

T.C.

Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBINDA
MUCİN-1, GLİKODELİN-A, LOKEMİA
INHIBITORY FACTOR, İNTERLÖKİN-15 VE
GRANULOSİT COLONY STIMULATION
FAKTÖR'ÜN ETKİSİ**

DR. MURAT POLAT

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. NADİ KESKİN

KÜTAHYA-2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTARCT	viii
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
Habituel Abortuslar.....	4
Etyoloji.....	4
Anatomik Nedenler.....	4
Genetik Nedenler.....	5
Enfeksiyonlar.....	5
Çevresel Faktörler.....	6
Endokrinolojik Nedenler.....	6
İmmunolojik Nedenler.....	7
Trombofilik Nedenler.....	8
Over Rezervi.....	9
Embriyo İmplantasyonu.....	10
Mucin-1.....	12
Glikodelin.....	14

Leukemia İnhibitory Factor.....	15
İnterlökin-15.....	17
Granülosit Colony Stimülan Faktör.....	18
MATERYAL VE METOD.....	20
BULGULAR.....	25
TARTIŞMA.....	29
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR.....	37

TEŞEKKÜRLER

Dört yıl süren asistanlık hayatımda bana bir çok şey öğreten, başta Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım olan Nadi Keskin'e ve diğer kıymetli hocalarım Kadriye Beril Yüksel, Ali Seven ve Suna Kabil Kucur'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Asistanlık sürecinde birbirimize her konuda destek olduğumuz asistan arkadaşlarım olan Halime Şencan Altınırnak ve Nuh Mehmet Erbakırcı'ya teşekkür ediyorum.

Beni bu günlere gelmemi sağlayan ve beni dürüst bir insan olarak yetiştiren, uzakta olsalar da sevgilerini hep yanımda hissettiğim sevgili annem Şenay Polat'a, babam İsmail Polat'a ve hep yanımda olan kardeşim İlayda Polat'a en içten şükranlarımı sunuyorum.

Son olarak TUS süreci de dâhil olmak üzere asistanlığım boyunca hep yanımda olan ve bütün zorluklarda bana destek olan hayat arkadaşım Emel Sert'e teşekkür ederim.

Dr. Murat POLAT

KISALTMALAR

TGK: Tekrarlayan Gebelik Kaybı

MUC-1: Müsin-1

GdA: Glikodelin-A

LIF: Leukemia İnhibitory Factor

IL-15: İnterlökin-15

G-CSF: Granülosit Colony Stimulan Faktör

LH: Lüteinizan Hormon

NK: Natural Killer

uNK: Uterin Natural Killer

HLA: Human Lökosit Antijen

ANA: Anti Nükleer Antikor

F5L: Faktör 5 Leiden Mutasyonu

APCR: Aktive Protein C Rezistansı

PTM: Protrombin Mutasyonu

AFAS: Antifosfolipit Antikor Sendromu

MTHFR: Metilentetrahidrofolat Redüktaz Mutasyonu

KDa: Kilodalton

IVF: İnvitro Fertilizasyon

PP14: Plasental Protein 14

E2: Estradiol

IL-6: İnterlökin-6

FSH: Folikül Stimülan Hormon

Bkz: Bakınız



TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Embriyonun İmplantasyonu

Şekil 2: Mucin-1'in Moleküler Yapısı

Şekil 3: Glikodelin-a'nın Moleküler Yapısı

Şekil 4: Leukemia İnhibitory Factor'un Moleküler Yapısı

Şekil 2: İnterlökin-15'in Moleküler Yapısı

Şekil 6: Granülosit Colony Stimulan Faktör'ün Moleküler Yapısı

Tablo-1: Gruplara ait yaş değerlerinin dağılımı

Tablo-2: Gruplara ait gravida ortalamasının dağılımı

Tablo-3: Gruplara ait parite değerlerinin dağılımı

Tablo-4: Gruplara ait abortus değerlerinin dağılımı

Tablo-5: Gruplara ait MUC-1 değerlerinin dağılımı

Tablo-6: Gruplara ait GdA değerlerinin dağılımı

Tablo-7: Gruplara ait LIF değerlerinin dağılımı

Tablo-8: Gruplara ait IL-15 değerlerinin dağılımı

Tablo-9: Gruplara ait G-CSF değerlerinin dağılımı

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada tekrarlayan gebelik kayıplarına; Mucin-1, Glikodelin-A, Lokemia Inhibitory Factor, İnterlökin-15 ve Granulosit Colony Stimulation Faktör kan plazma değerlerinin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Bu çalışma Kasım 2016 ve Aralık 2016 tarihleri arasında Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinde gerçekleştirildi. Çalışmamıza on ikinci gebelik haftasından önce ardı ardına en az 2 defa düşük yapan kırk iki hasta ile hiç düşük yapmamış ve en az 1 tane canlı doğum yapmış olan kırk beş kontrol olmak üzere toplam seksen yedi kişi alınmıştır. Her hastada kan plazma Mucin-1, Glikodelin-a, Lokemia Inhibitory Factor, İnterlökin-15 ve Granulosit Colony Stimulation Faktör düzeyleri incelenmiştir.

BULGULAR: Mucin-1 kan plazma seviyeleri hasta ve kontrol grubunda sırasıyla $0,88\pm 0,45$ ng/ml ve $1,17\pm 0,57$ ng/ml bulunmuştur ($p=0,008$). Glikodelin-A kan plazma seviyeleri hasta grubunda $23,73\pm 3,72$ ng/ml, kontrol grubunda $25,92\pm 4,20$ ng/ml saptanmıştır ($p=0,006$). Lokemia Inhibitory Factor kan plazma seviyeleri ise hasta grubunda $64,59\pm 21,13$ pg/ml, kontrol grubunda $72,14\pm 20,89$ pg/ml bulunmuştur ($p=0,011$). İnterlökin-15'in kan plazma seviyeleri hasta ve kontrol grubunda sırasıyla $38,57\pm 55,70$ ng/ml ve $31,44\pm 43,65$ ng/ml bulunmuştur ($p=0,013$). Granulosit Colony Stimulation Faktör kan plazma seviyeleri ise hasta grubunda $13,07\pm 3,84$ pg/ml, kontrol grubunda $14,11\pm 3,62$ pg/ml saptanmıştır ($p=0,056$).

SONUÇ: Çalışmamızın sonucuna göre tekrarlayan gebelik kaybının patolojisinde Mucin-1, Glikodelin-A, Lokemia Inhibitory Factor, İnterlökin-15 önemli bir role sahip olabilir.

ANAHTAR KELİMELELER: Mucin-1, Glikodelin-A, Lokemia Inhibitory Factor, İnterlökin-15 ve Granulosit Colony Stimulation Faktör, Tekrarlayan Gebelik Kaybı

ABSTRACT

Aim: Our aim was to investigate the plasma levels of Mucin-1, Glycodelin-A, Lokemia Inhibitory Factor, Interleukin-15 and Granulocyte Colony Stimulation Factor in a group of patients who had a history of recurrent pregnancy loss.

MATERIALS AND METHODS: The study was carried out in the Department of Gynecology&Obstetrics of Dumlupınar University, School of Medicine between November 2016 and December 2016. A total of 87 patients were enrolled in the study. The study group included 42 patients who had at least two consecutive miscarriage before 12th weeks of pregnancy. The control group included 45 patients who had at least one live birth and didn't have a history miscarriage. The plasma levels of Mucin-1, Glycodelin-a, Lokemia Inhibitory Factor, Interleukin-15 and Granulocyte Colony Stimulation Factor of patients were evaluated.

RESULTS: The plasma levels of Mucin-1 in the study and control groups were $0,88\pm0,45$ ng/ml and $1,17\pm0,57$, respectively ($p=0,008$). The difference between the plasma levels of Glycodelin-A and Lokemia Inhibitory Factor were also statistically significant (for Glycodelin-A $23,73\pm3,72$ ng/ml and $25,92\pm4,20$ ng/ml, $p=0,006$ for Lokemia Inhibitory Factor $64,59\pm21,13$ pg/ml and $72,14\pm20,89$ pg/ml $p=0,011$). Similarly the plasma levels of Interleukin-15 were significantly different two groups ($38,57\pm55,70$ ng/ml and $31,44\pm43,65$ ng/ml, $p=0,013$). The plasma levels of Granulocyte Colony Stimulation Factor were $13,07\pm3,84$ pg/ml and $14,11\pm3,62$ pg/ml for study and control groups but the difference was not statistically significant($p=0,056$)

CONCLUSION: Altered levels of Mucin-1, Glycodelin-A, Lokemia Inhibitory Factor, Interleukin-15 may have a role in the pathogenesis of recurrent pregnancy loss.

KEY WORDS: Mucin-1, Glycodelin-A, Lokemia Inhibitory Factor, Interleukin-15 and Granulocyte Colony Stimulation Factor, Recurrent Pregnancy Loss, Recurrent Miscarriage.

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), 20. gebelik haftasından önce aynı partnerle en az 2 ardışık spontan düşük olarak tanımlanır (1,2). Yanı sıra Amerikan Üreme Sağlığı Cemiyeti (American Society of Reproductive Medicine-ASRM) TGK'yı iki veya daha fazla sayıda olan ve ardışık olması gerekmeyen gebelik kaybı olarak tanımlamaktadır (3). Üreme Sağlığı ve İnfertilite Derneği'nin (TSRM) son rehberinde ise 3 veya daha fazla sayıda ardışık düşük TGK olarak tanımlanmıştır (4). Wilcox ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada özellikle erken gebelik kaybının endometrial reseptivite ile güçlü bir ilişkisi olduğu göstermişlerdir (5). Bu reseptörlerin embriyo implantasyonu sırasında denetim mekanizmasında rol oynadığı ve TGK olan hastalarda bu reseptivitenin bozulduğu düşünülmektedir (6).

Blastokistin endometriyuma implantasyonu çok kısa bir süre için mümkün olabilmektedir ve bu süreye implantasyon penceresi denmektedir. Bu olay çok komplike olmakla birlikte hem embriyo hem de endometrial reseptörlerin iyi senkronize olmasını gerektirir (7).

Bizim de çalışmamızda inceleyeceğimiz bu reseptörlerden Mucin-1 (MUC-1) daha önce invitro fertilizasyon yapılmış rekküren implantasyon bozukluğu olan hastalarda araştırılmış olup, düzeyleri hem doku hem kanda kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (8). Yine aynı çalışmada Glicodelin-A (GdA) düzeyleri de hem kanda hem de dokuda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur.

Leukemia inhibitory factor (LIF) ise TGK'lı hastaların endometrial biyopsileri ile yapılan bir araştırmada kontrol grubuna göre endometriyumda daha az olduğu görülmüştür ancak bu farkın anlamlı olmadığı belirtilmiştir (9). Bir başka çalışmada ise LIF ve interlökin-15 (IL-15) rekküren implantasyon bozukluğu olan hastaların endometrial biyopsileri ile araştırılmış ve kontrol grubuna göre daha düşük seviyede oldukları izlenmiştir (10).

Granülosit colony stimulan faktör (G-CSF) granülosit proliferasyonu ve farklılaşmasını stimüle eden hematopoetik sitokin olup, embriyonun implantasyonu sırasında maternofetal arayüzden üretilmekte ve desidual ve plasental fonksiyonlarda rol aldığı düşünülmektedir (11,12). Bazı çalışmalar rekürren implantasyon bozukluğu olan hastalarda ve TGK'lı hastalarda sistemik G-CSF uygulamasının gebelik sonuçları açısından faydalı olduğunu göstermiştir (13-15).

Bizde yukarıda anlattığımız çalışmalardan yola çıkarak TGK'lı hastalar ile hiç gebelik kaybı yaşamamış ve en az bir canlı doğumu olan hastaların kanlarında MUC-1, GdA, LIF, IL-15 ve G-CSF düzeylerini karşılaştırmayı amaçladık.

2 GENEL BİLGİLER

Dünya Sağlık Örgütü 1977 yılında 20. gebelik haftasından küçük veya 500 gramdan daha az olan fetüs ve eklerinin tamamının veya bir kısmının uterin kavite dışına atılmasını abortus olarak tanımlamıştır (16). On ikinci gebelik haftasına kadar olan abortuslar erken abortus, on iki ile yirminci gebelik haftaları arasında olan abortuslar ise geç abortus olarak tanımlanmıştır (16,17) .

Abortuslar tamamlanma şekillerine göre 2 başlıkta incelenebilir. İlki inkomplet abortustur ve bu durum embriyo-fetus ve eklerinin bir kısmının uterus kavitesi dışına atılıp, bir kısmının ise kavitede kalması olarak tanımlanmaktadır. İkincisi ise komplet abortustur embriyo-fetus ve eklerinin tamamının uterin kavite dışına atılması olarak tanımlanmaktadır (16-18).

Klinik seyre göre ise abortuslar abortus imminens, abortus insipiens, missed abortus ve septik abortus olarak dört başlıkta incelenir. Abortus imminens, düşük tehdidi anlamına gelir ve yirminci gebelik haftasından önce uterus kaynaklı vajinal kanama olması ancak serviksin kapalı olması şeklinde vuku bulur. Abortus insipiens ise kaçınılmaz düşüktür, yirminci gebelik haftasından önce bol miktarda vajinal kanama, kasıklarda kramp tarzında ağrı ve servikste açıklık-silinme şeklinde klinik vermektedir. Missed abortusta ise yirminci gebelik haftasından önce fetüs ölmüş olup haftalar hatta aylar geçmesine rağmen ölü dokunun uterin kaviteden atılmadığı durum olarak tanımlanmaktadır. Septik abortus, enfekte bir abortus sonucu enfeksiyonun maternal dolaşıma yayılmasına denir (16-18).

