



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**TÜP BEBEK UYGULAMALARINDA TEKRARLAYAN
İMLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN
KADINLARIN ENDOMETRİAL MİKROBİYOTASININ
VE HİSTOLOJİK GÜNÜNÜN İMLANTASYON
BAŞARISIZLIĞI OLMAYAN KADINLAR İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

HANDE YEĞENOĞLU AKÇINAR

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2022



**TÜP BEBEK UYGULAMALARINDA TEKRARLAYAN İMPLANTASYON
BAŞARISIZLIĞI OLAN KADINLARIN ENDOMETRİAL
MİKROBİYOTASININ VE HİSTOLOJİK GÜNÜNÜN İMPLANTASYON
BAŞARISIZLIĞI OLMAYAN KADINLAR İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Hande YEĞENOĞLU AKÇINAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hande YEĞENOĞLU AKÇINAR

26.01.2022

TÜP BEBEK UYGULAMALARINDA TEKRARLAYAN İMPLANTASYON
BAŞARISIZLIĞI OLAN KADINLARIN ENDOMETRİYAL MİKROBİYOTASININ VE
HİSTOLOJİK GÜNÜNÜN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLMAYAN
KADINLAR İLE KARŞILAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Hande YEĞENOĞLU AKÇINAR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2022

ÖZET

Çalışmalarımızda, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan 15 gönüllü ve tüp bebek tedavisi sonrası canlı doğum elde edilmiş olan 15 gönüllü olarak, toplamda 30 kadının endometriyal biyopsi örnekleri kullanılmıştır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalar çalışma grubunu; IVF sonrası canlı doğum yapmış hastalar ise kontrol grubunu oluşturacak şekilde çalışma tasarlanmıştır. Noyes kriterlerince anlamlı bir gün sapması gruplar arasında mevcut değildir. Elde edilmiş olan bu endometriyal biyopsi örneklerinden; hem 16S metagenom analizi, hem de immünohistokimyasal çalışmalar yürütülmüştür. Metagenom analizi için kontrol ve çalışma gruplarında öncelikle, bakteri çeşitliliği, tür bazında incelenmiş ancak bu iki grup arasında belirgin bir bakteriyel flora farklılığı görülmemiştir. Ardından Lactobacillus cinsinin baskınlığının (%90 ve üzeri) IVF tedavisinin başarısında etkili olup olmadığını ortaya koymak için gruplar arası analiz yapılmıştır. Elimizdeki biyopsi örneklerinde bu baskınlığın, gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermediği saptanmıştır. Basigin, E-kadherin ve okludin proteinlerine karşı geliştirilen antikorlar ile yapılan immünohistokimyasal incelemelerde ise yüzeyde, bez epiteline ve stromada bu proteinlerin her birinin ifadesi gruplar arasında ortaya konulmuştur. Kontrol ve çalışma grupları arasında fark görülmemiş yeni bir gruplama yapılarak, bu proteinlerin ifadeleri, Lactobacillus oranının %90 'nın altında olduğu 1. Grup ve % 90 ve üzerinde olduğu 2. Grup arasında karşılaştırılmıştır. Buna göre E-kadherin tutulumu, stromada, 1. Grupta 2. Gruba göre daha yüksek tespit edilmiştir(p: 0,024). Okludin ifadesinin ise bez epiteline ve stromada gene 1. Grupta 2. Gruba göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, çalıştığımız gönüllülerde bakteri florasındaki farklılığın, tekrarlayan başarısızlığı olan hastalarda direkt etkili olmadığını, ancak endometriyumda bulunan e-kadherin, okludin gibi implantasyon için önemli olan proteinlerin ifadesinde farklılık yaratabileceği ortaya konulmuştur.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Basigin, E-kadherin, Okludin, İmplantasyon, Noyes Kriterleri
Sayfa Adedi : 103
Danışman : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

THE COMPARISON OF ENDOMETRIAL MICROBIOTA AND HISTOLOGIC DAY
OF WOMEN HAVING REPEATING IVF IMPLANTATION FAILURE WITH WOMEN
WHO DON'T HAVE IMPLANTATION FAILURE

(M. Sc. Thesis)

Hande YEĞENOĞLU AKÇINAR

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2022

ABSTRACT

In our studies, endometrial biopsy samples of a total of 30 women were used in 15 volunteers with recurrent implantation failure and 15 volunteers who had a live birth after IVF treatment. Patients with recurrent implantation failure formed the study group; The study was designed so that the patients who had a live birth after IVF is the control group. There was no significant day deviation between groups by Noyes criteria. From these obtained endometrial biopsy samples; both 16S metagenome analysis and immunohistochemical studies were carried out. For metagenome analysis, bacterial diversity was primarily examined on the basis of species in the control and study groups, but no significant bacterial flora difference was observed between these two groups. Then, between-group analysis was performed to reveal whether the dominance of the Lactobacillus genus (90% and above) was effective in the success of IVF treatment. In the biopsy samples we have, it was determined that this dominance did not show a significant difference between the groups. In immunohistochemical studies with antibodies developed against basigin, E-cadherin and occludin proteins, the expression of each of these proteins on the surface, glandular epithelium and stroma was revealed between groups. No difference was observed between the control and study groups, a new grouping was made and the expression of these proteins was compared between Group 1, where the Lactobacillus ratio was below 90%, and Group 2, where the ratio of Lactobacillus was below 90% and above. Accordingly, E-cadherin uptake in the stroma was higher in Group 1 than in Group 2 (p: 0.024). Occludin expression in the gland epithelium and stroma was higher in Group 1 than in Group 2. As a result, it was revealed that the difference in the bacterial flora of the volunteers we studied was not directly effective in patients with recurrent failure, but it could cause a difference in the expression of proteins that are important for implantation, such as e-cadherin and occludin in the endometrium.

Science Code : 1033
Key Words : Basigin, E-cadherin, Occludin, Implantation, Noyes Criteria
Page Number : 103
Supervisor : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

TEŞEKKÜR

"Tüp Bebek Uygulamalarında Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı Olan Kadınların Endometrial Mikrobiyotasının ve Histolojik Gününün İmplantasyon Başarısızlığı Olmayan Kadınlar ile Karşılaştırılması" başlıklı ve TSA-2018-16987 kodlu projemize sağlamış oldukları destekle yüksek lisans tez çalışmamı yürütmemde destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne vermiş olduğu maddi desteğinden ötürü teşekkürler.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bilgisini ve desteğini benden hiç esirgemeyen, tecrübesi ve özverisi ile bana her zaman yol gösteren çok değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız, Sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a, Laboratuvar deneyimlerini, yüksek bilgisini ve zamanını benden esirgemeyen, tüm deney sürecinde bana destek olan, Öğr. Gör. Dr. Esra SAVARİ ÖZKOÇER'e, yüksek lisans eğitim sürecimde bilimsel birikimleri ile katkı sağlayan, her zaman bana destek olan değerli hocam, Prof. Dr. Gürkan BOZDAĞ'a emeklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Çalışmamızın kurulum ve işleyiş basamaklarında deneyimlerini ve yardımlarını bizden esirgemeyen, ayrıca gönüllülerimizden endometriyal biyopsi örneklerinin alınması işlemlerini gerçekleştiren Sayın Doç. Dr. Sezcan MÜMÜŞOĞLU'na, bu aşamada yardım ve desteklerinden dolayı Arş. Gör. Dr. Ali Can GÜNEŞ'e ve Op. Dr. Gonca ÖZTEN DERE'ye, örnek alımlarını gerçekleştirmiş olduğumuz Hacettepe Tüp Bebek Ünitesi'nde katkısı olan tüm ekibe, biyopsi örneklerimizin mikrobiyom analizlerini gerçekleştiren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Çağman TAN'a, biyoistatistik çalışmalarımızı yürüten Dr. Öğr. Üyesi İdil YET'e ve Arş. Gör. Ebru ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan, sonsuz inanç, destek ve sabır ile her zaman yanımda olduklarını hissettiren dostlarım ve aileme; Prof Dr. Ahmet COŞAR'a, Hüseyin ÖNSÜREN'e, biricik annem Lutfiye YEĞENOĞLU'na, beni hep izlediğine inandığım, derin özlem ve sevgiyle tüm kalbimle yanımda olduğunu bildiğim canım babam Sami YEĞENOĞLU'na, sevgili eşim Necip AKÇINAR'a ve varlığıyla tüm hayatımı değiştiren, anlamlı kılan, çok değerli kızım Derin AKÇINAR'a SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Fertilizasyon ve İmplantasyon	5
2.1.1. Fertilizasyon sürecinde spermde oluşan değişimler	6
2.1.2. Fertilizasyon sürecinde oositte oluşan değişimler	10
2.1.3. Fertilizasyon sürecinde pronükleusların (PN) oluşumu	11
2.1.4. Fertilizasyon sonrası blastosist implantasyonu.....	14
2.1.5. İmplantasyon penceresi	21
2.1.6. Endometrial epiteldeki adezyon molekülleri, doku bütünlüğü ve embriyo implantasyonu üzerindeki etkileri	22
2.1.7. Hücreler arasındaki bağlantılar ve implantasyondaki rolleri.....	36
2.2. İnfertilizasyon ve IVF Teknikleri	38
2.3. Endometrial Günleme ve Noyes Kriterleri	39
2.4. Mikrobiyota ve Mikrobiyom Kavramları	41
2.4.1. Kadın üreme sistemi mikrobiyotası	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Deneysel Yöntem ve Hazırlık Aşaması	45

	Sayfa
3.2. Metagenom Analizi.....	46
3.3. Işık Mikroskopik Yöntem	46
3.3.1. Hematoksilen – Eozin (H&E) boyaması	47
3.3.2. Masson’un üçlü boyaması	48
3.3.3. İmmünohistokimyasal (IHC) yöntem	48
3.4. İstatistiksel Yöntem	50
4. BULGULAR	51
4.1. Metagenom Analiz Bulguları.....	51
4.2. Işık Mikroskopik Yöntem Bulguları	54
4.2.1. Endometriyal günleme için yapılmış histokimyasal boyama bulguları.....	54
4.2.2. İmmünohistokimyasal (IHC) boyama bulguları	56
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	77
EKLER.....	100
EK-1. Etik Kurul Kararı.....	101
ÖZGEÇMİŞ	102

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Mann-Whitney U testi kullanılarak, kontrol ve çalışma grupları arasındaki; IHC analizlerinin, gün sapmalarının ve Lactobacillus cinsi bakterilerin bulunma yüzdelerinin istatistiksel karşılaştırmaları	56
Çizelge 4.2. 1. Grup (% 90 altında Lactobacillus cinsini içerenler) ve 2. Grup (%90 ve üzerinde Lactobacillus cinsini içerenler) arasındaki sonuçların, Mann-Whitney U testi kullanılarak, IHC farklılıklar ve gün sapması yönünden karşılaştırılması. İstatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar ($0.01 \leq p < 0.05$) tabloda sarı ile gösterilmiştir	58

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Fimbria, oositi folikülün yırtıldığı bölgede yakalayarak tüpün içine doğru süpürür.....	5
Şekil 2.2. Fertilizasyon sürecinde spermin oosit çevresindeki yapıları aşarak oosit stoplazması içine girişi	9
Şekil 2.3. A. Fertilizasyondan hemen önce ovülasyonla atılmak üzere olan oosit. B. Bir spermatozoon ikinci mayotik bölünmesini tamamlamış olan oositin içine girmiştir. Oositin kromozomları veziküler bir nükleus içinde, dışı PN, hazır durumda beklemekt edirler. Bir kaç spermin başı ZP'ye takılıp kalmıştır. C. Erkek ve dışı PN'ler.	12
Şekil 2.4. PN'lerin kaynaşması.....	13
Şekil 2.5. Oositin blastosist evresine ulaşınca kadar geçirmiş olduğu süreç	14
Şekil 2.6. Zigotun iki hücre evresinden geç morula evresine gelişimi	15
Şekil 2.7. A. 107 hücreli insan blastosist kesiti, B. Fertilizasyondan 4.5 gün sonra uterus boşluğundan alınmış bir insan blastosistinin şematik gösterimi, C. Gelişimin 9. gününde bir blastosistin şematik gösterimi	16
Şekil 2.8. Over ve uterus mukozasındaki eş zamanlı değişikliklerin şematik görünümü.....	17
Şekil 2.9. Uterusta insan embriyo implantasyonu.	20
Şekil 4.1. Kontrol grubu ve hasta grubunun bakteri çeşitlilik farklılığı açısından incelenmesi amacıyla oluşturulmuş temel bileşenler analiz grafiği.....	52
Şekil 4.2. Bakteri çeşitliliğinin kontrol ve çalışma grupları arasındaki farklılığını incelemek amacıyla çalışılmış ısı haritası	53

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Fertilize olmuş bir oosit	13
Resim 2.2. Hücrelerin dış hatlarının kaybolmaya başlayarak, kompaktlaşmanın oluşumu	15
Resim 2.3. Noyes kriterleri altındaki temel özelliklerle, adet döngüsünün 16-24 günlerinde endometriyumun histolojik analizi için H&E boyaması	41
Resim 4.1. Kontrol (a) ve çalışma (b) grubundan hematoksil-eozen boyama örnekleri 17. güne ait örneklerde glandular epitelde psödostratifikasyon azalmıştır.	55
Resim 4.2. Kontrol (a) ve çalışma (b) grubunda, 17. günden Masson'un üçlü boyama örnekleri, stromal ödem bu günlerde görülmemektedir	56
Resim 4.3. Anti-Basigin antikoru kullanılarak, yüzey epitelinde yapılmış olan immüno-histokimyasal boyamalar	59
Resim 4.4. Anti-Basigin antikoru kullanılarak, bez epitelinde yapılmış olan immüno-histokimyasal boyamalar	60
Resim 4.5. Anti-Basigin antikoru kullanılarak, stromada yapılmış olan immüno-histokimyasal boyamalar	60
Resim 4.6. Anti-E-kadherin antikoru kullanılarak, yüzey epitelinde yapılmış olan immüno-histokimyasal boyamalar	61
Resim 4.7. Anti-E-kadherin antikoru kullanılarak, bez epitelinde yapılmış olan immüno-histokimyasal boyamalar	61
Resim 4.8. Anti-E-kadherin antikoru kullanılarak, stromada yapılmış olan immüno-histokimyasal boyamalar	62
Resim 4.9. Anti-Okludin antikoru kullanılarak, yüzey epitelinde yapılmış olan immüno-histokimyasal boyamalar	62
Resim 4.10. Anti-Okludin antikoru kullanılarak, bez epitelinde yapılmış olan immüno-histokimyasal boyamalar	63
Resim 4.11. Anti-Okludin antikoru kullanılarak, stromada yapılmış olan immüno-histokimyasal boyamalar.	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
sn	Saniye
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
AKAP	A-Kinase Anchor Protein (A-Kinaz Bağlayıcı Protein)
AOF	Oocyte Activating Facto (Oosit Aktivasyon Faktörü)
ASRM	Amerikan Üreme Tıbbi Derneği (Amerikan Üreme Tıbbi Derneği)
ECM	Ekstraselüler Matrix (Hücre Dışı Matriks)
ER	Endoplazmik Retikulum (Endoplazmik Retikulum)
ESC	Endometrial Stromal Cells (Endometriyal Stromal Hücre)
H&E	Hematoksilen- Eozin
HSPG	Heparan Sülfat Proteoglikan (Heperan Sülfat Proteoglikanlar)
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection (İntra-Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)
IgSF	İmmüoglobulin Süper Ailesi (İmmüoglobulin Süper Ailesi)
IHC	İmmünohistokimyasal (İmmünohistokimyasal)
IL-6	İnterlökin-6 (İnterlökin-6)
IP3	İnositol 1,4,5-Trifosfat (İnositol 1,4,5-Trifosfat)
IVF	In-Vitro Fertilization (Yardımcı Üreme)
KOH	Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon
MMP	Matriks Metalloproteaz (Matriks Metalloproteaz)
N-CAM	Nöral Yapışma Molekülü (Nöral Hücre Adezyon Molekülü)
OD	Ortanca Değer

Kısaltmalar	Açıklama
PN	Pronükleus (Pronükleus)
RGD	Arginin-Glisin Aspartik Asit (Arginin-Glisin Aspartik Asit)
RIF	Repeated Implantation Failure (Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı)
ROS	Reactive Oxygen Species (Serbest Oksijen Türevleri)
rRNA	Ribozomal RNA (Ribozomal RNA)
VM	Vajinal Mikrobiyom
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
ZO-1	Zona Okludens-1
ZP	Zona Pellusida

1. GİRİŞ

Taze veya dondurulmuş olarak transferi gerçekleştirilmiş iyi kalitedeki embriyolara rağmen, en az üç siklusta gebelik elde edilemeyen durumlar, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (RIF) olarak tanımlanmaktadır. İmplantasyon; embriyonun endometrium luminal yüzeyine bağlandığı, ardından da epitel yoluyla göçünü ve invazyonunu içeren bir süreçtir. Kaliteli embriyo transferlerine rağmen ard arda gebelik elde edilememesi RIF şeklinde adlandırılmaktadır. Ancak bu tüp bebek denemelerinde başarısız siklus sayısını veya transfer edilen toplam embriyo sayısını tanımlayan resmi bir kriter yoktur. Buna göre, IVF uygulayan farklı merkezler, RIF için farklı tanımlar kullanabilirler (Shufaro ve Schenker, 2011). İmplantasyon süreci, implantasyon potansiyeline sahip olması gereken sağlıklı bir embriyo ve bunu mümkün kılacak alıcı bir endometrium olmak üzere iki ana bileşeni içermektedir. Embriyo ve endometrium arasında karmaşık ilişkiler mevcuttur. Başarılı bir implantasyon için embriyonun invazyonu zorunlu bir süreçtir. Bu süreçler çok kapsamlı araştırmalar altındadır. İmplantasyon bünyesinde, embriyo ve endometriyumdaki kaynaklanan bir çok aracıyı; hatta annenin immünolojik sistemini de barındırıp bunlardan etkilenmektedir (Achache ve Revel, 2006; Fukui ve arkadaşları, 2011; Gonen-Gross ve arkadaşları, 2010). Embriyoda, endometriyumda veya bağışıklık sisteminde herhangi bir anormallik, implantasyon başarısızlığına neden olacaktır. Bu nedenle, RIF değerlendirilirken kişinin; embriyo, uterus ve fonksiyonel endometriyum referans alınarak değerlendirilmelidir. Buna göre, RIF tedavisi, tespit edilen anormalliğe ve implantasyon başarısızlığına katkıda bulunabilecek herhangi bir olası sıkıntının düzeltilmesine yönelik olmalıdır (Margalioth ve arkadaşları, 2006; Shufaro ve Schenker, 2011).

Son yıllarda, dişi genital sistemde mevcut olan bakteri florasının, IVF başarısında etkisi olduğu düşüncesi ile, bu konudaki araştırmalar genişletilmiştir. Yüksek verimli DNA sekanslamanın geliştirilmesinden önce vücut içinde bulunan bakteri türlerinin belirlenmesi için kültür bazlı yöntemler kullanılırdı. Ancak son 20 yıl içerisinde gen sekanslamasındaki ilerlemeler mikrobiyom sekanslamasını hızlandırmıştır (Gonzalez ve arkadaşları, 2011; Peterson ve arkadaşları, 2009). Vajinal mikrobiyom profilleri 16S ribozomal RNA (rRNA) profillemesi (PCR ve pyro-sekanslama ile 16S rRNA gen sekanslaması), Sanger sekanslama veya tüm genom sekanslama (Sirota ve arkadaşları, 2014) ile üretilmiştir. İnsan mikrobiyom projesindeki son bulgular göstermektedir ki vajinal sistemde *Lactobacillus*'un çeşitli türlerinin bulunmasına rağmen sadece bir kaç tanesi baskın durumdadır; gerçekten

de gastrointestinal mikrobiyoma göre üreme sistemindeki mikrobiyal çeşitlilik oldukça azdır (Gonzalez ve arkadaşları, 2011; Peterson ve arkadaşları, 2009). Bu ilerlemeler mikrobiyal komünite analizi alanını ve daha sonra da onunla doğrudan ya da dolaylı etkilenen fertilité ve üreme gibi sağlık alanlarını değiştirmiştir. Gerçekten de bu değişim yerleşik mikrobiyal komünitelerin yapısının ve kompozisyonunun üreme sağlığı ve fertilité sonuçları üzerindeki etkisini tanımlayan yayınların sayısındaki üstel artıştan görülmektedir (Green ve arkadaşları, 2015; Haahr ve arkadaşları, 2016; Ma ve arkadaşları, 2012; Nuriel-Ohayon ve arkadaşları, 2016). “Sağlıklı” bir vajinal mikrobiyomu, genel olarak hastalık bulgularının ve çeşitli enfeksiyonların bulunmaması olarak tanımlanır ve iyi gebelik sonuçları ile ilişkilendirilmiştir. “Normal” vajinal mikrobiyomu gebe olmayan sağlıklı kadınlarda ağırlıklı Lactobacillus türlerini içerir ve embriyo için ön ve gebelik öncesi dönemde sağlıklı ve destekleyici bir çevreyi güçlendirir (Sirota ve arkadaşları, 2014). Bir kadının hayatı boyunca hormonal ve yaşam stili değişikliklerine bağlı olarak VMB’inde dramatik kaymalar olur. Bu komünitelerin karmaşıklığı ve bu değişiklikleri etkileyen çevresel faktörler henüz tam olarak tanımlanmamış olmakla birlikte, yeni nesil DNA sekanslama teknolojilerinin kullanılması bu alandaki bilgiyi daha ileriye taşıyacaktır. Sağlıklı bir vajinal mikrobiyota üriner sistem enfeksiyonları ve BV gibi ürogenital durumların önüne geçilmesine yardımcı olabilir; bu nedenle VMB’nin daha iyi anlaşılmasına yol açan çalışmalar bu durumlar için iyileştirilmiş tedavi ve tanımlamaların keşfedilmesine yardımcı olacaktır. Vajinal mikrobiyotanın kompozisyonunun hamilelik ve yenidoğan sonuçları üzerinde dikkat çekici bir etkisi vardır. Moreno ve arkadaşlarının yakın zamandaki bir çalışmasında endometriyal mikrobiyota kompozisyonunun IVF uygulanan kadınların hamilelik sonuçlarını etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. İlginç bir şekilde, yazarlar olumsuz hamilelik sonuçları ile Lactobacillus türleri bakımından zayıf olan endometriyal mikrobiyotalar arasında korelasyon ilişkisi bulmuşlardır (Moreno ve arkadaşları, 2016).

Biz de buradan yola çıkarak tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastaların vajinal mikrobiyomlarında enfeksiyon olup olmadığını ve genel olarak floralarının, IVF başarısına etkisini gözlemlemek amacıyla 16S sekanslama ile metagnom analizi planladık ve bazı çalışmalarda beklenen ideal endometriyal mikrobiyota ile kıyasladık.

Ayrıca implantasyonda güçlü etkileri olduğu düşünülen, Basigin, E-kadherin ve Okludin proteinlerinin endometriyumdaki, yüzey epitelinde, bez epitelinde ve stromada ayrı ayrı

ifadelerinin belirlenebilmesi amacıyla immünohistokimyasal çalışmalar tasarlanmıştır. Basigin, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve doku yeniden şekillenmesinde rol oynayan bir transmembran glikoproteinidir ve dişi üremesi için gerekli olduğu gösterilmiştir, ancak normal uterus fonksiyonundaki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Doğurganlık çalışması verileri, mutant farelerin kontrollere kıyasla doğurganlığı önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu sonuçlarla, Basigin'in başarılı gebelik için, implantasyon ve desidualizasyonda fonksiyonlarını desteklediği gösterilmiştir (Li ve arkadaşları, 2021). Kadherinler, hücreler arası yapışmanın kalsiyuma bağımlı mekanizmalarından sorumlu olan bir glikoprotein ailesidir. E-kadherinler embriyogenezde; gastrulasyon, nörolasyon ve organogenezde merkezi bir rol oynarlar. E-kadherin üretiminin baskılanması, hücre içi adezyonu bozar. Luteal fazda, E-cadherin mRNA seviyeleri önemli ölçüde artar. E-kadherinlerin ifadesi, endometriyal kalsitonin ile birlikte progesteron tarafından düzenlenir (Shirane ve arkadaşları, 2012). Embriyo implantasyonu sırasında, endometriyal epitelde, E-Kadherin ifadesinin modeli üzerinde çeşitli tartışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalar, embriyo implantasyon bölgesinde, endometriyal epitel hücrelerde, E-Kadherin kaybı olduğunu, bazıları da artış olduğunu bildirirken diğer taraftan bazı çalışmalarda ise fark görülmediği raporlamıştır. Okludin ise, sıkı bağlantıların stabilizasyonuna ve optimal bariyer fonksiyonuna katkıda bulunan bir integral membran proteindir. Bu sıkı bağlantıların da implantasyon sırasında nasıl ve ne zaman etkilendiği tartışmalıdır. Görüldüğü üzere çok önemli olan bu proteinlerin mekanizmaları tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Biz çalışmamızda bu proteinlerin antikorlarını kullanarak gruplar arasında immünohistokimyasal karşılaştırmalar yapmayı hedefledik. Bu alandaki çalışmaların çoğu insan endometriyumunda yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın özgünlüğü yüksektir. Bu proteinlerin ifadeleri çalışmalarda hep dönemsel farklılıklar göstermiştir. İmplantasyon öncesinde, implantasyon sırasında ve gebeliğin farklı günlerinde ifadeleri güçlü ya da oldukça zayıf olabilir. Biz çalışmamızda ovülasyon test kiti kullandığımız için aldığımız örneklerin implantasyon penceresi aralığında olduğunu belirleyebildik.

Diğer bir histolojik çalışma olarak (H&E) boyaması ve Masson'un üçlü boyaması ile Noyes kriterlerine göre, gönüllülerin endometriyal günlerini değerlendirdik. Çıkan sonuçları, teste göre belirlenmiş olan günler ile karşılaştırarak gün sapması hesaplandı. Bu önemliydi çünkü; endometriumun histolojik gelişiminde 2 günden daha fazla olacak bir gecikme luteal faz yetmezliğinin tanımıdır. Bu yetmezliğin tanımlanmasında ise literatürde en sık baş vurulan yöntem; Noyes ve arkadaşlarının (Noyes ve arkadaşları, 1950) tarif

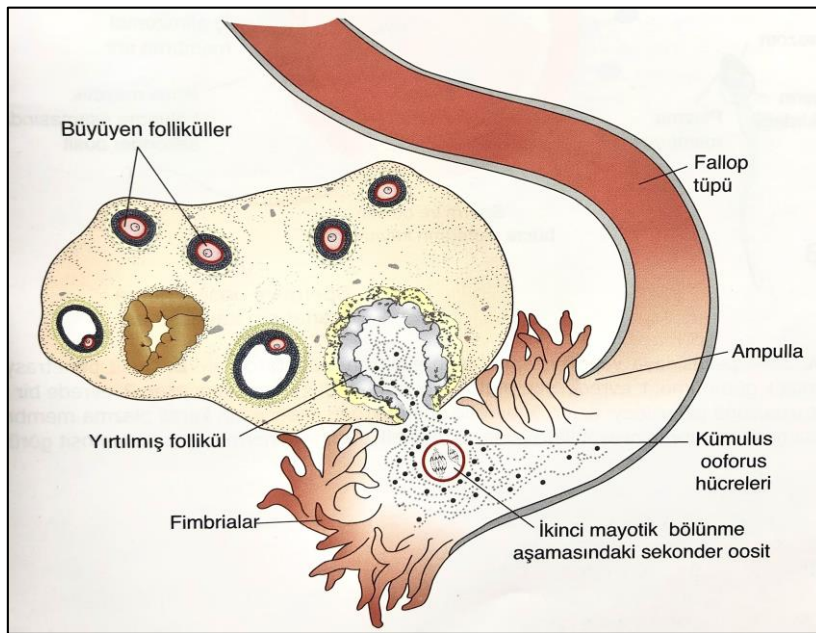
ettiği klasik kriterlere göre yapılmaktadır. Günümüzde de hala güncel olarak kullanılan bu kriterler endometriyal günleme açısından önemini korumaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fertilizasyon ve İmplantasyon

İnsan üremesi, gametogenezis, folikülogenezis, ovülasyon, fertilizasyon ve implantasyon gibi aşamalardan geçerek gerçekleşir ve tüm bu süreç hassas bir dengede ilerler. Bireyin varlığını başlatan fertilizasyon, erkek gamet olan spermin, dişi gamet ile yani oosit ile birleşmesi olarak tanımlanabilir (Sadler, 2010). Yani sperm ve oosit yeni bir bireyi oluşturmak üzere çekirdek ve tüm sitoplazmik bileşenlerin katılımıyla gerçekleşen bir olaylar dizisidir. Fertilizasyon tamamlanmış olduğunda anne ve babadan gelen kromozomlar yeni bir kombinasyon oluşturarak diploid reorganizasyonu sağlarken yeni oluşan bireyin cinsiyeti de belirlenir. Bu özellik gametlerin olgunlaşma sürecinde kromozom sayısını yarıya indirgeyen mayoz bölünme ile sağlanmaktadır (Sadler, 1985; Junguieria ve Carneira, 1983; Wassarman, 1987; Longo, 1997). Fertilizasyon ile kromozomlarının yarısı anne ve yarısı babadan gelen eşsiz bir genetik yapıya sahip olan zigot oluşur (Norwitz ve arkadaşları, 2001).

Dişi ve erkek gametlerin birbiriyle birleşip kaynaşması anlamına gelen döllenme, uterus tüplerinin ampuller bölgesinde gerçekleşir. Bu bölge, tüpün en geniş ve overe en yakın bölümüdür (Şekil 2.1). Spermier dışının üreme kanallarında birkaç gün boyunca canlı kalabilmektedir (Sadler, 2017).



Şekil 2.1. Fimbria, oositi folikülün yırtıldığı bölgede yakalayarak tüpün içine doğru süpürür (Sadler, 2017)

Vajene dolan spermilerin %1 kadarı serviksten geçebilecektir. Buraya kadar ulaşabilen spermier canlılıklarını saatler boyu koruyabilirler. Spermier uterus ve t p duvarlarındaki kasılmalar ile serviksten, fallop tüplerine doğru kendi propulsif hareketleriyle yol alırlar. Spermin bu yolculuğu 30 dk ve 6 gün arasında değişiklik gösterir. İstmusa ulaştıklarında motiliteleri ve hızları yavaşlar. Ovülasyon ile birlikte oositi çevreleyen kümülüs hücrelerince salgılanan kemostatik maddelerin etkisi ile spermier yeniden hareketlenerek döllenmenin sıklıkla ger ekleştii ampullaya doğru yüzmeye devam ederler. Dişi  reme kanalı içerisindeki spermierin oositi d lleyecek yeteneğe kavuşabilmeleri için spermatozoanın kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu denilen değişimleri geçirmelidirler (Sadler, 2017). Spermin, oositi fertilize edeceği zamana dek geçireceği işlemler sırasıyla hareketliliğindeki değişim, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, zona pellusida'ya penetrasyon, oolemmaya bağlanma ve membran füzyonudur. Testis içinde hareketsiz bekleyen spermier, epididimde hareketli olsalar dahi, tam hareketliliğe ejakulasyon ve kapasitasyondan sonra ulaşırlar (Bedford, 2008; Bailey, 2010). Oositte gerçekleşen yapısal değişiklikleri ise kortikal reaksiyon, zona reaksiyonu, ve oosit aktivasyonu olarak sıralayabiliriz.

