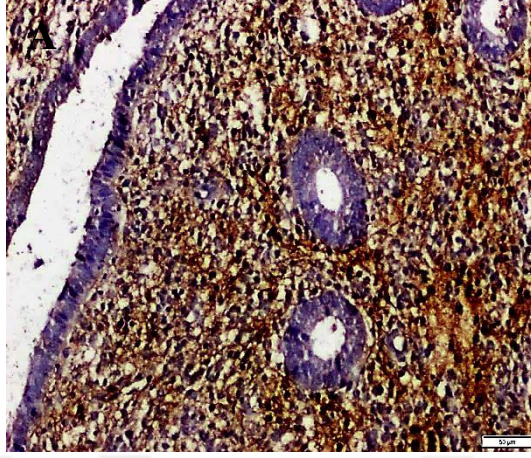


**Resim 34:** Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50  $\mu$ m; B, D, F: 20  $\mu$ m.

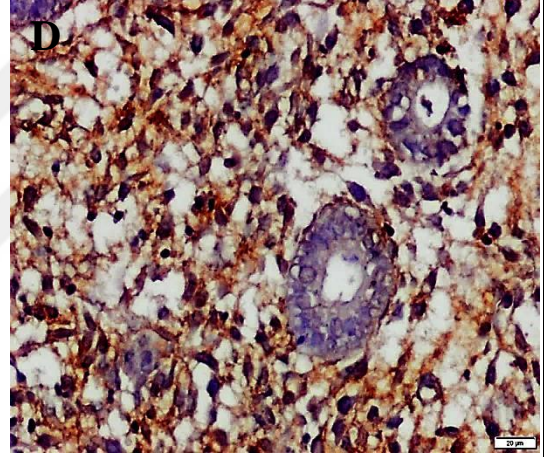
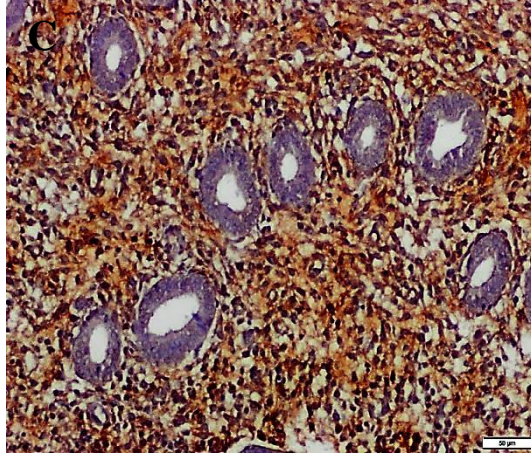


## İNFERTİL ERKEN SEKRESYON (eIF2 $\alpha$ )

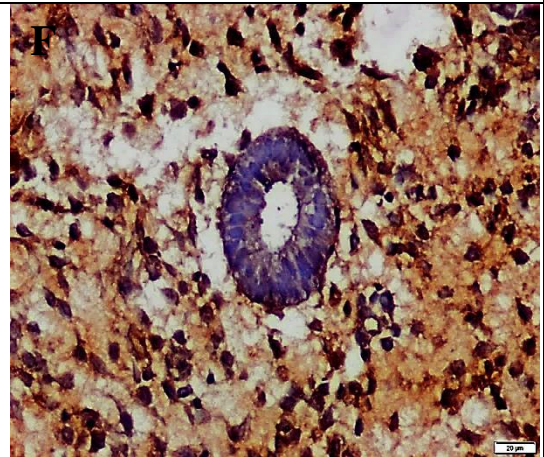
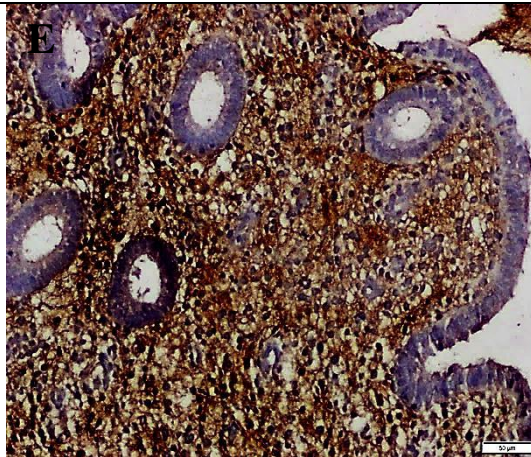
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli



### Stroma



**Resim 35:** İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki eIF2 $\alpha$  immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50  $\mu$ m; B, D, F: 20  $\mu$ m.

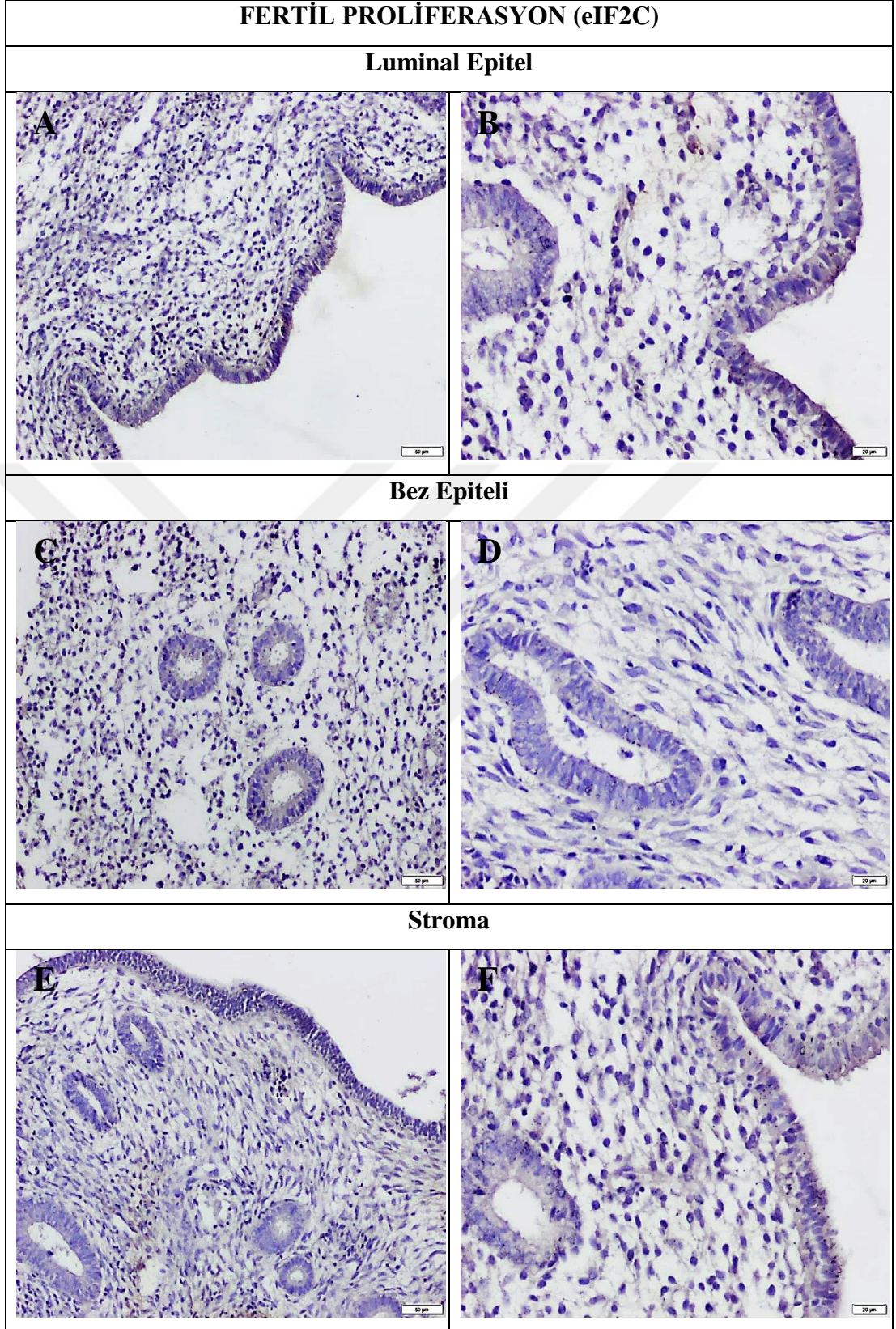
#### **6.2.4. eIF2C İmmunoreaktivitesi**

Fertil ve infertil gruplara ait alınan hasta örneklerinin incelenmesi sonucunda, eIF2C immunoreaktivitesinin hem fertil (Resim 36, Resim 38) hem de infertil (Resim 37, Resim 39) gruplara ait örneklerde proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde, luminal ve bez epitelleri ile stromada da negatif olduğu saptandı.

Gruplara ait tüm immunohistokimyasal yoğunluklar Tablo 18’de, HSCORE analiz sonuçları Tablo 19’da ve Şekil 33’de verilmiştir.

