

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEBEBİ BİLİNMEYEN TEKRARLAYAN GEBELİK
KAYIPLARINDA TAM RESEPTÖR KİNAZLARIN VE
LİGANDLARININ EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Esmâ KONUK

DOKTORA TEZİ

2017-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEBEBİ BİLİNMEYEN TEKRARLAYAN GEBELİK
KAYIPLARINDA TAM RESEPTÖR KİNAZLARIN VE
LİGANDLARININ EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Esmâ KONUK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Necdet DEMİR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2015-977 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir 22/06.../2017...

İmza

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof.Dr.Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof.Dr.Mehmet ŞİMŞEK
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof.Dr.Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN
Trakya Üniversitesi



Üye : Prof.Dr.Özhan EYİĞÖR
Uludağ Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Narin DERİN

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Esmâ KONUK

İmza

Tez Danışmanı

Prof.Dr.Necdet DEMİR

İmza

TEŐEKKÜR

BaŐta hayatımdaki en anlamlı varlık olan oğlum Ege KONUK'a teŐekkür ediyorum. Annesini devamlı iş yerinde beklemek eminim hiÇ kolay olmadı. Bu dönemde yaŐının üstünde gösterdiği olgunluğu, desteği, anlayıŐı, sevgisi ve bana güç veren enerjisi için çok teŐekkür ederim.

Sevgili eŐim Atilla KONUK gece yarlarına kadar eŐinin iş yerindeki yoğun temposu seni bunalttı. Bu süreçte gösterdiğin anlayıŐ ve desteğin için sana minnettarım. Varlığın her zaman benim için büyük bir güç oldu. Canım annem Aysel KIRIMLIOğLU bana en çok ihtiyaÇ duyduğun dönemdesin. Fakat her zamanki gibi yine sen bana destek oluyorsun. Dualarınla sevgi dolu yüreğinle hep destek oldun. Mezuniyetimi görebilmen ve seni gururlandırabilmek benim boynumun borcudur.

Saygıdeğer hocam Prof. Dr. Necdet DEMİR yol göstericiliğinizin yanında bana olan inancınız, desteğiniz ve moral olarak düŐtüđümde beni kaldırdığınız, sadece tez projemde değil kişisel gelişimimde de oynadığınız rol için size hep minnet duyacağım.

Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına, hem eğitim yaŐamıma hem de kişisel gelişimime yaptıkları katkılar için teŐekkür ederim. Sevgili Araş.Gör. Őeyma GÖNÜLDAŐ, Eda ORHAN, Feride QULİEVA ve gönüllü öğrencilerimiz Ergi KAYA, Medine DOğAN ve Cansın Linda YILMAZ gece gündüz çalışmalarımı yaparken beni hiÇ yalnız bırakmayıp yanımda oldukları, motivasyonumu kaybettiğim anlarda pozitif enerjileriyle beni güçlendirmeyi baŐardıkları ve daha da önemlisi desteklerinin yanısıra gözlerinden hiÇ eksik olmayan "sevgi" için çok teŐekkür ederim.

Doktora eğitimim sürecinde öğrenciliğim, iş hayatım ve özel hayatımda eŐ ve anne olarak sorumluluklarımdan hepsini, aynı anda, mümkün olduğunca düzgün yürütmeye gayret gösterdim. Bu süreçte istemeden de olsa yapmış olabileceğim hatalarımdan için hayatımda yer alan herkesden özür dilerim; gösterdiğiniz sabır ve anlayıŐ için herkese sonsuz teŐekkürler ederim.

ÖZET

Amaç: RPL’de immünojenik, genetik ve hematolojik faktörlerin rol aldığı bilinmektedir. RPL’nin %50’sini oluşturan “sebebi açıklanamayan RPL”nin (URPL) etiyolojisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Gebeliğin devamlılığında immünojenik denge oldukça önemlidir. İnflamasyon ve fagositoz, TAM reseptör kinaz (TYRO3, AXL, MERTK) ve ligandları (GAS6 ve PROS1) aracılığıyla düzenlenir. URPL’de, immün mekanizmanın dengelenmesinde normal gebelere göre farklılık olabileceği düşüncesiyle “URPL’de TAM reseptör kinazlar ve ligandlarının ekspresyon düzeyleri, koryon villus ve desidua normal gebeliklere göre farklılık gösterir” hipotezini oluşturduk. Hipotezimizi test etmek için URPL, Spontan gebelik kaybı yaşamamış, istemli sonlandırılmış gebelik (TP) ve normal kontrol endometrium (KE) örneklerinde TAM reseptör kinazlar ve ligandlarının, mRNA ve protein ekspresyonlarını karşılaştırarak URPL etiyolojisine yaklaşımda bulunmayı amaçladık.

Yöntem: Gruplar (1) URPL (n:5), (2) TP (n:6) ve (3) KE grupları (n:6) şeklinde oluşturuldu. 1 ve 2. gruplarda desidua ve koryon villus materyalleri steriomikroskop altında ayrıldı. Örneklerin, AXL, MERTK, TYRO3, GAS6 ve PROS 1 düzeyleri immünohistokimya, immunoblot ve QPCR yöntemleriyle analiz edildi.

Bulgular: Sağlıklı gebelikte, TAM reseptörlerinde artış, GAS6 ligandında azalma gözlenirken PROS1’de belirgin değişiklik belirlenmedi. URPL’de reseptör ve ligandların ekspresyon düzeyi diğer gruplara göre yüksekti.

Sonuç: TP ve URPL’de TAM reseptörleri ve ligandlarının desidua ve koryon villusta ekspresyon farklılıkları bulunmaktaydı. Bu reseptörlerin gebelikte ligandları sınırlandırılarak aşırı fagositotik aktiviteyi engellediği ve immün hücreleri modüle ederek, semiallogenik fetüs’ün reddini önlemeye katkı sağladığını düşünmekteyiz. URPL’de reseptör ve ligand artışlarından, ölüme bağlı fagositik aktiviteyi arttırdığı ve inflamasyonu baskılayarak maternal doku hasarını önlediği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sebebi anlaşılamayan tekrarlayan gebelik kaybı, AXL, MERTK, TYRO3, GAS6, PROS1

ABSTRACT

Objective: The role of immunological, genetic and hematological factors in RPL is known. The etiology of unexplained RPL (URPL), which accounts for 50% of RPL, is unknown. Immunological balance is important in the continuity of pregnancy. Inflammation and phagocytosis are regulated via TAM receptor kinase (TYRO3, AXL, MERTK) and ligands (GAS6 and PROS1). Since we think that TAM receptors and ligands may be effective in URPL, We hypothesized that “the expression levels of TAM receptor kinases and ligands in URPL differ from normal pregnancies in chorionic villus and decidua”. We aimed to approach the etiology of URPL by comparing mRNA and protein expressions of TAM receptor kinases and ligands in samples of URPL, voluntary terminated pregnancy (TP) who didn't have spontaneous pregnancy loss and endometrium (KE) groups.

Method: The groups were formed as (1) URPL (n: 5), (2) TP (n: 6) and (3) KE groups (n: 6). In groups 1 and 2, decidua and chorionic villus materials were separated under a stereomicroscope. The AXL, MERTK, TYRO3, GAS6 and PROS 1 levels of the samples were analyzed by immunohistochemistry, immunoblot and QPCR methods.

Results: In healthy pregnancy, increase in TAM receptors, decrease in GAS6 ligand, no significant change in PROS1 was detected. Expression of receptors and ligands in URPL were increased.

Conclusion: In TP and URPL, TAM receptors and ligands had differences in expression in decidua and chorionic villus. We believe that these receptors limit ligands in gestation and inhibit excessive phagocytotic activity and modulate immunological cells, contributing to the prevention of rejection of the semiallogenic fetus. Increased receptor and ligand in URPL increased phagocytic activity due to death and inhibited inflammation, thus preventing maternal tissue damage.

Key words: Unexplained Recurrent Pregnancy Loss, AXL, MERTK, TYRO3, GAS6, PROS1

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları (RPL)	3
2.2. Blastosist Aktivasyonu, Uterus Reseptivitesi ve İmplantasyon	5
2.3. Desidual İmmün Hücreler	8
2.4. TAM (TYRO3, AXL, MERTK) Reseptör Kinaz Ailesi	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1. Örneklerin elde edilmesi	15
3.2. Parametreler	15
3.3. Dokuların Toplanması ve Rutin Parafin Takibi	16
3.4. İmmunohistokimyasal Boyanma	16
3.5. Western- Blot Analizi	19
3.5.1. Lizat Hazırlama	23
3.5.2. SDS-PAGE Western Blot Protokol	23
3.6. Kantitatif Real-Time RT-PCR	24
3.6.1. Total RNA İzolasyon Basamakları	25
3.6.2. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	26
3.6.3. Kantitatif Real Time Q-PCR Uygulama basamakları	27
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	28
4. BULGULAR	
4.1. İmmunohistokimyasal Bulgular	29

4.2. Western Blot ve QPCR Analizleri	43
4.2.1. AXL için Western Blot ve QPCR Analizleri	43
4.2.2. MERTK için Western Blot ve QPCR Analizleri	45
4.2.3. TYRO3 için Western Blot ve QPCR Analizleri	48
4.2.4. GAS6 için Western Blot ve QPCR Analizleri	50
4.2.5. PROS1 için Western Blot ve QPCR Analizleri	53
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	76
EKLER	
EK-1.	

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. İmmünohistokimyasal analizlerde kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları	19
Tablo 3.2. Western blot deneyinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	24
Tablo 3.3. cDNA reaksiyon içeriği	26
Tablo 3.4. Q-PCR için reaksiyon karışımı	27
Tablo 3.5. QPCR’da kullanılan primerler	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Reseptivite için blastokist aktivasyonu ve Uterinal epitelin hazırlanmasında sinyalleşmeler	5
Şekil 2.2. Embriyo implantasyonunu düzenleyen sinyal ağı	6
Şekil 2.3. TAM reseptörleri ve ligandları	10
Şekil 2.4. TAM reseptör sinyal yollarını gösteren şematik çizim. A. Reseptör dimerizasyonu ile aktive edilmiş TAM proteinleri, Akt fosforilasyonu ve aktivasyonu ile klasik reseptör kinaz sinyal yolağının çalışması, TAM tarafından hücre sağ kalımının düzenlenmesi ve apoptotik hücrelerin fagositler tarafından alınması için gereken aktin sitoskeletonunu harekete geçirmektedir. B. TİP1 İnterferon reseptörü (IFNAR) ile kompleks TAM reseptörü. Dendritik hücrelerdeki inflamatuvar cevabın inhibisyonunda etkin olan yolak	12
Şekil 4.1. TP ve URPL grubu koryon örneklerinde AXL, MERTK, TYRO3, GAS6, PROS1, CD68, CD11c, CD90, CK7 proteinlerinin immünoreaktivitesi.	29
Şekil 4.2. TP ve URPL gruplarının desiduası ve Kontrol Endometriumda (KE) AXL, MERTK, TYRO3, GAS6, PROS1, CD68, CD11c, CD90, CK7 proteinlerinin immünoreaktivitesi.	30
Şekil 4.3. KE (a), TP (b) ve URPL desiduasında (c) AXL immünoreaktivitesi.	31
Şekil 4.4. TP grubu koryon örneklerinde AXL immünoreaktivitesi.	32
Şekil 4.5. URPL grubu koryon örneklerinde AXL immünoreaktivitesi.	32

Şekil 4.6. KE grubu (a), TP grubu (b) ve URPL grubu desidua örneklerinde (c) MERTK immunoreaktivitesi.	33
Şekil 4.7. TP grubu koryon örneklerinde MERTK immunoreaktivitesi.	33
Şekil 4.8. URPL grubu koryonunda MERTK immunoreaktivitesi.	33
Şekil 4.9. KE grubu (a), TP grubu (b) ve URPL grubu (c) desidua örneklerinde TYRO3 immunoreaktivitesi.	34
Şekil 4.10. TP grubu koryon örneklerinde TYRO3 immunoreaktivitesi.	34
Şekil 4.11. URPL grubu koryon örneklerinde TYRO3 immunoreaktivitesi.	35
Şekil 4.12. KE grubu (a), TP grubu (b) ve URPL grubu (c) desidua örneklerinde GAS6 immunoreaktivitesi.	36
Şekil 4.13. TP grubu koryon örneklerinde GAS6 immunoreaktivitesi.	36
Şekil 4.14. URPL grubu koryon örneklerinde GAS6 immunoreaktivitesi.	36
Şekil 4.15. KE grubu (a), TP grubu (b) ve URPL grubu (c) desidua örneklerinde PROS1 immunoreaktivitesi.	37
Şekil 4.16. TP grubu koryon örneklerinde PROS1 immunoreaktivitesi.	37
Şekil 4.17. URPL grubu koryon örneklerinde PROS1 immunoreaktivitesi.	37
Şekil 4.18. KE grubu (a), TP grubu (b) URPL grubu (c) desidua örneklerinde CD68+ immunoreaktivitesi.	38
Şekil 4.19. TP grubu koryon örneklerinde CD68+ immunoreaktivitesi.	38
Şekil 4.20. URPL grubu koryon örneklerinde CD68+ immunoreaktivitesi.	38
Şekil 4.21. KE grubu endometriyum örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) İmmunoreaktivitesi	39

- Şekil 4.22.** TP grubu desidua örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi. 39
- Şekil 4.23.** TP grubu koryon ve desidua örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi. 40
- Şekil 4.24.** TP grubu koryon örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi. 40
- Şekil 4.25.** TP grubu koryon örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi. 41
- Şekil 4.26.** URPL grubu desidua örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi 41
- Şekil 4.27.** URPL grubu koryon ve desidua örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi. 42
- Şekil 4.28.** URPL grubu koryon örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi. 42
- Şekil 4.29.** URPL grubu koryon örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi. 43
- Şekil 4.30.** TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen AXL mRNA'sının QPCR analizi (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) *URPL ve KE grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu. 44
- Şekil 4.31.** TP ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen AXL proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) 44

- Şekil 4.32.** TP ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *AXL* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) 45
- Şekil 4.33.** TP ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *AXL* proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) 45
- Şekil 4.34.** TP ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *MERTK* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) 46
- Şekil 4.35.** TP ve URPL desiduasında eksprese edilen *MERTK* proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) *: URPLD ve KE grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır (p:0,01). 47
- Şekil 4.36.** TP ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *MERTK* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) 47
- Şekil 4.37.** TP ve URPL koryonlarında eksprese edilen *MERTK* proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6). 48
- Şekil 4.38.** TP ve URPL desiduasında eksprese edilen *TYRO3* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (UPRD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6)
a: URPL ve KE arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. $P < 0,03$;
b: TP ve KE arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. $P:0,0001$;
c: RPL ve TP arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. $P: 0,01$. 49
- Şekil 4.39.** TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *TYRO3* proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) 49
- Şekil 4.40.** TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *TYRO3* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) 50

- Şekil 4.41.** TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen TYRO3 proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) 50
- Şekil 4.42.** TP grubu ve URPL grubu desidularında eksprese edilen *GAS6* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) a: TP ve KE arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. P: 0,005; b: TP ve URPL arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. P:0,003. 51
- Şekil 4.43.** TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *GAS6* proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) *: URPL ve TP arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. P< 0,003. 52
- Şekil 4.44.** TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *GAS6* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) 52
- Şekil 4.45.** TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *GAS6* proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) 53
- Şekil 4.46.** TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *PROS1* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) 54
- Şekil 4.47.** TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *PROS1* proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) 54
- Şekil 4.48.** TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *PROS1* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) 55

Şekil 4.49. TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen PROS1 proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) *: URPL ve TP arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır P: 0,02.

55

Şekil 4.50. Tüm grupların western Blot Bantları (AXL, MERTK, TYRO3, GAS6 ve PROS1)

56



SİMGELER ve KISALTMALAR

2-ΔΔCT	: Relative quantification
ACE	: Angiotensin converting enzyme
ACRYL/BIS	: Acrylamide and Bis-acrylamide
AKT	: Protein kinase B (PKB)
aPC	: Aktifleştirilmiş Protein C
aPL	: AntiPhosphoLipid Antikor
APS	: AntiPhospholipid Sendrom
Ark	: AXL Receptor tyrosine kinases
AXL	: AXL Receptor tyrosine kinases
Brt	: TYRO3 Receptor tyrosine kinases
CD	: Cluster of Differentiation
cDNA	: Komplementer DNA
c-Eyk	: MERTK Receptor tyrosine kinases
CK	: Cytokeratin
CL	: Chemiluminisans
Ct	: Threshold cycle
CTB	: Sitotrofoblast
DAB	: Diaminobenzidin
dMph	: Desidual Makrofaj

DNA	: Deoksiribo nükleic acid
dNK	: Desidual Natural Killer
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
Dtk	: TYRO3 Receptor tyrosine kinases
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EGF	: Epidermal growth factor
Erb	: Estrogen receptor 2
Etk-2	: TYRO3 Receptor tyrosine kinases
EVT	: Ekstra villöz trofoblastlar
F2	: Protrombin G20210A
F5	: Faktör V Leiden
GAS6	: Growth arrest-specific 6
HB-EGF	: Heparin-binding EGF-like growth factor
HCL	: Hidroklorik asid
HGF	: Hepatocyte growth factor
HLA	: Human Lökosit Antijen
HRP	: Horse Radish Peroxidase
IFN-α	: İnterferon Alfa
IFN-γ	: İnterferon Gamma
IFNAR	: TİP1 İnterferon reseptörü

IGF	: İnsulin-like growth factor
IL	: İnterleukin
KE	: Kontrol Endometrium
LIF	: Leukemia inhibitory factor
LILRB	: Inhibitory leukocyte immunoglobulin like receptors
LH	: Luteinize Hormon
MERTK	: c-mer proto oncogene receptor tyrosine kinase
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MMLV	: Moloney Murine Leukemia Virus
Mph	: Makrofaj
mRNA	: Messenger RNA
NK	: Natural Killer cell
Nyk	: c-mer proto oncogene receptor tyrosine kinase
PBS	: Phosphate Buffer Salin
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
pNK	: Periferal Natural Killer
PR	: Progesteron
PROS1	: Protein S Receptor tyrosine kinases
PtdSer	: Phosphatidylserine

QPCR	: Quantative Polimerase Chain Reaction- Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	: Quantative Polimerase Chain Reaction- Polimeraz zincir reaksiyonu
Rek	: TYRO3 Receptor tyrosine kinases
RNA	: Riboksinükleik asit
ROR gamma-t	: Retinoid-related orphan receptör gamma-t
RPL	: Recurrent Pregnancy Loss/ Tekrarlayan Gebelik Kaybı
Rse	: TYRO3 Receptor tyrosine kinases
RT-PCR	: Reverse Trankriptase PCR
SDS	: Sodyum Dedosil Sülfat
Sky	: TYRO3 Receptor tyrosine kinases
STAT	: Signal transducers and activators of transcription
STB	: Sinsisyotrofoblast
TAM	: <u>TYRO-3</u> , <u>AXL</u> , <u>MER</u>
TBS	: Tris Buffer Salin
TBS-T	: Tris Buffer Salin-Tween
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
TGF-β	: Transforming Growth Factor Beta
Tif	: TYRO3 Receptor tyrosine kinases
TLR	: Toll benzeri reseptörler

TNF	: Tümör Nekresis Faktör
TP	: Terminated Pregnancy- Sonlandırılmış gebelik
TPD	: Terminated Pregnancy Decidua
TPK	: Terminated Pregnancy Koryon
TYRO	: Receptor tyrosine kinase
Ufo	: AXL Receptor tyrosine kinases
uNK	: Uterin Natural Killer
URPL	: Unexplained Reccurent Pregnancy Loss- Sebebi açıklanamayan (bilinmeyen) tekrarlayan gebelik kaybı
URPLD	:Unexplained Reccurent Pregnancy Loss Decidua- Sebebi açıklanamayan (bilinmeyen) tekrarlayan gebelik kaybı desiduası
URPLK	: Unexplained Reccurent Pregnancy Loss Koryon- Sebebi açıklanamayan (bilinmeyen) tekrarlayan gebelik kaybı Koryonu
ZP	: Zona pellucida

1. GİRİŞ

İnsanlar, tüm gebeliklerin ortalama %12-15' inde spontan düşükle karşılaşmaktadır. Kaybedilen bu gebeliklerin %30' u, implantasyondan 6. haftaya kadar geçen erken dönemde sonlanmaktadır(Nybo Andersen ve ark. 2000). Bu vakaların %50' sinden fazlası, açıkça tanımlanmış bir etiyolojiye sahip değildir(Stirrat 1990). Literatürde, tekrarlayan gebelik kaybının (Recurrent Pregnancy Loss-RPL) önemli bir kısmının bağışıklık etiyojisi ile ilişkili olabileceği ifade edilmektedir. RPL' li kadınlarda gebelik öncesi ve gebelik esnasında izlenen abartılı inflamatuvar cevap ile karşılaştığı belirtilmektedir(Saito ve ark. 2011, Christiansen 2013).

Reseptör tirozin kinaz ailesinden olan TAM (TYRO-3, AXL, MERTK) reseptör kinazların, hem fagositozda hem de inflamatuvar çevrenin baskılanmasında önemli role sahip olduğu bildirilmektedir(Zagorska ve ark. 2014). Ancak, TAM reseptör kinazların gebelik döneminde immün toleranstaki rollerine ilişkin yeterli bilgi bulunmamaktadır. TAM reseptör kinazların inflamatuvar çevrenin düzenlenmesinde oynadığı rol nedeniyle, maternal genoma yabancı olan embriyonun, uterusu kabulü ve immün toleransında etkili olabileceğinden yola çıkarak çalışmamızı “Sebebi açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarında (Unexplained Recurrent Pregnancy Loss-URPL) TAM reseptör kinazlar ve ligandlarının ekspresyon düzeyleri, koryon villus ve desiduada normal gebeliklere göre farklılık gösterir” hipotezine dayandırdık.

Hipotezimizi test etmek için, URPL'li hasta desiduası ve koryon villus örneklerinde, TAM reseptör kinazlar (TYRO-3, AXL, MERTK) ve reseptörlerinin (GAS6 ve PROS-1) mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonlarını belirlemeyi ve normal gebelik durumu ile karşılaştırmayı amaçladık. Böylece URPL'li hasta desiduasında ve koryon villusunda TAM reseptör kinazların ve ligandlarının ekspresyon düzeylerinde önemli bir değişikliğin olup olmadığı, URPL görülen kadınların bu açıdan normal gebelere göre bir özellik taşıyıp taşımadığı konusunda önemli bulgulara ulaştık. Çalışmamızın sonucunda; implantasyonun gerçekleşmesi ve gebeliğin devamlılığında önemli olan inflamatuvar çevrenin düzenlenmesinde, TAM reseptörlerinin düzeyleri ve rolleriyle ilgili yeni bilgiler elde edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, RPL' nin önlenmesi, yönetilmesi ve

tedavisine yeni bakış açıları ve yaklaşımların oluşturulmasına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları (RPL)

Spontan düşük, tüm hamile kadınlar için önemli bir kayıptır ve kadınların % 1' ni etkilemektedir (Stirrat 1990). Spontan düşük yaşama sıklığı, sağlık kurumuna başvurulmamış vakalar dikkate alındığında, klinik olarak açıklanan oranlardan çok daha yüksek olabilir. Tüm gebeliklerin, % 12-15' ine varan oranda spontan düşükle karşılaşmaktadır. Kaybedilen bu gebeliklerin %30' u implantasyon ve 6. hafta arasını içeren erken dönemde sonlanmaktadır. Maternal yaş ve önceki düşükler, sonraki düşüklerin meydana gelme olasılığını arttırmaktadır (Nybo Andersen ve Wohlfahrt 2000). RPL yönetimi günümüzde henüz yeterli düzeyde çözülememiş bir sorun olarak durmaktadır. Bu vakaların bir bölümünün nedenleri açıklanabilirken, %50' sinden fazlası açıkça tanımlanmış bir etiyolojiye sahip değildir. Bu nedenle günümüzde RPL nedenleri ve yönetimi en çok tartışılan ve araştırılan konulardan birisidir. Klinikte üç veya daha fazla ardışık düşükler (Stirrat 1990), Amerika üreme tıbbi derneği uygulama komitesine göre de iki veya daha fazla tekrarlayan klinik gebelik kaybı (Practice Committee of the American Society for Reproductive 2012) RPL olarak tanımlanmaktadır. İki ardışık kayıp sonrası tekrar düşük yapma olasılığı %17-25, üç ardışık kayıp sonrası dördüncü düşük yapma olasılığı %25-46 arasında olduğu hesaplanmıştır. Ayrıca anne yaşı da diğer bir etkendir; anne yaşı arttıkça risk daha da artmaktadır (Regan ve ark. 1989). Genel populasyon ile kıyaslandığında RPL'li kadınlarda subfertilite prevalansının ve subfertil çiftler arasında da spontan kayıpların frekansının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Coulam 1992).

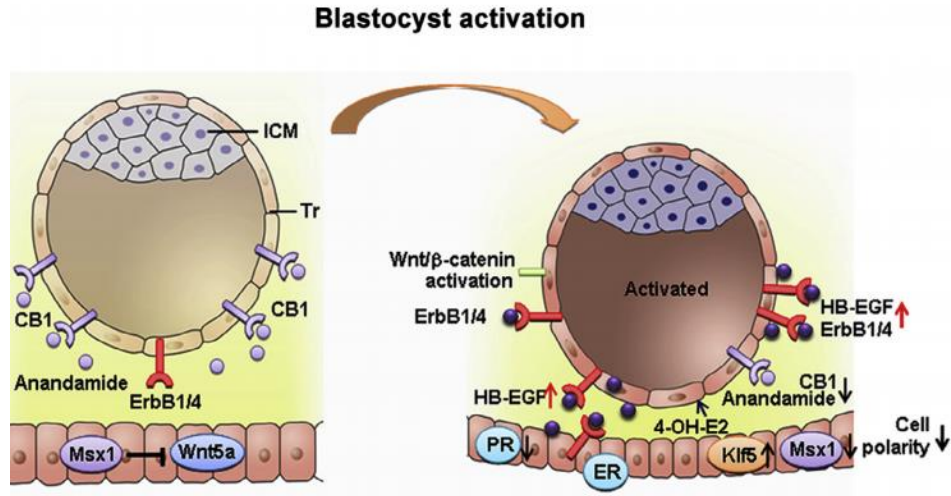
Erken gebelik kayıplarının yaklaşık %50-60' ı konseptusun kromozomal anomalisiyle ilişkilendirilmektedir. En yaygın anomali, kromozomal anomalili düşüklerin %50' sinden fazlasını oluşturan otozomal trizomili anoplöididir (Jeve ve Davies 2014). Anatomiik anomaliler de önemli RPL sebeplerinden birisini oluşturmaktadır. Major uterin anomaliye sahip olanların, RPL yaşama olasılığı %3,2-6,9 iken, kavisli uterusu sahip olanların ihtimali % 1-16,9 olarak hesaplanmıştır (Sugiura-Ogasawara ve ark. 2011). Gardnerella vaginalis enfeksiyonuna bağlı gelişen bakteriyel vajinozis de, erken doğum ve geç dönem düşükler için güçlü bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Leitich ve

Kiss 2007). RPL riski oluşturan diğer bir faktör olarak hematolojik hastalıklar gösterilmektedir. Kişinin kendi dokusuna karşı oluşturulmuş antifosfolipit otoantikörlerinin (aPL) varlığı ile karakterize otoimmün bir hastalık olan Antifosfolipid Sendrom (APS), RPL sebepleri arasında kabul edilmektedir (Yetman ve Kutteh 1996). Kalıtsal trombofili örnekleri olan antitrombin aktivitesi, Protein C aktivitesi, Protein S dereceleri, Faktör V Leiden (F5) ve Protrombin G20210A (F2)'de RPL nedenleri içerisinde ifade edilmektedir (Balszan-Kowalska 2002). Faktör V Leiden ve Protrombin G20210A tekrar RPL'den ziyade 20. haftadan sonra ölü doğumlarla daha çok ilişkilendirilmektedir (Dizon-Townson ve ark. 2005, Silver ve ark. 2010). 5,10-methylenetetrahydrofolate'ın 5-methyltetrahydrofolate' a dönüşümünü katalizleyen anahtar enzim olan MTHFR (EC 1.5.1.20) 'nin geninde meydana gelen polimorfizm, hiperhomosistinemi ile ilişkilendirilmiştir. Hiperhomosistineminin de RPL için bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (Steeegers-Theunissen ve ark. 1992, Nelen ve ark. 2000). RPL'li kadınlar arasında Polikistik Over Sendromu (PCOS) prevalansının %40 olduğu hesaplanmıştır (Liddell ve ark. 1997). PCOS'lu ve PCOS'suz kadınlar arasında görülen bazal LH'nin aşırı salgılanması da RPL nedenleri arasında gösterilmektedir (Rai ve ark. 2000). Diyabette insülin direncinin de RPL'ye neden olduğu bildirilmektedir (Chakraborty ve ark. 2013). Luteal faz defektleri, diabetes mellitus, tiroid hastalıkları ve sperm DNA fragmentasyonu artışı da RPL etkenleri arasındadır (Jeve ve Davies 2014).