2.1.1. Fertilizasyon sürecinde spermde oluşan değişimler

Fertilizasyon sürecinde spermierde kapasitasyon

Spermier kapasitasyon sürecini dişi genital kanallarında, salgıların da etkisi ile tamamlarlar. Ancak bu kapasitasyon sürecinin lokalizasyon olarak nerede başlayıp nerede tamamlandığını bilmemekle birlikte, genellikle spermin depolandığı yere göre değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (Delilbaşı, 2008).

Bu süreçte spermin akrozomal bölgesini kaplayan plazma membranındaki glikoprotein örtüsü ve seminal plazma proteinleri ortadan kaldırılır. Kapasitasyonunu tamamlamış bir sperm ancak korona hücrelerinin arasından geçebilir ve akrozom reaksiyonuna girebilir (Sadler, 2010).

Spermierin kapasitasyonu dişi genital kanallarında tamamlansa da; bir kısmı da oositle karşılaştığında, oositi  eveleyen kumulus-korona hücrelerinin salgılamış olduğu glikoproteinlerin etkisi ile de tamamlanabilirler. Yani kapasitasyon; spermierin oositle

karşılaşmadan önce veya bu sırada tamamlamaları gereken bir süreçtir. Bu süreçte yapısal bir değişiklik gözlenmese de kapasite olan spermelerde iyonların yeniden organizasyonu, metabolik değişiklikler ve nukleus proteinlerinde değişiklikler görülür (Longo, 1997; Gardner ve Hiatt, 2007; Carlson, 2004; Jones, 1991). Bu sırada spermelerin plazma membranlarında bazı değişiklikler gözlemlenir: Akrozomal kep bölgesindeki plazma membranından seminal plazma proteinleri ve glikoprotein örtü uzaklaştırılır. Aynı zamanda sperm plazma membranında bulunan intramembranöz partiküller de yer değiştirir. Hücre içi kalsiyum ve sodyum seviyesi yükselir (Delilbaşı, 2008). Yapısal bir değişiklik gözlemlenmese de; kapasite olan spermelerde intraselüler iyonların yeniden organizasyonu gerçekleşerek metabolik değişiklikler oluşur (Longo, 1997; Sadler, 2006; Gardner ve Hiatt, 2007; Carlson, 2004; Jones, 1991).

Kapasitasyon esnasında endometriyal hücrelerden salgılanan, interlökin-6 (IL-6) sperm fertilizasyon yeteneğini olumlu yönde etkileyerek kapasitasyonu artırır. IL-6 etkilerini muhtemelen en çok, spermde bulunan IL-6R α reseptörüne bağlanmak suretiyle oluşturduğu düşünülmektedir (Laflamme ve arkadaşları, 2005).

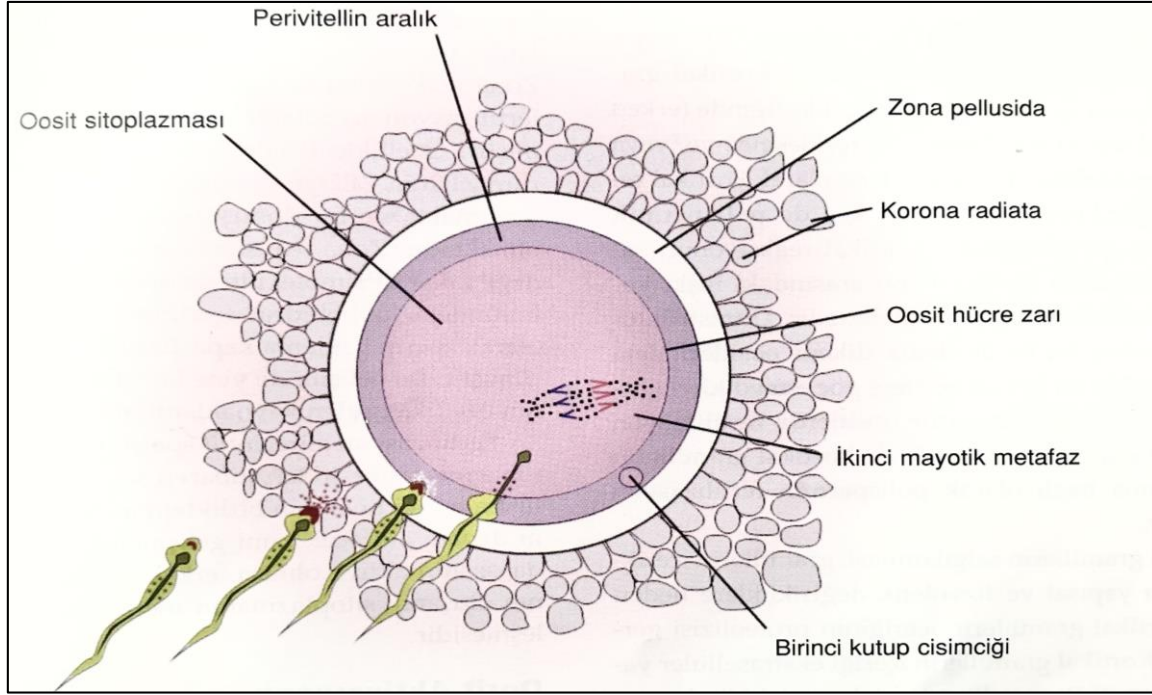
Kapasitasyon, kalsiyum, kinaz, cAMP, G-protein ve redoks bağımlı bir olaydır (Baldi ve arkadaşları, 1996). Kapasitasyonun gerçekleşebilmesi için ortamda bikarbonat, kalsiyum, serum albumin, enerji kaynakları ve glikoz mevcut bulunmalıdır. Kapasitasyonda, ikinci mesajcı olarak cAMP görev almaktadır. Protein kinaz A, hücre içinde gerçekleşen kapasitasyondan sorumludur ve inhibisyonu da kapasitasyonu bloke eder. Kapasitasyon sürecinde gerçekleşen diğer bir olay tirozin fosforilasyonunun artmasıdır. cAMP bu fosforilasyonda görevli bir enzimdir. cAMP-bağımlı sinyal mekanizması ve ROS (serbest oksijen türevleri) ürünleri tirozin fosforilasyonunu başlatır. Bu sırada Ca⁺² artışı da gerçekleşecektir (Leclerc ve arkadaşları, 1998; Mandal ve arkadaşları, 1999). Tirozin ile fosforile edilmiş olan proteinler insan sperminde ZP3 için reseptör işlevindedir (Burks ve arkadaşları, 1995). Bu proteinler akrozomda bulunur ve tirozin kinaz aktivasyonu gösterirler. Zona pellusidada, proteinler ile temas ettiğinde tirozin kinaz aktive olur, tirozin fosforillenir ve fosfotirozin oluşur. Sperm membranında bulunan AKAP (A-kinase anchor protein) adı verilen diğer bir protein de kinaz aktivitesi gösterir ve ZP proteinleri için reseptör işlevindedir (Mandal ve arkadaşları, 1999). Sperm ve dişi üreme kanallarını döşeyen epitel hücreleri arasında bir etkileşim olur, sperm akrozomal bölgesini örten

plazma membranı üzerindeki glikoprotein kılıf ve seminal plazma proteinleri ortadan kaldırılır (Gedikli ve arkadaşları, 2013).

İnsanlarda yaklaşık olarak 7 saat süren bu kapasitasyon dönemi kısaca; spermin, dişi üreme kanallarının fertilizasyon için uygun hale getirilmesidir.

Fertilizasyon sürecinde spermlerde akrozom reaksiyonu

Laboratuvar ortamında, yaklaşık 2-15 dk süren bir işlemdir (Bedford, 2008). Kapasitasyonun tersine spermlerde yapısal değişikliğe neden olurlar bu nedenle de geri dönüşümü olmayan bir olgudur. Akrozomal reaksiyon spermlerin oositle karşılaştıkları dönemde geçirdikleri bir süreçtir. Bu reaksiyonda sperm başında yer alan ve içi hidrolitik enzimle dolu yapının serbest kalması ile akrozomal kep içeriği sperm başı etrafında dağılır (Delilbaşı, 2008). Akrozom; akrozin, proakrozin, hiyaluronidaz, kollajenaz, fosfotaz, arilsülfataz, fosfolipaz-C (PLC), nöraminidaz, beta galaktosidaz gibi hidrolitik enzimleri içeren, membranla sarılmış olan, sperm başının ön bölgesinde bulunan başlık kısmıdır. Kapasitasyon işleminden sonra sperm, ZP'ye bağlanınca, proteinlerince uyarılan akrozom reaksiyonunda spermin plazma membranında geçirgenliği artar ve pek çok iyonun intrasellüler konsantrasyonu değişir. PLC tarafından inositol 1,4,5- trifosfat (IP3) üretilir ve bu akrozomdaki reseptörlerine bağlanarak depolanmış olan kalsiyum salınır ve bu akrozomdaki reseptörlerine bağlanarak depolanmış olan kalsiyum salınır (Walensky ve Snyder, 1995). Böylece sitoplazma alkalize olur. Akrozom reaksiyonu sırasında; ilk olarak, çoklu füzyonlar ile dış akrozomal membran sperm başının plazma membranı ile birleşir (Bu reaksiyonda hiyaluronidaz ve akrozin, tripsin benzeri maddeler rol oynar). Sonraki basamakta ise akrozom granülleri kırılır ve lizinler salınır, böylece ZP boyunca yol açılır (Bedford, 2008). Akrozom reaksiyonu sonucunda serbest kalmış hidrolitik enzimler, zona pellusidayı lokal olarak eritip, spermin zona pellusidayı kat etmesini sağlar. Sonuçta ZP'yi aşan sperm, perivitellin aralığa geçmiş olur (Şekil 2.2) (Longo, 1997; Wassarman, 1987; Guzick ve arkadaşları, 1989).



Şekil 2.2. Fertilizasyon sürecinde spermin oosit çevresindeki yapıları aşarak oosit stoplazması içine girişi (Delilbaşı, 2008)

ZP, 13–15 μm kalınlığında olup, ZP1, ZP2 ve ZP3 glikoproteinlerinden oluşan oositi bütünüyle kuşatan bir kılıftır. Sperm başında bulunan yüzey molekülleri ZP’de bulunan ZP3’e özgü bağlanır. Yani spermin ZP’ye bağlanması ve akrozom reaksiyonu ZP3 ligandı ile düzenlenir. Bu bağlanmaya primer bağlanma denilmektedir. Akrozom reaksiyonunu tamamlamış olan spermin bu kez ZP’nin işlevsel olan diğer molekülü ZP2’ye bağlanması ise ikincil bağlanmadır (Foltz ve Lennarz, 1993; Foltz, 1994).

Kapasitasyon işlemini geçirmiş olan spermlerin, korona radyata ile teması sırasında akrozomda delinmeler gerçekleşir. Spermin plazma membranı ve akrozomun membranı pek çok noktada birleşirler. Birleşim noktalarında sperm plazma membranında delinmeler oluşur ve akrozom içindeki enzimler dışarıya verilir. Bunlardan; hiyaluronidaz, spermin korona radyataya penetrasyonunu, tripsin benzeri maddeler ise ZP’nin sindirimini, zona lizinse spermin ZP’ yi aşmasına yardım eder (Gedikli ve arkadaşları, 2013).

2.1.2. Fertilizasyon sürecinde oositte oluşan değişimler

Oositte gerçekleşen yapısal değişiklikler ise; kortikal reaksiyon, zona reaksiyonu, ve ardından oosit aktivasyonu olarak gerçekleşir.

Kortikal reaksiyon

Oosit stoplazmasının çevresinde yerleşmiş olan kortikal granüller hücre yüzeyine doğru salgılanarak polispermiye karşın bir blok oluştururlar. Bu durum sperm, oosit stoplazmasına girdikten hemen sonra gerçekleşir. Kortikal granüllerin bu şekilde oosit yüzeyine salgılanmalarına kortikal reaksiyon denir. Kortikal reaksiyon sırasında, kortikal granüller oolemmının elektrostatik yapısında değişikliklere neden olarak salgılanırlar. Bu salgılanma ilk olarak spermin oosite girdiği bölgeden başlar ve dalgalar halinde tüm oosit yüzeyinde devam eder. Kortikal reaksiyon sırasında her bir granül ayrı ayrı oolemma ile birleşerek içeriğini oosit yüzeyine boşaltır (Sadler, 2006).

Kortikal granüllerin ekzositozunu başlatan mekanizma; hücre içindeki Ca^{++} artışı ve buna bağlı olarak gelişen reaksiyonlardır. Oosit sitoplazması içerisine Ca^{++} enjeksiyonu, serbest Ca^{++} 'a bağlanan şelasyon ajanları ve oositin A 23187 veya amfoterin B ile muamele edilmesiyle başlar.

Kortikal granüllerin salgılanması ile yapısal ve fizyolojik değişiklikler gözlenir. İlk önce kortikal granüllerin içeriğinin proteolizisi gerçekleşir. İkincil olarak bu içerik ekstrasellüler yapıya katılır ve son olarak da perivitellin alandaki moleküllerle çapraz olarak bağlanırlar. Tüm bunların neticesinde ZP yapısında farklanmalar görülür (Delilbaşı 2008).

Kortikal reaksiyon, zona reaksiyonuna neden olmaktadır. Ve sonuçta; 1) Oositin membranı diğer spermatazoalara geçirgen olmayan hale gelir. 2) ZP'nin yapısı polispermiyi engellemek amacıyla değişerek katılaşır (Yanagimachi, 1994).

Zona reaksiyonu

Kortikal granüller, ekzositoz yolu ile hücre yüzeyine salgılandıklarında kortikal granüller ZP'nin yapısını sertleştirerek değiştirirler ki bu da zona reaksiyonu olarak bilinmektedir. Zona reaksiyonu ile zona yüzeyindeki spermier için türe spesifik olan reseptör alanları aktivitesini kaybetmiş olur. Sertleşmiş olan zona embriyoyu potansiyel mikrobiyal istiladan koruyan bir yapı oluştururken, blastomerlerin de sıkı temas halinde tutulmasını sağlar. Bu koruyucu tabakadan embriyo, implantasyondan hemen önce çıkacaktır (Wassarman ve arkadaşları, 1999).

Zona reaksiyonu iki farklı yolla gerçekleşmektedir: 1) ZP'nin sperm bağlayabilme yeteneği azalır ve ZP diğer spermierin penetrasyonuna karşı direnç oluşturur. 2) ZP'nin çözünürlüğe karşı direnci azalır (Delilbaşı ve arkadaşları, 2000).

Zona reaksiyonunun, ZP'deki, ZP2' nin ZP2f'ye dönüşmesi; ZP3' ün de karbonhidrat içeriğinin sindirilmesine bağlı olarak sperm bağlama kapasitesinin kaybolmasından kaynaklandığı bilinmektedir (Delilbaşı ve arkadaşları, 2000).

Oosit aktivasyonu

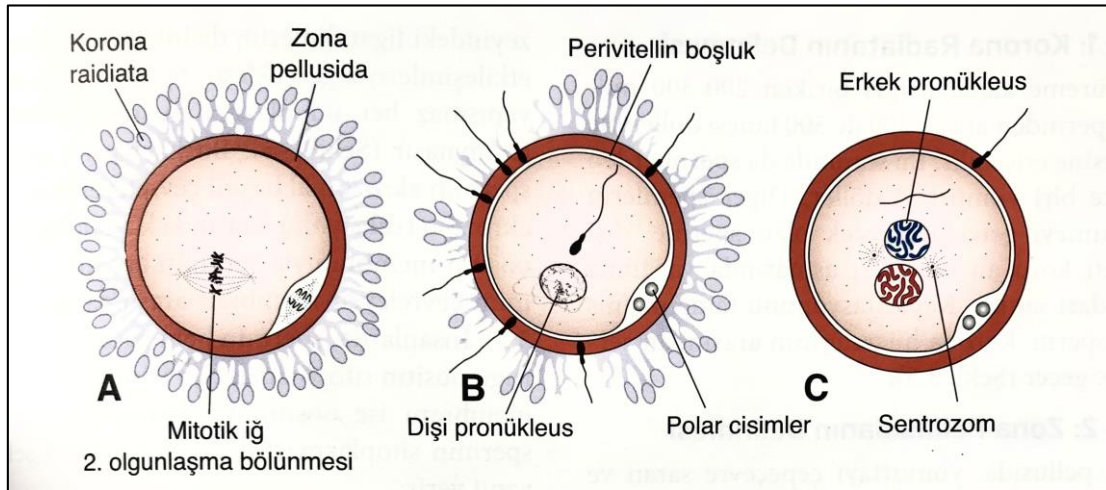
Sperm ile birleşmiş olan oositte, sitoplazmasında birtakım değışiklikler gelişir. Oositte gözlemlenen tüm bu değışiklikler oosit aktivasyonu olarak isimlendirilmektedir. Oosit aktivasyonunun biyokimyasal temelleri hakkında 2 görüş mevcuttur. Birinci görüş; oositin sperm tarafından taşınan oosit aktivasyon faktörü (AOF) tarafından uyarılması, ikinci görüş ise; bu sürecin reseptörler tarafından yönlendirilen olaylar dizisi olmasıdır (Delilbaşı, 2008). Ancak Lawrence ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, spermin oosite bağlanmasının kesilmesine karşı Ca^{++} dalgalanmalarının devam etmesi, spermin oosite aktardığı bir faktör ile kalsiyum metabolizmasını etkileyerek bu aktivasyonun oluştuğu gösterilmiştir (Lawrence ve arkadaşları, 1997).

2.1.3. Fertilizasyon sürecinde pronükleusların (PN) oluşumu

Erkek PN oluşumu üç aşamada gerçekleşmektedir. 1) İlk önce spermin çekirdek zarı erir, 2) Sonrasında yoğunlaşmış olan sperm kromatini sitoplazmada dağılır (Sadler, 2006). Spermin membran zarı, oosit stoplazmasına sperm girdikten sonra iç ve dış membranların

birleşmesi ile birçok alanda veziküller bir yapı kazanır. Zamanla bu veziküller oosit sitoplazmasına dağılarak veziküllerinde çevreleyen membranlarının yıkılması ile sperm kromatini ooplazmada serbest kalmış olur (Delilbaşı, 2008). 3) En son aşamada ise pronukleer zar olarak nukleer zar yeniden şekillenir (Sadler, 2006). Pronukleus zarının şekillenmesinde oosit sitoplazmasında yaygın görülen endoplazmik retikulum (ER) işlev görmektedir. Bu ER'ların kromatin çevresinde yer yer birleşmeye başlaması ile pronukleer membran şekillenir (Delilbaşı, 2008).

Dişi PN'lerinde ise anafaz II'yi izleyen dönemde, oosite ait kromozomlar, zigot sitoplazmasında dağınık halde bulunurlar. Sonra kromozomların çevresindeki veziküller kromozomları içlerine almaya başlarlar. Veziküller de birbirleriyle birleşerek dişi PN'leri geliştirmiş olur. Gelişen PN, zamanla büyüyerek yuvarlanır ve içerisinde de çekirdekçikler gelişir. Sonrasında da farklı bölgelerde gelişen erkek ve dişi PN'ler, spermdeki asterler ve hücre iskelet yapıları sayesinde birbirlerine yakınlaşarak birlikte oositin sitoplazmasında orta kısma doğru yol alırlar. Erkek PN'lerinin ilk hareketini tetikleyen sperm sentriyollerinde bulunan mikrotübüllerin itici gücüdür. Bu esnada uzayan mikrotübüller de Şekil 2.3'te ki gibi, her iki PN yüzeyine temas ederek PN'ler birbirlerine yönelirler (Longo, 1997).

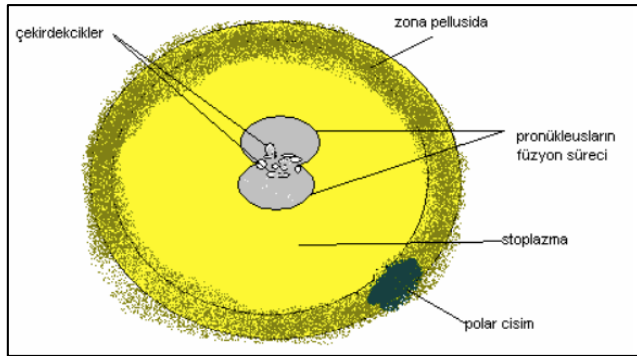


Şekil 2.3. A. Fertilizasyondan hemen önce ovülasyonla atılmak üzere olan oosit. B. Bir spermatozoon ikinci mayotik bölünmesini tamamlamış olan oositin içine girmiştir. Oositin kromozomları veziküler bir nükleus içinde, dişi PN, hazır durumda beklemekt edirlir. Bir kaç spermın başı ZP'ye takılıp kalmıştır. C. Erkek ve dişi PN'ler (Sadler, 2017)

Farklı bölgelerde gelişmiş olan bu PN'lerin birbirlerine yaklaşılarak birlikte oosit sitoplazmasının ortasına doğru hareket etmelidirler. Bu harekette hem sperm asteri hem de

hücre iskeletini oluşturan yapılar birlikte çalışırlar. İnseminasyon sonrası 20. saatte PN'ler birbirlerine yönelerek zigotun ortasına yerleşmiş olurlar (Longo, 1997).

PN membranları öncelikle kaybolarak, kromozomlar mitotik bölünme için bir araya gelirler (Şekil 2.4). Zigotun mitoz mekiğinin oluşmasında spermatozoonun proksimal sentriyolu rol oynar. Singami sonrası ilk yarıklanma oluşarak, embriyo gelişimi başlamış olur (Bebitoğlu, 2004).



Şekil 2.4. PN'lerin kaynaşması (Bebitoğlu, 2004)

Döllenme sonucunda; yarısı anneden, yarısı da babadan gelen farklı bir kromozom kombinasyonuna sahip zigot oluşmuştur (Resim 2.1) ve oluşan yeni bireyin cinsiyeti belirlenmiştir: X taşıyan bir sperm ile dişi bir embriyo (XX); Y taşıyan bir sperm ile de erkek bir embriyo (XY) oluşacaktır (Sadler, 2017).

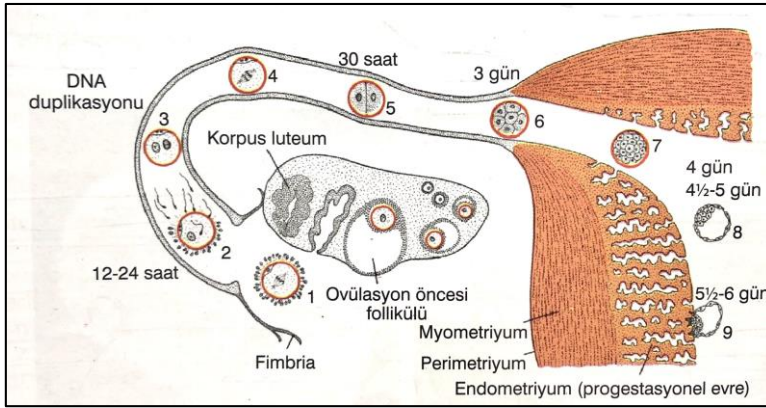


Resim 2.1. Fertilize olmuş bir oosit (Delilbaşı, 2008)

Fertilizasyon ile eşsiz bir genetik yapıya sahip zigot oluşumundan sonra ise, implantasyon süreci gelecektir: Zigot blastokist haline geldiğinde uterus kavitesine ulaşması ve endometriyum lüminal epiteli ile karşı karşıya gelmesi, tutunması ve desidualize endometriyum stromasını istila ederek maternal damar sistemine ulaşp yerleşmesi süreci implantasyon sürecidir (Norwitz ve arkadaşları, 2001).

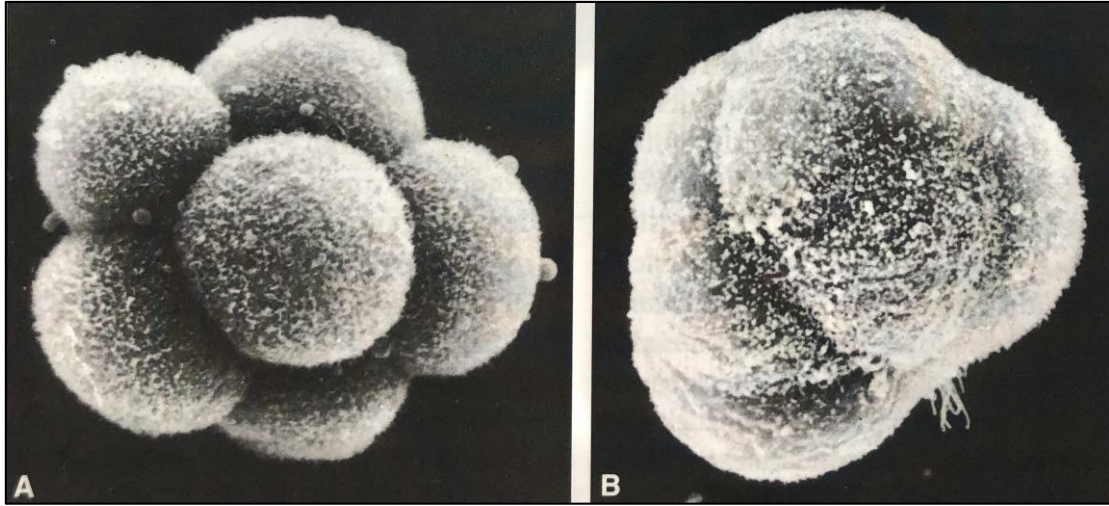
2.1.4. Fertilizasyon sonrası blastosist implantasyonu

Döllenmenin bir diğer sonucu da klivajın başlamasıdır. Zigot artık 2 hücreli aşamaya ulaşmanın sonucunda peşpeşe mitotik bölünmelerin sonucunda hücre sayısını arttırmaya başlayacaktır. Şekil 2.5'te görüldüğü gibi, her klivaj bölünmesi sonucunda, hacmi giderek küçülen hücreler olacaktır. Bu hücreler blastomer olarak adlandırılırlar (Sadler, 2010).



Şekil 2.5. Oositin blastosist evresine ulaşmaya kadar geçirmiş olduğu süreç (Sadler, 2010)

Blastomerler 8 hücre aşamasına kadar gevşek bir hücre kümesi halindedir. Ancak üçüncü yarıklanmadan sonra blastomerler Resim 2.2'de de görüldüğü gibi birbirleriyle daha sıkı bağlantılar kurarak kompakt bir hücre kümesi haline gelirler (Sadler, 2010).



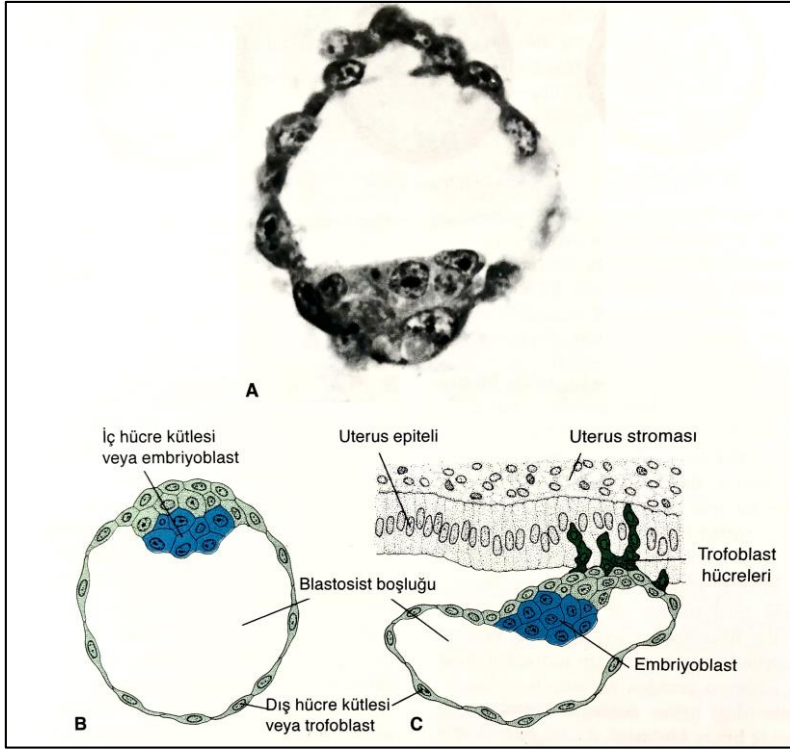
Resim 2.2. Hücrelerin dış hatlarının kaybolmaya başlayarak, kompaktlaşmanın oluşumu (Sadler, 2017)

Bu süreç kompaksiyon olarak bilinmektedir. Kompaksiyon aşamasında iç hücreler ve dış hücreler birbirlerinden ayrılırlar. Ancak hala aralarındaki boşluk vasıtasıyla ilişki halindedirler. Fertilizasyonun yaklaşık 3 gün sonrasında kompakt haldeki embriyo yeniden bölünerek Şekil 2.6’da gösterilmiş şekilde morula-dut (16 hücreli) hale gelmiş olur (Sadler, 2010).



Şekil 2.6. Zigotun iki hücre evresinden geç morula evresine gelişimi (Sadler, 2017)

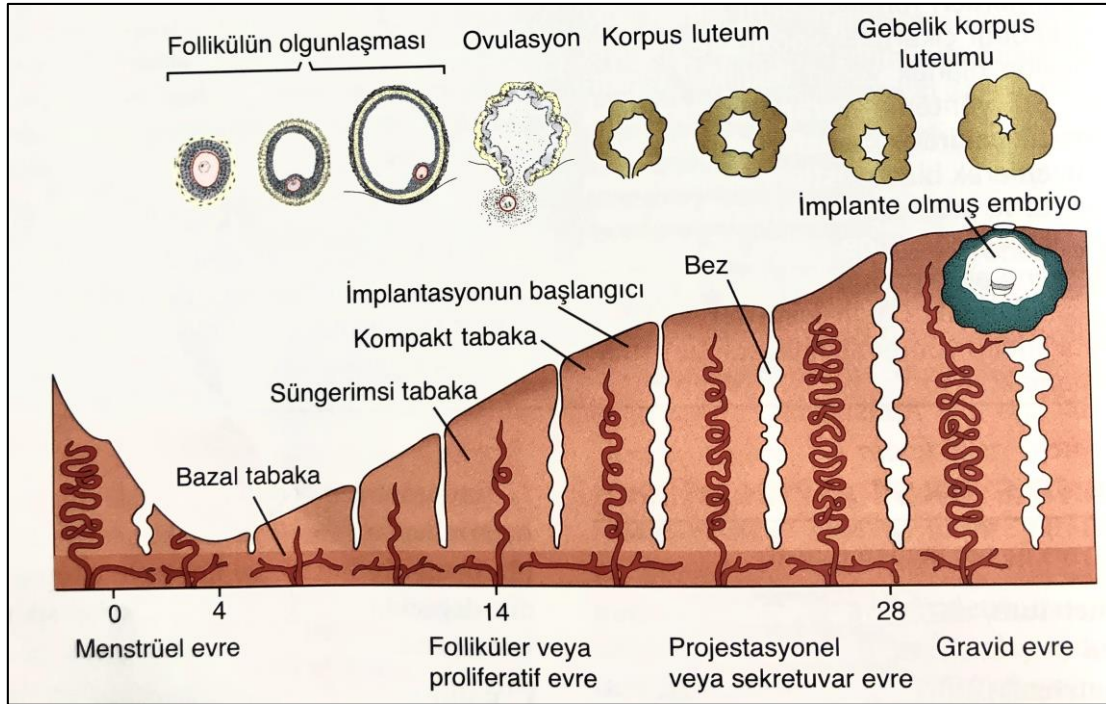
Morula, uterus boşluğuna ulaştığı zaman, uterus boşluğunda bulunan sıvı ZP’yi delerek, iç hücre kütesinin hücreler arası boşluğuna sızıp orada toplanmaya başlar. Bu boşluklar genişler ve nihayetinde de boşlukların birleşmesiyle, tek bir boşluk olan blastosel oluşur. Artık bu evrede de embriyoya blastosist denilir. Morulanın iç hücreleri, iç hücre kütesini; dış hücreleri ise dış hücre kütesini oluşturur. Şekil 2.7’de gösterildiği gibi, İç hücre kütesinden, embriyonun dokuları, embriyoblast; dış hücre kütesinden de daha sonra plasentaya katılacak olan trofoblastlar gelişir (Sadler, 2010).



