

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GRANÜLOSİT-MAKROFAJ KOLONİ STİMULE EDİCİ  
FAKTÖR GEN POLİMORFİZM VE MUTASYONLARININ  
ERKEN GEBELİK KAYIPLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Biyolog Reyhan YAŞAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2014**

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GRANÜLOSİT-MAKROFAJ KOLONİ STİMÜLE EDİCİ  
FAKTÖR GEN POLİMORFİZM VE MUTASYONLARININ  
ERKEN GEBELİK KAYIPLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Biyolog Reyhan YAŞAR**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Volkan BALTACI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2014**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Reyhan YAŞAR



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. İMPLANTASYON FİZYOLOJİSİ.....	5
4.1.1. Steroid Hormonlar ve İmplantasyon.....	6
4.1.2. Hücre Adezyon Molekülleri.....	6
4.1.2.1. Müsinler.....	7
4.1.2.2. İntegrinler.....	7
4.1.2.3 Trofonin/Tastin.....	7
4.2. GEBELİK KAYIPLARI.....	8
4.2.1. Oluş Zamanına Göre.....	9
4.2.1.1. Subklinik Abortus.....	9
4.2.1.2. Erken Abortus.....	9
4.2.1.3. Geç Abortus.....	9
4.2.2. Oluş Şekline Göre.....	9
4.2.2.1. Spontan Abortus.....	9
4.2.2.2. İndüklenmiş Abortus.....	10
4.3. SİTOKİNLER.....	11
4.3.1. I. Grup Sitokinler.....	12
4.3.1.1. IL-1.....	12
4.3.1.2. TNF.....	13
4.3.1.3. IL-6.....	14
4.3.1.4. Tip I Interferon (IFN).....	15
4.3.1.5. Kemokinler.....	15

4.3.2. II. Grup Sitokinler.....	15
4.3.2.1. IL-2.....	16
4.3.2.2. IL-4.....	16
4.3.2.3. TGF- $\beta$ .....	17
4.3.3. III. Grup Sitokinler.....	17
4.3.3.1. Tip II Interferon (IFN- $\alpha$ ).....	17
4.3.3.2. Lenfotoksin (LT) .....	17
4.3.3.3. IL-10.....	18
4.3.3.4. IL-5.....	18
4.3.3.5. IL-12.....	18
4.3.3.6. MIF.....	19
4.3.4. IV. Grup Sitokinler.....	19
4.3.4.1. c-kit ligand.....	19
4.3.4.2. IL-3.....	19
4.3.4.3. IL-7.....	19
4.3.4.4. M-CSF.....	20
4.3.4.5. G-CSF.....	20
4.3.4.6. GM-CSF.....	20
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
5.1. MATERYAL.....	22
5.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu.....	22
5.2. YÖNTEM.....	23
5.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu.....	23
5.2.2. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	24
5.2.2.1. GM-CSF Primer Dizayını.....	24
5.2.2.2. PZR Programlama.....	28
5.2.2.3. PZR Ürününün Hazırlanması.....	28
5.2.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroföresi İle Görüntülenmesi.....	29
5.2.4. PZR Ürününün Purifikasyonu.....	30
5.2.5. Sekans PZR Protokolü (Big Dye) .....	30

5.2.6. Sodyum Asetat Pürifikasyonu.....	31
5.2.7. Sekans Analizi.....	31
6.BULGULAR.....	33
6.1. PZR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ BULGULARI.....	33
6.2. SEKANS ANALİZ BULGULARI.....	34
7.TARTIŞMA.....	47
8.SONUÇ.....	49
9.TEŞEKKÜR.....	50
10.KAYNAKLAR.....	51



## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ACOG</b>	Kadın Hastalıkları ve Jinekologlar Amerikan Kongresi
<b>Bç</b>	Baz Çift
<b>CL</b>	Corpus Luteum
<b>CSF</b>	Koloni Stimule edici Faktör
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile Su
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>EBV</b>	Epstein-Barr Virüs
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik Asit
<b>EtBr</b>	Etidyum bromür
<b>EtOH</b>	Etil Alkol
<b>F-V Leiden</b>	Faktör V Leiden
<b>G-CSF</b>	Granülosit Koloni Stimule edici Faktör
<b>GM-CSF</b>	Granülosit Makrofaj Koloni Stimule edici Faktör
<b>HOX</b>	Homeobox
<b>IFN</b>	İnterferon
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>IL-1RI</b>	İnterlökin-1 Tip I Reseptör
<b>IL-1RII</b>	İnterlökin-1 Tip II Reseptör
<b>LIF</b>	Lösemi İnhibitör Faktör
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarid
<b>LT</b>	Lenfotoksin
<b>MAG</b>	Mouse Ascites Golgi
<b>M-CSF</b>	Makrofaj Koloni Stimule edici Faktör
<b>MHC</b>	Büyük Doku Uyum Kompleksi
<b>MIF</b>	Migrasyon İnhibitör Faktör
<b>ml</b>	Mililitre
<b>MTHFR</b>	Metilentetrahidrofolat Reduktaz
<b>MUC-1</b>	Müsin-1
<b>NaOAc</b>	Sodyum asetat

<b>NK</b>	Doğal Öldürücü
<b>O.D</b>	Optik Densitite
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>rpm</b>	Dakikadaki Dönme Sayısı (Revolutions Per Minute)
<b>sn</b>	Saniye
<b>TBE</b>	Tris-Borik Asit-EDTA
<b>TGF</b>	Transforme edici Büyüme Faktörü
<b>TGK</b>	Tekrarlayan Gebelik Kayıpları
<b>Th</b>	Yardımcı T Lenfosit
<b>Th1</b>	Tip 1 Th
<b>Th2</b>	Tip 2 Th
<b>Tm</b>	Yapışma Sıcaklığı (Annealing Temperature)
<b>TNF</b>	Tümör Nekrozu Faktörü
<b>TORCH</b>	Toxoplasma gondii, Rubella, Sitomegalovirus ve Herpes simple
<b>VCAM-1</b>	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\gamma</math></b>	Gama
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikrolitre
<b><math>\infty</math></b>	Sonsuz

#### **Etik Kurul Kararı:**

**Karar No:** 14.03.2013/03-14

Aşğıda belirtilen çalışmanız 14.03.2013 tarihli Üniversitemiz Klinik Araştırmaları Etik Kurulu incelenmiş, çalışmanın yapılmasında etik ve bilimsel açıdan bir sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

**Araştırma Proje No:** TBG/1102012

**BAPKO Karar No:** 2013-01-03



## 1. ÖZET

Sitokinler gestasyonel sürecin temelini teşkil eden “immünolojik adaptasyon” ve “gelişimin” en önemli mediatörleridir. Başarılı bir gebelik bir yandan yeni doku gelişimleri, invazyon ve yeni bir yapılanma (fetal ve plasental formasyon) gibi olayların eksiksiz tamamlanmasını gerektirirken diğer yandan da paternal genlerin ekspresyonları nedeniyle anne için semiallojenik doku niteliğinde olmasına rağmen maternal immün reaksiyonun olmadığı veya olmamasını gerektiren bir prosestir.

Tekrarlayan gebelik kayıpları tüm kadınların %0,5-2 kadarını kapsamaktadır. Bu vakaların %40 kadarında sebebe yönelik bulgu elde edilememekte olup bilinmeyen endometrial veya plasental fonksiyon bozuklukları öngörülmektedir.

Granülosit Makrofaj Koloni Stimule edici Faktör (GM-CSF) geni plasental gelişim ve fonksiyonu üzerinde önemli etkiye sahip, 5. kromozomun uzun kolunda (5q21-5q32) lokalizedir. Dört ekzon içeren ve yaklaşık 2.5 kb uzunluğunda bir genidir.

Çalışmamızda GM-CSF geninde olabilecek varyasyon ve mutasyonların, sebebi bilinmeyen ilk trimester tekrarlayan gebelik kaybı olgularında rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, ilk trimester gebelik kaybı bulunan vakalardan oluşturulmuş çalışma grubu ile normal yoldan gebe kalmış, düşük öyküsü ile sistemik/kronik hastalığı bulunmayan kontrol grubuna ait olgular karşılaştırılmışlardır. Her iki gruba ait vakaların periferik kan materyallerinden elde edilen Deoksiribonükleik asit (DNA) örneklerinden dizi analizleri gerçekleştirildi.

Çalışma grubu ile kontrol grubu arasında GM-CSF genine ait tespit edilen değişimler tek tek dikkate alındıklarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmamış olmakla birlikte tüm değişimleri birlikte dikkate aldığımızda oldukça anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak vaka sayılarının artırılması ve benzer çalışmaların yapılması ile GM-CSF gen araştırmasının düşük etiyolojisi araştırma testleri arasında yer alabileceği öngörülmüştür.

## 2. SUMMARY

Cytokines comes as the most important mediator of "immunological adaptation" and "development" which forms the basis of the gestational process. Development of new tissues, invasion and restructuring (fetal and placental formation) is required for a successful pregnancy. Although this is a semi-allogenic process for the mother, there should not be an immunologic reaction against it.

Up to 0.5-2% of all women experience recurrent pregnancy loss. The cause of approximately 40% of these cases are unknown. It is believed that, unknown endometrial and placental dysfunctions are the reason of these recurrent pregnancy losses.

Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) have a significant effect on placental development and function. GMCSF is a gene which is located on the long arm of chromosome 5 (5q21-5q32), approximately length of 2,5 kb and contains 4 exons.

In our study, we have examined the possible variations and mutations which might be the cause of recurrent pregnancy loss in GM-CSF gene. To come to a conclusion, we compared the study group consisting of women with recurrent miscarriages, to a control group consisting of women with no pregnancy loss and no systemic/chronic disease. We performed a DNA sequence analysis from the blood samples we took from both of the groups.

Evaluation of the results show that there is no statistically significant differences between the study group and the control group when detected individually. However, when all the detected variations were considered together, quite significant statistical results were observed. Based on this result, increasing the number of cases and additional similar studies suggest that the GM-CSF gene test could be a part of etiology of pregnancy loss research tests.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm gebelik kayıplarının %0,5-2 kadarını tekrarlayan gebelik kayıpları oluşturmakta ve bu sayının yaklaşık %40'nın sebebi bilinmemektedir. Klasik olarak ilk trimester tekrarlayan gebelik kaybı olgularında eşlerden yapılan karyotip analizleri vakaların bir kısmı için etiyojolojiyi aydınlatmaktadır. Dengeli translokasyon taşıyıcılıkları yanısıra sitogenetik düzeyde bulunan bazı polimorfizimlerde son yıllarda (heterokromatin veya satelit artışları 9. kromozomun perisentrik inversiyonu vs) tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkilendirilmiştir. Yine trombofili genlerinde saptanan değişiklikler (F-V leiden, protrombin ve MTHFR gen mutasyonları) 8. hafta ve sonrasındaki düşükler ile ilişkilendirilmektedir.

Açıklanmamış infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilgili yapılan ekspresyon çalışmalarında bazı mediatörler ile düşükler arasındaki ilişki gösterilmiştir. İnterlökin-10 (IL-10), Lösemi İnhibitör Faktör (LIF), GM-CSF ve Transform edici büyüme faktörü (TGF) ekspresyonları diğer regülasyonlarıyla yakından bağlantılı bulunmuşken, özellikle IL-6 ve IL-1'in endometriumdaki yetersiz ekspresyonları düşükler için predispozan olarak ortaya konmuştur.

GM-CSF sitokini fetal-plasental dokulara karşı maternal toleransın sağlamlasının yanı sıra preimplantasyon embryo gelişimini ve trofoblast gelişimini regule ederek gebeliğin progresi üzerine de belirleyici bir rol oynamaktadır. Yapılmış olan çalışmalar GM-CSF'in embriyonal implantasyon, plasental formasyon ve gebeliğin devamı ile ilgili önemli fonksiyonlar üstlendiğini ortaya koymuştur.

GM-CSF gen mutasyonu yapılmış farelerde kontrol grubuna oranla fertilitenin azaldığı, fetal kayıpların arttığı gösterilmiştir (1,2). Bunun yanı sıra tek doz GM-CSF verilen farelerde verilmeyen gruba karşılaştırıldığında fetal kayıp ve fetal rezorpsiyon oranları anlamlı ölçüde azalmış bulunmuştur (3).

Bunun yanında, GM-CSF de dahil olmak üzere bazı sitokin ve diğer mediatörlerin fertilitite üzerine etkileri ile düşük yapan grupta bunların ekspresyonlarının kontrol gruplarıyla karşılaştırmaları yapılmış ancak GM-CSF geni ile tekrarlayan gebelik kaybı olguları arasında korelasyonu gösterecek çalışma dizayn edilmemiştir. GM-CSF ve benzeri mediatörlere ait yapılmış çalışmalar, bu sitokinlerin gebelik oluşumu, gebeliğin devamlılığı

ve düşükler üzerine etkili olduklarını ortaya koysalar bile bunların rutin tarama testleri arasında yer almalarına zemin hazırlayacak sonuçlar vermemiştir.

Bu çalışma ile GM-CSF geninde olabilecek varyasyon ve mutasyonların sebebi bilinmeyen ilk trimester tekrarlayan gebelik kaybı olgularında rolü olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Çalışmamız GM-CSF'in gen düzeyinde değişikliklerinin gebelik kayıplarına etki edebileceği düşüncesinden yola çıkarak sebebe yönelik bir ilişkinin var olup olmadığını ortaya koyacaktır. GM-CSF geni ile tekrarlayan düşükler arasında bir ilişki ortaya konulursa gebelik kayıplarının takip testleri arasında yer alabilecek, hatta bu hastaların düşüklerinin önlenmesi konusunda tedavi girişimlerinin gündeme gelmesini sağlayacaktır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1 İMPLANTASYON FİZYOLOJİSİ

İmplantasyon hücrenel, hormonal ve moleküler birçok faktörün rol aldığı kompleks ve hala tam aydınlatılmamış bir süreçtir. İmplantasyon, embriyonun öncelikle desidua içerisine yerleşip sonra da annenin dolaşım sistemine plasentayı oluşturmak için ulaşmasını kapsayan bir seri işlem olarak tanımlanmaktadır (4). Bu esnada endometrium ile embriyo arasında büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks ve prostoglandinler ile oluşan karmaşık bir diyalog vardır. Embriyo bu etkenlerle epitele yapışmakta bazal membrana doğru inmekte ve stromaya invaze olmaktadır (5). İnsanda implantasyon süreci; oosit matürasyonunun erken dönemlerinde başlayan, embriyo ve endometrium arasındaki kompleks ve karmaşık bir ilişki ile kontrol edilmektedir (6). İmplantasyon progressif ve sürekli değişen bir sürece sahiptir. Uterus “implantasyon penceresi” olarak adlandırılan kısa bir süre için embriyonun implantasyonuna uygundur. Bu dönemin dışında implantasyon olanaksızdır (7). İmplantasyonun başarısı; blastokistin reseptif endometriyumla doğru zamanda buluşmasına bağlıdır. Endometrium menstrüel siklus boyunca sürekli yeniden düzenlenir ve sadece implantasyon penceresi döneminde reseptiftir. Menstrüel siklus boyunca birçok endometrial genin ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir. Örneğin endometriozis veya submüköz myoma gibi durumlarda gelişen Homeobox (HOX) gen disregülasyonu, implantasyon defektine yol açabilir (8).

Ovulasyondan 4 gün sonra embriyo kaviteye ulaşır. Ovülasyondan 6-8 gün sonra ise endometrium blastokist implantasyonuna reseptif olur ve bu reseptivite 4 gün sürer.