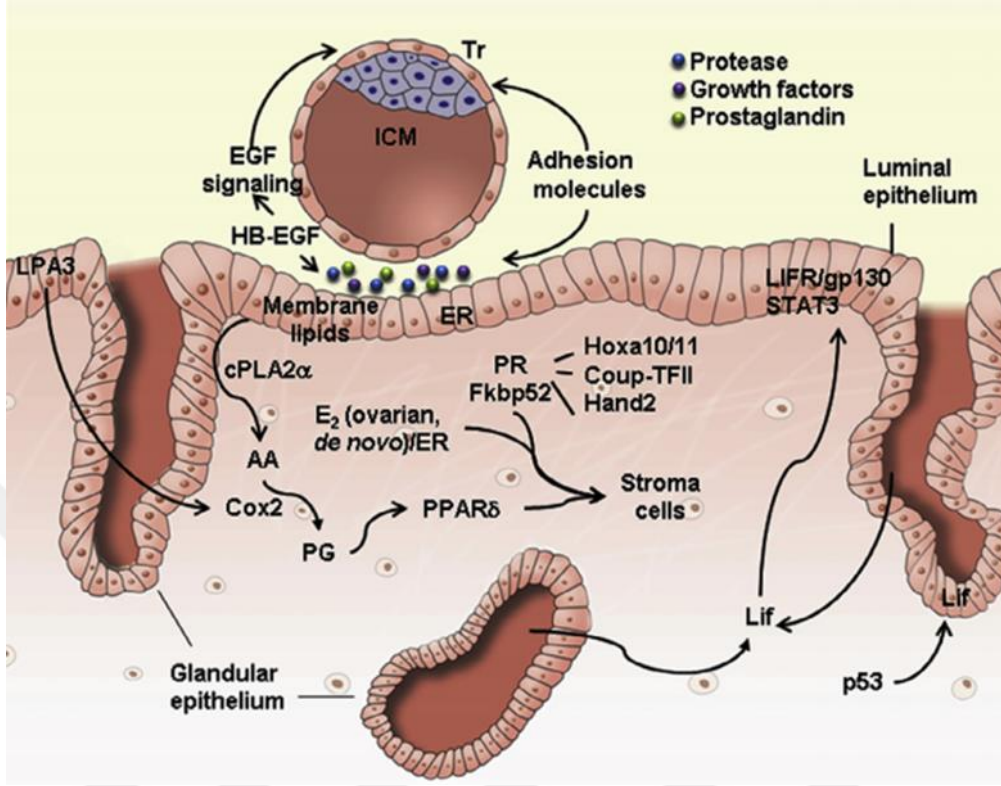
RPL'nin önemli bir kısmının bağışıklık etiyojisi ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Saito ve Nakashima 2011). uNK (Uterin Natural Killer)' lar ve pNK (Periferal Natural Killer)' ların üreme yetersizliği ile ilişkisi bulunmuş olup, endometriyumda immün komponent hale gelen NK hücrelerinin anormal fonksiyon göstermesi de RPL nedenleri içerisinde gösterilmektedir (Russell ve ark. 2011). İmmünolojik orjinli olduğu düşünülen nadir görülen plasental patolojilerden kronik histiyositik intervillözitin üreme kaybı ile ilişkili oldu rapor edilmiştir (Reus ve ark. 2013). RPL' li kadınlarda hamilelikten önce ve hamilelik esnasında izlenen abartılı inflamatuvar yanıtın, fetal antijenler ile oto antijenler arasındaki toleransın kırıldığına işaret ettiği söylenmektedir (Christiansen 2013).

2.2. Blastokist Aktivasyonu, Uterus Reseptivitesi ve İmplantasyon

Fertilizasyon ovulasyondan sonraki 24 ila 48 saat içerisinde fallop tüplerinde gerçekleşir. Oluşan zigot, mitotik bölünmeler geçirerek fertilizasyondan sonra yaklaşık 3. günde uterus lümenine girer. Bu geçiş aşamasında embriyo hücresel değişim göstererek, ileride plasentayı oluşturacak ekstraembriyonik yapı olan trofoblast ve embriyoyu oluşturacak iç hücre kitlesine farklılaşarak blastokist yapısını kazanır. Uterus lümenine giren blastokist 72 saat içerisinde ZP'dan (Zona pellucida) kurtulur. Fertilizasyondan 6-7 gün sonra blastokistin uterus epitelini geçerek endometriuma implantasyonu görülür. Blastokistin başarılı implantasyonu, uterus lümenine ulaşmadan ve ulaştıktan sonra geçirdiği değişimlere bağlıdır. Blastokistin ZP'dan kurtulmasından sonra trofoektodermal hücreler, uterin sıvıda bulunan büyüme faktörleri ve diğer çözülebilir biyoaktif moleküller aracılığı ile parakrin sinyallere erişilebilir hale gelirler (Armant 2005, Wang ve Dey 2006, Cockburn ve Rossant 2010, Modi ve ark. 2012, Christiansen 2013).



Şekil 2.1. Reseptivite için blastokist aktivasyonu ve uterinal epitelin hazırlanmasında etkili sinyalleşmeler (Zhang ve ark. 2013)



Şekil 2.2. Embriyo implantasyonunu düzenleyen sinyal ağı (Zhang ve Lin 2013)

Embriyo kaynaklı sinyaller hem uterusu hem de üreme organlarını etkilemektedir. Blastokist aktivasyonu sırasında, *Hbegf* geni, belirgin bir şekilde upregüle olur. Bu gen HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) proteininin genidir. *Hbegf* geni farede blastokistin tutunmasından yaklaşık 6 saat önce blastokistin apozisyon bölgesindeki luminal epitelde eksprese edilir. HB-EGF reseptörlerinin (*Erb1* ve *4*) ekspresyonu ve ligand bağlama aktivitesi artışı implantasyon için yeterli olgunluğa ulaşmış blastokistte gözlenir. HB-EGF proteini ile ıslatılmış "Blastocyst Size Affi-Gel bead" lerin yalancı gebelik oluşturulmuş canlıya intraluminal olarak transfer edildiği çalışmada, beadlerin çevresindeki uterus hücrelerinde *Hbegf* gen ekspresyonunun uyarıldığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada vasküler permabilitenin, normal blastosist tarafından uyarılmış fizyolojik değişimlere benzer şekilde arttığı da belirlenmiştir. Bu süreçte embriyoya HB-EGF tarafından sinyalin geri gönderildiği ve böylece, tutunma ve invazyon esnasında adhezif fonksiyonlar için gerekli olan trofoblast farklılaşmasının uyarıldığı iddia edilmektedir. HB-EGF'nin, parakrin ve juktakrin sinyalleşme yoluyla implante olacak blastokist ve uterus arasında otomatik uyarıcı döngüyü yürüttüğü düşünülmektedir.

Reseptif endometriyumda HB-EGF yüksek derecede eksprese edilirken, reseptörü olan ErbB4' de, periimplantasyon blastokistinin trofoektoderm yüzeyinde yer almaktadır. İnsanda HB-EGF-ErbB4 sinyalinin implantasyon esnasında trofoektoderm-uterus epiteli etkileşimine aracı olduğu ve HB-EGF' nin insanda gebeliğin ilk trimesterinde plasantasyon esnasında, trofoblastın gelişimi ve yaşamını sürdürmesinde düzenleyici rol oynadığı belirlenmiştir (Şekil 2.1) (Zhang ve Lin 2013).

Normal implantasyon için blastokistle uterus arasında karşılıklı konuşma oldukça önemlidir. İmplantasyon başarısında, blastokistin aktive olup implantasyon için yeterli seviyeye gelmesiyle birlikte, endometriumun reseptif duruma gelmesi de gerekmektedir. Bu iki durumun gerçekleşmesi ovaryan östrojen ve progesteron gibi maternal hormonlarla düzenlenir. Moleküler ve genetik kanıtlar göstermiştir ki; ovaryan hormonlar fonksiyonlarını kompleks implantasyon işlemine spesifik bir takım sinyal molekülleri (lokal olarak üretilmiş sitokinler, büyüme hormonları, homeobox transkripsiyon faktörleri, lipid mediatörleri ve morfogen genler) ile birlikte otokrin, parakrin ve juktakrin etkileşimler aracılığı ile göstermektedir (Şekil 2.2). Ovulasyon döneminde yüksek östrojen pikinden kısa bir süre sonra progesteron artışı gerçekleşmektedir. Fertilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi durumunda farelerde 4. günde östrojenin küçük bir dalgalanması, progesterona yardımcı olarak uterus reseptivitesine katkıda bulunur. İnsanlarda ve primatlarda ise blastokist-uterus etkileşimi için ovaryan östrojenin gerekli olup olmadığı halen net değildir (Zhang ve Lin 2013). Periimplantasyon periyodu içerisinde bazı majör sitokin ve büyüme faktörleri de salgılanmaktadır. Bunlardan LIF, interleukin (IL)-6, IL-11, IL-1, IL-15, IL-8, HGF, IGF, EGF, IFN- α , IFN- γ ve TGF- β süper ailesinin sitokinleri, trofoblast fonksiyonunu etkileyerek, başarılı gebeliğin gerçekleştirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Suman ve ark. 2013).

Blastokist ZP' dan kurtulduktan sonra uterus lumen epiteli ile etkileşime girerek burada bulunan HB-EGF gibi büyüme faktörüyle trofoblastlarda integrin $\alpha_5\beta_1$ ' in ekspresyonunu uyaran juktakrin sinyalleşmeye olanak sağlar. Bu sinyalleşme blastokiste ekstraselüler matrikste bulunan fibronektin ile bağlantı yapmak için yeterlilik kazandırır. Endometriyal hücreler ve trofoblast hücreleri arasındaki bu çapraz sinyalleşme,

blastokistin endometriyuma daha sağlam tutunmasını sağlar. Endometrium, başlangıçta endometrial lüminal epitele blastokistin tutunmasına yardım eder. Tutunmuş blastokistin trofoblastları, proliferasyon olarak farklılaşır ve böylelikle fonksiyonel plasentayı oluşturmaya başlarlar. Blastokistin maternal endometriuma yapışması tutunmayı sağlarken bir yandan da trofoblastların dış sinsisyotrofoblast (STB) ve iç sitotrofoblast (CTB) tabakalarına farklılaşmasını tetikler (Armant 2005). STB' lar bu sırada bazı litik enzimleri salgılayarak desidual ekstrasellüler matriksin (ECM) degrades olmasını (yıkılmasını) sağlarken, endometriyal hücrelerin apoptozunu tetikleyen bir takım faktörler de salgırlar. Bu şekilde, STB' lar endometriyal epitel arasından bazal lamina bariyerini aşır, desidualizasyon geçiren endometriyum stroması içerisine blastokistin yerleşmesine öncülük eder. İlave olarak STB' lar fetal ve maternal metabolizmanın düzenlenmesi için gerekli olan proteinler, steroid hormonlar, büyüme faktörleri ve diğer substratların sentezi ve salgılanması, maternal ve fetal sirkülasyon arasında substratlar, gazlar ve diğer faktörlerin değişimi gibi birçok işlevi de yürütür. Bu sayede erken implantasyon olayları süreci fertilizasyonun ikinci haftasının sonunda biter (Modi ve Godbole 2012, Soares ve ark. 2012, Zhang ve Lin 2013). Bu aşamadan sonra CTB' lar daha sıkı hücre grupları oluşturmak üzere hızla proliferasyona gider ve trofoblastların daha invazif formu olan ekstra villöz trofoblastlara (EVT) farklılaşırlar. EVT' ler ya Nitabuch tabakası içerisindeki koryonik villusa demirlemek, yada endometriyal desidualanın derinlerine infiltre olmak için çoğalırlar. İnvazif trofoblast hücreleri maternal spiral arterlere ulaşır ve var olan endotelyal tabakaya katılarak endovasküler trofoblastlara dönüşürler (Soares ve Chakraborty 2012, Suman ve Malhotra 2013).

2.3. Desidual İmmün Hücreler

Hamilelik, maternal immün sistem için gebelik süreci boyunca belirgin bir sorun oluşturur. İnsanda maternal immün sistem semi allojenik fetusu 9 ay boyunca tolere etmek zorundadır. Bu olguya ilk olarak 1950' lerde Peter Medawar tarafından dikkat çekilmiştir (Medawar 1948). Medawar, genetik olarak farklı bireyler arasında deri graft rejeksiyonu üzerine çalışırken, bu immünolojik çelişkiyi fark ederek bu olguyu destekleyecek üç faktör önermiştir: 1-Anne ve fetus arasındaki anatomik ayrım, 2-Fetusun antijenik özelliğinin azalmış olması, 3- Maternal immün sistemin immünolojik durgunluğu. Bu öneriler gebelik immünolojisi ile ilgili araştırmaların önünü açmıştır.

Bugün çok iyi bilinmektedir ki; fetal hücreler maternal immün sistemden büyük ölçüde Klasik MHC Sınıf 1 (HLA-C dışında) ve MHC Sınıf 2 molekülleri bulunmayan zayıf antijeniteye sahip fetal EVT hücreler ile ayrılmaktadır. Bununla birlikte fetal maternal mikrokimerizm, insan hamileliği sırasında maternal serumda anti-fetal HLA antikörlerinin bulunmasıyla kanıtlanmış bir durumdur. İlave olarak fetal hücreler tarafından sunulan fetal antijenler, direkt sunulmayıp fetal-maternal yüzde maternal antijen sunan hücreler tarafından işlendikten sonra sunulmaktadır. Maternal immün sistemin çeşitli alt tipleri gebe uterusunun fetal-maternal yüzdeki müköz membranı olan desiduada bulunur (Hsu ve Nanan 2014).

Gebeliğin ilk trimesterinde desidua yoğun lökosit içerir. Bu immün havuz ilk trimesterin sonuna kadar yoğun olarak, NK hücrelerden, makrofajlardan (Mph) ve bir kaç T hücresinden oluşur. Lökositlerin yaklaşık %70' ini oluşturan desiduanın NK hücreleri (dNK) CD162 CD56^{bright} yüzey işaretleyicilerine sahiptir ve kan NK hücrelerinden farklıdır (Bulmer ve ark. 2010).

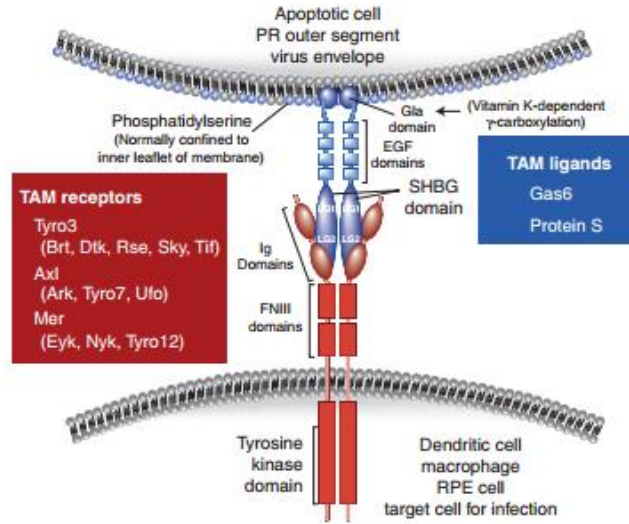
İnsanda desidual makrofajlar (dMph) ile dNK' nın ilişkisi Regulator T hücrelerinin uyarımı ile sonuçlanır ve fetomaternal toleransda temel role sahiptir. dNK hücreleri, salgıladıkları sitokin, kemokin ve angiogenez düzenleyici faktörlerin etkisiyle trofoblast invazyonu ve vasküler yeniden şekillenmeyi kontrol etmektedir (Wallace ve ark. 2012). İnvaze olmuş trofoblast hücreleri kemokin sekresyonu ile desiduya CD56^{bright} dNK hücrelerini çağırırlar (Hanna ve ark. 2003).

Desiduada ikinci lökosit popülasyonu, desidual lökositlerin % 20-30' nu oluşturan dMph' lardır. dMph' lar alternatif aktivasyon markerları eksprese ederek hem endometriyumun yeniden şekillenmesine hem de konseptusun kabulü için gerekli immün toleransı olan ortamın sağlanmasına katkıda bulunur (Svensson ve ark. 2011). dMph' ler immün modülatör moleküller salgılayarak (Nagamatsu ve Schust 2010) aynı zamanda invazif EVT' ler HLA-G için inhibitör HLA-G reseptörleri LILRB1 ve LILRB2 eksprese ederler. Ayrıca dMph' lar apoptotik trofoblast hücrelerin temizlenmesinde de önemli rol oynamaktadırlar. Trofoblast hücreleri tarafından salgılanan sitokinler yoluyla etki edilen dMph' ların, erken hamilelik dönemi desiduasında, EVT' lerin hemen yakınındaki bezler ve spiral arterlerin civarında yer aldığı da bilinmektedir (Bulmer ve

Williams 2010, Nagamatsu ve Schust 2010, Svensson ve Jenmalm 2011, Wallace ve Fraser 2012, Helige ve ark. 2014).

2.4. TAM (TYRO3, AXL, MERTK) Reseptör Kinaz Ailesi

Homeostaz ve inflamasyon uzun yıllar boyunca farklı iki olgu iken, zaman içinde birbirleriyle yakın ilişkide olduğu anlaşılmıştır. Homeostazı etkileyen moleküllerin, inflamasyonu da etkilediği, yada tam zıt etkiler gösterdiği günümüzde bilinmektedir. Reseptör Tirozin Kinaz ailesinden olan TAM reseptörleri (Robinson ve ark. 2000) ilk 1991 yılında klonlanmış, 1995 yılına kadar da orfan reseptörler olarak kalmıştır (Lai ve Lemke 1991). Hemen ardından ligandları olan Protein S (PROS 1) ve Growth arrest-specific 6 (GAS6) tanımlandı (Stitt ve ark. 1995, Nagata ve ark. 1996). TAM reseptör kinaz ailesinin üyeleri, TYRO3 (Brt, Dtk, Etk-2, Rek, Rse, Sky, ve Tif), AXL (Ark, Tyro7, ve Ufo) ve MERTK (c-Eyk, Mertk, Nyk, ve Tyro12) den oluşmaktadır. TAM reseptörleri hücre dışı alanlarında arka arkaya bulunan iki immünglobulin benzeri domain ve iki fibronektin tip III tekrarlarını içerir (Şekil 2.3). Ligand bağlandığı zaman reseptör dimerize olur ve reseptör tirozin kinaz aktive olur (Sasaki ve ark. 2006).



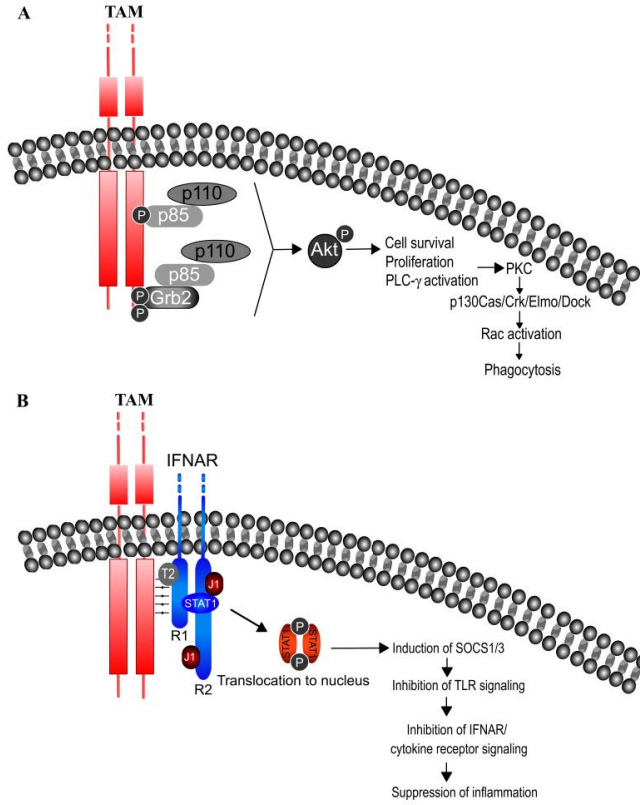
Şekil 2.3. TAM reseptörleri ve ligandları (Lemke 2013)

Son yıllarda TAM reseptörlerinin bir kaç sinyal fonksiyonu tanımlanmıştır. Bunlar arasında hücre büyümesi ve proliferasyonun uyarımı, apoptozun inhibisyonu (Nakano ve ark. 1995, Goruppi ve ark. 1996), efferositozis'e aracılık yapmak (Anderson ve ark.

2003), homeostazisi uyarmak (Angelillo-Scherrer ve ark. 2005) ve inflamasyonu modüle etmek (Camenisch ve ark. 1999) sayılabilir (Şekil 2.4).

TAM reseptörleri, GAS6 tarafından aktive edildiği zaman platelet stabilizasyonunu kolaylaştırarak hemostazı uyarır (Angelillo-Scherrer ve Burnier 2005). Diğer ligandı PROS 1, TAM reseptörlerinden bağımsız, hemostaz üzerinde inhibitör etkiye sahiptir (Walker 1980, Heeb ve ark. 1994). TAM reseptörleri aktivasyonunun, Toll like reseptör sinyalini inhibe ettiği, fagositozu ve NK hücre gelişimini uyardığı bulunmuştur. Ayrıca bu aktivasyonun otoimmüitenin önlenmesinde rol oynayabileceği hakkında spekülasyonlar da bulunmaktadır (van der Meer ve ark. 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda TAM reseptör kinazların hem fagositozda hem de inflamatuvar çevrenin baskılanmasında oldukça önemli role sahip olduğu bildirilmektedir. AXL, MERTK ve TYRO3 reseptörlerinden oluşan TAM reseptör kinaz ailesi üyelerinin makrofajlar, dendritik hücreler (DC) ve endotel hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Zagorska ve Traves 2014).



Şekil 2.4. TAM reseptör sinyal yollarını gösteren şematik çizim. A. Reseptör dimerizasyonu ile aktive edilmiş TAM proteinleri Akt fosforilasyonu ve aktivasyonu ile klasik Reseptör kinaz sinyal yolağının çalışması, TAM tarafından hücre sağ kalımının düzenlenmesi ve apoptotik hücrelerin fagositler tarafından alınması için gereken aktin sitoskeletonunu harekete geçirilmektedir. B. TİP1 İnterferon reseptörü (IFNAR) ile kompleks TAM reseptörü. Dendritik hücrelerdeki inflammatuar cevabın inhibisyonunda etkin olan yolak (Lemke 2013).

Patojen uyarısının olmadığı durumda, inflamasyonun baskılanmasında etkin olan AXL reseptörünün dendritik hücrelerde önemli rol oynadığı, kararlı durum ve toleransda daha baskın olduğu bilinen MERTK ekspresyonunun ise, makrofajlarda daha fazla olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Zagorska ve Traves 2014).

AXL' nin aktivasyonu için GAS6' nın varlığının ve birlikte yüzey ekspresyonunun gerekli olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. GAS6' nın bir çok dokuda protein rezervuarının korunması AXL' in yüzey ekspresyonuna bağlıdır. AXL ligandı GAS 6' nın, AXL ve PtdSer (Phosphatidylserine) arasında köprü oluşturup aktivasyonu sağladığı ve aktivasyon sonrasında AXL' in bölünerek Solubl AXL-GAS6' yı oluşturduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Zagorska ve Traves 2014).

İdiyopatik RPL' de AXL ligandı GAS6' nın plazma seviyelerinin arttığı bilinmektedir (Eroglu ve ark. 2014). Preeklamsili olgularda plazmada solubl AXL konsantrasyonunun arttığı, bu artışın sistolik kan basıncını ve proteinüriyi etkiliyor olabileceği öne sürülmüştür (Liu ve ark. 2014). Preeklamsili hasta grubunda aynı zamanda plazma GAS6 konsantrasyonunda da belirgin artış olduğu bilinmektedir (Stepan ve ark. 2013). GAS6 umbilikal kord plazma seviyelerinin IUGR (Intrauterine growth restriction)' li fetüslerde yüksek olduğu gösterilmiştir (Lindqvist ve ark. 2010).

İnflamatuvar çevre, makrofajların yüzeyinde bulunan AXL ekspresyonunu daha da yükseltirken MERTK ekspresyonunu inhibe etmektedir. Progesteron, Dexametazon, hidrokortizon ve aldesteron gibi steroidlerin varlığında MERTK ekspresyonu artmaktadır (Zagorska ve Traves 2014). İmplantasyon döneminde Korpus Luteumdan salgılanan progesteronun, makrofajların yüzeyinde yer alan MERTK ekspresyonunu arttırabileceğini akla getirmektedir. Bu durumda, implantasyon anında, semi allogenik fetusa karşı kararlı durum ve toleransın oluşmasında MERTK ekspresyonunun rolünün bulunup bulunmadığı sorusu önem kazanmaktadır.

Tip1 interferonların aracılığıyla AXL uyarımı Twist ekspresyonunun artmasına ve Twist aracılığıyla da TNF alfa ekspresyonunun inhibisyonuna yol açmaktadır (Zagorska ve Traves 2014). İmplantasyon anında TNF alfa gibi proinflamatuvar sitokinlerin baskılanması, AXL ekspresyonunda ki olası artıştan kaynaklanıyor olabilir mi?

Ligand varlığında apoptotik hücrelerin çevresinde AXL ve MERTK lokalize olurken, ligand yokluğunda lokalizasyon izlenmemektedir. Bu durum ligand varlığında AXL ve MERTK içeren makrofajların apoptotik hücreyi sararak fagositoza başladığını düşündürmektedir. Dexametazon uygulaması apoptotik hücrelerin makrofajlarca fagositozunu arttırmaktadır. Progesteron uygulaması in vitro koşullarda kemik iliği kökenli makrofajlarda MERTK ekspresyonunu upregüle etmiştir. Bu iki durum da, makrofajların yüzeyindeki MERTK ekspresyonunun artışına bağlı olarak apoptotik hücrelerin fagosite edilmesini açıklamaktadır (Zagorska ve Traves 2014).

Mevcut literatür sonuçlarından elde ettiğimiz bilgilere göre idiyopatik gebelik kayıplarında maternal serumda AXL ligandı GAS6' nın seviyesi artmaktadır. Diğer

yandan preeklemtik olgularda periferel kanda solubl AXL ekspresyonunda artış gözlenmesi, muhtemelen AXL reseptörünün GAS6 ligandıyla olan aktivasyonu sonucunda oluşmaktadır. Litaratürde normal gebeliklerde desiduada AXL' ın gen düzeyinde ekspresyonunun varlığı gösterilmiş olmasına rağmen RPL' de TAM reseptörlerinin ekspresyon düzeyleri hakkında bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca fagositik özellikte olan trofoblastlarda ekspresyonunun olup olmadığı da açık değildir. İlk trimesterde TAM reseptörlerinin desiduada bulunan hücrelerde ve koryonik villusta kendi ligandlarına bağımlı olarak aktivitelinde farklılığın olup olmadığı net olarak bilinmemektedir. Bu trimesterde görülen RPL' nin etyolojisinde TAM reseptörlerinin rolü olup olmadığıyla ilgili herhangi bir araştırma sonucu da literatürde bulunamamıştır.