Yukarıdaki bu tanımlamalar dışında abortuslar, spontan ve provake abortus olacak şekilde de ayrılmaktadır. Spontan abortuslar; provake abortuslar dışındaki tüm abortusları kapsamakta kendi içerisinde sporadik ve habituel abortus şeklinde ikiye ayrılmaktadır.

2.1 Habituel Abortuslar

Habituel abortus diğer adıyla tekrarlayan gebelik kaybı gebeliğin yirminci haftasından önce iki veya daha fazla ardı ardına düşük yapılmasıdır ve bu durum kadınların %0,5 ile %2 sini etkilemektedir (19). Gebe kalmak isteyen kadınların %15'inde gebelik abortus ile sonuçlanır ve bu kadınların %1-3'ünde klinik olarak TKG görülür (20). Ardışık olarak 3 gebelik kaybı yaşıyan bir kadında bir sonraki gebeliğinde düşük yapma riski %73 ile %84 arasında artmaktadır (21).

2.1.1 Etyoloji

TKG'ya neden olan etyolojik faktörler anatomik, genetik, endokrinolojik nedenler, enfeksiyonlar, immunolojik faktörler, trombofilik bozukluklar, çevresel faktörler ve ovaryan rezerv düşüklüğü olarak sayılabilir (22,23). Etyolojiyi ayrıntılı incelersek;

2.1.1.1 Anatomik Nedenler

Uterus anomalileri tekrarlayan düşük sebebiyle araştırılan olguların yaklaşık %15'inde görülmektedir (24). Bu bozukluklar konjenital ya da edinsel olabilir. Konjenital uterin anomalilerin genel popülasyonda insidansı yaklaşık %1 iken tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda bu oran %3'dür (25-27).

Gebelik kaybı riskini arttıran başlıca uterin anomaliler; uterin leiomyomlar, müllerian gelişim bozuklukları, intrauterin adezyonlar, dietilstilbestrol kullanıma bağlı uterin anomaliler, endometrial polipler ve servikal yetmezlik olarak sıralanabilir.

Müllerian anomalisi olan hastalarda endometrial ve myometrial kapasite azalmıştır, endometrial gelişim anormaldir ve uterus vasküleritesi azalmıştır. Bu nedenlerin sonucunda TKG, preterm doğum ve malprezentasyon riski artmış durumdadır (28,29).

2.1.1.2 Genetik Nedenler

Ebeveynlerin kromozom anomalileri TGK'nın %2-5'inden sorumludur. İlk trimester gebelik kayıplarının %50'sinde, ikinci trimester kayıplarının %30'unda ve ölü doğumların %3'ünde kromozomal anomali bulunmaktadır (30,31). Spontan abortuslarda tespit edilmiş olan kromozomal anomalilerin %90'ı anöploididir ve geri kalan kısmı ise translokasyonlar, inversiyonlar ve mozaizmlerdir.

Tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan olguların büyük bir kısmında spontan abortuslardan farklı olarak yapısal anomaliler görülür. Bunlar içinde en sık görüleni dengeli translokasyonlardır. TGK yaşayan çiftlerin birinde tespit edilen dengeli translokasyon oranı %2-5 arasında olup normal popülasyonda bu oranın %0,2 olduğu dikkat çekmektedir. Bu translokasyon daha çok maternal kaynaklıdır. Translokasyonların 2/3'ü resiprokal, 1/3'ü robertsonian tipidir. Kromozomal inversiyonlar translokasyonlardan daha nadir gelişir (32).

Tetraploidi ve triploidi diğer genetik anomalilerdendir ve anormal fertilizasyona bağlı gelişirler ancak yaşamla bağdaşmazlar. Tek gen mutasyonlarından TGK'ya neden olduğu ispatlanmış olan myotonik distrofi otozomal dominant geçişlidir (33). Tanatoforik displazi ve tip 2 osteogenezis imperfecta fetüsü etkileyen ve abortuslara neden olan diğer otozomal dominant bozukluklardır.

2.1.1.3 Enfeksiyonlar

Abortusa yol açan enfektif ajanlarla ilgili bazı teoriler bulunmaktadır. Bu teoriler; endotoksin, ekzotoksin veya sitokinler gibi toksik metabolik ürünlerin fetoplasental yapıyı, uterusu veya fetüsü etkileyerek gebeliği sonlandırabileceği; endometriuma assendan yolla ulaşarak kronik endometrit yaparak embriyo implantasyonunu bozabilecek olan klamidya, üroplazma ve mikoplazma gibi mikroorganizmalar ve son olarak plasental enfeksiyona bağlı olarak plasental yetmezliğe neden olup gebelik kaybına yol açabilme şeklindedir. Günümüzde pek çok mikroorganizmanın düşüklere neden olabileceği söylene de, tekrarlayan gebelik kayıplarında hiçbir ajanın bu süreçten sorumlu olduğuna dair kanıt bulunamamıştır (34,35).

2.1.1.4 Çevresel Faktörler

Gebelik kaybına zemin hazırlayan çevresel faktörler arasında sigara, alkol, aşırı kahve tüketimi ve diğer kimyasallar sayılabilir. Alkol kullanımı spontan gebelik kaybı riskini arttıran ve etkisi doza bağımlı olduğu bilinen bir

teratojendir (36). Yine doza bağımlı olarak sigaranın da gebelik kaybı riskini yükselttiği bilinmektedir (37). Sigara ve alkol tüketimi birlikte olur ise bu risk daha da artabilmektedir. Abortusa neden olabilen diğer maddeler ise kokain, radyasyon, anestetik gazlar ve civa, kurşun gibi ağır metaller olarak sayılabilir (38).

2.1.1.5 Endokrinolojik Nedenler

Abortusa yol açan başlıca endokrinolojik nedenler arasında diyabet, tiroid hastalıkları ve luteal faz defekti olduğu düşünülmektedir.

Hipotiroidizm ister subklinik isterse gizli olsun tedavi edilmediği takdirde gebelik kaybına neden olabilir. Yapılan bir çalışmada tedavi edilerek tiroid fonksiyonları normal düzeye çekilmiş olan hipotiroidili gebeler ile tedavi almamış veya yetersiz tedavi almış olan hipotiroidili gebeler karşılaştırılmış ve ikinci grupta gebelik kaybı oranlarının belirgin düzeyde yüksek olduğu izlenmiştir (39). Bir meta-analizde ise otoimmün tiroidit ile TGK arasında yüksek derecede anlamlı ilişki bulunmuştur (40). Hipotiroidizm ile gebelik kaybı ilişkisi bu kadar net olmasına rağmen hipertiroidi ile gebelik kaybı arasında ilişki olduğu düşünülmemektedir (41).

Glisemik kontrol ile spontan abortus arasında net bir ilişki vardır. İnsülin bağımlı diyabeti olan gebelerde glisemik kontrol kötü olduğu takdirde diyabetik olmayan gebelere göre spontan abortus oranı iki-üç kat artmıştır (42,43). Diyabetik hastalarda hemoglobin A1c seviyesi %7,5 altında olmasını ve bu düzeyin üzerinde bir hemoglobin A1c seviyesi olduğu takdirde gebe kalmamaları önerilmektedir.

TGK'ya neden olabileceği düşünülen bir diğer endokrin patoloji ise luteal faz defektidir. Bu defekt plasenta veya korpus luteum denilen yapılardan gebelik için gereken düzeyden daha az miktarda progesteron salınmasıdır. Ancak luteal faz defekti ile TGK arasındaki ilişki kesin olarak ispatlanmamıştır (44).

Polikistik over sendromunun da TGK'ya neden olabileceği araştırılmıştır ve bazı mekanizmalar öne sürülerek nedeni açıklanmaktadır.

İnsülin sekresyonunun fazla olması ve bunun overlere etkileri, luteinizan hormon yüksekliği, hiperandrojenemi düşünülen mekanizmalardır fakat bazı çalışmalar TGK ile polikistik over sendromu arasında ilişki olmadığını öne sürmüştür (45).

2.1.1.6 İmmunolojik Nedenler

Gebelik sırasında annenin immun sisteminde paternal antijenlere karşı aşırı bir reaksiyon oluşması ve sitokin üretiminin TGK'ya neden olabileceği öne sürülmüştür (46). TGK'lı olgularda öne sürülen mekanizmalar; aşırı aktif uterin natural killer (uNK) ve makrofaj hücrelerinin trofoblast hücrelerine karşı reaksiyon oluşturması bunun yanı sıra sitokinlerin ayrıca trofoblast hücrelerine direkt olarak etki etmesi ve plasental kan akışı azalmasına karşı oluşan sitokinlerin plasental damarlarda tromboza neden olması şeklinde sıralanabilir (47).

Endometriumda bulunan natural killer (NK) hücresi çoğunlukla CD56^{bright} olup trofoblast hücrelerine karşı toksik etkileri daha azdır. TGK öyküsü olan kadınların endometrial dokularında NK hücreleri diğer kadınlara oranla daha yüksek bulunmuştur. Bunun yanı sıra endometrial CD56^{bright} hücre defekti olması gebelik kaybı riskini arttırabilmektedir (48-50). Birçok çalışmada da TGK'sı olan kadınlarda endometrial uNK sayısının arttığı gösterilmiştir (48,51,52)

TGK öyküsü olan ve olmayan kadınların karşılaştırıldığı bir meta-analizde gebeliğin ilk trimesterinde TGK öyküsü olan olguların IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 üretiminin sağlıklı gruba göre azaldığı ve interferon- γ , tümör nekrozis faktör- α ve tümör nekrozis faktör- β üretiminin ise arttığı gösterilmiştir (53).

Bunların yanı sıra mannoz bağlayıcı lektin seviyesinin düşük olması TGK ile ilişkili bulunmuş olup bu hastalarda bu molekülün bakılması önerilmektedir (54). Human Lökosit Antijen (HLA) grubundan HLA-G TGK öyküsü olan olgularda daha az bulunmuştur ayrıca HLA-D1 ve HLA-DR3 aleli olanlarda da TGK riski yükselmiştir (55). Son olarak ise Anti Nükleer Antikor

(ANA) pozitifliği TGK öyküli kadınların bir kısmında tespit edilmiştir ve bundan dolayı TGK öyküsü olanlarda ANA pozitifliğine bakılması önerilmektedir (56).

2.1.1.7 Trombofilik Bozukluklar

Trombofilik bozukluğu olanlarda desidual damarların trombozuna bağılı olarak plasental infarkt, preeklampsi, uteroplakental yetmezlik ve fetal kayıp gibi komplikasyonlar daha sık izlendiğinden bunun TGK'da rol aldığı düşünölmüştür. Ancak ilk trimesterde plasenta tam gelişmemiştir ve buna bağılı olarak plasental gelişim az olduğu için trombofilisi olanlarda ilk trimester gebelik kayıpları teoride beklenmemektedir.

Kalıtsal trombofililerle erken gebelik kayıpları ve tekrarlayan gebelik kayıpları arasındaki ilişki şüphelidir. Klinikte rutin trombofilik taraması; kalıtsal trombofililer ile TGK arasında ilişkiye bakılan çalışmaların çelişkili olması ve antitrombotik tedavi ile plaseboyu karşılaştıran randomize çalışma yapılmamış olmasından dolayı halen tartışmalıdır. (57-64)

Trombofililer içinde TGK ile ilişkili olduğu düşünölenler; Faktör 5 Leiden mutasyonu (F5L), aktive protein C rezistansı (APCR), protrombin gen mutasyonu (PTM) ve antifosfolipit antikor sendromudur (AFAS). Bu trombofililer arasından sadece AFAS kabul edilmiş bir TGK nedenidir. Metilentetrahidrofolat redüktaz mutasyonu (MTHFR), protein C eksikliği ve antitrombin 3 eksikliğinin TGK ile ilişkili olduğu düşünölmüş ancak yapılan çalışmalarda bu hastalıklar ile TGK arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (57-61).

F5L kalıtsal trombofililerin en sık göröleni olup APCR olgularının %90'ında tespit edilmektedir (65). Otozomal dominant geçişli olan bu hastalık mutasyona uğramış olan faktör 5'in vücuttaki doğal antikoagölanlara dirençli hale gelmesi sonucunda kanda trombin artışı ile karakterizedir. Bu mutasyon homozigot ya da heterozigot olabilir, her iki durumda da gebelik kaybı riski artmıştır (57). Hastalığın rutin taraması gerekli görölmemektedir lakin

hastanın anamnezinde venöz tromboemboli, TGK, plasenta dekolmanı, intrauterin gelişme geriliği öyküsü bulunanlarda tarama önerilmektedir (66).

APCR de açıklanamayan TGK'larda %9 ile %38 arasında bulunmaktadır. Özellikle F5L mutasyonu ile birlikte olduğunda fetal kayba neden olma riski artmıştır (67). F5L mutasyonu olan ve kontrol grubu gebelerin karşılaştırıldığı bir çalışmada F5L mutasyonu olan gebelerde TGK ihtimalinin artmış olduğu görülmüş olup %80 kadarının 16 hafta ve altındaki gebeler olduğu izlenmiştir (68).

PTM gebelikte oluşan tromboembolizmin yaklaşık olarak %17'sinden sorumludur (69). Bu mutasyon genel popülasyonun %2'sinde tespit edilmiş olup ülkemizde ise %1,2-2,7 arasında izlenmektedir (70). Bu hastalığın TGK riskini 3 kat kadar arttırdığı ve TGK hastalarının %4 ila %9'unda olduğu tespit edilmiştir (57).