Embriyo implantasyonu apozisyon fazı, adezyon fazı ve invazyon fazı olmak üzere 3 fazdan oluşmaktadır. Salgılanan moleküller aracılığı ile maternal ve fetal hücreler arasında bir iletişim sağlanır. Bu amaçla aktive edilmiş blastositin endometriyal epitele yerleşmesi apozisyon fazını oluşturur. Maternal ve fetal hücreler arasında gerçekleşen bu iletişim her iki hücre tipinin yüzeyinde yer alan adezyon molekülleri ile gerçekleşir. Bu moleküller vasıtası ile blastositin endometriyumun epiteline tutunması adezyon fazını içerir. İnvazyon fazında ise blastosit epitele penetre olur ve trofoblast hücrelerinin tomurcuklanması ile endometriyal desidua invazyonu gerçekleşir.

Ovülasyondan sonra corpus luteum (CL) embriyonun rahime tutunması ve implantasyonunu kolaylaştırmak için östrojen ve progesteron salgılamaya başlar. Endometriumun epitelinde yer alan ve L-selektinlere bağlanma özelliği olan L-selektin ligantlar burada önem kazanmaktadır. Çünkü embriyonun endometriuma ilk bağlanması trofoblast tarafından salgılanan L-selektinin endometrium yüzeyinde yer alan L-selektin liganta bağlanması ile gerçekleşir. Bundan sonra, trofoblastın endometriuma daha sağlam bağlanması ve daha başarılı bir invazyonun gerçekleşmesi amacı ile bir dizi sinyal yolağı aktive olur. Trofoblast tarafından sürdürülen L-selektin üretimi ise maternal vaskülerizasyon etkileşimi ile plasenta oluşumunu etkilemektedir.

#### **4.1.1. Steroid Hormonlar ve İmplantasyon**

Uzun zamandır östrojenin endometriumdaki östrojen ve progesteron reseptörlerini arttırdığı bilinmektedir. Progesteron ise luteal fazda östrojen ve progesteronu azaltmaktadır. Progesteronun azalması ile uterin reseptivite başlamaktadır. Östrojen ve progesteronun siklusun 20. gününden sonra kaybolmasıyla overin etkisinin azalması ve ayrıca implante olacak embriyonun endometriumda yaptığı değişiklikler implantasyonda önemli rol oynamaktadır. Östrojen ve progesteron ile suprese olan bazı gen ekspresyonlarının reseptörlerdeki azalma ile tekrar eksprese olmaları muhtemel olarak görülmektedir. Mekanizma ne olursa olsun östrojen ve progesteronun azalması implantasyonun başlamasında kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir.

#### **4.1.2. Hücre Adezyon Molekülleri**

İmplantasyona hazırlanan endometrium bazı glikoproteinler salgılar. İmplantasyon dönemindeki epitelde yüzey negatifliği azalır ve glikokaliks yapı daha fibriller yapıya dönüşür. Hücre adezyonunda görev alan en önemli moleküller müsinler, integrinler ve trofinindir.

#### 4.1.2.1. Müsinler

Müsinler, hücrelerin yüzeylerinde bulunan büyük glikolize moleküllerdir. Apoziyonda rol oynadıkları düşünülmektedir. Müsin-1 (MUC-1) çok sayıda epitel hücresinde bulunan ve siklus evrelerine göre ekspresyonu değişen bir müstür. İnsanda peri-implantasyon dönemde MUC-1 ekspresyonu artar. Diğer bir müstür olan Mouse Ascites Golgi (MAG) ise implantasyonun çok erken evrelerinde endometriumda gözlenir. Yapılan bir çalışmada açıklanamayan infertilitesi olan kadınların %60'ında MAG ekspresyon bozukluklarına rastlanmıştır (8).

#### 4.1.2.2. İntegrinler

Kaderinler immünoglobulin ailesine ait transmembran glikoproteinlerdir. Hücre fenotipinin devamlılığı için önemlilerdir. İntegrinler hücrelerin dokudaki lokalizasyonu, şekil, polarite, steroid hormonlara verilen cevap gibi özellikleri belirler. Fibronektin, laminin, kollajen gibi bazı ekstraselüler matriks proteinleri için reseptör görevi görürler. Endometriumda en çok çalışılmış adezyon molekülleri integrinlerdir. Endometriumda ilk saptandıkları günden sonra hem sabit hem de siklik değişen integrinlerin bulunduğunun anlaşılması endometriumda özel bir durumdur. Fibronektin reseptörü olan  $\alpha_5\beta_1$  endometrium stromasında devamlı bulunan tek integrindir. Diğer stroma integrinleri  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , siklus içerisinde değişiklikler gösterir. İmpantasyon döneminde, endometrium epitel hücrelerinde östrojen ve progesteron reseptörleri bulunmamaktadır.  $\alpha_v\beta_3$ 'ün artması ile beraber progesteron reseptörlerinin kaybolması bu integrinin implantasyonda önemli bir rolü olduğu ve reseptivitenin bir belirteci olabileceği görüşünü desteklemektedir.

#### 4.1.2.3. Trofinin/Tastin

Trofonin, trofoblast adezyonunda rol oynayan önemli bir membran proteindir. Tastin ise trofoninin fonksiyonu için gerekli sitoplazmik bir proteindir. Her iki protein de insan endometriumunda sadece implantasyon döneminde eksprese olur.

## 4.2. GEBELİK KAYIPLARI

Spontan gebelik kayıpları şaşırtıcı derecede yaygın olarak gözlenen bir durumdur. Spontan gebelik kayıpları, klinik olarak tanımlanmış gebeliklerin yaklaşık %15'ini oluştururken, klinik olarak tanımlanmadan önce gerçekleşen gebelik kayıpları çok daha fazladır (9). Gebelik kayıplarının çoğu 8. gebelik haftasından önce olurken 12. haftadan sonra bu sayı düşmektedir (10).

Tüm gebeliklerin sadece %30'u canlı doğum ile sonuçlanmaktadır (11). Düşüklerin ise %80'ni erken abortus olarak gerçekleşmektedir. %50-%75 oranı ile fetal kromozomal anomaliler bu durumun en sık görülen nedenini oluşturmaktadır (12). Normal karyotipli gebeliklerin sadece % 10'u abortusla sonuçlanırken kromozomal bozukluk olan gebeliklerin nerdeyse tümü 10. haftadan önce abortusla sonuçlanır (13,14). Bu sebepten bu türdeki gebelik kayıplarının doğal bir seleksiyon olarak iş gördüğü söylenebilir.

1977 yılından önce abortus tanımı, 28. haftadan önce sonlanan gebelikler için kullanılırken 1977 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yeni bir abortus tanımı geliştirmiştir. Bu tanıma göre, gebeliğin ilk 20. haftası içinde, ağırlığı 500 gramdan az embriyo veya fetus ve eklerinin tamamının veya bir kısmının uterus kavitesi dışına atılmasına abortus denilmektedir (15).

Tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK) son adet gününden itibaren 20. gebelik haftasından önce birbirini izleyen üç ya da daha fazla gebeliğin spontan olarak sonlanmasıdır.

Abortus riskinin geçmiş jinekolojik hikaye ile değiştiği yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (10,16,17,18). Bir önceki gebeliği abortusla sonlanan kadınlarda sonraki gebeliğin abortus ile sonuçlanma olasılığı yüksektir. TGK olmayan kadınlarda bir kez canlı embriyo ultrasonografi ile saptandıktan sonra fetal kayıp oranı %5 iken, TGK olan kadınlarda fetal kardiyak aktivite saptandıktan sonra fetal kayıp oranı 4-5 kat daha fazladır. Buna karşın hiç canlı doğum yapmayan ve TGK olan kadınların tekrar düşük yapma riski %40-45 dir (19).

Spontan gebelik kayıplarına ait verilere bakıldığında TGK'nın yaklaşık %0,3 (300'de 1) olması beklenirken yapılan epidemiyolojik çalışmalar bu sayının %1-2 olduğunu göstermiştir (20). Bir kez spontan gebelik kaybı %20, iki kez ardarda spontan gebelik kaybı %4, üç kez ardarda spontan gebelik kaybı ise %0,8 oranında gerçekleşmektedir (21).



Ayrıca yaş ile abortus riskinin arttığı da bilinmektedir. İlerleyen yaş ile beraber abortus oranının da %19-24 artmaktadır (22). 30 yaşından önce risk %7-15, 30-34 yaşında %8-21 iken 35-39 yaşlarda %17-28 arasında bir artış göstermektedir. 40 yaş ve üzerinde ise bu oran %34-52'ye çıkmaktadır (23,24,25,26). 40 yaş üzerinde ise bu oran %52 olup görüldüğü gibi ileri anne yaşı abortus riskini artırmaktadır (26,27,28).

Abortuslar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir.

#### **4.2.1. Oluş Zamanına Göre**

##### **4.2.1.1. Subklinik Abortus**

Bu tip abortus döllenmeden hemen sonraki günlerde gerçekleştiği ve gebelik fark edilemediği için belirlenemeyen abortus olarak da isimlendirilmektedir. Subklinik abortuslarda ya zamanında bir menstrüel kanama veya birkaç gün geciken bir menstrüel kanama ile gebelik sonlanır.

##### **4.2.1.2. Erken Abortus**

12. gebelik haftasının sonuna kadar oluşan abortuslardır.

##### **4.2.1.3. Geç Abortus**

13. ve 20. haftalar arasında oluşan abortuslardır.

#### **4.2.2. Oluş Şekline Göre**

##### **4.2.2.1. Spontan Abortus**

Dışarıdan herhangi bir müdahale olmadan gebeliğin 20. haftasından önce kendiliğinden gelişen abortuslara denir.

#### 4.2.2.2. İndüklenmiş Abortus

Tıbbi müdahale sonucu gebeliğin sonlandırılmasıdır. 1987 yılında Kadın Hastalıkları ve Jinekologlar Amerikan Kongresi (ACOG)'in yaptığı tanımlamaya göre, gebeliğin devamı anne hayatına veya sağlığına ciddi zarar veriyorsa, gebelik tecavüz veya ensest bir ilişki sonucunda oluştuysa, gebeliğin sürdürülmesi sonucu ağır anomalili çocuk doğumu gerçekleşecekse tıbbi müdahale ile gebelik sonlandırılır. Tüm bunların dışında maternal ağır sistemik hastalıklar, böbrek hastalıkları, kalp hastalıkları, gebelik psikozu, sarılık, kanser veya fetüste anomali tespit edilmişse, gebelikte teratojenik ilaç kullanılmışsa, özellikle ilk üç ayda Toxoplasma gondii, Rubella, Sitomegalovirus ve Herpes simplex virus (TORCH) enfeksiyonu geçirilmişse, genetik hastalık tespit edilmişse, pelvise aşırı radyasyon uygulanmışsa, fenilketonuri-galaktozemi gibi doğuştan metabolik hastalıklar varsa, veya ortada anne ve fetüs açısından hiçbir tıbbi sorun yokken, istenmeyen bir gebelik olgusu mevcut ise 20. gebelik haftasından önce medikal abortus yaptırılır. Ayrıca istenmeyen bir gebelik olgusu mevcut ise herhangi bir sebep olmaksızın yasal haftalar içerisinde medikal abortus (küretaj) yaptırılabilir.

### 4.3. SİTOKİNLER

Sitokinler, immün sistem hücreleri arasındaki ilişkileri kontrol eden ve kimyasal haberci olarak rol alan, küçük molekül ağırlıklı mediatörlerdir. Sitokinler lokal veya sistemik, immün yanıtı desteklemenin yanında hematopoiesis olayını da düzenlerler. Bunun yanında mitoz, hücre diferansiyasyonu, apoptoz ve onkogenesisde de rolleri vardır. Yapısal olarak birbirinden farklı ve genetik olarak da ilişiksiz görünen yüzden fazla sitokin tanımlanmıştır. Çoğu 6.000-60.000 molekül ağırlığında olan, polipeptid veya glikoprotein yapısındadır. Çok düşük konsantrasyonlarda bile, spesifik reseptörleri ile hedef hücreye bağlanarak etkilerini gösterirler (29).

Aktive T lenfositleri tarafından sentezlenip salınan sitokinler “lenfokin” olarak adlandırılırken aktive monosit ve makrofajlardan sentezlenip salınan sitokinler “monokin” ve lökositler arasında etkileşim yapan sitokinler ise “interlökin” olarak adlandırılmaktadır. Antijene özgül olmayan, lenfosit uyarılmasını ve farklılaşmasını yöneten faktörler interlökinlerdir (29, 30).

Birçok farklı özellik göstermelerine rağmen her sitokin spesifik bir uyarana karşı yanıt olarak spesifik hücre tipleri tarafından sentezlenir ve hedef hücrelerin büyüme, hareketlilik, farklılaşma ve fonksiyonları üzerine etkilerini gösterir. Birden fazla etkisi olan sitokinler için pleotropik tanımı kullanılırken, bu özelliğe de pleotropizm adı verilir.

Sitokinlerin, üretildikleri hücreleri etkilemeleri otokrin, yakındaki başka bir hücreyi veya hücreleri etkilemeleri parakrin, dolaşım aracılığı ile farklı bir yerde etki göstermeleri ise endokrin olarak adlandırılır (29, 30).

Hematopoez geniş bir sitokin spektrumu tarafından düzenlenir. Hücre siklusuna giren kök hücrenin (stem cell) aktivasyonu IL-1 ve IL-6 ile gerçekleştirilirken bütün hematopoetik serideki öncül hücrelerin büyümesi IL-3 ve GM-CSF ile sağlanır. Eritrositler için eritropoetin, granülositler veya makrofajlar için koloni stimüle edici faktör (G-CSF, M-CSF) gibi türe özgü olan sitokinler hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynar. Platelet üretiminin kontrolü hakkında ise pek az şey bilinmektedir. GM-CSF, M-CSF ve G-CSF aktivasyon faktörleri olarak olgun hücreler üzerinde etkilidir. Yalnız çok az sitokinin immün sistemin inhibisyonunda etkili olduğu bilinmektedir. TGF- $\beta$  birbiri ile ilişkili 5 molekülden oluşan bir ailedir ve bütün immünite ve hematopoetik fonksiyonlar üzerinde inhibitör görevi vardır. İnterferon (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  immün sistem hücrelerinin

proliferasyonuna engel olmaktadır. IFN  $\alpha$  ve  $\beta$ , IFN  $\gamma$  vasıtası ile Büyük Doku Uyumu Kompleksi (MHC) Sınıf II indüksiyonunu engeller. IFN $\gamma$  ise IL-4 aracılığı ile B lenfositlerinde MHC sınıf II indüksiyonunu engelleyebilir (29,30,31).

Sitokinler, genel olarak birbirleri ile başlıca şu etkinlikleri gösterir:

- a) Lenfoid hücreler ile bazı hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamak.
- b) İmmün cevabı şiddetlendirerek veya baskılayarak düzenlemek.
- c) Enflamasyon olaylarına katılan hücreleri aktive etmek, reaksiyon yerine toplayarak orada tutmak, çeşitli biyolojik etkinlik göstermek.
- d) Kemik iliğine etki ile hematopoetik regülasyona katılmak.
- e) Bazı hipofiz hormonlarının ve diğer biyolojik maddelerin sentez ve salınmalarına neden olmak.
- f) Ateş ve akut faz cevabı oluşturmak.
- g) Antiviral etkinlik göstermek.

#### **4.3.1. I. Grup Sitokinler**

Doğal immüitenin mediatörleridir. İnfeksiyöz ajanların uyarımı sonucunda sentezlenirler. IL-1, Tümör nekrozu faktörü (TNF), IL-6, Tip I IFN ve kemokinler bu grupta yer alır.

##### **4.3.1.1. IL-1**

Temel olarak karaciğer, akciğer, beyin, kemik gibi dokulara geçen makrofajlar yani aktive mononükleer fagositler tarafından sentezlenir ve T hücre stimülatörüdür. Bunun yanında farklı uyarılar aracılığı ile değişik hücreler tarafından da sentezlenebilir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarından köken alan lipopolisakkaridler (LPS) monosit makrofajlar, dendritik hücreler, Langerhans hücreleri, endotelyal hücreler, mikroglial hücreler, epitelial hücreler ve B lenfosit serilerinin IL-1 sentezlemesini uyarır. Ayrıca alüminyum hidroksit nötröfiller üzerinde, muramyl dipeptid fibroblastlar üzerinde, solid

partiküller, hidroksi üre ve aktif hale geçmiş T lenfositleri monosit makrofajlar üzerinde aynı etkiyi gösterir (29,30,32,33,34,35,36).