Tüm bu veriler bize; TAM reseptör kinazların URPL' lerde tolerogenik fonksiyondan sorumlu MERTK reseptörü ve ligandı PROS 1' in ekspresyonunun düşmüş, inflamasyonun baskılanmasından sorumlu AXL reseptörü ve ligandı GAS6' nın ekspresyonunun da artmış olacağını düşündürdü. Hipotezimizi test etmek için, URPL hasta desiduası ve koryon villus örneklerinde, TAM reseptör kinazların mRNA ve protein ekspresyon düzeylerini belirlemeyi ve normal gebelik durumu ile karşılaştırmayı amaçladık. Böylece URPL hasta desiduasında ve koryon villusunda TAM reseptör kinazların ve ligandlarının ekspresyon düzeyleri ile ilgili sorularımıza yanıt aradık. Dolayısıyla implantasyonun gerçekleşmesi ve gebeliğin devamlılığında önemli olan inflamatuvar çevrenin düzenlenmesinde, TAM reseptörlerinin rolleriyle ilgili yeni ipuçları elde ettik. Çalışmamızın sonuçları, RPL' nin önlenmesi ve tedavisine yeni bakış açıları ve yaklaşımların oluşturulmasına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin Elde Edilmesi

Örnekler, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran hastaların küretaj materyallerinden elde edildi. Tüm hasta ve gönüllülerden yazılı onam formu alındı. Hem istemli sonlandırılan hem de URPL yaşayan ilk trimester (6-12 hafta) gebeliklerden (her gruptan 6 adet hasta) elde edilmiş desidua ve koryon villus örnekleri toplandı. Kürtaj materyalinde derin kazıma ile interstisyel trofoblastik invazyonunda dahil olduğu bazal plak ve plasental yataktan maternal doku örnekleri elde edildi. Operasyon sonrası örnekler buz üstünde tutularak hızla laboratuvara ulaştırıldı.

Çalışma üç grup şeklinde planlanarak gerçekleştirildi.

Gruplar;

1-URPL grubu (n:5)

2- TP (Terminated Pregnancy) grubu; Herhangi bir spontan gebelik kaybı yaşamamış, istemli sonlandırılmış gebelik grubu (n:6)

3- KE (Kontrol Endometrium) grubu; Sağlıklı bireylerden alınan endometrium biyopsisi grubu (n:6)

3.2. Parametreler:

- TP ve URPL gruplarından elde edilen koryon villus, desidua örneklerinde ve KE grubu örneklerinde AXL, MERTK, TYRO3, GAS6 ve PROS1 proteinlerinin varlığı ve lokalizasyonları, ışık mikroskopi düzeyinde immunohistokimyasal olarak incelenmiştir.
- TP ve URPL gruplardan elde edilen koryon villus ve desidua örnekleri lizatlarında ve KE örnekleri lizatlarında AXL, MERTK, TYRO3, GAS6, PROS1 ve β aktin protein düzeyleri Western Blot analizi ile incelenmiştir.

- TP ve URPL gruplardan elde edilen koryon villus ve desidua örneklerinde ve KE örnekleri lizatlarında *AXL*, *MERTK*, *TYRO3*, *GAS6*, *PROS1* ve *GAPDH* mRNA ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile tespit edilmiştir.

3.3. Dokuların Toplanması ve Rutin Parafin Takibi

Küretaj ve biyopsi materyali 50 µg/ml gentamicin eklenmiş serum fizyolojikle yıkanıp, steriomikroskop altında diseke edilerek koryon villus ve desidua örnekleri ayrıldı. Her iki örneğin ayrı ayrı, ışık mikroskopi için takibi yapılarak bloklandı. Örnekler, %10' luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Çeşme suyunda yapılan yıkamayı takiben (3 saat) dehidratasyon için artan etanol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100' lük etanol) geçirildi. %70, %80 ve %90'lık etanolde birer gün bekletilen örnekler, %100' lük etanolde ise 3 saat tutuldu. Dehidratasyon işleminden sonra, ksilol uygulaması ile dokunun şeffaflaştırılması gerçekleştirildi. Şeffaflaştırma, ksilol I'de 3 dakika, ksilol II'de 3 dakika ve ksilol III'de ise 3 dakika sürelerde gerçekleştirildi. Şeffaflaştırmadan sonra parafinizasyon işlemi yapıldı. Parafin I, parafin II ve parafin III aşamalarında, birer saat 60⁰C'lik etüvde tutulduktan sonra, örnekler fitre edimiş temiz parafin içine uygun oryantasyonda gömüldü. Bloklardan rotari mikrotom kullanılarak 5-7µm kalınlığında seri kesitler elektostatik olarak (+) yükle yüklü lamlara alındı.

3.4. İmmunohistokimyasal Boyanma

Deney gruplarından alınan örneklerin parafin kesitlerinde *AXL*, *MERTK*, *TYRO3*, *PROS 1* ve *GAS6* proteinleri için immunohistokimyasal boyama gerçekleştirildi. Böylece her üç deney grubunun hem desiduasında hem de koryon villusunda bu proteinlerin lokalizasyonları ve ekspresyon seviyeleri değerlendirildi.

Kullanılan Solüsyonlar

- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz Solüsyonu):**
 - 7.2 gr Na₂HP04.12H₂O (Merck)
 - 0.8 gr KH₂P04 (Merck)
 - 16 gr NaCl (Merck)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre distile su içerisinde çözüldü ve 2N NaOH ile pH'sı 7.4 olacak şekilde ayarlandı.

➤ **Sitrat Tamponu**

- 2.1 gr sitrik asit
- 900 ml distile su

900 ml distile suda sitrik asit çözüldükten sonra pH 6'ya ayarlandı.

➤ **%3' lük H₂O₂ Solüsyonu:**

63 ml Metanol (#1.06008.2500; Merck) ve 7 ml %35 H₂O₂ (18312, Sigma Aldrich) eklenerek alüminyum folyoya sarılı şale içerisinde hazırlandı.

- **Bloklama Solüsyonu:** Ultra V Block (#TA-125-UB; Thermo Scientific/LabVision)
- **Antikor Dilüent Solüsyonu:** Antibody Diluent Reagent (003118, Invitrogen Corporation)
- **Streptavidin Peroksidaz Kompleksi:** Horseradish peroxidase Streptavidin (1325114A, Invitrogen Corporation)
- **Kromojen/Substrat:** DAB Kromojen (TA-012-HDC), DAB Substrat (TA-125-HDS)
- **Mayer'in Hematoksileni:** Mayer's Hematoxylin (#1.09249.1000; Merck)
- **Kapatma Solüsyonu:** Entellan (#1.07961.0100; Merck)

1. Preperatlar, 60⁰C' lik etüvde 1 saat bekletilerek kesitteki dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde yayılması ve yapışması sağlandı.
2. Daha sonra, preperatlar 10' ar dakika ksilol I ve ksilol II aşamalarından geçirildi.
3. Preperatlar, azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70 etanolde) 1x5 dakika bekletildi. Son olarak preperatlar, 5 dakika distile suda bırakıldı.
4. Antijenik bölgelerin açılması için, preperatlar 0.01 M sitrat tamponu içinde 665 watt'a ayarlı mikrodalgada 2x8 dakika kaynatıldı.
5. Preperatlar, soğuması için sitrat tamponu içinde 25 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

6. Süre sonunda, preparattaki kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizilip, distile suya alındı ve 2x10 dakika bekletildi.
7. Daha sonra preparatlar, metanol içinde hazırlanan %3' lük H₂O₂ içinde 25 dakika oda ısısında bekletilerek, endojen peroksidaz aktivitesi bloklandı.
8. Bloklama sonrasında preparatlar, 1X PBS içinde 2x5 dakika yıkandı.
9. Yıkama sonrası, preparatlar sekonder antikorun özgül olmayan bağlanmalarını önlemek için UV bloklama solusyonunda 5 dakika inkübe edildi.
10. Bloklama sonrası preparatlar, yıkama yapılmadan üzerindeki UV bloklama solusyonu dökülüp, primer antikorlar (Tablo 3.1) mikropipetle kesitlerin üzerine damlatıldı. Rabbit anti-AXL poliklonal, rabbit anti-MERTK poliklonal, rabbit anti-TYRO3 poliklonal, rabbit anti-GAS6 poliklonal ve rabbit anti-PROS 1 poliklonal primer antikorları Tablo-3.1'de belirtilen dilüsyonlarda UV block içinde hazırlandı. Primer antikor damlatılan preparatlar, gece boyu +4°C de inkübe edildi. Her immunohistokimya boyamasında kesitlerden birisi negatif kontrol için kullanıldı. Bu nedenle kesit üzerine, primer antikor yerine 1X PBS damlatıldı. Çalışmada kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları Tablo-1'de gösterilmiştir.
11. Süre sonunda, preparatların üzerindeki primer antikor damlaları dökülerek, 1X PBS'de 2x10 dakika yıkandı. Daha sonra kesitlerin üzerine sekonder antikordan üretici firmanın önerdiği dilüsyon oranında 1X PBS' te hazırlanıp damlatıldı ve preparatlar oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
12. Preparatlar, sekonder antikor aşamasından sonra 1X PBS içinde 2x15 dakika yıkandı.
13. Preparatlar streptoavidin solusyonunda 20 dakika oda ısısında bekletildi.
14. 1X PBS içinde 2x15 dakika yıkandı.
15. Yıkama sonrasında kesitlerin üzerine DAB (diaminobenzidine) damlatıldı ve reaksiyon gelişimi ışık mikroskopunda kontrol edildi. Reaksiyon gelişimi yeterli düzeye ulaştığında, preparatlar 1X PBS içine alınarak reaksiyon durduruldu.
16. Son olarak preparatlar, artan alkol serilerinde dehidrate edildi ve ksilolden geçirildikten sonra entellan kullanılarak lamelle kapatıldı. Kapatılan preparatlar ışık mikroskopunda incelenerek analiz edildi. Analiz sonucunda; Desidua

hücrelerinde ve koryon villusta, AXL, MERTK, TYRO3, GAS6 ve PROS 1 proteinlerinin lokalizasyonları ve ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Tablo 3.1. İmmunohistokimyasal analizlerde kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları.

Primer Antikor	Katalog Numarası	Dilüsyon	Sekonder Antikor
AXL	Cell Signalling C89E7	1:100	# BA- 1000 Vector Laboratories
MERTK	Abcam-ab52968	1:500	# BA- 1000 Vector Laboratories
TYRO3	Abcam-ab79778	1:500	# BA- 1000 Vector Laboratories
GAS6	Abcam-ab136249	1:50	# BA- 1000 Vector Laboratories
PROS1	Thermo-PA5-22022	1:40	# BA- 1000 Vector Laboratories
CD68	Thermo-MA1-80133	1:40	# BA- 9200 Vector Laboratories
CD11c	Thermo- MA1-46052	1:40	# BA- 9200 Vector Laboratories
CD90	Thermo- MA1-81930	1:40	# BA- 9200 Vector Laboratories
CK7	Dako- Code IS619	Direkt kullanım	# BA- 9200 Vector Laboratories

3.5. Western- Blot Analizi

Deney gruplarına ait desidua ve koryon villus örneklerinde AXL, MERTK, TYRO3, GAS6, PROS 1 proteinlerinin semi kantitatif değerlendirilmesi için Western-Blot analizi yapılmıştır.

Kullanılan Solüsyonlar

➤ **Lizis tampon solüsyonu:**

0,1M Tris: 0,6 gr Tris (#1.08387.0500; Merck) 40 ml bidistile suda çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Son hacim bidistile su ile 50 ml' ye tamamlandı.

Sodyum-ortoovanadate: 0.184 gr Na-orthoovanadate (#L4390; Sigma Aldrich), 10 ml Tris (pH 10) (0.1M tris: 0.6gr/50ml) ile ateş üzerinde çözüldü.

Lizis tamponunu hazırlamak için ise 10 ml 0.1M Tris (pH 7.4), 90 ml bidistile su, 1 ml Na-orthoovanadate karıştırıldı. Hazırlanan solüsyona 1 gr SDS (Katalog No: #161-0302, BIO-RAD) eklendi ve lizis tamponu elde edildi.

➤ **Proteaz inhibitör kokteyli** (#P8340; Sigma Aldrich)

➤ **%30 akrilamid-bisakrilamid solüsyonu:** 15,4gr 37.5:1 oranındaki akrilamid-bisakrilamid ACRYL/BIS 37.5:1, #1052C146, Amresco) 40 ml bidistile su içerisinde çözüldü.

➤ **4Xtris-HCL/SDS, pH 8.8:** 18.15 gr Tris, 40 ml bidistile su içerisinde çözüldü pH 8.8'e ayarlandı. Ardından bidistile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Son olarak 0.4 gr SDS eklendi.

➤ **4Xtris-HCl/SDS, pH 6.8:** 6.05 gr Tris, 40 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 6.8'e ayarlandı. Ardından bidistile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Son olarak 0.4 gr SDS eklendi.

➤ **%10'luk Amonyum-persülfat (APS):** 0,1 gr toz APS (#7727-54; Amresco) , 1 ml distile su içerisinde çözüldü.

➤ **N,N,N''',N'''-Tetramethylethylenediamine (TEMED)** (#BCBH1254V; Sigma Aldrich)

➤ **Ayrıştırıcı (Seperating) Jel:**

Ayrıştırıcı (Seperating) Jel

%7,5'lik Tris-HCl Jel

%30 Akrilamid-bisakrilamid 3,75 ml

4X Tris-HCl/SDS, pH 8.8 3,75 ml

Distile su 7,5 ml

Yukarıda verilen solüsyonlar 15 ml' lik Falcon tüpünde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyon sağlayacak olan; 0,05 ml %10'luk Amonyum-persülfat (APS) ve 0,01 ml TEMED solüsyonları eklendi. Birkaç kez pipetaj yapıldıktan sonra jel karışımı 2 cam plaka arasına döküldü. Yaklaşık 45 dakika oda ısısında donmaya bırakıldı.

➤ **Toplayıcı (Stacking) Jel:**

650 µl %30 akrilamid-bisakrilamid

1250 µl 4Xtris-HCl/SDS, pH 6.8

3050 µl bidistile su

Yukarıda verilen solüsyonlar 15 ml' lik Falcon tüpünde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyon sağlayacak olan;

25 µl %10' luk Amonyum-persülfat (APS)

5 µl TEMED

solüsyonları eklendi. Birkaç kez pipetaj yapıldı ve jel karışımı 2 cam plaka arasına döküldü. Ardından uygun genişlikteki tarak jel içerisine yerleştirildi.

5X Elektroforez yürütme solüsyonu:

9 gr Tris

43.2 gr Glisin (#5.00190.1000; Merck)

3gr SDS (#161-0301; BioRad)

600 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 8.3-8.6'da olacak şekilde ayarlandı.

1X Elektroforez yürütme solüsyonu: 5X stok solüsyondan 140 ml alındı ve 560 ml distile su ile 700 ml'ye tamamlandı.

- **Transfer Tampon Solüsyonu (Blotting Buffer):**
- 3 gr Tris
- 14.3 gr Glisin

800 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 7.8-8 arasında olacak şekilde ayarlandı. Solüsyona daha sonra 200 ml metanol (#1.06008.2500; Merck) eklendi. +4 °C'de soğutularak kullanıldı.

- **10 X Tris Tamponlu Tuz (Tris Buffered Saline-TBS) Solüsyonu:**
- 60.55 gr Tris
- 87.66 gr NaCl (#1.06404.1000; Merck)

800 ml distile suda çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

1X Tris Tamponlu (Tris Buffered Saline)-Tween 20 (TBS-T) Solüsyonu:

100 ml 10X TBS solüsyonuna 900 ml distile su eklenerek 1X TBS hazırlandı. Daha sonra 1 litre 1X TBS'e 1 ml Tween 20 (#8.22184.0500; Merck) eklenerek TBS-T çalışma solüsyonu hazırlandı.

- **Bloklama Solüsyonu:** %5' lik süt tozu: 5 gr. süt tozu (#170-6404; BioRad) 100 ml TBS-T içerisinde çözülerek hazırlandı.
- **Chemiluminescent solüsyonu:** (#34080 ; Thermo Scientific)

Luminol/geliştirici solüsyon ve sabitleme solüsyonu 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

- **Membran Soyma (Stripping) Solüsyonu** (#46430; Thermo Scientific)
- **Geliştirme (Developer) Solüsyonu:** 100 ml geliştirme solüsyonuna (#175 7314; Liford), 900 ml distile su eklenerek hazırlandı.
- **Sabitleme (Fiksatif) Solüsyonu:** 50 ml sabitleme solüsyonuna (#1984565; Liford) 450 ml distile su eklenerek hazırlandı.

3.5.1. Lizat Hazırlama

Total örnekten, 0.2 gr dokuya 600µl lysis buffer ve 10µl proteaz inhibitör kokteyli olacak şekilde inkübe edilerek sonikatör yardımı ile homojenize edildi. Tüm örneklerden, 15000 g'de, +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları – 20°C' de saklanmak üzere, protein lizatları hazırlandı. Dokuların içerdiği protein miktarları Pierce Modified Lowry Protein assay kit (Cat No: 23240) kullanılarak tespit edildi.

3.5.2. SDS-PAGE Western Blot Protokol

Protein miktarları distile su, örnek ve laemmli buffer (Sample Buffer 2X, Laemmli electrophoresis Reagent, Sigma, Katalog No: S-3401) oranları ile eşitlenen örnekler 5 dakika 95 °C' de kaynatıldı. Çalışılacak olan proteinlerin ve internal kontrol olarak kullanılan Beta aktin proteininin kilo dalton ağırlıkları dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Tüm antikolar için %7,5' lik poliakrilamid jel hazırlandı. Her kuyucuğa 20 µl örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde konulup Protean Tetra Cell, Mini Trans Blot Modül (# 165-8033; Biorad) tankının içine yerleştirildi. Mini Protean Sistem III tankına elektroforez solüsyonu eklenerek, tank güç kaynağına bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 100 Volt, 50 miliamperde 80-100 dakika elektroforez edildi.

Proteinler jelde yürürken, Nitrosellüloz membran üstte ve altta 3' er adet filtre kağıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. Nitrosellüloz membran üzerine proteinleri içeren jel konularak hazırlanan sandviç Mini protean III sistemindeki tank blot içerisine alındı. Mini protean III tankına transfer solüsyonu eklendi ve +4 °C' de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlandı. Proteinlerin Nitrosellüloz membranına transferinden sonra elde edilen membran, Tris tuz solüsyonu (TBS) ile hazırlanan % 5' lik yağsız kuru süt tozu (PROS1, B-ACTIN için) ve BSA (AXL, MERTK, TYRO3, GAS6 için) ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Bloklama solüsyonuna ayrıca % 0.1 Tween-20 ilave edildi. Membran, primer antikor (rabbit poliklonal anti MERTK, AXL, TYRO3, PROS 1, GAS6) kullanılarak +4 °C'de gece boyu β-actin ise 1,5 saat oda ısısında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi (Tablo-2). İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 30 dakika boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenecek yıkama

yapıldı. Membran, primer antikor için uygun olan ve bloklama solüsyonu ile sulandırılmış horseradish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 30 dakika boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi ile 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında karanlık oda içerisinde membranlardaki sinyaller hiperfilme aktarıldı. Film geliştirici ve tespitten geçirilip distile su ile yıkanarak kurutuldu.

Böylece, desidua, koryon villus ve endometriyum örneklerinde *MERTK*, *AXL*, *TYRO3*, *PROS 1*, *GAS6* ve β -*ACTIN* protein ekspresyonları belirlenmiş ve semi kantitatif olarak protein seviyeleri karşılaştırılmıştır.

Tablo 3.2. Western blot deneyinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Primer Antikor	Katalog No	Dilüsyon	Sekonder Antikor
AXL	Cell Signalling C89E7	1:1000 (%5'lik BSA ile hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
MERTK	Abcam-ab52968	1:500 (TBS-T'de hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
TYRO3	Abcam-ab79778	1:1000 (TBS-T'de hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
GAS6	Abcam-ab136249	1:500 (TBS-T'de hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
PROS1	Thermo-PA5-22022	1:500 (TBS-T'de hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
BETA ACTIN	#4970 Cell Signaling Technology	1:1000 (%5'lik süt tozu ile hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories

3.6. Kantitatif Real-Time RT-PCR

Kantitatif real-time PCR, oluşturulan üç deney grubunda *AXL*, *MERTK*, *TYRO3*, *GAS6*, *PROS1* ve *GAPDH* gen ekspresyonu mRNA düzeyinde miktarsal olarak değerlendirmek

amacıyla kullanılmıştır. mRNA izolasyonu, izole edilen mRNA' lardan Reverse Transkripsiyon ile cDNA eldesi ve elde edilen cDNA örnekleri ile real-time PCR yapılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Total RNA İzolasyon Basamakları

Gruplardan alınan desidua ve koryon villus örneklerinden RNA izolasyonu RNAqueous-Micro (Micro Scale RNA Isolation Kit) kiti ile gerçekleştirildi.

1. Örnekler steril 0.5 ml tüpler içine konulacak ve üzerine 100 µl lizis solüsyonu konulup +4 °C'de kitte belirtilen sürede tutuldu.
2. Üzerine 50 µl etanol konulup vorteksle karıştırıldı.
3. Lizat + etanol karışımı belirli bir por çapına sahip micro filtreden 20 saniye 12000 rpm'de döndürülerek geçirildi. Böylece karışımdaki RNA' nın tamamının filtreden geçmesi sağlandı.
4. Daha önceden oda ısısına getirilmiş 180 µl yıkama solüsyonu ile filtre, 20 saniye 12000 rpm' de döndürülerek yıkandı. Prosedürün bu basamağı 2 kez tekrar edilmiştir.
5. Ardından 13000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
6. Mikro filtreye sahip tüp mikro ayırma ya da yıkama tüpüne aktarıldı. +4 °C' de saklanan ve kullanım öncesi 75 °C' de önceden ısıtılan ayırma solüsyonundan 5 µl filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konularak kapağı kapatılıp oda ısısında 1 dakika bekletildikten sonra RNA'nın filtreden uzaklaşması için 13000 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi.
7. Aynı işlem 5 µl ayırma solüsyonu ile bir kez daha gerçekleştirilerek, RNA' ların mikro ayırma tüpüne toplanması sağlandı.
8. Mikro ayırma tüpündeki karışımın hacminin %10' u kadar 10X DNaz I tamponu ve 10X DNaz I konulup 15 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

9. Tüpteki hacmin %10' u kadar 10X DNaz inaktivasyon solüsyonu konulup, iyice karıştırılıp oda ısısında 2 dk bekletildi.
10. 13000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilip DNA inaktivasyon solüsyonunun uzaklaşması sağlanarak izole edilen RNA yeni bir tüpe konuldu.
11. İzole edilen RNA -80 °C saklandı.

3.6.2. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

cDNA eldesi aşağıda belirtilen basamaklarla gerçekleştirilmiştir;

1. Her bir tüp için hazırlanan temel karışım Tablo-3' de belirtilmiştir. Her tüpe koyulan temel karışımın aynı içerik ve homojenitede olmasını sağlamak açısından örnek sayısına göre ana bir karışım hazırlanıp tüplere bu karışımdan belli bir miktar aktarıldı.

Tablo 3.3. cDNA reaksiyon içeriği

Reaktantlar	Hacim	Final konsantrasyon
10x Tampon RT	2.0 µl	1x
dNTP (her bir dNTP 2.5 mM'dır.)	4.0 µl	0.5 mM/ her bir dNTP
RNaz inhibitör (10 unit/µl)	1.0 µl	10 unit/ 20 µl reaksiyon karışımında
MMLV-revers transkriptaz	1.0 µl	100 unit/ 20 µl reaksiyon karışımında
Toplam	8.0 µl	

2. 0.2 µl' lik reaksiyon tüplerine izole edilmiş olan RNA' dan 10 µl konuldu. Ayrıca her bir tüpe 2 µl oligo-dT (50 µM, final konsantrasyon 5 µM olur) eklendi.
3. Her bir tüpe 8 µl temel karışımdan konulup, karıştırılarak kısa süre döndürüldü.
4. Reaksiyon tüpleri, 42 °C' de 60 dakika inkübe edildi.

5. Daha sonra, 92°C’ de 10 dakika inkübasyon işlemi sonunda elde edilen cDNA’ lar, -20 °C’ de QPCR aşamasına kadar saklandı.

3.6.3. Kantitatif Real Time Q-PCR Uygulama Basamakları

Görelî ve kesin mRNA miktarını belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir yöntem olan kantitatif real time Q-PCR tekniği, gen ekspresyonu çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu teknikle, her hücrede belirli düzeyde eksprese olduğu bilinen house-keeping genin ekspresyonu temel alınarak gruplar arasında değerlendirilen RNA miktarları ve bu gruplardaki *AXL*, *MERTK*, *TYRO3*, *GAS6* ve *PROS1* gen ekspresyon düzeyi karşılaştırılmıştır. Uygulanan kantitatif real-time PCR uygulama basamakları aşağıda belirtilmiştir.

1. Yukarıda belirtildiği gibi RNA izolasyonu ve cDNA eldesi gerçekteştirildi.
2. Tablo-4’ de belirtilen reaktantlar konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Tablo 3.4. Q-PCR için reaksiyon karışımı.

Reaktantlar	Miktarları
2XIQ SbrGreen Supermix	12.5 µl
Primer 1 (Çizelge5)	10 pmol olacak miktarda
Primer 2 (Çizelge5)	10 pmol olacak miktarda
Distile su	25 µl’ye tamamlanacak

Amplifikasyon, 30 siklusta gerçekteştirilmiştir. Başlangıç denatürasyonu; 95 °C’de 5 dakika 30 siklus, 92 °C’ de 30 saniye, 65 °C’ de 20 saniye, 72 °C’ de 1 dakika şeklinde uygulandı. Örnekler analiz sonucunda, oluşturduğumuz standartın aralığında ve referans DNA ile kantitatif real-time PCR aletinde okunmuş ve software programı yardımıyla belirlenmiştir. Ortaya çıkan eşik değerü siklusunda ve diğer sikluslarda *AXL*, *MERTK*, *TYRO3*, *GAS6*, *PROS1* ve *GAPDH* gen ekspresyon düzeyi miktarsal olarak belirlenmiştir. Sonuçlar $2[-\Delta\Delta C(T)]$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Bu yöntemde; her bir örnek için ayrı ayrı olarak, test edilen genin Ct

değeri ile endojen kontrol olarak kullanılan rRNA'nın verdiği Ct değerleri birbirinden çıkarılarak ΔCt değerleri belirlenmiş. ΔCt ' den Relative quantification ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) değeri hesaplanarak deney grubunun kontrolü olan gruba göre kat artışı belirlenmiştir.