AFAS gebeliğin en sık görülen edinsel trombofilisi olup otoimmün bir hastalıktır ve vasküler trombozlara neden olur (71). TGK olgularının yaklaşık %5 ila %15'lik bir kısmında görülen bu hastalık desidual vaskülopati, intravillöz infarktlar ve intervillöz trombüsler sonucunda oluşan fetal hipoksi ile gebelik kayıplarına neden olur (72). 3 veya daha fazla 10 hafta altı gebelik kaybı öyküsü olan bütün gebeler AFAS açısından araştırılmalıdır (73).

2.1.1.8 Over Rezervi

Overlerde follikülogenez ve steroidogenez aktivitelerini yapan follikül havuzunun büyüklüğü, oositlerin kalitesi over rezervi olarak tanımlanır. Over rezervini ölçmek için anti-müleryan hormon, menstrual siklusun üçüncü günü folikül stimulan hormon (FSH) ve estradiol (E2) gibi statik testlerin yanı sıra klomifen sitrat testi, GnRHa stimülasyon testi, eksojen FSH stimülasyon testi gibi dinamik testler de kullanılabilir (74).

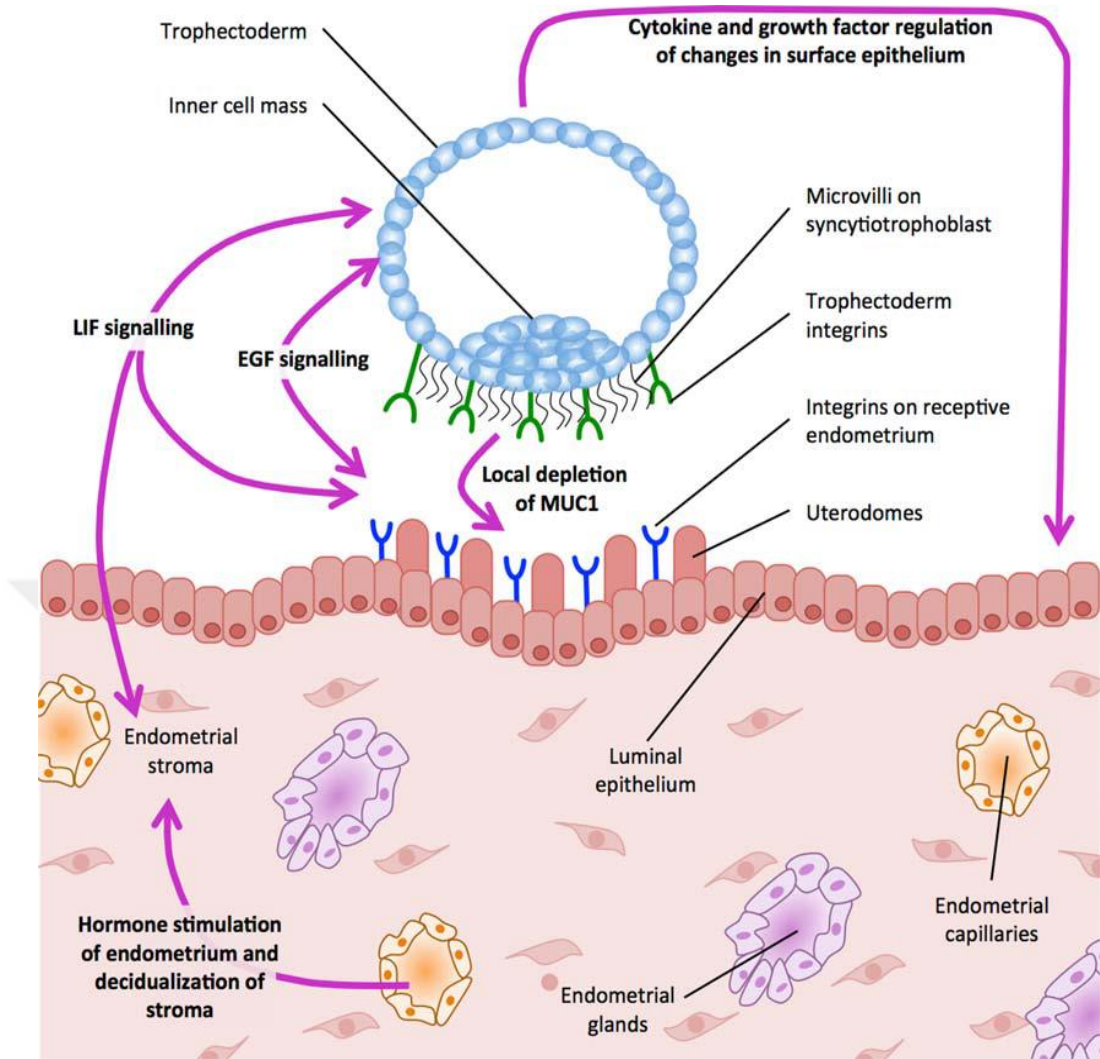
Yapılan bir çalışmada nedeni belirlenemeyen TGK öyküsü olan hastaların menstrual siklus üçüncü gün FSH ve E2 düzeyleri karşılaştırılmış ve normal popülasyona göre daha yüksek bulunmuştur. Artan FSH ve E2

oosit sayısını ve kalitesini düşürecek, bu oositlerden oluşan embriyolarda daha fazla kromozomal anomali ve gebelik kaybı olma riski artacaktır (75).

2.2 Embriyo İmplantasyonu

Embriyonun uterus duvarına implante olması yalnızca insanda değil tüm memelilerde olan ortak bir özelliktir. Embriyonun implantasyonu fertilizasyondan yaklaşık 6 ila 7 gün sonra gerçekleşmektedir ve bu olay appozisyon, adezyon ve invazyon olarak 3 kısımda incelenmektedir. İmplantasyonun başarılı olması için endometriumun östrojen ve progesteron tarafından kabule hazır hale getirilmiş olması gerekmektedir. Başarılı bir implantasyon hem embriyonik hem de endometrial faktörlere bağlıdır (32).

Menstruel siklus boyunca endometrium embriyonik implantasyon için değişikliğe uğrar. Endometriyum luteal fazda genel olarak "implantasyon penceresi" olarak adlandırılan süre boyunca embriyoya karşı duyarlıdır. Bu süreçte endometriumda implantasyonu kolaylaştıracak proteinler sentezlenir(76-78). Bu dönemde epitel yüzey hücrelerinin apikalinde mikrovillus ve silialar azalır ve lümen içine doğru pinopod denen çıkıntılar oluşur (79). Bu pinopodlar blastokistin implantasyonunda önemli role sahiptir.



Şekil 3 Embriyo İmplantasyonu (80)

Pinopodlar, ilk olarak 1958 yılında farelerde tanımlanan endometrium epitelinin çıkıntılarıdır ve daha sonra insan endometriumunda da elektron mikroskopisi ile tanımlanmıştır (81,82). Pinopodlar, insan endometriyum epiteliumundaki implantasyon penceresini tanımlayan klasik biyolojik belirteçler olarak iyi bilinmektedir (83). Çok miktarda pinopod implantasyon başarısı ile korelasyon gösterir ve çoklu implantasyon başarısızlığı olan birçok hasta pinopod üretimi başarısız olmaktadır (84). Bazı araştırmacılar, pinopodların implantasyon penceresi boyunca 48 saatten fazla bir süre endometriumun yüzeyinde bulunmadığını ve maksimum reseptivite süresinin keskin bir şekilde çizildiğini belirtmektedir. Pinopodların yanı sıra bu süreçte

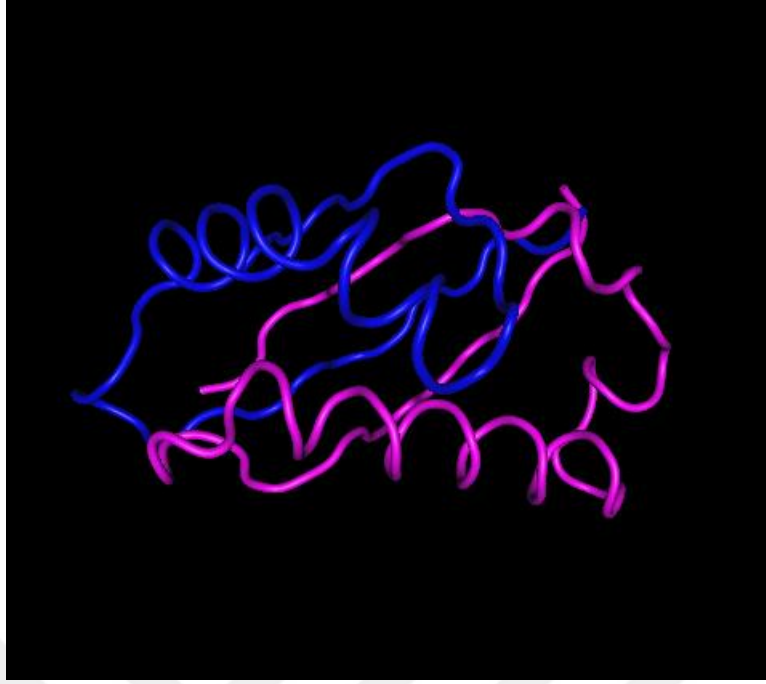
görevli olan bazı moleküller gösterilmiştir. Bu moleküllerin bizim çalışmamızda araştırma konusu olan bazılarını yakından inceleyeceğiz.

2.2.1 Mucin-1

Müsinler insan endometrium epitelyal hücreleri de dâhil olmak üzere epitelyal yüzeylerde bulunan, yüksek oranda glikozile edilmiş iki yüz elli kilodaltonu (KDa) aşan ağırlığa sahip yüksek molekül ağırlıklı bir glikoprotein ailesidir (Şekil-2) (85,86).

Bir antiadezyon molekülü olan MUC-1, blastokistlerin endometriyuma adezyonunu önler. İmplantasyon penceresi boyunca MUC-1 sentezinin azalması embriyo ve endometrium arasındaki temasa izin vermektedir (87). MUC-1 sentezinin zamanında inhibe edilmesi endometrial reseptivite açısından çok önemli kabul edilmektedir (88). Ayrıca MUC-1'in endometriuma yönelik bakteriyel ve proteolitik saldırılara karşı lubrikasyon ve koruma sağladığı düşünülmektedir (89,90).

MUC-1 blastokistin implantasyon fazında önemli bir rol oynayan hücre adezyon moleküllerinin sentezini azaltmaktadır dolayısıyla nispeten düşük seviyelerdeki MUC-1'in implantasyon sırasında başarılı bir embriyo-endometrium etkileşimi açısından hayati olduğu hipotezi öne sürülmüştür (88-92).



Şekil 4 MUC-1'in Moleküler Yapısı (93)

İmplantasyon penceresindeyken endometrial MUC-1 sentezi TGK öyküsü olan kadınlarda kontrol grubuna göre sıra dışı derecede düşük bulunmuştur (94-96). Buna ek olarak, büyük ölçüde azaltılmış MUC-1 sentezinin, endometrial implantasyon sırasında bağışıklık sistemini bozabileceği ve böylece implantasyon sürecini olumsuz şekilde etkileyebileceği izlenmiştir (97). Ayrıca, MUC-1 T lenfosit hücrelerinde bir immuno-modülatör olarak ortaya çıkmakta ve yabancı maddelere karşı savunma duvarı olarak hareket ederek implante olmuş embriyoları korumaktadır (98). Bu nedenle MUC-1 ekspresyonundaki aşırı düşüşler bu koruyucu etkiyi azaltabilir ve embriyoları saldırıya açık bırakabilir. Sonuç olarak MUC-1'in endometrial reseptiviteyi belirlemede önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür (92).

Yapılan bir çalışmada fertil ve İnvitro Fertilizasyon (IVF) sonrası tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan kadınların endometrium biyopsileri ve kan örneklerinde MUC-1 seviyeleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda fertil grubun MUC-1 seviyesi hem kan hem

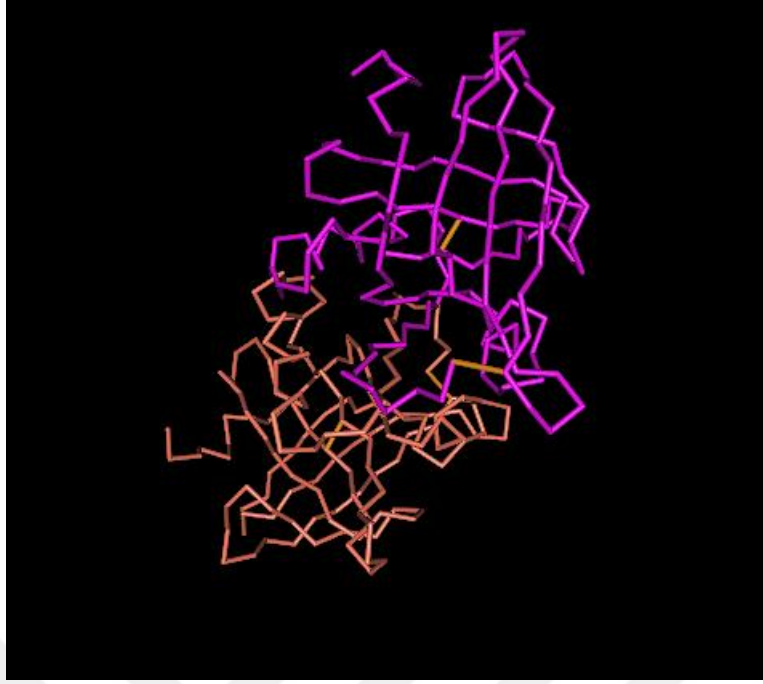
endometriumda tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olanlara göre daha yüksek izlenmiştir. Ayrıca MUC-1 miktarının kan ve endometriumda korele olduğu izlenmiştir (8).