IL-1 düşük konsantrasyonlarda lokal inflamasyon mediatörü olarak etki eder. Özellikle, mononükleer fagositler ve vasküler endotelial hücreler üzerinde, IL-1 sentezinin daha artmasını ve IL-6 sentezinin indüklenmesini sağlar. Lökosit adhezyon moleküllerinin hücre yüzey ekspresyonunu arttırabilir. Nötrofiller gibi inflamatuvar lökositleri doğrudan etkilemez ancak kemokin sentezlemeleri için mononükleer fagositleri ve endotelial hücreleri uyararak bu hücrelerin uyarılmasını sağlar. Yüksek konsantrasyonda ise kan dolaşımına katılır ve endokrin etki gösterir. Ateş yükselmesine ve akut faz plazma proteinlerinin sentezinin uyarılmasına neden olur.

IL-1 pleotropik etkiye sahiptir. T ve B lenfositlerini etkileyerek sitokin ve immünglobulin sentezini artırır.

IL-1'in IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  olarak iki ayrı formu bulunur. Her ikisi de aynı hücre yüzey reseptörüne bağlanır.

IL-1'in iki farklı reseptörü vardır. Tip I reseptör (IL-1RI) ve Tip II reseptör (IL-1RII). IL-1RI, IL-1 ile bağlandıktan sonra sitoplazma içerisine sinyal iletir ve IL-1'e yanıt veren tüm hücrelerde, sinyalden sorumlu olduğu düşünülmektedir. IL-1RII ise sinyal iletiminde rol oynamaz ancak sistemik inflamasyon sırasında solubl halde serum içerisine salgılanır ve genellikle IL-1 $\beta$ 'ya bağlanır (29,30,32,33,34,35,36).

#### **4.3.1.2. TNF**

İnsanda 6. kromozom üzerinde, MHC gen kompleksi bölgesinde iki ayrı gen tarafından kodlanmasına rağmen MHC proteinleri ile yapısal benzerlikleri bulunmaz. LPS karşı konak tarafından geliştirilen cevabın ana mediatörüdür. TNF, LPS ile aktive olan mononükleer fagositler, antijenle uyarılmış T hücreleri, aktive doğal öldürücü (NK) hücreleri ve aktive mast hücreleri tarafından sentezlenir. İnsanlarda TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$  olmak üzere iki ayrı form bulunur. TNF- $\alpha$  daha çok aktifleşmiş makrofajlardan ve daha az olarak da diğer hücreler tarafından üretilir. TNF- $\beta$  ise aktifleşen T lenfositleri tarafından üretilir ve lenfotoksin olarak isimlendirilir. TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$  hedef hücre yüzeyinde aynı reseptöre bağlanırlar ve aynı etkiyi gösterirler. Tip I ve Tip II olmak üzere iki reseptörü vardır. TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$  Tip II reseptörü ile daha yüksek afinite ile bağlanır. Tip I

reseptörü aracılığı ile sitotoksik aktivite ve fibroblast proliferasyonu yönlendirilir. Tip II reseptörü ile ise T lenfosit proliferasyonu yönlendirilir. IL-1 ve TNF benzer biyolojik aktivite gösterirler. Her ikisi de endojen pirojendir (29,30,32,33,34,35,36,37,38).

Düşük konsantrasyonlarda, lökositlerin ve endotelial hücrelerin otokrin ve parakrin regülatörü olarak etki gösterir. Vasküler endotelial hücrelerin adezyon molekülleri eksprese etmesine neden olur ve böylece endotelial hücre yüzeyi lökositler, nötrofiller ve daha sonra monositler ve lenfositler için daha adeziv hale gelir. TNF, inflamatuvar lökositleri aktive eder. Özellikle nötrofil aktivasyonu üzerine güçlü etkisi vardır. Eozinofil ve mononükleer fagositleri de etkiler. Mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini IL-1, IL-6 ve kemokin gibi sitokinleri üretmesi için uyarır. Virüsle infekte CD8<sup>+</sup> hücrelerin, MHC sınıf I ekspresyonunu artırır.

Yüksek konsantrasyonlarda ise endojen pirojen etki gösterir. Mononükleer fagositleri, dolaşıma IL-1 ve IL-6 sentezlemeleri için uyarır. Hepatositleri etkileyerek bazı serum proteinlerinin sentezini artırır. IL-1 ile benzer etki göstererek akut faz yanıtını başlatır. Koagülasyon sistemini etkileyerek, vasküler endotelial hücrelerin prokoagülant ve antikoagülant aktivitelerinin dengesini değiştirir. Kemik iliğinde kök hücre bölünmesini inhibe eder (29,30,32,33,34,35,36,37,38).

#### **4.3.1.3. IL-6**

IL-6 çok yönlü biyolojik aktiviteye sahip olup bu etkilerini IL-1 ve TNF ile sinerjistik olarak gösterir. Aktif T ve B lenfositleri, monositler, endotelial hücreler, epitelial hücreler ve fibroblastlar tarafından sentezlenir. Yardımcı T lenfositleri (Th) üzerine mitojenik aktiviteye sahiptir. B hücre proliferasyonuna ve immünglobulin sentezi artışına neden olur. Karaciğerde akut faz cevabın gelişimini etkiler. IL-11 ve TNF ile birlikte hematopoiesis üzerinde uyarıcı etkisi vardır.

IL-6 için iki ayrı reseptör (IL-6R $\alpha$  ve IL-6R $\beta$ ) olup çeşitli hücrelerde eksprese edilir. Makrofajlar, miyelomonositik hücre serisi, hepatositler, dinlenme halindeki T hücreleri, aktif veya Epstein-Barr virüs (EBV) ile infekte B lenfositleri ve plazma hücreleri bu reseptörleri eksprese eder. IL-6, alfa reseptörüne daha düşük bir afinite ile bağlanır ve oluşan kompleks yapı IL-6R $\beta$ 'ya bağlanarak sitoplazmik sinyal iletimini oluşturur (29,33,34,35,37,38).

#### **4.3.1.4. Tip I Interferon (IFN)**

Virüsle infekte olan hücreler tarafından sentezlenir. IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$  olmak üzere iki farklı formda bulunur. İmmün yanıtta bu ikisi birlikte sentezlenir. Makrofaj ve mononükleer fagositler tarafından sentezlendiği için “lökosit interferonu” olarak da isimlendirilen IFN- $\alpha$ , lökositler tarafından oluşturulan ana IFN’dur. Birbirleriyle ilişkili 18 ayrı gen tarafından kodlanır ve 14’ü fonksiyonel olan proteinlerin aminoasit dizileri %90 oranında benzerdir. IFN- $\beta$  ise virüsle infekte olan fibroblastlarca üretilir ve tek bir gen tarafından kodlanır. Antijenle aktive olmuş T lenfositleri, mononükleer fagositleri IFN sentez etmesi için uyarır. Her iki tip de hemen hemen tüm hücrelerde bulunan, tek bir reseptöre bağlanarak etkilerini gösterir. Sitotoksik T lenfositlerinin MHC sınıf I molekülleri ekspresyonunu artırır. Viral replikasyonu inhibe eden Tip I IFN aynı zamanda hücre proliferasyonunu da inhibe eder. NK hücrelerinin litik potansiyelini artırır. MHC sınıf I moleküllerinin ekspresyonunu artırır, sınıf II moleküllerinin ise ekspresyonunu azaltır (29,31,36,37,38,39).

#### **4.3.1.4. Kemokinler**

İki ayrı kromozom üzerinde bulunan genler tarafından kodlanırlar. Alfa formu 4. kromozom üzerindeki genler, beta formu ise 17. kromozom üzerindeki genler tarafından kodlanır. Kemokinler, mononükleer fagositler, endotelial hücreler ve fibroblastlar tarafından sentezlenir (29,31,36,37,38,39).

#### **4.3.2. II. Grup Sitokinler**

T lenfositleri tarafından tanınan, spesifik antijenlere karşı yanıt olarak geliştirilen ve lenfosit aktivasyonu, büyüme ve farklılaşmasını yönlendiren sitokinlerdir. IL-2, IL-4 ve TGF- $\beta$ , bu gruba yer alan sitokinlerdir.

#### 4.3.2.1. IL-2

Sadece aktif hale geçmiş T lenfositleri tarafından transkribe edilir, sentezlenir ve sekrete edilir. T hücreleri için büyüme faktörü olarak da bilinir (T cell growth factor, TCGF). 4. kromozom üzerindeki tek bir gen tarafından sentezlenen IL-2'nin hem otokrin hem de parakrin etkisi vardır. T hücrelerinin G1 fazından S fazına geçmelerini sağlayarak DNA replikasyonu için sinyal iletir. NK hücrelerinin büyümesi ve sitolitik aktivasyonlarını etkiler. Bunun yanında B lenfositlerinin proliferasyonunu ve immünglobulin sentezini uyarır. IL-2 miktarı, immün yanıtın büyüklüğünün önemli kanıtıdır. IL-2 molekülleri, hedef hücre üzerindeki etkilerini reseptörü aracılığı ile gösterir. Reseptör, dinlenme halindeki hücrelerde görülmez. Aktif hale geçen T lenfositleri yüksek ve düşük afiniteli iki ayrı reseptör gösterir. Düşük afiniteli reseptör tek zincir ( $\alpha$  veya  $\beta$ ) içerirken yüksek afiniteli reseptör iki zincir ( $\alpha, \beta$ ) içerir. IL-2 her iki zincire de bağlanır. Alfa zinciri hızla IL-2 ile bağlanır ve kolayca kompleksten ayrılırken beta zinciri ise yavaş bağlanmasına karşın, kurulan bağ aracılığı ile yanıt gelişimini sağlar. Yüksek afiniteli reseptör, IL-2R, iki zincirin uygun birleşmesi ile oluşan alfa-beta dimeridir. IL-2'ye hızlı bağlanır ancak yavaş ayrılır. Hücre, sinyali  $\beta$  zinciri aracılığı ile alırken  $\alpha$  zinciri de ligandın bağlanmasını sağlar (38,39,40,41,42,43).

#### 4.3.2.2. IL-4

Aktif hale gelmiş  $CD4^+$  T hücrelerinden salınır. Bu sitokin, IL-6, IL-5 ve IL-4 salgılayan  $CD4^+$  T hücre alt gruplarından Tip 2 Th (Th2) için otokrin büyüme faktörü etkisi gösterir. Buna karşın IL-2'nin, IFN- $\gamma$  ve lenfotoksin üreten klonların üzerine ters bir etkisi vardır. Mast hücreleri için büyüme faktörüdür ve IL-3 ile proliferasyonuna neden olur. IFN- $\gamma$ 'nın makrofaj aktivasyon etkisini bloke eder ve IL-1 ve TNF üretimini de inhibe eder. B hücrelerinde MHC sınıf II moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Antikor sentezini uyarır ve immünglobulin izotipinin değiştirilmesinde (isotype switching) de önemli bir etkiye sahiptir. Özellikle vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) olmak üzere bazı adhezyon moleküllerinin endotelial hücrelerin üzerinde ekspresyonunu artırır ve sonuçta lenfositlerin, monositlerin ve özellikle eozinofillerin bağlanmasını artırır (38,39,40,41,42,43).



### 4.3.2.3. TGF- $\beta$

Aktif T hücreleri, makrofajlar ve diğer somatik hücreler tarafından salgılanır. TGF- $\beta$  nın  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_3$  olmak üzere üç ayrı formu vardır. Birçok sitokinin sentezini, sınıf II MHC moleküllerinin ve IL-2 reseptörünün ekspresyonunu baskılar ve, T ve B lenfositleri üzerindeki IL-2 etkisini ve timositler üzerindeki IL-1 etkisini bloke eder. Bunun yanında B hücrelerini etkileyerek IgA sentezini uyarır. Aynı genin ürünü olan bu moleküllerin hepsi aynı hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. Tip I, Tip II, Tip III, Tip IV ve Tip V olmak üzere 5 adet reseptörü bulunmaktadır. Tip I ve II reseptörleri sinyali iletiminde görevliken diğer reseptörlerin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (29,38,39,40,41,42,43).

### 4.3.3. III. Grup Sitokinler:

T lenfositleri tarafından tanınan spesifik antijenlere karşı nonspesifik inflamatuvar hücreleri aktif hale geçiren mediatörlerdir. IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-5, IL-12, Migrasyon İnhibitör Faktör (MIF) ve Lenfotoksin (LT) bu grupta yer alır (36,37).

#### 4.3.3.1. Tip II Interferon (IFN- $\gamma$ )

Aktif hale geçen CD8<sup>+</sup> T lenfositleri, Tip 1 Th (Th1) ve az da olsa NK hücreleri tarafından sentezlenir. Hemen tüm hücreler IFN- $\gamma$  reseptörü eksprese eder. Etkilenen hücreler, sınıf I MHC moleküllerinin ekspresyonunu artırır. IFN- $\gamma$ , monokinlerin (IL-1, IL-6, IL-8, TNF) sentezi için makrofajları aktif hale getirir. Yabancı antijenlere karşı T lenfositlerini daha yetenekli hale getirirken B lenfositlerinin de immünglobulin sentezini uyarır. Nötrofilleri, NK hücrelerini ve vasküler endotel hücreleri aktif hale getirir. IFN- $\gamma$  varlığında, venlerin endotel hücreleri nötrofiller için daha adeziv hale geçer (36,37).

#### 4.3.3.2. Lenfotoksin (LT)

LT genleri, TNF genleri ile beraber MHC gen bölgesi üzerinde bulunur. İnsanda, doğrudan salgı proteini şeklinde sentezlenir. TNF ile %30 oranında homologtur ve aynı hücre yüzey reseptörüne bağlanır. TNF daha çok mononükleer fagositler tarafından

sentezlenirken lenfotoksin aktif hale geçen T lenfositleri tarafından sentezlenir. Nötrofillerin aktif hale geçmesini sağlar ve bu etkisi IFN- $\gamma$ 'nın etkisinden daha güçlüdür. Aynı zamanda vasküler endotel hücrelerini aktif hale getirerek lökositlere karşı daha adeziv olmalarını ve sitokin sentezlemelerini sağlar.

#### **4.3.3.3. IL-10**

Aktif T hücrelerinin sitokin üretimini inhibe ettiği için, sitokin sentezini inhibe eden faktör olarak da isimlendirilir. Th ve Tc hücreleri, monositler, keratinositler ve aktif B hücreleri tarafından üretilir. Özellikle Th1'in sentezlediği IL-2 ve IFN- $\gamma$  gibi sitokinler ile makrofaj ve NK hücreleri tarafından sentezlenen sitokinlerin sekresyonunu baskılar. MHC sınıf II moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak, T hücre kaynaklı inflamasyonu engeller. Ayrıca diğer sitokinlerle sinerjistik etki göstererek B hücrelerinin proliferasyonuna neden olur. Doğrudan uyarıcı etki ile antikor üretimini artırır (38,39,40,41,42,43).

#### **4.3.3.4. IL-5**

Aktif hale geçen Th2 hücreleri ve mast hücrelerince sentezlenen IL-5'in en önemli fonksiyonu, eozinofiller üzerinedir. Bu hücreler üzerine hem proliferatif hem de fonksiyonlarını arttırıcı etkileri vardır. İn vivo çalışmalarda, helmint enfeksiyonları ve alerjik hastalıklar sırasında eozinofilleri düzenleyen ana sitokinin IL-5 olduğu gösterilmiştir. IL-5 aynı zamanda B hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasını da uyarır ve IL-2 ve IL-4 gibi diğer sitokinlerle sinerjistik etki gösterir. B hücrelerinin özellikle IgA sentezi üzerinde etkisi vardır.