Tablo 3.5. QPCR' da kullanılan primerler

<i>AXL</i> Forward Primer	5 -GGTGGCTGTGAAGACGATGA-3
<i>AXL</i> Reverse Primer	5 -CTCAGATACTCCATGCCACT-3
<i>MERTK</i> Forward Primer	5'-CCCCCTCCGTGCTAACTGTT-3'
<i>MERTK</i> Reverse Primer	5'-TGTGGGCCTCACAACCTGAAG-3'
<i>TYRO3</i> Forward Primer	5'-CCTGGCCGACAACCTGTAT-3'
<i>TYRO3</i> Reverse Primer	5'-TCCATTCGCAGACAAGTAAAGC-3'
<i>GAS6</i> Forward Primer	5'-CCTTCCATGAGAAGGACCTCGT-3'
<i>GAS6</i> Reverse Primer	5'- GAAGCACTGCATCCTCGTGTTTC-3'
<i>PROS1</i> Forward Primer	5'-GGCTCCTACTATCCTGGTTCTG-3'
<i>PROS1</i> Reverse Primer	5'-CAAGGCAAGCATAACACCAGTGC-3'
<i>GAPDH</i> Forward Primer	5' -GTCTTCACCACCATGGAGAA- 3'
<i>GAPDH</i> Reverse Primer	5 -ATCCACAGTCTTCTGGGTGG-3

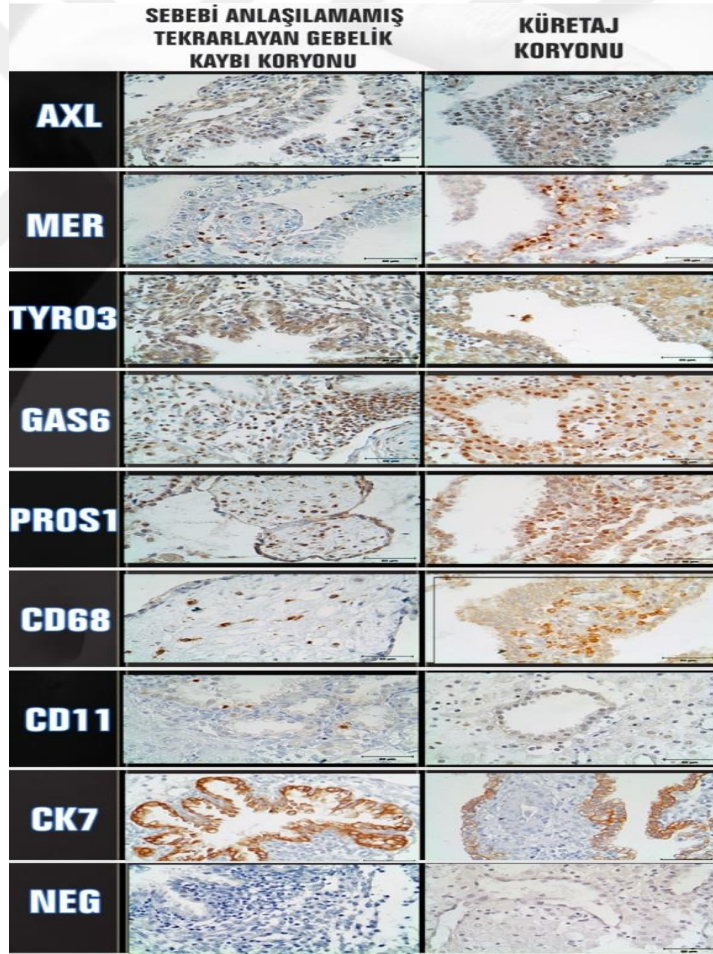
3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Western blot analizleri sonucunda elde edilen bulguların analizleri Image J programı kullanılarak ölçüldü. Bu sonuçlardan elde edilen veriler ve qRT-PCR analizleri sonucunda her bir örnek için ayrı ayrı test edilen genin ΔCt değerlerinin istatistiksel hesaplamaları Windows için Sigma Stat sürüm 3.5 (Jandel Scientific Corp. San Rafael, CA) kullanılarak One Way ANOVA testi ile değerlendirildi. $P < 0.05$; istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

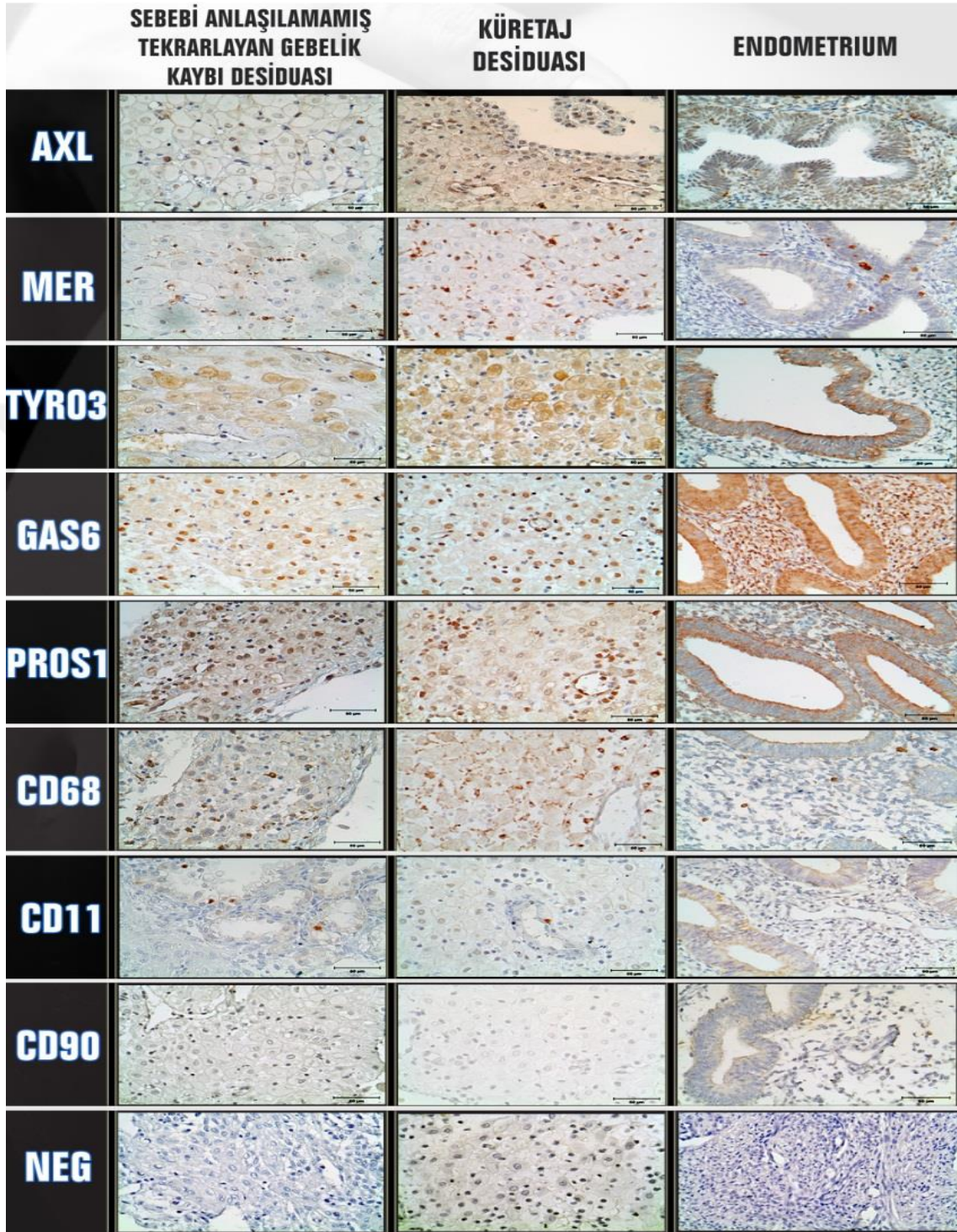
4. BULGULAR

Bu çalışmada İlk trimesterde URPL yaşamış ve istemli sonlandırılmış ilk trimester gebeliklerinin desidua ve koryon örneklerinde ve sağlıklı endometrium örneklerinde TAM reseptör kinaz reseptör ve ligandlarının gen ve protein ekspresyon düzeyleri aynı zamanda protein lokalizasyonlarının belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bunun için, vakalardan onamları alınarak elde edilen örnek dokularda immünohistokimya, Western blot ve qRT-PCR teknikleri uygulanmıştır.

4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular



Şekil 4.1. TP ve URPL grubu koryon örneklerinde AXL, MERTK, TYRO3, GAS6, PROS1, CD68, CD11c, CD90, CK7 proteinlerinin immünoreaktivitesi.



Şekil 4.2. TP ve URPL gruplarının desiduası ve Kontrol Endometriumda (KE) AXL, MERTK, TYRO3, GAS6, PROS1, CD68, CD11c, CD90, CK7 proteinlerinin immunorektivitesi.

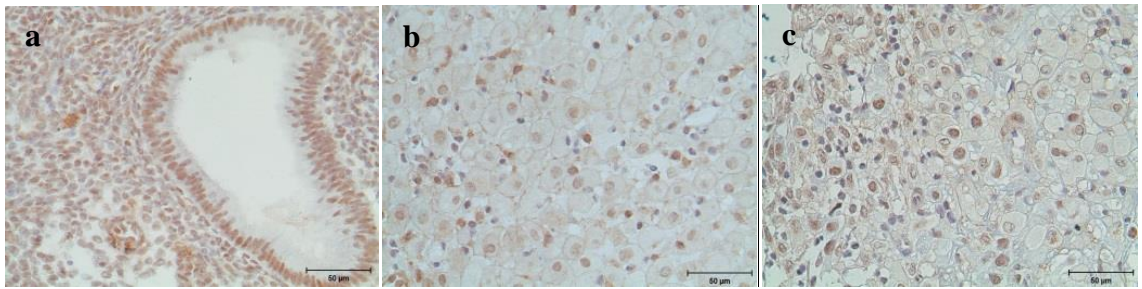
KE grubunda, bez epitelinde ve stromal hücrelerde AXL ekspresyonu yoğun olarak nükleer boyanma gösterdi. (Şekil 4.3) Bez epitelinin bazalinde nadir birkaç hücrede sitoplazmik boyanma göstermekteydi (Şekil 4.21a).

TP grubunda maternal alanda, desidua hücreleri AXL proteinini yoğun olarak nükleer ve membranöz, çok zayıf olarak da sitoplazmada eksprese etmekteydi (Şekil 4.3.). Desidua hücrelerinin arasında küçük çaplı bazı hücrelerin sitoplazmik ve nükleer olarak yoğun AXL ekspresyonuna sahip olduğu gözlemlendi. Desidua hücrelerinin aralarında bulunan damar endotel hücrelerinde de nükleer olarak AXL ekspresyonu görüldü (Şekil 4.23a).

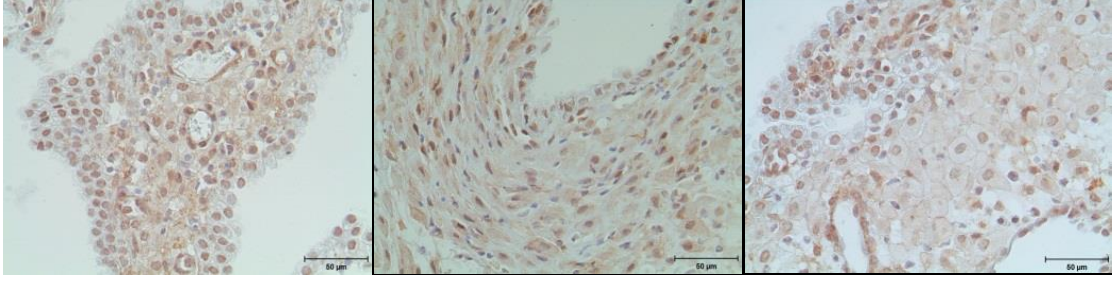
TP grubunda fetal alanda, trofoblast hücreleri AXL proteinini nükleer olarak eksprese etmekteydiler (Şekil 4.4, 4.23a). Trofoblast hücreleri komşuluğunda bir alt tabakada bulunan makrofaj olduğu düşünülen hücrelerin nükleuslarında da yoğun AXL ekspresyonu görülmekteydi (Şekil 4.25a). Bununla birlikte koryonik stromal hücrelerde oldukça yoğun nükleer ve zayıf sitoplazmik AXL boyanması dikkat çekmekteydi (Şekil 4.24a).

URPL grubunda maternal alanda, desidua hücreleri AXL proteinini kuvvetli olarak nükleer, zayıf olarak membranöz ve sitoplazmik bölgelerde eksprese etmekteydi (Şekil 4.3). Desidua hücrelerinin arasında küçük çaplı bazı hücrelerin AXL'yı yoğun nükleer olarak eksprese ettiği gözlemlendi (Şekil 4.26a, 4.27a).

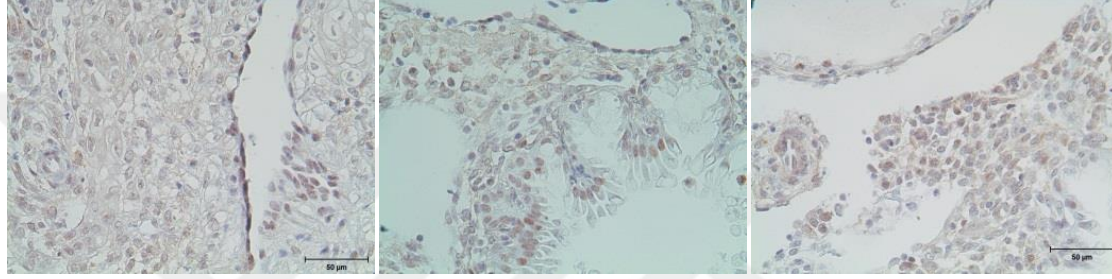
URPL grubunda fetal alanda, trofoblast hücreleri AXL proteinini nükleer olarak eksprese etmekteydiler. Bununla birlikte desiduya doğru göç eden ve maternal vasküler endotele giren ekstravillöz trofoblast hücreleri olabileceğini düşündüğümüz hücrelerin nükleuslarında oldukça yoğun boyanma dikkat çekiciydi (Şekil 4.5, 4.28a, 4.29a).



Şekil 4.3. KE (a), TP (b) ve URPL desiduasında (c) AXL immunoreaktivitesi.



Şekil 4.4. TP grubu koryon örneklerinde AXL immunoreaktivitesi.



Şekil 4.5. URPL grubu koryon örneklerinde AXL immunoreaktivitesi.

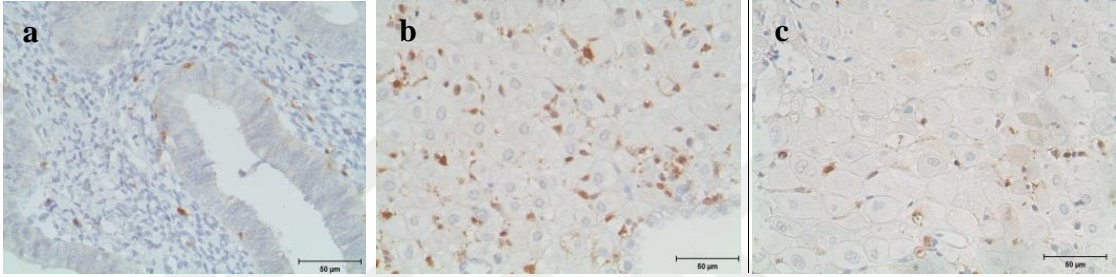
KE grubunda, MERTK ekspresyonu bez epiteli ve stromal hücrelerde izlenmedi. Stromal hücrelerin arasında ve epitel hücre tabakasının bazalinde bulunan bazı hücrelerde nükleer, yer yer hem nükleer hem sitoplazmik boyanmalar olduğu belirlendi (Şekil 4.6, 4.21b).

TP grubunda maternal alanda, desidua hücreleri MERTK proteinini eksprese etmemekteydi. Desidua hücrelerinin arasında küçük çaplı hücrelerin MERTK’i sitoplazmik ve nükleer olarak yoğun bir şekilde eksprese ettiği gözlemlendi (Şekil 4.6, 4.22b, 4.23b).

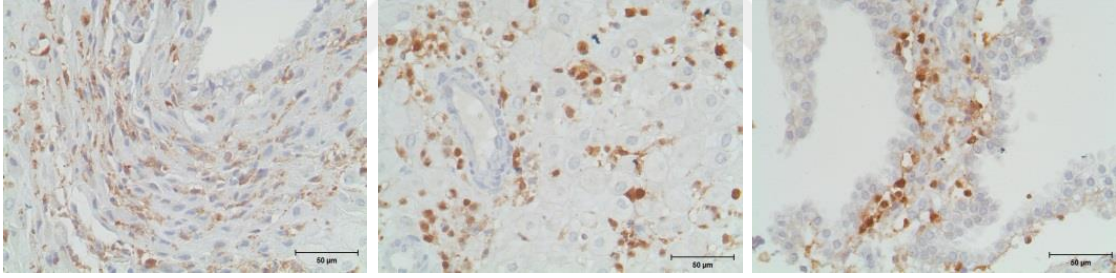
TP grubunda fetal alanda, trofoblast hücreleri MERTK proteinini ekspresyonu göstermedi. Trofoblast hücreleri komşuluğunda, immünfloresan boyanma sonuçlarımıza istinaden dendritik hücre olabileceğini öngördüğümüz küçük hücrelerin nükleus ve sitoplazmasında da yoğun MERTK ekspresyonu dikkat çekti. Buna karşın, desiduya doğru göç eden ve maternal vasküler endotele giren EVT hücreleri olduğunu düşündüğümüz hücre gruplarında hiç bir lokasyonda MERTK boyanması görülmemekteydi (Şekil 4.7, 4.25b).

URPL grubunda maternal alanda desidua hücrelerinin arasında küçük çaplı hücrelerin yoğun nükleer zayıf sitoplazmik MERTK ekspresyonuna karşın desidua hücreleri MERTK proteinini eksprese etmemekteydi (Şekil 4.6, 4.26b).

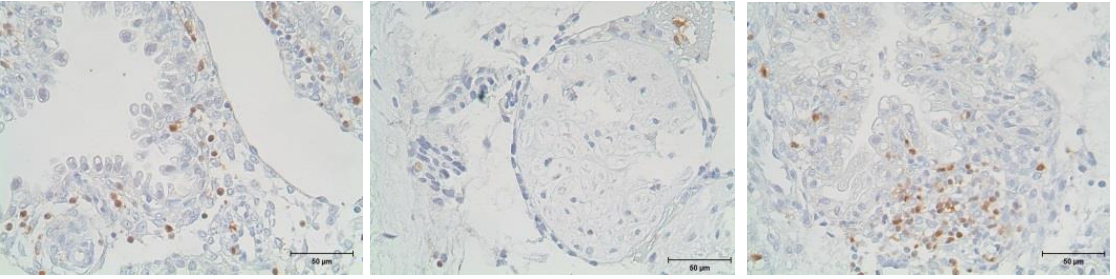
URPL grubunda fetal alanda, trofoblast hücrelerinin MERTK protein ekspresyonu yoktu. Aynı şekilde desiduaya doğru göç eden ve maternal vasküler endotel arasına giren EVT hücrelerinde de hiç bir lokasyonda boyanma izlenmedi (Şekil 4.8).



Şekil 4.6. KE grubu (a), TP grubu (b) ve URPL grubu desidua örneklerinde (c) MERTK immunoreaktivitesi.



Şekil 4.7. TP grubu koryon örneklerinde MERTK immunoreaktivitesi.



Şekil 4.8. URPL grubu koryonunda MERTK immunoreaktivitesi.

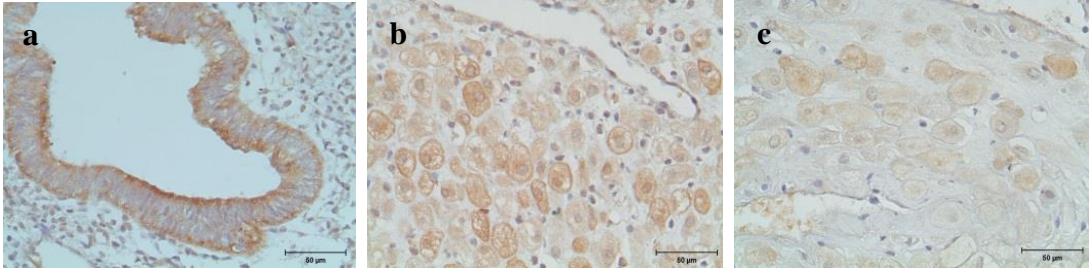
KE grubunda, TYRO3 ekspresyonu bez epitelinde membranöz, stromal hücrelerde nükleer olarak izlendi (Şekil 4.9).

TP grubunda maternal alanda, desidua hücreleri TYRO3 proteinini hem membranöz hem de sitoplazmik olarak eksprese ederken, nükleer ekspresyonun oldukça zayıf olduğu görüldü. (Şekil 4.9, 4.21c, 4.23c).

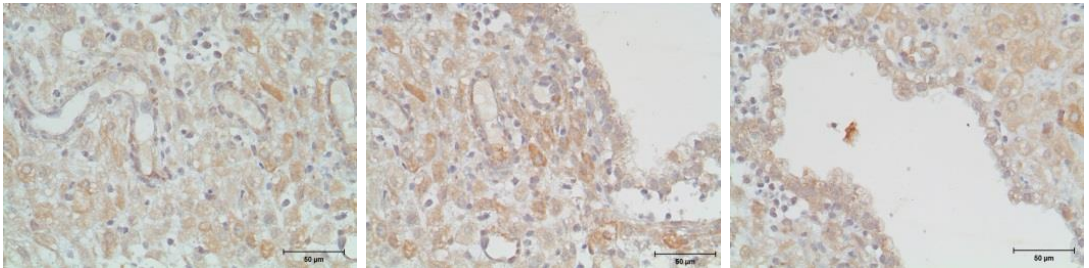
TP grubunda fetal alanda, trofoblast hücreleri TYRO3 proteinini sitoplazmik ve membranöz eksprese etmekteydi. Desiduaya doğru göç eden EVT hücrelerinde oldukça yoğun nükleer ve sitoplazmik boyanma izlendi. Maternal vasküler endotele giren EVT olduğunu düşündüğümüz hücrelerde sadece nükleer boyanma dikkat çekmekteydi (Şekil 4.10).

URPL grubunda maternal alanda, desidua hücreleri sitoplazmik ve membranöz olarak zayıf TYRO3 proteinini eksprese etmekteydi (Şekil 4.9, 4.26c).

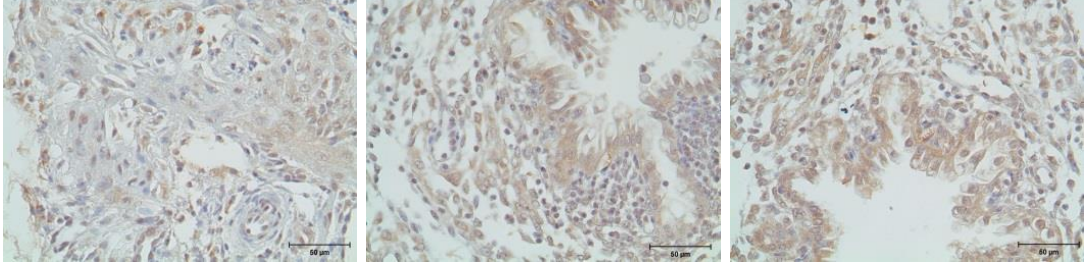
URPL grubunda fetal alanda, trofoblast hücreleri membranöz, sitoplazmik, ve nükleer olarak güçlü TYRO3 protein ekspresyonu gösterdi (Şekil 4.11). Bununla birlikte villus stromasında bulunan makrofaj hücrelerinde sitoplazmik boyanma dikkat çekmekteydi (Şekil 4.28c, 4.29c).



Şekil 4.9. KE grubu (a), TP grubu (b) ve URPL grubu (c) desidua örneklerinde TYRO3 immunoreaktivitesi.



Şekil 4.10. TP grubu koryon örneklerinde TYRO3 immunoreaktivitesi.



Şekil 4.11. URPL grubu koryon örneklerinde TYRO3 immunoreaktivitesi.

KE grubunda, TAM Reseptör Kinaz'ların ligandlarından olan GAS6 bez epitelinde yoğun olarak membranöz, sitoplazmik ve nükleer boyanma izlendi. Stromal alanda yer yer nükleer ve sitoplazmik boyanma gösteren hücreler izlendi (Şekil 4.12).

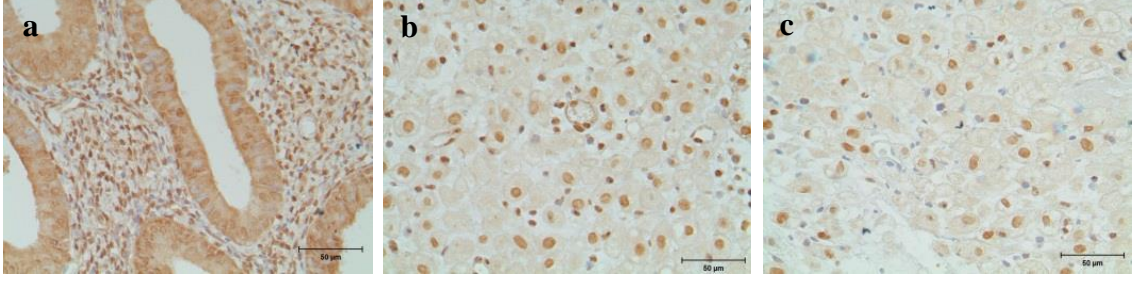
TP grubunda maternal alanda, desidua hücreleri GAS6 proteinini yoğun olarak nükleer, çok zayıf olarak da sitoplazmada eksprese etmekteydi. Desidua hücrelerinin arasında dağılmış küçük çaplı hücrelerin GAS6'ı daha yoğun bir şekilde nükleer olarak eksprese ettiği gözlemlendi (Şekil 4.12, 4.22d, 4.23d).

TP grubunda fetal alanda, trofoblast hücreleri GAS6 proteinini şiddetli nükleer ve zayıf sitoplazmik eksprese etmekteydi. Bununla birlikte endotelin bazalinde EVT olduğunu düşündüğümüz hücrelerde oldukça yoğun nükleer boyanma dikkat çekiciydi. (Şekil 4.13).

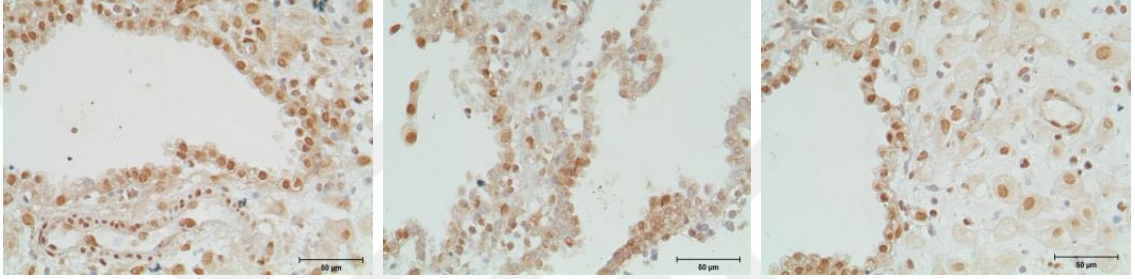
URPL grubunda maternal alanda, desidua hücreleri GAS6 proteinini yoğun bir şekilde nükleer, zayıf düzeyde sitoplazmik bölgelerde eksprese etmekteydi. Desidua hücrelerinin arasında bulunan küçük çaplı hücrelerde ise GAS6 ekspresyonu gözlenmedi (Şekil 4.12).

URPL grubunda fetal alanda, desidua hücreleri GAS6 proteinini yoğun bir şekilde nükleer olarak eksprese etmekteydi (Şekil 4.14, 4.29d).

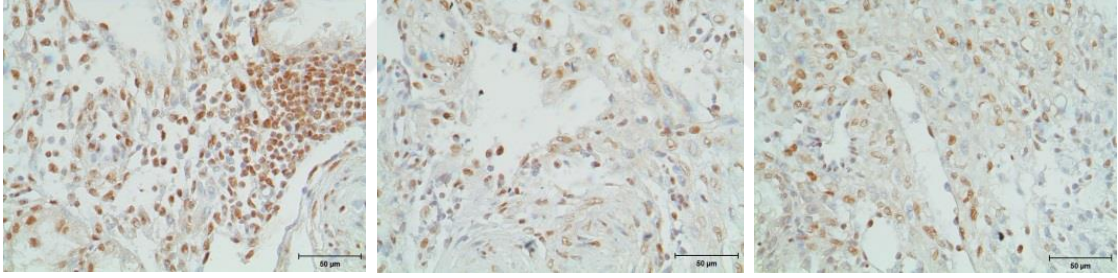
KE grubunda, TAM reseptör kinazların ligandlarından olan PROS1 de TYRO3 ile aynı lokalizasyonlarda bez epitelinde yoğun olarak membranöz, stromal hücrelerde ise yoğun olarak nükleer boyanma göstermekteydi (Şekil 4.15).



Şekil 4.12. KE grubu (a), TP grubu (b) ve URPL grubu (c) desidua örneklerinde GAS6 immunoreaktivitesi.



Şekil 4.13. TP grubu koryon örneklerinde GAS6 immunoreaktivitesi.



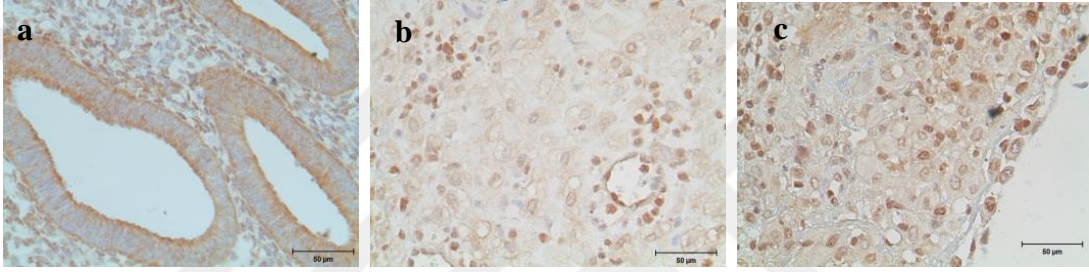
Şekil 4.14. URPL grubu koryon örneklerinde GAS6 immunoreaktivitesi.