2.2.2 Glikodelin

Plasental protein 14 (PP14) olarak da bilinen GdA implantasyon ve erken gebelik sırasında en bol bulunan glikoprotein olup ayrıca uterusdaki progesteron ile düzenlenen en yaygın proteindir (99). Sentez ve salınımı progesteron tarafından düzenlenmektedir (100). Fetal allograftın maternal immun rejeksiyonunun önlenmesinde faydalı bir rolü olan bir immun modülatördür (101).

Bu glikoprotein sperm-zona etkileşimini inhibe eder ve implantasyon sırasında endometriumu bu olaya hazırlamada hayati bir rol oynadığı savunulmaktadır (102,103). Ayrıca GdA'nın sağlıklı bir gebeliğin devam etmesi için gerekli olduğu da öne sürülmüştür çünkü TGK ve açıklanamayan infertilite ile ilişkisi ortaya konmuştur (104-107).

Günümüze kadar fertil ve infertil kadınlar üzerinde GdA düzeylerini araştıran yayınlarda değişik sonuçlar vardır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada GdA'nın potansiyel olarak proinflamatuvar olan monositlerde apoptozisi uyardığı ve böylece GdA'nın başarılı bir gebelik için gerekli olan anti-inflamatuvar ortamın sürdürülmesinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (108). Ayrıca yapılan çalışmalarda endometrial biyopsilerdeki GdA ile kan E2 düzeyi arasında pozitif korelasyon bulunmuş olup ovaryan rezerv düşüklüğünün GdA üretimini azaltabileceği öne sürülmüştür (109) ve bu endometrial gen ekspresyon çalışmaları ile doğrulanmıştır (110).



Şekil 5 GdA'nın Moleküler Yapısı (111)

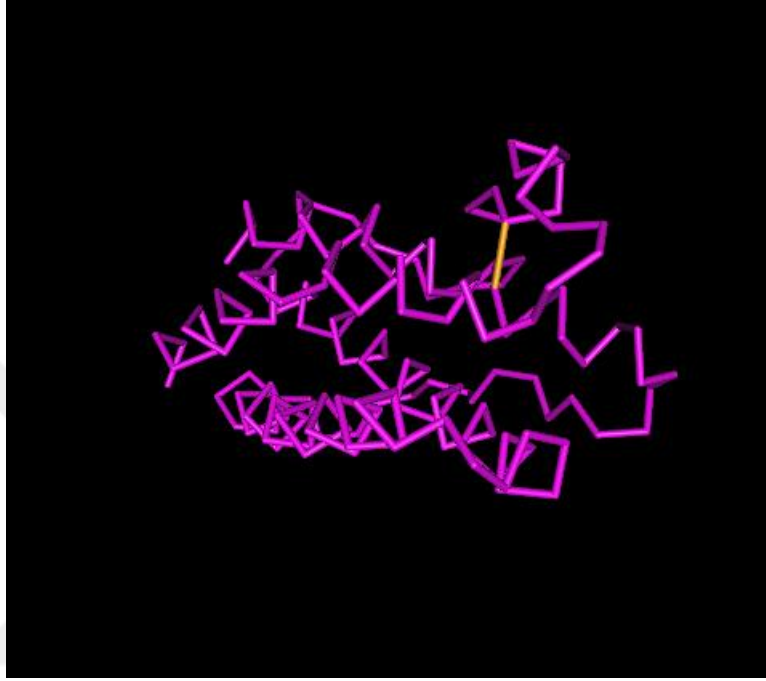
Yapılan bir çalışmada fertil ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan kadınların endometrium biyopsileri ve kan örneklerinde GdA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda fertil grubun GdA seviyesi hem kan hem endometriumda tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olanlara göre daha yüksek izlenmiştir. Ayrıca GdA'nın kan ve endometriumda korele olduğu izlenmiştir (8)

2.2.3 Leukemia İnhibitory Factor

Birçok sitokin ve büyüme faktörü endometriumda implantasyon ile eş zamanlı olarak sentezlendiği için uterin reseptivite için biyolojik belirteç olarak belirlenmiştir. Bunlardan biri de LIF'tir (112).

LIF, interlökin-6 (IL-6) ailesine ait bir pro-inflamatuvar sitokindir (113-115).LIF hücre membranına bağlı, çok işlevli ve yüksek oranda glikozile edilmiş molekül ağırlığı 38 ile 67 KDa arasında değişen bir proteindir (116). LIF, farelerde embriyo implantasyonunun temel bir düzenleyicisidir ve birçok memeli türünde olduğu gibi insanlarda da gerekli olduğu düşünülmektedir. Düzenlenmemiş LIF sentezi kusurlu implantasyona bağlı kadın infertilitesiyle

ilişkilendirilmiştir (117-119). LIF'in implantasyondan hemen önce endometrial glandular epitelyumda maksimum düzeyde sentezlendiği gösterilmiştir (120-122)



Şekil 6 LIF'in Moleküler Yapısı (123)

LIF, integrin-b3, heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü benzeri büyüme faktörü ve MUC-1 gibi birçok moleküler belirteç pinopod oluşumunda rol oynamaktadır (124-126). LIF, erken implantasyon penceresi boyunca endometrial reseptiviteyi etkileyen en önemli sitokinlerden biri olarak, plasentada trofoblast fonksiyonunu ve vasküler oluşumu düzenler. LIF ve reseptörünün insan endometriumunda sentezi, peri-implantasyon evresinde pik düzeylerine ulaşır (122,126). LIF; endometrium ve blastosist arasındaki olaylarda rol oynar gibi görünmekte ve implantasyon anındaki endometriumda eksprese edilmektedir (113,120). Daha önce yapılan bir çalışmada açıklanamayan infertilitesi olan kadınların uterin yıkama sıvılarında LIF konsantrasyonu daha düşük bulunmuştur (127).

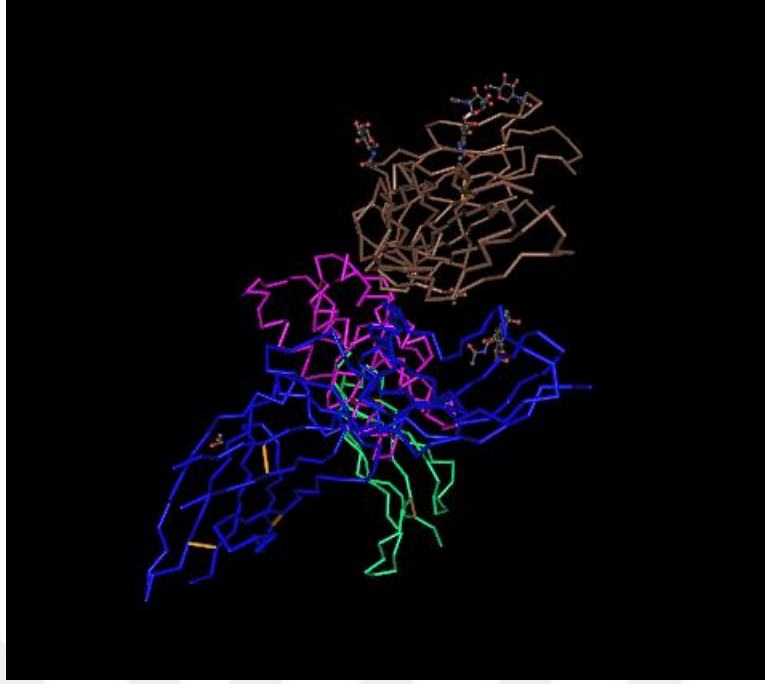
Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise TKG'lı hastalar ile normal popülasyon karşılaştırılmış LIF düzeyleri hem endometrial dokuda hem de kan serumunda anlamlı derecede düşük bulunmuştur (128)

2.2.4 İnterlökin-15

IL-15 farklı doku ve hücrelerde iki izoform şeklinde sentezlenmektedir (129). IL-15, lokal doku inflamatuvar ve uyarlanabilir immun tepkinin, özellikle NK hücre çoğalması, sitotoksik öldürme ve interferon- γ ve tümör nekrozis faktör- α üretiminin anahtar düzenleyicisidir (129-132). Ayrıca IL-15'in anjiogenez ve fibrozis gibi non-immun fonksiyonları da bulunmaktadır (133). Patolojik bozukluklarda IL-15 seviyesinin arttığı bildirilmiştir, bu hastalıklar; romatoid artrit, ülseratif kolit, astım ve kanser gibi immun ve kronik inflamatuvar reaksiyonu içermektedir (134).

IL-15 insan endometriumunun hem stromal hem de epitelyal hücreleri ile plasenta ve desiduada da sentezlenmektedir (135,136). IL-15 sentezi menstrual siklusun çoğu döneminde endometriumun epitelyal hücrelerinde stromal hücrelere göre daha fazla olmaktadır ancak desidualizasyondan sonra stromal hücrelerde daha fazla sentezlenmektedir (135,137).

Uterin natural killer (uNK) hücreleri menstrual siklusun sekretuar fazında endometriumdaki major lökositler olduğu ve ilk trimester desiduasında sayılarının arttığı gösterilmiştir (138). Birçok çalışmada TKG'sı olan kadınlarda endometrial uNK sayısının arttığı gösterilmiştir (48, 51, 52). IL-15 NK hücre proliferasyonu için güçlü bir indükleyicidir ve bu hücrelerin sitokin üretiminin artırılması ile sitotoksitesinin güçlendirilmesinde gereklidir (139). Ayrıca IL-15'in endometriuma periferik kan NK hücrelerinin alınması ve bunların uNK hücrelerine farklılaşması açısından önemli olabileceği de öne sürülmüştür (140, 141).



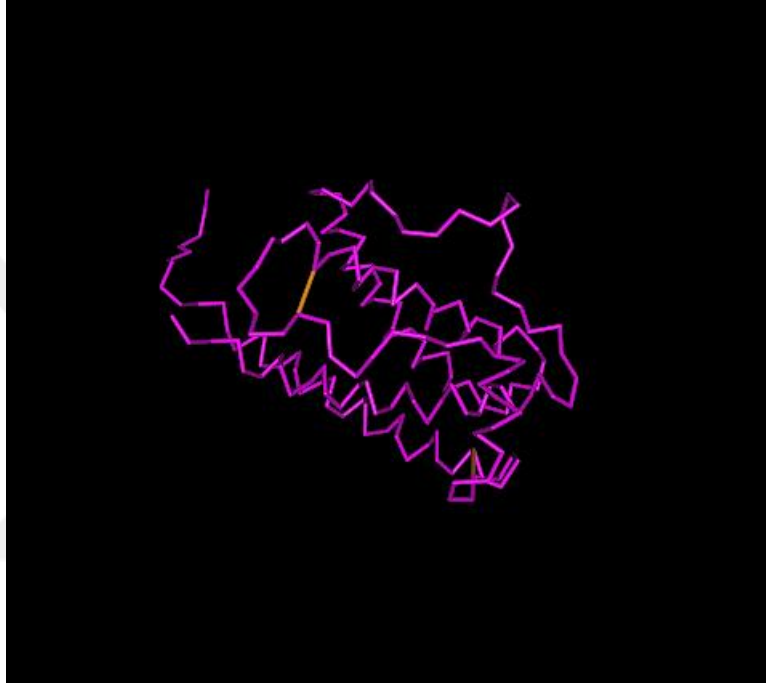
Şekil 7 IL-15 Moleküler Yapısı (142)

Chegini ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, TGK öyküsü olan kadınların normal fertil kadınlara kıyasla endometriumun stromasında ve glandüler epitelinde IL-15 ekspresyon düzeylerinde yükselme olduğu öne sürülmüştür (143). Bir başka çalışmada ise tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınlarda endometrial stromadaki IL-15 düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (10).

2.2.5 Granülosit Colony Stimulan Faktör

İnsanlarda 1985 yılında tanımlanan ve protein yapıda olan G-CSF yüz yetmiş dört aminoasitten oluşmaktadır (144-146). G-CSF reseptörleri sitokin reseptör süperfamilyasının üyesidir. Sitokin reseptör süperfamilyası; tirozin fosforilasyonu ve janus protein kinaz aktivasyonu ile işlevlerini yerine getirmektedirler (147,148). Adından da anlaşılacağı üzere reseptörler, miyeloproliferatif doku ve hücrelerinin birçok tipinde, örneğin makrofajlar, NK hücreler gibi monositik hücrelerde, T lenfositlerde ve aynı zamanda plateletlerde de bulunurlar (149-151). Preovulatuvar follikülün matürasyonu sırasında, G-CSF reseptörünün ekspresyonu artmakta ve reseptör sentezi

luteinizasyona uğramış granuloza hücrelerinde de gerçekleşmektedir (152,153). Ayrıca menstruel siklus boyunca östrojen tarafından farklı miktarlarda etkilenen G-CSF reseptör sentezi endometrial hücrelerde de meydana gelmektedir (154,155). Ayrıca desidua ve plasentada da G-CSF reseptörü olduğu gösterilmiştir (156).



Şekil 8 GCSF'nin Moleküler Yapısı (157)

Scarpellini ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada TGK öyküsü olan kadınlar iki gruba ayrılmış ve bir gruba günlük 1 µg/kg G-CSF tedavisi verilmiş diğer gruba ise plasebo verilmiştir. G-CSF tedavisi alan grupta hem abortus oranı daha düşük hem de canlı doğum oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir (158). Yapılan bir başka çalışmada ise TGK'sı olan kadınlar in-vitro fertilizasyon yapıldıktan sonra üç gruba ayrılmış ve ilk gruba G-CSF tedavisi, ikinci gruba placebo, üçüncü gruba ise düşük molekül ağırlıklı heparin, asetilsalisilik asit ve prednizolon tedavisi verilmiştir. Çalışma sonuçları incelendiğinde G-CSF tedavisi alan grupta gebelik oranının diğer iki gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (13).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hasta Seçimi

Çalışmamız Dumlupınar Üniversite Kütahya Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde Kasım 2016 ile Aralık 2016 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmaya on ikinci gebelik haftasından önce ardı ardına iki ve daha fazla düşük yapmış olan kırk iki TGK öyküsü olan hasta ile hiç düşük yapmamış ve en az bir canlı doğumu olan sağlıklı kırk beş kontrol olmak üzere toplam seksen yedi kişi dâhil edildi. Çalışma için gerekli etik kurul izni Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan alındı (Karar no: 11/11/2016-11).