#### **4.3.3.5. IL-12**

B hücreleri ve makrofajlar tarafından sentezlenir. Aktif T lenfositleri ve NK hücrelerinin proliferasyon ve IFN- $\gamma$  sentezlemelerini etkiler. Th hücreler üzerine etki ederek Th1 hücrelerin farklılaşmasını sağlar. Ayrıca sitotoksik T lenfositlerini etkileyerek, fonksiyonel olarak aktif olmalarını sağlar. Th1 lenfositlerin üzerinden hücre kaynaklı

immün yanıtı yönlendirirken, IL-4, IL-10 ve IgE tipi antikorların üretimi gibi Th2'ye bağlı fonksiyonları da baskılayarak etki gösterir (38,39,40,41,42,43).

#### **4.3.3.6. MIF**

In vitro koşullarda yapılan çalışmalarda makrofajların hareketini inhibe ettiği gösterilen bu sitokinin biyolojik etkileri henüz tam olarak ortaya konulmamıştır (31,34).

#### **4.3.4. IV. Grup Sitokinler**

Hem aktif hale geçen lenfositler hem de diğer hücreler tarafından üretilen mediatörlerdir. Olgunlaşmamış lökositlerin büyüme ve farklılaşmasını düzenleyen bu sitokinler c-kit ligand, IL-3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF ve IL-7 olarak sıralanabilir.

##### **4.3.4.1. c-kit ligand**

Kemik iliğindeki stromal hücreler, fibroblastlar ve endotelial hücrelerden salınır. Kök hücrelerin diğer koloni stimülatör faktörlere (CSF) yanıt vermesi aşamasında gereklidir.

##### **4.3.4.2. IL-3**

Antijenle veya mitojenle aktif hale gelmiş Th hücreler tarafından sentezlenir. Kemik iliğindeki pluripotent kök hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını sağlar. Tüm hematopoietik hücre tiplerinin üretimi için pluripotent kök hücreleri stimüle ettiği için "multi CSF" olarak da isimlendirilir.

##### **4.3.4.3. IL-7**

Kemik iliği stromal hücreleri tarafından monomer olarak sentezlenir. Hematopoietik progenitör hücreler üzerine etki eder. Hem T hem de B hücrelerinin prekürsörleri üzerinde, büyüme faktörü olarak etkisini gösterir. CSF ile birlikte timosit ve pre-B hücreleri üzerine

mitojenik etki sağlar. Fetal timosit gelişimi sırasında T hücre reseptör genlerinin düzenlenmesini başlatan sinyali etkilediği düşünülmektedir.

#### **4.3.4.4. M-CSF**

T lenfositleri, makrofajlar, endotelial hücreler ve fibroblastlar tarafından sentezlenir. Dolaşıma girmeyen bu sitokin de etkisini lokal olarak gösterir.

#### **4.3.4.5. G-CSF**

Granülositlerin şekillenmesini ve metabolizmasını hızlandıran G-CSF, aktif T hücreleri, makrofajlar, endotel hücreleri ve fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir.

#### **4.3.4.6. GM-CSF**

GM-CSF, T hücrelerinde mononükleer fagositlerden ve endotelial hücrelerden salgılanır. Dolaşıma girmeyen bu sitokin, etkisini lokal olarak gösterir. Granülosit ve makrofajların üretilmesini uyarır. İmmatür progenitörlerin büyüme ve farklılaşmasını, matür lökositlerin ise aktivasyonunu sağlar. (33,34)

GM-CSF ve GM-CSF reseptörünün insan endometrium dokusundaki ekspresyonu GM-CSF'in bu dokudaki otokrin/parakrin rolünü göstermektedir. Sitokinler, endometriumu etkileyen çeşitli normal ve patolojik olayları düzenleyen moleküllerin interaktif ağının bir parçasıdır. GM-CSF, insan ve diğer türler olmak üzere endometrium içeren birçok üreme siteminde eksprese edilen hematopoietik sitokin ailesinin bir üyesidir. GM-CSF reseptörleri çoğunlukla arteriyol endotelial ve stromal hücreler ile ilişkili olduğundan endometriumdaki esas ekspresyon alanları epitelial hücrelerdir. GM-CSF granülosit ve makrofajların çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalması için önemli bir büyüme faktörü olmasına rağmen bazı non-hematopoetik hücrelerin poliferasyonunu da uyarır. GM-CSF'in uterusdaki biyolojik etkisi henüz bilinmemektedir. Ancak hayvan modellerinden elde edilen veriler GM-CSF'in gebelik boyunca embriyonik gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini ve düşük yapma eğilimli farelerde spontan abortları NK hücre aktivitesinin inhibisyonu ile T hücre bağımlı mekanizma sonucu engellediği

gösterilmiştir (44). Bununla birlikte GM-CSF bakımından eksik farelerin doğurgan oldukları bildirilmiştir. Endometriyal GM-CSF ekspresyonu overian steroidleri tarafından düzenlenen bir döngüye bağımlı olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak makrofaj, fibroblast ve endotelial hücreler gibi bazı hücrelerdeki  $TNF\alpha$ , IL-1 ve TGF- $\beta$  gibi bazı sitokinlerin GM-CSF ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir. TGF- $\beta$ , GM-CSF gibi sitokinlerin büyüme üzerindeki etkilerini arttırırken aynı zamanda multipotansiyel hematopoietik hücre büyümesini inhibe ederek immünosüpresör gibi davranan multifonksiyonel bir sitokindir (44).



## 5. MATERİYAL VE YÖNTEM

### 5.1. MATERİYAL

#### 5.1.1. Hasta Ve Kontrol Grubu

Çalışmada İstanbul Grup Florence Nightingale Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Özel Mikrogen Genetik Tanı Laboratuvarına 2009-2012 yılları arasında başvuran ve klinik öyküleri ile önceki test sonuçları uygun bulunan kadın bireylere ait toplam 79 adet venöz kan örneği dizi analizi yöntemi ile incelenerek değerlendirilmiştir. 79 adet kan örneğinin 48'i çalışma grubu kriterlerine uyum gösteren hastalardan oluşurken, kalan 31 adet kan örneği kontrol grubunu oluşturmaktadır. Çalışma grubuna dahil edilen hastalar, 20-35 yaş aralığında spontan gebelik ve 2 veya daha fazla ilk trimester düşük öyküsüne sahip olup hiç normal doğum yapmamıştır. Ayrıca toksik ajan maruziyeti, anormal kromozom test sonucu, F-V veya protrombin mutasyonu, trombofili, TORCH pozitif gibi düşüğü açıklayan nedenler bulunmamaktadır. Kontrol grubu bireyler ise hiç düşük yapmamış ve en az 1-2 adet normal yollar ile sağlıklı bebek doğumu gerçekleştirmiştir. Kontrol grubu için herhangi bir yaş aralığı belirlenmemiştir.

Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm gönüllüler 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Formu' adı altında hazırladığımız formu okuyup imzaladıktan sonra çalışmamıza dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan bireylerden Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)'li tüplere 2 mililitre (ml) venöz kan örneği alındı. Bu kan örneklerinden DNA izolasyonları yapılmadan önce kan örnekleri +4°C'de biriktirilerek saklandı. DNA izolasyonları belirli aralıklarla gruplar halinde gerçekleştirildi.

## 5.2. YÖNTEM

### 5.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Tekrarlayan gebelik kayıpları ile GM-CSF gen bölgesi olası mutasyon ve polimorfizmlerini bulmayı amaçladığımız çalışmamız için EDTA'lı tüplere 2 ml kan örnekleri alındı ve bu örneklerden DNA izole edildi. DNA izolasyonu için “Fermentas-Genomic DNA Isolation Kit” K0512 DNA izolasyon kiti kullanıldı.

DNA izolasyonu için sırası ile aşağıdaki işlemler yapıldı.

1. EDTA'lı tüplerde bulunan kan örnekleri 2-3 saniye (sn) vortekslendi ve içerisinden 200 mikrolitre ( $\mu$ l) alınıp ependorf tüplere konuldu.
2. Ependorf tüplerde bulunan kan örneklerinin üzerine hücre lizisinin gerçekleşmesi ve DNA'nın serbest kalması amacı ile 400  $\mu$ l lizis solüsyonu ve 20  $\mu$ l proteinaz K enzimi eklendi ve pipetaj yapıldı.
3. Tüpler 56°C de 10 dakika (dk) inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon süresi sona eren tüplere 200  $\mu$ l %95'lik etil alkol (EtOH) eklendi ve karışım filtreli kolon tüplere aktarıldı. Filtreli kolon tüplerde bulunan karışım iyice karıştırıldı ve 8 000 rpm de 1 dk santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası kolon tüplerde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Filtreli tüpler yeni kolon tüplere yerleştirildi ve üzerine 500  $\mu$ l wash buffer I eklenip 10 000 rpm de 1 dk santrifüj edildi.
6. Kolon tüpte biriken sıvı tekrar uzaklaştırıldı ve filtreli tüpün altına yerleştirildi. Filtreli tüplere 500  $\mu$ l wash buffer II eklenip 13 000 rpm de 3 dk santrifüj edildi.
7. Yıkama işleminden sonra kolon tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı ve hiçbir ekleme yapmadan 13 000 rpm de 1 dk santrifüj edildi.
8. Kolon tüpün uzaklaştırılmasından sonra filtreli tüp temiz bir ependorf tüpün üzerine yerleştirildi ve üzerine 100  $\mu$ l elution buffer eklendi. Bu karışım 1000 rpm de 1 dk santrifüj edildi.
9. Ependorf tüpte biriken filtrat artık saf DNA içermektedir. Elde edilen bu DNA örnekleri PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) işlemine kadar -20°C de saklandı.

## 5.2.2. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

### 5.2.2.1. GM-CSF Primer Dizaynı

GM-CSF geninin baz dizileri incelenerek amplifikasyonu için uygun primer bölgeleri belirlendi. Dizi üzerindeki primer bölgeleri Şekil 1’de gösterilmiştir.

```
>chromosome:GRCh37:5:131408883:131412459:1
TGCTGGATGTGCACATGGTGGTCATTCCCTCTGCTCACAGGGGCAGGGTCCCCCCTTAC
TGGACTGAGGTTGCCCCCTGCTCCAGGTCTGGGTGGGAGCCCATGTGAACTGTCAGTGG
GGCAGGTCTGTGAGAGCTCCCCTCACACTCAAGTCTCTCACAGTGGCCAGAGAAGAGGAA
GGCTGGAGTCAGAATGAGGCACCAGGGCGGGCATAGCCTGCCCAAAGGCCCTGGGATTA
CAGGCAGGATGGGGAGCCCTATCTAAGTGTCTCCCACGCCCCAGCCATTCCAGGC
CAGGAAGTCCAAACTGTGCCCTCAGAGGGAGGGGGCAGCCTCAGGCCATTTCAGACTGC
CCAGGGAGGGCTGGAGAGCCCTCAGGAAGGCGGGTGGGTGGGCTGTCGGTTCTTGAAAG
GTTTATTAAATGAAAACCCCAAGCCTGACCACCTAGGGAAAAGGCTCACCGTTCCCATGT
GTGGCTGATAAGGGCCAGGAGATTCCACAGTTCAGGTAGTTCCCCGCCTCCCTGGCATT
TTGTGGTCACCATTAATCATTTCTCTGTGTATTTAAGAGCTCTTTTGCCAGTGAGCCA
GTACACAGAGAGAAAGGCTAAAGTTCTCTGGAGGATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTT
GGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTGCACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCC
CTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGCGTCTCTGAACCTGAGTAGAGACAC
TGCTGCTGAGATGGTAAGTGAGAGAATGTGGCCTGTGCCTAGGCCACCCAGCTGGCCCC
TGACTGGCCACGCCTGTCAGCTTGATAACATGACATTTTCTTTTCTACAGAAATGAAACA
GTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGTAAGATGCTTCTCTCTGACATAGCTT
TCCAGAAGCCCCTGCCCTGGGGTGGAGGTGGGGACTCCATTTTAGATGGCACCACACAGG
GTTGTCCACTTTCTCTCCAGTCAGCTGGCTGCAGGAGGAGGGGGTAGCAACTGGGTGCTC
```



AAGAGGCTGCTGGCCGTGCCCTATGGCAGTCACATGAG **CTCCTTTATCAGCTGAGCGG**C  
CATGGGCAGACCTAGCATTCAATGGCCAGGAGTCACCAGGGGACAGGTGGTAAAGTGGGG  
GTCAC TTCATGAGACAGGAGCTGTGGGTTTGGGGCGCTCACTGTGCCCCGAGACCAAGTC  
CTGTTGAGACAGTGCTGACTACAGAGAGGCACAGAGGGGTTTCAGGAACAACCCTTGCCC  
ACCCAGCAGGTCCAGGTGAGGCCCCACCCCCCTCTCCCTGAATGAT **GGGGTGAGAGTCAC**  
**CTCCTT**CCCTAAGGCTGGGCTCCTCTCCAGGTGCCGCTGAGGGTGGCCTGGGCGGGGCAG  
[TGAGAAGGGCAGGTTCGTGCCTGCCATGGACAGGGCAGGGTCTATGACTGGACCCAGCCT  
GTGCCCCCTCCCAAGCCCTACTCCTGGGGGCTGGGGGCAGCAGCAAAAAGGAGTGGTGGAG  
AGTTCTTGTACCACTGTGGGCACTTGGCCACTGCTCACCGACGAACGACATTTCCACAG  
**GAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTC**  
**ACCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCA**  
**ACCCCC**GTGAGTGCCCTACGGCAGGGCCTCCAGCAGGAATGTCTTAATCTAGGGGGTGGGG  
TCGACATGGGGAGAGATCTATGGCTGTGGCTGTTTCAGGACCCAGGGGGTTTCTGTGCCA  
ACAGTTATGTAATGATTAGCCCTCCAGAGAGGAGGCAGACAGCCATTTTCATCCCAAGGA]  
GTCAGAGCCACAGAGCGCTGAAGCCACAGTGCTCCCCAGCAGGAGCTGCTCCTATCCTG  
GTCATTATTGTCATTATGGTT **AATGAGGGTCAGAGGTGAGGG**CAAACCCAAGGAACTTGG  
GGCCTGCCCAAGGCCAGAGGAAGTGCCAGGCCCAAGTGCCACCTTCTGGCAGGACTTT  
CCTCTGGCCCCACATGGGGTGCTTGAATTGCAGAGGATCAAGGAAGGGAGGCTACTTGA  
ATGGACAAGGACCTCAGGCACTCCTTCTGCGGGAAGGGAGCAAAGTTTGTGGCCTTGAC  
TCCACTCCTTCTGGGTGCCAGAGACGACCTCAGCCCAGCTGCCCTGCTCTGCCCTGGGA  
CCAAAAGGCAGGCGTTTGACTGCCAGAAGGCCAACCTCAGGCTGGCACTTAAGTCAGG  
CCCTTGACTCTGGCTGCCACTGGCAGAGCTATGCACTCCTTGGGGAACACGTGGGTGGCA  
GCAGCGTCACCTGACCCAGGTCAGTGGGTGTGTCCTGGAGTGGGCCTCCTGGCCTCTGAG  
TTCTAAGAGGCAGTAGAG **AAACATGCTGGTGCCTTCCCTT**CCCCACGTTACCCACTTGCCT  
G [GACTCAAGTGTTTTTTATTTTTCTTTTTTAAAG **GAACTTCCTGTGCAACCCAGATTA**  
**TCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTATCCCCTTTGACT**

```
GCTGGGAGCCAGTCCAGGAGTGAGACCGGCCAGATGAGGCTGGCCAAGCCGGGGAGCTGC
TCTCTCATGAAACAAGAGCTAGAACTCAGGATGGTCATCTTGGAGGGACCAAGGGGTGG
GCCACAGCCATGGTGGGAGTGGCCTGGACCTGCCCTGGGCCACACTGACCCTGATACAGG
CATGGCAGAAGAATGGGAATATTTTATACTGACAGAAATCAGTAATATTTATATATTTAT
ATTTTTAAAATATTTATTTATTTATTTATTTAAGTTCATATTCATATTTATTCAAGATG
TTTTACCGTAATAATTATTATTTAAAATATGCTTCTA]CTTGTCCAGTGTTCTAGTTTGTT
TTTAACCATGAGCAAATGCCAGTGGTGCCTGCCTTCCCATGAGGCAGGGGAGGGAGGAAA
CGGGGAGGTGGAGAGGGGGCGGGGGCCTCCAGGCGTTGGGCA]CTATCCAAGGGCCAACA
CTGTCAGAGCAGAGGGGAGGTGAGAGCCGG]CATAGGTGCGGAATTCTGCACACCTGGAC
GGGCTTCCC GGATGCTCCAGGGCTCCCACCCAGAGAATGGCTCTCAAGTTCACCTGGA
AGTCCAAGTGACCAGCCCAGGGAACCTTATCCCAGAGAAGGGCACCACCCTTCCTGGGG
AGGCCTGGGGGTTGGCTGGTCACTGGCTGAACAGGCCCACTCTGGCATCAGGCAAAACAC
CTGCCCTGTAGAGGCCTTGGCCCCTGTGCCCCACGCCCTGCCCTCACACTCTGAGATTT
AACCATTCGAAAGTAAACAGCAAAATAGACTAACTGTTTCAGGGGAAAAGAAACCAAACC
ACAGGGGTCACAGTGCAGCGTATTTACCAAACCTTGCCCCAAAATGGGTGATCTTAATCTC
TGAGAGTCAGAATGTAAGGTCATAATTTGTTGGTACA
```

**Şekil 1:** GM-CSF Genine Ait Baz Dizileri Ve Uygun Primer Bölgeleri

4 ekzonu bulunan bulunan GM-CSF geni için 3 adet primer tasarlandı. 1. ve 2. ekzon için tek bir primer 3. ve 4. ekzonlar için ise ayrı ayrı primerler dizayn edildi ve her biri blast edildi. Primer tasarımı için PrimerPlex 2, Premier Biosoft International programı kullanıldı. Primerler Tablo 1-3'de gösterilmiştir.