Şekil 2.7. A. 107 hücreli insan blastosist kesiti, B. Fertilizasyondan 4.5 gün sonra uterus boşluğundan alınmış bir insan blastosistinin şematik gösterimi, C. Gelişimin 9. gününde bir blastosistinin şematik gösterimi (Sadler, 2017)

ZP'deki bu aşamada yok olmaya başlayarak embriyonun uterus mukozasına implantasyonuna imkan vermiş olur. Yani gelişimin 6. gününde trofoblastik hücreler, uterus mukozasının epiteliyal hücreleri arasına penetre olmaya başlamıştır (Sadler, 2010). Penetrasyon aşaması; trofoblast hücreleri üzerindeki L-selektinin ve uterus epiteli üzerindeki karbonhidrat reseptörleri aracılığıyla gelişmektedir. Gelişimin 1. haftasının sonunda zigot, morula ve blastosist evrelerini geçirerek uterus mukozasına gömülmeye başlamıştır (Sadler, 2010).

Uterusun duvarı 3 tabakadan oluşmaktadır: Duvarın iç yüzünü döşeyen mukoza endometriyum; kalın bir düz kas tabakası miyometriyum; ve son olarak duvarın en dışını kaplayan perimetriyum. Döllenme gerçekleştiyse endometrium implantasyona yardımcı olur ve plasantanın oluşumuna katkıda bulunur. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde hormon salgınları plasanta tarafından üstlenilir ve korpus luteum bozulur. İmplantasyon sırasında uterusun mukozası, uterus bez ve arterlerinin uzayarak, kıvrılarak helozonik bir şekle büründüğü ve dokuların tümüyle dolgunlaştığı sekresyon evresindedir (Şekil 2.8). İnsan blastosisti de bezlerin ağızları arasına implante olur (Sadler, 2010).



Şekil 2.8. Over ve uterus mukozasındaki eş zamanlı değişikliklerin şematik görünümü (Sadler, 2017)

İnsan embriyo implantasyonu, alıcı bir endometriyum ile fonksiyonel bir blastosist arasındaki, eş uyumlu çapraz etkileşimi içeren üç aşamalı bir süreçtir (eşleşme, adezyon ve istila). Bu durum, sadece implantasyon penceresi aralığında görülebilir. Bu da adet döngüsünün 20-24. günleri arasındaki sınırlı bir alıcılık dönemidir. İmplantasyon, gebeliğin gerçekleşmesi için; inhibe edici bileşenlerin kaybından, adezyon ligandlarının edinilmesine kadar uzanan karmaşık bir sinyal olayları dizisini içerir (Achache ve Revel, 2006). Embriyo implantasyonu, birçok türde üreme sürecinin en kritik aşamasını temsil eder. Blastosist, büyüyen fetüs ve maternal dolaşım arasında bir arayüz sağlayacak plasentayı oluşturmak için maternal endometriyal yüzeye yakın bir şekilde bağlandığı benzersiz bir biyolojik olay gerçekleştirir (Denker, 1993; Aplin, 2000).

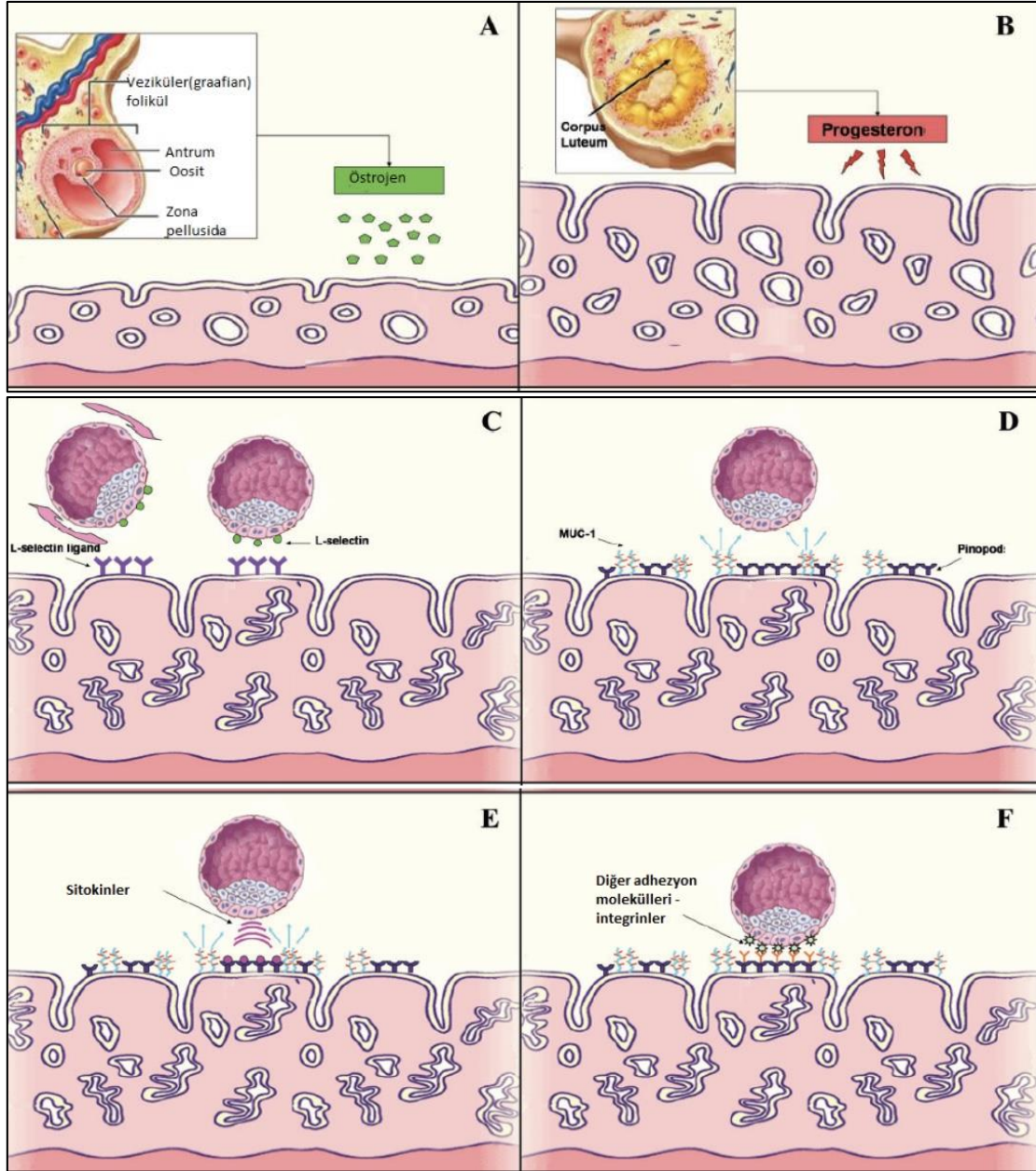
Başarılı implantasyon, alıcı bir endometriyum, blastosist gelişim aşamasında normal ve fonksiyonel bir embriyo, maternal ve embriyonik dokular arasında senkronize bir diyalog gerektirir (Simon ve arkadaşları, 2000). İmplantasyon; adet döngüsünün 20. ve 24. günleri arasında uzanan, kendi kendini sınırlayan bir dönemde gerçekleşebilir. Bu süre boyunca yani implantasyon penceresi boyunca (Psychoyos, 1973), insan endometriumu, overlerin steroid hormonları tarafından başlatılan doğru bir morfolojik ve işlevsel duruma sahip olduğu göz önüne alındığında, blastosist bağlanması için hazırlanır (Finn ve Martin, 1974;

Yoshinaga, 1988; Paria ve arkadaşları, 2002). İmplantasyon, gebeliğin elde edilebilmesi için çok önemli ve karmaşık sinyal olaylar dizisini içerir. Ovaryan hormonların etkisi altında çok sayıda tanımlanmış moleküler araçların bu erken etkileşimde rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bu araçlar, adezyon molekülleri, sitokinler, sitokinler dahil çok çeşitli birbiriyle ilişkili molekülleri, büyüme faktörlerini ve lipitleri kapsar (Lessey ve arkadaşları, 1992; Simon ve arkadaşları, 2000). Endometriyal alıcılık, adezyonun kazanılmasından sonra oluşur inhibitör bileşenlerin kaybı ile birlikte ligandlar, bağlanan bir embriyoya bariyer görevi görebilir (Aplin, 2000).

Endometriyum morfolojik özellikleri de implantasyon başarısında oldukça önemlidir (Achache ve Revel, 2006). Endometriyumun tarihlenmesini anlatan klasik çalışma, Noyes ve arkadaşları (1950), 50 yıldan daha eski bir tarihe aittir. İlginç bir şekilde, bu makale uzun zaman boyunca infertilite literatüründe en çok alıntı yapılan makaleydi (Key ve Kempers, 1987). Endometriyal histolojinin değerlendirmesi rutininin iki amacı vardır: İlki progesteron salgılayan aktif bir korpus luteum gelişiminin tespiti (endometriyal bezler üzerindeki gözlemlenebilen etkiler yoluyla); ikincisi ise, endometriyal günlemenin embriyonik yaş ile uygun bir ilişki içerisinde olduğundan emin olmaktır (Acosta ve arkadaşları, 2000; Lessey ve arkadaşları, 2000). Luteal faz, ovülasyon ve menstrüasyon arasındaki süreç olup, progesteron üretimini gerçekleştiren korpus luteumun oluşumu ile karakterizedir. Progesteron salınımı, endometriumun, sekretuvar faza dönüşümünü başlatmakta ve implantasyona hazırlanmasını sağlamaktadır. LH salınımı ile uyarılmayan korpus luteum varlığında kadınlarda düşük serum progesteron seviyeleri izlenmekte ve korpus luteum yetmezliği olarak tanı konulmaktadır (Hinney ve arkadaşları, 1996). Bu hastalarda korpus luteum tarafından salınan az miktarda progesteron seviyeleri bile GnRH salınımını baskılayarak çok az miktarda LH salınımına sebep olmakta, hipotalamik korpus luteum yetmezliği olarak da adlandırılmaktadır (Hinney ve arkadaşları, 1996). Endometriyumun histolojik gelişiminde 2 günden fazla gecikme luteal faz yetmezliğini tanımlamada literatürde en sık başvurulanan yöntemdir, Noyes ve arkadaşlarının tarif ettiği klasik kriterlere göre yapılır (Noyes ve arkadaşları, 1950).

Ayrıca pinopodlar, endometriyal epitelin apikal yüzeyinde bulunan kabarcık benzeri çıkıntılardır (Usadi ve arkadaşları, 2003). Bu yapılar birkaç µm genişliğindedir ve mikrovilli seviyesinin üzerinde uterus lümenine çıkıntı yapar. İlk önce farelerde (Nilsson, 1958) ve daha sonra insan endometriyumunda tanımlandılar (Johannisson ve Nilsson,

1972; Martel ve arkadaşları, 1987; Murphy ve arkadaşları, 1987). Pinopod ifadesi, implantasyonun varsayılan penceresine karşılık gelen adet döngüsünde maksimum 2 günlük kısa bir süre ile sınırlıdır (Nikas, 1999; Aghajanova ve arkadaşları, 2003). Pinopodlar progesterona bağımlı görünmektedir. Menstrüel döngü boyunca progesteron seviyesinin orta luteal artışı ile pinopodların ilk görünümü arasındaki ilişki not edilmiştir (Stavreus-Evers ve arkadaşları, 2001; Usadi ve arkadaşları, 2003). Ayrıca blastosist implantasyonuna endometrial alıcılık için dışa vurumu gerekli olan HOXA 10 geni, pinopod gelişiminde de önemli bir role sahiptir. Aslında, HOXA-10 ifadesinin engellenmesi pinopodların sayısını önemli ölçüde azaltır. HOXA 10, hem endometrial stromal hücre (ESC) proliferasyonunu hem de epitel hücre morfogenezini düzenleyerek endometriyumda ikili bir rol göstermektedir (Bagot ve arkadaşları, 2001). Pinopodların rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, embriyo ve endometrial etkileşimlerinin tercih edilen bölgeleri gibi görünmektedir (Şekil 2.9). Blastosist yapışmasının endometrial pinopodların tepe noktasında olduğu gösterilmiştir (Bentin-Ley ve arkadaşları, 1994; Bentin-Ley ve arkadaşları, 1999). Orta sekretuar faz sırasında pinopodların saptanması, implantasyon oranlarını en iyi hale taşımak için ve endometrial alıcılığın değerlendirilmesi için son derece yararlı olabilir (Achache ve Revel, 2006).



Şekil 2.9. Uterusta insan embriyo implantasyonu. A. Endometriyum, östrojen artışı altında gelişir. B. Luteinize foliküllerden gelen progesteron endometriyal farklılaşmaya neden olur. C. Blastosist uterus boyunca ilerlerken, L-selektin sinyalleri altında endometriyum üzerinde serbestçe yuvarlanır. D. Musin-1, blastosisti iter ve düşük implantasyon şansına sahip olan endometriyal bölgelerde tutunmayı ve yapışmayı önler. E. Kemokinler ve sitokinler, blastosisti optimal implantasyon noktasına çeker. F. İntegrin ve kadherin gibi adezyon molekülleri, blastosisti endometriyal pinopodlara sıkıca bağlayarak, başarılı bir implantasyona katkı sağlar (Achache ve Revel, 2006)

2.1.5. İmplantasyon penceresi

Gelişimsel olarak yetkin bir embriyonun endometriyuma bağlanmasına ve nihayetinde endometriyuma girmesine izin verildiği adet döngüsü sırasındaki aralık "implantasyon penceresi" olarak adlandırılmıştır. İmplantasyon penceresi ilk olarak üreme endokrinologları tarafından bir embriyo transferinin zamanlamasının değerlendirilmesi sırasında fark edilmiştir (Harvey ve arkadaşları, 2019).

Navot ve arkadaşları 42-48 saatlik embriyoların yalnızca döngü günleri (CD'ler) 17, 18 veya 19'da (ovülasyon günü olan CD 14'e normalize edildiğinde) aktarıldığında implante edildiği gerçeğini güçlü bir şekilde belgeledi (Navot ve arkadaşları, 1991). Daha önceki veya sonraki transferler herhangi bir hamilelikle sonuçlanmadı. Daha ileri çalışmalar bunu teyit etti ve IVF ile implantasyon penceresinin CD 19-23'lerini kapsadığını gösteren ortak bir gözlem oluştu (Bergh ve Navot, 1992; Wilcox ve arkadaşları, 1999).

Bu bulgular, doğurgan kadınlarda CD 18.5 ila 21'ler arasında doğal olarak döngü yaşayan 4.5-7 günlük insan embriyolarının doğrudan gözlemleriyle de korelasyon göstermiştir (Hertig ve arkadaşları, 1956). Trofoblastların, yalnızca CD 19 üzerinde toplanan örneklerden endometriyal yüzey epiteline yapıştığı gösterilmiştir, bu da yüzey epitelinin endometriyal seçiciliğin en kritik bileşeni olduğunu göstermektedir (Kliman ve arkadaşları, 1990).

İmplantasyonun tek bir olaya bağımlı olmadığı; embriyonun trofektodermi, endometriyal yüzeyi ve bez epiteli arasındaki bir dizi etkileşimle olduğu açıktır (Lindenberg, 1991; Lessey, 2011).

Endometriyal boşluğa ulaşıktan sonra, embriyo ilk olarak uzun müsin molekülleri ile etkileşimler yoluyla endometriyal yüzey epiteline zayıf bir şekilde karşı koyar (apozisyon fazı) (Meseguer ve arkadaşları, 2001). Daha sonra, blastosist, trofoblast tarafınca türetilen fetal fibronektinli etkileşim yoluyla endometriyal yüzeye sıkıca yapışır (Turpeenniemi ve arkadaşları, 1995). ($\alpha_v\beta_3$ integrini gibi endometriyal yapışma molekülleri aracılığıyla [yapışma aşaması] (Lessey ve arkadaşları, 1992; Lessey ve arkadaşları, 1994)). Bu süreç, epitelden ve ardından da endometriyal stromaya trofoblast istilasını ile sonuçlanır (Hertig ve arkadaşları, 1956; Carter ve arkadaşları, 2015).

Bu durum, hem embriyonun hem de endometriyumun sıralı ve eş zamanlı olarak fonksiyonel bileşenleri alması gerektiği anlamına gelir, aksi takdirde implantasyon elde edilemez (Harvey ve arkadaşları, 2019).

Hücre adezyon moleküler ailesi; integrinler, selektinler kadherinler, immünoglobulinler, müsinler, sitokinler, prostaglandinler şeklinde sınıflandırılabilirler (Achache ve Revel, 2006).

2.1.6. Endometriyal epiteldeki adezyon molekülleri, doku bütünlüğü ve embriyo implantasyonu üzerindeki etkileri

Endometrial epiteldeki hücre adezyonları, yaklaşık 4 günlük gibi bir kısıtlı süre boyunca embriyonun interstisyel implantasyonuna izin verirken, aynı zamanda lümen örtücü hücre tabakasının sürekliliğini ve koruyuculuğunu sürdürmek için de düzenlenir. Bir çok görüşe göre normal embriyo implantasyonda başarısız olur ve epitelyal embriyo tutunumu tam olarak anlaşılamayan bir fenomen olarak kalır (Singh ve Aplin, 2009).

İnsanda implantasyon, blastosist ve endometriyal yüzey arasındaki ilkin zayıf bir etkileşimi, sonrasında kararlı bir yapışmayı ve ardından da embriyo konumlandıkça epitelde geçici bozulmayı ve yeniden mühürlenmeyi içerir. Moleküler mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Birkaç çalışma, insan blastosistinde trofektoderm üzerinde adezyon molekülü ifadesini analiz etmiştir (Campbell ve arkadaşları, 1995a, b; Bloor ve arkadaşları, 2002; Fujiwara ve arkadaşları, 2002, 2003; Genbacev ve arkadaşları, 2003). Ancak embriyo azlığı ve hassasiyeti göz önüne alındığında bilgi biriktirmek oldukça yavaş kalmıştır (Aplin, 2000, 2006; Aplin ve Kimber, 2004). İmplantasyon olayı epitelde kazanılan bir özellik olan maternal alıcılığı gerektirir ve epiteldeki moleküler adayların belirlenmesi, bağlanma mekanizmalarına ilişkin güçlü hipotezlerin formüle edilmesini sağlamıştır. Epiteldeki adezyon molekülleri ayrıca alttaki bazal membrana veya bitişik epitelyal hücrelere yapışmaya aracılık etmek için gereklidir. Hücre yüzeyi bileşenleri, transkriptomik kütüphanelerde nispeten zayıf bir şekilde temsil edilir, ancak diğer biyoinformatik bilişimlerle ilgili yaklaşımlar daha aydınlatıcı olabilir (Reese ve arkadaşları, 2001; Yoon ve arkadaşları, 2004; Aplin, 2006; Aplin ve Singh, 2008). Günümüzde mevcut işlevlerin

saptanması için verilerin çoğu laboratuvar ortamında implantasyon modellerini kullanılarak genişletilen geleneksel immüno-lokalizasyon çalışmalarından elde edilmiştir (Singh ve Aplin, 2009).

Kadherinler

E-Kadherin ve Kalsiyum

Kadherin süper ailesinin üyeleri, yaklaşık 110 aminoasitlik dizi tekrarlarını paylaşan transmembran glikoproteinleridir. E-cadherin, homotipik ya da heterotipik bağlanma yoluyla hücre-hücre etkileşimine aracılık eden, kalsiyuma bağımlı CAM ailesine ait, hücre yüzey transmembran glikoproteinidir (Stemmler, 2008). Kadherinler; klasik kadherin (tip I), tip II kadherin, desmozomal kadherin ve proto kadherinler olmak üzere birkaç alt grupta tanımlanmıştır. Transmembran kısım; ekstraselüler tekrarları daha kısa olan sitoplazmik alana bağlar ki; bu kısımda, non-kovalent bir şekilde etkileşime giren, p120 katenin ve β -katenein etkileşimindedir. β -katenein öncelikle α -kateneine bağlanır. α -katenein, aktin hücre iskeleti kompleksine, hem aktin filamentleri yoluyla doğrudan; hem de vinkulin, zonula okludens-1 (ZO-1), α -aktinin ve afadin gibi aktin bağlayıcı proteinlerle dolaylı olarak bağlanabilir (Kaplan ve arkadaşları, 2001; Hartsock ve Nelson, 2008; Stemmler, 2008). Katenin bağlanma bölgelerinin silinmesi, hücre sel yeniden organizasyonun yitimine ve bağlanma özelliğinin kaybına neden olur. Bu da kateninlerin, kadherinlerin aktivitesinde aracılık ettiğini göstermektedir (Rosales ve arkadaşları, 1995). Kadherin-katenin kompleks oluşum kaybı, epitel hücrelerinde lateral yapışma kaybı ile ilişkilidir (Oyama ve arkadaşları, 1994). Tam uzunluktaki β -katenein ifadesi, hem bu karmaşık yapılanmayı, hem de hücre adezyonunu düzeltir (Kawanishi ve arkadaşları, 1995).

Endometriyum, alıcı bir duruma ulaşmak için kapsamlı bir yeniden şekillenme geçiren dinamik bir dokudur. Hamileliğin başarılı bir şekilde başlatılması için bir embriyo varlığında daha da modüle edilir. E-kadherinler epitel biyogenezi için gereklidir. E-kadherin kodlayan gen olan kadherin yoksun farelerde, uterus epiteli düzensiz bulunmuştur (Reardon ve arkadaşları, 2012). Ayrıca E-kadherin ifadesi, infertil kadınların epitellerinde ve bazı endometriyal bozukluklarda değişiklik gösterdiği saptanmıştır (Kakar ve arkadaşları, 2019; Matsuzaki ve arkadaşları, 2010; Mishra ve arkadaşları, 2020; Whitby ve arkadaşları, 2020).

Kadherinler, hücreler arası yapışmanın kalsiyuma bağımlı mekanizmalarından sorumlu olan bir glikoprotein ailesidir. E-kadherinler embriyogenezde; gastrulasyon, nörolasyon ve organogenezde merkezi bir rol oynarlar. E-kadherin üretiminin baskılanması, hücre içi adhezyonu bozar. Luteal fazda E-kadherin mRNA seviyeleri önemli ölçüde artar. E-kadherinlerin ifadesi, endometriyal kalsitonin ile birlikte progesteron tarafından düzenlenir (Shirane ve arkadaşları, 2012).

Embriyo implantasyonu sırasında, endometriyal epitelde, E-Kadherin ifadesinin modeli üzerinde çeşitli tartışmalar gene de mevcuttur. Bazı çalışmalar, embriyo implantasyon bölgesinde, endometriyal epitel hücrelerde, E-Kadherin kaybı olduğunu, bazıları da artış olduğunu bildirirken diğer taraftan bazı çalışmalarda ise fark görülmediği raporlanmıştır (Arora ve arkadaşları, 2016; Ashary ve arkadaşları, 2018; Dudley ve arkadaşları, 2017; Guo ve arkadaşları, 2009; Jha ve arkadaşları, 2006; Payan-Carreira ve arkadaşları, 2016). Ancak son yıllardaki çalışmalara göre, blastosistin endometriyuma bağlanma sürecinde, E-kadherin ifadesinin kayıp olduğu görüşü ağır basmaktadır (Verma ve arkadaşları, 2021).

E-kadherin yok edilmiş farelerde preimplante, embriyo gelişiminde kusur ve implantasyon başarısızlıkları gözlemlenmiştir (Larue ve arkadaşları, 1994; Riethmacher ve arkadaşları, 1995). E-kadherin, lateral epitelyal plazma membranında bulunur ve adherens bağlantılarının kurulması ve sürdürülebilirliği açısından kritik olması muhtemeldir (Gumbiner, 1996; Huber ve arkadaşları, 1996; Poncelet ve arkadaşları, 2002). Mevcut diğer kadherinler arasında tip 1 N-kadherin ve P-kadherin ve tip 2 kadherin-6 (K-kadherin) bulunur (van der Linden ve arkadaşları, 1995; Getsios ve arkadaşları, 1998; MacCalman ve arkadaşları, 1998; Dai ve arkadaşları, 2002; Tsuchiya ve arkadaşları, 2006).

Ishikawa hücreleriyle (endometriyal karsinom hücreleri) yapılmış olan *in vitro* deneyler göstermektedirki; kalsitonin tarafından tetiklenen hücre içerisindeki kalsiyumun geçici olarak yükselmesi, E-kadherini hücresel temas bölgelerinde aşağı düzenler ve doku transglutaminazı aktive eder (Li ve arkadaşları, 2002; Li ve arkadaşları, 2006). Kalsitonin, kalsiyum mobilizasyonu yoluyla endometriyal epitel hücrelerinin trofoblastik yer değiştirmesini destekler (Li ve arkadaşları, 2008). Kemirgenlerde progesteronun kalsitonin ifadesini düzenlediği ve maternal kalsitoninin bloke edildiği taktirde implantasyon oranlarında azalma olduğu gösterilmiştir (Zhu ve arkadaşları, 1998a,b). İnsanlarda sekretuar fazda yükselen progesteron seviyeleri büyük ihtimalle endometriyal kalsitonin

ifade edilmesini uyarır (Ding ve arkadaşları, 1994; Kumar ve arkadaşları, 1998; Zhu ve arkadaşları, 1998a).

E-kadherin luminal epitelde ve ayrıca trofoektoderimde bulunduğundan, embriyonun ilk yapışmasında rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Coutifaris ve arkadaşları, 1991).

E-kadherinlerin (veya diğer kadherinlerin) ikili bir işleve sahip olması mümkündür. İlk aşamalarda, epitel devamlılığı için hücre yüzeyinde ifade edilmesi gerekli olabilir. Bununla birlikte, kadherin aracılı adezyon, blastosist invazyonunu sağlamak için sonradan implantasyon yerinde aşağı regüle düzenlenebilir (Singh ve Aplin, 2009).

E-kadherinin, insan embriyo implantasyonundaki rolü tam olarak bilinmemektedir, ancak dışa vurum modeline dayanarak, implantasyonda önemli bir rolü olduğundan şüphelenilmektedir. E-kadherin mRNA seviyelerinin luteal fazda anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (Fujimoto ve arkadaşları, 1996). Epitel hücre yüzeyinde E-kadherin mevcudiyetinin düzenlenmesi, hücresel yapışma kontrolünü mümkün kılmaktadır. E-cadherin ifadesinin aşağı düzenlenmesi, karsinomatöz hücreler tarafından metastatik potansiyelin edinimi ile ilişkilidir. Daha sonra doku bütünlüğü kaybolur ve hücre ayrışmasına, dağılmasına sebebiyet verir (Battle ve arkadaşları, 2000; Cano ve arkadaşları, 2000; Comijn ve arkadaşları, 2001).

E-kadherin, çeşitli dokular tarafından ifade edilir ve gastrulasyon, nörülasyon ve organogenez sırasında embriyogenez oluşumunda önemli bir rol oynar. E-kadherin baskılanması, hücre-hücre adezyonunun işlev bozukluğundan sorumlu ana moleküler olaylardan birisi olarak kabul edilir (Barth ve arkadaşları, 1997).

β-Katenin etkileşimleri

β-Katenin, kadherin taşıyan hücre- hücre bağlantılarının bütünlüğünün korunmasındaki rolüne ek olarak, sitosolik sinyallerin çeşitli hücresel bağlamlarda çekirdeğe aktarılmasında önemlidir. Wnt yolu üzerinden sinyal verilmesi, β-Katenin'in aktivasyonuna, birikimine ve nükleer translokasyonuna yol açar (Widelitz, 2005). Farelerde, blastosist tarafından salgılanan Wnt ligandı, inhibisyonu ciddi şekilde düşüren, uterusun lümen epitelindeki Wnt/ β-Katenin sinyal yolunu aktive eder (Mohamed ve arkadaşları, 2005). β-Katenin

ifadesi, insan endometriyumunda; hem proliferatif hem de sekretuvar fazda gözlemlenmiştir (Fujimoto ve arkadaşları, 1996; Shih ve arkadaşları, 2004) ve mRNA verileri Wnt/ β -Katenin sinyalleme sisteminin reseptif fazda rol aynama olasılığını göstermektedir (Tulac ve arkadaşları, 2003). MUC1 müsin, sekretuvar faz endometriyumunda (Yamamoto ve arkadaşları, 1997; Li ve arkadaşları, 1998) yüksek oranda ifade edilmektedir. Sitoplazmik alanda serin- β -Katenin ile etkileşime girer ve ilişkili adaptör proteinlerin de var olması sinyal iletiminde MUC1' in rolü olduğunu düşündürür (Wen ve arkadaşları, 2003). Luminal epitel yüzeyinin diğer bir müsin bileşeni, hücre-hücre yapışmasını uyaran MUC16'dır (Gipson ve arkadaşları, 2008).

Desmozomlar ve sıkı bağlantılar

Desmozomlar, lateral epitel sınırlarla ilişkili mekanik temas bölgeleridir (Dockery ve arkadaşları, 1988; Preston ve arkadaşları, 2004). Farelerde gebeliğin implantasyon öncesi döneminde lümen uterin epitelinde desmozomal plak proteini desmoplakin azalır (Illingworth ve arkadaşları, 2000). Desmozomların görülme sıklığı (ve ayrıca açıklık bağlantıları da) implantasyon sırasında azalır, bu da muhtemelen boşlukların açılmasını ve implantasyonda trofoblast hücreleri tarafından luminal epitelin penetrasyonunu kolaylaştırır (Dockery ve Burke, 2008). *In-vitro* bağlanma bölgelerinde trofektoderm ve luminal epitel hücreleri arasında apikal birleşme kompleksleri ve desmozom paylaşımı vardır (Bentin-Ley ve arkadaşları, 2000; Lopata ve arkadaşları, 2002).