TP grubunda maternal alanda, desidua hücreleri PROS1 proteinini membranöz ve sitoplazmik olarak çok çok zayıf düzeyde eksprese etmekteydi. Desidua hücrelerinin arasında gruplar halinde bulunan küçük çaplı hücrelerin PROS1'i yoğun olarak nükleer ve sitoplazmik olarak eksprese ettiği gözlemlendi. Desidua hücrelerinin aralarında bulunan damar endotel hücrelerinde de nükleer olarak PROS1 ekspresyonu görüldü (Şekil 4.15).

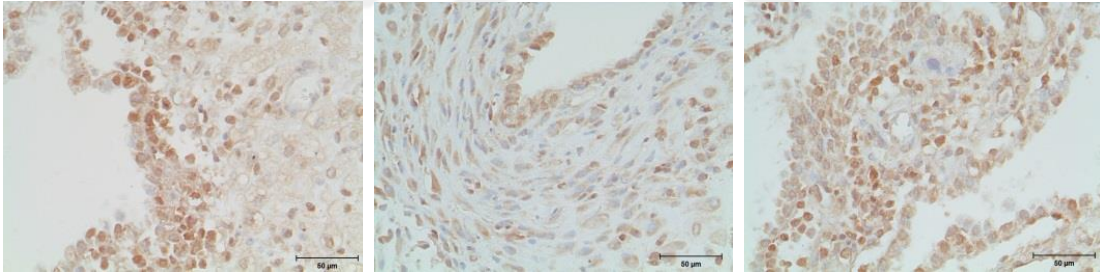
TP grubunda fetal alanda, trofoblast hücreleri PROS1 proteinini farklı düzeylerde sitoplazmik ve nükleer olarak eksprese etmekteydi. Trofoblast hücreleri komşuluğunda bir alt tabakasında bulunan hücrelerin nükleusunda ve sitoplazmasında yoğun PROS1 ekspresyonu görülmekteydi. Bununla birlikte EVT olduğunu tahmin ettiğimiz hücrelerin de oldukça yoğun sitoplazmik boyanmaktaydı (Şekil 4.16).

URPL grubunda maternal alanda, desidua hücreleri PROS1 proteinini yoğun bir şekilde nükleer, orta derecede sitoplazmik olarak eksprese etmekteydi. Desidua hücrelerinin arasında küçük çaplı hücrelerde ise PROS1 yoğun bir şekilde nükleer ve sitoplazmik olarak eksprese edildi (Şekil 19, 4.26e).

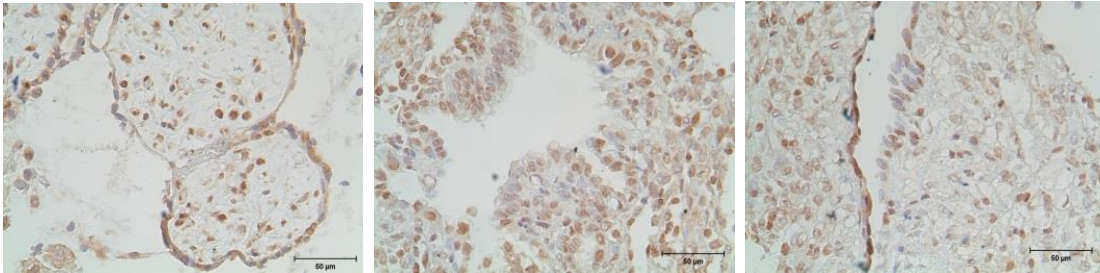
URPL grubunda fetal alanda, trofoblast hücreleri PROS1 proteinini nükleer daha yoğun olarak da sitoplazmik eksprese etmekteydiler. Koryon içerisindeki stromal hücrelerde nükleer boyanan hücreler oldukça fazla miktarda izlendi (Şekil 4.17).



Şekil 4.15. KE grubu (a), TP grubu (b) ve URPL grubu (c) desidua örneklerinde PROS1 immunoreaktivitesi.



Şekil 4.16. TP grubu koryon örneklerinde PROS1 immunoreaktivitesi.



Şekil 4.17. URPL grubu koryon örneklerinde PROS1 immunoreaktivitesi.

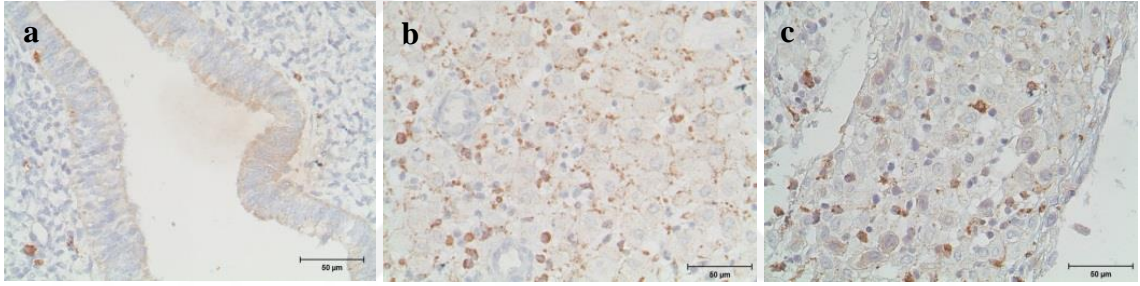
KE grubunda, CD68+ makrofajlar çok az sayıda bez epitelinin bazalinde ve stromal hücrelerin arasında dağılmış olarak izlendi (Şekil 4.18).

TP grubunda maternal alanda, Makrofajlar desidua hücrelerinin arasında kontrol endometriuma göre çok daha fazla miktarda izlendi (Şekil 4.18).

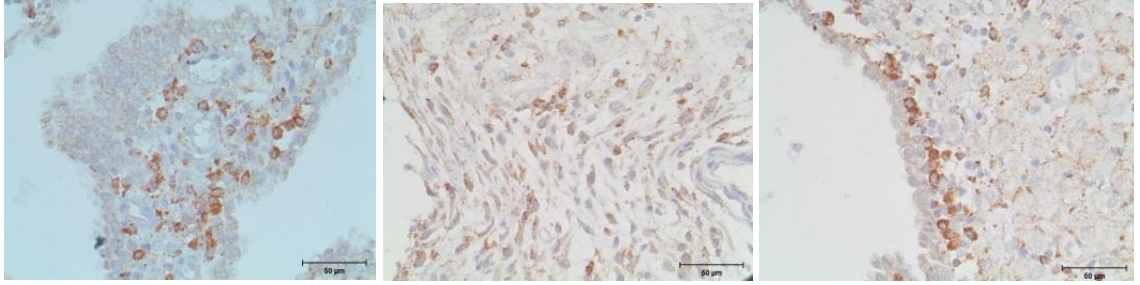
TP grubunda fetal alanda, trofoblast hücrelerinin bazalinde yer alan çok sayıda CD68+ hücre izlendi (Şekil 4.19).

URPL grubunda maternal alanda, desidua hücreleri CD68'i niceliksel olarak gebeliktekine benzer oranda izlendi (Şekil 4.18).

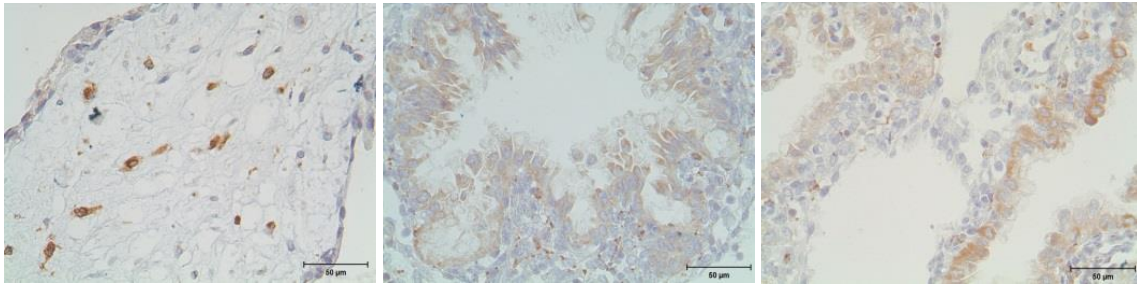
URPL grubunda fetal alanda, koryon stromasında oldukça yoğun miktarda CD68+ hücre gözlemlendi (Şekil 4.20).



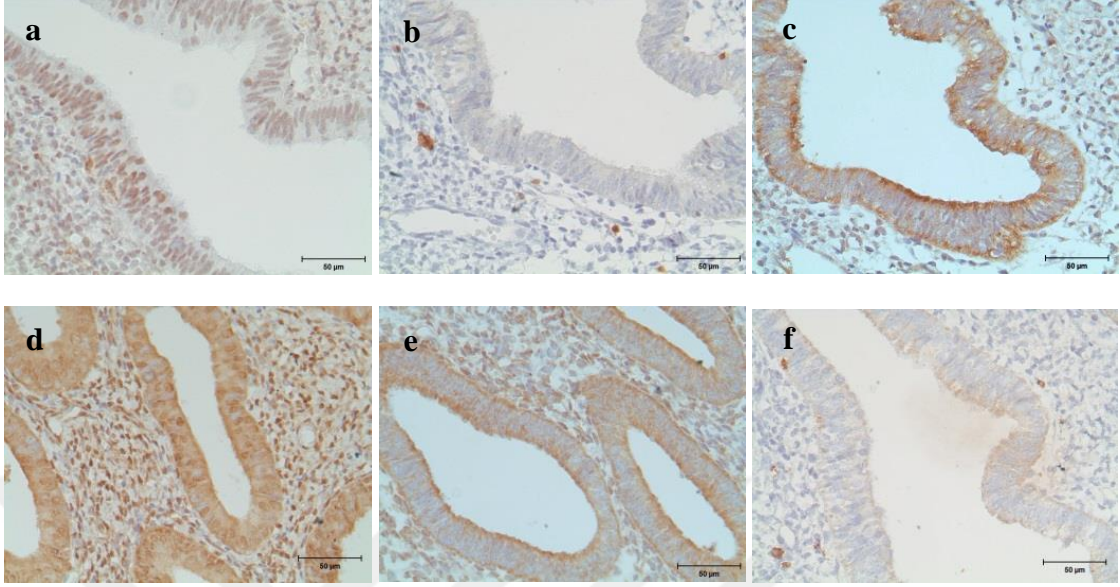
Şekil 4.18. KE grubu (a), TP grubu (b) URPL grubu (c) desidua örneklerinde CD68+ immunoreaktivitesi.



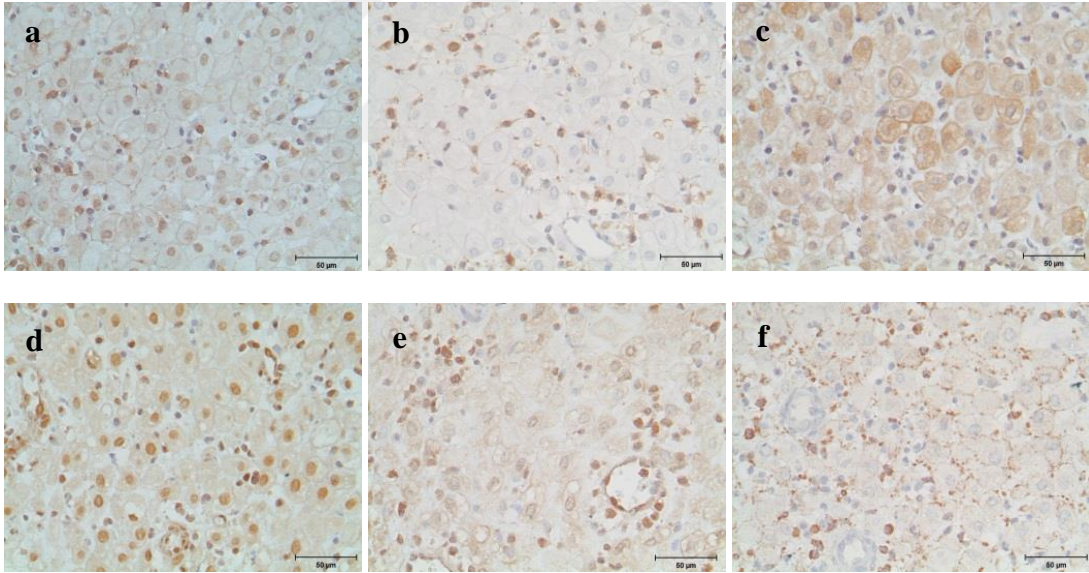
Şekil 4.19. TP grubu koryon örneklerinde CD68+ immunoreaktivitesi.



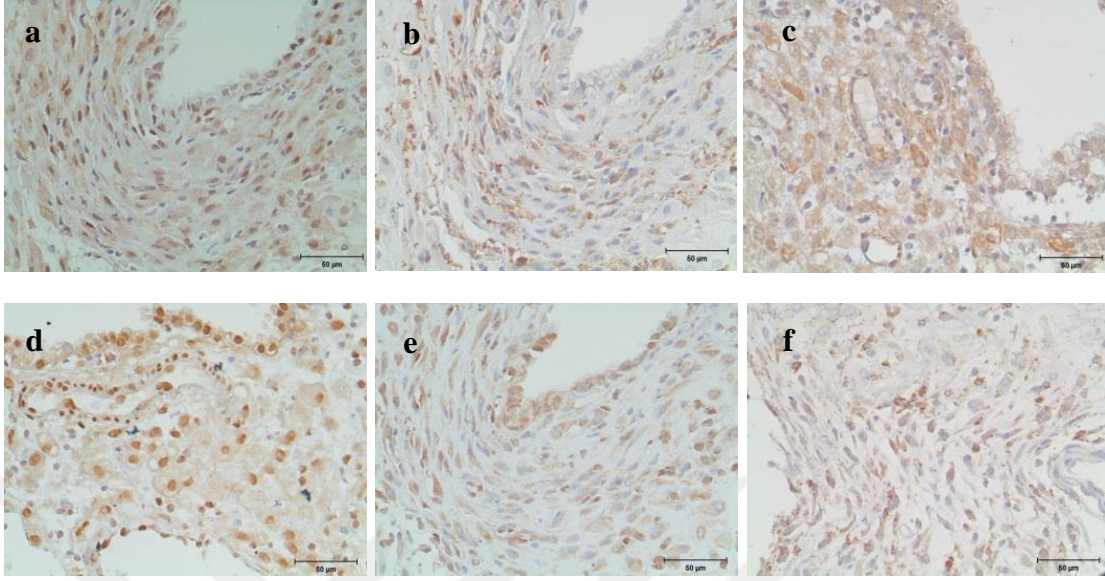
Şekil 4.20. URPL grubu koryon örneklerinde CD68+ immunoreaktivitesi.



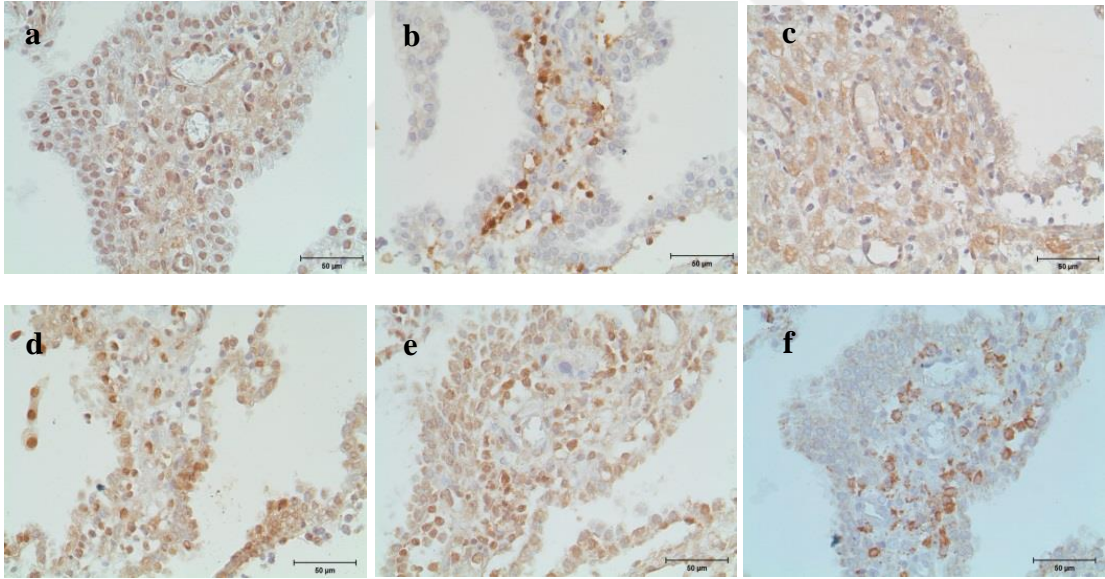
Şekil 4.21. KE grubu endometriyum örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi



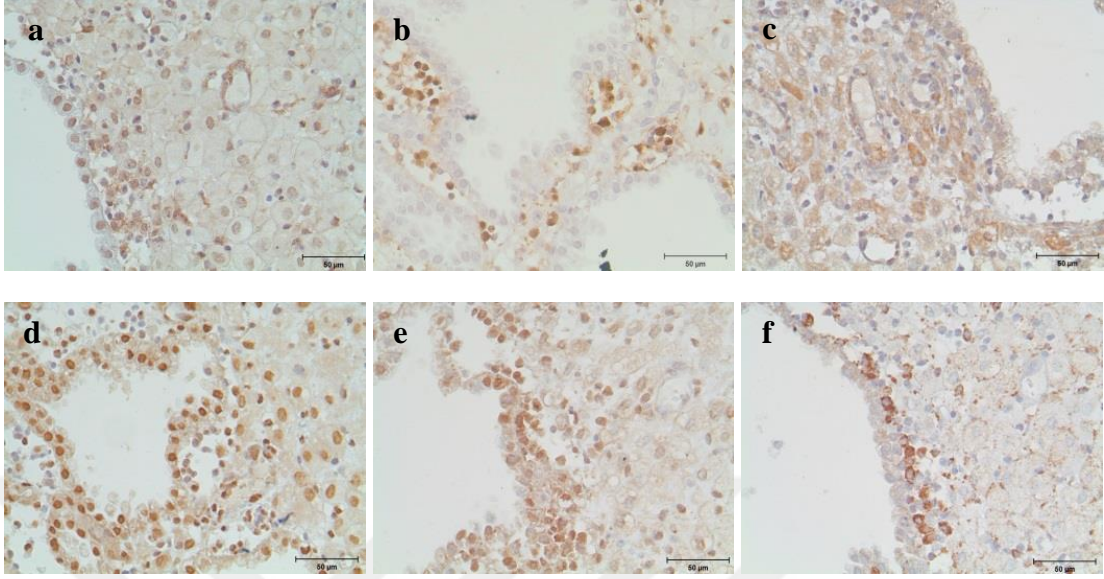
Şekil 4.22. TP grubu desidua örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi.



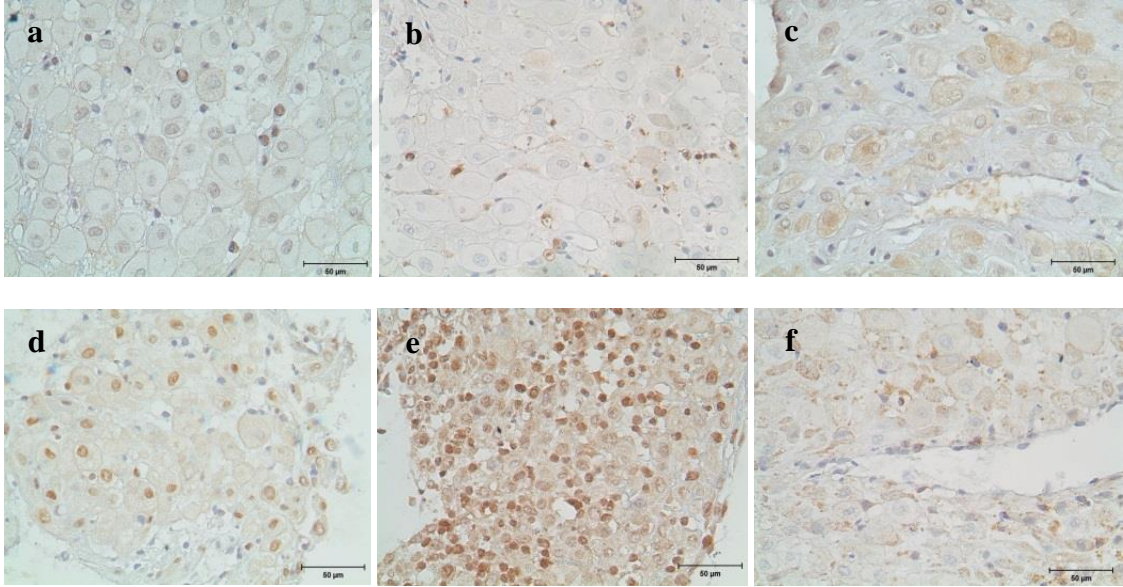
Şekil 4.23. TP grubu koryon ve desidua örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi



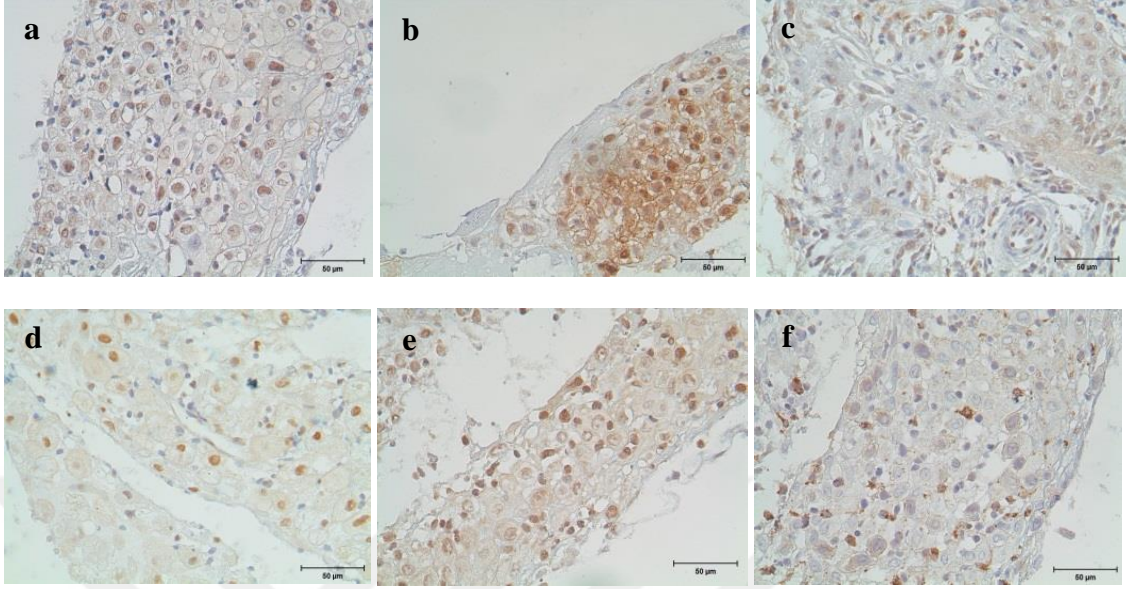
Şekil 4.24. TP grubu koryon örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi



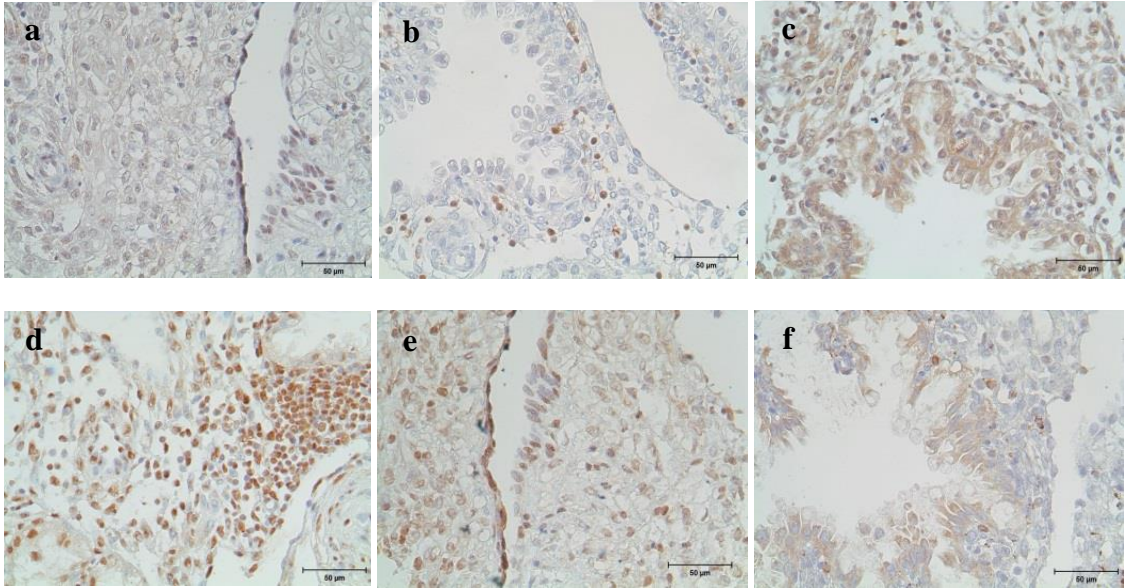
Şekil 4.25. TP grubu koryon örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi



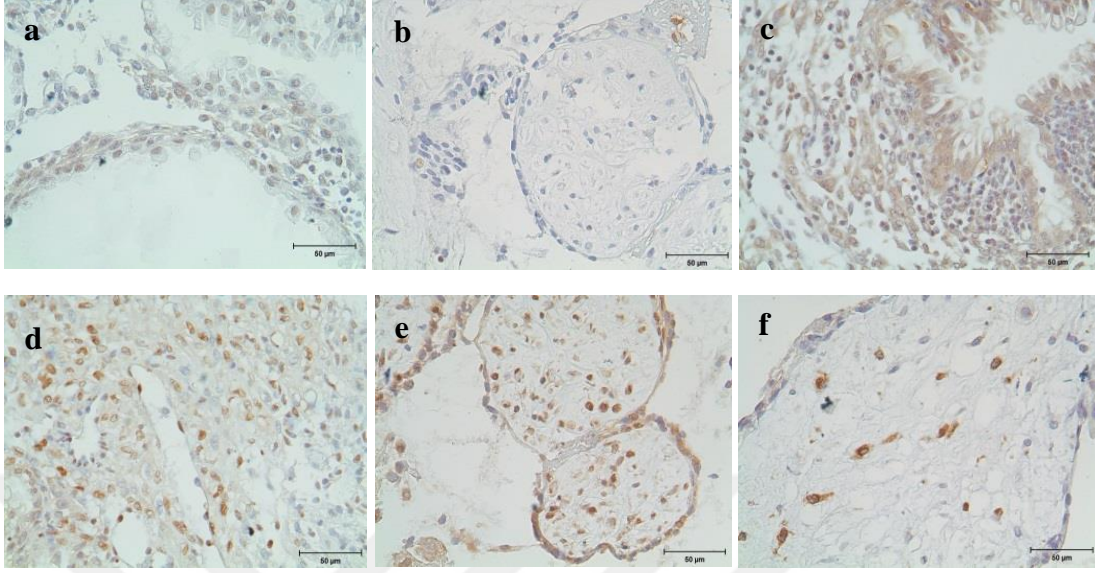
Şekil 4.26. URPL grubu desidua örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi



Şekil 4.27. URPL grubu koryon ve desidua örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi



Şekil 4.28. URPL grubu koryon örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi



Şekil 4.29. URPL grubu koryon örneklerinde AXL (a), MERTK (b), TYRO3 (c), GAS6 (d), PROS1 (e) ve CD68+ (f) immunoreaktivitesi

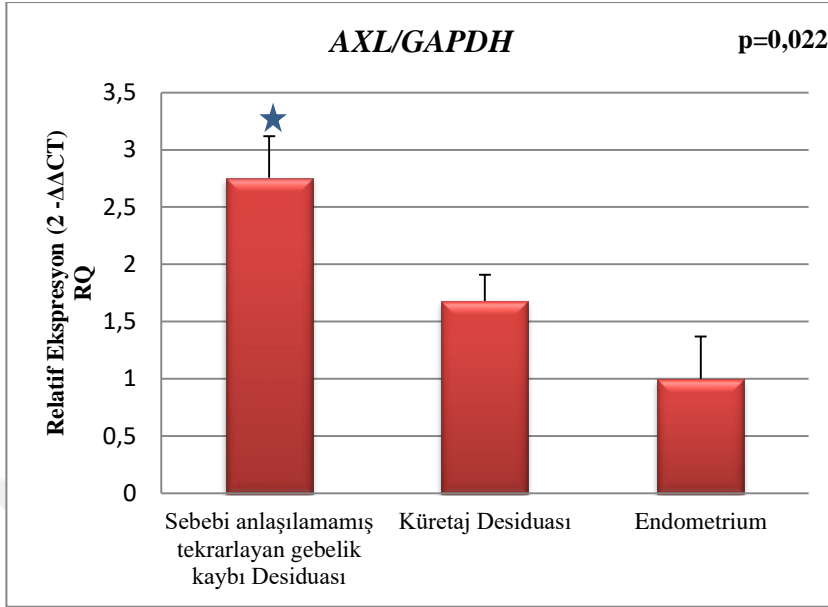
4.2. Western Blot ve QPCR Analizleri

Western blot analizleri her grup için 2 kez tekrarlanmış her iki tekrarda da aynı koşullar oluşturulmuştur. PCR için her gen, kendi içinde üçlü gruplar halinde aynı koşullar oluşturularak çalışılmış her gen her örnek için üç kez tekrar edilmiştir.