<b>Ekzon 1 ve 2</b>	<b>Sekans</b>
<b>Forward Primer Dizisi</b>	GTTCCCATGTGTGGCTGATA
<b>Reverse Primer Dizisi</b>	CCGCTCAGCTGATAAAGGAG
<b>Baz Uzunluđu</b>	669 bç

**Tablo 1:** Ekzon 1 ve 2'ye Ait Primer Dizi Bilgileri

<b>Ekzon 3</b>	<b>Sekans</b>
<b>Forward Primer Dizisi</b>	GGGGTGAGAGTCACCTCCTT
<b>Reverse Primer Dizisi</b>	CCCTCACCTCTGACCTCATT
<b>Baz Uzunluđu</b>	655 bç

**Tablo 2:** Ekzon 3'e Ait Primer Dizi Bilgileri

<b>Ekzon 4</b>	<b>Sekans</b>
<b>Forward Primer Dizisi</b>	AAACATGCTGGTGCTTCCTT
<b>Reverse Primer Dizisi</b>	CAGAATTCCGCACCTATGC
<b>Baz Uzunluđu</b>	691 bç

**Tablo 3:** Ekzon 4'e Ait Primer Dizi Bilgileri

### 5.2.2.2. PZR Programlama

Primerlerin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık ( $T_m$ =Annealing Temperature) ve primer uzunlukları dikkate alınarak tüm primerler için tek bir PZR programı oluşturuldu. Hazırlanan PZR programı Tablo 4'de gösterilmiştir.

Program Grupları	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	95°C	2 dk	1
2	95°C	18 sn	35
	58°C	40 sn	
	72°C	60 sn	
3	72°C	5 dk	1
4	4°C	∞	1

**Tablo 4:** Tüm Primerler İçin Oluşturulan PZR Protokolü

### 5.2.2.3. PZR Ürününün Hazırlanması

Liyofilize olarak temin edilen primerler çalışmanın yapılacağı zamana kadar -20 santigrat derece (°C)'de saklandı. PZR çalışması için dizayn edilen 3 adet primer etiket bilgilerinde belirtilen optik densite (O.D) konsantrasyonlarına göre distile su (dH<sub>2</sub>O) ile dilüe edildi. Her bir primere eklenmesi gereken dH<sub>2</sub>O miktarı, O.D değerinin 10 ile çarpılması sonucu bulundu. Bu şekilde her primer için 100 pikomol (pmol) stok primer elde edildi ve her biri 10 pmol olacak şekilde aliquotlanarak PZR işlemine kadar -20 °C'de saklandı.

Reaksiyon hazırlanmadan önce reaksiyon bileşenleri tek tek incelenerek, stok kontaminasyonun önlenmesi amacıyla günlük kullanımlara uygun ve herbiri 10 pmol olacak şekilde steril mikrosantrifüj tüplerine paylaştırıldı. Günlük stoklar hazırlandıktan sonra mümkün olduğu kadar steril şartlarda ve buz üzerinde, en son enzim ilave edilecek şekilde PZR reaksiyonu hazırlandı. PZR için Nanohelix, HelixAmp™ T5000N Kiti kullanıldı. GM-CSF geninin amplifikasyonu için hazırlanan PZR reaksiyonu bileşenleri Tablo 5'de verilmiştir.

<b>Kullanılan materyal</b>	<b>Miktar</b>
DNA	3 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
dNTP	1 µl
Tune-up solüsyonu	5 µl
Helix reaction buffer	5 µl
Taq polimeraz (HelixAMP Taq Cat No T5000N)	0,3 µl
dH <sub>2</sub> O	13,7 µl
Toplam	30 µl

**Tablo 5:** GM-CSF Geninin Amplifikasyonu İçin Hazırlanan PZR Reaksiyonu Bileşenleri

0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde bu şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı daha önce programlanmış olan PZR cihazının (Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700, Amerika) örnek bloğuna yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı.

### 5.2.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez ile Görüntülenmesi

PZR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla agaroz jel elektrofrez çalışması yapıldı. Bu amaçla hassas terazide tartılan 2 gram agaroz (Prona Biomax Agarose) bir erlene konuldu ve üzerine 150 ml Tris-Borik Asit-EDTA 1X (TBE) solüsyonu eklendi. Karışım hafifçe karıştırıldıktan sonra agaroz tamamen eriyene kadar maksimum derecede mikrodalgada kaynatıldı. Çözelti 50-60°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 10 µl etidyum bromür (EtBr) eklendi ve kabarcık oluşmamasına dikkat ederek karıştırıldı. Elektrofrez tankına (Thermo EC Midicell PRIMO EC330, Amerika) jel tarağı dikkatli bir şekilde yerleştirildikten sonra hazırlanan çözelti hava kabarcığı oluşmayacak şekilde döküldü ve soğumaya bırakıldı. Jel tamamen donduktan sonra kuyucukların bozulmamasına dikkat ederek elektrofrez tankından çıkarıldı ve TBE 1X solüsyonu bulunan tanka bırakıldı. Jeldeki ilk kuyucuğa örnek DNA boyutlarının kontrolü amacı ile 2

$\mu\text{l}$  100 baz çift (bç) DNA standartı (ladder) yüklendi. Daha sonra 2  $\mu\text{l}$  yükleme boyası (loading dye) ile birlikte 5  $\mu\text{l}$  PZR ürünü karıştırılarak diğer kuyucuklara yüklendi ve 150 volt akımda 15 dk süreyle elektroforetik ayırma tabi tutuldu. Elektroforez işleminin tamamlanmasından sonra jel, görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) incelenerek DNA bantlarının varlığını kayıt altına almak amacı ile profillerin fotoğrafları çekildi. Her çalışmada bir pozitif ve bir negatif kontrol kullanıldı.

#### 5.2.4. PZR Ürününün Purifikasyonu

PZR ürününün purifikasyonu için ExoSAP-IT PCR Clean Up (USB Products Affymetrix, P/N: 78200) protokolü uygulandı. Bu amaçla 5  $\mu\text{l}$  PZR ürünü 2  $\mu\text{l}$  ExoSAP-IT ile karıştırıldı. Karışım 37°C’de 15 dk ve 80°C’de 15 dk olmak üzere PZR cihazında inkübe edildi.

#### 5.2.5. Sekans PZR Protokolü (Big Dye)

Sekans PZR işlemi için Sanger-Coulson zincir sonlama yöntemi ve Applied Biosystem -BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit’i kullanıldı. Her bir örnek için hazırlanan reaksiyon bileşenleri sırası ile Tablo 6’da verilmiştir.

<b>Kullanılan materyal</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
dH <sub>2</sub> O	8,5 $\mu\text{l}$
5X buffer	6 $\mu\text{l}$
sequencing mix	2 $\mu\text{l}$
forward primer	0,75 $\mu\text{l}$
pürifiye PZR ürünü	2,75 $\mu\text{l}$

**Tablo 6:** Sekans PZR Protokolü Reaksiyon Bileşenleri

Hazırlanan bu bileşim PZR cihazında Tablo 7’de gösterilen program ile çalışıldı. Bundan sonra sodyum asetat purifikasyonuna kadar 4°C’ de bekletildi.

Program Grupları	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	96°C	1 dk	1
2	96°C	5 sn	25
	50.0	40 sn	
	60°C	4 dk	
3	4°C	2 dk	1
4	4°C	∞	1

**Tablo 7:** Sekans PZR Protokolü

### 5.2.6. Sodyum Asetat Pürifikasyonu

Sekans PZR uygulamasının ardından gerçekleştirilen sodyum asetat purifikasyonu aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Sekans PZR ürünü üzerine 2 µl (3 mM, pH:4,6) sodyum asetat (NaOAc) eklendi.
2. Üzerine 50 µl % 95'lik EtOH eklendi ve karışım 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılarak hafifçe karıştırıldı.
3. 15 dk buz üzerinde yapılan inkübasyonun hemen ardından 13.000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
4. Çekilen süpernatant atıldı ve üzerine 250 µl %70'lik EtOH eklendi. Tekrar hafifçe karıştırıldı.
5. 5 dk 13.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant tekrar atıldı.
6. DNA içeriği oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
7. Liyofilize hale gelen DNA'lar üzerine 20 µl formamid (Amresco, Formamide, Deionized) eklendi ve 3 sn. vortekslendi.
8. Denatürasyon işlemi için 95 °C'de 5 dk bekletildi.
9. Buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra örnekler sekans cihazına yüklenmek üzere hazırlandı.

### 5.2.7. Sekans Analizi

Örnekler ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer sekans cihazına yüklenmek üzere her birinde 20 µl alınarak üzerine 5 µl dH<sub>2</sub>O eklendi. Sekans cihazı ile hedef bölgeler okunarak

dizi üzerindeki değişiklikler değerlendirildi. Deęerlendirmede Mutation Surveyor DNA Varyant Analysis Software dizi analiz programı kullanıldı.

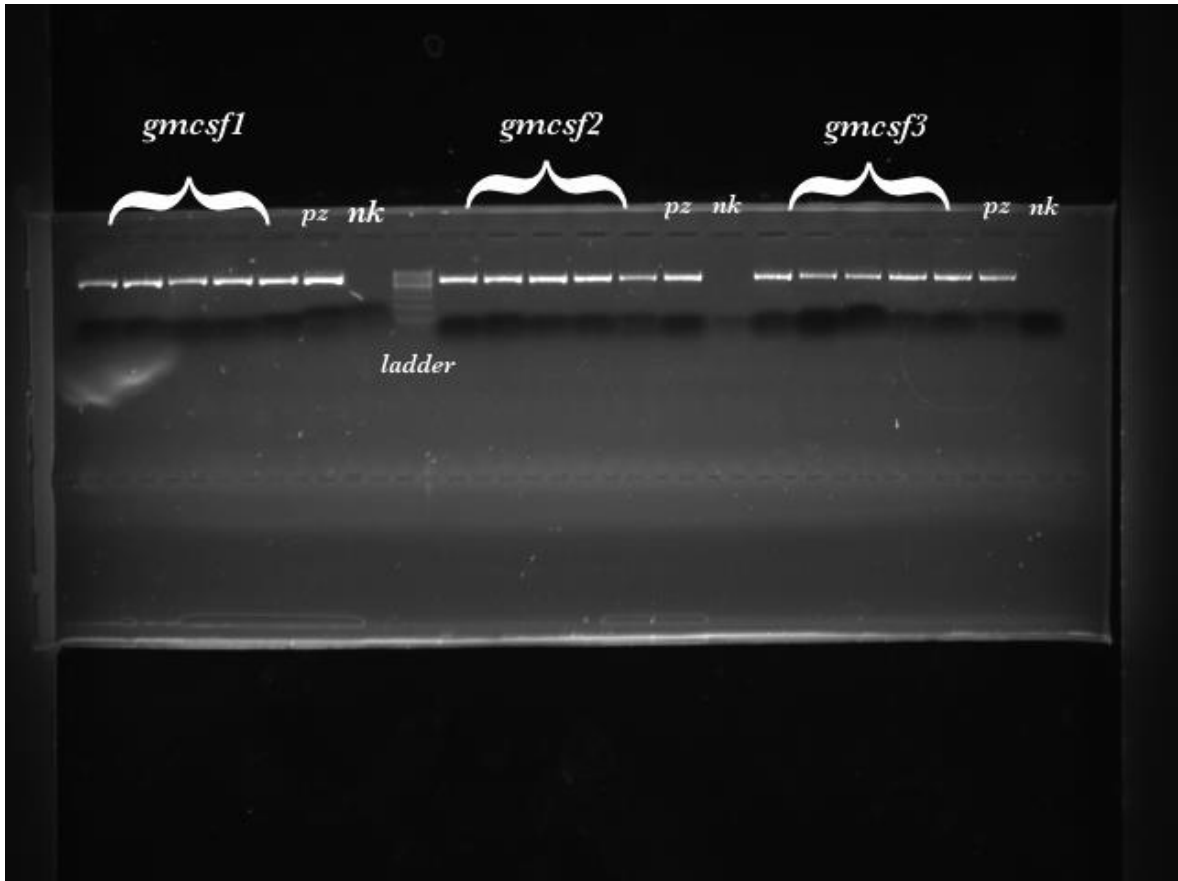




## 6. BULGULAR

### 6.1. PZR ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ BULGULARI

PZR amplifikasyonu sonrasında elde edilen ürünler 100 bp'lik ladder ve her ekzon için birer pozitif ve negatif kontrol kullanılarak agaroz jel elektroforezi yöntemi ile kontrol edildi. GM-CSF geninin 3 ayrı ekzonuna ait DNA varlığını gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir.