Etik kurul iznini takiben hastane kayıtları taranarak tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hastalar dökümanente edildi. Hastalara ulaşılarak çalışmamız hakkında bilgi verildi. Bu hastalardan çalışmamıza katılmayı kabul eden ve dâhil edilme kriterlerini karşılayan kişiler çalışmaya alındı.

Kontrol grubu hastalar ise hastanemiz polikliniklerine başvuran, kontrol grubu için dâhil edilme kriterlerini karşılayan ve çalışmaya katılmayı kabul eden hastalar arasından seçildi. Hastaların yaş, abortus, parite ve gravida gibi demografik bilgileri alındı. Ayrıca ilaç kullanımı ve kronik hastalıklarını içerecek şekilde tıbbi özgeçmişleri alındı.

3.2 Dahil Edilme ve Dışlama Kriterleri

Çalışmamızda TGK grubu için dahil edilme kriterlerimiz:

1. Hastanın en az iki defa ardışık olarak abortus yapmış olması,
2. En az on sekiz yaşında olması
3. Ovaryan rezerv azlığını dışlamak açısından en fazla otuz beş yaşında olması
4. Hiç canlı doğumunun olmaması

Kontrol grubu için dahil edilme kriterleri ise

1. Hiç gebelik kaybı yaşamamış olması,

2. En az on sekiz ve en fazla otuz beş yaşında olması
3. En az bir tane canlı doğumu olması

Çalışmamızda hem kontrol grubu hem de hasta grubu için geçerli olan dışlama kriterleri:

1. Uterin anomali (septat, bikornat, unikorn uterus vb.) olanlar,
2. Myoma uterisi olanlar
3. Endometrial polipi olanlar
4. Endokrinolojik bozukluklardan diyabet, polikistik over sendromu ve tiroid fonksiyon bozukluğu olanlar
5. Kendisinde veya eşinde TKG'ya neden olabilecek bilinen kromozom anomalisi olması
6. Sigara ve alkol kullanımı olanlar
7. Aktif enfeksiyonu olanlar (çalışmamızdaki moleküllerin seviyelerini etkileyebileceği için)
8. Endometrial reseptiviteyi etkileyebileceği için anormal uterin kanama öyküsü ile oligomenore-amenoresi olanlar, rahim içi araç ve oral kontraseptif kullanımı olanlar
9. En az bir tane trombofili tanısı almış olanlar

3.3 Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışacağımız moleküller özellikle implantasyon penceresinde en yüksek miktarda olduğu için tüm gönüllülerden kanlar bu dönemde alınmıştır. Bu dönem LH pikinden 7 ila 10 gün sonra olduğu için hastaların beklenen menstruasyon tarihinden bir hafta önce kanlar alınmıştır. Kan örnekleri alındıktan sonra 10.000 rpm/dak ile 10 dakika santrifüj edilerek serumları elde edildi. Serumlar steril şeffaf 2 ml'lik eppendorf cryo tüplerine alındı. Örnekler çalışma anına kadar -20°C'lik dondurucuda muhafaza edildi. Numunelerin alınması ve saklanması sırasında numuneler sürekli olarak ışıktan korundu. Serumları hemorajik, ikterik ve lipemik olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

3.4 Biyokimyasal Analiz

Numuler özel bir biyokimya laboratuvarında Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELİSA) yöntemiyle bir Tıbbi Biyokimya uzmanı tarafından çalışıldı.

MUC-1 Elabscience Biotechnology Co.Ltd firmasına ait ELİSA yöntemiyle çalışıldı. Bu ELISA kiti yöntem olarak Sandwich-ELISA kullanılmaktadır. Bu kitte verilen mikro ELISA plakası, İnsan MUC1'e özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, uygun mikro ELISA plaka kuyularına ilave edilir ve spesifik antikor ile kombine edilir. Ardından, insan MUC1 ve Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir tespit antikoru, her bir mikro plakaya ardı ardına iyice ilave edilir ve daha sonra inkübe edilir. Serbest bileşenleri yıkanır. Substrat çözeltisi, her oyuğa eklenir. Sadece İnsan MUC1, biyotinlenmiş tespit antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular mavi renkte görünür. Enzim-substrat reaksiyonu bir sülfürik asit çözeltisi eklenerek sonlandırılır ve renk sarıya dönüşür. Optik yoğunluk (OD) 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri İnsan MUC1 konsantrasyonu ile orantılıdır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür. Daha sonra çizilen kalibrasyon eğrisinden çalışılan örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

GdA Elabscience Biotechnology Co.Ltd firmasına ait ELİSA yöntemiyle çalışıldı. Bu ELISA kiti yöntem olarak Sandwich-ELISA kullanılmaktadır. Bu kitte verilen mikro ELISA plakası, GdA'ya özel bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, uygun mikro ELISA plaka kuyularına eklenir ve spesifik antikor ile bağlanır. Ardından, GdA ve Avidin- Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatına spesifik bir biyotinlenmiş algılama antikoru, her bir mikro plakaya ardışık olarak iyice eklenir ve kuluçkalanır. Serbest bileşenleri yıkanır. Substrat çözeltisi, her oyuğa eklenir. Sadece GdA, biyotinlenmiş tespit antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular renkte mavi olarak görünür. Enzim-substrat reaksiyonu, bir sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir ve renk sarı renge döner. Optik yoğunluk (OD) 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak

ölçülür. OD değeri GdA konsantrasyonu ile orantılıdır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür. Daha sonra çizilen kalibrasyon eğrisinden çalışılan örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

LIF Elabscience Biotechnology Co.Ltd firmasına ait ELİSA yöntemiyle çalışıldı. Bu ELISA kiti yöntem olarak Sandwich-ELISA kullanılmaktadır. Bu kitede verilen mikro ELISA plakası, LIF'ye özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, uygun mikro ELISA plaka kuyularına eklenir ve spesifik antikor ile bağlanır. Ardından, LIF ve Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatı için spesifik bir biyotinlenmiş algılama antikoru, her mikro plakaya ardışık olarak iyice eklenir ve kuluçkalanır. Serbest bileşenleri yıkanır. Substrat çözeltisi, her oyuğa eklenir. Yalnızca LIF, biyotinlenmiş algılama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular renkte mavi olarak görünür. Enzim-substrat reaksiyonu, bir sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir ve renk sarı renge döner. Optik yoğunluk (OD) 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri LIF konsantrasyonu ile orantılıdır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür. Daha sonra çizilen kalibrasyon eğrisinden çalışılan örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

IL-15 Elabscience Biotechnology Co.Ltd firmasına ait ELİSA yöntemiyle çalışıldı. Bu ELISA kiti yöntem olarak Sandwich-ELISA kullanılmaktadır. Bu kitede verilen mikro ELISA plakası, IL-15'e özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, uygun mikro ELISA plaka kuyularına eklenir ve spesifik antikor ile bağlanır. Ardından, IL-15 ve Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir tespit antikoru, her mikro plakaya ardı ardına iyice ilave edilir ve kuluçkalanır. Serbest bileşenleri yıkanır. Substrat çözeltisi, her oyuğa eklenir. Sadece IL-15, biyotinlenmiş tespit antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular renkte mavi renkte görünür. Enzim-substrat reaksiyonu, bir sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir ve renk sarı renge döner. Optik yoğunluk (OD) 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, IL-15 konsantrasyonu ile orantılıdır. Oluşan renk spektrofotometrik

olarak ölçülür. Daha sonra çizilen kalibrasyon eğrisinden çalışılan örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

G-CSF Elabscience Biotechnology Co.Ltd firmasına ait ELISA yöntemiyle çalışıldı. Bu ELISA kiti yöntem olarak Sandwich-ELISA kullanılmaktadır. Bu kitle sağlanan mikro ELISA plakası, Human G-CSF'ye özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştı. Standartlar veya numuneler, uygun mikro ELISA plaka kuyularına ilave edilir ve spesifik antikor ile kombine edilir. Ardından Human G-CSF ve Avidin- Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir tespit antikorunu, her bir mikro plakaya ardı ardına iyice eklenir ve daha sonra inkübe edilir. Serbest bileşenleri yıkanır. Substrat çözeltisi, her oyuğa eklenir. Sadece İnsan G-CSF, biyotinlenmiş tespit antikorunu ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular renkte mavi renkte görünür. Enzim-substrat reaksiyonu bir sülfürik asit çözeltisi eklenerek sonlandırılır ve renk sarıya dönüşür. Optik yoğunluk (OD) 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri İnsan G-CSF konsantrasyonu ile orantılıdır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür. Daha sonra çizilen kalibrasyon eğrisinden çalışılan örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

3.5 İstatistiksel Analiz

Sürekli nicel değişkenler; n, ortalama ve standart sapma olarak, nitel değişkenler ise n, ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdelik değerler olarak ifade edilmiştir. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenler için Mann-Whitney Rank Sum Testi uygulanmıştır. $P < 0.05$ olasılık değerleri önemli olarak kabul edilmiştir. Tüm veri analizleri SPSS 21 paket programları ile yapılmıştır.

4 BULGULAR

Çalışmaya katılan hastalara ait demografik bilgilerin analizi sonucu; TGK öyküsü olan hasta grubunun yaş ortalaması $30,44 \pm 3,91$, kontrol grubunun yaş ortalaması $30,40 \pm 3,68$, çalışmaya katılan bütün kişilerin yaş ortalaması ise $30,41 \pm 3,76$ bulunmuştur (Bkz. Tablo-1).

Tablo-1. Gruplara ait yaş değerlerinin dağılımı

	Grup Sayısı	Yaş Ortalaması	Standart Sapma	p
Hasta	42	30,44	$\pm 3,91$	0,972
Kontrol	45	30,40	$\pm 3,68$	
Toplam	87	30,41	$\pm 3,76$	

Hasta grubunun ve kontrol grubunun gravidasının ortalaması sırasıyla; $3,83 \pm 1,61$, ve $1,80 \pm 0,73$ olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo-2). Hasta grubunun ve kontrol grubunun paritesinin ortalaması ise sırasıyla; 0 ve $1,80 \pm 0,73$ olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo-3). Abortus sayılarında ise kontrol grubunun ortalaması 0, hasta grubunun ortalaması ise $3,86 \pm 1,20$ bulunmuştur (Bkz. Tablo-4).

Tablo-2. Gruplara ait gravida ortalamasının dağılımı

	Grup Sayısı	Gravida	Standart Sapma	p
Hasta	42	3,83	$\pm 1,61$	<0,001
Kontrol	45	1,80	$\pm 0,73$	

Tablo-3. Gruplara ait parite değerlerinin dağılımı

	Grup Sayısı	Parite	Standart Sapma	p
Hasta	42	0	±0	<0,001
Kontrol	45	1,80	±0,73	

Tablo-4. Gruplara ait abortus değerlerinin dağılımı

	Grup Sayısı	Abortus Sayısı	Standart Sapma	p
Hasta	42	2,86	±1,20	<0,001
Kontrol	45	0	±0	

Hastalara ait MUC-1, GdA, LIF, IL-15 ve G-CSF plazma seviyeleri tespit edildi ve gruplar arasında karşılaştırma yapıldı. Buna göre MUC-1 seviyeleri kontrol grubunda ortalama $1,17 \pm 0,57$ ng/ml, hasta grubunda ortalama $0,88 \pm 0,45$ ng/ml olarak saptandı. TGK öyküsü olan hasta grubunda MUC-1 seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük bulundu ($p=0,008$) (Bkz. Tablo-5). GdA seviyeleri; hasta grubunda ortalama $23,73 \pm 3,72$ ng/ml, kontrol grubunda ortalama $25,92 \pm 4,20$ ng/ml olarak saptandı. İki grup arasında yapılan karşılaştırmaya göre TGK öyküsü olan hasta grubuna ait GdA seviyeleri kontrol grubuna ait GdA seviyelerinden istatistiksel anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0,006$) (Bkz. Tablo-6).

Tablo-5. Gruplara ait MUC-1 değerlerinin dağılımı

	Grup Sayısı	MUC-1 Değerleri	Standart Sapma	p
Hasta	42	0,88 ng/ml	±0,45	0,008
Kontrol	45	1,17 ng/ml	±0,57	
Toplam	87	1,02 ng/ml	±0,53	

Tablo-6. Gruplara ait GdA değerlerinin dağılımı

	Grup Sayısı	GdA Değerleri	Standart Sapma	p
Hasta	42	23,73 ng/ml	±3,72	0,006
Kontrol	45	25,92 ng/ml	±4,20	
Toplam	87	24,86 ng/ml	±4,09	

TGK öyküsü olan hasta grubunun LIF seviyelerinin ortalaması 64,59±21,13 pg/ml, kontrol grubuna ait LIF seviyelerinin ortalaması ise 72,14±20,89 pg/ml bulunmuştur. TGK öyküsü olan hasta grubunun ortalama değerinin kontrol grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,011) (Bkz. Tablo-7). IL-15 seviyelerinin ortalaması TGK öyküsü olan hasta grubunda 38,57±55,70 ng/ml, kontrol grubunda ise 31,44±43,65 ng/ml bulunmuştur. Kontrol grubuna göre TGK öyküsü olan hasta grubunda IL-15 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0,013) (Bkz. Tablo-8). G-CSF'in hasta ve kontrol grubuna ait ortalama seviyeleri sırasıyla 13,07±3,84 pg/ml ve 14,11±3,62 pg/ml olarak saptanmıştır. TGK öyküsü olan hasta grubu ve kontrol grubu arasındaki bu farkın istatistiksel anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (p=0,056) (Bkz. Tablo-9).