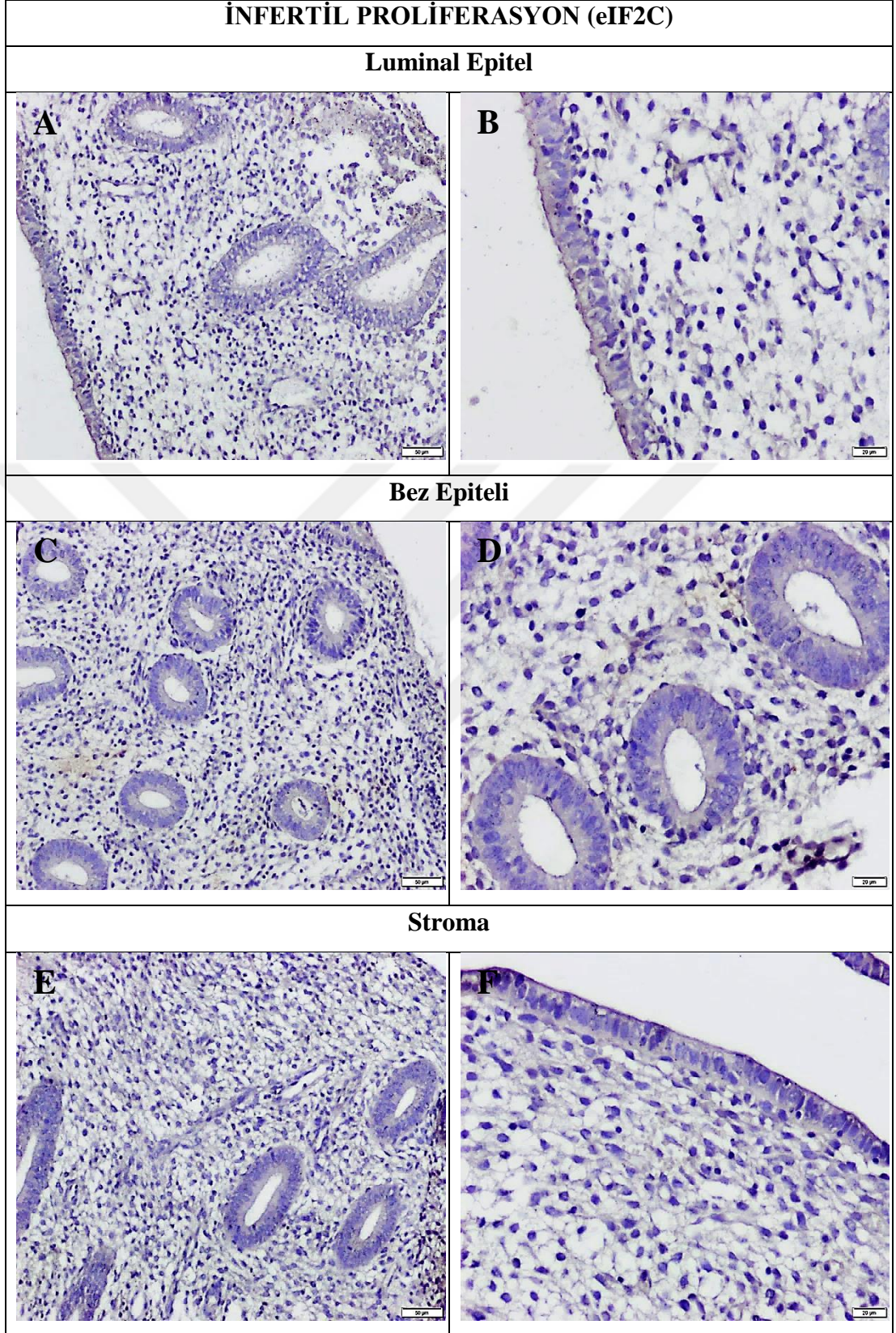






**Resim 36:** Fertil gruba ait proliferasyon dönemindeki eIF2C immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.



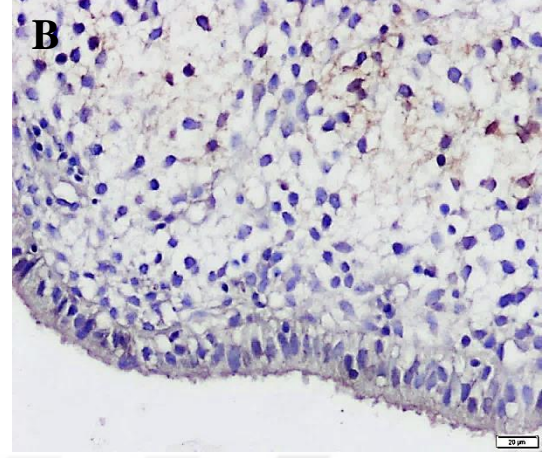
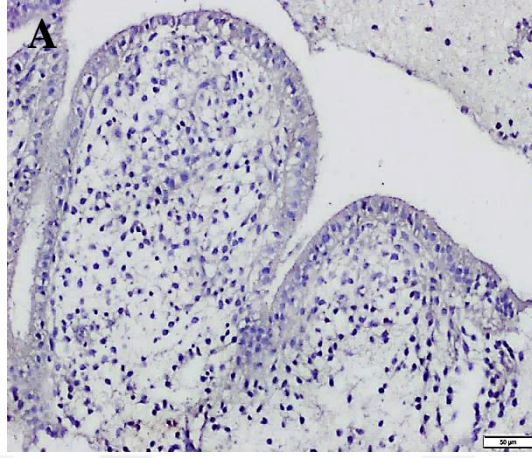


**Resim 37:** İnfertil gruba ait proliferasyon dönemindeki eIF2C immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50  $\mu$ m; B, D, F: 20  $\mu$ m.

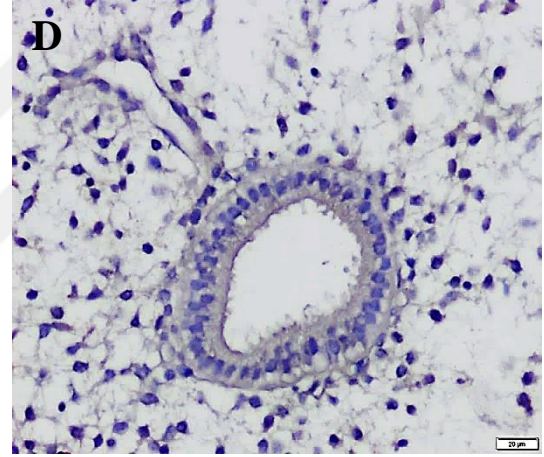
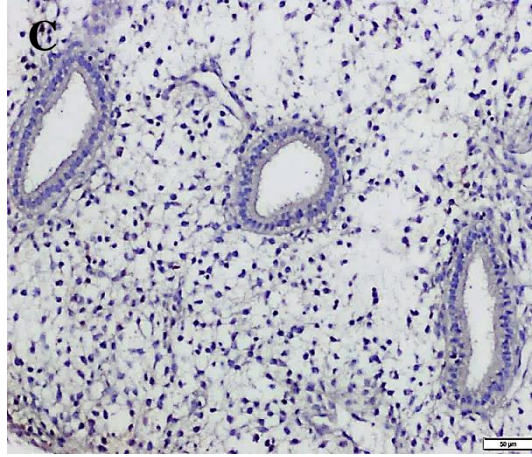


## FERTİL ERKEN SEKRESYON (eIF2C)

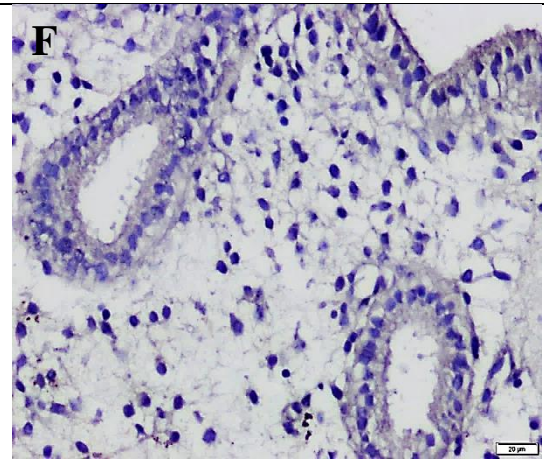
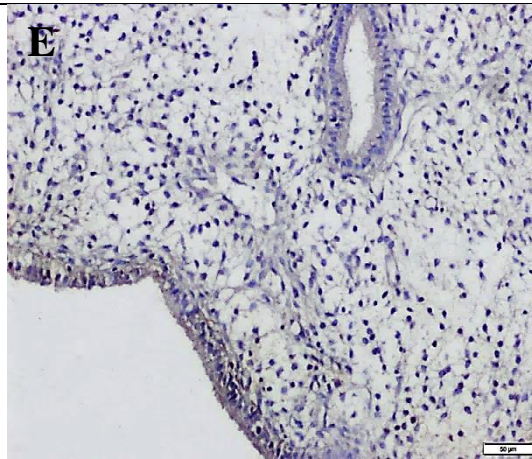
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli



### Stroma

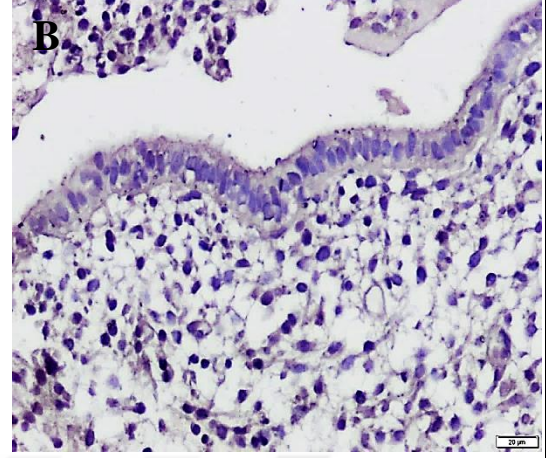
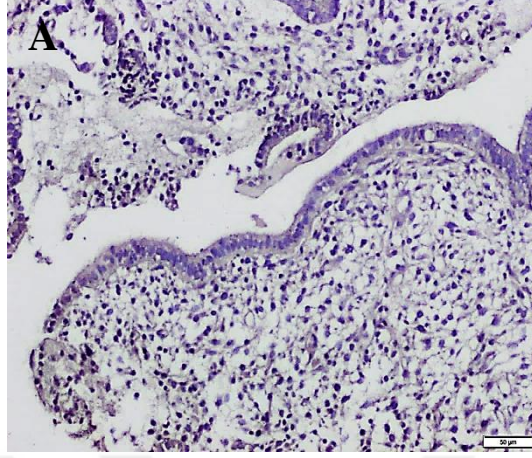


**Resim 38:** Fertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki eIF2C immunreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.

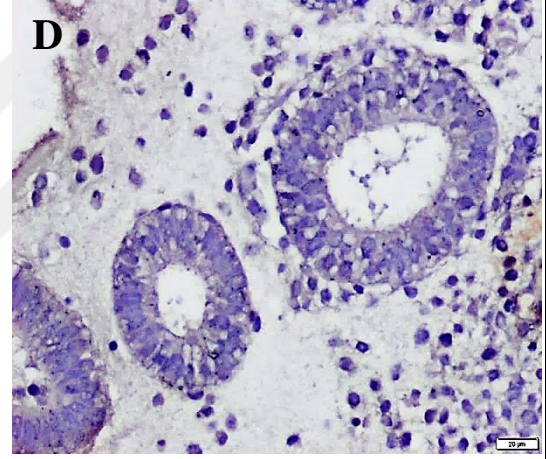
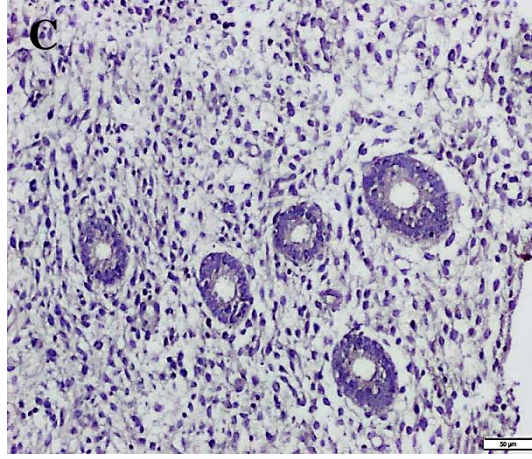


## İNFERTİL ERKEN SEKRESYON (eIF2C)

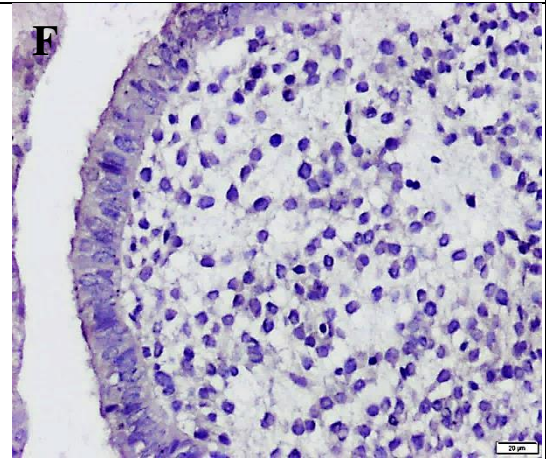
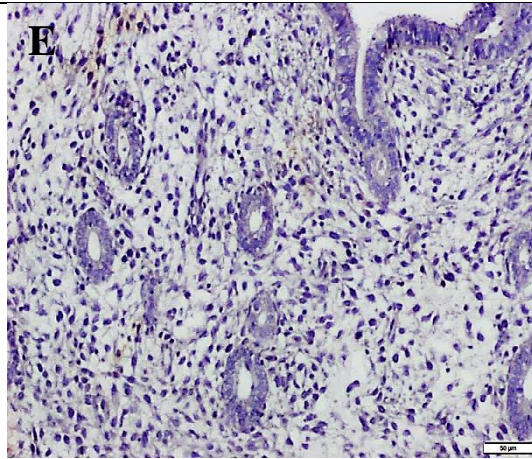
### Luminal Epitel



### Bez Epiteli



### Stroma



**Resim 39:** İnfertil gruba ait erken sekresyon dönemindeki eIF2C immunoreaktivitesinin luminal epitel (A-B), bez epiteli (C-D) ve stromadaki (E-F) dağılımları. Scale Bar: A, C, E: 50 µm; B, D, F: 20 µm.