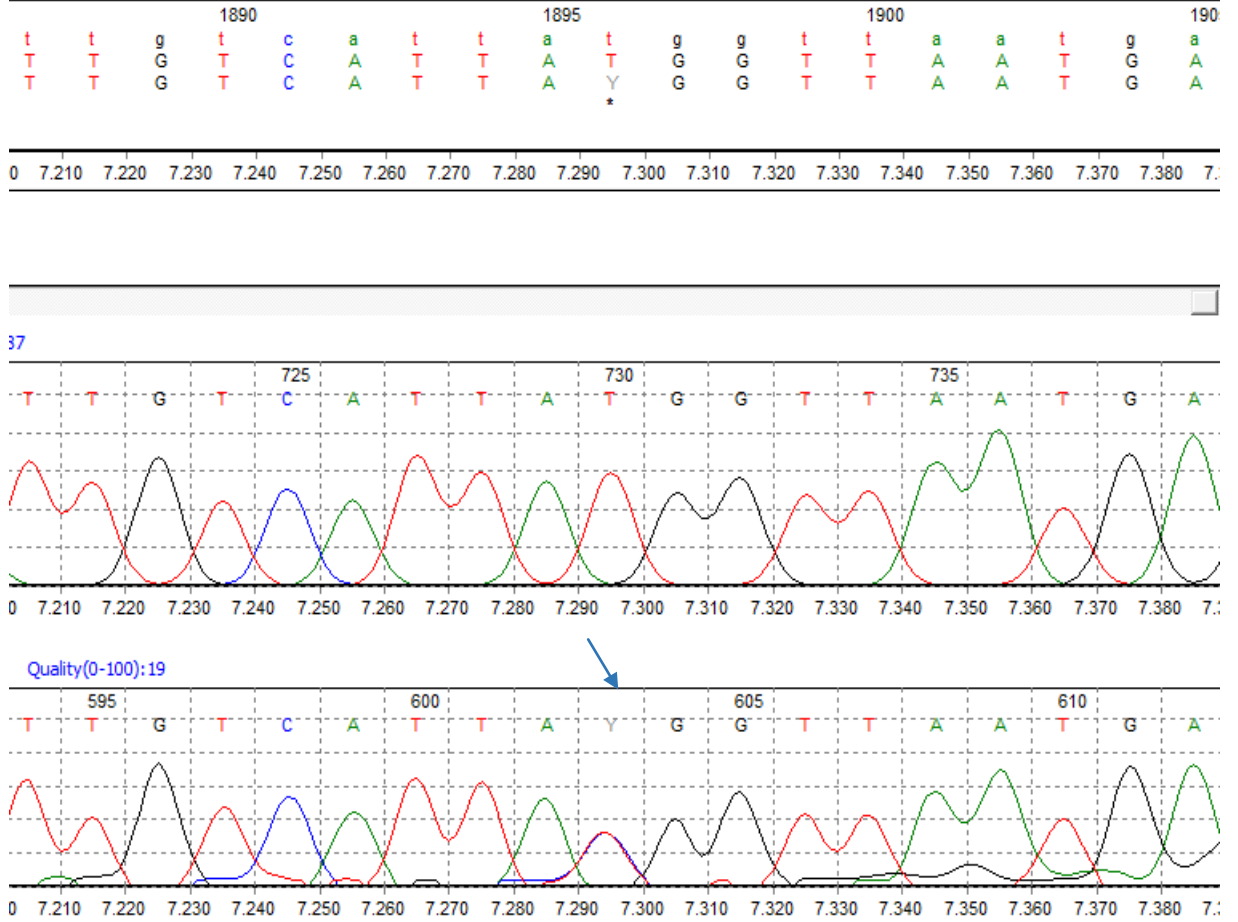


Şekil 2: Agaroz Jel elektroforezi sonrasında GM-CSF geninin 3 ayrı ekzonuna ait DNA varlığını gösteren görüntü.

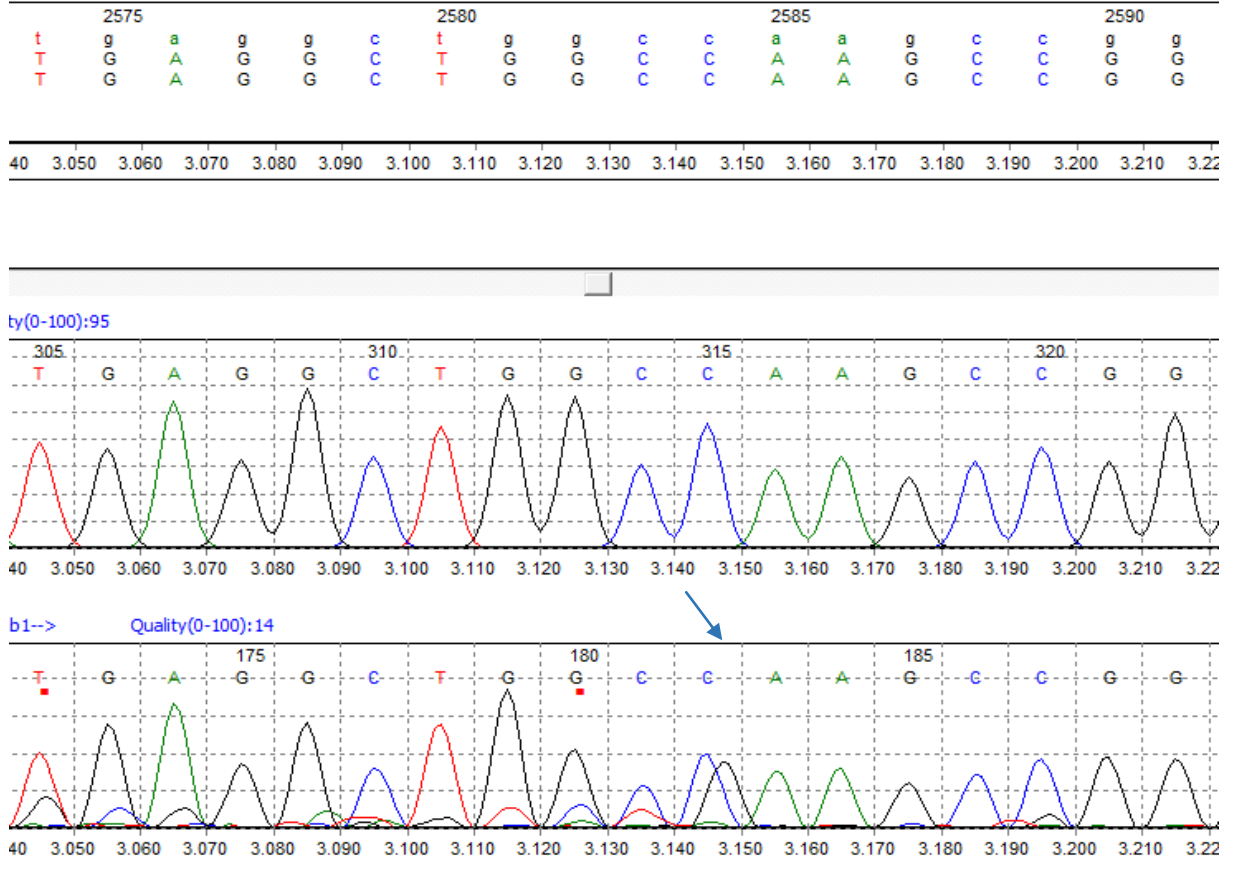
PZR amplifikasyonu ile edilen ürünler agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edildikten sonra pürifikasyon işlemlerinden geçirilerek sekanslama işlemi için hazırlandı.

## 6.2. SEKANS ANALİZ BULGULARI

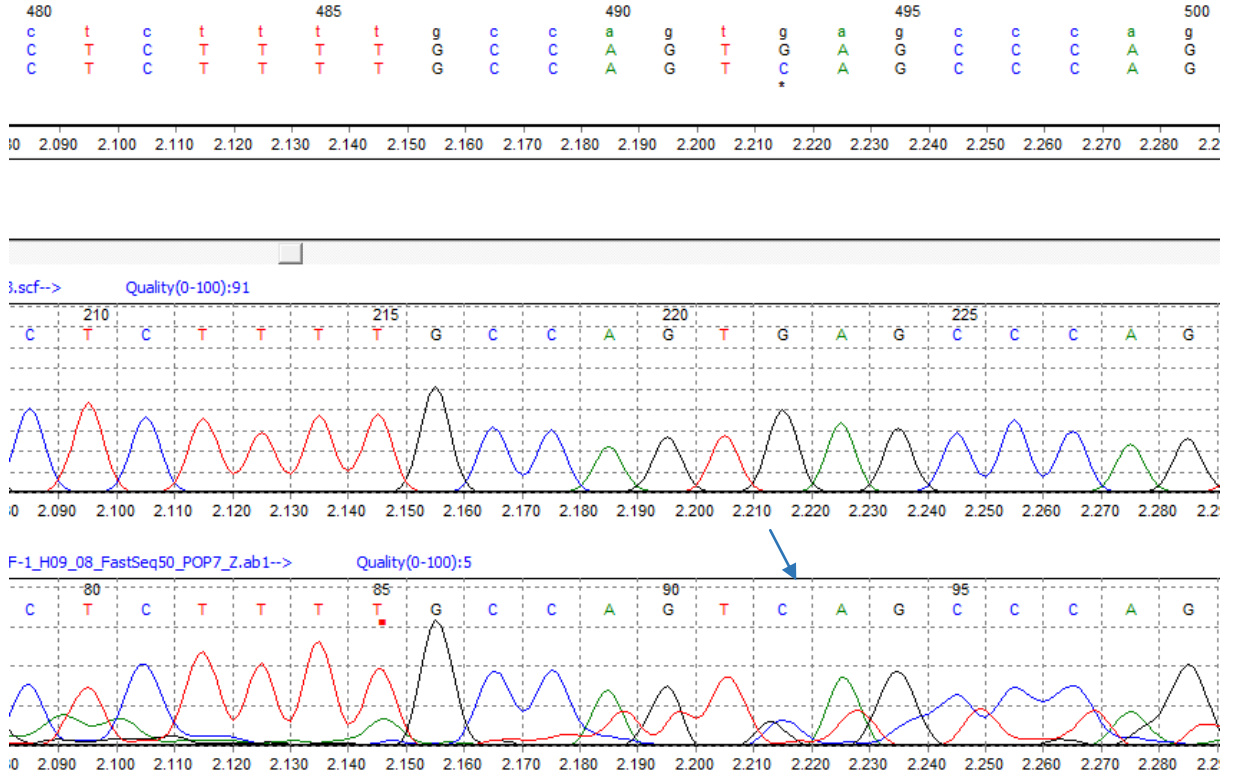
Agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilen PZR ürünleri sekans cihazı (*ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer*, Amerika) ile sekans analizleri yapıldı ve grafik çıktıları elde edildi. Her bir polimorfizm veya değişikliğe ait grafikler Şekil 3-12'de gösterilmiştir.



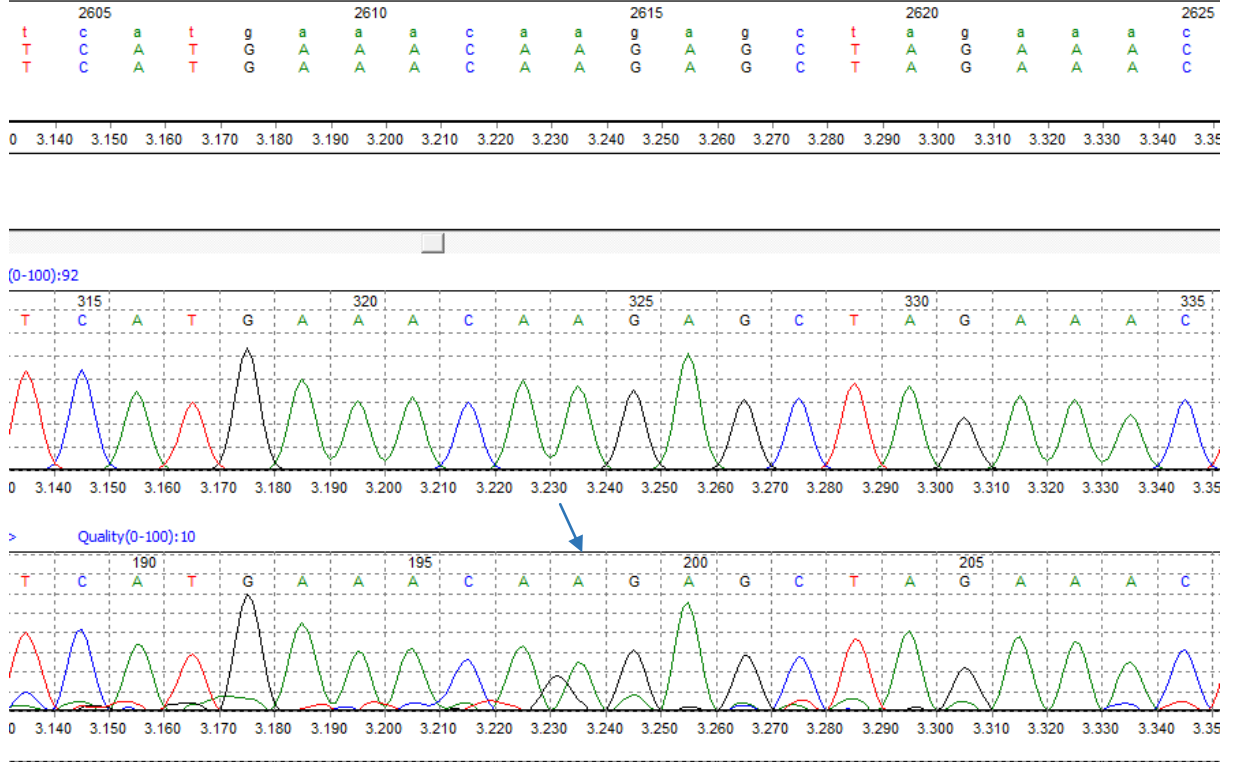
**Şekil 3:** 1896 T > C intron polimorfizmi rs743564 için sekans grafiği. Alel frekansları %78 T % 22 C. Polimorfizm hem kontrol grubunda hem hastalarda sıklıkta tespit edilmiştir ve patojenik bir polimorfizm olduğuna dair bulgu elde edilememiştir.



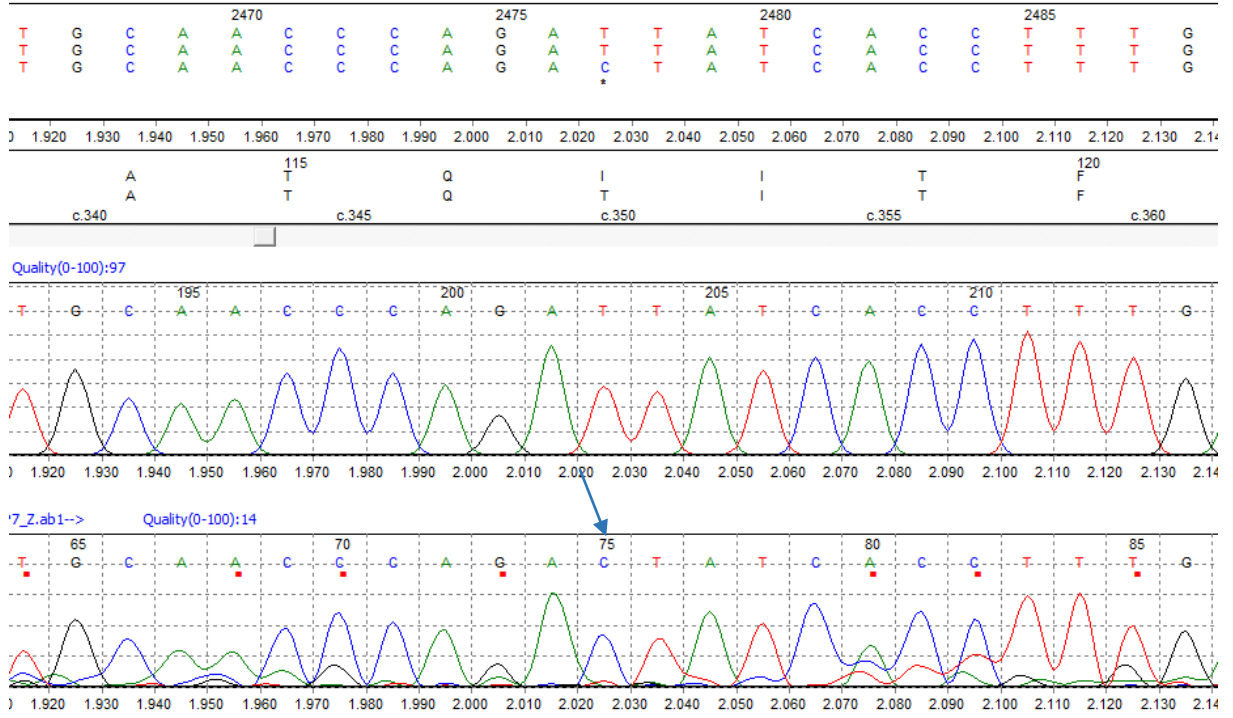
**Şekil 4:** 2584 C>G het / c.489 C>G ekzon 4 heterozigot kodlanmamış bölge polimorfizmi için sekans grafiği. Polimorfizmin literatürde bildirimi yok ve kodlanmamış bölge değişimidir. Alel frekansları bildirilmemiştir. Polimorfizm sadece kontrol grubunda tespit edilmiştir.