Tablo-7. Gruplara ait LIF değerlerinin dağılımı

	Grup Sayısı	LIF Değerleri	Standart Sapma	p
Hasta	42	64,59 pg/ml	±21,13	0,011
Kontrol	45	72,14 pg/ml	±20,89	
Toplam	87	68,49 pg/ml	±21,22	

Tablo-8. Gruplara ait IL-15 değerlerinin dağılımı

	Grup Sayısı	IL-15 Değerleri	Standart Sapma	p
Hasta	42	38,57 ng/ml	$\pm 55,70$	0,013
Kontrol	45	31,44 ng/ml	$\pm 43,65$	
Toplam	87	34,88 ng/ml	$\pm 49,67$	

Tablo-9. Gruplara ait G-CSF değerlerinin dağılımı

	Grup Sayısı	G-CSF Değerleri	Standart Sapma	p
Hasta	42	13,07 pg/ml	$\pm 3,84$	0,056
Kontrol	45	14,11 pg/ml	$\pm 3,62$	
Toplam	87	13,60 pg/ml	$\pm 3,73$	

5 TARTIŞMA

TGK yirminci gebelik haftasında önce ardışık olarak 2 veya daha fazla düşük olmasıdır. Ancak bu hastalığın farklı tanımları da bulunmaktadır (19). Örneğin TSRM 2016 yılında yayınlanan kılavuzunda gebeliğin yirminci haftasından önce en az 3 ardışık düşük olması şeklinde tanımlamışlardır (4). ASRM ise en az 2 defa düşük yapılmasını TGK olarak tanımlamıştır ancak bu düşüklerin ardışık olmasının gerekli olmadığını belirtmiştir (3).

TGK'nın tanımı üzerinde net bir uzlaşma olmamakla birlikte etyolojisinde birçok neden suçlanmaktadır. Ancak; hastaların yaklaşık yarısında etyoloji net olarak aydınlatılamamaktadır. Özellikle etyolojinin net olarak ortaya koyulamadığı hastalar ve bu gruba giren hastaların hekimleri tanı ve tedavi için yoğun bir uğraş vermekte ancak bu çabalar çoğu zaman karşılık bulamamaktadır. Bu bağlamda hastaların yarısına yakın bir kısmında etyoloji belirlenemediği için tedavi şansları da olmamaktadır. Günümüzde nedeni belirlenemeyen TGK'da tek yöntem yakın takip ve kontroldür. Bu hastalığın kadınların %0,5 ila %2'sini (19) etkilediği düşünüldüğünde TGK'nın tanı ve tedavisinin sağlık harcamaları açısından oldukça yük getirdiği bilinmektedir. Ayrıca bu hastalar psikolojik olarak da sıkıntıya düşmekte ve evlilikleri dahi tehlikeye girmektedir (159).

TGK öyküsü olan kadınların sonraki dönemde devam eden gebeliklerinde doğum şeklinin genellikle sezaryen olduğu görülmektedir. Bu hastaların sezaryen endikasyonlarına bakıldığında en sık nedenin kıymetli gebelik olduğu bulunmuştur (160,161).

Obstetrik ve jinekoloji alanında bilimsel saygınlığı olan cemiyetlerin TGK tanımlamasını farklı şekilde yapması ve etyolojik nedenlerin yaklaşık yarısının aydınlatılamamış olması bizlere bu durumun nedenleri konusunda bilinmeyen ve netleşmesi gereken birçok bilimsel hadise olduğunu düşündürmüştür. Bu bağlamda çalışmamızın amacı; henüz açıklığa kavuşmamış etyolojik nedenler arasında bulunması muhtemel olan

endometrial implantasyon bozukluklarını ve implantasyonda etkili bir takım sitokinlerin plazma seviyelerini değerlendirmektedir.

Embriyo implantasyonunun başarılı olabilmesi için sağlıklı bir embriyoya ve yine sağlıklı bir endometriuma ihtiyaç vardır. Embriyo ve endometriyumun sağlıklı olması ve aralarında doğru bir iletişim olması implantasyonun başarılı olması için büyük önem arz eder. IVF hastalarındaki tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında da çoğu zaman bu iki unsurdan birinin kusurlu olduğu görülmektedir. Yukarıda bahsettiğimiz gibi birçok çalışma; IVF hastalarındaki tekrarlayan implantasyon başarısızlığı durumunda endometrial reseptivitenin bozulduğunu göstermiştir (8,10,158). Sonuç olarak embriyo implantasyonu için gerekli bir takım belirteçlerin endometrial ekspresyon düzeyleri ve bunların yansıması olan plazma konsantrasyonları hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık gösterebilir. Biz bu hipotezden yola çıkarak; endometriyal reseptivite ve implantasyonun bir parçası olan ve daha önce IVF hastalarındaki tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında çalışılmış olan MUC-1, GdA, LIF, IL-15 ve G-CSF'nin kan plazma düzeylerini TGK'lı hastalar ile kontrol grubu arasında karşılaştırdık.

Çalışmamızın sonuçları göstermiştir ki MUC-1, GdA ve LIF'in ortalama plazma değerleri hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşüktür. Bu farklılık her üç değer için istatistiksel anlama ulaşmıştır (Bkz. Tablo-5-6-7). Kan plazma IL-15 seviyelerinin ise hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde bu farklılık da istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (Bkz. Tablo-8). G-CSF'in ortalama kan plazma değerleri ise hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşüktür fakat bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,56$) (Bkz. Tablo-9).

MUC-1 daha öncede bahsettiğimiz gibi hem bir antiadezyon molekülü hem de T lenfositler üzerine immuno-modülatör etkileri olan bir moleküldür (87,98). İmmüno-modülatör etkisi ile implante embriyoları yabancı etkenlere karşı korumaktadır. Her ne kadar, implantasyon penceresinde MUC-1 seviyesinin nispeten düşük olmasının implantasyon için önemli olduğu öne

sürülse de yapılan çalışmalarda TGK öyküsü olan hastalarda MUC-1 seviyesinin normal popülasyona göre belirgin olarak düşük olduğu gösterilmiştir (8,94-96). Bizim çalışmamızda da literatürdeki önceki çalışmalara benzer şekilde MUC-1 seviyesi TGK öyküsü olan hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Bu paradoksal durum; MUC-1 seviyelerinin implantasyon penceresi sırasında azalmasının blastokistin endometriyuma implantasyonu açısından önemi olsa da, TGK olgularında MUC-1 seviyelerindeki aşırı azalmanın embriyoyu dış etkenlere karşı koruma görevini yerine getirememesine ve dolayısıyla embriyonun dış etkenlere karşı savunmasız kalmasına neden olduğu şeklinde açıklanmaya çalışılmıştır. (97, 98)

GdA'nın proinflatuar monositlerde apoptozisi uyararak gebelik için gerekli olan anti-inflatuar ortamın sürdürülmesinde rol alabileceği öne sürülmüştür (108). Literatürde daha önce yapılmış çalışmalara baktığımızda Tulppala ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada implantasyon penceresinde TGK öyküsü olan hastalar ile normal grubun GdA serum seviyeleri karşılaştırılmış ve TGK grubunda GdA seviyesi daha düşük bulunmuştur (105). Dalton ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada ise yine TGK öyküsü olan hastalar ile normal popülasyon karşılaştırılmış ve bu kadınlara implantasyon penceresi sırasında uterin kaviteye verilen yaklaşık 10 ml steril salin geri aspire edilerek elde edilen yıkama sıvısında GdA seviyesi bakılmış ve TGK öyküsü olan grupta GdA seviyesinin daha düşük olduğunu saptanmıştır (106).

İmplantasyon başarısızlığı olan hastalar üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise implantasyon başarısızlığı olan kadınların normal gruba göre hem endometriyal örneklemelerinde hem de serum düzeylerinde GdA seviyeleri daha düşük bulunmuştur (8). Bizim çalışmamızda ise kan plazma GdA seviyeleri literatürü destekler nitelikte; hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur.

Daha önce yapılan birçok çalışmada LIF ile embriyo implantasyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. LIF'in implantasyondan hemen önce

endometriumun glandular epitelinde sentezinin maksimum düzeye ulaştığı bilinmektedir (120-122). Peri-implantasyon evresinde pik düzeylerine ulaşan LIF'in plasental trofoblast fonksiyonu ve plasental vasküler oluşuma olan etkileri de daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (122,126).

Laird SM ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada implantasyon başarısızlığı olan hastaların uterin yıkama sıvılarındaki LIF konsantrasyonu normal popülasyona göre daha düşük bulunmuştur (127). Xu B ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise LIF'in endometrial ekspresyonu hem TGK öyküsü olan kadınlarda hem de normal kadınlarda incelenmiş ancak iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır (9). Yapılan bir başka çalışmada ise TGK öyküsü olan hastalar ile normal popülasyon karşılaştırılmış LIF düzeyleri hem endometrial dokuda hem de kan plazmasında anlamlı derecede düşük bulunmuştur (128) Bizim çalışmamızda ise hasta grubunda LIF düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Normal implantasyon süreci içerisinde çok önemli bir yere sahip olan LIF'in TGK öyküsü olan hastalarda daha düşük bulunması beklenen bir sonuç olabileceği gibi literatürde bu konuda yapılmış pek çok çalışma ile de uyum göstermektedir.

Chegini ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada TGK öyküsü olan kadınlarda endometrial IL-15 sentezinin arttığı gösterilmiştir (143). Benzer şekilde Mariee ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan kadınlarda endometrial IL-15 seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (10). Çalışmamızda kan plazma IL-15 seviyeleri hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksek bulunmuş olup literatürdeki endometrial seviyeleri ölçen çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.

IL-15'in uNK hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkili olduğu ve bunun yanında bu hücrelerin sitotoksitesini arttırdığı bilinmektedir (139). NK hücrelerinin uNK hücrelerine dönüşmesinde IL-15'in önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (140, 141). TGK öyküsü olan kadınlarda uNK sayısının arttığı bilinmektedir (48, 51, 52). Buradan yola çıkarak IL-15 seviyelerindeki

artmanın NK hücrelerinin uNK hücrelerine daha fazla dönüşümüne sebep olarak implantasyonu bozabileceği düşünülebilir. Bu durum implante olan sağlıklı embriyoların bile kaybedilmesine sebep olabilir.

Yakın zamanda yapılan randomize placebo kontrollü bir çalışmada daha önce TGK öyküsü olan ve IVF tedavisi planlanan hastalar üç gruba ayrılmış; bir gruba intrauterin G-CSF, bir gruba düşük molekül ağırlıklı heparin, asetilsalisik asit ve prednizolon, bir gruba da placebo verilmiştir. Sonuç olarak G-CSF grubunda diğer gruplara göre canlı doğum oranının daha yüksek ve gebelik kaybının daha az olduğu gösterilmiştir (13). Bizim çalışmamızda da TGK öyküsü olan hastalarda G-CSF değerlerinin TGK öyküsü olan hastalarda kontrol grubuna göre seviyelerinin nasıl değiştiği değerlendirilmek istendi. Çalışmamızda sonuç olarak TGK öyküsü olan hastalarda G-CSF serum değerleri kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde bulundu fakat bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi.

Çalışmamızın güçlü olan yönlerini inceleyecek olursak literatüre bakıldığında endometrial reseptivite kavramı ve bunda görevli olan moleküllerin genellikle IVF yapılan ve implantasyon başarısızlığı olan hastalarda incelendiğini görmekteyiz. Bu molekülleri TGK öyküsü olan hastalarda inceleyen çalışmalar sınırlı düzeydedir.

Literatüre bakıldığında MUC-1 daha önce TGK'da incelenmiş ancak hep uterin yıkama sıvıları ve endometrial biyopsilerde çalışılmıştır. TGK'da kan plazma MUC-1 konsantrasyonlarını normal popülasyon ile karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamızın bir ilk olduğunu düşünmekteyiz. Ancak bu sonucumuzun desteklenmesi için TGK öyküsü olan hastalarda MUC-1 kan plazma düzeyleri üzerine başka çalışmaların da yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Literatürde GdA'nın serum düzeylerinin TGK'da incelendiği Tulppala ve ark.'nın yaptığı bir çalışma dışında başka çalışma bulunmamaktadır (105). Çalışmamızda bu çalışmanın sonuçlarına benzer bulgular elde edilmiş olması, bu molekülün TGK'da önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir

lakin bu konuda yapılacak olan yeni çalışmalar ile bu sonuçların desteklemesinin gerekli olduğu kanaatindeyiz.

LIF kan plazma düzeylerinin ise TGK'da çalışıldığı yine tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın bizim çalışmamız ile uyumlu bulgulara sahip olması, TGK öyküsü olan hastalarda LIF düzeyinin önemli olduğu ve bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızın bir başka güçlü yönü ise IL-15'in TGK öyküsü olan hastaların kan plazma düzeylerini inceleyen ilk çalışma olmasıdır. Daha önce TGK ile IL-15 ilişkisini inceleyen iki çalışma bulunmaktadır ve bu iki çalışmada da endometrial dokudaki ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Çalışmamızın bu iki çalışma ile uyumlu olması IL-15 ve TGK ilişkisini desteklemekle birlikte bu konuda yeni çalışmaların bu sürece ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın TGK'da endometrial reseptivitenin incelenmesi için endometrial biyopsi gibi invaziv bir yöntem yerine venöz kan örneğinden elde edilen plazma düzeylerinin de bu moleküllerin çalışılması için kullanışlı bir yöntem olabileceğini göstermiş olduğunu düşünmekteyiz.