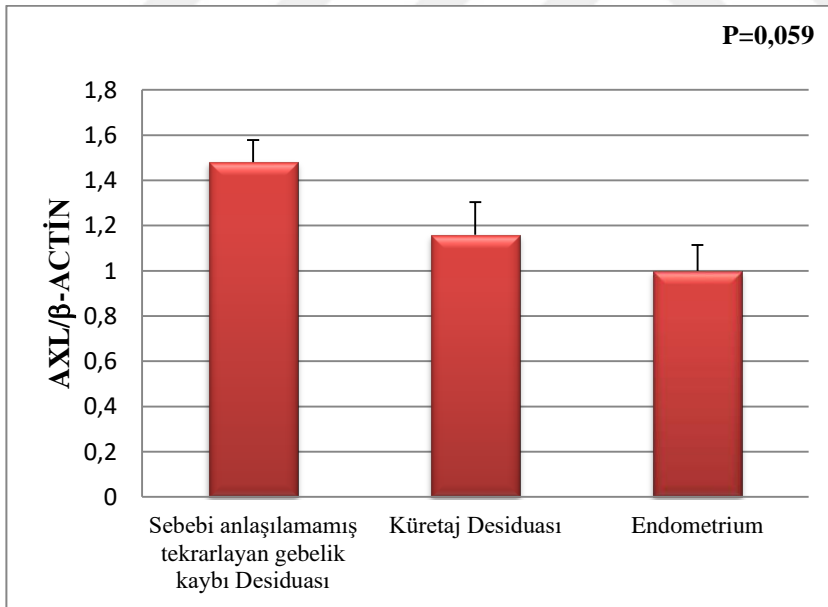
4.2.1. AXL için Western Blot ve QPCR Analizleri

Gebelik durumunda desiduada, AXL ekspresyonu hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde sağlıklı endometriuma oranla yükseldiği ancak bu yükselişin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. URPL desiduasında ise KE grubu endometriyumuna göre her iki parametrede de yükseliş olduğu, bunlardan sadece gen düzeyindeki yükselişin anlamlı olduğu bulunmuştur (p: 0,022). URPL grubunda ise sağlıklı gebeliğe oranla yükseliş olsa da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.30, 4.31, 4.50).

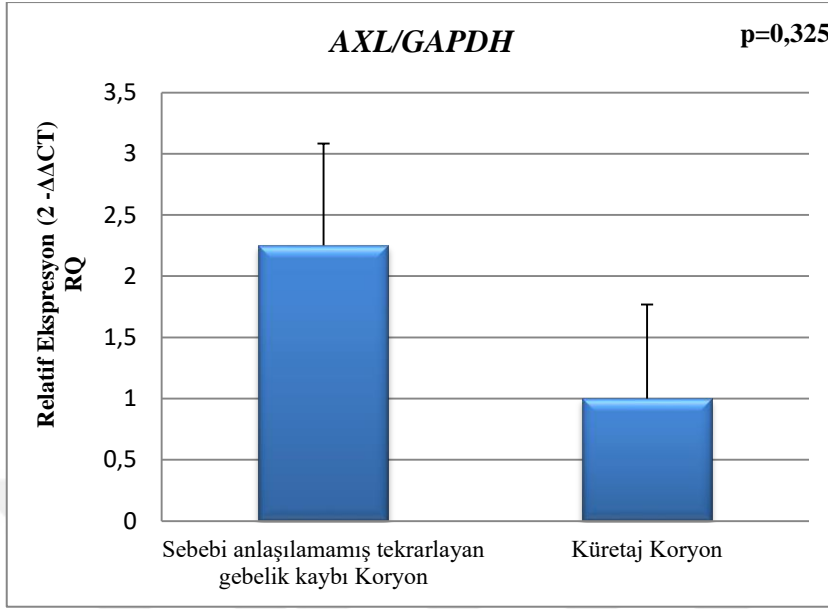
TP grubu koryonu ve URPL grubu koryonundaki AXL ekspresyonu karşılaştırıldığında URPL grubunda AXL ekspresyonunun hem gen (p:0,325) hem protein (p:0,318) düzeyinde artış gösterdiği, ancak bu artışın anlamlı olmadığı belirlendi.(Şekil 4.32, 4.33, 4.50)



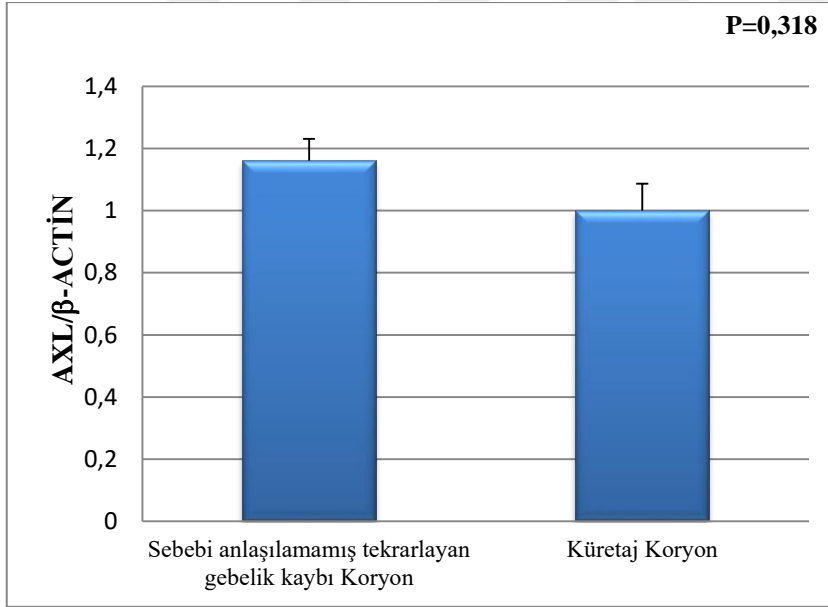
Şekil 4.30. TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *AXL* mRNA'sının QPCR analizi (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) *URPL ve KE grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 4.31. TP ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *AXL* proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6)



Şekil 4.32. TP ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *AXL* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6)



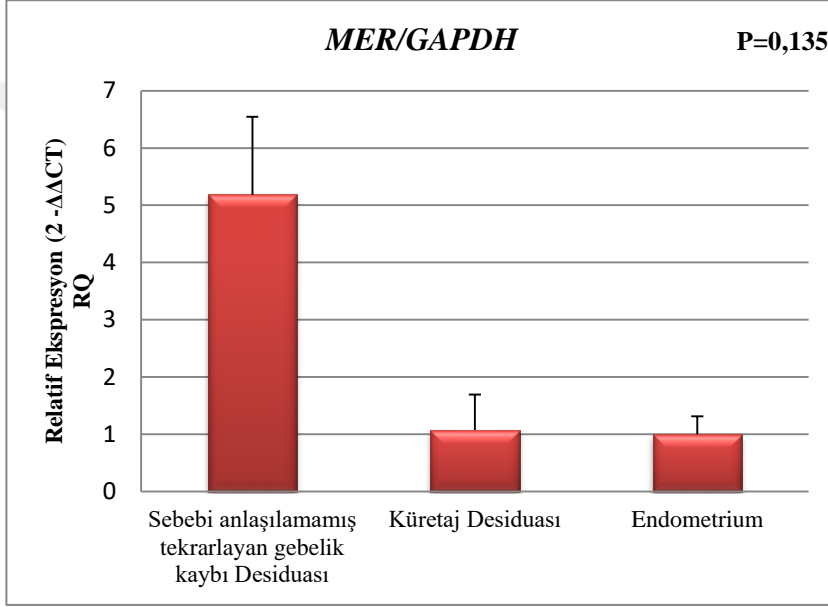
Şekil 4.33. TP ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *AXL* proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6)

4.2.2. MERTK için Western Blot ve QPCR Analizleri

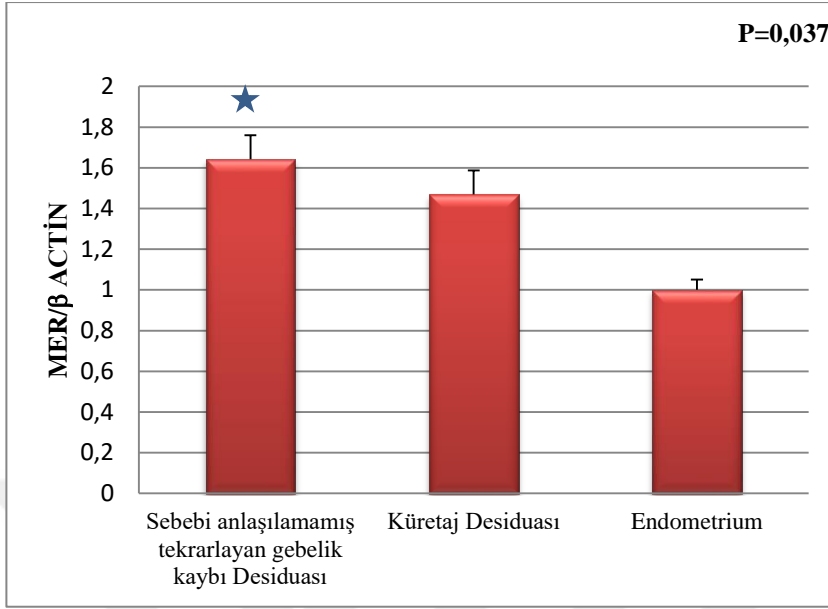
Gebelik durumunda desiduada, MERTK ekspresyonu hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde sağlıklı endometriuma oranla anlamlı olmayan çok az bir yükselişi gösterdi. URPL grubu desiduasında ise KE göre her iki parametrede de belirgin bir yükseliş izlendi. Fakat mRNA düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken

(p: 0,135) protein düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p: 0,037) (Şekil 4.34, 4.35, 4.50) .

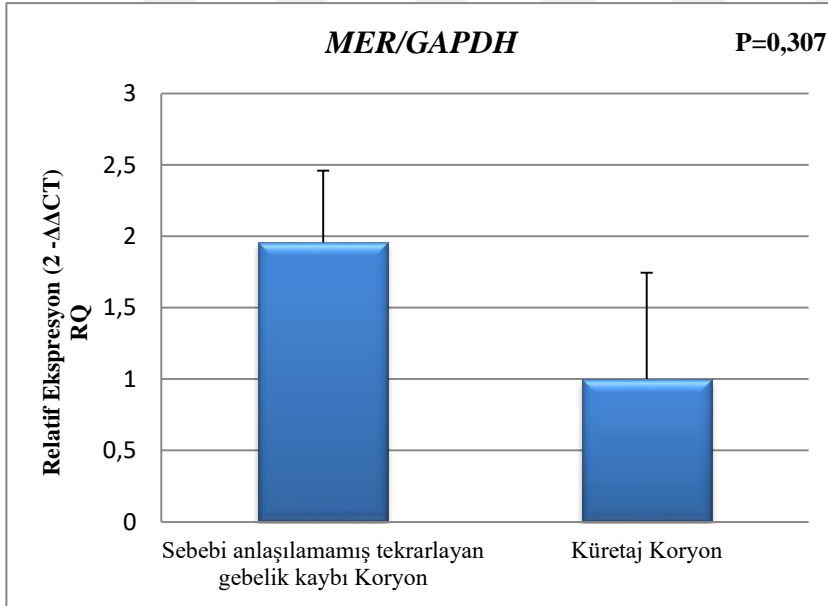
TP grubu ve URPL grubularına ait koryon örneklerinde MERTK ekspresyonu değerlendirilmesinde, URPL grubunda MERTK ekspresyonunun hem gen hem de protein düzeyinde artış gösterdiği, ancak mRNA (p:0,307) ve protein (p: 0,227) düzeyindeki bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.36, 4.37, 4.50) .



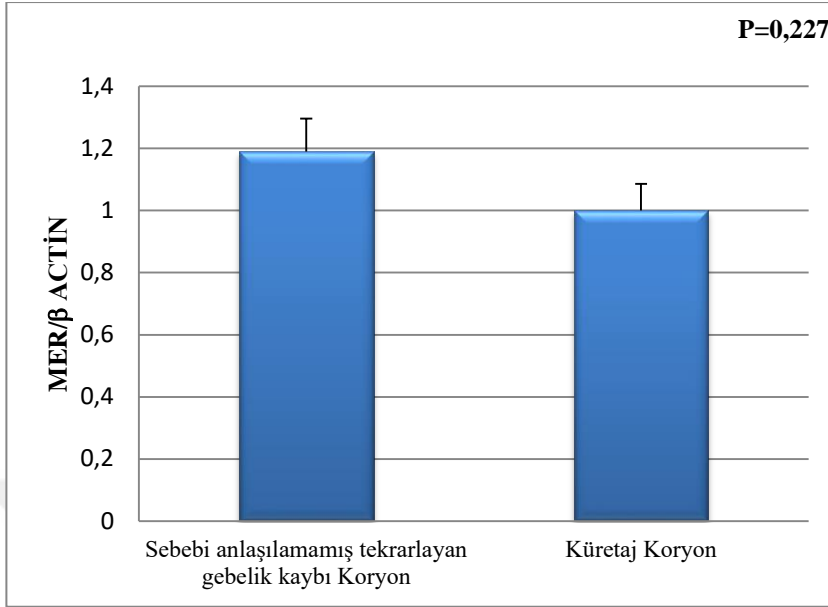
Şekil 4.34. TP ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *MERTK* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6)



Şekil 4.35. TP ve URPL desiduasında eksprese edilen MERTK proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) *: URPLD ve KE grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır (p:0,01).



Şekil 4.36. TP ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen MERTK mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6)

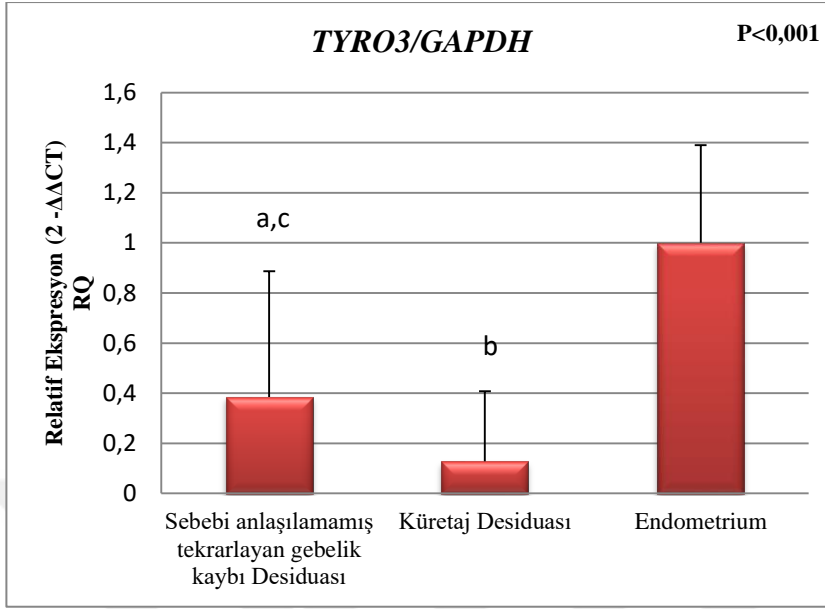


Şekil 4.37. TP ve URPL koryonlarında eksprese edilen MERTK proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6).

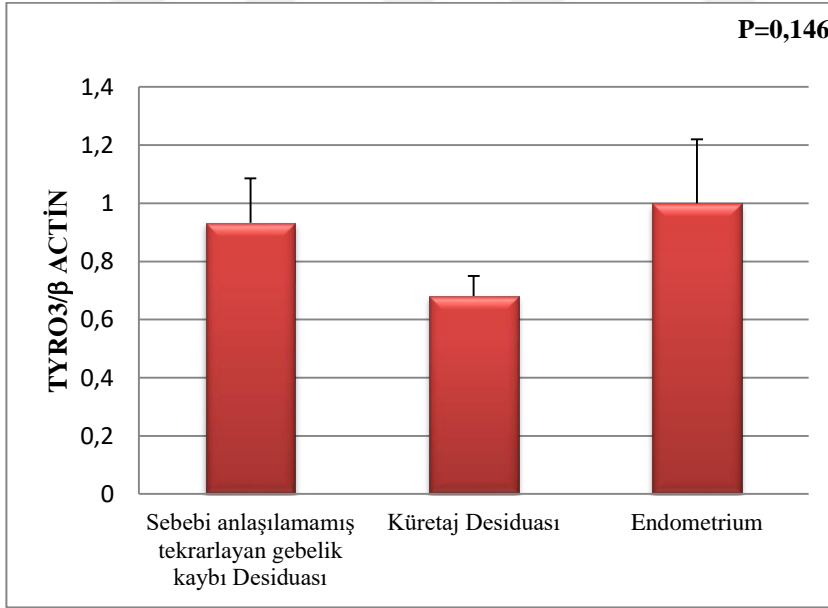
4.2.3. TYRO3 için Western Blot ve QPCR Analizleri

TYRO3 mRNA ekspresyonu, TP desiduasında sağlıklı endometriuma (KE) oranla (p: 0,0001) ve URPL desiduasında ise sağlıklı endometriuma oranla (p: 0,03) istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiği bulunmuştur. URPL grubu desiduasında TP grubu desiduasına göre TYRO3 mRNA ekspresyonunda anlamlı bir yükseliş izlenmiştir (p: 0,01). Protein düzeyindeki değişikliklerin de mRNA ekspresyonundaki değişikliklere paralellik göstermekle birlikte bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p: 0,146) (Şekil 4.38, 4.39, 4.50) .

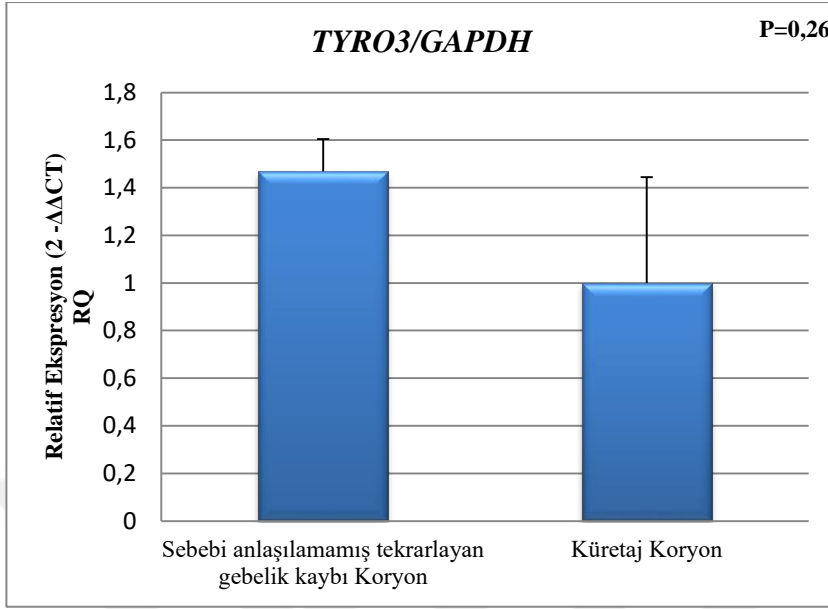
TP grubu ve URPL grubu koryonlarındaki TYRO3 ekspresyonu değerlendirmesinde, URPL grubunda TYRO3 ekspresyonunun hem gen hem protein düzeyinde artış gösterdiği, ancak bu artışın mRNA (p:0,26) düzeyinde ve protein (p: 0,058) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.40, 4.41, 4.50) .



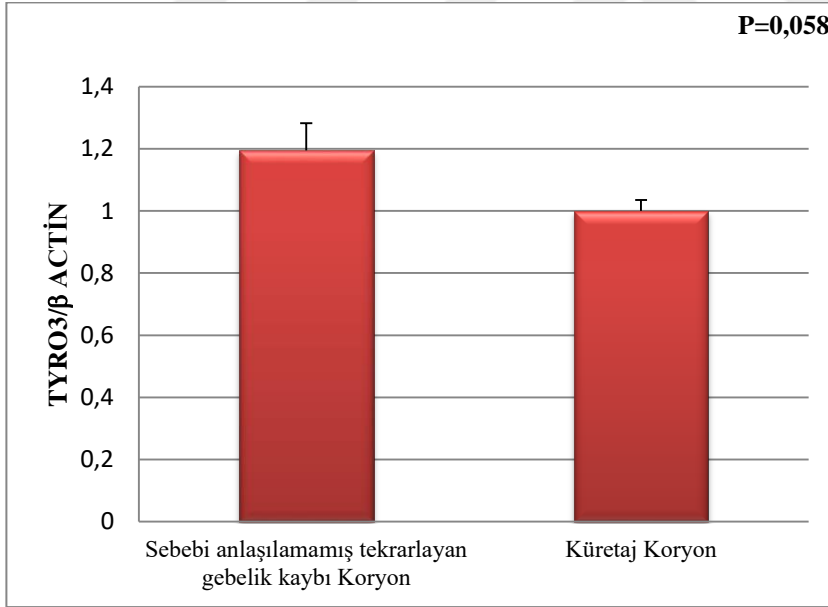
Şekil 4.38. TP ve URPL desiduasında eksprese edilen *TYRO3* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (UPRD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) a: URPL ve KE arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. $P < 0,03$; b: TP ve KE arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. $P:0,0001$; c: RPL ve TP arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. $P: 0,01$.



Şekil 4.39. TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen TYRO3 proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6)



Şekil 4.40. TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *TYRO3* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6)



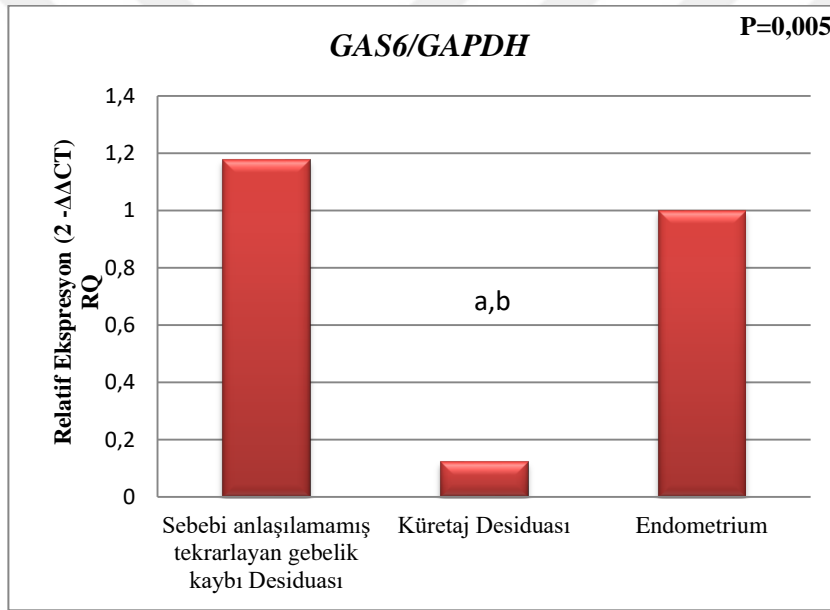
Şekil 4.41. TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen TYRO3 proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6)

4.2.4. GAS6 için Western Blot ve QPCR Analizleri

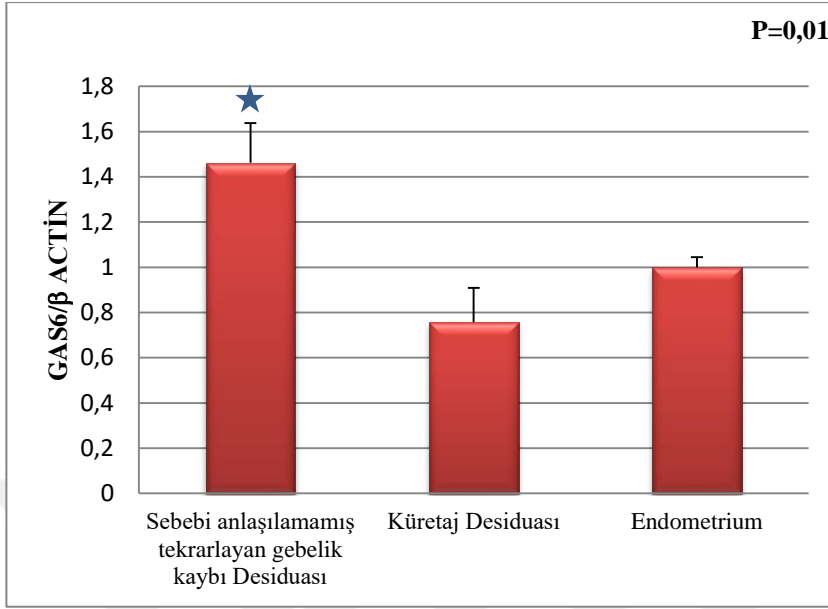
Gebelik durumunda desiduada, GAS6 ekspresyonu hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde sağlıklı endometriuma oranla azalma göstermiştir. URPL grubu desiduasında ise KE'ye göre her iki parametrede de yükseliş izlenmiştir. mRNA düzeyinde TP grubu desiduasının, hem KE grubu desiduasıyla (p: 0,005) hem de URPL

grubu desiduasıyla (p: 0,003) istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir. Protein düzeyinde ise sadece TP grubu desiduasısı ve URPL grubu desiduasısı (p< 0,003) arasında görülen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.42, 4.43, 4.50) .

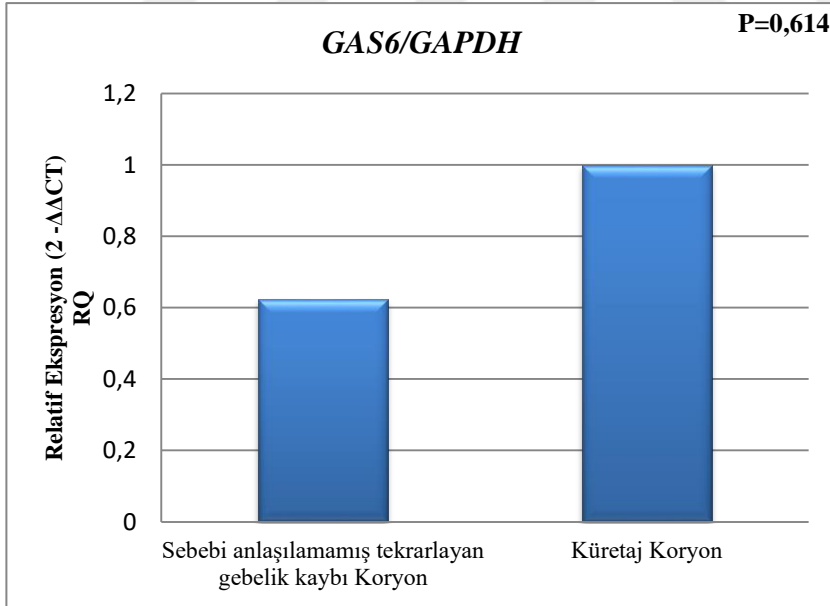
TP grubu koryonu ve URPL grubu koryonundaki GAS6 ekspresyonu değerlendirmesinde URPL grubunda GAS6 ekspresyonunun hem gen hem protein düzeyinde azalma gösterdiği, bu azalmanın hem mRNA (p:0,614) düzeyinde hem de protein (p: 0,207) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.44, 4.45, 4.50) .