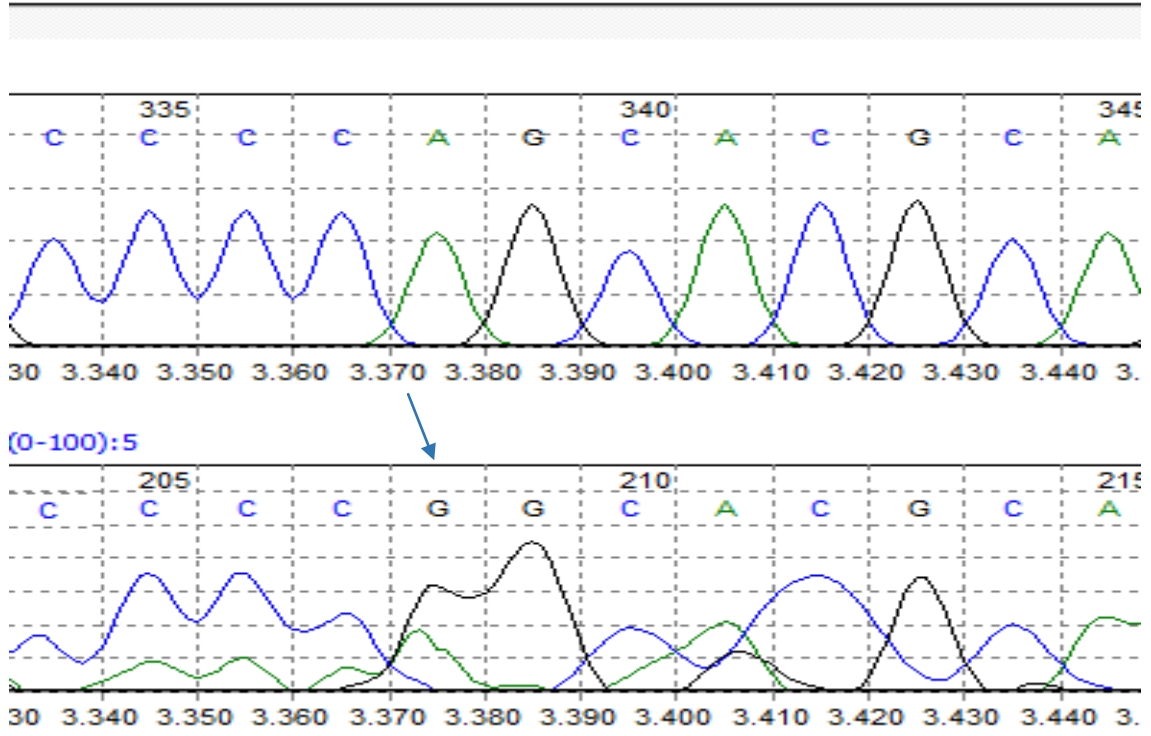
**Şekil 5:** 493 G>C heterozigot intronik polimorfizm sekans grafiği. Polimorfizmin literatürde bildirimini yok ve allel frekansları bildirilmemiştir. 2 hastada tespit edilmiştir.



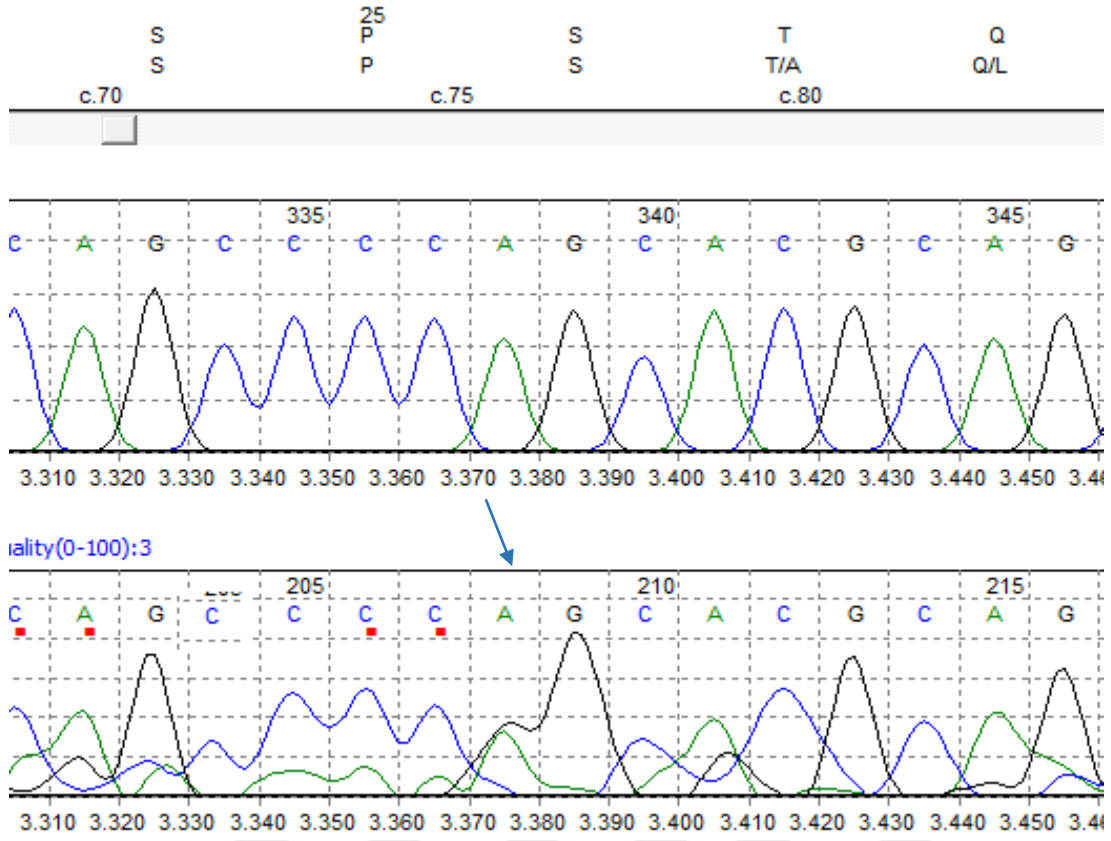
**Şekil 6:** 2614 A > G, c. 519 A>G heterozigot ekzon 4 kodlanmayan bölge polimorfizmi sekans grafiği. Polimorfizmin literatürde bildirimi yok ve alel frekansları bildirilmemiştir. 2 hastada tespit edilmiştir. Protein seviyesine etkileri incelenebilir.



**Şekil 7:** 2477 T>C / p. I117T Homozigot Ekzon 4 rs25882 sekans grafiği. Alel frekansları: %63 T %37 C. Polimorfizm hem kontrol grubunda hem hastalarda hem de çalışılmış toplumlarda sıklıkta tespit edilmiştir ve amino asit değişime sebep olsa da düşük ile ilişkilendirilememiştir. Birçok diğer hastalıkla ilişkilendirmek için çalışmalar yapılmaktadır.

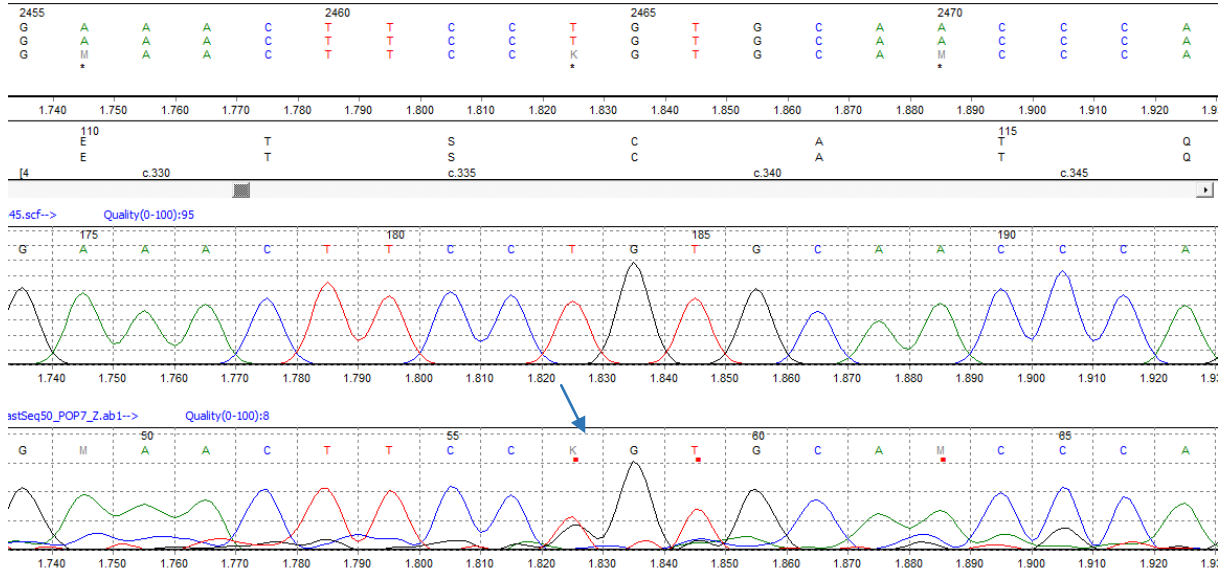


**Şekil 8:** 609A>G(S26G) homozigot ekzon 1, amino asit değişimine yol açan polimorfizm sekans grafi. Polimorfizmin literatürde bildirimi yok ve alel frekansları bildirilmemiştir. 2 hastada tespit edilmiştir. Daha çok hastada çalışılması önerilir.



**Şekil 9:** 609A>G(S26G) heterozigot ekzon 1, amino asit değişimine yol açan polimorfizm sekans grafiği. Polimorfizmin literatürde bildirimini yok ve alel frekansları bildirilmemiştir. 6 hastada tespit edilmiştir. Daha çok hastada çalışılması önerilir.





**Şekil 10:** 2464 T>G/ p.C113G heterozigot değişimi sekans grafiği. Amino asit değişimine yol açan 4.ekzon değişikliği. Polimorfizmin literatürde bildirimini yok ve alel frekansları bildirilmemiş. 3 hastada tespit edilmiştir. Amino asit değişimine yol açtığı için gen ifadesine etkisi çalışılabilir.





SNP	SNP ID	KROMOZOMAL YERLEŞİM (UCSC)	EKZON / İNTRON	PATOJENİK	GENEL POPÜLASYON FREKANSI	ÇALIŞMA GRUBU (48) FREKANSI	KONTROL GRUBU (31) FREKANSI
1572dupG	x	x	x	x	x	1	0
493G>C HET	x	chr5:131409476	intron	x	x	2	0
549C>T HET	x	x	x	x	x	1	0
559 T>C HET	x	x	x	x	x	1	0
585G>A HET	x	x	x	x	x	1	0
I117T HET	rs25882	<u>chr5:131411460</u>	exon 4	ilişkilendirilmemiş	% 63 T % 37 C	5	4
I117T HOM	rs25882	<u>chr5:131411460</u>	exon 4	ilişkilendirilmemiş	% 63 T % 37 C	1	1
609A>G(S26G) HET	x	chr5:131409592	exon 1	x	x	5	0
1896T>C HOM	rs743564	chr5:131410879	intron 3	ilişkilendirilmemiş	% 78 T %22 C	22 (%45)	10 (%32)
2464T>G HET	x	chr5:131411447	exon 4	x	x	1	0
c.634 G>A HET	x	chr5:131411710	exon 4/ untranslated	x	x	1	0
2584 C>G HET c.489	x	chr5:131411567	exon 4 / untranslated	araştırılmalı	x	0	6
1697G>C HET	rs743677	chr5:131410680	intron 3	ilişkilendirilmemiş	% 92,1 G % 7,9 C	0	1
979C>T	x	x	intron	x	x	1	0
2464 T>G/ p.C113G	x	x	exon 4	x	x	3	0
2614 A>G/ c. 519 A>G HET	x	chr5:131411597	exon4 / untranslated	x	x	2	0

**Tablo 8:** Tespit Edilen Polimorfizmlerin, SNP ID, Kromozomal ve Ekzon/İntron Yerleşimlerinin, Genel Popülasyon, Çalışma ve Kontrol Grubu Frekanslarını Gösteren Tablo.

Beşinci kromozomun q21-32 bölgesine lokalize edilmiş olan GM-CSF geninin 4 ekzonu dizi analizi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sekans analizleri (*ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer*, Amerika) ile yapılmış ve sekans çıktıları elde edilmiştir. Elde edilen sekans çıktıları “Mutation Surveyor V4.0.8 (Soft Genetics, LLC, USA) yazılımı kullanılarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sonuçlar ayrıca tablo 8’de özetlenmiştir. Tespit edilen polimorfizmlerin çalışma ve kontrol gruplarındaki dağılımları ve allel sıklıkları karşılaştırılmış ve analiz edilmişlerdir. Bulguların istatistiksel değerlendirmesinde “Binary Logistic Regresyon Analizi” yapılmıştır. Sonuçlar windows altında çalışan MINITAB yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve P değeri 0.05 olarak belirlenmiştir. Buna göre çalışma ve kontrol gruplarında toplam 18 adet SNP veya mutasyon tespit edilmiştir. Bunların bazılarına ait DNA dizi analiz çıktıları ve açıklamaları Şekil 3-12’de gösterilmiştir.

Tespit edilen polimorfizmler değerlendirildiğinde: 1896 T>C intron polimorfizmi hem kontrol hemde hasta grubunda tespit edilmiştir. Heriki grup arasında sıklık bakımından istatistiksel bir fark gösterilmemiş ( $P>0.05$ ) ve patojenik bir polimorfizm olduğuna dair bir bulgu elde edilmemiştir.

2584 C>G heterozigot c489 polimorfizmi 4. ekzonda kodlanmamış bölge değişimi niteliğindedir. Bu polimorfizmin literatürde bildirimi bulunmayıp sadece kontrol grubunda tespit edilmiştir. Bu değişimin varlığı düşüklerin oluşması ile ilgili olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

493 G>C heterozigot intronik polimorfizmde daha önceden literatürde bildirilmemiş olup hasta grubunda 2 ayrı olguda tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

2614 A>G, c519A>G heterozigot değişimi 4. ekzonda kodlanmayan bölge polimorfizmidir. Literatürde bildirilmemiştir. Çalışma grubuna ait 2 hastada tespit edilmiş olup buna ait protein ekspresyonu incelenmelidir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

2477 T>C / p. I117T homozigot rs25882 değişimi 4. ekzonda tespit edilmiş olup hem hasta hemde kontrol grubu olgularda yüksek oranda mevcut olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte bu değişim her iki grupta benzer sıklıkta gözlenmiş ve bu nedenle düşüklerle ilişkilendirilmemiştir ( $P>0.05$ ).

609 A>G (S26G) homozigot değişimi 1. ekzon içinde tespit edilmiş bir değişim olup aminoasit değişikliğine neden olmamaktadır. Literatürde bildirilmemekle birlikte bu değişim çalışma grubundan 2 ayrı hastada tespit edilmiş, kontrol grubunda gözlenmemiştir, bununla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

609 A>G (S26G) heterozigot değişimi ise toplam 6 hastada tespit edilirken kontrol grubunun hiçbir üyesinde gözlenmemiştir. İstatistiksel olarak anlam ifade etmekle birlikte kontrol grubunda pozitif obje bulunmaması nedeniyle Binary Logistic Regresyon Analizi sonucu anlamlı bulunmamıştır ( $P>0.05$ ), bununla birlikte vaka sayısının artırılması bu değişimin gebelik kayıplarıyla ilişkisini daha net ortaya koyacaktır.

2464 T>G/ p.C113G heterozigot değişimi amino asit değişikliğine yol açan ve 4. ekzonda lokalize bir polimorfizmdir. Literatürde henüz bildirilmemiş olan bu değişiklik 3 adet hastada tespit edilmiş olup kontrol grubunda hiçbir olguda gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ).