Embriyo implantasyonunda görev alan onlarca molekül bulunmakla birlikte bizim çalışmamız bir tez çalışması olduğundan dolayı süre ve bütçe açısından kısıtlılıkları mevcut olduğu için bu moleküllerden yalnızca beş tanesinin plazma seviyelerine bakılmıştır. Bu moleküllerin hepsinin değerlendirilebildiği bir çalışma yapılabilirse, bunların arasından hangi moleküllerin TGK ile ilişkili olduğu ve bu durumu predikte etmek için belirteç olarak kullanılabileceği tespit edilebilir.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda MUC-1, GdA, ve LIF'in TGK hastalarında literatür ile uyumlu ve istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmasının gelecekte klinik pratikte hem tanı hem de tedavi aşamasında kullanılabilceğini düşünmekteyiz. Aynı şekilde IL-15 seviyelerinin TGK öyküsü olan hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunması da klinik açıdan değerlidir. Her ne kadar sonuçlarımız doğrultusunda G-CSF seviyelerinin TGK öyküsü olan hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük seviyelerde olması istatistiksel anlama ulaşmasa da, literatürde bu molekülün tekrarlayan IVF başarısızlığında kullanıldığı takdirde sonuçları iyileştirdiği gösterildiği için bu molekülün TGK öyküsü olan hastalardaki etkilerinin de daha geniş hasta serilerinde yapılacak çalışmalar ile aydınlatılması gerektiği kanaatindeyiz.

TGK etyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamış ve bilinen sebepleri dışında tanı konulamayan yaklaşık %50 hasta grubunda tedavi seçenekleri net olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu bağlamda bu konu ile ilgili yapılacak tanımlayıcı ve randomize kontrollü çalışmaların klinik pratikteki uygulamalara anlamlı katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

Embriyo implantasyonunda önemli bir yere sahip olan endometrial reseptivitenin bu hastalığın etyolojisini aydınlatmada önemli bir yere sahip olduğunu düşünmekteyiz. Endometrial reseptiviteyi incelemek için genellikle implantasyon penceresinde endometrial biyopsiler ile örnekleme yapılmaktadır. Alınan örnekler genellikle elektron mikroskopu veya immunohistokimyasal yöntemler ile incelenmektedir. Bu incelemeler hem masraflı hem de pratik olmayıp aynı zamanda biyopsi gibi girişimsel bir yöntem ihtiva etmektedir. Endometrial reseptiviteyi incelemek için bizim çalışmamızda olduğu gibi venöz kan örneklerinin kullanılmasının daha pratik, daha az girişimsel ve daha ucuz bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

TGK'nın etyolojisinin buna benzer ve daha geniş hasta serilerinde yapılacak çalışmalarla aydınlatılmasının bu hastalığın tanı ve tedavisinde

yeni yöntemler bulunması ve literatüre katkı sağlaması açısından önemli ve gerekli olduğu kanaatindeyiz.



7 KAYNAKLAR

1. Stirrat, G.M., Recurrent miscarriage. Lancet, 1990. 336(8716): p. 673-5.
2. Berry, C.W., et al., The Euro-Team Early Pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. Hum Reprod, 1995. 10(6): p. 1516-20.
3. American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and Recurrent Pregnancy Loss: a Committee Opinion
https://www.asrm.org/uploadedFiles/ASRM_Content/News_and_Publications/Practice_Guidelines/Committee_Opinions/Definitions_of_infertility.pdf
(Erişim Tarihi : 1 Aralık 2016)
4. Üreme Sağlığı ve İnfertilite Derneği (TSRM). Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Kanıta Dayalı Yaklaşım Rehberi
<http://www.tsrn.org.tr/pro/dosyalarimiz> (Erişim Tarihi: 1 Aralık 2016)
5. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. N Engl J Med 1999;340:1796–9
6. Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, et al., The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. Mol Hum Reprod 2010;16:886–95
7. van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. J Leukoc Biol 2009;85:4–19
8. Bastu E, Mutlu MF, Yasa C, et al., Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. Fertil Steril. 2015 Apr;103(4):1059-1064.e2.
9. Xu B, Sun X, Li L, et al., Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin- β 3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. 2012 Aug;98(2):389-95
10. Mariee N, Li TC, Laird SM. Expression of leukaemia inhibitory factor and interleukin 15 in endometrium of women with recurrent implantation failure after IVF; correlation with the number of endometrial natural killer cells. Hum Reprod. 2012 Jul;27(7):1946-54.

11. Eftekhari M, Sayadi M, Arabjahanlou F. Transvaginal perfusion of G-CSF for infertile women with thin endometrium in frozen ET program: A non-randomized clinical trial. *Iran J Reprod Med.* 2014;12:661.
12. Barad DH, Yu Y, Kushnir VA, et al. A randomized clinical trial of endometrial perfusion with granulocyte colony-stimulating factor in in vitro fertilization cycles: impact on endometrial thickness and clinical pregnancy rates. *Fertil Steril.* 2014;101:710–715
13. Santjohanser C, Knieper C, Franz C, et al. Granulocyte-colony stimulating factor as treatment option in patients with recurrent miscarriage. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2013;61:159–164
14. Scarpellini F, Sbracia M. G-CSF treatment improves IVF outcome in women with recurrent implantation failure in IVF. *J Reprod Immunol.* 2012;94:103.
15. Würfel W. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor in patients with repetitive implantation failures and/or recurrent spontaneous abortions. *J Reprod Immunol.* 2015;108:123–135.
16. Bektaş S, Demir N, Koç A, Yüksel A: Erken gebelik problemleri ve düşükler. *Obstetrik, Maternal – Fetal Tıp ve Perinatoloji*, 1. baskı, Medikal&Nobel, Ankara, 2001, 1076-1085.
17. Atasü T, Şahmay Ş: Abortus. *Jinekoloji, Nobel*, 2. Baskı, İstanbul, 2001, (37) 533-545
18. Kişnişçi, Gökşin, Durukan, Üstay, Ayhan, Gürkan, Önderoğlu: Rekürren abortus. *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*, 1.Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara,1996,1312-1318
19. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1988;319:189–94.
20. Salat-Baroux J. Recurrent spontaneous abortions. *Reprod Nutr Dev* 1988; 28:1555-68.
21. Marc A. Fritz, Leon Speroff *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins 2014 8. Edition Chapter 28

22. Carrington B, Sacks G, Regan L. Recurrent miscarriage: Pathophysiology and outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17:591-7
23. Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:412-24.
24. Devi Wold AS, Pham N, Arici A: Anatomic factors in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*, 24(1):25-32, 2006.
25. Raga F, Bauset C, Remohi J, et al., Reproductive impact of congenital Mullerian anomalies. *Hum Reprod* 1997;12 (10):2277-2281
26. Homer H, Li T, Cooke I. The septate uterus. A review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril* 2000;73:1.
27. Maneschi F, Zupi E, Marconi D, et al., Hysteroscopically detected asymptomatic mullarian anomalie. Prevalance and reproductive implications. *J Reprod Med* 1995;40(10):684-688
28. Propst AM, Hill JA: Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*, 18(4):341-50, 2000.
29. Grimbizis GF; Camus M, Tarlatzis BC, et al. Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update* 2001;7:161-174
30. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985;70:11.
31. Warburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. In: Porter IH ed. *Perinatal Genetics: Diagnosis and Treatment*. Academic Pres, New York 1986, pp.133
32. Williams Obstetrics, F. Gray Cunningham, Norman F.Gant, Kenneth J. Leveno, Larry C. Gilstrap III, John C. Hauth, Katharinne D.Wenstrom, McGraw-Hill, 2010
33. Byrne J and Ward K. Genetic factors in recurrent abortions. *Clin Obstet Gynecol* 1994;37:693-704.
34. ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001 (Replaces Technical Bulletin Number 212,

- September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 78:179-90.
35. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2006 Sep;21(9):2216-22.
 36. Harlap S, Shiono PH. Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. *Lancet* 1980;173.
 37. Armstrong B, McDonald A, Sloan M. Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Public Health* 1992;82:85.
 38. Gardella J, Hill J. Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000;18:407.
 39. Abalovich M, Gutierrez S, Alcaraz G, et al. Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid* 2002;12:63.
 40. Prummel MF, Wiersinga WM. Thyroid autoimmunity and miscarriage. *Eur J Endocrinol.* 2004 Jun;150(6):751-5.
 41. Arredondo F, Noble LS. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2006 Feb;24(1):33-9.
 42. Coulam C and Stern J. Endocrine factors associated with recurrent spontaneous abortion. *Clin Obstet Gynecol* 1994;37:730-744.
 43. Miodovnik M, Skillman C, Holroyde J. Elevated maternal glycohemoglobin in early pregnancy and spontaneous abortion among insulin-dependent diabetic women. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153:439-442.
 44. Haas DM, Ramsey PS. Progestogen for preventing miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Oct 31;(10):CD003511
 45. Okon M, Laird S, Tuckerman E, Li T. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil Steril* 1998;69:682-690.
 46. Laird S, Tuckerman EM, Cork B, et al. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2003;9:163-174.
 47. Jauniaux E, Burton G. Pathophysiology of Histological Changes in Early Pregnancy Loss. *Placenta* 2005;26:114-123.

48. Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999; 14:2727–2730
49. Michou VI, Kanavaros P, Athanassiou V, et al. Fraction of the peripheral blood concentration of CD56+/CD16-/CD3- cells in total natural killer cells as an indication of fertility and infertility. *Fertil Steril* 2003; 80(Suppl 2):691-7.
50. Askelund K, Liddell HS, Zanderigo AM, et al. CD83(+) dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy. *Placenta* 2004; 25:140-5.
51. Quenby S, Bates M, Doig T, et al. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999;14:2386–2391.
52. Tuckerman E, Laird SM, Prakash A, Li TC. Prognostic value of the measurement of uterine natural killer (uNK) cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2007; 22:2208–2213.
53. Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, et al. Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:36-41.
54. Kilpatrick DC, Bevan BH, Liston WA. Association between mannan binding protein deficiency and recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1995; 10:2501-5.
55. Christiansen OB, Ring M, Rosgaard A, et al. Association between HLA-DR1 and -DR3 antigens and unexplained repeated miscarriage. *Hum Reprod Update* 1999; 5:249-55
56. Xu L, Chang V, Murphy A, et al. Antinuclear antibodies in sera of patients with recurrent pregnancy wastage. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:1493-7.
57. Rey E, Kahn SR, David M, Shier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 361(9361): 901-8.
58. Robertson, L. et al., Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol*, 2006. 132(2): p. 171-96.

59. Roque, H., et al., Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. *Thromb Haemost*, 2004. 91(2): p. 290-5.
60. van Dunne, F.M., et al., Factor V Leiden mutation in relation to fecundity and miscarriage in women with venous thrombosis. *Hum Reprod*, 2005. 20(3): p.802-6.
61. Bellver, J., et al., The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod*, 2008. 23(2): p. 278-84.
62. Laskin, C.A., et al., Low Molecular Weight Heparin and Aspirin for Recurrent Pregnancy Loss: Results from the Randomized, Controlled HepASA Trial. *J Rheumatol*, 2009.
63. Brenner, B., et al., Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparin. *Thromb Haemost*, 2000. 83(5): p. 693-7.
64. Carp, H., M. Dolitzky, and A. Inbal, Thromboprophylaxis improves the live birth rate in women with consecutive recurrent miscarriages and hereditary thrombophilia. *J Thromb Haemost*, 2003. 1(3): p. 433-8.
65. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 7: 364-369.
66. Creinin D, Lisman R, Strickler C. Screening for Factor V Leiden mutation before prescribing combination oral contraceptives. *Am Soc Reprod Med* 1999; 72: 646- 651.
67. Rai R, Shlebak A, Cohen H, et al. Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2001; 16:961-5
68. Younis JS, Brenner B, Ohel G. Activated protein C resistance due to factor V leiden mutation can be associated with first as well as second trimester recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod immunol* 2000; 43: 31-35

69. Gerhardt A, Scharf R, Beckmann M et al: Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med*, 342:374-380, 2000.
70. Atasay B, Aslan S, Günlemez A, Kemahli S, Akar N. Factor V Leiden and Prothrombin gene 20210A variant in neonatal thromboembolism and in healthy neonates and adults. *Pediatric Hematology and Oncology* 2003; 20: 627-634.
71. Robertson B ve Greaves M. Antiphospholipid syndrome: An evolving story. *Blood Reviews* 2006;20:201-212.
72. Chamley LW, Duncalf AM, Mitchell MD, Johnson PM. Action of anticardiolipin and antibodies to beta2-glycoprotein- I on trophoblast proliferation as a mechanism for fetal death. *Lancet* 1998; 352:1037-8.
73. Wilson, W.A., et al., International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum*, 1999. 42(7): p. 1309-11.
74. Doğan DG, Berker B. Over rezervinin değerlendirilmesi (Evaluation of ovarian reserve). *Turkiye Klinikleri J Gynecol Obst* 2008;18(4):254-65.
75. Trout SW, Seifer DB. Do women with unexplained recurrent pregnancy loss have higher day 3 serum FSH and estradiol values? *Fertil Steril* 2000; 74:335-7.
76. Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:48–60.
77. Ilesanmi AO, Hawkins DA, Lessey BA. Immunohistochemical markers of uterine receptivity in the human endometrium. *Microsc Res Tech* 1993;25: 208–22.
78. Giudice LC. Genes associated with embryonic attachment and implantation and the role of progesterone. *J Reprod Med* 1999;44(Suppl):165–71.
79. Nikas G. Cell-surface morphological events relevant to human implantation. *Hum Reprod* 2:37, 2003.
80. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. 2001. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345:1400–1408.