Desmozomal plazma membran proteinleri (desmokollinler ve desmogleinler) kadherin üst ailesinin üyeleridir ancak klasik kadherinlerden farklı sitoplazmik bölgelere sahiptir ve plakoglobin alımına izin verir. Bu yapı ara filament hücre iskeleti ile bağlantılıdır. Dokuya ve farklılaşmaya özgü bir şekilde ifade edilen üç desmokollin ve desmoglein alt tipi bulunmaktadır. Desmozomal kadherinler, klasik kadherinlerin homotipik etkileşimlerinin aksine heterotipik etkileşimlere açıktır. Desmozomal kadherinler, klasik kadherinlerin yokluğunda hücre-hücre yapışmasını başlatabilir ve sürdürebilirler. Desmoglein-2 eksik fareler ve heterozigotların bir kısmı, iç hücre kütlesi kusurları nedeniyle implantasyonda başarısız olur (Eshkind ve arkadaşları, 2002). Desmoglein 1 ve 2, sıçan uterus epitelinde gözlenir. İnsan endometriyumundaki doku fenotipinin daha fazla analiz edilmesi gereklidir (Preston ve arkadaşları, 2004). Apikal birleşme kompleksindeki endometriyal luminal epitel hücrelerinde sıkı bağlantılar belirgindir ve bunların derinliği ve karmaşıklığı 24-25.

günlere göre 14-16. günlerde daha yüksektir (Murphy ve arkadaşları, 1992; Dockery ve Burke, 2008). Sıçanlarda, implantasyon sırasında apikal plazma membranında, sıkı bağlantıların artan derinliği, mikrovillusların düzleşmesi ve apikal hücre iskeletindeki ilişkili değişiklikler ile bir dönüşüm vardır (Lindsay ve Murphy, 2008). Endometriyumdaki sıkı bağlantıların savunma işlevi, daha fazla incelemeyi gerektirmektedir. İmplantasyonda trofektoderm ile etkileşimlere dahil olabilecek birçok adezyon molekülü, apikal alana regüle difüzyon olabilecek şekilde yanal membran alanında spesifik olmamakla birlikte esas olarak bulunur. İşlevsel potansiyeli açısından önemlidir (Aplin, 2006).

İmmünoglobulin süper ailesi

İmmünoglobulin süper ailesinin (IgSF) üyeleri, hücre-hücre adezyon reseptörleri veya sinyal transdüksiyon reseptörleri yada her ikisi gibi de davranarak, hücre davranışının kontrolünde yer alır (Aricescu ve Jones, 2007). IgSF üyeleri, homofilik bağlanmaya dahil olabilir veya heterofilik hücre-hücre yapışmasına aracılık etmek için integrinler için ligand görevi görebilir (Singh ve Aplin, 2009).

ICAM-1 (CD54)

Hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1 veya CD54), β_2 integrinler için bir ligandır. ICAM-1 adezyon etkileşimleri, lökositlerin transendotelyal göçüne ve diğer çeşitli immünolojik fonksiyonlara aracılık eder (van de Stolpe ve van der Saag, 1996). ICAM-1, adet döngüsü boyunca endometriyal epitel hücrelerinin apikal yüzeyine immünolokalizedir (Thomson ve arkadaşları, 1999). ICAM-1'in dolaşımdaki formu, transmembran ICAM-1'in proteolizi ile hücre yüzeyinden salınmaktadır (Defrere ve arkadaşları, 2005).

C-CAM ve N-CAM

İmplantasyon sırasında trofektoderm yüzeyinde bulunan diğer IgSF ailesi üyeleri, homofilik hücre-hücre yapışma molekülü 105 (C-CAM) (Svalander ve arkadaşları, 1987) ve nöral yapışma molekülüdür (N-CAM) (Kimber ve arkadaşları, 1994). C-CAM protein ifadesini, östrojen etkisi altında lümen epitelinde de tespit edilirken, dışa vurum progesteronlu uterusu aşağı düzenlenir (Svalander ve arkadaşları, 1990).

CD146

CD146 (Mel-CAM; MUC18), gebeliğin ilk trimesterinde invazif sitotrofoblastlarda ifade edilir, ancak invazif olmayan trofoblastta ifade edilemez (Shih ve arkadaşları, 1998b; Liu ve arkadaşları, 2004). *In vitro* trofoblast invazyonunda fonksiyonel bir yol gösterilmiştir (Shih ve arkadaşları, 1998a). Farelerde CD146, özellikle alıcı maternal uterin ve invaziv embriyonik trofoblastlarda ifade edilir, hamile olmayan rahimlerde bulunmamaktadır. CD146 fonksiyonunun antikör tarafından *in vivo* ve *in vitro* bloke edilmesi, blastosist bağlanmasını ve ardından trofoblastik istilayı güçlü bir şekilde inhibe ederek gebelik başarısızlığına yol açmıştır (Liu ve arkadaşları, 2008).

Basigin

Basigin; EMMPRIN ya da CD 147 olarak bilinmektedir. Hücre yüzeyinde çok sayıda bağlanma partnerlerine sahip, oldukça glikosile bir transmembran glikoproteindir (Singh ve Aplin, 2009). Basigin, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve dokuların yeniden şekillenmesinde rol oynayan bir transmembran glikoprotein yapısına sahiptir. Basigin'in erkek ve dişi üremesinde gerekli olduğu gösterilmiştir ancak normal uterus fonksiyonundaki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir (Li ve arkadaşları, 2021).

Basigin komşu hücreler arasındaki homotipik etkileşim ile aktive edilebilir. Ancak aynı zamanda matris metaloproteinaz (MMP) aracılı proteoliz aktivatörü olarak da bilinir. Kaveolin, monokarboksilat taşıyıcılar ve $\beta 1$ integrinler ile kompleks oluşturma dahil olmak üzere hücre yüzeyinde birden fazla moleküler ilişkide yer alır. Basigin döllenme ve implantasyon için gereklidir (Iacono ve arkadaşları, 2007).

Basigin, MMP'ler ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyojenik faktörlerin güçlü bir indükleyicisi olmasının yanı sıra, ayrıca monokarboksilat taşıyıcıları gibi plazma hücre zarındaki spesifik metabolit taşıyıcıları için bir şaperon proteindir ve hücre metabolizmasının önemli bir düzenleyicisidir (Li ve Nowak, 2020).

Basigince yoksun mutant fareler, her iki cinsiyette de kısırlık sergilemiştir. Birçok basigin yoksun mutant farede, embriyonun, implantasyon zamanları sırasında kaybolduğu gösterilmiştir. Sınırlı sonuçlara dayanarak, kusurlu implantasyon, kadın kısırlığının nedeni

olarak kabul edilmiştir. Basigin geninin bozulmasının, yalnızca implantasyon değil, aynı zamanda dölleme de dahil olmak üzere dişi üreme süreçlerinde başarısızlığa yol açtığını düşünülmektedir. Kümüls hücrelerinde Basigin mRNA ifadesi ve bazolateral lokalizasyonu, endometriyal epiteldeki Basigin proteininin, bu süreçlerde önemini daha da desteklemektedir (Kuno ve arkadaşları, 1998).

Uterus epitel hücrelerinde, basigin protein ifadesini, östrojen ve progesteron reseptörlerinin en yüksek düzeyde ifade edildiği proliferatif faz sırasında en güçlü şekilde olduğu bilinmektedir (Braundmeier ve arkadaşları, 2006).

İnsanda Basigin, lenfositlerin aktivasyonunu ve matris metaloproteazın (MMP) uyarılmasında rol oynar (Biswas ve arkadaşları, 1995; Kasinrerck ve arkadaşları, 1992). Endometriyal epiteldeki Basigin, MMP'nin, trofoblast tarafından ifade edilmesini uyararak, trofoblastın uterus lümen epiteline invazyonuna katkıda bulunabilir (Kuno ve arkadaşları, 1998). MMP'ler, kalsiyum ve çinko bağımlı proteolitik enzim ailesidir. Bu ailenin bir üyesi olan MMP-2 ve MMP9 jelatini, tip IV, V, VII ve X kollajeni parçalayan tip IV kollajenazlardır. MMP-2 fibroblastlar, endotel hücreleri ve osteoblastlar; MMP-9 inflamatuvar hücreler, tümör hücreleri, keratinositler ve epitel hücreleri tarafından sentezlenmektedir (Taskan ve Gonenc, 2020).

Nedeni belirlenememiş infertil hastaların endometriyumdaki MMP-9 mRNA seviyelerinin daha düşük olduğu belirtilmiştir (Wu ve Zhon, 2003). Aksine bir diğer çalışmada ise; yapılan PCR çalışmalarının sonucunda nedeni bilinmeyen infertil endometriyumlarında ve tekrarlayan gebelik kaybı bulunan endometriyumlarda MMP-2 ve MMP-9 ifadelerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (Öner ve Öner, 2013). Bulunmuş olan bu sonuçlar idiyopatik infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıplarında endometriyal Ekstrasellüler Matriks (ECM)'in rolü olabileceğini göstermiştir. Çünkü desidualizasyon aşamasında uterus ECM yıkımı gerçekleşir. Bu yıkımı gerçekleştiren faktörler de başarılı bir implantasyon ve gebelik için oldukça önemlidir (Öner ve arkadaşları, 2006). ECM yıkılması da kısmen MMP'lar aracılığıyla düzenlenir. MMP ailesi de ECM'nin en azından bir bileşenini parçalayabilen proteinazdır (Aksun ve arkadaşları, 2001).

Hem farelerde hem de sıçanlarda basigin gebeliğin 1. gününde östrojenin etkisi altında, lümen epitelinde azalarak düzenlenir, ancak daha sonra 4. günde embriyonik uyaranlara yanıt şeklinde ve lokal olarak yeniden ortaya çıkar (Xiao ve arkadaşları, 2002a,b).

Basigin ifadesinin endometriyumun embriyo ile tutunum bölgesinde, lokal olarak arttığı ve, basigin genine sahip olmayan mutant farelerin ciddi şekilde düşük implantasyon oranlarına sahip olduğu bildirilmiştir (Igakura ve arkadaşları, 1998). Fare endometriyumundaki basigin ekspresyonu, lümende embriyo olmayan bölgelere göre daha güçlü bulunmuştur (Kuno ve arkadaşları, 1998). Basigin mRNA, 4.0-7.5 günlerde iç hücre kütlesi ve embriyoda güçlü bir şekilde ifade edilmektedir (Igakura ve arkadaşları, 1998).

İnsan endometriyumunda hem bez epitel, hem de stromal hücrelerde güçlü ifadesi ile; luminal (lateral) epitel yüzeylerinde zayıf bir şekilde dışa vurum yaptığı bazı çalışmalarca söylenmiştir. İmmünofloresans ve hücre yüzeyi proteomik analizi ile Ishikawa hücrelerinde orta derecede apikal dağılımda gözlemlenir. İnsan endometriyumunda adet döngüsüne bağlı olarak moleküler varyantlar gözlemlenmiştir (Noguchi ve arkadaşları, 2003).

ALCAM (CD166)

Aktifleştirilmiş bir lökosit-hücre adezyon molekülü olan ALCAM (CD166), IgSF'ye ait bir transmembran glikoprotein ve T lenfositler üzerinde ifade edilen CD6 için bir ligandır. ALCAM-ALCAM homotipik adezyonunun kök hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (van Kempen ve arkadaşları, 2001). ALCAM, endometriyal luminal ve bez epitel hücre yüzeylerinde ve ayrıca blastosist hücre yüzeyinde ifade edilir (Fujiwara ve arkadaşları, 2003). MMP aracılı proteolizi aktive eder (Lunter ve arkadaşları, 2005). Normal endometriyuma kıyasla endometrioziste ekspresyon önemli ölçüde azalmıştır (Zhang ve arkadaşları, 2006).

Trophinin

Trophinin, insan trofoblastik ve endometriyal hücre sınırlarının adezyonundaki rolüne dayalı olarak tanımlanan apikal bir transmembran glikoproteinidir (Fukuda ve arkadaşları, 1995; Fukuda ve Sugihara, 2008). Trophinin sitoplazmik alanı, bistin ve tastin proteinleri

ile kompleksler oluşturur. Trophinin, kalsiyuma bağlı homofilik hücre yapışmasına aracılık ediyor gibi görünmektedir ve trofoblast aktivasyonu için moleküler bir anahtar görevi görür; bunun ligasyonu, trofoblastta proliferasyonu ve motiliteyi teşvik ettiği ileri sürülen bir sinyal olayı olan HB-EGF varlığında, ErbB4 fosforilasyonuna yol açar. Farelerde trophinin hem blastosist hem de uterus tarafından koitus sonrası 3,5 ve 5,5. günlerde uterus tarafından ifade edilir. Ancak erken implantasyon sırasında kesinlikle gerekli değildir. Makak ve maymun implantasyon bölgelerinde trophinin ifadesi hem luminal epitelin apikal yüzeyinde hem de trofoblastta gözlenir (Fukuda ve Sugihara, 2008).

CD164

CD164 (endolin, MUC24), sisteinden zengin, müsin olmayan bir alan ve 13 amino asitten oluşan, iki hücre dışı müsin alanı (I ve II) içeren yüksek oranda O-glikosile olmuş bir tip I transmembran proteindir (Chan ve arkadaşları, 2001; Ihrke ve arkadaşları, 2000). Alternatif birleşim, çözünür bir form da dahil olmak üzere, moleküler varyantların üretimine yol açar. CD164, insan hematopoietik kök hücrelerinin proliferasyonunu, yapışmasını ve yer değiştirmesini düzenler (Zhou ve arkadaşları, 2010). CD164'ün prostat kanseri hücre hatları üzerinde bloke edilmesi, bunların kemik iliği endotel hücrelerine yapışmasını ve hücre dışı matrikslerin (ECMs) istilasını azaltmıştır (Havens ve arkadaşları, 2006).

Endometriyal epitel hücreleri ve endometriyal biyopsiler üzerinde yapılan immüno lokalizasyon çalışmaları, CD164'ün lümen epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde bez epitel ve stromal hücrelerle birlikte ifade edildiğini ve bunun embriyo bağlanması sırasında rol oynayabileceğini düşündürdüğünü göstermektedir.

İntegrinler ve bağlanma partnerleri

İntegrinler, α ve β alt birimlerinin kovalent olmayan birleşmesi ile oluşturulan bir transmembran glikoprotein ailesidir. Her bir alt birim, bir hücre dışı alan, bir transmembran bölge ve bir hücre içi alan içerir. ECM bileşenleri, salgılanan glikoproteinler, tamamlayıcı ve diğer hücreler için reseptör görevi görürler. Ligand bağlanmasına yanıt olarak integrinlerin fokal yapışma bölgelerine birleşmesi, hücre iskeleti proteinleri ve hücre içi sinyal kompleksleri ağının görevlendirilmesine yol açar (Arnaout

ve arkadaşları, 2007). İntegrinlerin implantasyondaki rolü geniş çapta araştırılmış ve anahtar noktaları özetlenmiştir (Aplin, 1997, 2006; Lessey, 1998, 2000, 2002; Lessey ve arkadaşları, 2000; Aplin ve Kimber, 2004; Kimber, 2008).

β_1 İntegrinler

$\alpha_2\beta_1$ ve $\alpha_3\beta_1$ integrinler, adet döngüsü sırasında yapısal olarak ifade edilir ve kolajen ve interstisyel ECM'nin diğer bileşenleri için reseptörler olarak, menstrüasyondan sonra yeniden epitelizasyonda kullanılabilirler. $\alpha_1\beta_1$ ve $\alpha_4\beta_1$ integrinleri döngünün 20-24. günlerinde ifade edilir. Alt birim lokalizasyon verileri, integrinlerin farklı miktarlarda da olsa apikal, bazal ve lateral epitel yüzeylerinde mevcut olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, β_1 genellikle belirgin bir yanal dağılım gösterir (Quenby ve arkadaşları, 2007).

İntegrin β_1 alt biriminden yoksun fare blastosistleri, görünüşe göre subepitelyal stromaya yapışamama veya ona tutunamama nedeniyle implante olamamaktadır (Brakebusch ve arkadaşları, 1997). Antikor uyarım deneyleri, fare implantasyonunda integrin $\alpha_4\beta_1$ 'in bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Basak ve arkadaşları, 2002).

α_v İntegrinler

α_v integrinler ECM'yi veya bir arginin-glisin aspartik asit (RGD) peptit motifi içeren salgılanan proteinleri bağlar. Endometriyal epiteldeki orta sekretuar fazda $\alpha_v\beta_3$ ' deki artış, 19. günden sonraki β_3 miktarındaki artıştan kaynaklanır (Lessey, 2002). Bu, transkripsiyon faktörü HoxA10'un aracılık ettiği steroidlerden kaynaklı bir etkidir (Daftary ve arkadaşları, 2002). Atipik $\alpha_v\beta_3$ integrin, açıklanamayan kısırlık ve diğer endometriyal patolojiler ile ilişkilendirilmiştir (Lessey ve arkadaşları, 1992, 1994, 1995, 1996; Apparao ve arkadaşları, 2002). $\alpha_v\beta_5$ ve $\alpha_v\beta_6$ integrinler de endometriyumda bulunmaktadır (Aplin ve arkadaşları, 1996). Bu ailenin integrinleri, implantasyon sırasında trofektoderm tarafından ifade edilir (Campbell ve arkadaşları, 1995b; Bloor ve arkadaşları, 2002). Fare veya tavşan modellerinde $\alpha_v\beta_3$ etkileşimlerinin bloke edilmesinin implantasyonu bozduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte α_v eksikliğindeki fareler fertildir (Illera ve arkadaşları, 2000; Illera ve arkadaşları, 2003).

Osteopontin ve diğer integrin ligandları

Hem trofoblast hem de uterin epitel yüzeyinde bulunan integrinler, embriyonik yapışmaya aracılık etmek için iki işlevli hücre dışı bir köprü ligandına bağlanabilir. Osteopontin (OPN; SPP1 olarak da bilinir), bir RGD motifi içeren ve multimerizasyon yapabilen salgılanmış bir glikoproteindir (Johnson ve arkadaşları, 2003). Osteopontin, progesteron tarafından düzenlenir ve ağırlıklı olarak apikal LE ve GE hücrelerine immünolokalleştiğinde döngünün salgılama fazında en yüksek seviyeye ulaşır (Apparao ve arkadaşları, 2002; Quenby ve arkadaşları, 2007). Gebe koyunlarda, osteopontin mRNA progesterona bağlıdır ve ortaya çıkan protein, bu türdeki erken implantasyonun yapışma ve bağlanma aşamasına karşılık gelen bir dönem olan 11. ve 17. günler arasında salgılanır (Johnson ve arkadaşları, 2000; Spencer ve arkadaşları, 2004). Gerçekten de, OPN tam olarak trofektoderm ve lüminal epitel arasındaki arayüzde lokalize olur (Johnson ve arkadaşları, 1999). Osteopontini kodlayan mRNA da insan trofoblastlarında progesteron tarafından yukarı seviyeye düzenlenir (Omigbodun ve arkadaşları, 1997). OPN'nin; $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$ integrinler dahil ve CD44'ün spesifik varyantlarını da içeren (v3 ve v6) birden fazla bağlayıcı ortağı vardır. OPN'nin uyarımındaki artış, insanlarda orta sekretuar faz sırasında lümen epitelinde artan integrin $\alpha_v\beta_3$ ifadesiyle eşleşir. Bu nedenle, $\alpha_v\beta_3$ ve CD44 dahil reseptörlerle OPN kompleksleri, embriyo bağlanmasını desteklemek için luminal epitelin apikal yüzeyinde oluşabilir. OPN eksik fareler fertildir (White ve arkadaşları, 2006).

Başka integrin ligandları da mevcuttur. Fibronektin, insan embriyolarında ZP ile bağlantılı olarak tanımlanmıştır (Turpeenniemi-Hujanen ve arkadaşları, 1995). Heparan sülfat proteoglikan (HSPG) perlekan, fare blastosistinin dış yüzeyinde bulunur ve onun çekirdek proteini, $\alpha_v\beta_3$ integrini için ligand görevini üstlenebilir (Carson ve arkadaşları, 1993). Trombospondin, $\alpha_v\beta_3$ için bir liganddır ve trofektoderm ile bez epitel ve desidua ile ifade edilir (O'Shea ve arkadaşları, 1990).

Integrin $\alpha_6\beta_4$

İntegrin $\alpha_6\beta_4$ temelde endometriyal epitelde ifade edilir (Murray ve arkadaşları, 1999). İntegrin $\alpha_6\beta_4$, lamininler için bir reseptör görevi görür ve bazal membrana hücre yapışmasına aracılık eder ve hücre polaritesini düzenler. Aynı zamanda, bazal membranlar

üzerinden göçünde de rol oynayabilir (Guo ve arkadaşları, 2006; Friedland ve arkadaşları, 2007).

CD9

Transmembran-4 süper ailesinin bir üyesi olan CD9, trofoblast tarafından üretilen gebeliğe özgü glikoproteinler için bir reseptördür (Park ve arkadaşları, 2000; Wynne ve arkadaşları, 2006) ve endometriyal epitel hücrelerinde $\alpha 6$, $\alpha 3$ ve $\beta 1$ integrinleri ile birleşir (Hirano ve arkadaşları, 1999; Park ve arkadaşları, 2000). Baskın olarak lümen epitel hücrelerinin lateral membranlarında dağılır ve blastosistlerde ifade edilir. Bir in vitro fare embriyo bağlanma modelinde CD9'a karşı bloke edici antikörlerin kullanıldığı fonksiyonel analiz, bağlanma hızı üzerinde hiçbir etki göstermedi ancak trofoblast büyümesini uyardı. Farelerde, CD9'a karşı antikörler gebeliğin 4. gününde enjekte edildikten sonra implantasyon alanlarında bir artış gözlemlenmiştir (Li ve arkadaşları, 2006). CD9'a karşı antikör, BeWo koryokarsinoma hücrelerinin göçünü arttırır, belki de integrin ilişkisinin işlevi inhibe edici olduğunu düşündürür (Hirano ve arkadaşları, 1999). CD9 implante edilmeyen embriyolar normalde CD9 yoksun annelerde, CD9'un implantasyonun bir inhibitörü veya düzenleyicisi olduğu hipoteziyle uyumludur (Wynne ve arkadaşları, 2006).

Karbonhidrat bağlanma reseptörleri ve implantasyon

Sekretuar faz glikokaliksinde ve sekretuar materyalde zengin bir şeker yapısı çeşitliliği mevcuttur. Bu da immünohistokimya kullanılarak gösterilmiştir (Aplin, 1991; Hey ve arkadaşları, 1994; Jones ve arkadaşları, 1998). Bazı yapılar, türe özgü bir şekilde hormonal olarak düzenlenir (Jones ve arkadaşları, 1998). Bir hücre yüzeyi glikan kodunun, trofektoderm epitel bağlanmasını düzenlemede rol oynadığı öne sürülmüştür (Jones ve Aplin, 2008); bu, epitelyal yerleşimli türlerde insanda olduğundan çok daha uzun ömürlüdür (Jones ve Aplin, 2004). Epitelyal trofoblast arayüzündeki karbonhidrat bağlayıcı proteinler, böyle bir etkileşime aracılık etmenin bir yolunu sağlayabilir (Singh ve Aplin, 2009).

CD44

CD44, tek geçişli bir transmembran glikoproteindir ve endometriyumda gözlenen birkaç izoform ile alternatif birleşim karmaşık bir modelde olduğunu gösterir (Behzad ve arkadaşları, 1994; Horne ve arkadaşları, 2002). CD44 hücre göçü ile ilişkilidir ve hiyaluronat ve osteopontin dahil olmak üzere çok sayıda bağlayıcı ortağa sahiptir (Behzad ve arkadaşları, 1994; Poncelet ve arkadaşları, 2002; Cichy ve Pure, 2003).

Endometriyumda, CD44 hem bez epitelinde hem de luminal epitelde baskın olarak lateral bir dağılım gösterir (Behzad ve arkadaşları, 1994). Sekretuvar fazda, lateral membrandaki ifadesi artarken (Albers ve arkadaşları, 1995); orta sekretuvar fazda lateral membranda en yüksek düzeye ulaşır (Afify ve arkadaşları, 2006). Epitelyale özgü diziler, müsin benzeri alanların özelliklerine sahiptir, serin, treonin ve diğer hidrofilik amino asitler açısından zengindir ve yüksek bir glikosilasyon potansiyeli sunar (Cichy ve Pure, 2003). CD44 ayrıca implantasyon öncesi insan embriolarında da ifade edilir (Campbell ve arkadaşları, 1995a). CD44 yönünden eksik mutant fareler fertildir (Singh ve Aplin, 2009).

Galektinler

Galektinler, lektin süper ailesine ait olan kalsiyumdan bağımsız β galaktozid bağlayıcı proteinler ailesidir. Galektinler için çeşitli işlevler tanımlanmıştır: immünomodülasyon, hücre yapışması ve kemotaksis, hücre yüzey reseptörü görevi, büyüme faktörü yanıtlarının ölçeklendirilmesi ve istilacı mikroorganizmalara karşı savunma görevleri gibi işlevleri vardır. Galektinler klasik olmayan bir yolla hücrelerden salgılanır. Büyük olasılıkla, hücre yüzeyinde ve/veya ECM'de karbonhidrat zincirlerini çapraz bağlayarak hareket ederler (Lau ve arkadaşları, 2007; Rabinovich ve arkadaşları, 2007). Galektin-1'in (LGALS1) döngüye bağlı ifadesi, insan endometriyal stromal hücrelerinde; galektin-3, epitel hücrelerinde gözlenir (von Wolff ve arkadaşları, 2005; Aplin ve Singh, 2008). Galektin-1'in hem adhesif hem de anti-adhesif rollere sahip olduğu ve materno-fetal toleransta işlevleri olan bir immünomodülatör olduğu düşünülmektedir (Blois ve arkadaşları, 2007). Geç blastosistlerin trofektodermindeki transkriptlerin ifadesi, Galektin-1'in, embriyo implantasyonunda rol oynayabileceğini gösterir. Bununla birlikte, galektin-1 eksik mutant fare embriyoları normal şekilde gelişir ve herhangi bir açık fenotipik anormallik göstermez (Poirier ve Robertson, 1993).

Galektin-3 (LGALS3), adet döngüsünün sekretuvar fazında ifadesi önemli ölçüde artan galaktoza özgü bir lektindir (von Wolff ve arkadaşları, 2005). Epitel hücrelerinden salgılanmasından sonra laminin, fibronektin ve integrinler gibi ligandlara bağlanarak hücre yapışmasını modüle edebilir (Colnot ve arkadaşları, 1998).

Ayrıca, Galektin-9'un ekspresyonu, galektin-9'un insan embriyo implantasyonunun ilk olayları sırasında bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Shimizu ve arkadaşları, 2008).

Galektin 15 (OVGAL 11)'in ise, progesteron tarafından indüklenir ve koyunlarda endometriyal luminal epitelden salgılanır, burada trofektoderm bağlanmasında ileriye dönük bir rolü vardır (Farmer ve arkadaşları, 2008).

Selektinler

Selektinler, yüksek oranda glikoliz edilmiş hücre dışı bir alan, tek bir transmembran alan ve küçük bir hücre içi sitoplazmik kuyruk içeren kalsiyuma bağımlı hücre adezyon molekülleridir (Barthel ve arkadaşları, 2007). Blastosist üzerinde L-selektin ifadesine dair kanıt vardır ve maternal yüzeyde oligosakkarit ligand ile etkileşimin fizyolojik önemi ileri sürülmüştür. L-selektin ligandları, lüminal ve glandüler epitelyuma lokalize edilir ve implantasyon penceresi sırasında ifadesinde artışı sağlanır (Hey ve Aplin, 1996; Red-Horse ve arkadaşları, 2004; Lai ve arkadaşları, 2005). Bununla birlikte, üç selektinin her biri için boş homozigotik mutant farelerde ve üç selektinin ikisine veya hepsine sahip olmayan farelerde embriyonik gelişim, implantasyon ve gebelik normal görünmektedir (Bullard ve arkadaşları, 1996; Robinson ve arkadaşları, 1999; Collins ve arkadaşları, 2001).

2.1.7. Hücreler arasındaki bağlantılar ve implantasyondaki rolleri

Dokuları oluşturan hücrelerin birbirleri ile ilişkisini düzenleyen mekanizmalar; hücreleri birbirine mekanik olarak bağlamasının yanısıra, boşluğun hücreler arası geçirgen veya yarı geçirgen bir hal almasını da sağlar. Ayrıca hücreden hücreye impulslarla uyarı ve kimyasal madde taşınmasını sağlarlar. Epitel doku hücrelerinin morfolojik temas oluşumları; Zonula okludens, Zonula Adherens, Macula Adhaerens yani desmozomlar şeklindedir (Kızıroğlu, 2004).

Zonula okludens; sıkı bağlantı olarak da isimlenmektedir (Campbell ve Reece, 2006). Yan hücre plazmalema dış lamellerinin birbirleri ile kaynaşmasıyla oluşurlar (Kiziroğlu, 2004). Hücrelerin çevresinde devamlılık taşıyan bir kuşak oluşturarak hücre dışı sıvısının epitel hücre tabakasının dışına sızmasını önlerler (Campbell ve Reece, 2006). Büyük moleküllerin girişine bölgeden izin olmazken; küçük iyonlar ve elektrik uyarılarının geçişinde bu yapılar etkindir (Kiziroğlu, 2004).

Zonula adhaerens; ara bağlantı ve iletişim bağlantıları olarak da adlandırılmaktadırlar (Campbell ve Reece, 2006). Zonula okludens ile ilişki halindedir. Burada iki hücre arasındaki boşluk 20 nm'dir (Kiziroğlu, 2004). Komşu hücreler arasında sitoplazmik bağlantıların kurulmasını sağlarlar. Tuz iyonları, şekerler, aminoasitler, nükleotitler, vitaminler, hormonlar ve diğer küçük moleküllerin geçişine olanak sağlayacak büyüklüktedir. Hücre arası geçitlerin en önemli görevlerinden birisi de, embriyonik gelişim esnasında, bazı belirli maddelerin hücreden hücreye bu yolu kullanarak geçip, doku ve hücrelerin farklılaşmasını sağlamaktır (Demirsoy, 2004).

Makula adherens; aynı zamanda dezmozom ve implantasyon bağlantıları olarak da ifade edilirken (Kiziroğlu, 2004; Campbell ve Reece, 2006); iki hücrenin birbirleriyle temasta olan noktaları da yarı dezmozom olarak adlandırılmaktadır (Kiziroğlu, 2004). Yapıştırıcı madde rolü üstlenen bir glikoprotein tabakası mevcuttur. Plazmalemma bu bölgede çok kalınlaşmıştır. Hücreleri güçlü tabakalar formunda perçinleyerek bağlama işlevi görürler (Campbell ve Reece, 2006), hücrelerin mekanik bağlantılarına destek olurlar. Buradaki tonofilamanlar hücreye dayanıklılık vermektedir (Kiziroğlu, 2004).