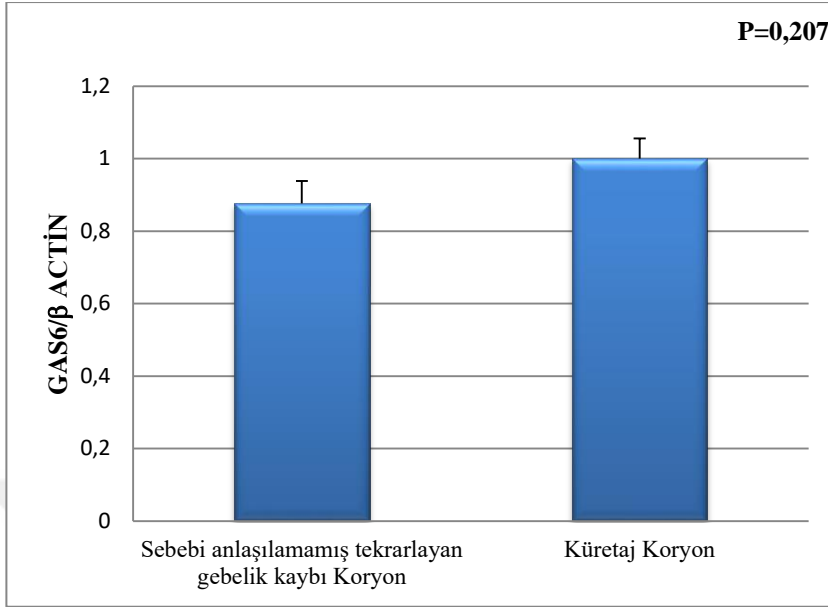
Şekil 4.42. TP grubu ve URPL grubu desidualarında eksprese edilen GAS6 mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) a: TP ve KE arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. P: 0,005 ;b: TP ve URPL arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. P:0,003



Şekil 4.43. TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen GAS6 proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6) *: URPL ve TP arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. $P < 0,003$



Şekil 4.44. TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen GAS6 mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6)

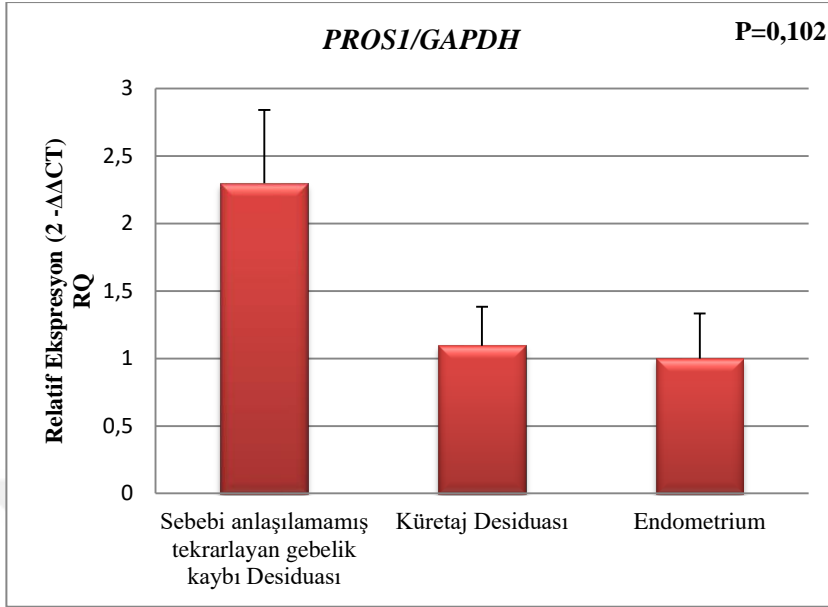


Şekil 4.45. TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen GAS6 proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6)

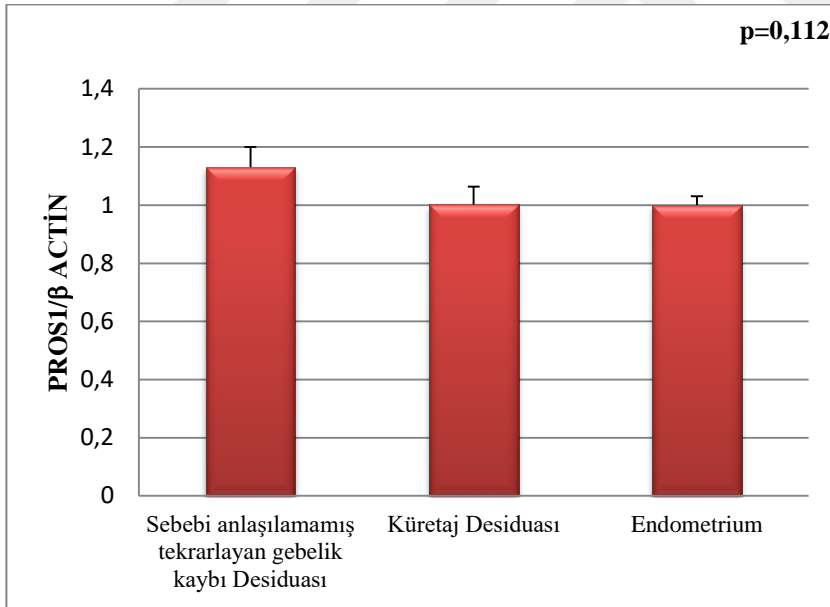
4.2.5. PROS1 için Western Blot ve QPCR Analizleri

PROS1 mRNA ekspresyonu, gebelik desiduasında sağlıklı endometriuma oranla artış gösterirken, URPL grubu desiduasında daha da belirgin olarak yükselmiştir. Gen düzeyinde izlenen bu yükselişler protein düzeyinde de görülmektedir. mRNA (p:0,102) ve protein (p:0,112) düzeyindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir (Şekil 4.46, 4.47, 4.50) .

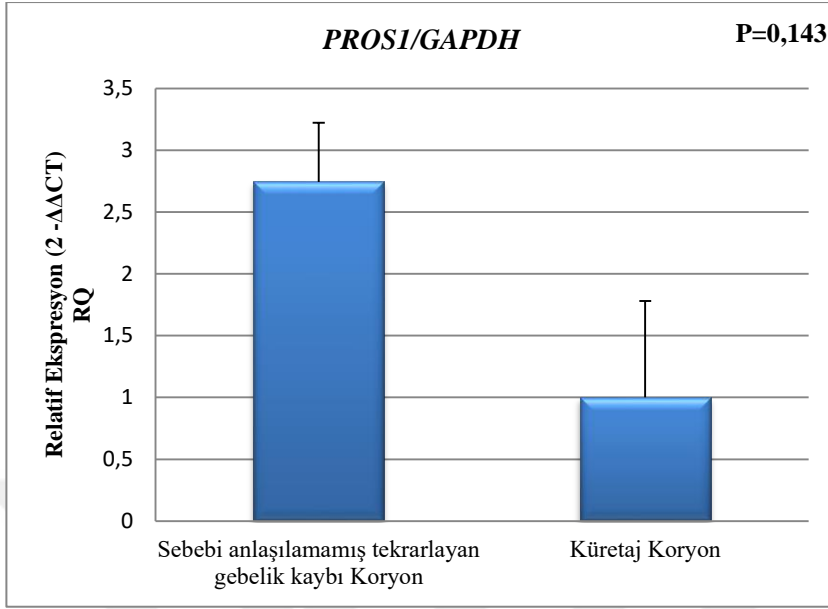
TP grubu koryonu ve URPL grubu koryonundaki PROS1 ekspresyonu değerlendirmesinde, URPL grubunda PROS1 ekspresyonunun hem gen hem protein düzeyinde artış gösterdiği, mRNA (p:0,143) düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değilken, protein (p: 0,023) düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.48, 4.49, 4.50).



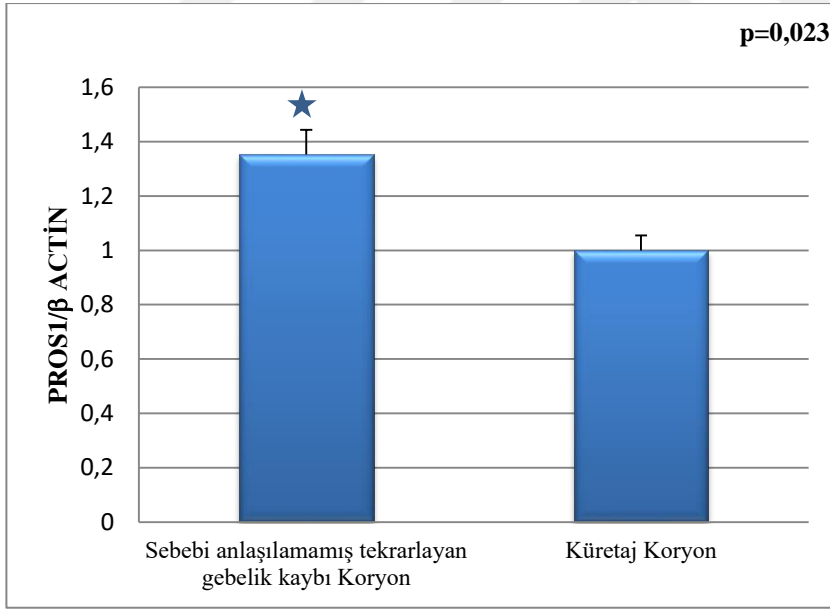
Şekil 4.46. TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *PROS1* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6).



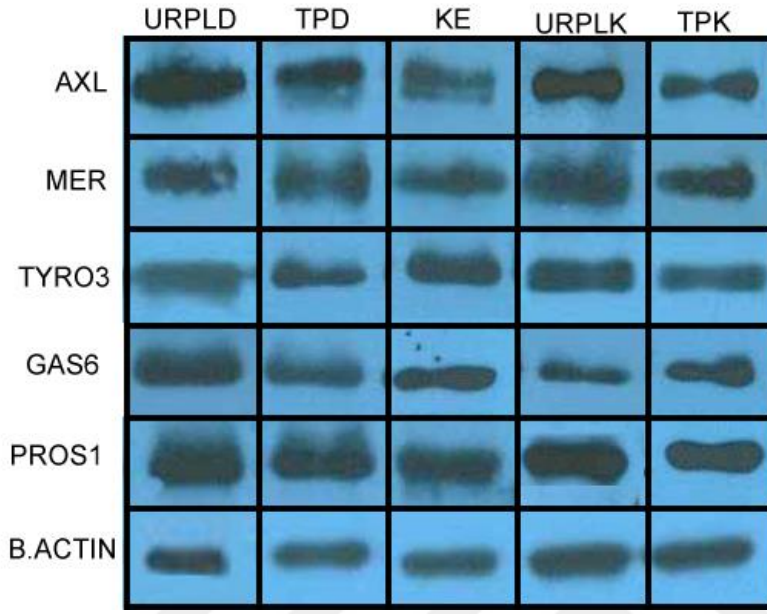
Şekil 4.47. TP grubu ve URPL grubu desiduasında eksprese edilen *PROS1* proteinin Western Blot analizi sonucu (URPLD için n:5; TPD için n: 6; KE için n: 6)



Şekil 4.48. TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *PROS1* mRNA'sının QPCR analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6)



Şekil 4.49. TP grubu ve URPL grubu koryonlarında eksprese edilen *PROS1* proteininin Western Blot analizi sonucu (URPLK için n:5; TPK için n: 6) *: URPL ve TP arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır P: 0,02.



Şekil 4.50. Tüm grupların western Blot Bantları (AXL, MERTK, TYRO3, GAS6 ve PROS1)

5. TARTIŞMA

RPL, eksojen etken olan infeksiyöz ajanların yanı sıra, anatomik anomalilerden genetik problemlere kadar çok geniş perspektifte nedenlere sahiptir. URPL'nin ise etiyojisi tanımlanamamış olduğundan bir çok bilinmeyen içerisinde barındıran önemli bir araştırma konusudur.

Gebeliğin sürdürülmesinde normal plasental mimarinin gelişmesi anahtar role sahiptir. Anormal plasental oluşum gebelik kayıplarında önemli nedenlerden birisini oluşturur. Spiral arter modellenmesi ve anjiyogenezin normal şekilde gerçekleşmemesi plasentada anormal yapılanmanın önemli nedenlerinden birisidir. Bu nedenle anjiyogenez yönlendiren moleküler mekanizmalardaki farklılık anormal plasental vaskülarizasyona ve gebelik kayıplarına neden olabilmektedir (Ball ve ark. 2006). RPL'de VEGF düzeylerinin sağlıklı gebeliğe sahip ve gebe olmayan sağlıklı kadınlara göre oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Bagheri ve ark. 2017). Bu nedenle VEGF düzeyleri gebelik kayıplarında önemli tanımlayıcı marker olabileceği önerilmektedir.

Endotel hücrelerinden sentezlenen ve kan basıncı regülasyonunda işlevsel olan ACE (angiotensin converting enzyme), inaktif anjiyotensin I' in anjiyotensin II ye dönüştürülmesinde etkilidir. Bazı toplumlarda ACE gen polimorfizmine sık rastlandığı ve buna bağlı tekrarlayan gebelik kayıplarının da sık yaşandığı belirlenmiştir (Al-Mukaynizi ve ark. 2016). Böylece RPL etyolojisinde ACE mekanizmasındaki değişikliklerin de rol aldığı ileri sürülmektedir.

Gebelik kaybı olasılığının önceden belirlenmesi, gebeliğin sağlıklı bir şekilde tamamlanması için önemlidir. Bu nedenle RPL için marker olabilecek etkenleri belirlemeye yönelik çalışmalar günümüzde araştırmacıların odaklandığı önemli konulardan birisidir. Yapılan çalışma sonucunda, maternal serum amyloid (SAA) düzeyinin artmış olması URPL için önemli bir marker olabileceği önerilmektedir (İbrahim ve ark. 2017).

Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) gibi patent tanıma reseptörleri, virüsler, bakteri ve funguslar gibi patojenler üzerinde korunmuş moleküler kalıpları tespit eder. Bu yaygın moleküler epitopların saptanması üzerine, TLR'ler bağışıklık yollarını başlatır ve pro-inflamatuvar sitokinlerin ve diğer bağışıklık aracılarının üretilmesine yol açar. İnflamasyon oluşumu ve bağışıklık hücrelerinin çağırılması enfeksiyona yanıt olarak önemlidir. Bununla birlikte, düzensiz pro-inflamatuvar cevaplar doku hasarına ve otoimmün hastalığa neden olabilir. Bu nedenle, bu reseptörlerin aktivasyonu, aşırı inflamasyon oluşumunu ve doku hasarını önlemek için sıkı bir şekilde düzenlenir (Malawista ve ark. 2016). TAM reseptör tirozin kinaz ailesi üyeleri AXL, MERTK ve TYRO3 reseptörleri ve ligandlarında GAS6 ve PROS1' dir (Lemke ve Rothlin 2008). TAM reseptörleri (TYRO3, AXL ve MERTK) aşırı uyarımı kontrol etmek ve homeostatik dengeyi düzeltmek için TLR'leri ve onların downstreamini baskılayan homolog reseptör-tirozin kinazlardan oluşan bir ailedir. TLR sinyalleme, tip I interferon reseptörü (IFNAR) -STAT1 yoluyla TAM upregülasyonunu indükler ve IFNAR-STAT1 yolağını baskılar. Böylelikle kendinden regülasyonlu, negatif geri besleme döngüsü oluşturulur (Malawista ve Wang 2016). TAM reseptörleri bu inflamatuvar dengenin sağlanmasında oldukça etkin reseptörlerdir.

Çalışmamız, sağlıklı ilerleyen gebelikte ve sebebi anlaşılamamış tekrarlayan gebelik kayıplarında TAM reseptörleri ve ligandlarının ekspresyon düzeylerini gösterildiği ilk çalışmadır. Öncelikle hem sağlıklı endometriyumunda hem de ilk trimester gebeliğinde TAM reseptörleri ve ligandlarının farklı düzeylerde de olsa ekspre olduğu ilk kez gösterilmiştir.

Sağlıklı endometriuma oranla gebelikte AXL ekspresyonu belirgin bir biçimde hem gen hem de protein düzeyinde artış gösterdi. Ligandı GAS6 ise gebelikle birlikte belirgin bir şekilde düşüş gösterdi. AXL aşırı inflamatuvar yanıtın baskılanmasında rol alan immünsüpresif fagositik reseptörlerdendir. AXL hem M1 hem de M2 polarize makrofajlarda uyarılmakta olup, herhangi bir doku hasarı yada inflamatuvar hasara karşı yanıt reseptörü olarak görev yapmaktadır. AXL' in aktivasyonu üzerine bölünmeye uğradığı ve bu bölünmenin apoptotik hücre fagositozunun ilk aşaması için gerekli olabileceği düşünülmektedir. Diğer TAM' ların aksine AXL ve ligandı GAS6 birbirine

bağımlıdır. AXL aktive olabilmek için GAS6' ya; GAS6' nın stabil devamlılığını devam ettirebilmesi için de AXL' a ihtiyacı vardır. Bir çok dokudaki GAS6 protein rezervuarının korunması AXL'in yüzey ekspresyonuna bağlıdır. Ve bu dokularda GAS6, normalde AXL'a bağlı bulunur. Ayrıca AXL-GAS6 birlikteliğinde PtdSer varlığında aktivasyon artmaktadır (Zagorska ve Traves 2014). Çalışmamızda GAS6 düzeyinde izlenen bu düşüş AXL' ın immünohistokimya verileriyle desteklediği gibi, gebelikte çoğunlukla nükleer ekspresyonuna bağlı olabilir. Normal gebelikte abartılı inflamatuvar cevap olmaması gerektiğinden AXL'in yüzey ekspresyonunun bulunmaması normaldir. Stroma içerisindeki çeşitli hücrelerde yoğun nükleer ve sitoplazmik AXL ekspresyonunun görülmesi, AXL'nin immün yanıt dışında rol aldığı farklı yollarla ilgili olabilir. Bunlara ilaveten fagositik hücrelerin apoptotik hücreyi fagosite edebilmesi için ligandıyla yüzeyde etkileşim halinde olmasının gerekli olduğunu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmişti (Zagorska ve Traves 2014). AXL'in spesifik reseptörü GAS6'nın düşük olması da bu etkileşimin yeterince gerçekleşmediğini gösteriyor olabilir. Normal gebelik süreci olması nedeniyle apoptotik hücrelerin normal fizyolojik şartlar sınırında olduğu ve bu etkileşime ihtiyaç duyulmadığı düşünülebilir. TAM reseptör tirozin kinaz ailesi doğal bağışıklıkta önemli rol oynamaktadır. Doğrudan patojenleri tanımanın yanı sıra patojenler ile enfekte bir hücre de tanınmalı ve yok edilebilmelidir. Doğal immün yanıtta bu işlevsel durum, temel olarak NK hücreleri ile gerçekleştirilmektedir. TAM sinyalizasyon sistemi de bu hücrelerin aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu düzenlenme sitokin reseptörleri ile birlikte yapılmaktadır. İmmatür NK hücrelerinin olgunlaşması ve sitotoksik aktivite gösterebilmesinde TAM sinyalizasyonu önemli bir rol üstlenmektedir (Lemke ve Rothlin 2008). Kemik iliği stromal hücreleriyle yapılmış bu çalışmanın sonuçlarından yola çıkarak desidual hücreler arasında AXL boyanma gösteren hücrelerin bir kısmının immatür NK olabileceğini düşünebiliriz. Stromal desidual hücrelerde eksprese olduğunu gösterdiğimiz GAS6 veya PROS1 ile immatür NK hücreleri etkileşime geçerek uNK hücrelerine dönüşümü tetikleyebilir. uNK hücreleri, NK hücrelerinin sitotoksik olmayan, gebelikte immün hücrelerin %70'ini oluşturan ve normal gebelik sürecinin sağlıklı ilerlemesi için gerekli olan hücrelerdir. Ancak URPL li kadınlarda yapılan çalışmada IL-22 sentezleyen NK22 hücrelerinin daha yüksek oranda bulunduğu

belirlenmiş. Retinoid-related orphan receptör gamma-t (ROR gamma-t) periferik kan ve uterinal endometriyumda bulunan NK22 hücrelerinin regülasyonunda işlevseldir. URPL yaşayan kadınlarda ROR gamma-t ekspresyonu da yüksek bulunmuş ve bu ekspresyonuna bağlı olarak artmış NK22 hücre sayısının RPL nedeni olabileceği ileri sürülmüştür (Fuchinoue ve ark. 2016).

URPL’de desidual alanda protein ve belirgin olarak gen düzeylerinde AXL artışı izlendi. AXL ekspresyonunda lokalizasyon olarak TP grubuyla karşılaştırıldığında bir farklılık izlenmedi. AXL’in spesifik ligandı olan GAS6’ nın da URPL de TP grubuna oranla daha fazla artmış olması, bilmediğimiz bir dış etkene bağlı oluşmuş aşırı inflamatuvar cevabı baskılamak adına olabileceği gibi, aynı zamanda ortamda bir sebepten dolayı oluşmuş aşırı miktarda apoptotik hücre’ yi temizlemek için reseptör ligand etkileşimi ile fagositik aktivitenin arttığını da düşünebiliriz.

Koryon örneklerinde ise hem gen hem de protein düzeyinde AXL ekspresyonu izlendi. Trofoblast hücrelerinde epitelyal mezenşimal geçişin var olduğu bilinmektedir (Mobley ve ark. 2017). AXL’in epitelyal mezenşimal geçişte aşırı eksprese olduğu ve rolünün bulunduğu yöneltte yayınlar bulunmaktadır (Gay ve ark. 2017). Bu sebeple AXL ekspresyonunu gösterdiğimiz immunohistokimyasal analizlerimiz sonucunda immünreaktivitenin büyük oranda trofoblastların nukleusunda görülmesi şaşırtıcı değildir. Gebelikteimplantasyondan itibaren pasantasyonun olu URPL koryonunda ise TP koryonuna oranla AXL ekspresyonunda artış olsa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hücrelerde eksprese oldukları lokalizasyonlar da normal gebelikte olduğu şekildeydi. AXL ekspresyonu her ne kadar koryonda yükselme gösterse de standart sapması çok yüksek çıktı. Çünkü koryon örnekleri kendi içerisinde birbirinden çok farklı sonuçlar gösteriyordu. Bu örneklerde üç tekrar yapılmış olmasına rağmen bu oranlar değişmedi. Buna sebep olabilecek iki faktör olabileceği kanaatindeyiz; Çalıştığımız materyaller insan materyali olması nedeniyle her ne kadar bilinen bir enfeksiyonu olmayan hastaları toplamış olsak bile, henüz dünyada tanımlanamamış birçok mikrobiyal etken bulunmaktadır. Ve farklı TLR uyarıcılarının AXL reseptörünün ekspresyonunu farklı düzeylerde etkilediği daha önceki çalışmalardan bilinmektedir (Zagorska ve Traves 2014). Herhangi teşhisi yapılamayan virütik bir etkene bağlı AXL

ekspresyonu aşırı yükselmiş olabilir yada vücudun hormonal olarak üretmiş olabileceği steroid bir molekül AXL ekspresyonunu diğer hastada düşürmüş olabilir. Bir diğer faktör de biz ne kadar büyük bir dikkat ile örnekleri ayırmış olsak bile küretaj materyali olması ve ayrımının oldukça zor olması nedeniyle koryon örneğine fazlaca maternal kısım karıştırılmış olabilir. Her iki faktörü de eleyebilmek için daha fazla vaka toplamaya ihtiyacımız olduğu kanaatindeyiz. AXL reseptörü, bir çok hücrede hayatta kalma, büyüme, agregasyon, migrasyon ve anti-inflamatuvar gibi çeşitli fonksiyonları düzenler. AXL-GAS6 yolağı kanser, otoimmün hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir (Korshunov 2012). Dendritik hücrelerdeki analizler, AXL mRNA'nın, TLR sinyalizasyonunun aktivasyonunun downstreaminde STAT1'e bağımlı bir şekilde yukarı doğru düzenlendiğini göstermiştir (Rothlin ve ark. 2007). Benzer şekilde, makrofajlarda, AXL ekspresyonu TLR ligandları ve diğer tümör nekroz faktörü de dahil inflamasyon belirteçleri tarafından uyarılır, ancak bu etki kortikosteroidlerle tedavi aracılığıyla engellenebilir. Dendritik hücrelerde, AXL ekspresyonu bol miktarda bulunurken kemik iliği kaynaklı makrofajlarda AXL ekspresyonu minimaldir. Bununla birlikte, bu hücrelerde AXL mRNA kopya sayısında esas olarak bir fark bulunmaması, AXL ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Zagorska ve Traves 2014).

Trofoblast hücreleri komşuluğunda bir alt bölgede bulunan hücrelerin yoğun olarak sitoplazmik CD68 ve nükleer olarak da AXL eksprese ettiğini izledik. Desidual alanda ise her ikisinin ortak boyanma gösterdiği hücreler oldukça az miktardaydı. Son bir yıl içerisinde gündemde olan orta ve gestasyonel dönemde Zika virüsü AXL, TYRO3 ve TIM1 ekspre eden hücreleri infekte ederek fetüsü infekte ettiğine yönelik yayınlar çıkmıştır. Burada AXL ve TYRO3 ekspresyonu gösterilmiş olsa da çalışmamız ilk trimesterdeki bu ligandların varlığına yönelik ilk çalışma olma özelliğini korumaktadır.