81. Nilsson O. Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. 5. Continuous administration of estrogen. *J Ultrastruct Res* 1959;2:342–51.
82. Psychoyos A, Mandon P. [Study of the surface of the uterine epithelium by scanning electron microscope. Observations in the rat at the 4th and 5th day of pregnancy]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1971;272:2723–5.
83. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, et al. Embryo implantation. *Dev Biol* 2000;223:217–37.
84. Nikas G, Markrigiannakis A. Endometrial pinopodes and uterine receptivity. *Ann NY Acad Sci* 2003;997:120–3.
85. Devine P, Mackenzie IFC. Mucins: structure, function and association with malignancy. *Bioessays* 1992; 14:619–625.
86. Lagow E, DeSouza MM, Carson DD. Mammalian reproductive tract mucins. *Hum Reprod Update* 1999; 5:280–292.
87. Serle E, Aplin JD, Li TC, Warren MA, Graham RA, Seif MW, et al. Endometrial differentiation in the peri-implantation phase of women with recurrent pregnancy loss: a morphological and immunohistochemical study. *Fertil Steril* 1994;62:989–96.
88. Singh H, Nardo L, Kimber SJ, Aplin JD. Early stages of implantation as revealed by an in vitro model. *Reproduction* 2010;139:905–14.
89. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 1995;57:607–34.
90. Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:4.
91. Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, et al. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology* 1995;136:3639–47.
92. Horne AW, Lalani EN, Margara RA, Ryder TA, Mobberley MA, White JO. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of

- endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol Reprod Dev* 2005;72:216–29.
93. Macao B, Johansson DG, Hansson GC, Härd T. Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Jan;13(1):71-6.
94. Li TC, Tuckerman EM, Laird SM. Endometrium factors in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002;8:43–52.
95. Quenby S, Vince G, Farquharson R, Aplin J. Recurrent pregnancy loss: a defect in nature's quality control? *Hum Reprod* 2002;17:1959–63.
96. Aplin JD, Hey NA, Li TC. MUC1 as a cell surface and secretory component of endometrial epithelium: reduced levels in recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:261–6.
97. Meseguer M, Pellicer A, Simon C. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol Hum Reprod* 1998;4:1089–98.
98. DeSouza MM, Surveyor GA, Price RE, Julian J, Kardon R, Zhou X, et al. MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol* 1999;45:127–58.
99. Seppala M, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* 2002;23:401–30.
100. Taylor RN, Vigne JL, Zhang P, Hoang P, Lebovic DI, Mueller MD. Effects of progestins and relaxin on glycodelin gene expression in human endometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:841–7; discussion 7–9.
101. Clark GF, Oehninger S, Patankar MS, Koistinen R, Dell A, Morris HR, et al. A role for glycoconjugates in human development: the human fetoprecursor defence system hypothesis. *Hum Reprod* 1996;11: 467–73.
102. Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD, Seppala M. Factors affecting fertilization: Endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* 1995; 63:377–83.

103. Uchida H, Maruyama T, Ohta K, Ono M, Arase T, Kagami M, et al. Histone deacetylase inhibitor-induced glycodelin enhances the initial step of implantation. *Hum Reprod* 2007;22:2615–22.
104. Tomczak S, Briese V, Kunkel S, Muller H. Serum placental protein 14 (PP14) levels in patients with threatened abortion. *Arch Gynecol Obstet* 1996;258: 165–9.
105. Tulppala M, Julkunen M, Tiitinen A, Stenman UH, Seppala M. Habitual abortion is accompanied by low serum levels of placental protein 14 in the luteal phase of the fertile cycle. *Fertil Steril* 1995;63:792–5.
106. Dalton CF, Laird SM, Estdale SE, Saravelos HG, Li TC. Endometrial protein PP14 and CA-125 in recurrent miscarriage patients; correlation with pregnancy outcome. *Hum Reprod* 1998;13:3197–202.
107. Mackenna A, Li TC, Dalton C, Bolton A, Cooke I. Placental protein 14 levels in uterine flushing and plasma of women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 1993;59:577–82.
108. Alok A, Mukhopadhyay D, Karande AA. Glycodelin A, an immunomodulatory protein in the endometrium, inhibits proliferation and induces apoptosis in monocytic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1138–47.
109. Seppala M, Martikainen H, Ronnberg L, Riittinen L, Kauppila A. Suppression of prolactin secretion during ovarian hyperstimulation is followed by elevated serum levels of endometrial protein PP14 in the late luteal phase. *Hum Reprod* 1989;4:389–91.
110. Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update* 2007;13:77–86.
111. Schiefner A, Rodewald F, Neumaier I, Skerra A. The dimeric crystal structure of the human fertility lipocalin glycodelin reveals a protein

- scaffold for the presentation of complex glycans. *Biochem J.* 2015 Feb 15;466(1):95-104.
112. Lessey BA, Young SL. The structure, function, and evaluation of the female reproductive tract. In: Strauss JF III, Barbieri RL, editors. *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management.* Philadelphia: Saunders Elsevier; 2012:192–235.
113. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ: Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359:76–79.
114. Haines BP, Voyle RB, Rathjen PD: Intracellular and extracellular leukemia inhibitory factor proteins have different cellular activities that are mediated by distinct protein motifs”. *Mol Biol Cell* 2000; 11:1369–1383.
115. Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL: Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 2000; 141:4365–4372.
116. Tawfeek MA, Eid MA, Hasan AM, Mostafa M, El-Serogy HA: Assessment of leukemia inhibitory factor and glycoprotein 130 expression in endometrium and uterine flushing: a possible diagnostic tool for impaired fertility. *BMC Womens Health* 2012; 12:10.
117. Hambartsoumian E: Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39:137–143.
118. Mikolajczyk M, Wirstlein P, Skrzypczak J: The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women—a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:65–74.

119. Franasiak JM, Holoch KJ, Yuan L, Schammel DP, Young SL, Lessey BA: Prospective assessment of midsecretory endometrial leukemia inhibitor factor expression versus amb3 testing in women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 2014; 101:1724–1731.
120. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL: Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:11408–11412
121. Shen MM, Leder P: Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:8240–8244.
122. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 3115–20.
123. Miller J, Hawkins N, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of leukemia inhibitory factor. *FEBS Lett.* 1993 Dec 27;336(2):236-8. PubMed PMID:8262236.
124. Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update* 2009;15:229–36.
125. Gipson IK, Blalock T, Tisdale A, Spurr-Michaud S, Allcorn S, Stavreus-Evers A, et al. MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biol Reprod* 2008;78:134–42.
126. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O, Landgren BM. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl 1): 808–14.

127. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor (LIF) by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997;12:569–574.
128. Comba C, Bastu E, Dural O, Yasa C, Keskin G, Ozsurmeli M, Buyru F, Serdaroglu H. Role of inflammatory mediators in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2015 Dec;104(6):1467-74.e1.
129. Waldmann TA, Tagaya Y: The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:19–49.
130. Bulfone-Paus S, Bulanova E, Pohl T, Budagian V, Durkop H, Ruckert R, Kunzendorf U, Paus R, Krause H: Death deflected: IL-15 inhibits TNF- α -mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ra chain. *FASEB J* 1999; 13:1575–1585.
131. Fehniger TA, Caligiuri MA: Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97:14–32.
132. Marks-Konczalik J, Dubois S, Losi JM et al. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:11,445–11,450.
133. Castagnoli C, Stella M, Magliacani G: Role of T-lymphocytes and cytokines in post-burn hypertrophic scars. *Wound Repair Regen* 2002; 10:107–108.
134. De Creus A, Van Beneden K, Stevenaert F, Debacker V, Plum J, Leclercq G: Developmental and functional defects of thymic and epidermal V γ 3 cells in IL-15-deficient and IFN regulatory factor-1-deficient mice. *J Immunol* 2002; 168:6486–6493.

135. Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, Honjo H. IL-15 expression in human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 2000;63:683–687.
136. Verma S, Hiby SE, Loke YW, King A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine IL-15. *Biol Reprod* 2000;62:959–968.
137. Chegini N, Roberts M, Ripps B. Differential expression of IL-13 and IL-15 in ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis and normal fertile women. *Am J Reprod Immunol* 2003;49:75–83.
138. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991;6:791–798.
139. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, Anderson D, Eisenmann J, Grabstein K, Caligiuri MA. IL-15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994;180:1395–1403.
140. Croy BA, Esadeg S, Chantakru S, van de Heuvel M, Paffaro VA, He H, Black GP, Ashkar AA, Kiso Y, Zhang J. Update on pathways regulating the activation of uterine natural killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing precursors to the uterus. *J Reprod Immunol* 2003;59:175–191.
141. Manaster I, Mizrahi S, Golman-Wohl D, Sela H, Stern-Ginossar N, Lankry D, Gruda R, Hurwitz A, Bdolah Y, Haimov-Kockman R et al. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* 2008;181:1869–1876.
142. Ring AM, Lin JX, Feng D, Mitra S, Rickert M, Bowman GR, Pande VS, Li P, Moraga I, Spolski R, Ozkan E, Leonard WJ, Garcia KC. Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat Immunol*. 2012 Dec;13(12):1187-95.

143. Chegini N, Ma C, Roberts M, William RS, Ripps BA. Differential expression of IL-13 and IL-15 throughout the menstrual cycle in endometrium of normal fertile women and women with recurrent abortion. *J Reprod Immunol* 2002;56:93–110.
144. Nicola, N.A., Begley, C.G., Metcalf, D., 1985. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukemia cells. *Nature* 314, 625–630.
145. Welte, K., Platzer, E., Lu, L., Gahrilove, J., Levi, E., Mertelsmann, R., Moore, M., 1985. Purification and biological characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1526–1533.
146. Souza, L.M., Boone, T.C., Gahrilove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K.K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M.A.S., Mertelsmann, R., Welte, K., 1986. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 232, 61–65.
147. Rapoport, A.P., Abboud, C.N., DiPersio, J.F., 1992. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation. *Blood Rev.* 6, 43–57.
148. Shimoda, K., Feng, J., Murakami, H., Nagata, S., Watling, D., Rogers, N.C., Stark, G.R., Kerr, I.M., Ihle, J.N., 1997. Jak1 plays an essential role for receptor phosphorylation and Stat activation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 90, 572–604.
149. Miyama, M., Umesaki, N., Kawabata, M., 1998. Identification of the granulocyte colony-stimulation factor (G-CSF) producing cell population in human decidua and its biological action on trophoblast cell. *Osaka City Med. J.* 44, 85–96.

150. Franzke, A., Piao, W., Lauber, J., Gatzlaff, P., Könecke, C., Hansen, W., Schmitt-Thomsen, A., Hertenstein, B., Buer, J., Ganser, A., 2003. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. *Blood* 102,702–739.
151. Shimoda, K., Okamura, S., Harada, N., Kondo, S., Okamura, T., Niho, Y., 1993. Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets. *J. Clin. Invest.* 91, 1310–1313.
152. Fujii, R., Neyatani, N., Waseda, T., Oka, Y., Takagi, H., Tomizawa, H., Sasagawa, T., Makinoda, S., 2011. The involvement of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the release of a mature oocyte. *Hum. Reprod.* 26 (Suppl. 1), 310–311.
153. Salmassi, A., Schmutzler, A.G., Huang, L., Hedderich, J., Jonat, W., Mettler, W., 2004. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil. Steril.* (Suppl. 1), 786–791.
154. Vandermolen, D.T., Gu, Y., 1996. Human endometrial expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and its receptor, stimulation of endometrial G-CSF production by interleukin-1 beta, and G-CSF inhibition of choriocarcinoma cell proliferation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 36, 278–284.
155. Zeyneloglu, H.B., Onalan, G., Durak, T., Alyazici, I., Unal, E., 2013. Granulocyte macrophage colony stimulating factor (G-CSF) administration for ART patients with repeated implantation failure (RIF): which route is best? *Fertil. Steril.* 100, S291–S292.
156. Larsen, A., Davis, T., Curtis, B., Gimpel, S., Sims, J., Cosman, D., Park, L., Sorensen, E., March, C.J., Smith, C., 1990. Expression cloning of a human granulocyte colony-stimulating factor receptor: a structural

mosaic of hemopoietin receptor, immunoglobulin, and fibronectin domains. *J. Exp. Med.* 172, 1559–1571.

157. Zink T, Ross A, Lüers K, Cieslar C, Rudolph R, Holak TA. Structure and dynamics of the human granulocyte colony-stimulating factor determined by NMR spectroscopy. Loop mobility in a four-helix-bundle protein. *Biochemistry.* 1994 Jul 19;33(28):8453-63.
158. Scarpellini, F., Sbracia, M., 2009. Use of colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 11, 2703–2708.
159. Kolte AM, Olsen LR, Mikkelsen EM, Christiansen OB, Nielsen HS. Depression and emotional stress is highly prevalent among women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2015 Apr;30(4):777-82.
160. Jivraj S, Anstie B, Cheong YC, Fairlie FM, Laird SM, Li TC. Obstetric and neonatal outcome in women with a history of recurrent miscarriage: a cohort study. *Hum Reprod* 2001;16:102-106
161. Sheiner E, Levy A, Katz M, Mazor M. Pregnancy outcome following recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;118:61-65.