Erken gebelikte embriyonun anne vücudunun olumsuz ortamından korunmasının, implante olan embriyonun yakın çevresini kaplayan desidual hücreler tarafından oluşturulan geçici bir geçirgen bariyerin oluşturulmasıyla elde edildiği düşünülmektedir. Normalde, polarize epitel, maddelerin hücre içi geçişini dar bağlantılarla düzenleyerek bir bariyer görevi görür. İmplantasyon öncesi uterus lümen epitelinde sıkı bağlantı proteinlerinin ifadesi bu düşünceyle uyumludur. Ancak, desidualize stromal hücreler tarafından implantasyon sırasında oluşturulan geçirgenlik bariyerinin doğası ve regülasyonu üzerine sınırlı bilgi bulunmaktadır. Sıkı bağlantı proteinlerinin, okludin, kladin-1, zonula okludens-1 ve zonula okludens-2'nin, tümünün ifade edildiğini ve embriyoyu çevreleyen bir bariyer oluşturan desidualize stromal hücrelerin fiziksel varlığı ile ilişkili olduğu burada gösterilmektedir (Wang ve arkadaşları, 2004). Blastosist

trofektodermin bu bariyerin yaratılması için uyarıcı olduğu görünmektedir, çünkü izole edilmiş iç hücre kütlesi veya yapay uyaranlar, böyle bir bariyer oluşturmada başarısız olmuştur. Ayrıca, normal blastosist tarafından uyarılan birincil desidual bölge, geçirgen değildir. Bu bulgular, trofoblastın neden olduğu sıkı bağlantıların ifadesiyle birincil desidual bölgenin hücrelerinde geçici bir bariyer oluşturduğunu ve annenin immünoglobulinleri gibi embriyoya zararlı uyaranların geçişini kısıtladığını gösterir (Wang ve arkadaşları, 2004).

Epitelyal ve/veya endotelyal bariyerler, insan da dahil olmak üzere hayvan yaşam formlarında kritik bir rol oynar. Sıkı bağlantılar, bu engellerin önemli bir bileşenidir. Okludin de bu sıkı bağlantıların önemli bir parçasıdır (Feldman ve arkadaşları, 2005). Sıkı bağlantıların stabilizasyonuna ve optimal bariyer fonksiyonuna katkıda bulunan bir integral membran proteini (Cummins, 2012).

2.2. İnfertilizasyon ve IVF Teknikleri

Bir yıl süreyle korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalınamaması durumu infertilite olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Amerikan Üreme Tıbbi Derneği (ASRM) bu tanımın bir yıl korunmasız ilişkiye rağmen, gebe kalınamaması durumunda, bu tanımın kullanılmasını uygun görmüştür (Zegers-Hochschild ve arkadaşları, 2009; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008; National Collaborating Centre, 2013). Herhangi bir sağlık problemi bulunmayan bir çiftte haftada 2-3 kez birlikte olan genç bir çiftin infertilite tetkiklerine başlanması için bir yıl beklemleri önerilmektedir. Yaş ile birlikte fertilitenin şansının düştüğünü düşünürsek, 35 yaş üzerindeki kadınlarda ve ayrıca; amenore, pelvik inflamatuvar hastalık, pelvik cerrahi, inmemiş testis gibi de fertilitenin düşürücü risk faktörleri bulunuyorsa infertilite testlerine daha erken başlanması önerilen bir durumdur (World Health Organization, 1991). Birincil infertilite daha önce hiç gebelik oluşmaması; ikincil infertilite ise daha önceden bir gebelik öyküsüne sahip olması şeklinde tanımlanmaktadır. Tüm dünya baz alındığında, doğurgan yaştaki kadınlar ve onların eşleri ile oluşmuş çiftlerin %8-12'sinin infertil olduğu düşünülmektedir (Johnson ve Tough, 2012).

IVF; oositin vücut dışında sperm ile fertilize edilmesini içeren bir prosedürdür (Nargund ve arkadaşları, 2007, Edwards ve arkadaşları, 2007). Bunun için uygulanan iki teknik mevcuttur; ilki, konvansiyonel IVF (Steptoe ve Edwards, 1978) diğeri ise intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)'dir (Palermo ve arkadaşları, 1992). Laboratuvarında gerçekleştirilen

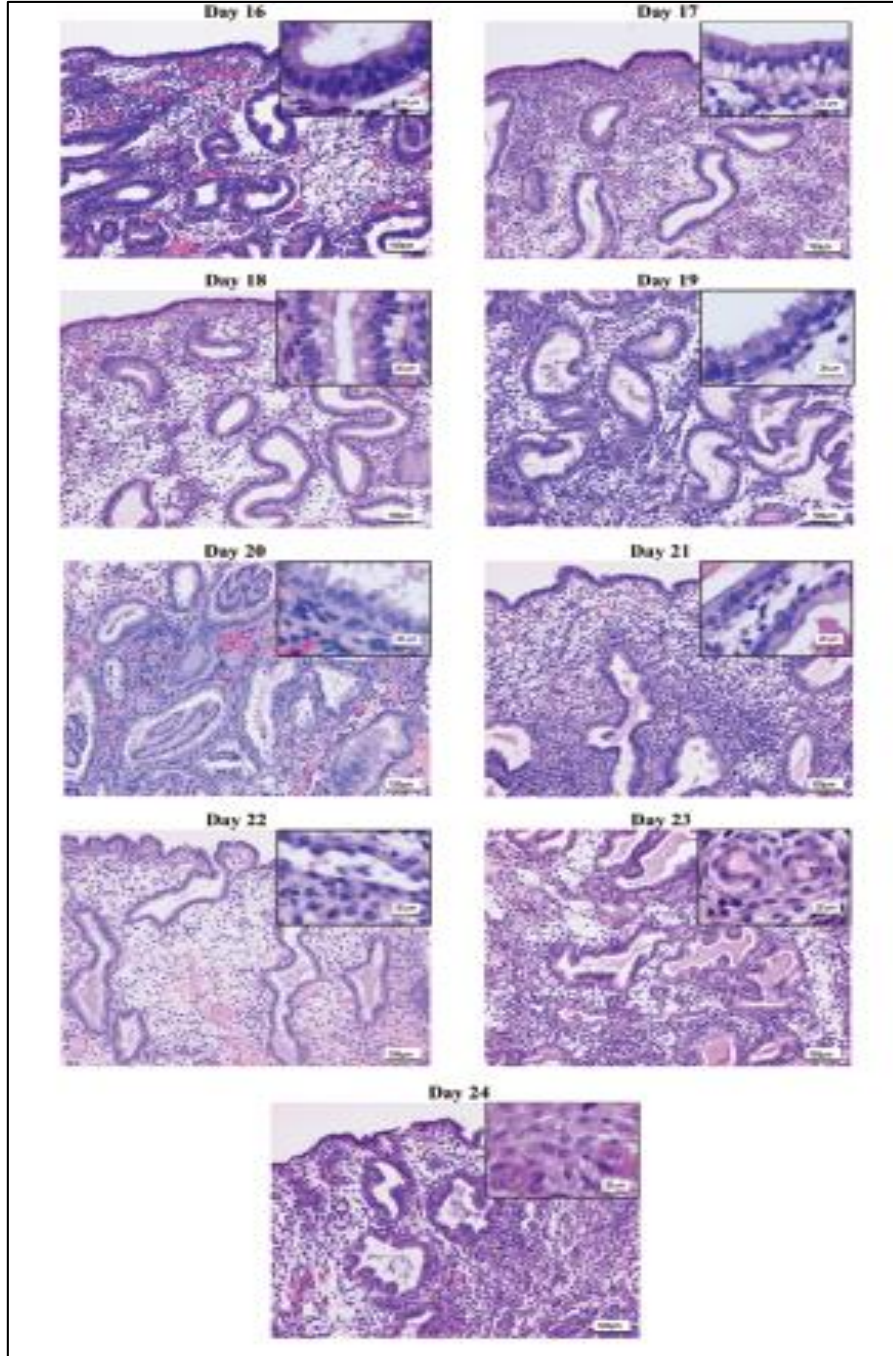
konvansiyonel IVF, aslında canlı içerisinde gelişen olayların taklidi gibi düşünülebilir. Oositler bir petri kabına yerleştirilerek erkekten elde edilerek işlenmiş olan sperm ile karıştırılır. Oositin dış katmanlarında bulunan kümülüs ve korona hücrelerinin sperm tarafından geçilmesi ve oosit içerisine girebilmesi için petri kabında genellikle 1 gece (bazen birkaç saat) bekletilir (Gardner ve Simon, 2019). 80'lerin başında ise kontrollü ovaryan hiperstimülasyonunun (KOH) başlaması, daha fazla oosit elde edilmesine imkan verdiği için IVF işlemini daha verimli hale getirmiştir (Trounson ve arkadaşları, 1981; Fleming ve arkadaşları, 1982). Bu yöntemde ultrason eşliğinde folikül aspirasyonu uygulanarak oosit(ler)'in toplanması etkili ve güvenli bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır (Chian ve arkadaşları, 2004; Tan ve Child, 2002; Child ve arkadaşları, 2001). Daha sonra toplanmış olan oosit(ler) ICSI için hazırlanmalıdır. Hazırlanan spermier içerisinden de sperm seçimi oldukça önemlidir. Oosit toplandıktan 3-5 saat sonrasında ICSI işlemi uygulanır. Seçilmiş olan spermin kuyruğu sıkılıp hareketsizleştirilerek ooplazma içerisine iletilir (Gardner ve Simon, 2019).

2.3. Endometriyal Günleme ve Noyes Kriterleri

Luteal faz, ovülasyon ile menstrüasyon arasında geçen ortalama olarak 14 günlük bir süredir ve progesteron üretimini gerçekleştiren korpus luteumun oluşumu ile karakterizedir. Progesteron salınımı, endometriyumun, sekretuvar faza dönüşümünü başlatmakta ve implantasyona hazırlanmasını sağlamaktadır. Gebeliğin erken evresinde korpus luteumun çıkartılması abortusa neden olmaktadır. Gebeliğin devamını olumsuz etkileyen luteal faz yetmezliğinde endometriyumun sekretuvar faza dönüşümü yetersiz ve daha kısa süreli olmaktadır (Selam ve Topçuoğlu, 2004). Endometriyumun histolojik gelişiminde 2 günden daha fazla olacak bir gecikme luteal faz yetmezliğinin tanımıdır. Bu yetmezliğin tanımlanmasında ise literatürde en sık baş vurulan yöntem; Noyes ve arkadaşlarının tarif ettiği klasik kriterlere göre yapılmaktadır. Noyes ve arkadaşları 1950'de "*Dating the Endometrial Biopsy*" adı altında bir çalışma yayımlamışlardır ve bu çalışmada alınmış olan endometriyal biyopsi örneklerinin histolojik olarak günlemeleri yapılmıştır (Noyes ve arkadaşları, 1950). Günümüzde de hala güncel olarak kullanılan bu kriterler endometriyal günleme açısından önemini korumaktadır.

Ayrıca 2020' de güncellenmiş bir çalışmada da endometriyal günlemede histolojik kriterler tekrar ele alınmıştır (Alfer ve arkadaşları, 2020). Bu çalışmaya göre histolojik olarak en göze çarpan kriterler şu şekildedir ve Resim 3 incelendiğinde gözlemlenebilir durumdadır: 16. gün: Bez epitelinde subnükleer vakuolizasyonu düzenli ve belirgindir. Çekirdeklerin

psödostratifikasyonu bez epitelinde hala görülebilir ve stromada neredeyse sadece hücrelerin çekirdekleri belirgindir; 17. gün: Sadece bez epitelin fokal tabakalaşması mevcuttur. Çekirdekler az/çok üst üste diziler halinde bulunur. Homojen stoplazmalarıyla vakuoller ile arka arkaya gelir; 18. gün: Bez epitelinde bezin tabakalaşmış görüntüsü neredeyse son bulur. Vakuollerin boyutu küçülmüş ve çekirdeği geçerek bez epitel lümenine yakın sitoplazmaya ve oradan da lümeneye doğru kaymıştır; 19. gün: Birkaç vakuol arda kalmıştır. Bu yüzden 16. gün aşamasının erken vakuolizasyonuna benzetilebilir. Lümen içi salgılanmanın varlığı ve psödostratifikasyonunun ve mitozların yokluğu, bu günü karakterize etmemizi sağlamaktadır; 20. gün: Salgı zirveye ulaşır. Subnükleer vakuoller nadirdir, çekirdekler yuvarlak ve temelde yerleşmişlerdir. Sekresyon; periyodik asit – Schiff reaksiyonu ile kırmızı renk oluşturularak belirgin hale getirilebilir ve bu durum 25. güne kadar gözlemlenebilir haldedir. Stromal ödem başlangıcı bu günde görülmeye başlayabilir. 21. gün: Stromal ödemde artışların belirgin olarak görülebilmesi ile karakterizedir; 22. gün: Stromal ödem en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Spiral arteriyoller belirgin değildir. Stromal hücreler ise, neredeyse artık çok ince sitoplazmalı çıplak çekirdekler şeklinde görülebilmektedir. 23. gün: Onları çevreleyen stromaların yoğunlaşması nedeniyle spiral arteriyoller belirginleşmiştir. Periarteriolar stroma hücrelerinin çekirdekleri ve stoplazmaları büyümüştür. 24. gün: Spiral arteriyollar çevrelerindeki desidualizasyon öncesi reaksiyonlara bağlı olarak belirgin hale gelirler. Predesidual değişiklikler yüzey epitelinin altında başlamıştır (Alfer ve arkadaşları, 2020).



Resim 2.3. Noyes kriterleri altındaki temel özelliklerle, adet döngüsünün 16-24 günlerinde endometriyumun histolojik analizi için H&E boyaması

2.4. Mikrobiyota ve Mikrobiyom Kavramları

2001 yılında insan genomunun sekanslanması (Venter ve arkadaşları, 2001) fizyoloji ve biyoloji biliminde önemli bir başarı olmasına karşın; bazıları tarafından, sadece insanlar için ancak kısmi bir harita olarak görülmekteydi. İnsan mikrobiyotası, yani dışımızda ve içimizde var olan mikroorganizmalar komünitesinin bu haritaya katkıda bulunduğu

görülmüştür ve bireyin sağlık durumunun belirlenmesinde, tanımlanmasında önemli bir rol oynadığı açığa çıkmıştır (Zhou ve arkadaşları, 2010).

Mikrobiyota; çevreyle bağlantı halinde bulunan ve 16S rRNA sekanslama gibi moleküler tekniklerle saptanabilen mikrobiyal sınıflandırma (Cho ve Blaser, 2012; Ursell ve arkadaşları, 2012) iken, mikrobiyom ise habitatı bir bütün olarak ifade etmektedir. Böylece hem biyotik hem de abiyotik faktörleri içererek, konak ve mikroorganizma genomlarını ve çevresel koşulların tümünü kapsar (Cho ve Blaser, 2012).

Metagenom; bir mikrobiyomun içerisinde var olup, biyotik faktörlerden elde edilen genlerin ve genomların toplamını ifade etmektedir (Marchesi ve Ravel, 2015).

2.4.1. Kadın üreme sistemi mikrobiyotası

Mikrobiyota elemanlarının çoğunluğunu kültürde üretilmesi zor olan anaerobik mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Günümüze kadar kültür bazlı yöntemler sıklıkla kullanılmış ancak moleküler yöntemlerin gelişmesiyle birlikte kültürde üretilemeyen bakteri türlerinin tanımlanması için bir olanak gelişmiştir. Mikrobiyota kompozisyonlarının büyük kısmını bakteriler oluşturduğundan hedef bölge olarak 16S ribozomal RNA (rRNA) geni seçilmektedir. DNA izolasyonu ve sonrasında 16S rRNA amplifikasyonu ile bakteriler tanımlanmaktadır (Dymock ve arkadaşları, 1996). 16S rRNA gen sekanslaması tür seviyesine kadar bakterilere özgü olan hiper değişken bölgeleri tanımlayabilmektedir (Hyman ve arkadaşları, 2005). VM profilleri, 16S ribozomal RNA (rRNA) profillemesi (PCR ve pyro-sekanslama ile 16S rRNA gen sekanslaması), Sanger sekanslaması ya da tüm genom sekanslaması ile oluşturulmuştur (Sirota ve arkadaşları, 2014).

Sekanslama yöntemleri, düşük maliyetli olmaları ve hızlı bir şekilde dizilerin elde edilebileceği yöntemleri kapsamaktadır. Yeni nesil dizileme yöntemlerinde tipik olarak çoğaltılmış ampikonlar yerine, DNA ampikonu ya da total topluluk DNA'sı kullanılmaktadır. Total metagenomik DNA dizilenip fonksiyona yönelik veri tabanları ile karşılaştırılabilir veya dizilenen topluluk DNA'sı referans genomlar ile karşılaştırılarak mikrobiyal dizi varyantları ve polimorfizmleri tanımlanabilir, spesifik organizmaların varlık ve miktarları bu sayede belirlenebilir (Borsting ve Morling, 2015).

VM'nın kadın genital sistemindeki patojenlere karşı direnç için önemli mekanizmalar olan adaptif bağışıklık sistemlerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Mendling, 2016). Yapılan vajinal mikrobiyota çalışmalarında *Lactobacillus* üstünlüğü mevcuttur (Sirichoat ve arkadaşları, 2018; Smith ve Ravel, 2017). Yapılan çalışmalarda vajinal mikrobiyota en çok saptanan baskın mikroorganizmalar üzerinden beş kategoriye ayrılmıştır: *Lactobacillus (L) crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii* ve *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Atopobium* ve *Gardnerella* gibi anaerob bakterilerin baskın olduğu son grup (Smith ve Ravel, 2017).

Steril uterus 20. Yüzyılda pediatrist Henry Tisser tarafından oluşturulan, fetusun steril bir ortamda geliştiği görüşünün öncüsü bir dogma olarak kabullenilmiş olsa da günümüze kadar kanıtlanamamıştır (Perez-Munoz ve arkadaşları, 2017). Yakın dönemde yeni nesil sekanslama yöntemlerinin bulunması endometriyal mikrobiyotanın varlığına yönelik çalışmalara neden olmuştur (Perez-Munoz ve arkadaşları, 2017; Green ve arkadaşları, 2015). Ancak bir üreme sistemindeki mikrobiyal çeşitliliğe bakıldığında, örneğin bir gastrointestinal mikrobiyomu ile karşılaştırıldığında, oldukça düşüktür (Gonzalez ve arkadaşları, 2011; Peterson ve arkadaşları, 2009).

Mikrobiyal komünite analizlerindeki artış ve buna bağlı olarak, doğrudan ya da dolaylı olarak etkilenen fertilitate ve üreme alanlarındaki etkileri, bilinenleri değiştirmiştir. Bu değişim üreme sağlığı ve infertilite alanında yapılan yayınların artışına sebep olmuştur (Green ve arkadaşları, 2015; Haahr ve arkadaşları, 2016; Ma ve arkadaşları, 2012; Nuriel-Ohayon ve arkadaşları, 2016).

Sağlıklı bir VM genel olarak çeşitli enfeksiyonların ve hastalık bulgularının olmaması şeklinde tanımlanmıştır ve pozitif gebelik sonuçları ile ilişkilendirilmiştir. Beklenen normal bir VM gebe olmayan sağlıklı kadınlarda çoğunlukla *Lactobacillus* türlerini içerir ve embriyo için ön ve perikonsepsiyonel dönemde sağlıklı ve destekleyici bir çevreyi güçlendirir (Sirota ve arkadaşları, 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneyisel Yöntem ve Hazırlık Aşaması

Çalışmalarımızın etik kurul izinleri; Hacettepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmış olup, hastaların bu girişimsel işlem için sağlık yönünden sigortalanmaları biyopsi örnekleri toplanmadan önce sağlanmıştır. Sonrasında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne sunulmuş olan Kapsamlı Araştırma Projesi ile bu çalışma desteklenmiştir.

Çalışmalarımızın deneyisel kısmı için 30 adet gönüllü kadının endometriyal biyopsi örnekleri ile çalışılmıştır. Tüm gönüllüler Hacettepe Tıp Fakültesi Hastaneleri; Tüp bebek Ünitesi'nde tüp bebek tedavisi için başvurmuş ve burada en az bir kere olmak üzere tedavi görmüş hastalar arasından seçilmiştir. Gönüllü yaş aralıkları 20-38 olarak belirlenmiştir. Bu 30 kişilik gönüllü ekibin 15 tanesi çalışma grubu; diğer 15 tanesi ise kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Çalışma grubu gönüllüleri; son 2 yıl içerisinde IVF (*In vitro* fertilizasyon) tedavisi görmüş olan, en az 2 siklusta da iyi kalitede embriyolar transfer edilmiş (5. gün de blastokist aşamasında transfer edilmesi şartıyla) olmasına rağmen (dondurulmuş ya da taze embriyo transferi) gebelik kesesi oluşmamış kişileri kapsamaktadır. Kontrol grubu gönüllülerimiz ise; gene son 2 yıl içerisinde tüp bebek merkezine başvurmuş olan kadınlar arasından, 5. gün transferi ile gebelik elde edilerek canlı doğuma ulaşabilmiş kişilerdir.

Bu gönüllülerin tümü ile çalışma öncesinde yüzyüze görüşülerek çalışma ile ilgili gerekli tüm ayrıntılar, çalışmanın amaçları, hastaların çalışma sonunda elde edebileceği bilgiler açıklanmıştır ve yazılı olarak beyan edilmiştir. Gerekli onam formları gönüllülerden alınmıştır. Hastalardan örnek alınmadan en az 1 hafta öncesinde mikrobiyotanın değişmemesi açısından eşleri ile cinsel birliktelikten kaçınmaları istenmiştir. Gönüllülerin tümünün benzer histolojik endometriyum gününde bulunmaları ve test edilen hedef proteinlerin implantasyona etkileri açısından anlaşılabilmesi için implantasyon penceresinin açık olduğunu düşündüğümüz tarihler arasında biyopsi örneklerinin alımları gerçekleştirilmiştir. Bu tarihlerin belirlenebilmesi açısından hastalara “predictor ovulation” LH kitleri teslim edilmiş, testleri pozitif çıktıktan sonra da, implantasyon penceresi

açıklığının olduğu düşünölen 5, 6 ve 7. günlerde endometriyal biyopsi örneklerinin, kadın hastalıkları ve doğum uzmanlarınca düşük basınçlı pipel ile alınımı gerçekleştirilmiştir.

Bir hastadan alınmış olan her bir örnek, mikrobiyota için; içerisinde steril SF (serum fizyolojik) bulunan steril eppendorflara alınarak, -20°C 'de saklanmıştır. Histolojik çalışmalarda kullanılacak olan yaklaşık olarak 1,0 x 1,0 cm büyüklüğündeki biyopsi örnekleri ise hızlıca 3 sn yıkanarak, pH'ı 7.0 olan, % 4'lük formaldehite alınarak oda sıcaklığında saklanmıştır. Gerek mikrobiyom analizi için, gerekse histolojik çalışmalar için toplanan bu örneklerin hepsi tamamlanarak 30 gönüllüsünde işlemleri bitinceye kadar belirtilen şartlarda etiketlenerek saklanmıştır.

3.2. Metagenom Analizi

Gönüllülerden mikrobiyota için düşük basınçlı pipel ile alınmış olan örnekler; steril SF içerisinde, -20°C 'de, eppendorflar içerisinde, tüm 30 hastanın örnekleri tamamlanıncaya dek bekletilmiştir. Ardından çalışılan proje kapsamında Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümünde görev yapmakta olan Dr. Öğr. Üyesi Çağman Tan'a teslim edilmiştir.

Burada metagenom analiz çalışmaları için; "Ion 16S metagenomics Kit" (Thermo Fisher) kullanılmıştır.

DNA izolasyonu ve kalite ölçümleri ilk basamağı oluşturmaktadır. Bu işlemler üretici firmanın prosedürüyle gerçekleştirilmiştir. Metagenomik çalışma için 16S rRNA gen bölgesinde bulunan değişken bölgeler baz alınıp tanılamaları gerçekleştirilmiştir. Ion Torrent cihazı kullanılarak, 16S metagenomik kit ile iki primer havuz kullanılarak bakteriyel 16S rRNA çoklu değişken bölgeleri (V2, V3, V4, V6, V7, V8, V9) çoğaltılmıştır. Bu sayede de kompleks bakteriyel popölasyonları içerisinde tür tespiti yapılmıştır. Ion Reporter Software kullanılarak da, referans veritabanında popölasyon çeşitliliği saptanmıştır.

3.3. Işık Mikroskopik Yöntem

Uygun koşullarda örnek havuzunda tüm hastaların örnek alımlarının tamamlanması için formaldehit solüsyonunda bekletilen doku örnekleri, 24 saat akarsu altında yıkanarak tespit

maddesinden arındırılması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından da dokulardaki fazla suyun uzaklaştırılabilmesi için sırasıyla %70'lik, %80'lik, %90'lık, %96'lık ve %100'lük şeklinde artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon işlemi tamamlanmıştır. Bu işlemde sonra dokuların ksilol içerisinde şeffaflaştırılarak parafine gömülmesi sağlanmıştır. Doku takibi ve gömme işlemi böylece sonlanmıştır.

Bu işlemlerden sonra kesit alma işlemine geçebilmek için parafin bloklardan mikrotom aracılığıyla (Leica SM 2000, Germany), 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınmış olan bu kesitlerin açılmasını sağlamak amacıyla 37 °C' lik su banyosuna alınmışlardır. İmmünohistokimyasal çalışmalar için polilizinli; H&E ve Masson'un üçlü boyaması ile yapılacak olan boyamalarda ise rodajlı lamalar üzerine kesitler alınmıştır. Havada kurutma işlemleri de tamamlandıktan sonra artık boyamalara hazır halde kesitler elde edilmiştir.

3.3.1. Hematoksilen – Eozin (H&E) boyaması

Boya Solüsyonlarının Hazırlanması

Harris'in Hematoksilen Solüsyonu için;

1 g, Hematoksilen
10 mL, %96'lık Etil alkol
20 g, Potasyum alum
200 mL, distile su
0.5 g, Civa oksit
8 mL, Glasiyal asetik asit

Eozin Solüsyonu için;

1 g, Eozin
100 mL, Distile su
1 küçük timol kristali

Boyama Yöntemi

Kontrol ve çalışma gruplarından alınmış olan 4 µ kalınlığındaki kesitler, 2 saat süreyle 60°C etüvde bekletilmiştir. Ardından 2 kez, 20'şer dk ksilole alınarak, deparafinizasyon işlemi ile parafinden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra lamalar, dokulardaki suyun uzaklaştırılabilmesi için sırasıyla azalan (%100, %96, %80, %70, %50) etil alkol serilerinde 7'şer dk tutulmuşlardır. Kesitler havada kuruması sağlandıktan sonra 10 dk boyunca akarsu altında, dokulardaki alkolün uzaklaşabilmesi için bekletilmişlerdir. Ardından lamalar, Harris Hematoksilen'de 15 dk boyandıktan sonra tekrar 10 dk kadar akarsu altına alınmıştır. Süre bitiminde, %70 alkol +2 -3 damla glasiyel asetik asit karışımına 2-3 kez batırılıp çıkartılmak suretiyle maruz bırakılarak sonunda tekrar 10 dk akarsu altında yıkanmışlardır. Kesitler daha sonra 10 dk kadar eozin boya solüsyonunda bekletilip, 10 dk akarsu işlemi tekrarlanmıştır. Ardından artan dereceli etil alkol serilerinden (%50, %70, %80, %96, %100) kesitler hızlıca geçirilerek 2 x 20 dk ksilole alınarak entellan ile kapatılmışlardır.

3.3.2. Masson'un üçlü boyaması

Kontrol ve çalışma gruplarından alınmış olan 4 µ kalınlığındaki kesitler, 2 saat süreyle 60°C etüvde bekletilmiştir. Ardından 2 kez, 20'şer dk ksilole alınarak, deparafinizasyon işlemi ile parafinden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra lamalar, dokulardaki suyun uzaklaştırılabilmesi için sırasıyla azalan (%100, %96, %80, %70, %50) etil alkol serilerinde 7'şer dk tutulmuşlardır. Kesitler havada kuruması sağlandıktan sonra 10 dk boyunca distile su içerisinde bekletilmişlerdir. Bu boyamada "MosLAB Masson Trichrome (Lot: 25112019)" kiti kullanılmıştır. Distile sudan alınmış olan lamalar, eşit şekilde karıştırılmış olan; Iron hematoksilin ve Ferric Chloride içerisinde 10 dk süreyle bekletilmişlerdir. Ardından distile sudan geçirilerek, Ponceu-acid fuchsin solüsyonunda 15 dk tutulmuştur. Tekrar distile su içerisine alınan lamalar 5 dk'lık sürenin bitiminde, Phosphotungustic asitte 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra Aniline blueya, kesitlerimiz, 5 dk maruz bırakıldıktan sonra, distile suya 5 dk kadar alınarak, alkol serileri, ksilen ve kapama işlemlerinin yapılmasından sonra boyama tamamlanmıştır.

3.3.3. İmmünohistokimyasal (IHC) yöntem

İnsan endometriyum dokusu, basigin (CD147 Polyclonal Antibody, Lot: AI03014735, BIOSS-USA), e-kadherin (E-cadherin Polyclonal Antibody, Lot: AH10169197, BIOSS-

USA), okludin (Occludin Polyclonal Antibody, Lot: AI03265882, BS-1495R, BIOS-USA) antikorlarıyla Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi yöntemiyle immün reaktivite açısından incelenmiştir.

Kesitler polilizinli lamlara alındıktan sonra 37°C’de etüvde bir gece bekletilip daha sonra da deparafinizasyonun kolaylaşması için 60°C’lik etüvde 1 saat daha bekletilmiştir. Deparafinizasyon işleminin tamamlanması için kesitler 3’er kere 20 dk kadar ksilolde bekletildikten sonra, her birinde 10 dk kalacak şekilde %100’lük, %96’lık, %86’lık, %70’lik ve %50’lik etil alkol serilerinden geçirilip ardında 2 kez 5’er dk distile suda bekletilerek alkolden arındırılmıştır.

Doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılması için, çalışılmış olan kesitlerin herbiri 95°C sıcaklıkta mikrodalga içerisinde %10’ luk sitrat tamponuna (pH: 6. 00) (Lot: MK190226, Lab Vision, Thermo Scientific, UK) maruz bırakılmıştır. Oda sıcaklığında 20 dk kadar soğutulmaya bırakılmıştır ve ardında 2 kez 5 dk kadar distile su ile muamele edilerek yıkanmıştır. Polilizinli lamaların üzerinde bulunan dokulara ait kesitlerin çevresi PAP Pen (Cat: Pen-01, PatoLab, Japan) ile çerçevelenerek hatları belirlenerek sınırlandırılmıştır. Daha sonra kesitleri içeren polilizinli lamalar, immünobara sıralanmış ve dokuların 3’er kez 3 dk kadar PBS (Lot: BBI120127, Thermo Scientific, UK) (pH: 7.4) ile muamelesi gerçekleştirilerek yıkanması sağlanmıştır.

Sonrasında dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilebilmesi için 15 dk, oda sıcaklığında, % 3’ lük H₂O₂’e (Lot: HP46013, Thermo Scientific, UK) maruz bırakılmıştır. Ardından tekrar 3 kez 5’ er dk boyunca PBS ile dokuların yıkanması yapılmıştır. Spesifik olmayan bağlantıların önüne geçmek amacıyla, oda sıcaklığında 5 dk boyunca Ultra V Block (Lot : AUBL260-A, Thermo Scientific, UK) uygulanmıştır.