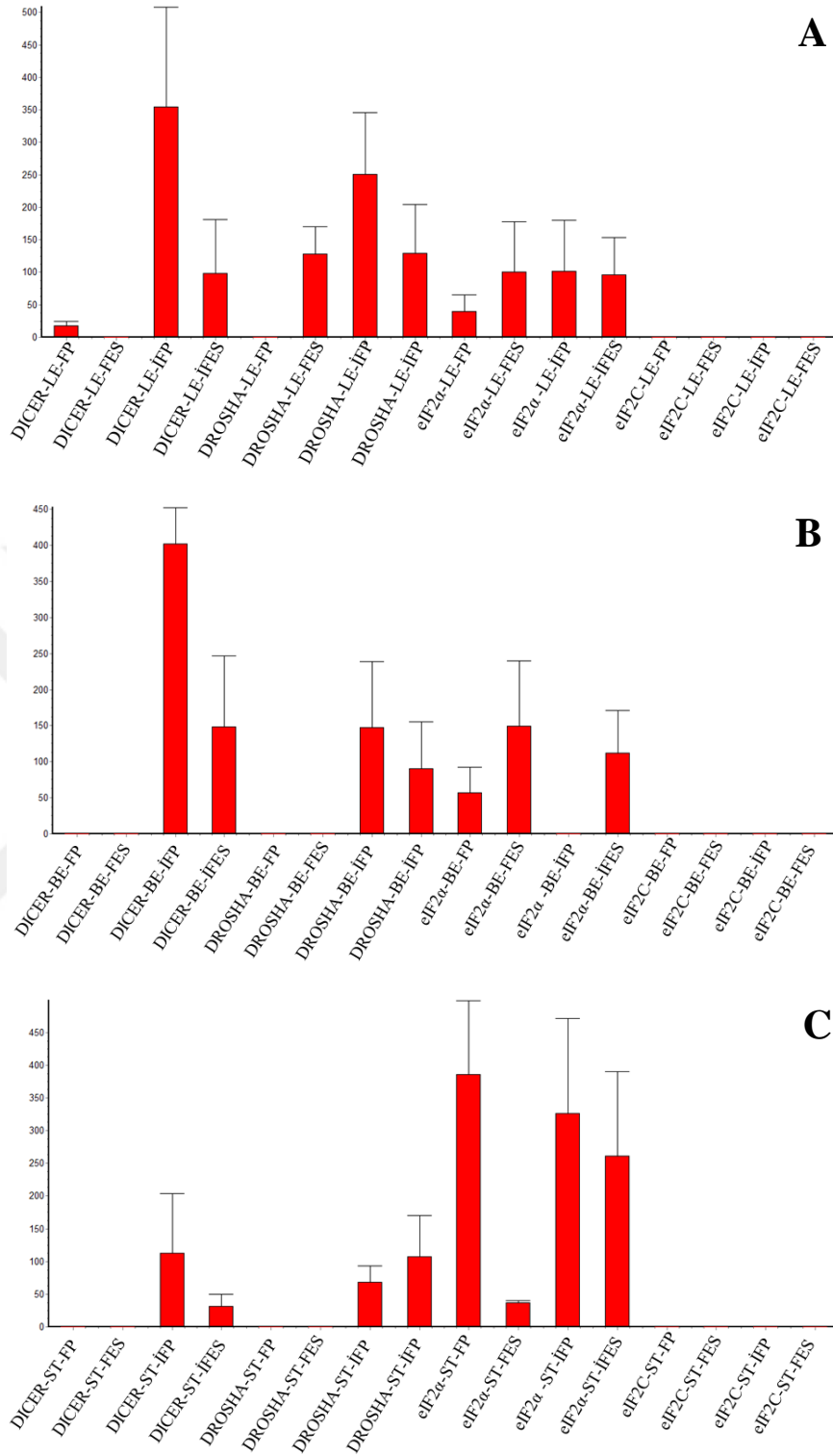
**Tablo 18:** Fertil ve infertil olgulardan proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinden alınan örneklerde Dicer, Drosha, eIF2 $\alpha$  ve eIF2C (AGO-1) immunohistokimyasal yoğunluklarının dağılımları.

	FERTİL						İNFERTİL					
	PROLİFERASYON			ERKEN SEKRESYON			PROLİFERASYON			ERKEN SEKRESYON		
	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma
<b>Dicer</b>	- yer yer +	-	-	-	-	-	+++	+++	++	+ yer yer ++	+	+
<b>Drosha</b>	-	-	-	+	-	-	++	+ yer yer ++	+	+ yer yer ++	+	- yer yer +
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	+	+	+++	++	++	++	+	-	+++	+	+	+++
<b>eIF2C (Ago-1)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tablo 19:** Fertil ve infertil olgulardan proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinden alınan örneklerde Dicer, Drosha, eIF2 $\alpha$  ve eIF2C (AGO-1) immunohistokimyasal dağılımlarının HSCORE değerleri. \*: Gruplar arası değerlendirme, #: Grup içi değerlendirme \*\*\*, ### (P<0,001), \*\*, ## (P<0,01), \*, # (P<0,05)

	FERTİL						İNFERİL					
	PROLİFERASYON			ERKEN SEKRESYON			PROLİFERASYON			ERKEN SEKRESYON		
	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma
<b>Dicer</b>	17.53 ±						354.44 ±	401.63	112.77	98.24 ±	148.03	50.15 ±
	6.55	0	0	0	0	0	153.75 ±	50.60	± 90.42	83.31 ±	99.12	32.48
	###						***	***, ###	***	***, ###	***, ###	###
<b>Drosha</b>				128.53 ±			251.29 ±	147.05	67.96 ±	128.94 ±	90.01 ±	81.29 ±
	0	0	0	41.57 ##	0	0	94.31 ±	91.64	25.01	75.87	64.92	49.91
							***	***		###	***, #	***
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>			386.14		65.53 ±	293.56			326.34		111.68	261.46
	40.07 ±	57.37 ±	±	100.77 ±	26.32	±	101.83 ±		±	96.63 ±	± 59.59	±
	24.60	35.07	112.28	76.92	*	122.50	78.73	0	±	57.42	###	128.99
			###						144.74			***
<b>eIF2C (Ago-1)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



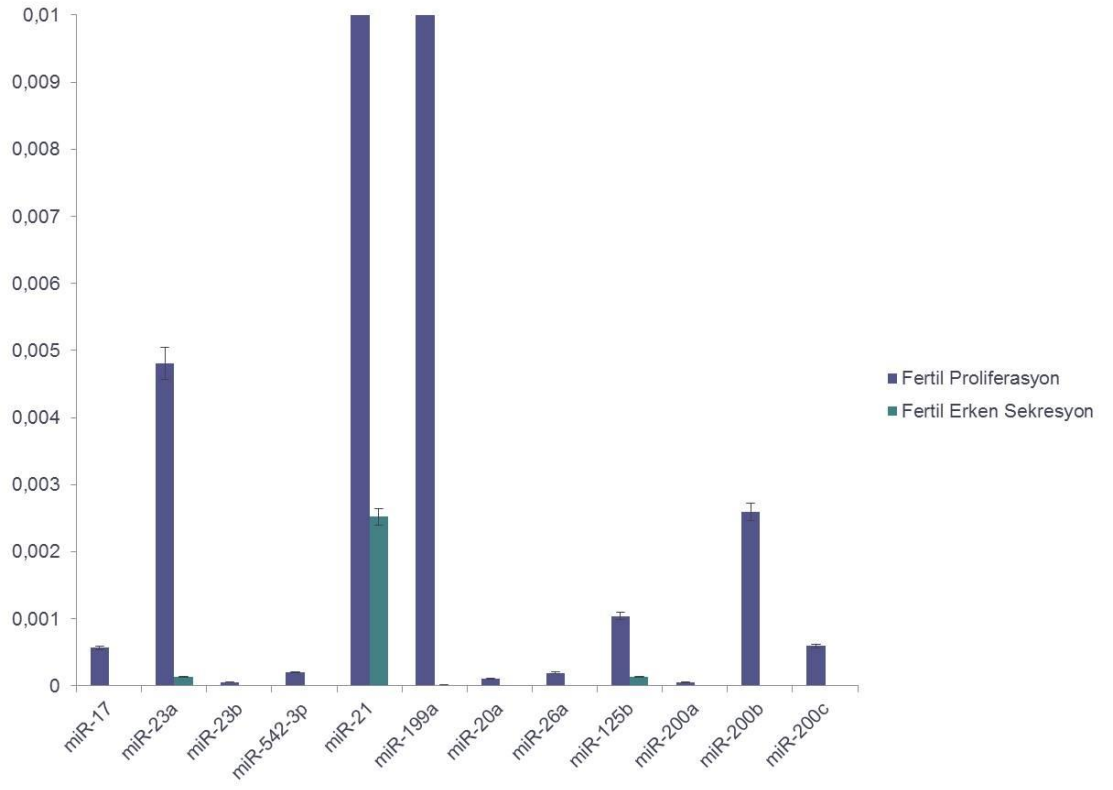


**Şekil 33:** Fertil ve infertil grupların proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait luminal epitel (LE), bez epiteli (BE) ve stromada (ST) Dicer, Drosha, eIF2α ve eIF2C immunoreaktivitelerinin HSCORE analizi ile dağılımları. FP: Fertile Proliferasyon, FES: Fertile Erken Sekresyon, İFP: İnfertil Proliferasyon, İFES: İnfertil Erken Sekresyon.

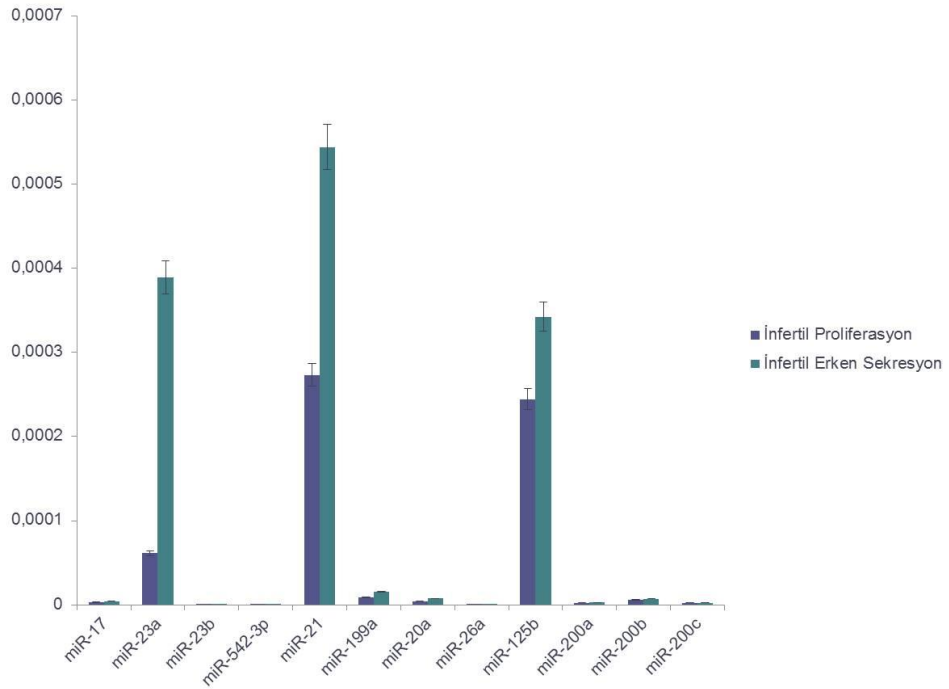
### 6.3. miRNA Analizleri

miRNA analizleri sonucunda, fertil grupta proliferasyon döneminde miR-21, miR-199a\* ve miR-200b ekspresyonu, erken sekresyona oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. Aynı miRNA'ların erken sekresyon döneminde de ekspresyonlarının daha az olduğu izlendi (Şekil 34). Diğer miRNA'ların ekspresyonlarının hem proliferasyon hem de erken sekresyon evrelerinde olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi (Şekil 34). İnfertil grupta ise proliferasyon döneminde miR-21, miR-23a ve miR-125b ekspresyonu erken sekresyona oranla daha az olduğu, bu miRNA'lara ait ekspresyonların istatistiksel olarak anlamlı şekilde erken sekresyonda arttığı saptandı (Şekil 35).