2227 G>A/ c.634 G>A ekzon 4 kodlanmayan bölge heterozigot değişimi tek hastada gözlenmiş olmasına rağmen ( $P>0.05$ ) protein seviyesinde etki göstermesi ihtimali mevcuttur.

1697G>C rs743677 heterozigot intron polimorfizmi hasta grubunda hiç gözlenmezken kontrol grubunda sadece 1 vakada gözlenmiştir ( $P>0.05$ ).

Tüm polimorfizmlerin dağılımlarına bakılacak olursa toplam değişim miktarı hasta grubu için 47 iken kontrol grubunda 22 adet olarak tespit edilmiştir. Bu çerçevede kıyaslama yapıldığında heriki grup arasında oldukça kuvvetli bir istatistiksel farklılık dikkati çekmektedir ( $P<0.05$ ). Buradan hareketle GM-CSF genine ait değişiklikler tek tek değerlendirilmeksizin yani varyasyonun cinsine bağlı olmaksızın genel polimorfizm artışlarının düşüklerin ortaya çıkmasında etiyolojik rol oynadığı düşünülebilir ( $P<0.05$ ).

## 7. TARTIŞMA

Düşüklerin etiyolojisinde kromozomal ve trombofili ile ilgili sebepler kanıta dayalı tıp çerçevesinde kanıtlanmış olarak yer almaktadır (4). Düşük yapan hastalarda sebepleri ortaya koymak üzere belirli algoritmalar çerçevesinde kromozomal analizlerin yanı sıra trombofili gen analizleri enfeksiyon ajanlarına ait analizler (TORCH vb.) yapılmaktadır (9). Tüm bu araştırmaların sonucunda sebebin anlaşılamadığı olgularda alternatif tanı testleri üzerinde en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. Bu çerçevede plasental fonksiyonlar üzerinde rolü olan sitokinlerden GM-CSF tarafımızdan araştırılmıştır. GM-CSF'in seçilmesinin önemli nedeni diğer sitokinlerden farklı olarak plasental oluşum ve vaskülerizasyonu üzerinde en etkin sitokinlerden biri olmasıdır. Söz konusu GM-CSF genine ait ekzonlar dizi analizi yöntemiyle incelenmiş, tespit edilen polimorfizm ve patojenik değişiklikler kontrol ve çalışma grupları arasında karşılaştırarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonrasında parametreler tek tek düşünüldüğünde bazı değişimlerin anlamlı farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle 493 G>C değişimi, 609 A>G değişimi ve 1896 T>C değişimi her iki grupta farklı olarak dağılım göstermekte ve düşükler üzerine anlamlı etki gösterebilecekleri düşünülmüştür, ancak vaka sayılarının azlığı ve bazılarında kontrol grubunda pozitif olgu bulunmaması nedeniyle Binary Logistic Regresyon Analizi sonucu istatistiksel olarak anlamsız bulunmuşlardır. Tüm değişimler heriki grup için toplu olarak karşılaştırıldıklarında iki grup arasında farklılık tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Gen seviyesinde olan bu değişiklikler GM-CSF'in ekspresyonunu etkileyerek düşüklere yol açması mümkün olabilir. Tabiidir ki fetal kayıplar birden çok mekanizmadan kaynaklanmış ve birden çok sebepten etkilenmiş olabilir. Buna rağmen kontrol grubunun hiç düşük yapmamış ve herhangi bir tedavi desteği almadan sağlıklı doğumlar gerçekleştirmiş olan kadınlar arasından seçilmiş olması GM-CSF çalışma grubunda saptadığımız bu değişikliklerin düşüklerden sorumlu olabileceği hipotezini desteklemektedir. Bir gebeliğin miyada kadar ulaşması ve sağlıklı doğum ile neticelenebilmesi sürecine olumlu veya olumsuz olarak etki edebilen yüzlerce faktörün bulunduğu düşünülürse bu çeşit çalışmaların etkinliğinin ortaya konulması bazı zorlukları beraberinde getirmektedir; Doğaldır ki çevresel faktörlerin, beslenme, stres, toksik ajan maruziyeti, enfeksiyon yada öngörülemeyen birçok faktörün çalışmaya dahil edilen olgularda standardize veya monitorize edilebilmesi mümkün olmamaktadır. Bununla

birlikte çalışmaya dahil ettiğimiz olguların benzer yaş dağılımında olmaları, obstetrik öykülerinde minimal 2 adet düşük yapmış olmaları, söz konusu düşüklerin ilk trimester içinde meydana gelmiş olmaları, ayrıca objelerin hiç birinde düşüğün sebebini açıklayacak sekonder bir faktörün (trombofili mutasyonu, kromozomal düzensizlik vb) bulunmaması test parametremizi (GM-CSF genini) izole olarak test etmemizi mümkün kılmıştır. Diğer yandan genetik materyali test etmemiz sebebiyle kontrol grubumuz obstetrik öykü bakımından belirlenen kriterlere (en az 2 adet spontan gebelik ve sağlıklı bebek doğumu, hiç düşük yapmamış olması vs..) uygun olduğu takdirde yaş sınırı arama zorunluluğumuzu ortadan kaldırmıştır. Çalışmamız oldukça iyi kurgulanmış olmakla birlikte bazı zayıf yönlerinin bulunduğu söylelenebilir: Bunlardan en önemlisi çalışmaya dahil edilen vakaların sayısının az olmasıdır. Yine aynı şekilde kontrol grubuna ait vaka sayısı da arttırılmalıdır. Bunlar başka bir çalışmanın konusu olabilir. Çalışmamıza ait diğer bir zayıf nokta ise, çalışmaya dahil edilen olguların düşük etiyojisinde rol oynayabilecek parametrelere ait bilgiler sadece anamnez olarak sorgulanmış, ancak olası bir gizli diyabet, subklinik anemi veya hipotroidi vb etkenler test yapılarak ekarte edilememiştir. Bununla beraber test parametremizin kontrol edilebilir, ölçülebilir, tekrar edilebilir olması ve istatistiksel olarak analiz edilebilmesi çalışmamızın olumlu taraflarındandır. Diğer yandan GM-CSF ile ilgili olarak bazı hastalıklar ve kondisyonlara (örn. sjögren sendromu vs.) yönelik çalışmalar yapılmış olmakla birlikte gebelik kayıplarına etkisi üzerine yapılan çalışma oldukça sınırlıdır. Bunların çoğunluğu hayvan deneyleri ile gerçekleştirilmiş olup insan çalışmaları henüz bulunmamaktadır. Son zamanlarda GM-CSF mediatörünün implantasyon fizyolojisi üzerine etkileri oldukça ilgi çekmiş ve araştırılmış olmakla birlikte insan erken dönem gebelik kayıpları üzerine etkisi araştırılmamıştır. Çalışmamız bu anlamda önemli bir konuyu ele almış olmakla birlikte net sonuçlar ortaya koymak adına henüz yeterli değildir. Çalışmaya dahil edilen vaka sayısının arttırılması ve yanısıra benzeri başka çalışmaların yapılması konuya daha net açıklık getirecektir.



## 8. SONUÇ

Özellikle erken gebelik kayıpları başta olmak üzere düşüklerin çok çeşitli faktörlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Bu faktörler hastalarda araştırıldığında vakaların %30-40 kadarında herhangi bir sebep ortaya konulamamaktadır. Bu gruba yönelik çok sayıda araştırma ve çalışma yapılmış olup özellikle immün sisteme yönelik faktörlerin yanı sıra sitokinlerin etkileri üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Tüm değişimler heriki grup için toplu olarak karşılaştırıldıklarında her iki grup arasında farklılık tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Gen seviyesinde olan bu değişiklikler GM-CSF'in ekspresyonunu etkileyerek düşüklere yol açması mümkün olabilir.

Çalışmamızda GM-CSF genine ait hasta ve kontrol grupları arasında mutasyon ve polimorfizm yönünden farklılık olup olmadığı çalışılmış ve özellikle 493 G>C, 609 A>G ve 1896 T>C değişimleri her iki grupta farklı olarak dağılım gösterdikleri tespit edilmiş ve düşükler üzerine anlamlı etki gösterebilecekleri düşünülmüştür. Bununla birlikte vaka sayılarının azlığı ve bazılarında kontrol grubunda pozitif olgu bulunmaması nedeniyle Binary Logistic Regresyon Analizi sonucu anlamsız bulunmuşlar ( $P>0.05$ ) ve istatistiksel farklılıklar ortaya konulamamıştır.

Tüm bunlar göz önüne alındığında GM-CSF gen değişiklikleri ve düşükler arasındaki ilişkinin daha net ortaya koyulabilmesi için vaka sayısının artırılması ile birlikte diğer sitokinlerin eşzamanlı çalışması ve karşılaştırılması gerekli görülmüştür.

## 10. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi sunarken, eğitimimde önemli yeri olan ve tezimin hazırlanmasında bana yol gösteren, sonsuz desteği olan, tez danışmanım Prof. Dr. Volkan BALTACI'ya, yüksek lisans eğitimim boyunca yetişmemde emekleri olan başta saygı ile andığım Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ olmak üzere Doç. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e, Yrd. Doç. Dr. Şule ÖZDAŞ'a, Yrd. Doç. Dr. Özge Üner AYVAZ'a, Yrd. Doç. Dr. Evrim ÜNSAL'a, beraber çalışma imkanı bulduğum süre içerisinde ve sonrasında yetişmemde büyük emekleri olan ve tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Gülen Bülbül DOĞUSOY'a, Doç. Dr. İlknur Türkmen ÇETİNASLAN'a, Doç. Dr. Nuray BAŞSÜLLÜ'ye, Yrd. Doç. Dr. İpek ÇOBAN'a, Doç. Dr. Yalçın SEYHUN'a ve Dr. Murat BÜYÜKDOĞAN'a tezimin oluşturulması sırasında emeği geçen Özel Mikrogen Genetik Tanı Laboratuvarı çalışanlarından Dr. Süleyman AKTUNA'ya, Uzman Biyolog Fatma AKYİĞİT'e, Biyolog Pelin Burcu ÇELİKKOL'a, Gayrettepe Florence Nightingale Hastanesi Genetik Laboratuvarı çalışanlarına, tezimde gönüllü olan hastalarımıza, yüksek lisans eğitimi gördüğüm süre içerisinde desteklerini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Gülçin CİVAN'a, Gülçin KUNAÇAF'a, Merve TECER'e, Elçin YALÇIN'a, Tarık KAVALCI'ya, Murat ULUSOY'a, ablam Tülay YAŞAR'a, kardeşim Gökhan YAŞAR'a, anneme ve babama, hayatımdaki en özel, en büyük destekçim, Erhan ERMEZ'e sonsuz TEŞEKKÜR ederim.

Reyhan YAŞAR

## 10.KAYNAKLAR

1. Seymour JF, Lieschke GJ, Grail D, Quilici C, Hodgson G, Dunn AR. Mice lacking both granulocyte colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF have impaired reproductive capacity, perturbed neonatal granulopoiesis, lung disease, amyloidosis, and reduced long-term survival. *Blood*. 1997, 15;90(8):3037-49.
2. Sjöblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod*. 1999, 14(12):3069-76.
3. Chaouat G, Menu E, Kinsky R, Brezin C. Immunologically mediated abortions: one or several pathways? *Res Immunol*. 1990, 141(2):188-95.
4. Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
5. Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod*. 1995, 10:1579-1602.
6. Emiliani S, Delbaere A, Devreker F, Englert Y. Embryo-maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive. *Reprod Biomed Online*. 2005, 10(4):527-40.
7. Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, Richter DU, Reimer T, Mylonas I, Friese K, Makrigiannakis A. Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin. *Mol Hum Reprod*. 2007, 13(9):663-73.
8. Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod*. 2004, 10(12):879-93.
9. Ford HB, Schust DJ. Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy. *Rev Obstet Gynecol*. 2009, 2(2):76-832.
10. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion, *Br Med J*. 1989, 299:541.

11. Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser BCJM. Conception to ongoing pregnancy: the “black box” of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2002, 8:333–343.
12. James David K. Steer Philip J. Weiner Carl P. Gonik Bernard. High Risk Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2008, 105-124.
13. Jacobs PA, Hassold TJ. Chromosomal abnormalities: origin and etiology in abortions and live births. *Adv Genet*. 1995, 33:101-33.
14. Quenby S, Vince G, Farquharson R, Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature’s quality control? *Hum Reprod*. 2002, 17:1959.
15. Kisinisci HA, Göksin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Önderoglu LS. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ankara. Günes Kitabevi, 1996.
16. Warburton D, Fraser FS. Spontaneous abortion rate in man: data from reproductive histories collected in a medical genetics unit. *Am J Hum Genet*. 1964, 16:1.
17. Stirrat GM, Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes, and management, *Lancet*. 1990, 336:728.
18. Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage, *Hum Reprod Update*. 1996, 2:118.
19. Speroff L. Fritz MA. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. USA. Lippincott Williams & Wilkins. 2007.
20. Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril*. 1996, 66:24–29.
21. Ingrid Pabinger. Thrombophilia and its impact on pregnancy. *Thromb Res*. 2009, 123:16-213.
22. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion, *Br Med J*. 1989, 299:541.
23. Maroilus BG. Effect of aging on fertility and pregnancy. *Seminars Reprod Endocrinol* 1991, 9:165.
24. Stein ZA. A woman’s age: childbearing and child rearing. *Am J Epidemiol* 1985, 121:327.
25. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985, 70:11.
26. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: Population based register linkage study. *Br Med J*. 2000, 320:1708.

27. Wilcox AJ, Weiberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *New Engl J Med.* 1988, 319:189.
28. Warburton D. Reproductive loss: how much is preventable? *New Engl J Med.* 1987, 316:158.
29. Aydın F, Oğuz R, Çarın M. Sitokinler. *Sendrom.* 1997, 10:95-101.
30. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Efeetor Mechanisms of Humoral Immunity. In: Cellular and molecular immunology. Ed: R. Grulioiw. Philadelphia, Elsevier, 1997.
31. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cells and Tissues of the Immune System. In: Cellular and molecular immunology. Ed: R. Grulioiw. Philadelphia, Elsevier, 1997.
32. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Properties and Overview of Immune Responses. In: Cellular and molecular immunology. Ed: R. Grulioiw. Philadelphia, Elsevier, 1997.
33. Peakman M, Vergani D. Innate Immunity II: In: Basic and Clinical Immunology. Ed: T. Horne. and A. Laing. London, Elsevier, 1997.
34. Parham P. Elements of the Immune System and their Roles in Defense. In: The Immun System. Ed: P. Parham. New York, Elsevier, 2000.
35. Roitt IM. The Production of effectors. In: Essential Immunology. Ed: Roitt IM. USA, Blackwell Science, 1997.
36. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. T-cell Mediated Immunology. In: Immunobiology. Ed: G. Bushell. UK, Garland Science Publishing, 2005.
37. Klein J. Immunology. Oxford, Blackwell Science, 1990.
38. Male D. Cooke A. Advanced Immunology. UK. Mosby. 1996.
39. Kahan BD, Ponticelli C. Principles and Practice of Renal Transplantation. London, Martin Dunitz, 2000.
40. Parham P. The Development of B Lymphocytes. In: The Immun System. Ed: P. Parham. New York, Elsevier, 2000.
41. Peakman M, Vergani D. Cellular Immune Response: In: Basic and Clinical Immunology. Ed: T. Horne. and A. Laing. London, Elsevier, 1997.
42. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Basic & Clinical Immunology. USA, Appleton & Lange, 1994.

43. Thiru S, Waldman H. Immunobiology of Graft Rejection. In: Pathology and Immunology of transplantation and Rejection. Ed: S. Thiru and H. Waldman. London, Blackwell Science, 2001.
44. Passer Chegini<sup>1</sup>, Xin-Min Tang and Qingchuan Dou. The expression, activity and regulation of granulocyte macrophage colony stimulating factor in human endometrial epithelial and stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 1999, 5(5):459–466.