Bloklama işleminden sonra kesitlere yıkama yapılmaksızın, Large Volume Ultrab Diluent (Lot: UD45348, Thermo Fisher Scientific, UK) ile dilüe edilmiş basigin (1:200), e-kadherin (1:300) ve okludin (1:300) primer antikorlarına maruz bırakılmış, 1 gece boyunca +4°C’de inkübe edilmiştir. Bir sonraki gün primer antikorların uygulanmış olduğu kesitler 3 kez 5 dk boyunca PBS ile yıkandıktan sonra 10 dk biyotinli sekonder antikör (Lot: PBN250-A, Thermo Scientific, UK) uygulanarak primer antikörlere bağlanması hedeflenmiştir. Kesitler 3 kez 5 dk kadar tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular enzimin

biyotine bağlanması amacıyla 10 dk streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Lot: SHRN251-A, Thermo Scientific, UK) maruz bırakılmıştır. Kesitler 3 kez 5 dk PBS ile yıkanması işleminden sonra AEC (Lot: HA45338, Thermo Scientific, UK) uygulanıp reaksiyon geliştirilerek, gözle görülebilen immün tepkimenin açığa çıkması sağlanmıştır. Daha sonra reaksiyonu durdurmak amacıyla kesitler distile suya alınır. Zemin boyamasında kesitler 1 dk kadar Mayer Hematoksileni'ne maruz bırakılmıştır ve sonrasında akar su altına alınmıştır. Lamlar daha sonra Aqua Mount (Lot: TA-125-AM, Thermo Scientific, UK) ile kapatılmıştır.

Değerlendirme aşamasında ise, yapılan immünolojik boyanma skorlaması (0: hiç boyanma olmaması; 1: zayıf boyanma; 2: zayıf-orta boyanma; 3: orta boyanma; 4: orta-kuvvetli boyanma; 5: kuvvetli boyanma) şeklinde yapılmıştır. Bu şekilde Basigin, e-kadherin ve okludin proteinlerinin her birisine ayrı ayrı bakılarak gene her bir protein için yüzey epitelinde, bez epitelinde ve stromada olmak üzere 3 ayrı bölgede bulunma yoğunlukları ayrı ayrı skorlanmıştır.

3.4. İstatistiksel Yöntem

Yapılmış tüm histolojik deneysel çalışmalarda, gruplar arasındaki farkların saptanması için SPSS 21.0 (IBM, USA) programında Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Değişiklikleri tanımlamak amacıyla en düşük, en yüksek değerler, 1. çeyrek, ortanca ve 3. çeyrek değerleri kullanılmıştır. İstatistiksel olarak, $p \leq 0.05$ değeri anlamlı bir farklılığın göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca mikrobiyom sonuçlarının temel bileşenler analiz grafiği ile ısı haritasının oluşturulmasında da; R version 4.0.4. (R programlama dili) kullanılmıştır.

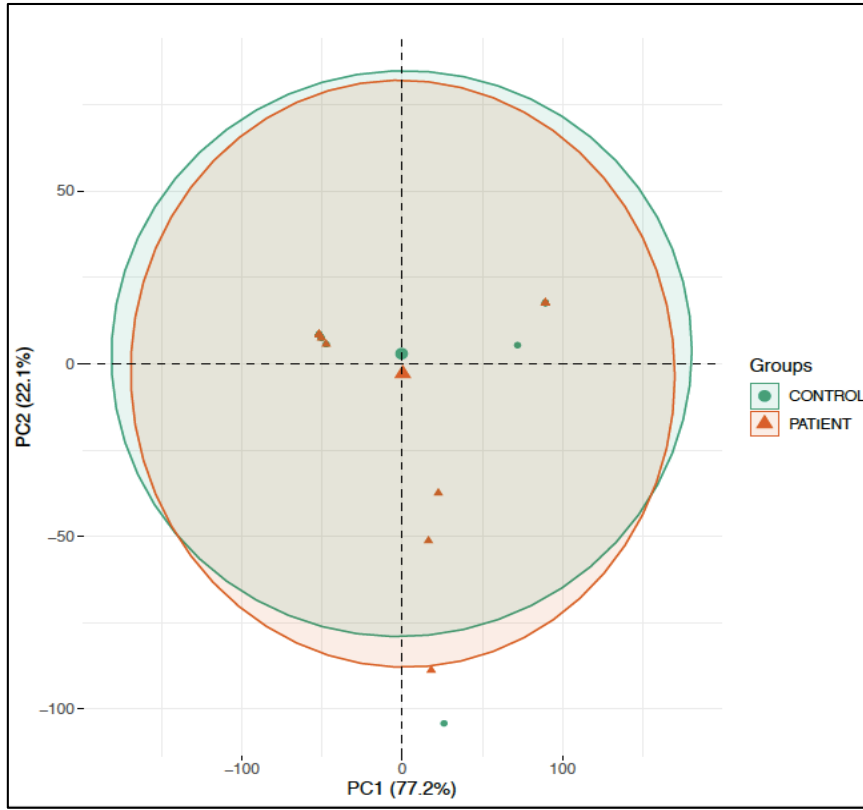
4. BULGULAR

Toplamda 30 gönüllü ile çalışma hedeflenmiştir. Ancak 1 kişi kontrol grubundan; 1 kişide çalışma grubundan olmak üzere, yetersiz biyopsi örneği nedeniyle tamamen elenmek zorunda kalınmıştır. Ayrıca deneysel hazırlık aşamaları tamamlanıp mikroskopik yöntemlerde araştırılmaları için kesitler alınıp, ilgili boyamaları yapıldığında, bazı katılımcıların dokularının, bazı çalışmalar için yetersiz kaldığı anlaşılmıştır ve çalışmalardan elenmek zorunda kalınmıştır. Alınmış olan endometriyal biyopsi örnekleri, insandan temin edildiği için ve tek seferde hassas ve ölçülü örnek alınması gerektiğinden, ayrıca farklı zamanlarda aynı hastadan örnek alınımının farklı sonuçlar yaratabileceğini düşündüğümüzden, endometriyal doku temini tekrarlanamamıştır. Alınmış olan bu biyopsiler hem metagenomik, hem de histolojik çalışmalarda kullanılacağından bazı çalışmalarda yetersizlikler ya da doku kayıpları yaşanmıştır. Bu nedenle bizi sonuca götürebilecek her türlü örnek kullanıldıysa da bazı çalışmalarda doku azlığı sebebiyle elenmeler olmuştur. Bunlar şu şekildedir: Kontrol grubundaki bir gönüllümüzde e-kadherin ifadesinin yüzey epitelinde incelenememesi, gene kontrol grubumuzda bir kişide sadece e-basigin ifadeleri ve günlemelerin incelenebilmiş olması, çalışma grubumuzdaki bir gönüllüde basigin ve okludin dışa vurumlarının değerlendirilememesi ve gene çalışma grubundan bir kişide sadece okludin dışa vurumlarının incelenebilmesidir.

4.1. Metagenom Analiz Bulguları

Ion Torrent cihazı kullanılarak, 16S metagenomik kit ile iki primer havuz kullanılarak bakteriyel 16S rRNA çoklu değişken bölgeleri (V2, V3, V4, V6, V7, V8, V9)'nin çoğaltılarak yapıldığı ve kompleks bakteriyel popülasyonları içerisinde de sırasıyla sınıf/takım/familya/cins/tür/ tespiti yapılmaya çalışılmıştır. Ion Reporter Software kullanılarak da, referans veri tabanında popülasyon çeşitliliği saptanmıştır. Elde edilmiş olan veriler kontrol ve çalışma gruplarında karşılaştırılarak, bakteri çeşitlilik farkının implantasyon başarısında etkisinin olup olmadığı saptanmaya çalışılmıştır. Her hasta için elde edilmiş olan bakteri yoğunlukları çalışma dosyasına aktararak karşılaştırılmış; sonuçlar temel bileşenler analizi grafiği ve ısı haritası ile ifade edilmiştir.

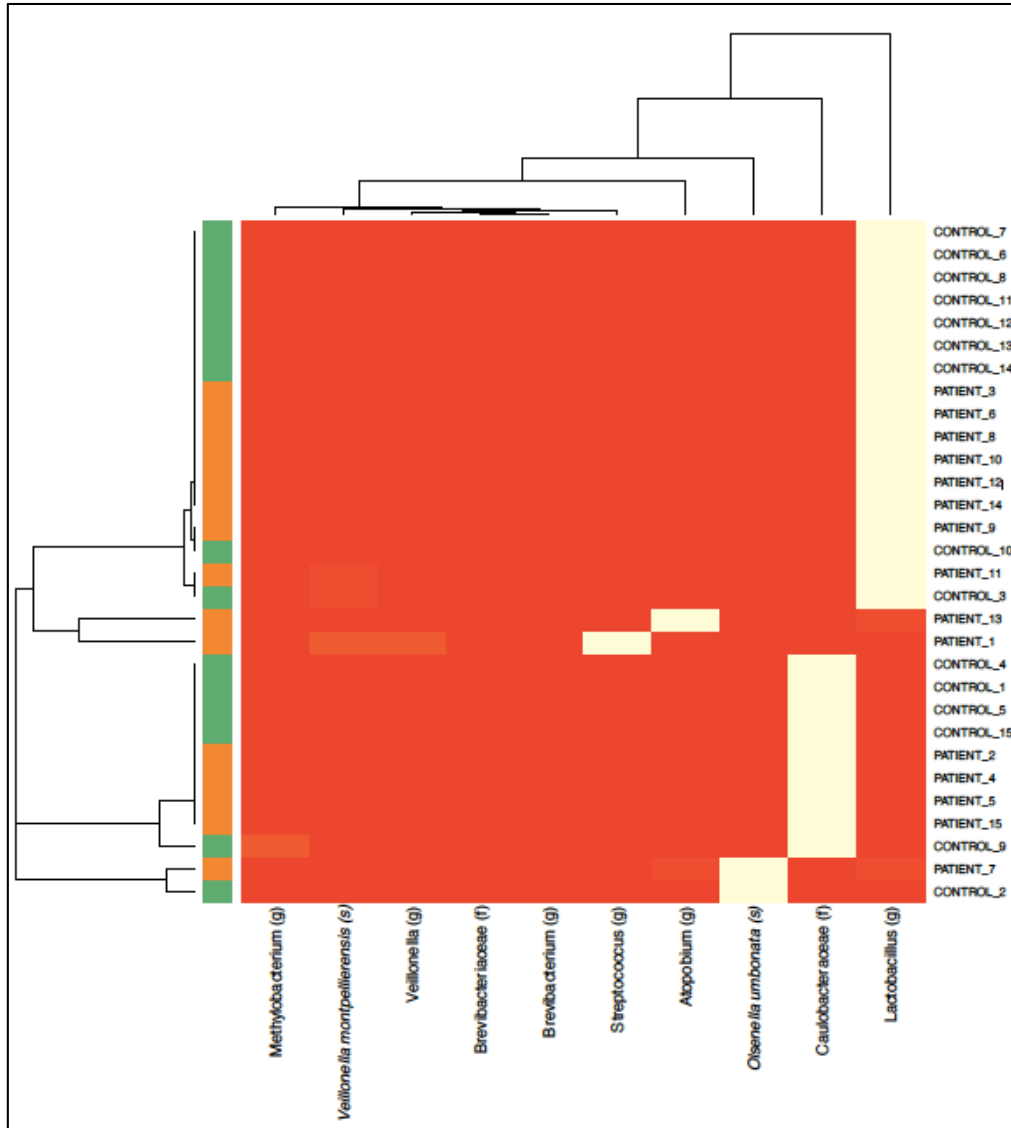
Temel Bileşenler Analizi Grafiği



Şekil 4.1. Kontrol grubu ve hasta grubunun bakteri çeşitlilik farklılığı açısından incelenmesi amacıyla oluşturulmuş temel bileşenler analiz grafiği

Şekil 10'da yeşil renk kontrol grubunu; turuncu renk ise çalışma grubunu temsil etmektedir. R version 4.0.4. (R programlama dili) kullanılarak bu grafik elde edilmiştir. Elimizdeki varyansı en çok açıklayan ilk 2 bileşen (PC1, PC2) çizilmiştir. Bu grafiğe göre IVF başarısını etkileyen bir faktör görülmemektedir. Çünkü grafikte kontrol ve çalışma grupları iç içe ortak kümede gözükerek kesin bir şekilde ayırma ortaya çıkarmamışlardır.

Isı Haritası



Şekil 4.2. Bakteri çeşitliliğinin kontrol ve çalışma grupları arasındaki farklılığını incelemek amacıyla çalışılmış ısı haritası

R version 4.0.4. (R programlama dili) kullanılarak ısı haritası (Şekil 11) elde edilmiştir. 15 kontrol grubu, 15 çalışma grubu kullanılarak toplamda en sık görülen 3 tür, 5 cins ve 2 familya, bazında; 10 adet mikrobiyota verisi ile çalışılmıştır. Yeşil renk kontrol grubunu; turuncu renk çalışma grubunu temsil etmektedir. Kırmızıdan sarıya doğru gidildikçe ise; bakteri bulunma yüzdesi artmaktadır. Yani en az bulunma yoğunluğu kırmızı ile ifade edilirken; sarıda ise bakteri bulunma yüzdesi artmaktadır. Bu ısı grafiğine göre bu mikrobiyota verilerinde anlamlı bir fark ortaya konulamamıştır. Aynı şekilde bulunma yoğunluğu fazla olduğu için, ısı haritasında *Caulobacteraceae* familyasına baktığımızda da, kontrol ve çalışma grupları arasında anlamlı bir fark mevcut değildir.

Diğer bilimsel çalışmaların bir kısmında implantasyon başarısı açısından *Lactobacillus* cinsinin, %90 ve üzerinde bulunma yüzdesinin önemi vurgulandığı için özellikle *Lactobacillus* cinsine baktığımızda da kontrol ve çalışma grupları arasında bizim çalışmamızda bir farklılık görülmemiştir. *Lactobacillus* cinsinin yüzdesi, Mann-Whitney U Testi ile, kontrol ve çalışma grupları arasında karşılaştırıldığında, ortanca değerlere bakıldığında, kontrol grubu 98,00; çalışma grubu 94,00 olarak bulunmuştur. Ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,967$). Sonuçlar çizelge 4.1’de topluca verilmiştir. Anlamlı bir fark olmadığı tespit edildiği için 2. basamak olarak kontrol ve çalışma grubu örneği olup olmadığına bakılmaksızın, % 90 altında *Lactobacillus* cinsini içerenleri (1. Grup), %90 ve üzerinde *Lactobacillus* cinsini içerenleri (2. Grup) olarak, gruplara ayırma gereksinimi doğmuştur. Bu 2 grup arasında da, IHC sonuçlarında ve histolojik günlemlerde ki sapmalarda *Lactobacillus* cinsinin baskın olması durumunun, etkisinin olup olmadığına bakılmıştır. Bu sonuçlar da Çizelge 4.2’ de verilmiştir ve ayrıntılı olarak, endometriyal günleme ve IHC boyama bulgularında verilmiştir.

Çalışmamızda, metagenomik analiz sonucuna göre, gönüllülerde tespit edilmiş olan *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin tümü *Lactobacillus iners* türüne ait çıkmıştır.

4.2. Işık Mikroskopik Yöntem Bulguları

3 ayrı boyama uygulanarak hazırlanan kesitler ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal yöntemde seçilmiş olan 3 proteine karşı geliştirilmiş olan antikorların bulunma yoğunlukları; kontrol grubu ve çalışma grubu arasında değerlendirilmiş ve embriyo tutunum başarısındaki proteinlerin rolü belirlenmeye çalışılmıştır. Masson’un üçlü boyaması ve (H&E) Boyaması ile de gene bu 2 grup arasındaki Noyes kriterlerince belirlenmiş histolojik günler ile uyumları karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıdaki şekildedir.

4.2.1. Endometriyal günleme için yapılmış histokimyasal boyama bulguları

Gönüllülere ovülasyon kiti uygulanarak, implantasyon penceresinin açık olduğu düşünülen günlerde alınmış olan örneklerin histolojik günlemlerinin yapılabilmesi için, H&E Boyaması ve Masson’un üçlü boyaması uygulanmış, Noyes kriterlerince belirlenmiş bazı önemli kriterlere göre, histolojik günleri belirlenmiştir. Bu histolojik günler ile, ovülasyon kitine göre saptanmış tahmini günler arasındaki farka göre de gün sapmaları belirlenmiştir.

Bu sayede her iki grup arasında, endometriyal günleme sapmalarını karşılaştırmak mümkün olmuştur.

Noyes kriterlerince gün belirlemede ayırt edici belirgin kriterler şu şekildedir;

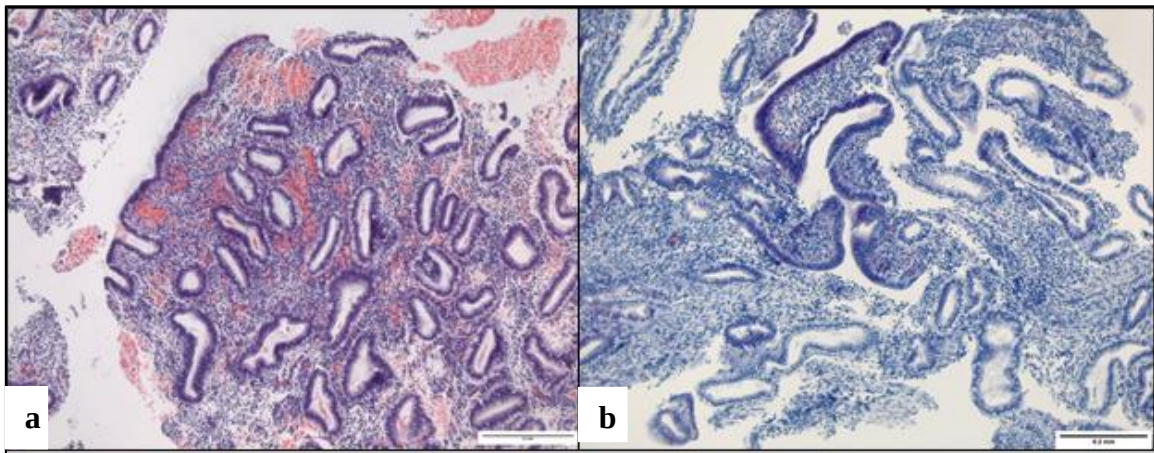
Mitoz figürü; 16. 17. ve 18. günde izlenebilecek olan mitozların yokluğu 19. güne giriş ile karakterizedir.

Psödostratifikasyon; Psödostratifikasyonunun bez epitelinde gözlenmesi, endometriyumun 16. Günü ile ilişkiliyken; yokluğu, histolojik olarak 19. günü işaret etmektedir.

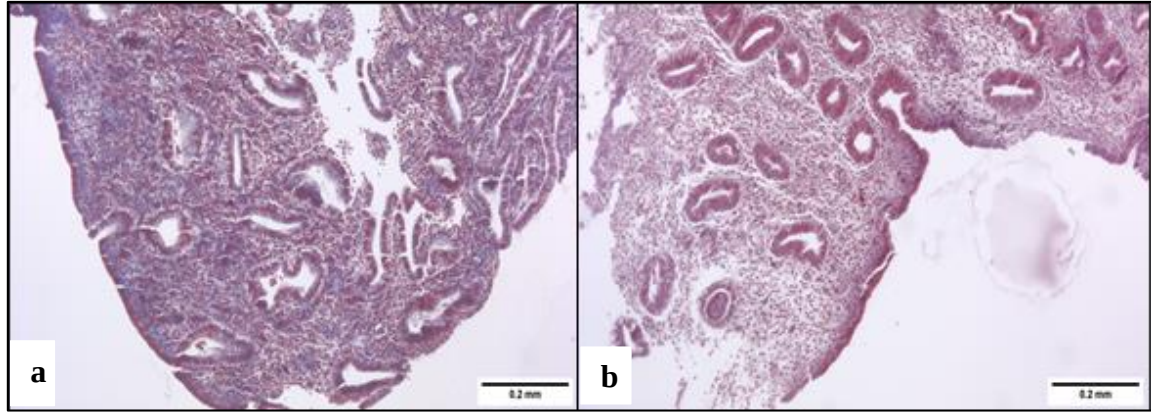
Subnükleer vakuoller; Uterusun bez epitel hücrelerinin bazalında bulunan vakuollerdir. Endometriyumda 16. günde, subnükleer vakuoller düzenli olarak gözlemlenmektedir. 20. günde ise subnükleer vakuoller çok nadirdir ve çekirdekler yuvarlak şekilde temelde yerleşmişlerdir.

Stromal Ödem; Stromal ödem başlangıcı, 20. günde görülmektedir. 21. günde artışlar gözlemlenmektedir ve 22. günde ise doruğa ulaşmaktadır.

Spiral Arteriyoller; 22. günde belirgin olmayan spiral arteriyoller, 23. günde belirlemeye başlarlar ve 24. günde, çevrelerindeki predesidual reaksiyonlara bağlı olarak iyice belirgin hale gelirler.



Resim 4.1. Kontrol (a) ve çalışma (b) grubundan hematoksilen eozin boyama örnekleri 17. güne ait örneklerde glandular epitelde psödostratifikasyon azalmıştır. Az sayıda mitoz görülebilir. Subnükleer vakuoller görülmektedir. Stromal ödem yoktur



Resim 4.2. Kontrol (a) ve çalışma (b) grubunda, 17. günden Masson'un üçlü boyama örnekleri, stromal ödem bu günlerde görülmemektedir

Tüm bu kriterlere bakılarak belirlenmiş olan histolojik günleme ile teste göre belirlenmiş endometriyum günleri arasındaki fark bize, gün sapmasını vermiştir. Çizelge 4.1'e baktığımızda, gün sapmasının ortanca değerlerinde; kontrol ve çalışma grupları arasında fark görülmemiştir ($p=0,624$).

Çizelge 4.2'de ise, 1. grup (*Lactobacillus* içeriği $<90\%$) ve 2. grup (*Lactobacillus* içeriği $\geq 90\%$) arasında, yeniden gün sapmaları değerlendirilmiştir. 1. Grupta, 2. Gruba göre daha yüksek bir sapma görülmekle birlikte, istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p=0,274$).

4.2.2. İmmünohistokimyasal (IHC) boyama bulguları

Basigin, E-kadherin, Okludin proteinlerine karşı geliştirilmiş antikorlar ile yapılan IHC incelemede, kontrol ve çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını anlamak amacıyla; yüzeyde, bez epiteline ve stromada ayrı ayrı olmak üzere yapılan skorlamalara, Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Mann-Whitney U testi kullanılarak, kontrol ve çalışma grupları arasındaki; IHC analizlerinin, gün sapmalarının ve *Lactobacillus* cinsi bakterilerin bulunma yüzdelerinin istatistiksel karşılaştırmaları

	Kontrol/Çalışma	Minimum Değer	1. Çeyrek	Ortanca Değer	3. Çeyrek	Maksimum Değer	p Değeri
Yüzey epiteli Basigin	Kontrol	0	1,00	1,00	3,25	5	0,212
	Çalışma	0	1,00	2,50	5,00	5	
Bez epiteli Basigin	Kontrol	0	1,00	2,00	4,00	5	0,374
	Çalışma	0	2,00	3,00	4,00	5	
Stroma Basigin	Kontrol	1	1,00	2,00	4,00	5	0,432
	Çalışma	0	2,00	3,00	3,00	5	

Çizelge 4.1. (devam) Mann-Whitney U testi kullanılarak, kontrol ve çalışma grupları arasındaki; IHC analizlerinin, gün sapmalarının ve Lactobacillus cinsi bakterilerin bulunma yüzdelerinin istatistiksel karşılaştırmaları

	Kontrol/Çalışma	Minimum Değer	1. Çeyrek	Ortanca Değer	3. Çeyrek	Maksimum Değer	p Değeri
Yüzey epiteli E-kadherin	Kontrol	0	0,25	1,00	3,00	4	0,894
	Çalışma	0	0,50	1,00	2,00	4	
Bez epiteli E-kadherin	Kontrol	0	1,00	2,00	4,00	4	0,390
	Çalışma	0	0,50	2,00	2,50	4	
Stroma E-kadherin	Kontrol	0	1,00	1,00	3,00	4	0,840
	Çalışma	0	1,00	1,00	2,50	5	
Yüzey epiteli Okludin	Kontrol	0	0,00	1,00	2,50	5	0,538
	Çalışma	0	0,50	1,00	2,50	5	
Bez epiteli Okludin	Kontrol	0	0,00	1,00	3,50	5	0,650
	Çalışma	0	0,50	2,00	3,00	5	
Stroma Okludin	Kontrol	0	0,00	1,00	4,00	5	0,479
	Çalışma	0	1,50	3,00	3,50	4	
Histolojik Günleme (HG)	Kontrol	16	16,00	17,00	18,50	20	0,560
	Çalışma	15	16,25	17,50	19,00	22	
Teste göre tahmini günleme (TG)	Kontrol	18	19,00	20,00	20,00	21	0,305
	Çalışma	18	19,00	20,00	21,00	24	
Gün Sapması (GS) (HG – TG)	Kontrol	-4	-3,00	-2,00	0,00	0	0,624
	Çalışma	-8	-3,00	-2,00	-1,00	0	
Lactobacillus yüzdesi	Kontrol	0	0,00	98,00	100,00	100	0,967
	Çalışma	0	0,00	94,00	100,00	100	

Bu çizelgeye göre, ortanca değerler üzerinden gittiğimizde;

Basigin pozitifliği; yüzey epitelinde, bez epitelinde ve stromada, çalışma grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

E-kadherin pozitifliği; yüzey epitelinde, bez epitelinde ve stromada, çalışma ve kontrol grubunda eşit bulunarak arada fark görülmemiştir.

Okludin pozitifliği; yüzey epitelinde, çalışma ve kontrol grubunda eşit bulunmuştur. Bez epitelinde ve stromada ise, çalışma grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olarak saptanmıştır.

Tabloda, ayrıca Lactobacillus cinsinin yüzdesi kontrol ve çalışma grupları arasında karşılaştırılmıştır. Ortanca değerlere bakıldığında, kontrol grubu 98,00; çalışma grubu 94,00 olarak bulunmuştur. Ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,967$). Bu nedenle çalışmamızda ikinci bir basamak olarak, kontrol ve çalışma grubu örneği olup olmadığına bakılmaksızın, % 90 altında Lactobacillus cinsini içerenleri (1. Grup), %90 ve üzerinde Lactobacillus cinsini içerenleri (2. Grup) olarak, gruplara ayırma gereksinimi duyduk. Oluşturulan bu yeni 2 grup arasında da, IHC sonuçlarında ve

histolojik günlemelerde ki sapmalarda Lactobacillus cinsinin baskın olması durumunun, etkisinin olup olmadığına bakıldı. Sonuçlar Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. 1. Grup (% 90 altında Lactobacillus cinsini içerenler) ve 2. Grup (%90 ve üzerinde Lactobacillus cinsini içerenler) arasındaki sonuçların, Mann-Whitney U testi kullanılarak, IHC farklılıklar ve gün sapması yönünden karşılaştırılması. İstatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar ($0.01 \leq p < 0.05$) tabloda sarı ile gösterilmiştir

	1(<90)/2 (≥90)	Minimum Değer	1. Çeyrek	Ortanca Değer	3. Çeyrek	Maksimum Değer	p Değeri
Yüzey epiteli	1	1	1,00	3,00	5,00	5	0,218
Basigin	2	0	1,00	1,00	3,00	5	
Bez epiteli	1	1	2,00	3,00	4,00	5	0,234
Basigin	2	0	1,00	2,00	4,00	5	
Stroma	1	1	1,50	3,00	3,75	5	0,235
Basigin	2	0	1,00	2,00	3,00	5	
Yüzey epiteli	1	0	1,00	1,50	4,00	4	0,108
E-kadherin	2	0	0,00	1,00	2,00	3	
Bez epiteli	1	0	1,00	1,50	3,75	4	0,349
E-kadherin	2	0	1,00	2,00	3,00	4	
Stroma	1	1	1,00	2,00	3,75	5	0,024
E-kadherin	2	0	1,00	1,00	2,00	3	
Yüzey epiteli	1	0	0,25	1,00	3,00	5	0,290
Okludin	2	0	0,00	1,00	2,00	4	
Bez epiteli	1	0	1,00	2,50	3,00	5	0,016
Okludin	2	0	0,00	0,00	2,00	4	
Stroma	1	0	2,00	3,00	3,75	4	0,038
Okludin	2	0	0,00	1,00	3,00	4	
Histolojik	1	15	16,00	16,00	18,50	20	0,186
Günleme (HG)	2	16	17,00	18,00	19,00	22	
Teste göre tahmini	1	18	19,25	20,00	21,00	23	0,488
günleme (TG)	2	18	19,00	20,00	21,00	24	
Gün Sapması (GS)	1	-8	-4,75	-3,00	-2,00	0	0,274
(HG – TG)	2	-4	-3,00	-2,00	-1,00	0	

Çizelge 4.2'ye bakıldığında, anlamlı bulunan istatistiksel farklar şu şekildedir;

- Stromada, E-kadherin tutulumunun, ortanca değerlerine bakıldığında, 1. grupta ($L < 90$), 2. Gruba göre ($L \geq 90$) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ve bu fark anlamlı bulunmuştur ($p = 0,024$).
- Bez epitelinde, okludin tutulumunun, ortanca değerlerine bakıldığında, 1. grupta ($L < 90$), 2. Gruba göre ($L \geq 90$) daha yüksek olduğu saptanmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,016$).
- Stromada, Okludin tutulumunun ortanca değeri, 1. grupta ($L < 90$), 2. Gruba göre ($L \geq 90$) gene daha yüksek olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak bu fark anlamlı çıkmıştır ($p = 0,038$).

Çizelge 4.2’de diğer sonuçlara da baktığımızda,

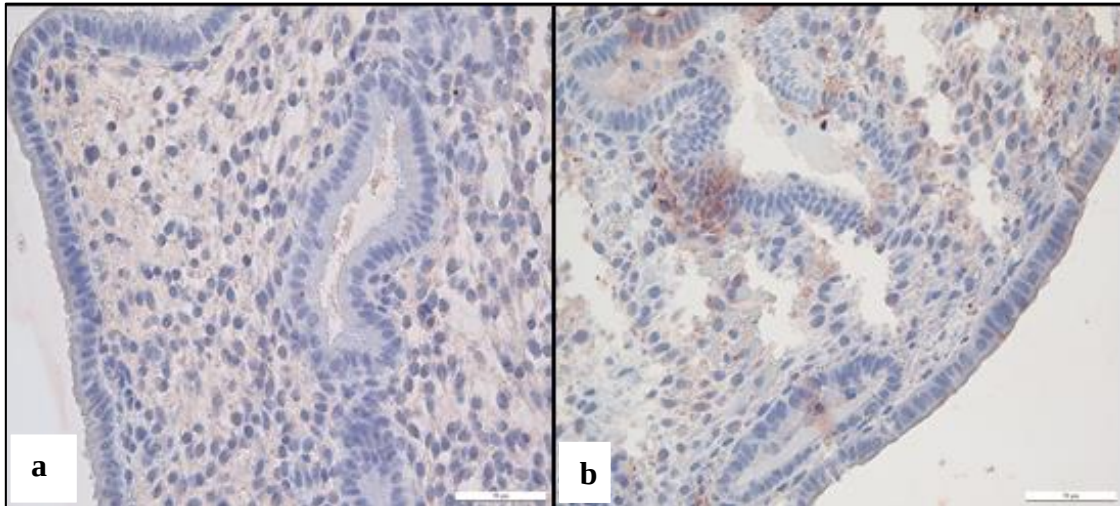
Basigin pozitifliği; yüzey epitelinde, bez epitelinde ve stromada, 1. grupta daha yüksek saptanmıştır.