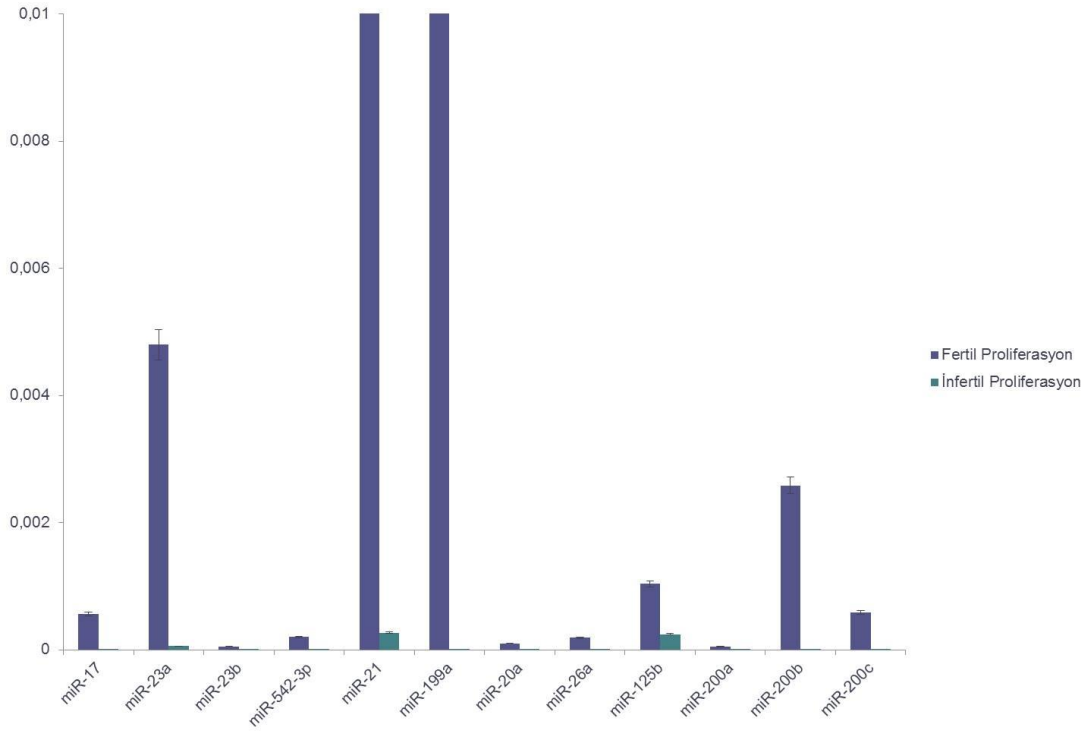
Fertil ve infertil grupların proliferasyon dönemlerinde eksprese olan miRNA karşılaştırılması sonrasında fertil grupta özellikle mi23a, miR-21, miR-199a\* ve miR-200b'nin infertil gruba oranla daha fazla olduğu (Şekil 36), erken sekresyon dönemlerinde ise özellikle miR-23a ve miR-125b'nin infertil grupta istatistiksel olarak anlamlı eksprese olduğu izlendi (Şekil 37). Tüm grupların miRNA ekspresyon verileri Şekil 38'de verilmiştir.



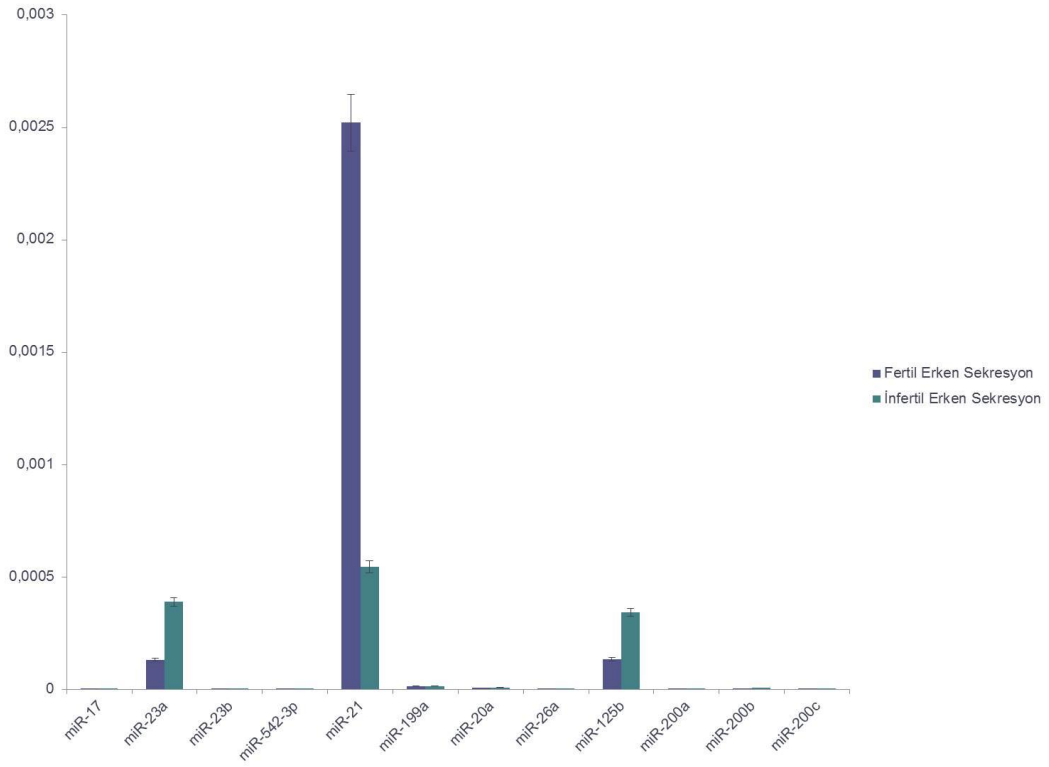
**Şekil 34:** Fertil grupların proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları.



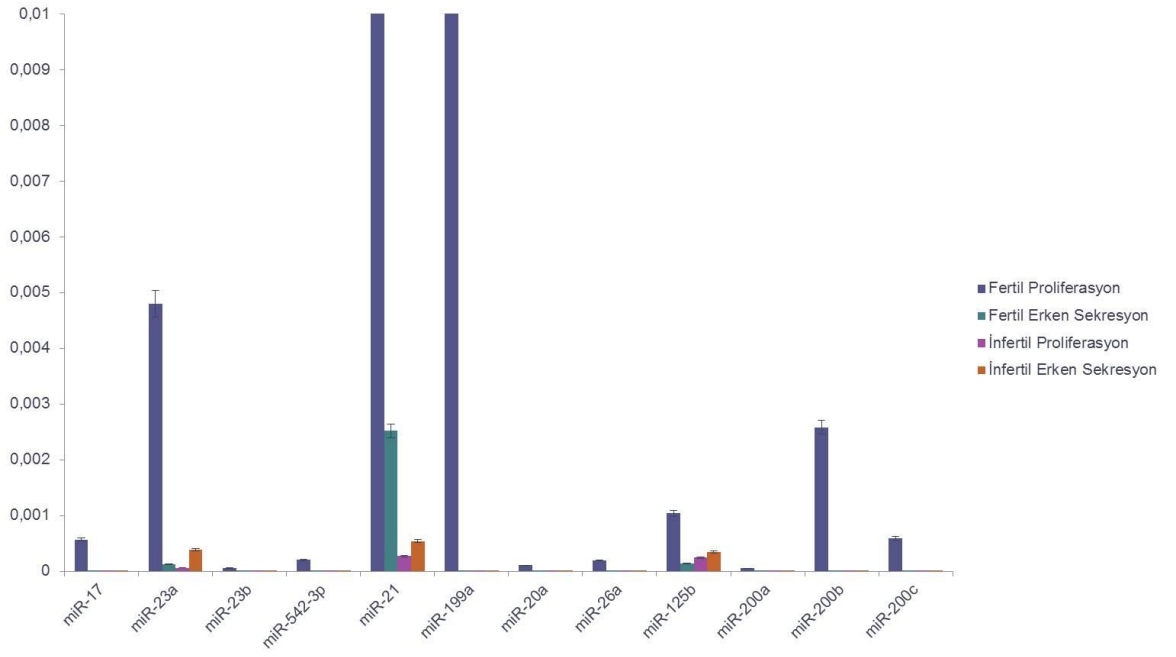
**Şekil 35:** İnfertil grupların proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları.



**Şekil 36:** Fertil ve infertil grupların proliferasyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları.



**Şekil 37:** Fertil ve infertil grupların erken sekresyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları.



**Şekil 38:** Fertil ve infertil grupların proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait miRNA ekspresyonları.



## 7. TARTIŞMA

İmplantasyon reseptif endometriyum ile adhezif embriyo arasındaki kompleks düzenlenim sonrasında gerçekleşir. Özellikle bu ikili arasındaki sürecin implantasyon penceresi adı verilen çok kısa bir zaman diliminde gerçekleşmesi de implantasyonun başarısında bu aşamada salgılanan faktörlerin doğru yerde ve zamanda salgılanması ile doğrudan ilişkilidir (Estella ve ark. 2012). Hem endometriyum hemde embriyo ya (özellikle blastokist aşamasında implante olmaya hazır) ait implantasyon penceresi süresindeki süreçte salgılanan moleküler düzenlenimlere ait birçok veri bulunmasına rağmen, bu mekanizma tam olarak açıklanamamıştır.

miRNA'ların tanımlanması ile birlikte birçok biyolojik süreçle birlikte implantasyon süreci de farklı bir bakış açısı ile aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Olgun miRNA'lar endojenaz kodlanmayan RNA'lar olup insanda 2000'e yakın miRNA tarif edilmiştir. Her bir miRNA yüzlerce genin kontrolünü düzenler. Özellikle hücre farklılaşması, büyümesi, morfogenezi, ölümü ve metabolizmasında rol oynayan birçok genin düzenlenmesinde rol oynarlar (Creighton ve ark. 2010).

miRNA ekspresyonu çekirdek içi ve sitoplazmik kısmı olmak üzere iki ortamdaki kontrol mekanizmaları ile salınmaktadır. Pri-miRNA'nın pre-miRNA olarak oluşumu Drosha tarafından kontrol edilir. Çekirdek içinde gerçekleşen bu aşama sonrasında pre-miRNA exportin 5 ve Ran-GTP aracılığı ile sitoplazmaya salınır ve Dicer tarafından maturasyonu gerçekleşir (Nothnick ve ark. 2010).

Dicer, çift sarmal RNA ve pre-miRNA'yı küçük interfering RNA ve miRNA'lara ayırır. Ayrıca Dicer RISC'in aktivasyonunu da kolaylaştırır. RISC ise RNA interferans için temeldir ve Argonuate bileşenine sahiptir. Argonuate ise mRNA degrades edebilen bir endonükleazdır. Dicer enziminin ekspresyon seviyelerine bakılarak, tümörlerin vücut içinde var olup olmadığını belirleme için kullanılabilir. Bir çalışmada kanser olan birçok hastada Dicer'in ekspresyon seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışma düşük seviyelerde Dicer ekspresyonunun düşük hasta sağ kalım süresi ile korele olduğunu da göstermiştir (Merritt ve ark. 2010).

Çalışmamızda Dicer immunoreaktivitesi fertil grupta sadece proliferasyon evresinde luminal epitelde gözlenir iken, infertil grupta hem proliferasyon hem de erken sekresyon evresinde hem luminal ve bez epitellerinde hem de stromada

gözlenmiştir. Özellikle Dicer'in infertil grupta fertil gruba oranla daha fazla immunoreaktivitesinin gözlenmiş olması, pre-miRNA'ların daha fazla maturasyonu ya da daha fazla miRNA ekspresyonu olmasından dolayı daha fazla Dicer'a ihtiyacı olduğunu düşündürdü. Çekirdek içerisinde translasyon sırasında gerekli olan Drosha ise Dicer ile birlikte infertil grupta hem erken sekresyon hem de proliferasyon evrelerinde luminal ve bez epitelleri ile birlikte stromada da varlığının tespit edilmesi, infertil grupta daha fazla miRNA transkripsiyonu olduğunu ve Dicer ile birlikte aynı dönemlerde ekspresyonlarının fazla olması da fazla transkripsiyonun olduğunu desteklemektedir. eIF2 $\alpha$  ile eIF2C immunoreaktiviteleri ise infertil ile fertil gruplarda erken sekresyon ve proliferasyon evrelerinde benzer olarak görülmesi üzerine, infertil gruplarda bu iki proteinin endometrial döngüde etkisinin daha az olduğunu düşündürdü.