Progesteron (PR) ekspresyonu, gebelik hazırlığı sırasında endometrial homeostazı muafaza eden uyarı sinyallerinde rol oynar. PR farklı işlevleri olan iki izoforma (PR-A ve PR-B) sahiptir. Gebeliğin ilk üç ayında stromal hücrelerde ağırlıklı olarak PR-A olacak şekilde totalde azalma gösterir. Desidualizasyon ilerlerken ve gebelik başlarken

progesteron kademeli olarak düşüş göstermeye başlar. Steroid hormonları ve bunların reseptörleri arasındaki mevcut düzenleme, muhtemelen desidual dönüşümü yönlendiren ve endometrial homeostaz mekanizmalarını koruyan karşı sinyalleri sağlar (Vinketova ve ark. 2016). Progesteronun MERTK ekspresyonunu arttırdığı daha önceki yayınlarda gösterilmiştir (Zagorska ve Traves 2014). Gebelik desiduasında MERTK ekspresyonu, sağlıklı endometriuma göre çok az yükselme göstermiş olup anlamlı değildi. Desidual alanda eksprese olan MERTK için post translasyonel modifikasyonun gebelikte değil sağlıklı endometriumda olduğu kanaatindeyiz. MERTK kararlı durum ve uyarılmış toleransda etkili olan immüsupresif fagositik reseptördür. Ortamda AXL'ı arttırmaya meyilli inflamatuvar uyarılar MERTK'i düşürmeye eğilimliken, Kortizon gibi immüsupresif uyarılar MERTK'i yükseltirken AXL'ı düşürme eğilimindedir. MERTK, AXL'dan farklı bir şekilde inflamasyonu baskılamaktadır. İlki düzenli olarak vücudumuzda oluşan apoptotik hücrelerin temizlenmesi, ikincisi de kortikosteroid gibi immüsupresif uyarılar varlığında MERTK'in makrofajlarda ekspresyonunun artmasına bağlı apoptotik hücrelerin fagositozunun uyarılmasıdır. MERTK ligand olarak hem GAS6 hem de PROS 1'i kullanabilmektedir (Zagorska ve Traves 2014). Transmembran tirozin kinaz olan MERTK, normal beyin dokusuna kıyasla glioblastoma multiforme hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve canlılık ve proliferatif yollarla sinyal verir. Bir MERTK ligandı olan GAS6'nın ekspresyonu, glioblastoma multiforme'li hastalarda TAM reseptör kinaz sinyalizasyonunun önemini belirten kötü prognoza işaret eder. Küçük molekülü bir tirozin kinaz inhibitörü UNC2025 tarafından MERTK'nın spesifik inhibisyonu glioblastoma multiforme hücre canlılığını, proliferasyonunu, koloni oluşturma potansiyelini ve uyarılan poliploidiyi ve yaşlanmayı azalttığı gösterilmiştir (Sufit ve ark. 2016). Desidualizasyonda desidual hücrelerde poliploidi varlığı bilinen bir durumdur. Yukarıdaki literatüre uyumlu olacak şekilde MERTK ekspresyonu sağlıklı sekresyon fazında ki endometrium grubunda bez epiteli ve stromal hücrelerde izlenmezken stromal hücrelerin arasında bulunan az sayıdaki hücrelerde nükleer ve sitoplazmik boyanmalar izlenmekteydi. TP grubunda ve URPL grubunda desidua hücreleri MERTK proteinini eksprese etmemekteydi. Burada MERTK ekspresyonunun olmaması desidualizasyonda poliploidiyi uyarıcı faktörlerden bir tanesinin de MERTK olabileceğine işaret ediyor. Desiduada, bu DC / Mph fenotip

hücreleri spiral arterlerin yakınında bulunur ve sıklıkla uNK hücreleri ile kümelenir. Buna karşılık, olgun DC'ler lenfatik damarların yakınında ve T lenfositleri ile temas halinde bulunurlar (Vinketova ve Mourdjeva 2016). Dendritik hücre markırı CD11c ile MERTK ekspresyonlarına çiftli immunfloresan boyama ile baktığımızda; Sağlıklı endometriumda bulunan stromal hücrelerin arasında bulunan dendritik hücrelerde de MERTK ekspresyonu hem sitoplazmik hem de nükleer olarak gözlemlendi. TP grubunda, desidua hücrelerinin arasında ve trofoblast hücrelerinin bir arka sırasında bulunan dendritik hücrelerde de sitoplazmik olarak yoğun MERTK ekspresyonu izlendi. URPL grubunda hem desidua hücreleri arasında hem de trofoblast komşuluğunda bulunan dendritik hücreler, zayıf olarak nükleer, yoğun olarak da sitoplazmik MERTK ekspresyon etmekteydiler. Genel olarak baktığımızda sağlıklı endometriumda stromal hücreler arasında çok yoğun bulunan MERTK ekspresyon eden dendritik hücreler, URPL grubunda sayıca azalma göstermişti. Literatüre baktığımızda DC'ler üzerindeki MERTK indüksiyonu, devam eden bir bağışıklık tepkisini sınırlamak için kendi kendini düzenleyen bir mekanizma oluşturmaktadır. Bununla birlikte, MERTK'in bağışıklık tepkisinin düzenlenmesiyle T hücresi çoğalması üzerinde nötralize edici bir etki gösterir. DC'ler üzerindeki MERTK'in T hücrelerinde MERTK ile PROS1 etkileşimi aracılığıyla T hücresi aktivasyonunu ve genişlemesini kontrol ettiğini bildirilmiştir (Cabezón ve ark. 2015). Bu durumda dendritik hücrelerin üzerinde ekspresyon eden MERTK adaptif immün cevabın yıkıcı etkisinden fetüsü korumaktadır. MERTK ekspresyon eden dendritik hücrelerin, URPL grubunda sayıca azalmış olması gerçekleşen bu kaybın adaptif immün sistemin devreye girmesi sonucunda gerçekleşmiş olabileceği sorusunu akla getirmektedir.

Antijen sunan hücre olan dendritik hücre nükleus ve sitoplazmasında yoğun MERTK ekspresyonu izlendi. Farklı olarak URPL grubunda amniyotik epitelin trofoblast hücreleriyle değiştiği bölgede bulunan trofoblastik hücrelerde MERTK ekspresyonu nükleer, sitoplazmik ve membranöz boyanma göstermekteydi. TP grubunda insan materyali olması nedeni ile bu bölgeyi denk getiremedik. Bu bölgede ki ekspresyonu ile ilgili veri sunabilmemiz için denek sayısını arttırarak ilgili bölgenin eldesi sağlanmaya çalışılmalıdır.

Hem PROS1 hem de GAS6 Gla içeren proteinler, yani gama- karboksilatlı glutamik asit artıklarını içeren proteinlerdir. Gla alanı başlangıçta kan pıhtılaşma faktörü protrombin içerisinde tanımlanmıştı. Gla alanları, antikoagülan proteinlerde de bulunmaktadır. İnflamatuar yanıtı benzer şekilde pıhtılaşma patolojik trombozu önlemek için negatif düzenleme gerektirir. Aslında PROS1'in en iyi karakterize edilen fonksiyonu, TAM reseptöründen bağımsız olarak antikoagülan özelliğidir. PROS 1, kan dolaşımında yaklaşık 300nM bulunur ve burada bir başka Gla içeren protein olan aktifleştirilmiş Protein C (aPC) için kofaktör olarak görev yapar. Pıhtılaşma kaskadı ardışık proteaz aktivasyon reaksiyonları serisi aracılığıyla başlanır. Koagülasyon Faktörler V ve VIII, protrombin bölünmesi ve pıhtı oluşumu için gereklidir. PROS1-aPC, Faktör V ve VIII'in bozulmasını destekler ve trombin oluşumunu engeller. PROS1 ayrıca protrombin bölünmesini inhibe etmek için aPC'den bağımsız, antikoagülan fonksiyonlara sahiptir. GAS6'nın bilinen aPC kofaktör aktivitesi yoktur (Rothlin ve ark. 2015). PROS1 mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonu, TP desiduasında sağlıklı endometriuma oranla artış göstermekte, URPL desiduasında daha da belirgin olarak yükselmiştir. TP grubu koryonu ve URPL grubu koryonundaki PROS1 ekspresyonu değerlendirmesinde, URPL grubunda PROS1 ekspresyonunun hem gen hem protein düzeyinde artış gösterdiği görüldü. Desidua ve koryonda TAM ligandı ve antikoagülan özelliğe sahip PROS1 artışı sonucunda, MERTK ile etkileşime geçerek gebelik kaybına bağlı apoptotik hücre temizlenmesinde beraberce rol oynuyor olabilirler. Yada kuagülasyona yol açabilecek bilinmeyen bir etkene maruziyet karşısında PROS1'in aşırı artışı gerçekleşmiş ve bu da fagositik aktiviteyi artırarak fetusun kaybında rol oynuyor olabilir.

TYRO3 reseptörü TAM reseptörlerinin en az çalışıldığı down streamindeki yolları en az bilinenidir. TYRO3 sinyal yolları platelet agregasyonuna, hücre transformasyonuna ve osteoklastik kemik rezorpsiyonuna aracılık eder (Linger ve ark. 2008). TYRO3'ün apoptotik hücre fagositozunda önemli bir rol oynamadığı bildirilmiştir (Zagorska ve Traves 2014). TYRO3'de daha çok membranöz boyanma dikkat çekmiştir. Hücrelerin bağlanma yapışma gibi fonksiyonlarına aracılık ediyor olabilir mi? Hücreler arasında bariyer oluşumunda rol oynuyor olabilir mi? gibi sorular akla gelmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsanda sekresyon fazı endometriumda TAM reseptör kinaz ve ligandlarının gösterildiği ilk çalışmadır.

İlk trimester gebeliğinde desiduada TAM reseptör kinaz ve ligandlarının gösterildiği ilk çalışmadır.

İlk trimester gebeliğinde koryonda TAM reseptör kinaz ve ligandlarının gösterildiği ilk çalışmadır.

İlk trimester URPL desiduasında TAM reseptör kinaz ve ligandlarının gösterildiği ilk çalışmadır.

İlk trimester URPL koryonunda TAM reseptör kinaz ve ligandlarının gösterildiği ilk çalışmadır.

Gebelikte dendritik hücrelerle kolokalize alanların tespit edildiği ilk çalışmadır.

Epitelyal mezenşimal geçişte rolleri olan Trofoblast kök hücrelerinde gebelik durumunda AXL ekspresyonunun yapıldığı ilk çalışmadır.

Gebeliğe hazırlık aşaması ve ilk gebelik dönemlerinde desidual hücrelerde gerçekleşen desidualizasyonda görülen poliploidide MERTK reseptörünün rolü olabileceğini düşündüren ilk çalışmadır.

Kemik iliğindeki NK larda sitotoksik olmayan NK oluşumunda TAM reseptör kinazların rolü biliniyordu. uNK'ların oluşmasında ve olgunlaşmasında TAM reseptörlerinin rolüne yönelik işaretler gösteren ilk çalışmadır.

Makale aşamasına kadar vaka sayısı arttırılması çalışmanın güvenilirliğini arttırması açısından önemlidir.

Çalışmada maternal fetal kısımların çok net çizgilerle ayrılmasının imkansızlığından dolayı, Flowsitometri ile sorting yapılarak hücrelerin ayrılması ve her hücrede eksprese

olan reseptör ve ligandlarının kantitasyonunun yapılması, çalışmanın kalitesini arttırmak açısından çok önemlidir.



KAYNAKLAR

Al-Mukaynizi, F. B., A. AlKhuriji, Z. Babay, M. Addar, S. AlDaihan, M. Alanazi and A. S. Warsy. "Lack of Association between Angiotensin Converting Enzyme I/D Polymorphism and Unexplained Recurrent Miscarriage in Saudi Arabia." J Med Biochem 2016. **35**(2): 166-173.

Anderson, H. A., C. A. Maylock, J. A. Williams, C. P. Paweletz, H. Shu and E. Shacter "Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells." Nat Immunol (2003). **4**(1): 87-91.

Angelillo-Scherrer, A., L. Burnier, N. Flores, P. Savi, M. DeMol, P. Schaeffer, J. M. Herbert, G. Lemke, S. P. Goff, G. K. Matsushima, H. S. Earp, C. Vesin, M. F. Hoylaerts, S. Plaisance, D. Collen, E. M. Conway, B. Wehrle-Haller and P. Carmeliet "Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy." J Clin Invest (2005). **115**(2): 237-246.

Armant, D. R. "Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells." Dev Biol (2005). **280**(2): 260-280.

Bagheri, A., P. Kumar, A. Kamath and P. Rao "Association of angiogenic cytokines (VEGF-A and VEGF-C) and clinical characteristic in women with unexplained recurrent miscarriage." Bratisl Lek Listy (2017). **118**(5): 258-264.

Ball, E., J. N. Bulmer, S. Ayis, F. Lyall and S. C. Robson "Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion." J Pathol (2006). **208**(4): 535-542.

Balszan-Kowalska, I. "[Diagnosis of thrombophilia based on coagulation and genetic studies]." Ann Acad Med Stetin (2002). **48**: 179-193.

Bulmer, J. N., P. J. Williams and G. E. Lash "Immune cells in the placental bed." Int J Dev Biol (2010). **54**(2-3): 281-294.

Cabezón, R., E. A. Carrera-Silva, G. Florez-Grau, A. E. Errasti, E. Calderon-Gomez, J. J. Lozano, C. Espana, E. Ricart, J. Panes, C. V. Rothlin and D. Benitez-Ribas "MERTK as negative regulator of human T cell activation." J Leukoc Biol (2015). **97**(4): 751-760.

Camenisch, T. D., B. H. Koller, H. S. Earp and G. K. Matsushima "A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock." J Immunol (1999). **162**(6): 3498-3503.

Chakraborty, P., S. K. Goswami, S. Rajani, S. Sharma, S. N. Kabir, B. Chakravarty and K. Jana "Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance." PLoS One (2013). **8**(5): e64446.

Christiansen, O. B. "Reproductive immunology." Mol Immunol (2013). **55**(1): 8-15.

Cockburn, K. and J. Rossant "Making the blastocyst: lessons from the mouse." J Clin Invest (2010). **120**(4): 995-1003.

Coulam, C. B. "Association between infertility and spontaneous abortion." Am J Reprod Immunol (1992). **27**(3-4): 128-129.

Dizon-Townson, D., C. Miller, B. Sibai, C. Y. Spong, E. Thom, G. Wendel, Jr., K. Wenstrom, P. Samuels, M. A. Cotroneo, A. Moawad, Y. Sorokin, P. Meis, M. Miodovnik, M. J. O'Sullivan, D. Conway, R. J. Wapner, S. G. Gabbe, H. National Institute of Child and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units "The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus." Obstet Gynecol (2005). **106**(3): 517-524.

Eroglu, M., O. B. Ozakpinar, L. Turkgeldi, S. Sahin, D. Herkiloglu, B. Durukan and F. Uras "Plasma levels of growth arrest specific protein 6 are increased in idiopathic recurrent pregnancy loss." Eur Rev Med Pharmacol Sci **1**(2014). **8**(10): 1554-1558.

Fuchinoue, K., A. Fukui, H. Chiba, M. Kamoi, A. Funamizu, A. Taima, R. Fukuhara and H. Mizunuma "Expression of retinoid-related orphan receptor (ROR)gamma on NK22 cells in the peripheral blood and uterine endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss and unexplained infertility." J Obstet Gynaecol Res (2016). **42**(11): 1541-1552.

Gay, C. M., K. Balaji and L. A. Byers "Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy." Br J Cancer (2017). **116**(4): 415-423.

Goruppi, S., E. Ruaro and C. Schneider "Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts." Oncogene (1996). **12**(3): 471-480.

Hanna, J., O. Wald, D. Goldman-Wohl, D. Prus, G. Markel, R. Gazit, G. Katz, R. Haimov-Kochman, N. Fujii, S. Yagel, A. Peled and O. Mandelboim "CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells." Blood (2003). **102**(5): 1569-1577.

Heeb, M. J., J. Rosing, H. M. Bakker, J. A. Fernandez, G. Tans and J. H. Griffin "Protein S binds to and inhibits factor Xa." Proc Natl Acad Sci U S A (1994). **91**(7): 2728-2732.

Helige, C., H. Ahammer, G. Moser, A. Hammer, G. Dohr, B. Huppertz and P. Sedlmayr "Distribution of decidual natural killer cells and macrophages in the neighbourhood of the trophoblast invasion front: a quantitative evaluation." Hum Reprod (2014). **29**(1): 8-17.

Hsu, P. and R. K. Nanan "Innate and adaptive immune interactions at the fetal-maternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia." Front Immunol (2014). **5**: 125.

Ibrahim, M. I., A. R. Ramy, A. S. Abdelhamid, M. I. Ellaithy, A. Omar, R. M. Harara, H. Fathy and A. S. Abolouz "Maternal serum amyloid A level as a novel marker of primary unexplained recurrent early pregnancy loss." Int J Gynaecol Obstet (2017). **136**(3): 298-303.

Jeve, Y. B. and W. Davies "Evidence-based management of recurrent miscarriages." J Hum Reprod Sci (2014). **7**(3): 159-169.

Korshunov, V. A. "Axl-dependent signalling: a clinical update." Clin Sci (Lond) (2012). **122**(8): 361-368.

Lai, C. and G. Lemke "An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system." Neuron (1991). **6**(5): 691-704.

Leitich, H. and H. Kiss "Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol (2007). **21**(3): 375-390.

Lemke, G. "Biology of the TAM receptors." Cold Spring Harb Perspect Biol (2013). **5**(11): a009076.

Lemke, G. and C. V. Rothlin "Immunobiology of the TAM receptors." Nat Rev Immunol (2008). **8**(5): 327-336.

Liddell, H. S., K. Sowden and C. M. Farquhar "Recurrent miscarriage: screening for polycystic ovaries and subsequent pregnancy outcome." Aust N Z J Obstet Gynaecol (1997). **37**(4): 402-406.

Lindqvist, P. G., I. Balogh and B. Dahlback "Umbilical cord plasma levels of growth-arrest specific protein 6 in intrauterine growth restriction." Acta Obstet Gynecol Scand (2010). **89**(1): 22-26.

Linger, R. M., A. K. Keating, H. S. Earp and D. K. Graham "TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer." Adv Cancer Res (2008). **100**: 35-83.

Liu, X., Y. Gong, J. Jia, Y. Bai, S. Gui, T. Wang and R. Zhou "Plasma concentrations of sAxl are associated with severe preeclampsia." Clin Biochem (2014). **47**(3): 173-176.

Malawista, A., X. Wang, M. Trentalange, H. G. Allore and R. R. Montgomery "Coordinated expression of tyro3, axl, and mer receptors in macrophage ontogeny." Macrophage (Houst) (2016). **3**.

Medawar, P. B. "Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye." Br J Exp Pathol (1948). **29**(1): 58-69.

Mobley, R. J., D. Raghu, L. D. Duke, K. Abell-Hart, J. S. Zawistowski, K. Lutz, S. M. Gomez, S. Roy, R. Homayouni, G. L. Johnson and A. N. Abell "MAP3K4 Controls the Chromatin Modifier HDAC6 during Trophoblast Stem Cell Epithelial-to-Mesenchymal Transition." Cell Rep (2017). **18**(10): 2387-2400.

Modi, D. N., G. Godbole, P. Suman and S. K. Gupta "Endometrial biology during trophoblast invasion." Front Biosci (Schol Ed) (2012). **4**: 1151-1171.

Nagamatsu, T. and D. J. Schust "The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface." Reprod Sci (2010). **17**(3): 209-218.

Nagata, K., K. Ohashi, T. Nakano, H. Arita, C. Zong, H. Hanafusa and K. Mizuno "Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for

Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases." J Biol Chem (1996). **271**(47): 30022-30027.

Nakano, T., K. Higashino, N. Kikuchi, J. Kishino, K. Nomura, H. Fujita, O. Ohara and H. Arita "Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors." J Biol Chem (1995). **270**(11): 5702-5705.

Nelen, W. L., H. J. Blom, E. A. Steegers, M. den Heijer and T. K. Eskes "Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis." Fertil Steril (2000). **74**(6): 1196-1199.

Nybo Andersen, A. M., J. Wohlfahrt, P. Christens, J. Olsen and M. Melbye "Maternal age and fetal loss: population based register linkage study." BMJ (2000). **320**(7251): 1708-1712.

Practice Committee of the American Society for Reproductive, M. "Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion." Fertil Steril (2012). **98**(5): 1103-1111.

Rai, R., M. Backos, F. Rushworth and L. Regan "Polycystic ovaries and recurrent miscarriage--a reappraisal." Hum Reprod (2000). **15**(3): 612-615.

Regan, L., P. R. Braude and P. L. Trembath "Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion." BMJ (1989). **299**(6698): 541-545.

Reus, A. D., N. M. van Besouw, N. M. Molenaar, E. A. Steegers, W. Visser, R. P. de Kuiper, R. R. de Krijger, D. L. Roelen and N. Exalto "An immunological basis for chronic histiocytic intervillitis in recurrent fetal loss." Am J Reprod Immunol (2013). **70**(3): 230-237.

Robinson, D. R., Y. M. Wu and S. F. Lin "The protein tyrosine kinase family of the human genome." Oncogene (2000). **19**(49): 5548-5557.

Rothlin, C. V., E. A. Carrera-Silva, L. Bosurgi and S. Ghosh "TAM receptor signaling in immune homeostasis." Annu Rev Immunol (2015). **33**: 355-391.

Rothlin, C. V., S. Ghosh, E. I. Zuniga, M. B. Oldstone and G. Lemke "TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response." Cell (2007). **131**(6): 1124-1136.

Russell, P., L. Anderson, D. Lieberman, K. Tremellen, H. Yilmaz, B. Cheerala and G. Sacks "The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure I: Techniques." J Reprod Immunol (2011). **91**(1-2): 90-102.

Saito, S., A. Nakashima and T. Shima "Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies." J Reprod Immunol (2011). **90**(1): 91-95.

Sasaki, T., P. G. Knyazev, N. J. Clout, Y. Cheburkin, W. Gohring, A. Ullrich, R. Timpl and E. Hohenester "Structural basis for Gas6-Axl signalling." EMBO J (2006). **25**(1): 80-87.

Silver, R. M., Y. Zhao, C. Y. Spong, B. Sibai, G. Wendel, Jr., K. Wenstrom, P. Samuels, S. N. Caritis, Y. Sorokin, M. Miodovnik, M. J. O'Sullivan, D. Conway, R. J. Wapner, H. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units "Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications." Obstet Gynecol (2010). **115**(1): 14-20.

Soares, M. J., D. Chakraborty, S. J. Renaud, K. Kubota, P. Bu, T. Konno and M. A. Rumi "Regulatory pathways controlling the endovascular invasive trophoblast cell lineage." J Reprod Dev (2012). **58**(3): 283-287.

Stegers-Theunissen, R. P., G. H. Boers, H. J. Blom, F. J. Trijbels and T. K. Eskes "Hyperhomocysteinaemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae." Lancet (1992). **339**(8801): 1122-1123.

Stepan, H., J. Richter, K. Kley, S. Kralisch, A. Jank, W. Schaarschmidt, T. Ebert, U. Lossner, B. Jessnitzer, J. Kratzsch, M. Bluher, M. Stumvoll and M. Fasshauer "Serum levels of growth arrest specific protein 6 are increased in preeclampsia." Regul Pept (2013). **182**: 7-11.

Stirrat, G. M. "Recurrent miscarriage." Lancet (1990). **336**(8716): 673-675.

Stitt, T. N., G. Conn, M. Gore, C. Lai, J. Bruno, C. Radziejewski, K. Mattsson, J. Fisher, D. R. Gies, P. F. Jones and et al. "The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases." Cell (1995). **80**(4): 661-670.

Sufit, A., A. B. Lee-Sherick, D. DeRyckere, M. Rupji, B. Dwivedi, M. Varella-Garcia, A. M. Pierce, J. Kowalski, X. Wang, S. V. Frye, H. S. Earp, A. K. Keating and D. K. Graham "MERTK Inhibition Induces Polyploidy and Promotes Cell Death and Cellular Senescence in Glioblastoma Multiforme." PLoS One (2016). **11**(10): e0165107.

Sugiura-Ogasawara, M., Y. Ozaki, K. Katano, N. Suzumori and E. Mizutani "Uterine anomaly and recurrent pregnancy loss." Semin Reprod Med (2011). **29**(6): 514-521.

Suman, P., S. S. Malhotra and S. K. Gupta "LIF-STAT signaling and trophoblast biology." JAKSTAT (2013). **2**(4): e25155.

Svensson, J., M. C. Jenmalm, A. Matussek, R. Geffers, G. Berg and J. Ernerudh "Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10." J Immunol (2011). **187**(7): 3671-3682.

van der Meer, J. H., T. van der Poll and C. van 't Veer "TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis." Blood (2014). **123**(16): 2460-2469.

Vinketova, K., M. Mourdjeva and T. Oreshkova "Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity." J Pregnancy (2016). **2016**: 8689436.

Walker, F. J. "Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S." J Biol Chem (1980). **255**(12): 5521-5524.

Wallace, A. E., R. Fraser and J. E. Cartwright "Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership." Hum Reprod Update (2012). **18**(4): 458-471.

Wang, H. and S. K. Dey "Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models." Nat Rev Genet (2006). **7**(3): 185-199.

Yetman, D. L. and W. H. Kutteh "Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies." Fertil Steril (1996). **66**(4): 540-546.

Zagorska, A., P. G. Traves, E. D. Lew, I. Dransfield and G. Lemke "Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function." Nat Immunol (2014). **15**(10): 920-928.

Zhang, S., H. Lin, S. Kong, S. Wang, H. Wang, H. Wang and D. R. Armant "Physiological and molecular determinants of embryo implantation." Mol Aspects Med (2013). **34**(5): 939-980.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esmâ	Uyruğu	T.C.
Soyadı	KONUK	Tel no	0505 893 5060
Doğum tarihi	01.01.1977	e-posta	esma.konuk@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Lisesi	1993
Lisans	Hacettepe Üniversitesi	1999
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2008
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2017

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
TIBBİ SATIŞ TEMSİLCİSİ	DEVA HOLDİNG A.Ş.	2000-2002 EKİM
TIBBİ SATIŞ TEMSİLCİSİ	TAY-MED İLAÇ SAN.LTD.ŞTİ. (JANSEN-CİLAG)	2003-2005 EYLÜL
ARAŞ.GÖR.	AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI İMMUNOLOJİ BÖLÜMÜ	2005 EKİM-2008 MART
SAĞLIK TEKNİSYENİ	AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI	2008 MART-DEVAM

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İNGİLİZCE	ÜDS	62.5

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Tuberkülozlu hastalarda interferon gamma polimorfizmleri	BAP	1 yıl
3G Cep Telefonlarından Yayılan Elektromanyetik Radyasyonun Testis İnterstisyal ve Seminifer Tübül Hücrelerinde Endoplazmik Retikulum Stres Yolağı Üzerine Etkisi	BAP	1 yıl

Measurement of intracellular biomolecular oxidation in liver ischemia–reperfusion injury via immuno-spin trapping	TUBİTAK	
Neutral sphingomyelinase inhibition decreases ER stress-mediated apoptosis and inducible nitric oxide synthase in retinal pigment epithelial cells	BAP	
Sphingomyelinase Inhibition Decreases ER Stress-Mediated Apoptosis and Caspase Activation in Rat Ocular Hypertension	TUBİTAK	
Pentoxifylline Alleviates Early Brain Injury in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage	BAP	
The Healing Effects of Autologous Mucosal Grafts in Experimentally Injured Rabbit Maxillary Sinuses	BAP	
Ortodontide Kullanılan Braket ve Mini İmplant Materyallerinin Antibakteriyel Kaplama Sonucu Etkinliğinin Değerlendirilmesi	3501 TUBİTAK	
Gebeliğin başlangıcı ve devamında TAM reseptörleri ve ligandlarının uterinal immün toleransın gelişimindeki rolünün araştırılması	1001 TUBİTAK	

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

1.Pentoxifylline Alleviates Early Brain Injury in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage.

Goksu E¹, Dogan O², Ulker P³, Tanrıover G⁴, Konuk E⁴, Dilmac S⁴, Kirac E⁵, Demir N⁴, Aslan M⁶.

Acta Neurochir (Wien). 2016 Sep;158(9):1721-30. doi: 10.1007/s00701-016-2866-5. Epub 2016 Jun 16.

2. The Healing Effects of Autologous Mucosal Grafts in Experimentally Injured Rabbit Maxillary Sinuses.

Topdag M¹, Kara A¹, Konuk E², Demir N², Ozturk M¹, Caliskan S¹, Topdag DO¹, Ulubil A³, Keskin IG¹, Iseri M¹.

Clin Exp Otorhinolaryngol. 2016 Mar;9(1):44-50. doi: 10.21053/ceo.2016.9.1.44. Epub 2016 Mar 7.

3- Neutral sphingomyelinase inhibition decreases ER stress-mediated apoptosis and inducible nitric oxide synthase in retinal pigment epithelial cells.

Kucuksayan E, **Konuk EK**, Demir N, Mutus B, Aslan M.

Free Radic Biol Med. 2014 Jul;72:113-23. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.013. Epub 2014 Apr 15.

4- Measurement of intracellular biomolecular oxidation in liver ischemia-reperfusion injury via immuno-spin trapping.

Dogan S, Ozlem Elpek G, **Kirimlioglu Konuk E**, Demir N, Aslan M.

Free Radic Biol Med. 2012 Aug 1;53(3):406-14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.028. Epub 2012 May 23.

5- Neutral sphingomyelinase inhibition alleviates apoptosis, but not ER stress, in liver ischemia–reperfusion injury

H Tuzcu, B Unal, E Kirac, E Konuk, F Ozcan, GO Elpek, N Demir, M Aslan

Free Radical Research, 1-16

6- Sphingomyelinase Inhibition Decreases ER Stress-Mediated Apoptosis and Caspase Activation in Rat Ocular Hypertension

M Aslan, EK Konuk, E Kucuksayan, M Unal, A Ciftcioglu, N Demir, ...

Free Radical Biology and Medicine, S43

7- Interferon Gamma (IFN- γ) Promoter and P2X7 Polymorphisms in Turkish Tuberculosis Patients Article · **August 2016**