E-kadherin pozitifliği; yüzey epitelinde ve stromada, 1. grupta daha yüksek; bez epitelinde ise 2. grupta daha yüksek bulunmuştur.

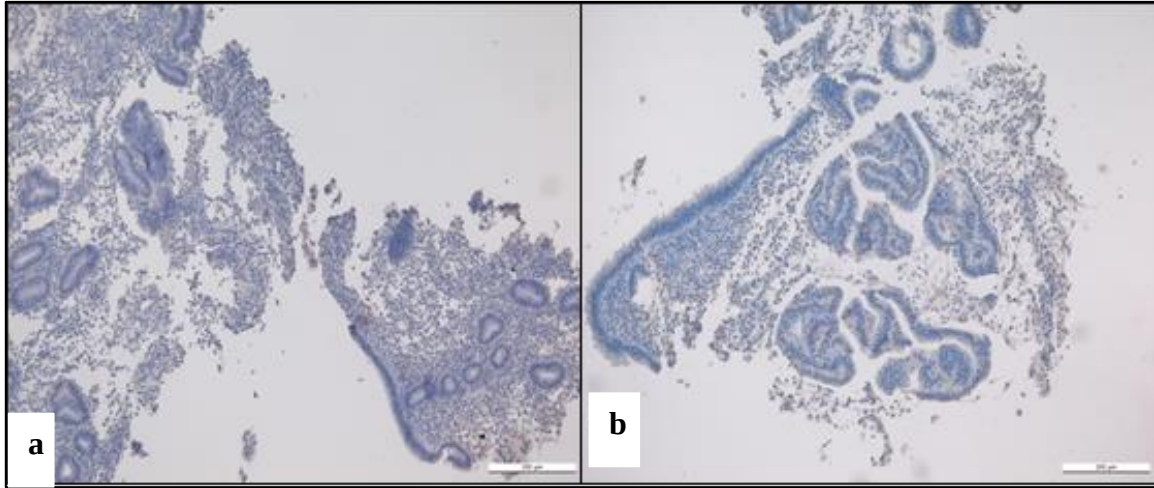
Okludin pozitifliği; yüzey epitelinde, eşit bulunmuş; bez epitelinde ve stromada ise, 1. grupta daha yüksek olarak saptanmıştır.

Ayrıca bu çizelgeye bakarak, gün sapmasının 1. grupta daha yüksek bulunmuş olmasının yanı sıra, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,274$).

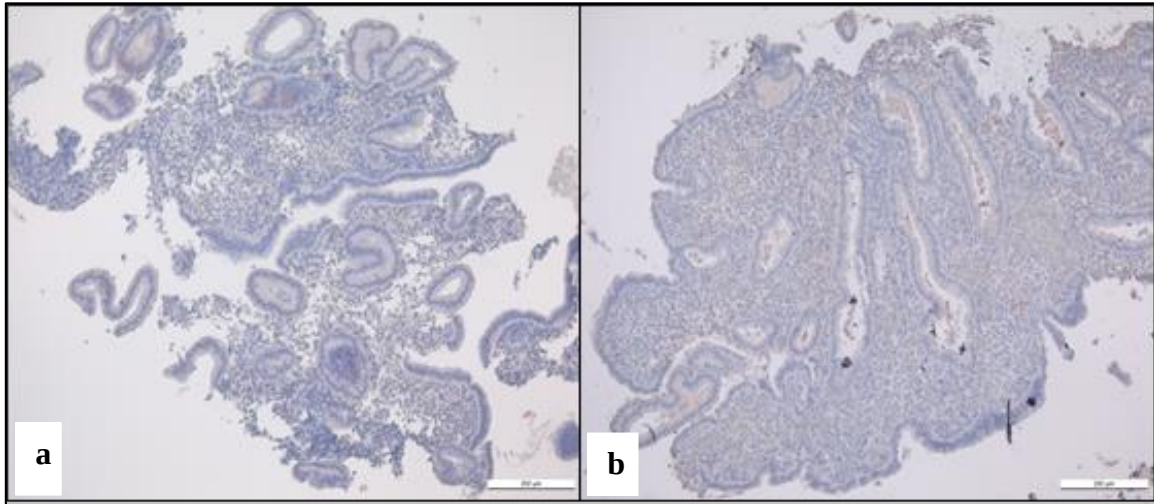
Anti-Basigin, Anti-E-kadherin ve Anti-Okludin antikorlarını kullanarak yapmış olduğumuz immünohistokimyasal boyamalar ve onların yüzey epitelinde, bez epitelinde, son olarak da stromadaki immünoreaksiyon skorlamalarının, ortanca değerlerinin (OD) şekillerle gösterimi aşağıdaki gibidir.



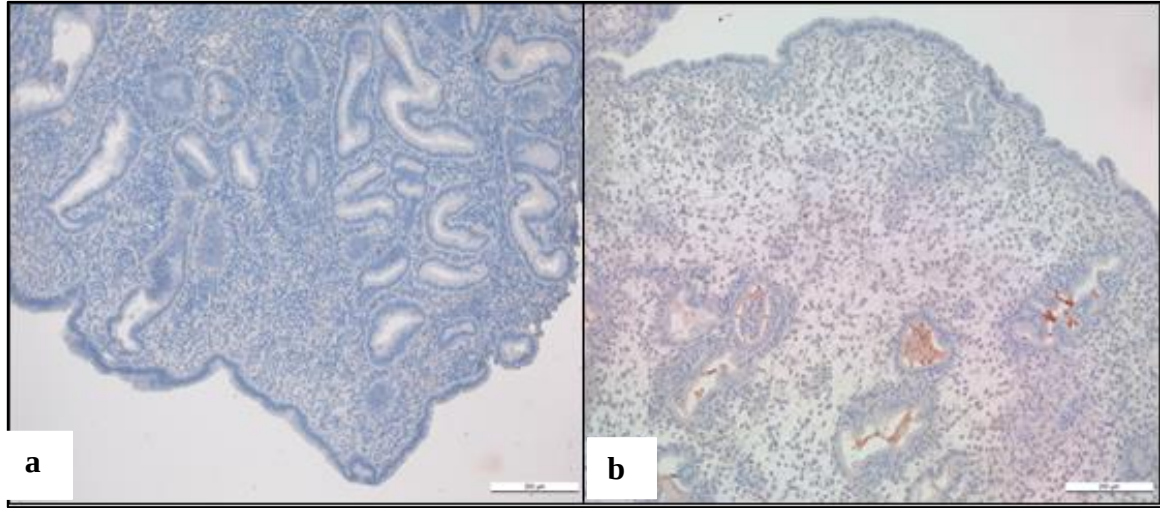
Resim 4.3. Anti-Basigin antikoru kullanılarak, yüzey epitelinde yapılmış olan immünohistokimyasal boyamalar. a. Kontrol grubu (OD=1,00); b. Çalışma grubu (OD=2,50) olarak immünoreaksiyon skorlamaları yapılmıştır



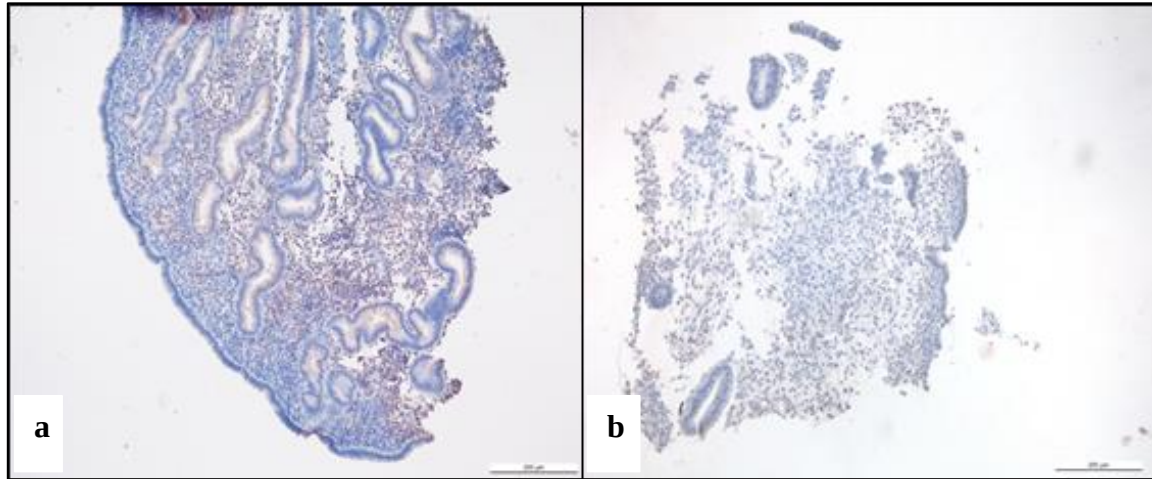
Resim 4.6. Anti-E-kadherin antikoru kullanılarak, yüzey epitelinde yapılmış olan immünohistokimyasal boyamalar. a. Kontrol grubu (OD=1,00); b. Çalışma grubu (OD=1,00) olarak immünoreaksiyon skorlamaları yapılmıştır



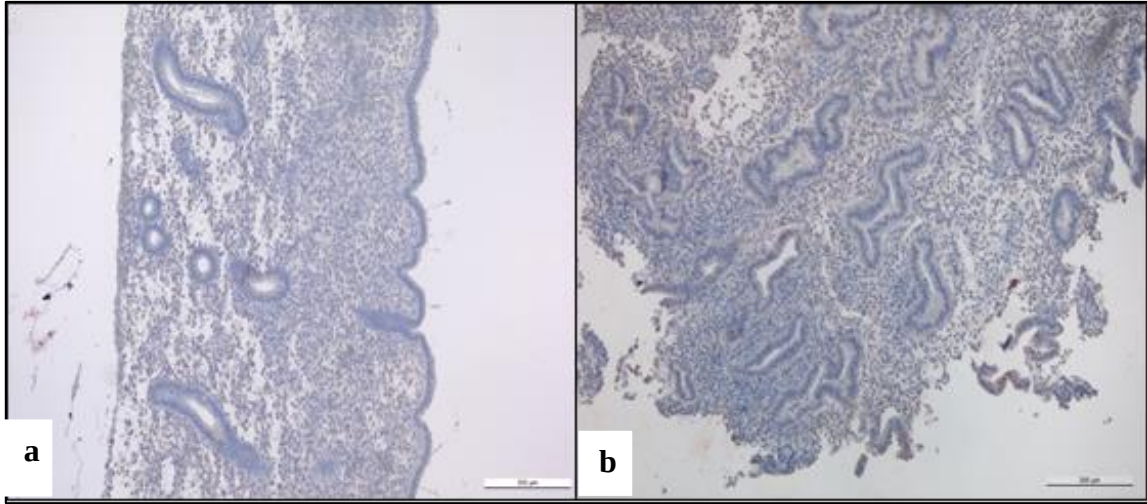
Resim 4.7. Anti-E-kadherin antikoru kullanılarak, bez epitelinde yapılmış olan immünohistokimyasal boyamalar. a. Kontrol grubu (OD=2,00); b. Çalışma grubu (OD=2,00) olarak immünoreaksiyon skorlamaları yapılmıştır



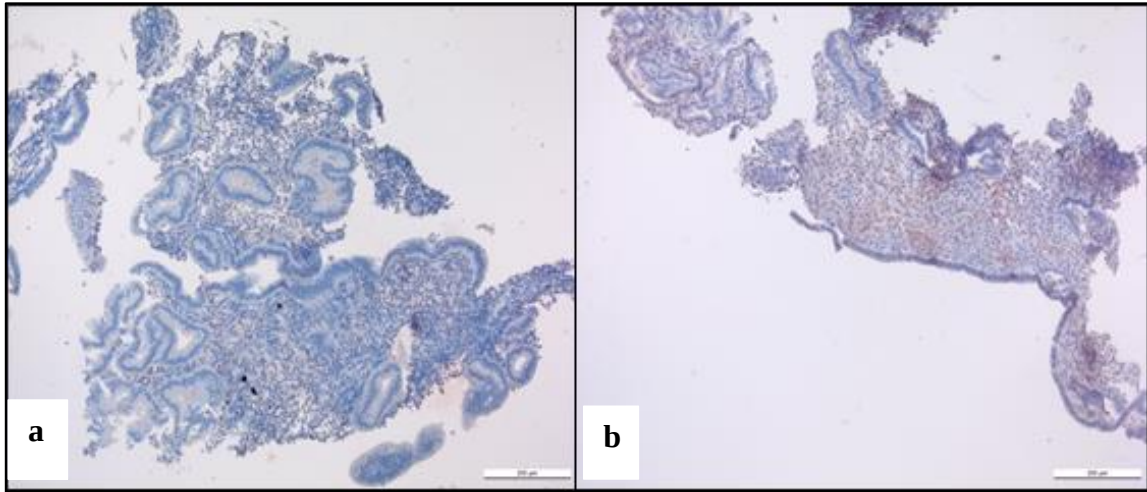
Resim 4.8. Anti-E-kadherin antikoru kullanılarak, stromada yapılmış olan immünohistokimyasal boyamalar. a. Kontrol grubu (OD=1,00); b. Çalışma grubu (OD=1,00) olarak immünoreaksiyon skorlamaları yapılmıştır



Resim 4.9. Anti-Okludin antikoru kullanılarak, yüzey epitelinde yapılmış olan immünohistokimyasal boyamalar. a. Kontrol grubu (OD=1,00); b. Çalışma grubu (OD=1,00) olarak immünoreaksiyon skorlamaları yapılmıştır



Resim 4.10. Anti-Okludin antikoru kullanılarak, bez epitelinde yapılmış olan immünohistokimyasal boyamalar. a. Kontrol grubu (OD=1,00); b. Çalışma grubu (OD=2,00) olarak immünoreaksiyon skorlamaları yapılmıştır



Resim 4.11. Anti-Okludin antikoru kullanılarak, stromada yapılmış olan immünohistokimyasal boyamalar. a. Kontrol grubu (OD=1,00); b. Çalışma grubu (OD=3,00) olarak immünoreaksiyon skorlamaları yapılmıştır

5. TARTIŞMA

Taze ya da dondurulmuş olarak transferi uygulanmış, iyi kalitedeki embriyolara rağmen, en az üç siklуста gebelik elde edilemeyen durumlar, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (RIF) olarak ifade edilmektedir. İmplantasyon; embriyonun endometriyum luminal yüzeyine bağlandığı, ardından da epitel yoluyla göçünü ve invazyonunu içeren bir süreçtir. Kaliteli embriyo transferlerine rağmen ard arda gebelik elde edilememesi RIF şeklinde tanımlanmaktadır. Ancak IVF denemelerinde başarısız siklus sayısını veya transfer edilen toplam embriyo sayısını tanımlayan resmi bir kriter bulunmamaktadır. Buna göre, IVF uygulayan farklı sağlık merkezleri ve kuruluşlar, RIF için farklı tanımlar kullanabilirler (Shufaro ve Schenker, 2011). Biz de çalışmamızda toplam 30 gönüllü kadının endometriyal biyopsi örneklerini kullanarak, çalışma grubu ve kontrol grubu adı altında iki gruba örnekleri ayırdık. Çalışma grubu gönüllüleri; son 2 yıl içerisinde IVF tedavisine katılmış olan, en az 2 siklуста da iyi kalitede embriyo transfer edilmiş (5. gün de blastokist aşamasında transfer edilmesi şartıyla) olmasına rağmen (dondurulmuş ya da taze embriyo transferi) gebelik kesesi oluşmamış kişileri kapsamaktadır. Kontrol grubu gönüllülerimiz ise; gene son 2 yıl içerisinde tüp bebek merkezine başvurmuş olan kadınlar arasından, 5. gün transferi ile ilk seferde gebelik elde edilerek canlı doğuma ulaşabilmiş kişiler arasından seçilmiştir.

Endometriyal ve vajinal mikrobiyotanın yapı ve kompozisyonunun kadınlarda değişebileceği gösterilmiştir. Hormonal düzenlemeden bağımsız olan bir endometriyal mikrobiyotanın varlığı birçok çalışmada mevcuttur. Son yıllarda, 16S rRNA gen sekanslaması yönteminin kullanımı hızla artmaktadır (Moreno ve arkadaşları, 2016).

Makalelerin birçoğunda endometriyumda *Lactobacillus* bakterilerinin bulunmaması, üreme fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilerle koreledir ve implant başarısızlığının ve gebelik düşüklerinin açığa çıkan bir nedeni olarak görülmektedir (Moreno ve arkadaşları, 2016). Vajinal mikrobiyota tipik olarak menstrual siklus süresi, cinsel aktivite, hijyenik ürünler, iç çamaşırı kompozisyonu gibi faktörlere dayalı olarakta değişebilmektedir (Gajer ve arkadaşları, 2012).

Bizim çalışmamızda, keşfedilen *Lactobacillus* cinslerinin tümü *Lactobacillus iners* türüne ait olarak tespit edilmiştir. *Lactobacilli*, uzun zamandır önemli bileşenler olarak kabul

edilmiştir. Sağlıklı insan vajinasının *Lactobacillus iners* vajinada en sık saptanan bakteri türüdür, ancak hakkında çok az şey bilinmektedir (Macklaim ve arkadaşları, 2011). Üreme çağında, kadınların vajinal mikrobiyotasına hakim olduğu bilinen 4 tür vardır. Bunlar; *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* ve *L. iners*'dir ve *L. iners*'da karşılaşma sıklığı en yüksek olan türdür (Ravel ve arkadaşları, 2011). Bizim çalışmamızda tümünün *L. iners* olmasının nedeni hem vajinal mikrobiyotada en yüksek sıklıkla karşılaşılan *Lactobacillus* türü olmasından, hem de çalıştığımız örnek sayısının azlığından kaynaklanıyor olabilir. Çalışmayı daha yüksek sayıda gönüllü ile yapmak ileride bu sonuçların güvenilirliğini arttıracaktır.

2016 yılında, 22 fertil kadın ile yapılmış olan bir mikrobiyota çalışmasında, (Moreno ve arkadaşları, 2016) endometriyal sıvı ve vajinal aspirasyon örnekleri, aynı menstrüal siklusta, implantasyon öncesi ve implantasyon döneminde toplamda 44 örnek ile incelenmiştir. Sonucunda uterin kavitesi ve vajinal aspirasyon örneklerinin farklı ve çeşitli bakteri floralarına sahip olduğunu bulunmuştur. *Lactobacillus domine* olan floralar % 90 ve üzerinde tanımlanarak; 1. grup; % 90 ve altında *Lactobacillus* içeren floralar ise 2. grup olarak incelenmiştir ve 2. grupta implantasyon oranlarında ciddi düşüşler gözlemlenmiştir. Buradan da implantasyon sırasında bakteri florasında meydana gelen ya da gelebilen değişimlerin, IVF uygulamalarının başarısında fark yarattığı sonucu ortaya konulmuştur. Gene 2016 yılında yapılmış olan bir diğer çalışmada (Linda ve Giudice, 2016), bizim çalışmamızda da olduğu gibi 16S rRNA sekanslama yapılmıştır. Burada endometriyal sıvı ve vajinal aspirasyon sıvıları kullanılmıştır. *Lactobacillus* baskın olmayan ($L < \%90$), floralara sahip hastalarda implantasyon oranlarında düşüş ve düşük oranlarında artış tespit etmişlerdir. Bu çalışmalarda olduğu gibi *Lactobacillus* oranının baskın olması durumunda ($L > \%90$), IVF ve implantasyon başarısının olumlu etkilendiğine yönelik çalışma sayısı fazladır. Bu nedenlerle biz de çalışmamızı kurarken aynı *Lactobacillus* baskınlığını göz önünde bulundurduk ve *Lactobacillus* yüzdeleri üzerinden gittik ve bu durumun tekrarlayan implantasyon başarısında etkili olup olamayacağını araştırmayı hedefledik. Bulgularımızda, Çizelge 4.1'deki tablomuzda da görüldüğü üzere, RIF olan gönüllülerde de (çalışma grubu), IVF sonucu başarılı doğum yapmış gönüllülerde de (kontrol grubu) *Lactobacillus* oranları % 90'ın üzerinde bulunmuştur. *Lactobacillus* baskınlığı her ne kadar ikisinde de bu oranın üzerinde olduğu için etki etmiyormuş gibi görünse de bu oran kontrol grubunda % 98'ken çalışma grubunda % 94'e düşmüştür. Kontrol grubunda, bu oranın daha yüksek bulunmuş olması açısından diğer çalışmalara

paralelik göstermiştir. Ancak bu tip bir çalışmada ileride gönüllü sayısının artırılması gerekmektedir. Bu tarzda genişletilmiş mikrobiyota çalışmalarının sonucunda belki de IVF başarısını arttırabilmek için antibiyotik tedavisi uygulanabilir. Bu sayede patojen ya da istenmeyen mikroorganizmaların floradan elenmesi sağlanarak ileride implantasyon başarı oranları arttırılabilir.

1950 yılında Noyes ve arkadaşları “*Dating the Endometrial Biopsy*” adı altında bir çalışma yayımlamışlardır ve bu çalışmada alınmış olan endometriyal biyopsi örneklerinin histolojik olarak günlemleri detaylıca yapılmıştır (Noyes ve arkadaşları, 1950). Günümüzde de hala güncel olarak kullanılan bu kriterler endometriyal günleme açısından önemi korumaktadır. Ayrıca 2020’de yenilenmiş bir çalışmada da endometriyal günlemede histolojik kriterler genişletilip güncellenerek tekrar ele alınmıştır (Alfer ve arkadaşları, 2020). Bu çalışmaya göre histolojik olarak en göze çarpan kriterler kullanılmıştır. Endometriyumun histolojik olarak implantasyona uygun bir şekilde hazır olması kuşkusuz ki hem implantasyon hem de IVF başarısı için oldukça önemlidir. Biz de çalışmamızda, kontrol ve çalışma gruplarında histolojik günlemlerinde sapma farklılıkları var mı bunları karşılaştırmayı hedefledik. Sonuçlara göre, iki grup arasındaki gün saptmaları eşit bulundu. Ayrıca *Lactobacillus* baskınlığının bu gün saptmalarında etkisinin olup olmadığını incelemek için baktığımızda da, bu baskınlığın günlemede anlamlı bir istatistiksel fark yaratmadığını gördük. Ancak bu sonuçların desteklenebilmesi için, örnek sayısının arttırılarak ileri çalışmaların planlanması gerekmektedir.

İmplantasyon sırasında trofektoderm epiteli ile endometriyumda hücre-hücre teması oldukça önemlidir. Bu esnada da birçok molekülün rolü vardır. Biz de çalışmamızda implantasyon penceresinin açık olduğu günlerde önemli görülen Basigin, E-kadherin ve Occludin’i seçerek, bu dönemdeki ifadelerini, yüzey epitelinde, bez epitelinde ve stromada gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırmayı hedefledik.

Basigin ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen; Basigin’in normal uterus fonksiyonundaki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir (Li ve arkadaşları, 2021). Hala aydınlatılamamış ve karmaşık birçok noktası vardır.

Basigin, komşu hücreler arasındaki homotipik etkileşim ile aktive edilebilir. Ancak aynı zamanda matris metaloproteinaz (MMP) aracılı proteoliz aktivatörü olarak da

bilinmektedir (Iacono ve arkadaşları, 2007). Kimi PCR ile yapılmış çalışmalarda infertil endometriyumlarda MMP-2 ve MMP-9 ifadelerinin fertil endometriyumlarına göre daha düşük olduğu tespit edilmişken (Wu ve Zhon, 2003); aksine bazı çalışmalarda da infertil endometriyumunda daha yüksek MMP mRNA seviyelerine rastlanmıştır (Öner ve Öner, 2013). Farklı sonuçlar alınmış çalışmalar olduğu görülmektedir. Bu nedenle implantasyon aşamasında MMP etkisinin incelenmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Desidualizasyon aşamasında, uterus ECM yıkımının gerçekleşmesi ve bu yıkımın implantasyonda büyük rolü olması bu konuda önemlidir. Endometriyal epiteldeki Basigin, MMP'lerin trofoblast tarafından ifade edilmesini uyararak, trofoblastın lümen epiteline invazyonuna katkıda bulunabilir ancak bizim çalışmamızda embriyo mevcut olmadığından, Bunu net olarak saptamamız söz konusu değildir. Ancak farklı sonuçlar literatürlerde mevcut olduğundan daha çok araştırılmaya ihtiyaç duyulan bir konu olarak karşımıza çıkmıştır.

Uterus epitel hücrelerinde, basigin dışı vurumunun, proliferatif faz sırasında en güçlü şekilde ifade edildiği bildirilmiştir (Braundmeier ve arkadaşları, 2006). Bizim çalışmamızda, implantasyon penceresinin aktif olduğu dönem seçildiğinden, sekretuar fazda çalışmalarımız yapılmıştır. Bu nedenle yüzey epitelinde Basigin'in bağlanması, çalışmamıza göre, ortalanca değerlere bakıldığında, hem kontrol grubunda (1,00) hem de çalışma grubunda (2,50) olarak skorlanarak, çok güçlü bulunmamıştır. Basigin pozitifliğinin güçlü skorlara sahip olmaması bizim çalışmamızda da bu fikri desteklemektedir.

Basigince yoksun mutant farelerin, her iki cinsiyette de kısırlık sergilemesi önemini ortaya koymaktadır. Bir çok çalışma Basigin genindeki bozukluğun, implantasyon dahil, dölleme ve diğer üreme sonuçlarında başarısızlığa yol açtığını vurgulamıştır. Ancak hangi mekanizma ile bunu gerçekleştirdiği açıklığa kavuşmamıştır.

Basigin ifadesinin, endometriyum-embriyo tutunum bölgesinde, lokal olarak arttığı ve, basigin genine sahip olmayan mutant farelerin ciddi şekilde riskli implantasyon oranlarına sahip olduğu bildirilmiştir (Igakura ve arkadaşları, 1998). Kuno ve arkadaşları tarafından, fare endometriyumundaki basigin ifadesinin, lümende embriyo olmayan bölgelere göre daha güçlü olduğu bulunmuştur. Northern blot analizinde, farelerle yapılan bir deneyde, Basigin mRNA ifadesinin, erken gebelik sırasında geçici olarak arttığı ve implantasyon

gerçekleştğinde yaklaşık 4.5 günde zirve yaptığı gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda, embriyo çalışmaya dahil edilmediğinden bu konu ile ilgili herhangi bir tezimiz bulunmamaktadır. Ancak embriyo olmadığı ve dolayısıyla implantasyon anında olmadığımız için çok güçlü Basigin ifadelerine rastlamamış olmamız, bu fikirleri desteklemektedir.

Başka bir çalışmada da, Basigin mRNA, gebeliğin 1. gününde esas olarak lümen epitelinde lokalize olmuştur. Luminal epiteldeki basigin mRNA miktarı gebeliğin 2. gününden itibaren kademeli olarak azalmış ve gebeliğin 3-5. günlerinde düşmüştür. Bununla birlikte, orta miktarda bir basigin mRNA'sı ilk olarak gebeliğin 3. gününde glandüler epitelde saptanmış ve bu süre boyunca da korunmuştur. Hamileliğin 4., 5. ve 6. günlerinde, basigin mRNA'sı esas olarak implante blastosistte ve blastosisti çevreleyen lümen epitelinde tespit edilmiştir. Gebeliğin 7. gününden 8. gününe kadar basigin mRNA sinyali kademeli olarak artarak ve embriyolarda ve desidualize hücrelerde güçlü bir şekilde tespit edilmiştir (Xiao ve arkadaşları, 2002b). Tüm bu çalışmalar, Basigin miktarının implantasyonda lokal olarak ifadesinin arttığını ve bunu takip eden gebelik günlerinde de değişim dinamiğinin aktif olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamız ise; implantasyon öncesi durumda, Basigin ifadesi, yüzey epitelinde, bez epitelinde ve stromada araştırıldığından özgün bir çalışma olmuştur.

Noguchi ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışma ile, Basigin'in adet döngüsünün kısıtlı zaman aralıklarında dahi moleküler varyantlarını gözlemlemişlerdir. Bu nedenle endometriyum örneklerinin alındığı zaman diliminin Basigin pozitifliği sonuçlarında oldukça önemli olduğunu görebiliyoruz. Biz de çalışmamızda her bir katılımcıya ovülasyon test kiti uyguladık ve genel olarak implantasyon penceresinin açık olduğunu düşündüğümüz günleri endometriyal biyopsi günü olarak seçtik. Ancak bu aralık 3-4 günlük bir süreyi kapsadığından tüm hastalarda Basigin ifadesini değerlendirebilmek için aynı dönemi yakalayamamış olmamız muhtemeldir.

Aynı çalışmada, immünofloresans ve proteomik analizi ile, insan endometriyumunda hem bez epitel, hem de stromal hücrelerde güçlü dışa vurum; epitel yüzeyde ise zayıf bir Basigin ifadesi gözlemlenmiştir. Bu açıdan bakıldığında bizim çalışmamız da bu sonucu desteklemektedir. Hem kontrol, hem çalışma gruplarında, yüzey epiteli; Basigin'in ifadesinin görüldüğü en zayıf bölgedir.

Çalışmamızda, Basigin pozitifliği; ilginç olarak; yüzey epitelinde, bez epitelinde ve stromada; çalışma grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak Basigin'in implantasyon aşamasında, implantasyon bölgesinde lokal olarak arttığı göz önüne alındığında bu sonuç bize sadece implantasyon öncesi, basigin yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir. Bu sonuca göre implantasyon öncesi Basigin ifadesinin düşük olması, ileride implantasyon üzerinde pozitif etki yaratabileceğini göstermektedir. Gebelik mümkün olmadığı için, embriyonun endometriyum üzerindeki etkisi tam olarak belirlenemediğinden anlamlı bir farklılık bulunmuş olabilir. Ancak sonuçlarımız, Basigin ifadelerinin, implantasyon öncesi dönemde genel olarak düşük olduğunu göstererek Igakura ve arkadaşlarının çalışmasını desteklemiştir (Igakura ve arkadaşları, 1998).

Bir sonraki gruplandırma ise mikrobiyotasında, % 90 oranının altında *Lactobacillus* cinsi içerenler, 1. grup; % 90 ve üzerinde *Lactobacillus* cinsi içerenler, 2. grup şeklindedir. Bu gruplar arasındaki Basigin ifadelerine baktığımızda; yüzey epitelinde bez epitelinde ve stroma da 1. grupta daha yüksek bulunmuştur. Ancak sonuçlar her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı çıkmamış olsa da bununla ilgili ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Çünkü tüm *Lactobacillus* cinslerimiz *Lactobacillus iners* türüne ait bulunmuştur ve bu türün Basigin ifadesini nasıl etkilediğine dair literatürde bir çalışma mevcut değildir.