Fertil ve infertil gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise, gruplar içinde de immunoreaktivitelerinin benzer olmasından dolayı, fertilitate ve infertilitate duruma göre menstrual siklus içerisinde ekspresyonların döngüsel olarak aynı olduğunu düşündürdü.

Daha önceden uterus içindeki miRNA'ların ekspresyonunun steroidale kontrol altında olduğunu gösterilmiştir ve bu dicer1 genindeki bozulmadan dolayı olduğu öne sürülmüştür. Olgun miRNA'ları üretiminde rol oynayan Dicer in ekspresyonundaki aksaklıklardan dolayı dişi üreme sisteminde gelişimsel ve fonksiyonel anormalliklere yol açabilir. Deneysel fare modelinde yapılan çalışma sonucunda Drosha, Dgcr8, Exportin-5 ve Dicer1 ile miRNA'ların biyogenez enzimlerinin steroidale düzenlenmesini incelendiğinde sadece progesteronun dicer1 ekspresyonunu arttırdığı, östrojen ve progesteronun da önemli derece de Exportin-5 mRNA ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür (Nothnick ve ark. 2010). Bu çalışmadan miRNA'ların biyogenez komponentleri olan Drosha, Dgcr8, Exportin-5 ve Dicer1'in fare uterusunda eksprese olduğu, Exportin-5 ve Dicer1'in miRNA biyogenezinde ana steroid düzenleyici komponentler olarak görüldüğü sonucuna varıldı. Çalışmamızda da infertil grupta Dicer immunoreaktivitesinin fertil gruptan farklı olarak hem proliferasyon hemde erken sekresyon evresinde gözlenmiş olması, hormonal düzenlenim etkisi ile ve/veya yoksa infertilitateye neden olabilecek ya da infertilitate sebeplerinden dolayı salınımı sağlanamayan endometrial dokuda gerekli

miRNA ların sentezi ile ilişkili olduğunu söyleyebiliriz. Bu gözlemler transkripsiyon seviyesinde miRNA ekspresyonunu steroidlerin modüle etmesinin yanı sıra, onların olgun sitoplazmik formuna gelişebilmesi için gerekli olan miRNA biyogenez komponentlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi ile miRNA ekspresyonu üzerine etkileri olabileceği düşündürmektedir.

miRNA'lar 19-22 nükleotid uzunluğunda kodlanamayan RNA'ları içerir. Hem normal hem hastalık durumundaki endometriyumda çok sayıda miRNA tanımlanmıştır ve fonksiyonel çalışmalar bu dinamik dokularda miRNA düzenleyici yolları göstermiştir. Son zamanlarda, dolaşan miRNA kökenlerine uzak bölgelerdeki hücrelere etkileri gösterilmiştir (Valadi ve ark. 2007).

İmplantasyon sürecindeki endometriumu prereseptif, reseptif ve refraktör faz olarak ayırır isek, 9 miRNA omik çalışmasında farklı evrelerde farklı memelilerde farklı miRNA'ların salgılandığı bildirilmiştir (Liu ve ark. 2015). İnsan da miR-21, miR-30d, miR-145, miR-181a ve miR-542-3p ekspresyonları gözlenir iken, farede miR-21, miR-101a, miR-141, miR-193, miR-199a, miR-200a, miR-429, miR-451, let-7a ve let-7a/b ekspresyonları saptanmıştır. Sıçanlarda ise miRNA ekspresyonları daha az olup miR-29a, miR-98, miR-143 ve miR-199a olarak bulunmuştur. Bu da farklı endometrial dokuda implantasyon sürecinde farklı miRNA ekspresyonlarının olduğu ve bu nedenle insan ile diğer primatlar arasındaki endometrial döngüde ve implantasyon sürecinde farklılıklar olabileceği vurgulamaktadır (Hunt ve ark. 2013).

İnsan çalışmalarına ait olan örneklerde özellikle Let-7, miR-200 ve miR-17-92 ailelerine ait olan miRNA çalışmaları sonucunda implantasyonun hemen öncesinde endometrial luminal epitelinde ve implantasyonda uterus dokusunda her üç aileye ait ekspresyon gözlenir iken, gecikmiş ve aktive edilmiş implantasyon olgularında Let-7 ve miR-17-92'nin ekspresyonu gözlenmiştir (Chakrabarty ve ark. 2007). Herhangi bir infertilite öyküsü olmayan endometrial dokuda geç proliferasyon dönemle sekresyon dönemi karşılaştırıldığında özellikle miR-30 ekspresyonun olduğu, sekresyon döneminde ise miR-30'a ilaveten Let-7 ekspresyonun olduğu saptanmıştır. miR-200 ailesine ait ekspresyonların reseptif uterusada diğerlerine nazaran daha düşük olduğu gözlenmiştir (Kuokkanen ve ark 2010).

miR-101a ve miR-199a siklo oksijenaz 2 ekspresyonunu düzenlemiştir, ki bu implantasyon için gereken enzimdir ve bu enzim prostaglandin sentezinde sınırlayıcı

basamağı kontrol eder (Chakrabarty ve ark. 2007). miR-21, kemirgenlerde implantasyon-spesifik miRNA'lardan bir tanesidir (Xia ve ark. 2010), ovariyektomi yapılmış farelerde progesteron tarafından down-regüle edilir ki, bu IVF programlarında endometriyal resptivite üzerine artmış progesteronun zararlı etkisini açıklayabilir (Chandana ve ark. 2010; Hu ve ark. 2008). Fare implantasyonundaki miR-21'in belirlenmiş etkilerinin IVF tedavisine başvuran kadınlarda incelenmiş ve endometriyumda erken progesteron artışı ile miR-21 down regülasyonu görülmemiştir (Li ve ark. 2011, Carletti ve Christenson 2009).

Bazı miRNA'ların fonksiyon kaybı manipülasyonu miR-222 ve miR-29b'nin adhezyon ve ekstrasellüler matriks oluşumunda ki miR-29b'nin aşırı ekspresyonunun desidualizasyon cevabını etkiliyor olmasına rağmen (Hawkins ve ark. 2011), önemli genlerin ekspresyon seviyelerini değiştirdiği de bilinmektedir (Qian ve ark. 2009).

Bununla beraber patolojik durumlarda da miRNA ve kontrol eden moleküler düzenlenimlerde de değişiklikler görülmektedir. Endometriozis olan ve olmayan kadınların endometrium ifade edilen belirli miRNA'lar tespit edilmiştir (Pan ve ark. 2007). Ötopik ve ektopik endometrium çiftlerinde 287 tane miRNA'ların ekspresyon profilleri gösterilmiştir, bu miRNA'ların 65 tanesi analiz sırasında belirlenen eşik düzeyinin üstünde eksprese olmuştur (endometriyosiz olmayan kadınların endometriyumunda progresif düşüş şeklinde eksprese olmuştur, ötopik ve ektopik endometriyum çiftlerindeki ekspresyona oranla). İstatistiksel analiz ile bu dokular arasında 48 farklı miRNA eksprese olduğu tespit edilmiştir ve bunlardan 32 tane miRNA izole endometrial stromal hücre ve glandüler epitel hücreden elde edilmiştir. Endometriozisli olgular sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, endometriyozis olan kadınların endometriyumlarında proliferatif fazda miR-135a'nın, proliferatif ve sekretuar fazda ise miR-135b'nin yüksek ekspresyonun olduğu görülmüştür (Petracco ve ark. 2011). Bu miRNA'ların endometrial reseptivitenin anahtar mediyatörü olan HOXA10'nun hedefi olmasından dolayı endometriyal reseptiviteyi baskılayabileceği öngürülebilir.

miR-199a ile endometriyal hücrelerin transfeksiyonu I kB kinaz / NF kB sinyalizasyonu ile bastırılmış ve IL-8 sekresyonunu inhibe etmiştir. Bu nedenle, endometriyozisli kadınları endometriyal stromal hücrelerinde miR-199a'nın düşük ekspresyonları (Dai ve ark. 2012) inflamatuvar mediyatörleri up-regüle etmesi

nedeniyle azalmış endometriyal reseptivite ve implantasyon defekleri ile sonuçlanabilir (Wu ve Ho 2003).

miRNA'lar ötopik ve normal endometriyum ile karşılaştırıldığında miR-17-5p, miR-23a, miR-23b and miR-542-3p'nin ekspresyonunu değerlendirmiş ve onların tahmin edilen hedef genleri, steroidojenik akut düzenleyici protein, aromataz ve siklooksijenaz-2 ve endometrial stromal ve glandular epitelyal hücrelerdeki ekspresyonuna over steroidlerin etkilerini değerlendirilmiştir. Sonuçta ektopik endometriyum, ötopik endometriyum ve normal endometriyum karşılaştırılması sonucunda miR-17-5p yüksek düzeyde, miR-23b ve miR-542-3p daha düşük düzeyde eksprese olduğu görülmüştür (Tannaz ve ark. 2008). Buda endometriosiz patogenezinde miRNA ekspresyonlarının önemini düşündürmektedir.

miRNA'nın post-traskripsiyon gen regülasyonunu üç yolla etkilediği söylenebilir: translasyon inhibisyon, translasyon arttırma (enhancement) ve mRNA bozulması. Üreme organ dokuları bu üç mekanizmadan birini veya tümünü kullanabilir. miRNA'nın üreme organ dokularındaki rolü esasen dört farklı yöntem ile gerçekleşmekte : 1) Dokuya özel koşullu Dicer 1 nakavt fare oluşturarak miRNA ekspresyonunu indirmek [Dicer 1'in delesyonu embriyonik olarak lethaldir (Bernstein ve ark. 2003)]; 2) Klonlama ve mikrodizi analizi kullanarak hücre ve dokulardaki miRNA ekspresyon profilini tespit etmek; 3) Tamamlayıcı 2'O-metil ya da kilitli nükleik asit (LNA) oligonükleotidin inhibitörünü kullanarak özel miRNA fonksiyonunu incelemek; ve 4) genler miRNA tarafından regülasyon olduğu tek tek analize edilen aday gen yaklaşım yöntemini kullanarak belirli bireysel miRNA tespiti yapmak (Carletti ve Christenson 2009).

Östrojenin uterus miRNA ekspresyonunu etkileyip etkilemediğini incelemek için Hong ve ark. (2008) estradiol 17- $\beta$  veya taşıyıcı (kontrol) ile overektomi uygulanmış olan farelerde tedavi uygulamış ve bütün uterus dokusu üzerine miRNA mikroarrayi yapmıştır. 123 miRNA'nın uterus içinde eksprese olduğunu, östrodiol tedavisi sonrası 30 miRNA'nın upregüle ve 19 miRNA'nın downregüle olduğunu göstermiştir. Down-regüle miRNA'lardan biri, miR-705 matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) mRNA'nın hedefi olduğu tahmin edilmektedir. Östrojen tedavisinden önce, MMP-9 protein ekspresyonu düşük fakat onun mRNA ekspresyonu yüksek olduğu ve östrojen tedavisini takiben bu ekspresyon profilleri tam tersi şekilde



seyrettiği bulunmuştur. Bu nedenle, bu model MMP-9'un translasyonel baskı ile sonuçlanan miR-705'i yüksek ifade edildiği, östrojen tedavisinin yapılması gerektiğini ve tedaviye takiben miR-705 düzeyleri düştüğünün görüldüğü bu yüzden MMP-9 çevrilebileceğini göstermektedir (Hong ve ark. 2008).

İki çalışmada embriyo implantasyonuna yanıt olarak uterus içindeki miRNA ekspresyonları incelenmiştir. İlk çalışmada, embriyo implantasyonu için uterusun pre-reseptif olduğu süre boyunca d1 gebe fare uterusları üzerinde miRNA mikroarray yapılmış, östrojen yüksek bulunmuştur, d4 gebe farelerde ise progesteron yüksek bulunmuştur (Chakrabarty ve ark. 2007). Reseptif fazda 2 miRNA upregüle olmuştur bunlar miR-101a ve miR-199a\*'dır.

Uterus luminal epitelindeki PTGS2'nin ekspresyonu embriyo implantasyonu için gereklidir. Böylece, miR-101a ve miR-199a\* embriyo implantasyon yerinde sıkıca PTGS2 ekspresyonunu düzenlenmesinde rol oynayabilir, böylece rahim içerisinde başka bir yerde, gereksiz büyümesini önler. Ayrıca, uterus stromal hücrelerinde desidualizasyon için PTGS2 ekspresyonu gereklidir, miR-101a ve PTGS2 ekspresyon profilleri desidualizasyon sırasında ters orantılıdır. Bu yüzden, miR-101a ve miR-199a embriyo implantasyonu ve eş zamanlı desidualizasyon boyunca muhtemel PTGS2'nin önemli regülatörleridir (Chakrabarty ve ark. 2007).

İkinci çalışmada, fare uteruslarında implantasyon olan ve olmayan sahalarda implantasyon yerlerinde miRNA mikroarray gerçekleştirilerek miRNA ekspresyonları doğrudan incelenmiştir (Hu ve ark. 2008). Çalışmada 13 miRNA implantasyon yerlerinde upregüle, 2 tanesinin de down regüle olduğu tanımlanmıştır. Northern blot analizleri ise sadece iki miRNA prokürsör formlarının, miR-290-5p ve miR-292-5p'nin upregüle olduğunu göstermiştir.

miRNA'ların daha önce hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol oynadığı bilinmektedir. Sadece endometriyum da değil, embryonik miRNA salınımlarınlarıda gelişimsel süreçte önemlidir. İmplantasyon öncesinde embryodan salgılanan miRNA ların endomteriyal reseptivite üzerine olan etkiside tam olarak bilinmemektedir. miR-21, blastosist etrafında alt luminal stromada yüksek ekspresyonla implantasyon yerlerinde upregüle olmaktadır (Hu ve ark. 2008). miR-21 gebelik d1-4 dönemindekilerde eksprese olmamıştır, sadece implantasyon bölgesinde gebeliğin d5 döneminde upregüle olmuştur ve daha sonra desiduada d6-8 döneminde yüksek

seviyede görülmüştür. miR-21 yalancı gebelik sırasında eksprese olmamıştır, bu yüzden miR-21'in ekspresyonu embriyo varlığına bağlı olduğunu desteklemektedir.

İmplantasyon bölgeleri arasında miR-21 düşük iken, Reck yüksektir; implantasyon bölgesi içinde miR-21 yüksek iken, Reck düşüktür; dolayısıyla bu MMP'nin aktive olmasını sağlar. Araştırmacılar bunun ekstraselüler matriksin analizi için olanak sağladığını ve plasenta gelişimi için anjiyogenezin gerektiğini düşünmektedirler (Hu ve ark. 2008).

miR-21 kendi promotor bölgesinde transkripsiyon 3 (STAT3)'ün sinyal dönüştürücü ve aktivatörü için bağlayıcı bölgelere sahiptir, ki bunun Loffler ve ark (2007) tarafından miR-21 transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Lösemi inhibitör faktör (LIF) embriyo implantasyonu için gereklidir ve STAT3'ün aktive olmasına sebep olur. STAT3 fare uterus epitelinde çekirdeğin yer değiştirmesi ve aktive olabildiğini sağlar (Cheng ve ark. 2001).

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan düşük ve endometriozis günümüzde tedavi yöntemleri sınırlı olan ve çoğunlukla yıllar sonra teşhis edilen sorunlardır. Büyük ölçekli miRNA profillemeye çalışmalarında ilk kanıt miRNA'nın endometriyumda menstrual siklusu değiştirmesi gibi endometriyal bozukluklara katkıda bulunduğudır (Hull ve Nisenblat 2013). Yeni nesil çalışmalar sonrasında miRNA ve onların hedefleri etkileyebilecek biyolojik süreçleri tahmin etmek mümkün olabilmektedir ve bazı fonksiyonel çalışmalar endometriyal hücrelerin miRNA/hedef mRNA etkileşimleri deneysel olarak doğrulanmıştır. Yeni bulunan ilerlemeler, endometriozis ile ilişkili plazma ve serumun tanımlanmasını sağlamaktadır, bu küçük moleküller uzak bölgelerde endometriyal olmayan hücreler ile etkileşime aracılık ettiği olasılığı yüksektir ve noninvazif teşhis testlerinin bileşenleri gibi potansiyele sahiptir (Hull ve Nisenblat 2013).

Bununla beraber insan endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyon boyunca eksprese olan miRNA profilleri belirlenmiş ve bu süreç boyunca miRNA biyogenesis enzimi olan dicer için ihtiyacı gerekliliğide vurgulanmıştır (Estella ve ark. 2012). O nedenle dicer'in endometrial düzenlenim sırasında en önemli olanlardan biri olabileceği düşünülmekte, elde edilen çalışmamız sonucunda da böyle olabileceğini desteklemektedir. Dicer fonksiyonu ile HOXA10, COX2, SP1, C/EBP $\beta$  ve FOXO1 ekspresyonunun yanı sıra Prolactin, IGFBP-1, MPlF-1 ve TIMP-3 sekresyonunu da

analiz edilmesi sonrasında dicer'in endometrial reseptivite ve implantasyon süreci ile direkt ilişkisi olabileceğini desteklemektedir (Estella ve ark. 2012).

Totalde desidualize olan insan embriyonik kök hücrelerden desidualize olmayan hücrelere oranla 26 miRNA upregüle 17 miRNA downregüle olmuştur. Desidualizasyon süreci boyunca 3 miRNA ailesi, ki bunlar miR-181, miR-183 ve miR-200 down regüle olmuştur. miRNA'ların hedef tahmin algoritmaları kullanılarak bu miRNA'lar tarafından düzenlenen potansiyel hedefleri ve yolları belirlenmiştir (Estella ve ark. 2012).

miRNA datalarının genel olarak değerlendirilmesinde aday mikroRNA'lardan miR-21, miR-23a, miR-199a\* ve miR-200b'nin ifadesinin fertil örneklerin proliferasyon döneminde yüksek olduğu ancak sekresyon dönemine geçişle birlikte miktarlarında azalma olduğu görülmektedir. Adı geçen miRNA'ların ifadesi infertil örneklerin proliferatif döneminde ciddi miktarda azalmaktadır. Bu mikroRNA'ların ifadelerinin proliferasyon için gerekli olduğu varsayımından yola çıkarak, infertil grupta ihtiyaç oldukları dönemde miktarlarında azalma olması, ilgili miRNA ifadesinde azalmanın proliferasyondaki gen ifade süreçlerini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

MiR-199a\* ve 200b proliferasyonu tetiklerken, miR-23a ve miR-21 antiapoptotik etki göstermektedirler. Dolayısıyla ilgili miRNA ifadelerinin yüksek olması, proliferasyonun düzenlenmesinde rol oynayabileceği hipotezini desteklemektedir.

miRNA analizleri sonucunda, fertil ve infertil gruplarda proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde farklı miRNA ekspresyonlarının olduğu gözlenmiştir. Özellikle hücre proliferasyonu kontrol eden miRNA ların fertil grupta ekspresyonlarının olması uyumlu iken, infertil grupta ekspresyonlarının azalmış olması infertilite sebepleri arasında olabileceğini düşündürdü. Bununla beraber infertil grupta özellikle miR-23a, miR-125b'nin fertil gruba oranla anlamlı ekspresyonu olması, infertil endometrial düzenleniminde rol oynayabileceğini düşündürdü. Alınan örneklerin endometrial epitel, bez epiteli veya stromasından kaynaklanıp kaynaklanmadığı tüm doku örneği analizi yapılması nedeni ile ayrımlandırılmamıştır. Bununla beraber analiz edilecek miRNA'ların hedef

genlerinin de incelenmesi infertilitede endometrial düzenlenimin anlaşılabilmesi için önemli olacaktır.

Endometriyal normal düzenlenim ve patolojik durumlardaki değişikliklerin anlaşılabilmesi için miRNA fonksiyonunun bilgisi gün geçtikçe artmakta ve implantasyon, plasentasyon ve endometriozis hastalıkları için miRNA-bazlı terapiler gerçekçi bir hal almaya başlamıştır. Bu nedenle, endometriyal dokuda miRNA'nın doğru biyolojik rolünün belirlenmesi hem teşhis hemde tedavi için önemli olduğu sonucuna varılmıştır.



## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada, fertil ve infertil olgularda menstrual siklusun proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde luminal epitel, bez epitel ve stroma bölgelerinde, miRNA biyogenezinde önemli rollere sahip Dicer, Drosha, eIF2 $\alpha$  ve eIF2C (AGO-1) moleküllerinin immunohistokimyasal dağılımları incelenmiş, örneklerde RNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra RNA izolasyonu ve kalitesinin ölçülmesi kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile yapılmış ve belirlenen miR-17-5p, miR-23a, miR-23b, miR-542-3p, miR-21, miR-199a\*, miR-705, miR-20a, miR-26a, miR-125b, miR-200a/b/c miRNA'lar analiz edilmiştir. Ayrıca fertil ve infertil gruplara ait proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerine ait endometriyum örnekleri hematoksil-eozin boyamaları ile morfolojik olarak incelenmiştir.

Dicer proteini, fertil gruplarda proliferasyon döneminde luminal epitelde erken sekresyon dönemi örneklerine oranla daha fazla eksprese olmuş iken, bez epiteli ve stromada proliferasyon ve erken sekresyon döneminde Dicer immunoreaktivitesi negatif izlenmiştir.

Dicer proteini, infertil gruplarda ise, proliferasyon dönemi örneklerinde erken sekresyon dönemi ile kıyaslandığında hem luminal ve bez epitellerinde hem de stromada daha fazla eksprese olduğu görülmüştür.

Dicer proteini için proliferasyon dönemi örnekleri incelendiğinde, infertil grupta daha şiddetli boyanma olduğu saptanmıştır. Erken sekresyon dönemi boyamaları karşılaştırıldığında ise fertil grupta hiç boyanma gözlenmez iken, infertil grupta luminal epitelde daha fazla olmak üzere hem bez epiteli hem de stromada da az da olsa boyanma izlenmiştir.

Drosha proteini, fertil gruplarda erken sekresyon döneminde luminal epitelde proliferasyon dönemi örneklerine oranla daha fazla eksprese olmuş iken, bez epiteli ve stromada proliferasyon ve erken sekresyon döneminde Drosha immunoreaktivitesi negatif izlenmiştir.

Drosha proteini, infertil gruplarda ise, proliferasyon dönemi örneklerinde erken sekresyon dönemi ile kıyaslandığında hem luminal ve bez epitellerinde hem de stromada daha fazla eksprese olduğu görülmüştür.

Drosha proteini için proliferasyon dönemi örnekleri incelendiğinde, infertil grupta daha şiddetli boyanma olduğu saptanmıştır. Erken sekresyon dönemi



boyamaları karşılaştırıldığında ise fertil grupta sadece luminal epitelde boyanma gözlenir iken, infertil grupta luminal epitelde daha fazla olmak üzere hem bez epiteli hem de stromada da boyanma izlenmiştir.

eIF2 $\alpha$  proteini, fertil gruplarda erken sekresyon döneminde luminal ve bez epitellerinde proliferasyon dönemi örneklerine oranla daha fazla eksprese olmuş iken, stromada proliferasyon döneminde erken sekresyon dönemine oranla daha fazla eksprese olmuştur.

eIF2 $\alpha$  proteini, infertil gruplarda ise, proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde luminal epitel ve stroma benzer boyanma gözlenir iken, bez epitelinde proliferasyon dönemi örneklerinde negatif iken erken sekresyon döneminde zayıf şiddette boyanma izlenmiştir.

eIF2 $\alpha$  proteini için proliferasyon dönemi örnekleri incelendiğinde, luminal epitel ve stromada benzer boyanma görülmüş, bez epitelinde ise fertil grupta zayıf şiddette boyanma var iken infertil grupta negatif olduğu saptanmıştır. Erken sekresyon dönemi boyamaları karşılaştırıldığında ise fertil grupta infertil gruba oranla luminal ve bez epitellerinde daha fazla boyanma gözlenir iken, stromada ise infertil grupta boyanma daha fazla görülmüştür.

eIF2C proteini ise fertil ve infertil grup proliferasyon ve erken sekresyon dönemi örneklerinin hepsinde negatif olduğu gözlenmiştir.

Tüm bu bulgular değerlendirildiğinde, miRNA biyogenezi sürecinde önemli olan moleküllerden Dicer başta olmak üzere Drosha'nında gruplar arasında yüksek farklılık göstermesi ve özellikle infertil grupta daha fazla eksprese olması bu moleküllerin infertilite ile ilişkilendirilebileceğini düşündürdü. Bu iki enzime karşı geliştirilecek olan inhibitör moleküller veya maddeler ile infertilite tedavisinde kullanılması olası araştırma konularındandır.

Özellikle implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan gebelik kayıpları vb. üreme hastalıkları görülen olgularda menstrual siklusun farklı dönemlerinde farklı molekül ve miRNA'ların eksprese olduğunun görülmesi, bu moleküllerin ve/veya miRNA'ların fazla veya eksik salgılanmasından dolayı bu başarısızlıkların oluştuğunu ve bu hastalara yeni bir tedavi protokolü oluşturulabileceğini düşündürdü.

## 9. KAYNAKLAR

- Allen, W. E. (2013). diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations (11th Edition). Journal of Anatomy, 213(3), 357-358.
- Aplin DJ. and Kimber SJ. (2004). Trophoblast uterine interactions at implantation. Rep Bioi and Endocrinology, 2:48,1-31.
- Bentinley U, Lopata A. (2001). In vitro models of human blastocyst implantation. Infertility and Rep Medicine Clinics of North America, 12:2,271-279.
- Bourgain C, Devroey P (2007) Histologic and functional aspects of the endometrium in the implantatory phase. Gynecologic and Obstetric Investigation 64(3): 131-133.
- Braga VM, Gendler SJ. (1993). Modulation of Muc-1 mucin expression in the Mouse uterus during the estrous cycle, early pregnancy and placentation. J Cell Sci, 105:397-405.
- Bruce A. White. The male and Female Reproductive Systems. Berne and Levy Physiology 6th 2008.
- Campbell S, Swan HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD (1995) Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. Molecular Human Reproduction 1(4):171-178.
- Cheon YP, Xu X, Bagchi MK, Bagchi IC (2003) IRGI is a novel target of progesterone receptor and plays a critical role during implantation in the Mouse. Endocrinology 144(12): 5623-5630.
- Creighton CJ, Benham AL, Zhu H, Khan MF, Reid JG, Ankur K. Nagaraja, Michael D. Fountain, Jr., Olivia Dziadek, Derek Han, Lang Ma, Jong Kim, Shannon M.

Hawkins, Matthew L. Anderson, Martin M. Matzuk, Preethi H. Gunaratne (2010).

Creighton, C. J. et al., Discovery of Novel MicroRNAs in Female Reproductive Tract Using Next Generation Sequencing, PLoS ONE 5(3): e9637(2010). doi:10.1371/journal.pone.0009637.

Çelik Ö. Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar 6. basım, Palme Yayıncılık Ankara; 2011, s:848-849.

Damario MA. and Rozenwaks Z. (2004). Repeated implantation failure: the preferred therapeutic approach. Textbook of Ass. Rep. Tech. Laboratory and Clin Perspectives Ed. DK. Gardner A.Weissman, CM. Howles, Z. Shoham, Taylor and Francis, NY, p.667-683.

Dean J. (1992). Biology of mammalian fertilization: the role of zona pellucida. J Clin Invest, 89:1055- 59.

Discovery of Novel MicroRNAs in Female Reproductive Tract Using Next Generation Sequencing. PLoS ONE 5(3): e9637. doi:10.1371/journal.pone.0009637.

Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferre F (1999) Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium (Review). European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology 83(1):85-100.

Elder K., Dale B. İn-vitro Fertilizasyon Çeviri Editörü: Prof. Dr. Tülay İrez 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul; 2014, ISBN: 978-975-420-960-0.

Emiliani S. (2005). Embryo maternal interactive factors regulating the implantation process; implications in assisted reproductive treatment. RBM Online, 10:4,527-540.

- Enders AC. (2001). Perspectives on human implantation in Infertility and Reproductive medicine. *Clinics of North America*, 12:2,251-269.
- Estella C, et al., miRNA Signature and Dicer Requirement during Human Endometrial Stromal Decidualization In Vitro, (2012) *PLoS ONE* 7(7): e41080. doi:10.1371/journal.pone.0041080.
- Estella C, Herrer I, Moreno-Moya JM, Quinonero A, Martinez S, Antonio Pellicer, Carlos Simon, (2012) miRNA Signature and Dicer Requirement during Human Endometrial Stromal Decidualization In Vitro. *PLoS ONE* 7(7): e41080. doi:10.1371/journal.pone.0041080.
- Gardner DK. (2001). Improving implantation rates in in vitro fertilization. *Infertility and Rep Med Clinics of North America* 12:2,403-426.
- Ghazeeri GS, Clark DA. and Kutteh WH. (2001). Immunologic factors in implantation. *Infertility and Rep Med Clinics of North America*, 12;2,315-337.
- Gregory L. (2004). Perifollicular vascularity, a marker of follicular heterogeneity and oocyte competence and a predictor of implantation in assisted conception cycles. In *essential IVF*, Ed.J. Van Bierkom, L. Gregory, Kluwer Acad Publ. P.59-80.
- Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ (2008) Implantation of the human embryo requires Rac1 dependent endometrial stromal migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 16189-16194.
- Gulart LA, Vieira GS, Martelli L(2004). Is MUC1 polymorphism associated with female infertility? *Rep Bio Online*, 8:477-482.
- Hendrickson MR, Atkins KA, Kempson RL, Uterus and fallopian tubes, in *Histology for Pathologists*, 3rd Edition, ed. Stacey E. Mills, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007, p.1027.

- Henkel RR. and Bernhard Schill W. (2003). Sperm preparation for ART Rep Bio Endocrinol, 1:108-115.
- Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C (2007) Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. Human Reproduction Update: 13(1):77-86.
- Howles CM. (2005). Superovulation for assisted conception: The new gonadotrophins. Textbook in vitro fertilization and assisted reproduction. Ed. P.R.Brinsden p.153-164. Taylor and Francis NY.
- Huszar G, Vigue land Oehninger S. (1994). Creatinine kinase immunocytochemistry of human sperm hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatinine kinase staining pattern. Fertil Steril, 61:136-142.
- John J. Bray, Patricia A. Cragg, Anthony Dc Macknight. Roland G. Mills. Reproduction, Lecture Notes on Human Physiology. 1999, Fourth Edition.
- Kao LC, Guidice LC. (2001). Growth factors and implantation In implantation. Infertility and Rep Med Clinics of North America,2:2,281-299.
- Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. Am J Reprod Immunol. 2002 Apr; 47(4):213-21.
- Kimber SJ, and Spanswick C. (2000). Blastocyst implantation; The adhesion cascade. Seminars Cell Development Bioi, 11;77-92.
- King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW (1998) Human uterine lymphocytes. Human Reproduction Update 4(5):480-485.
- Kliman HJ (2000) The story of decidualization, menstruation and trophoblast invasion. American Journal of Pathology 157:1759-1768.



- Kovacs T, Jakab A, Kovanc1 E. et al. (2004). Preparation of sperm fractions and individual sperm with low levels of chromosomal Aneuploidies for IVF and ICSI. *Essential IVF Basic research and Clinical applications*, Ed by J.van Blerkom and L.Gregory p.179-200 Kluwer Acad Publ. Boston/Doodrecht/London.
- Lee K, Jeong J, Kwak I et al. (2006) Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the Mouse uterus. *Nature Genetics* 38:1204-1209.
- Lee KY. and De Mayo FJ. (2004). Animal models of implantation. *Reproduction*, 128:679-695.
- Lessey BA. (1998). Endometrial Integrins and the establishment of uterine receptivity: *Hum Rep,13 suPPt.3:247-258*.
- Lessey SA. (2004). Principles of endometrial function and implantation. 37th Annual postgraduate program of ASRM course 7, Eggs, embryos and the endometrium, course book, 243-253,PA.
- Liu H, Cohen J, Alikani M. (1993). Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril*, 60:871-5.
- M Louise Hull, Victoria Nisenblat, Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease, *Reproductive BioMedicine Online* (2013) 27, 515– 529.
- M. Z. Carletti, L.K. Christenson, MicroRNA in the ovary and female reproductive tract, *J Anim Sci*. 2009 April; 87(14 Suppl): E29–E38. doi:10.2527/jas.2008-1331.
- Mazur MT, Kurman RJ, *Diagnosis of Endometrial Biopsies and Curettings*, 2nd edition, Springer, 2005, p.7.

- Michelmann HW, Gilbhard G. (2003). Morphological scoring and actual status of blastocyst transfer. In, How to improve results in as- sisted rep. Technologies. Publ., Germany.
- Moore, K. L., T. V. N. Persaud and M. G. Torchia (2008). The developing human: clinically oriented embryology, Elsevier Health Sciences.
- Mortimer D, Henman M J., Jansen RPS. (2002). Development of an improved embryo culture system for clinical human IVF.
- Nacas G. (1999). Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. Hum Rep, 2:99-106.
- Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A. et al.(2003). Synchronous expression of pinopodes and alpha 5 beta 3 and alpha 4 beta1 integrins in the endometrium surface epithelium of normally menstruating women during the implantation window. J Rep Med, 48(5) 355-361.
- Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, Salamonsen LA, Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation (2013). PLoS ONE 8(3): e58502. doi:10.1371/journal.pone.0058502.
- Nothnick W. B., et al., Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1, Endocrine. 2010 April 1; 37(2): 265–273. doi:10.1007/s12020-009-9293-9.
- Ovale WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. Noyan S (Çeviren), s: 412-418, Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.

Pan Q, et al., The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression, *Molecular Human Reproduction* Vol.13, No.11 pp. 797–806, 2007.

Patricia E. Molina: *Endocrine Physiology*, 2nd Edition. 2007. The McGraw-Hill Companies.

Quinn P. (2001). ART media commercial and in house products. *Proc. of 5th Ann. Symp. of Am. Ass. of Biol. Chem. Rep. Biol.* pp.1-2.

Qun Pan, Xiaoping Luo, Tannaz Toloubeydokhti, Nasser Chegini, The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression, *Molecular Human Reproduction* Vol.13, No.11 pp. 797–806, 2007. Advance Access publication on August 31, 2007 doi:10.1093/molehr/gam063.

Rawlings RG. (2001). Modern media for IVF, an evolution. In ART media commercial and in house products. P.43-65, *Proc. Of 5th Ann. Symp. of Am. Ass. of Bioi. Chem. Rep. Biol.*

*Review of Medical Physiology* 22nd Edition. W. Ganong (McGraw-Hill, LANGE) 2010.

Robert J, Sherwin A. and Sharkey AM. (2005). Regulation of embryo-endometrial interactions at implantation. *Textbook of in vitro fertilization and assisted Reproduction*. Ed.P. R.Brinsden p.405-419, Taylor and Francis London.

Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text And Atlas Çeviri Editörü: Barış Baykal* 6. basım, Palme Yayıncılık Ankara; 2014, s:848-849.

Sadler TW, *Langman Medikal Embriyoloji. Çeviren Prof. Dr. A. Can Başaklar.* 11. Basım, Palme yayıncılık Ankara; 2011, s:13-30.

- Schiewe MC, Hazeleger NL, C, Balmaceda JP. (1995). Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a Mouse Antihatching model. *Fertil Steril*, 63:288-94.
- Scott L. (2004). The Biological basis of oocyte and embryo competence: morphodynamic criteria for embryo selection in in vitro fertilization. *Essential IVF, Basic Research and Clinical applications*. Ed. J. Van Blerkom and I. Gregory, p.333-376.
- Scott LA, Smith S. (1998). The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Rep*, 13:1003-13.
- Seppala M, Lessey B. (2004). Determination of endometrial status and the implantation window. In *Essential IVF Basic Research and Clinical Applications*. Ed, by van Blerkom L. Gregory Kluwer Acad. Publ. p.577-609.
- Simon C, Cano F, Valbuena D. et al. (1995). Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum estradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod*, 10:2432-2436.
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. (2004). Expression and importance of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and 9) in human trophoblast. *Rep Bioi and Endocrinol*, 2:1-59.
- Staun-Ram E, Shalev E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Rep Bioi and Endocrinology*, 3:56-78.
- Stephen S. Myatt, Jun Wang, Lara J. Monteiro, Mark Christian, Ka-Kei Ho, Luca Fusi, Roberto E. Dina, Jan J. Brosens, Sadaf Ghaem-Maghami, Eric W. F. Lam, Repression of FOXO1 expression by microRNAs in endometrial cancer, *Cancer Res*. 2010 January 1; 70(1): 367–377. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1891.

Tannaz Toloubeydokhti, Qun Pan, Xiaoping Luo, Orhan Bukulmez, Nasser Chegini, The Expression and Ovarian Steroid Regulation of Endometrial Micro-RNAs, *Reprod Sci.* 2008 December; 15(10): 993–1001. doi:10.1177/1933719108324132.

Taylor HS. (2001). Hox gene regulation of endometrial receptivity. In *implantation, Infertility and Reproductive medicine. Clinics of North America*, 12:2,349-57.

Tesarik J. and Greco E. (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single Static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Rep*, 14:1318-23.

Van Blerkom J. (2004). The enigma of fragmentation in early human embryos possible causes and clinical relevance. *Essential IVF Basic Res. And Clin. Appl.* Ed. J.Van Blerkom, L.Gregory Kluwer Acad. Publ. p. 377-421, The Netherlands.

Vander Ven K. (2003). Embryonic implantation, recurrent abortion and trophoblast antigens. *How to improve results in assisted reproduction technology.* Ed. W.WUrtel Ve Bu Druck Gm BH, Germany p.39-48.

Vatansever S. (2014) Celal Bayar Üniversitesi Dönem II Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Ders Notları.

Veiga A, Boiso I, Bel H H. (2004). Assisted hatching. *Textbook of Assisted Rep. Tech. Lab. and Clin. Perspectives.* Ed. DK. Gardner et al Taylor and Francis, NY p.181-189.

Veiga A, Torello J, Boiso I, Bari P. and Menezzo Y. (2004). Blastocyst transfer update. In *essential IVF basic research and clinical applications.* Ed. J.Vanblerkom, L.Gregory Kluwer Acad Publ. p.423-440, The Netherlands.



Verlinsky Y. and Kuliev A. (2005). Preimplantation genetic diagnosis and its role in assisted reproduction technologies. Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. Ed.P R.Brinsden p.453-474,Taylor and Francis NY.

Warren B. Nothnick, Caitlin Healy, Xiaoman Hong, Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1, *Endocrine*. 2010 April 1; 37(2): 265–273. doi:10.1007/s12020-009-9293-9.

Warren B. Nothnick, The role of micro-RNAs in the female reproductive tract, *Reproduction* (2012) 143 559–576.

Xu P, Wang Y, PiaoY, Bai S. et al.(2001). Effects of matrix proteins on the expression of matrixmetalloproteinase 2, 9 and 14 and Tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Bioi of Rep*, 65:240-246.

## 10. EKLER

### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İmplantasyon Sürecinde Ekspres Olan miRNA'lar ve Önemi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	189-SBKA EK

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/10-17	Tarih: 15.04.2014
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmancın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, ve uygun bulunmuş olup araştırmancın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Ayşegül Yıldız


Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof.Dr. Ayşegül YILDIZ	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Yeni Doğan)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Hülya ELLIDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Preventif Onkoloji A.D.	E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Hale ÖREN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Çocuk Hematoloji)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Şule KALKAN	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. A. Necati GÖKMEN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	E	K	E	H	E	H	
Doç. Dr. Taner DAĞCI	Fizyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	K	E	H	E	H	
Doç. Dr. Pembe KESKİNOĞLU	Biyostatistik	DEU Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim A.D.	E	K	E	H	E	H	
Doç. Dr. Erdem YAKA	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji A.D.	E	K	E	H	E	H	
Doç. Dr. Mualla Aylin ARICI	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E	K	E	H	E	H	
Doç. Dr. Uğur Önsel TÜRK	Kardiyoloji	Batı Anadolu Mersinli Tıp Merkezi	E	K	E	H	E	H	
Av. Semra MARMARA	Hukuk	DEU Rektörlüğü	E	K	E	H	E	H	
İhsan ÇELİKDEMİR	75 Yılı Özel İlköğretim Okulu Md. Yard.	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	E	K	E	H	E	H	

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Ayşegül Yıldız  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

# ÖZGEÇMİŞ

EUROPEAN CURRICULUM VITAE FORMAT	
	
<b>PERSONAL INFORMATION</b>	
Name	<b>GOKALP, SEVTAP</b>
Address	<b>53/8, MAHMUT SEVKET PASA STREET, CELIKTEPE DISTRICT, 34413, ISTANBUL, TURKEY</b>
Telephone	<b>(+90) 539 390 7591</b>
Fax	<b>(+90) 236 233 1466</b>
E-mail	<a href="mailto:sevtap_gokalp90@hotmail.com">sevtap_gokalp90@hotmail.com</a> <a href="mailto:sevtapgokalp@ogr.cbu.edu.tr">sevtapgokalp@ogr.cbu.edu.tr</a>
Nationality	<b>Turkish</b>
Date of birth	<b>15 November, 1990</b>
<b>WORK EXPERIENCE</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Dates (from – to)</li><li>• Name and address of employer</li><li>• Type of business or sector</li><li>• Occupation or position held</li></ul>	<b>JUNE-SEPTEMBER, 2010</b> <b>SISLI ETFAL EDUCATION AND RESEARCH HOSPITAL</b> Clinical Biochemistry Laboratory Intern
<ul style="list-style-type: none"><li>• Main activities and responsibilities</li></ul>	<b>JANUARY-JUNE, 2012</b> <b>MUGLA ANADOLU HIGH SCHOOL</b> Biology Teacher
	<b>AUGUST, 2012-PRESENT DAY</b> <b>CELAL BAYAR UNIVERSITY</b> <b>FACULTY OF MEDICINE</b> <b>DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY</b> Assistant
<b>EDUCATION AND TRAINING</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Dates (from – to)</li><li>• Name and type of organisation providing education and training</li><li>• Principal subjects/occupational skills covered</li><li>• Title of qualification awarded</li></ul>	<b>AUGUST, 2012-PRESENT DAY</b> <b>CELAL BAYAR UNIVERSITY</b> <b>FACULTY OF MEDICINE</b> <b>DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY</b> <b>MASTER'S DEGREE</b> Histological techniques, Immunohistochemistry staining, Immunofluorescence staining, Cell culture, Stem cell, Experimental animal models

• Level in national classification  
(if appropriate)

SEPTEMBER, 2008-JUNE, 2012  
MUGLA SITKI KOCMAN UNIVERSITY  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY  
BACHELOR'S DEGREE (GRADUATED AS TOP STUDENT)

SEPTEMBER, 2004-JUNE, 2008  
VEHBI KOÇ FOUNDATION HIGH SCHOOL (FOREIGN LANGUAGE BASED) (GRADUATED AS 7<sup>TH</sup> IN TOP TEN)

SEPTEMBER, 1996-JUNE, 2004  
OSMAN FARUK VERIMER PRIMARY SCHOOL/JUNIOR HIGH SCHOOL

**PERSONAL SKILLS  
AND COMPETENCES**

MOTHER TONGUE

TURKISH

OTHER LANGUAGES

- Reading skills
- Writing skills
- Verbal skills

ENGLISH  
Good  
Good  
Good

SOCIAL SKILLS  
AND COMPETENCES

I HAVE VERY WELL COMMUNICATION SKILLS THAT I HAVE A LOT OF FOREIGN ROOMMATES AND COLLAGES. I WORK TOGETHER WITH OTHERS WHO ARE FROM DIFFERENT DEPARTMENTS VERY WELL. FOR MY THESIS I HAVE TO CONVINCED PATIENTS TO SIGN A CONSENT FORM AND THE PATIENTS I COMINUCATE WITH ARE VERY WILLINGLY TO SIGN THE FORM CAUSE THEY ARE VERY CONVINCED BY MY EXPLANATION.

ORGANISATIONAL SKILLS  
AND COMPETENCES

I WAS ASSISTED MY ADVICER PROF. H. SEDA VATANSEVER, ORGANISED MORE THEN FOUR CONGRESSES INCLUDING "PRIMARY CELL CULTURE AND CELL DEATH ANALYSIS PRACTICAL COURSE-II 08-08 JUNE 2014 IZMIR", "I. RESEARCH CONGRESS OF CELL DEATH WITH INTERNATIONAL PARTICIPANTS 30 OCTOBER-03 NOVEMBER 2013 / IZMIR", "INTERNATIONAL PARTICIPANT STEM CELL WORKSHOP, SEPTEMBER 10-12, 2014, MANISA-TURKEY".

TECHNICAL SKILLS  
AND COMPETENCES

I'M CAPABLE OF CELL CULTURE TECHNIQUES, HISTOLOGICAL TECHNIQUES AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY STAINING TECHNIQUES, IMMUNOFLUORESCENCE TECHNIQUES.  
COMPUTER SKILLS:  
WORD, EXCEL, POWERPOINT, PHOTOSHOP CS5-EXCELLENT



#### ADDITIONAL INFORMATION

- XII National Histology-Embryology Congress 27-30 May 2014, Human adenovirus-36's Short and Long Term Effects in Viral Obesity After vaccination, Poster Presentation, 1st award.
- XII National Histology-Embryology Congress 27-30 May 2014, THE EFFECT OF STEM CELL (Adipose Tissue and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Stem Cells Obtained from the liver tissue) THERAPY ON THE EXPERIMENTAL CIRRHOSIS MODEL, Oral Presentation, Prof. Dr.Yener AYTEKİN Oral Presentation, 2st award.
- EACR Sponsored - 2nd Anticancer Agent Congress 23-25 April 2014.
- 5th Multidisciplinary Cancer Research Congress 25-27 April 2014.
- EACR Sponsored - 2nd Anticancer Agent Congress and 5th Multidisciplinary Cancer Research Congress, "Young Investigator Scholarship" reward.
- EACR Sponsored - 2nd Anticancer Agent Congress and 5th Multidisciplinary Cancer Research Congress, "Travel Award".
- Celal Bayar University I. National Medical Students Projects Competition, "Projen Var Mi?" March, 2013, THE EFFECT OF STEM CELL THERAPY ON THE EXPERIMENTAL CIRRHOSIS MODEL, Poster and Project 1st award.
- 2. National Clinical Microbiology Congress, 10-13 November 2013, Antalya, Can adenovirus-36's adipogenic effects be reduced with vaccination in experimental rat model? , Oral Presentation, 1st award.
- 9. IUGEN INTERNATIONAL PARTICIPATION MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS WINTER SCHOOL, 24-26 February 2012.
- MULTIDISCIPLINARY R&D AND INOVATION SYMPOSIUM IN LIFE SCIENCE, 15-17 June 2012.
- 8TH NANO SCIENCE AND NANOTECHNOLOGY CONGRESS, 25-29 June 2012.
- INTERNATIONAL ACADEMY OF NANOMEDICINE III WORLD CONGRESS NANOMED, 29 June 2012.
- Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Laboratory Safety Education, 2012.
- 21. National Biology Congress-Ege University, 3-7 September 2012.
- 6TH International ITU Molecular Biology and Genetics Student Congress, 27-30 August 2012.