E-kadherin, homotipik ya da heterotipik bağlanma yoluyla hücre-hücre etkileşimine aracılık eden, kalsiyuma bağımlı CAM ailesine ait, hücre yüzey transmembran glikoproteinidir (Stemmler, 2008). E-kadherin, lateral epitelyal plazma membranında bulunur ve adherens bağlantılarının kurulması ve sürdürülebilirliği açısından kritik olması muhtemeldir (Gumbiner, 1996; Huber ve arkadaşları, 1996; Poncelet ve arkadaşları, 2002). İlk aşamalarda, epitel devamlılığı için hücre yüzeyinde ifade edilmesi gerekli olabilir. Ancak sonrasında, kadherin aracılı adezyon, blastosist invazyonunu sağlamak için sonradan implantasyon yerinde aşağı düzenlenebileceği hipotezi kurulmuştur (Singh ve Aplin, 2009). E-kadherinlerin, embriyogenezde; gastrulasyon, nörolasyon ve organogenezde merkezi bir rol oynadıkları bilinmektedir. Ayrıca hamileliğin başarılı bir şekilde başlatılması için bir embriyo varlığında daha da modüle edildiği raporlanmıştır. E-kadherin kodlayan gen olan kadherine yoksun mutant farelerde, uterus epiteli düzensiz bulunmuştur (Reardon ve arkadaşları, 2012). Endometriyum, embriyo alıcı bir duruma ulaşmak için detaylı bir şekillenme geçiren dinamik yapıdır. Ayrıca E-kadherin ifadesi, infertil kadınların epitellerinde ve bazı endometriyal bozukluklarda değişiklik gösterdiği

saptanmıştır (Kakar ve arkadaşları, 2019; Matsuzaki ve arkadaşları, 2010; Mishra ve arkadaşları, 2020; Whitby ve arkadaşları, 2020). Shirane ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu bir çalışmada luteal fazda E-cadherin mRNA seviyeleri önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir (Shirane ve arkadaşları, 2012). Ancak bizim çalışmamızda implantasyon penceresi aralığında güçlü E-kadherin ifadelerine rastlanmamıştır. Ortanca değer skorlamalarımız; yüzey epitelinde, bez epitelinde ve stromada sırasıyla; 1,00; 2,00; 1,00 şeklinde, kontrol ve çalışma grupları arasında fark görülmemesinin sonuçlanmıştır. E-kadherin ifadesi farkının gruplar arasında görülmemiş olması bize her ne kadar bu bağlantı biriminin yüzey epiteli ve yan yüz bağlantıları açısından implantasyonda etkisi olmadığını düşündürse de; ancak burada implantasyon anındaki sonuçları görmemiz, embriyo ile çalışmadığımızdan mümkün değildir. Bu sebeple embriyonun endometriyum üzerindeki etkisi tam olarak belirlenemediğinden anlamlı bulunamamış olabilir. Bu nedenle sonuçlarımızın kontrol ve çalışma gruplarında eşit çıkmış olabilir.

E-kadherince yoksun mutant farelerde implantasyon öncesi, embriyo gelişiminde kusur ve implantasyon başarısızlıkları gözlemlenmiştir (Larue ve arkadaşları, 1994; Riethmacher ve arkadaşları, 1995). Bunun nedeni, uterus epitelinin düzensiz olmasına bağlanabilir. İmplantasyon aşamasında ise literatürlerde çeşitli görüşler mevcuttur. Son yıllarda, blastosistin endometriyuma bağlanma sürecinde, E-kadherin ifadesinde kayıp olduğu görüşü ağır basmış olsada (Verma ve arkadaşları, 2021), çalışmaların bir kısmı embriyonun implantasyon bölgesinde, endometriyal epitel hücrelerinde, E-kadherin kaybı olduğunu; bir kısmı artış olduğunu bildirirken bir kısmı da bizim çalışmamızda olduğu gibi, fark görülmediğini bildirilmiştir (Arora ve arkadaşları, 2016; Ashary ve arkadaşları, 2018; Dudley ve arkadaşları, 2017; Guo ve arkadaşları, 2009; Jha ve arkadaşları, 2006; Payan-Carreira ve arkadaşları, 2016). Ancak bizim çalışmamızın farkı; embriyo ortamda olmadığına gruplar arasında eşit bulmamızdır. Bu sonucumuz göstermektedir ki; implantasyon öncesi dönemde, E-kadherin ifadesi, IVF başarısını etkilememiştir.

E-kadherinin, insan embriyo implantasyonundaki rolü çalışmalardan da görüldüğü üzere, tam olarak bilinmemektedir, ekspresyon modeline dayanarak, implantasyonda önemli bir rolü olduğundan şüphelenilmektedir. Ancak deneysel modelleri geliştirerek, literatürlerdeki bu sonuç farklılıklarının da giderilmesi için, ileride daha fazla özelleşilmesi gereken bir konu olarak düşünülmüştür.

Mikrobiyotasında, % 90 oranının altında *Lactobacillus* cinsi içerenler, 1. grup; % 90 ve üzerinde *Lactobacillus* cinsi içerenler, 2. grup olarak nitelendirilmişlerdir. Bu 2 grup arasındaki E-kadherin pozitiflikleri incelendiğinde, stromada; 1. grupta, 2. gruba göre daha yüksek bulunmuştur ve istatistiksel olarak bu sonuç anlamlıdır ($p= 0,024$). İmplantasyon penceresi dönemi sonrası sekretuar evre ile devam edilecek bir süreçtir. Bezlerin oluşumu için bu süreçteki e-kadherin dalgalanmaları yaşanıyor olabilir. Stromada bu tarz bir farklılığın yakalanmış olması ilginçtir ve ilerleyen zamanlarda buradaki mekanizmalarının anlaşılabilmesi için, daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda *Lactobacillus* cinsi olarak tespit edilmiş tüm türler *Lactobacillus iners* türüne ait olarak bulunmuştur ve daha önce *Lactobacillus iners* ve E-kadherin pozitifliği üzerine yapılmış herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Ancak bakteri floresındaki değişimin, E-kadherin pozitifliğine etkisi olduğu açıktır.

Endotelial ve epitelyal kısıtlayıcıların, insan da dahil olmak üzere, tüm yaşam formlarında kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Sıkı bağlantılar da bu engellerin önemli bir bileşenidir. Okludin ise, bu sıkı bağlantıların önemli bir parçasını temsil etmektedir (Feldman ve arkadaşları, 2005). Okludin, sıkı bağlantıların stabilizasyonuna ve optimal bariyer fonksiyonuna katkıda bulunan bir integral membran proteindir (Cummins, 2012). Gebeliğin erken dönemlerinde embriyonun olumsuz dış ortam koşullarından korunmasının, implante olan embriyonun yakın çevresini kaplayan desidual hücreler tarafından oluşturulan geçici bir geçirgen bariyerin oluşturulmasıyla elde edildiği düşünülmektedir. Polarize epitel normalde maddelerin hücre içi geçişini dar bağlantılarla düzenleyerek bir bariyer görevi görür. Ancak, desidualize stromal hücreler tarafından implantasyon sırasında oluşturulan geçirgenlik bariyerinin doğası ve düzenlenmesi üzerine sınırlı bilgi bulunmaktadır. Sıkı bağlantı proteinlerinden, okludin, kladin-1, zonula okludens-1 ve zonula okludens-2'nin, tümünün ifade edildiğini ve embriyoyu çevreleyen bir bariyer oluşturan desidualize stromal hücrelerin fiziksel varlığı ile ilişkili olduğunu gösteren bir çalışma mevcuttur. Bu bariyerin oluşumunda, blastosist trofektoderminin uyarıcı olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Wang ve arkadaşları, 2004). Bizim çalışmamızda embriyo kullanılmadığı için, implantasyon sırasında gözlemlenen bu güçlü ifadelerine esyonlarına yüzey epiteline, hem kontrol hem de çalışma gruplarında rastlanmamıştır ve her ikisinde de ortanca değerler 1,00 olarak saptanmış, zayıf bağlanmayla eşitlik göstermişlerdir. Sonuçlarımız bu nedenle, diğer literatürlerle paralellik göstermektedir.

Ancak dikkat çekici bir bulgu olarak, Okludin pozitifliği yüzey epitelinde fark yaratmazken, bez epitelinde ve stromada ise çalışma gruplarında, kontrol gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun, implantasyon başarısını olumsuz etkileyip etkilemeyeceğini görmek için daha detaylı, ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu sonuç diğer gelecekteki çalışmaların öncülünü oluşturabilecek kadar çarpıcıdır. Kontrol gruplarında, stromada 1,00 olarak saptanan ortanca değer, çalışma grubunda 3,00 olarak bulunmuştur. Bunun nedeninin, örnekleri aldığımız zamanın akabinde, sekresyon dönemine geçileceği için olduğu düşünülmektedir.

2010 yılında raporlanmış olan bir çalışmada *Lactobacillus plantarum*'un epitelyal sıkı bağlantıları uyardığı görülmüştür. *Lactobacillus plantarum*' un artışı, Zonula Okludens-1 ve bir transmembran proteini olan occludin'in artan boyanmasına sebep olmuştur (Karczewski ve arkadaşları, 2010). Bizim sonuçlarımızda *Lactobacillus* cinsine ait tüm türler *Lactobacillus iners* olarak keşfedilmiştir. Bu yüzden *Lactobacillus* % 90 ve üzeri ve %90 nın altı olarak nitelendirilen 2 grup arasındaki sonuçları karşılaştırırken bu durumu daha da özelleştirerek *Lactobacillus iners* bulunma yoğunluğundan da söz edebiliriz. Buradan yola çıkarak biz de *Lactobacillus iners* miktarı % 90 ve üzeri gruplarda okludin pozitifliği açısından değişkenlik gösterebileceğini düşündük. Bizim sonuçlarımıza bakıldığında; yüzey epitelinde, *Lactobacillus iners* yoğunluğunun artışı, okludens pozitifliği açısından eşit bulunarak fark yaratmadığı tespit edilmiştir ($p= 0,290$). Ancak bez epitelinde ve stromada istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bizim çalışmamızda raporlanmıştır. Mikrobiyotasında, % 90 oranının altında *Lactobacillus* cinsi içerenler, 1. grup; % 90 ve üzerinde *Lactobacillus* cinsi içerenler, 2. grup olarak nitelendirilmişlerdir. Bez epiteli ve stromada Okludin pozitifliği, 1. gruplarda daha yüksek görülmüştür ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (bez epitelinde, $p= 0,016$; stromada, $p= 0,038$) Bu sonuçlara göre, *Lactobacillus Iners* cinsi bakterilerin mikrobiyotada bulunma yoğunluğu %90 ve üzerindeyse Occludin pozitifliği bez epitelinde ve stromada düşüyor. Bu durum implantasyon ve sonrası dönemlerde pozitif etki yaratabiliyor olabilir; ancak kesin bir ifade için, çalışmalar genişletilmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İmplantasyon süreci, endometriyumun tek başına etkili olduğu bir süreç değil; embriyo ve endometriyum arasında karşılıklı gelişen bir süreçtir. Trofektoderm epiteli ile endometriyumda, hücre-hücre teması, epitel implantasyon için gereklidir. Endometriyumun reseptivitesi ve onunla, trofektoderm arasındaki karmaşık ilişkiler bütünüdür. İmplantasyon aşamasında bu iki yönlü etkileşimler birlikte rol oynarlar. Hücre-hücre teması sırasında; trofoblast hücrelerinin kontrollü istilas, uterus stromal hücrelerinin desidual hücrelere dönüşmesi ve annenin immünolojik tepkilerinin hepsi bu süreçte rol oynamaktadır. Bizim çalışmamızda insan endometriyumu hedeflendiği için, embriyolarla çalışmamız mümkün olmamıştır. Bu nedenle implantaston sırasındaki değişimleri eş zamanlı takip etmemiz mümkün olmadığından bu değişimler göz ardı edilmiştir.

Endometriyumda, Basigin, E-kadherin ve Okludin ifadesinin, insan endometriyumunda, implantasyon penceresi açıklığı döneminde, yüzey ve bez epitelinde, stromada incelenmesine ait benzer bir makale mevcut değildir. Bu nedenle özgünlüğü yüksek bir çalışma olmuştur.

Bazı istatistiksel karşılaştırmalarımızda, gruplar arası anlamlı farklılıkların bulunamamasının nedeninin denek sayılarındaki eksikliklerden ya da biyopsi elde edilmesi aşamasında eksik doku alınmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Alınmış olan endometriyum dokuları, insandan temin edildiği için, gönüllülerden tek seferde hassas ve ölçülü örnek alınması gerekliydi. Biyopsi işlemi tekrar edilemeyeceğinden almış bulunduğumuz bazı dokular eksik kalabilmiştir. Çünkü tek seferde alınan bu dokuların, hem metagenomik analiz, hem de histolojik çalışmaların tümüne yetmeliydi. Çalışılan örnek sayısı ileri yapılan çalışmalarda arttırılarak güvenirliğin yükseltilmesi gereklidir.

Kontrol ve çalışma gruplarında Lactobacillus oranı, kontrol gruplarında daha yüksek tespit edilmiştir. Çalışma ve kontrol grubu olup olmadığına bakılmaksızın Lactobacillus baskın türlerde anlamlı istatistiksel sonuçlar olarak; stromada e-kadherin ifadesi, bez epitelinde ve stromada okludin ifadeleri daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar, Lactobacillus baskınlığının bu proteinlerin dışı vurumunda etkili olabileceğini göstermiştir.

Kontrol ve çalışma gruplarında; lactobacillus baskın olan ve olmayan gruplarda, Noyes Kriterlerince sapmalar hesaplanmış ve gruplar arası istatistiksel bir fark bulunamamıştır.

KAYNAKLAR

- Achache, H., and Revel A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation, *Human Reproduction Update*, 12(6), 731-746.
- Acosta, A. A., Elberger, L., Borghi, M., Calamera, J. C., Chemes, H., Doncel, G. F., Kliman, H., Lema, B., Lustig, L., and Papier, S. (2000). Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertility and Sterility*, 73(4) 788-798.
- Afify, A.M., Craig, S., and Paulino, A. F. (2006). Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 14(3), 328-333.
- Aghajanova, L., Stavreus-Evers, A., Nikas, Y., Hovatta, O., and Landgren, B. M. (2003). Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertility and Sterility*, 79(1), 808-814.
- Aksun, S. A., Özmen, D. ve Bayındır, O. (2001). Metalloproteinazlar, inhibitorleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 21, 332-342.
- Albers, A., Thie, M., Hohn, H. P., and Denker, H. W. (1995). Differential expression and localization of integrins and CD44 in the membrane domains of human uterine epithelial cells during the menstrual cycle. *Acta Anatomica* , 153, 12-19.
- Alfer, J., Fattahi, A., Bleisinger, N., Krieg, J., Behrens, R., Dittrich, R., Beckmann, M. W., Hartmann, A., Classen, I., and Popovici, R. M. (2020). Endometrial dating method detects individual maturation sequences during the secretory phase. *In Vivo*, 34(4), 1951-1963.
- Aplin, J. D. (1991). Glycans as biochemical markers of human endometrial secretory differentiation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92(2), 525-541.
- Aplin, J. D. (1997). Adhesion molecules in implantation, *Reviews of Reproduction*, 2(2), 84-93.
- Aplin, J. D. (2000). The cell biological basis of human implantation. *Best Practice and Research Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 14(5), 757-764.
- Aplin, J. D. (2006). Embryo implantation: The molecular mechanism remains elusive. *Reproductive BioMedicine Online*, 13, 833-839.
- Aplin, J. D., and Kimber, S. J. (2004). Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 48.
- Aplin, J. D., and Singh, H. (2008). Bioinformatics and transcriptomics studies of early implantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127(1), 116-120.

- Aplin, J. D., Spanswick, C., Behzad, F., Kimber, S. J., and Vicovac, L. (1996). Molecular aspects of implantation: Integrins β_5 , β_3 and α_v are apically distributed in endometrial epithelium. *Molecular Human Reproduction*, 2(7), 527–534.
- Apparao, K. B., Lovely, L. P., Gui Y, Lininger R. A., and Lessey B. A. (2002). Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biology of Reproduction*, 66(2), 297–304.
- Aricescu, A. R., and Jones, E. Y. (2007). Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: Zippers and signals. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(5), 543–550.
- Arnaout, M. A., Goodman, S. L., and Xiong, J. P. (2007). Structure and mechanics of integrin based cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(5), 495–507.
- Arora, R., Fries, A., Oelerich, K., Marchuk, K., Sabeur, K., Giudice, L. C., and Laird, D. J. (2016). Insights from imaging the implanting embryo and the uterine environment in three dimensions. *Development*, 143(24), 4749–4754.
- Ashary, N., Tiwari, A., and Modi, D. (2018). Embryo Implantation: war in times of love. *Endocrinology*, 159(2), 1188–1198.
- Bagot, C. N., Kliman, H. J., and Taylor, H. S. (2001). Maternal Hoxa10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation. *Developmental Dynamics*, 222(3), 538–544.
- Bailey, J. L. (2010). Factors regulating sperm capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56(5), 334–348.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C., and Forti, G. (1996). Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Frontiers in Bioscience*, 15(1), 189–205.
- Barth, A. I., Nathke, I. S., and Nelson, W. J. (1997). Cadherins, catenins and APC protein: Interplay between cytoskeletal complexes and signalling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(5), 683–690.
- Barthel, S. R., Gavino, J. D., Descheny, L., and Dimitroff, C. J. (2007). Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(11), 1473–1491.
- Basak, S., Dhar, R., and Das, C. (2002). Steroids modulate the expression of α_4 integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation. *Biology of Reproduction*, 66(6), 1784–1789.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and De Herreros, A. G. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*, 2(2), 84–89.
- Bebitoğlu, G. (2004). Döllenme ve döllenme anomalilerinin yardımıyla üreme tekniklerindeki önemi. *Uluslararası İnsan Bilimleri Dergisi*, 8(1), 1–8.

- Bedford, J. M. (2008). Puzzle of mammalian fertilization and beyond. *The International Journal of Developmental Biology*, 52, 415-426.
- Behzad, F., Seif, M. W., Campbell, S., and Aplin, J. D. (1994). Expression of two isoforms of CD44 in human endometrium. *Biology of Reproduction*, 51(4), 739-747.
- Bentin-Ley, U., Horn, T., Sjogren, A., Sorensen, S., Falck, Larsen J., and Hamberger, L. (2000). Ultrastructure of human blastocystendometrial interactions *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120(2), 337-350.
- Bentin-Ley, U., Pedersen, B., Lindenberg, S., Larsen, J. F., Hamberger, L., and Horn, T. (1994). Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101(2), 327-332.
- Bentin-Ley, U., Sjogren, A., Nilsson, L., Hamberger, L., Larsen, J. F., and Horn, T. (1999). Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation *in vitro*. *Human Reproduction*, 14(2), 515-520.
- Bergh, P. A., and Navot, D. (1992). The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertility and Sterility*, 58(3), 537-542.
- Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., and Kataoka, H. (1995). The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Research*, 55(2), 434-439.
- Blois, S. M., Ilarregui, J. M., Tometten, M., Garcia, M., Orsal, A. S., Cordo-Russo, R., Toscano, M. A., Bianco, G. A., Kobelt, P., Handjiski, B., Tirado, I., Markert, U. R., Klapp, B. F., Poirier, F., Szekeres-Bartho, J., Rabinovich, G. A., and Arck, P. C. (2007). A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nature Medicine*, 13, 1450-1457.
- Bloor, D. J., Metcalfe, A. D., Rutherford, A., Brison, D. R., and Kimber, S. J. (2002). Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Molecular Human Reproduction*, 8(3), 237-245.
- Borsting, C., and Morling, N. (2015). Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic Science International Genetics*, 18, 78-89.
- Brakebusch, C., Hirsch, E., Potocnik, A., Fassler, R. (1997). Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *Journal of Cell Science*, 110 (Pt 23), 2895-2904.
- Braundmeier, A. G., Fazleabas, A. T., Lessey, B. A., Guo, H., Toole, B. P., and Nowak, R. A. (2006). Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates metalloproteinases in human uterine endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(6), 2358-2365.
- Bullard, D. C., Kunkel, E. J., Kubo, H., Hicks, M. J., Lorenzo, I., Doyle, N. A., Doerschuk, C. M., Ley, K., and Beaudet, A. L. (1996). Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *Journal of Experimental Medicine*, 183(5), 2329-2336.

- Burks, D. J., Carballada, R., Moore, H. D., and Saling, P. M. (1995). Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science*, 269(5220), 83-86.
- Campbell, N. A., and Reece, J. B. (2006). *Biology*. E. Gündüz, A. Demirsoy ve İ. Türkan (çev.). Ankara: Palme Yayıncılık, 133-135.
- Campbell, S., Swann, H. R., Aplin, J. D., Seif, M. W., Kimber, S. J., and Elstein, M. (1995a). CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Human Reproduction*, 10(2), 425–430.
- Campbell, S., Swann, H. R., Seif, M. W., Kimber, S. J., and Aplin, J. D. (1995b). Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Human Reproduction*, 10(6), 1571–1578.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*, 2(2), 76–83.
- Carlson, B. M. (2004). *Human Embryology of In Vitro Fertilization. Transport of Gametes and Fertilization*, (3rd ed.). Philadelphia: Mosby, 27-41.
- Carson, D. D., Tang, J. P., and Julian, J. (1993). Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Developmental Biology*, 155(1), 97–106.
- Carter, A. M., Enders, A. C., and Pijnenborg, R. (2015). The role of invasive trophoblast in implantation and placentation of primates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1663), 20140070.
- Chan, J. Y., Lee-Prudhoe, J. E., Jorgensen, B., Irkhe, G., Doyonnas, R., Zannettino, A. C., Buckle, V. J., Ward, C. J., Simmons, P. J., and Watt, S. M. (2001). Relationship between novel isoforms, functionally important domains, and subcellular distribution of CD164/endolyn. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 2139–2152.
- Chian, R. C., Buckett, W.M., Abdul Jalil, A. K., Son, W. Y., Sylvestre, C., Rao, D., and Seang Lin Tan, M. D. (2004). Natural-cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment. *Fertility and Sterility*, 82(6), 1675-1678.
- Child, T. J., Abdul-Jalil, A. K., Gulekli, B., and Tan, S. L. (2001). In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 76(5), 936-942.
- Cho, I., and Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260–270.
- Cichy, J., and Pure, E. (2003). The liberation of CD44. *Journal of Cell Biology*, 161(5), 839–843.

- Collins, R. G., Jung, U., Ramirez, M., Bullard, D. C., Hicks, M. J., Smith, C. W., and Beaudet, A. L. (2001). Dermal and pulmonary inflammatory disease in E-selectin and P-selectin double-null mice is reduced in triple-selectin null mice. *Blood*, 98(3), 727–735.
- Colnot, C., Fowles, D., Ripoche, M. A., Bouchaert, I., and Poirier, F. (1998). Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Developmental Dynamics*, 211(4), 306–313.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular Cell*, 7(6), 1267–1278.
- Coutifaris, C., Kao L. C., Sehdev, H. M., Chin, U., Babalola, O., Blaschuk, O. W., and Strauss, J. F. (1991). E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development*, 113(3), 767–777.
- Cummins, P. M. (2012). Occludin: One protein, many forms. *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), 242–250.
- Daftary, G. S., Troy, P. J., Bagot, C. N., Young, S. L., and Taylor, H. S. (2002). Direct regulation of beta3-integrin subunit gene expression by HOXA10 in endometrial cells. *Molecular Endocrinology*, 16(3), 571–579.
- Dai, D., Wolf, D. M., Litman, E. S., White, M. J., and Leslie, K. K. (2002). Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: down-regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors. *Cancer Research*, 62(3), 881–886.
- Defrere, S., Van Langendonck, A., Moulin P, Befahy, P., Gonzalez, D., Madrid, B. M., Dolmans, M. M., and Donnez, J. (2005). Human endometrial epithelial cells (EEC) constitutively express more intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 than endometrial stromal cells (ESC) in culture. *American Journal of Reproductive Immunology*, 54(1), 5–12.
- Delilbaşı, L. (2008). *In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 105–111.
- Delilbaşı, L., Balaban, B., and Ayaş, B. (2000). *Gametler (sperm/oosit), Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim*. (1. Baskı). Ankara: Serono Yayınları, 57–65.
- Demirsoy, A. (2004). *Yaşamın Temel Kuralları, Cilt I*. (18. Baskı). Ankara: Meteksan A.Ş., 75–77.
- Denker, H. W. (1993). Implantation: a cell biological paradox. *Journal of Experimental Zoology*, 266(6), 541–558.
- Ding, Y. Q., Zhu, L. J., Bagchi, M. K., and Bagchi, I. C. (1994). Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology*, 135(5), 2265–2274.

- Dockery, P., and Burke, M. (2008). The fine structure of the mature human endometrium. In J. Aplin, A. Fazleabas, S. Glasser, and L. Giudice (eds.), *The Endometrium*. London: Informa, 46–65.
- Dockery, P., Li, T. C., Rogers, A. W., Cooke, I. D., and Lenton, E. A. (1988). The ultrastructure of the glandular epithelium in the timed endometrial biopsy. *Human Reproduction*, 3(7), 826–834.
- Dudley, J. S., Murphy, C. R., Thompson, M. B., and McAllan, B. M. (2017). Epithelial cadherin disassociates from the lateral plasma membrane of uterine epithelial cells throughout pregnancy in a marsupial. *Journal of Anatomy*, 231(3), 359–365.
- Dymock, D., Weightman, A. J., Scully, C., and Wade, W. G. (1996). Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(3), 537–542.
- Edwards, R., Patrizio, P., Edgar, D., Field, C., and Brinton, L. (2007). Defining IVF terminology. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(5), 553–54.
- Eshkind, L., Tian, Q., Schmidt, A., Franke, W. W., Windoffer, R., and Leube, R. E. (2002). Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *European Journal of Cell Biology*, 81(11), 592–598.
- Farmer, J. L., Burghardt, R. C., Jounsán, D., Hansen, P. J., Bazer, F. W., and Spencer, T. E. (2008). Galectin 15 (LGALS15) functions in trophoblast migration and attachment. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(2), 548–560.
- Feldman, G. J., Mullin, J. M., and Ryan, M. P. (2005). Occludin: Structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(6), 883–917.
- Finn, C. A., and Martin, L. (1974). The control of implantation. *Reproduction*, 39(1), 195–206.
- Fleming, R., Adam, A. H., Barlow, D. H., Black, W. P., MacNaughton, M. C., and Coutts, J. R. A. (1982). New systematic treatment for infertile woman with abnormal hormone profiles. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 89(1), 80–83.
- Foltz, K. R. (1994). The sea urchin egg receptor for sperm. *Seminars in Developmental Biology*, 5(4), 243–253.
- Foltz, K. R., and Lennarz, W. J. (1993). The molecular basis of sea urchin gamete interactions at the egg plasma membrane. *Developmental Biology*, 158(1), 46–61.
- Friedland, J. C., Lakins, J. N., Kazanietz, M. G., Chernoff, J., Boettiger, D., and Weaver, V. M. (2007). $\alpha 6 \beta 4$ integrin activates Rac-dependent p21-activated kinase 1 to drive NF- κ B-dependent resistance to apoptosis in 3D mammary acini. *Journal of Cell Science*, 120(20), 3700–3712.

- Fujimoto, J., Ichigo, S., Hori, M., and Tamaya, T. (1996). Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Gynecological Endocrinology*, 10(3), 187–191.
- Fujiwara, H., Tatsumi, K., Kosaka, K., Sato, Y., Higuchi, T., Yoshioka, S., Meade, M., Ueda, M., and Fujii, S. (2003). Human blastocysts and endometrial epithelial cells express activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(7), 3437–3443.
- Fujiwara, H., Yoshioka, S., Tatsumi, K., Kosaka, K., Satoh, Y., Nishioka, Y., Egawa, M., Higuchi, T., and Fujii S. (2002). Human endometrial epithelial cells express ephrin A1: possible interaction between human blastocysts and endometrium via Eph-ephrin system. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(12), 5801–5807.
- Fukuda, M. N., and Sugihara, K. (2008). An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 34(2), 129–136.
- Fukuda, M. N., Sato, T., Nakayama, J., Klier, G., Mikami, M., Aoki, D., and Nozawa, S. (1995). Trophinin and tastin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation. *Genes and Development*, 9, 1199–1210.
- Fukui, A., Funamizu, A., Yokota, M., Yamada, K., Nakamura, R., Fukuhara, R., Kimura, H., and Mizunuma, H. (2011). Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, 90(1), 105–110.
- Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M. E., Zhong, X., Koenig, S. K. K., Fu, L., Ma, Z. S., Abdo, Z., Forney, L. J., and Ravel, J. (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota, *Journal of Translation Medicine*, 4, 132–152.
- Gardner, D. K., and Simon, C. (2019). *Handbook of In Vitro Fertilization*. G. S. Günalp (çev.). Ankara: Güneş Kitabevi, 143–154.
- Gardner, L. P., and Hiatt, J. L. (2007). *Female Reproductive System*. (3rd Ed.). Philadelphia: Saunders, 480–482.
- Gedikli, S., Özbek, E. ve Demirci, T. (2013). Fertilizasyonun moleküler temeli. *Van Tıp Dergisi*, 20(4), 294–301.
- Genbacev, O. D., Prakobphol, A., Foulk, R. A., Krtolica, A. R., Singer, M. S., Yang, Z., Kiessling, L. L., Rosen, S. D., and Fisher, S. J. (2003). Trophoblast L-selectin mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*, 299(5605), 405–408.
- Getsios, S., Chen, G. T., Stephenson, M. D., Leclerc, P., Blaschuk, O. W., and MacCalman, C. D. (1998). Regulated expression of cadherin-6 and cadherin-11 in the glandular epithelial and stromal cells of the human endometrium. *Developmental Dynamics*, 211(3), 238–247.

- Gipson, I. K., Blalock, T., Tisdale, A. Michaud, S. S., Allcorn, S., Evers, A. S., and Gamzell, K. (2008). MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biology of Reproduction*, 78(1), 134–142.
- Gonen-Gross, T., Goldman-Wohl, D., Huppertz, B., Lankry, D., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Gilad, R., Yagel, S., and Mandelboim, O. (2010). Inhibitory NK receptor recognition of HLA-G: regulation by contact residues and by cell specific expression at the fetal-maternal interface. *PLoS One*, 5(1), e8941.
- Gonzalez, A., Clemente, J. C., Shade, A., Metcalf, J. L., Song, S., Prithiviraj, B., Palmer, B. E., and Knight, R. (2011). Our microbial selves: What ecology can teach us?. *EMBO Reports*, 12, 775–784.
- Green, K. A., Zarek, S. M., and Catherino, W. H. (2015). Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. *Fertility and Sterility*, 104(6), 1351–1357.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84(3), 345–357.
- Guo, B., Tian, Z., Han, B. C., Zhang, X. M., Yang, Z. M., and Yue, Z. P. (2009). Expression and hormonal regulation of Hoxa10 in canine uterus during the peri-implantation period. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(4), 638–642.
- Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yosioka, T., Muller, W. J., Inghirami, G., and Giancotti, F. G. (2006). Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell*, 126(3), 489–502.
- Guzick, D. S., Balmededa, J. P., Ord, T., and Ash, R. H. (1989). The importance of egg and sperm factors in predicting the likelihood of pregnancy from gamete intrafallopian transfer. *Fertility and Sterility*, 52(5), 796–800.
- Haahr, T., Ersboll, A. S., Karlsen, M. A., and Svare, J. (2016). Treatment of bacterial vaginosis in pregnancy in order to reduce the risk of spontaneous preterm delivery—a clinical recommendation. *Acta Obstetrica Gynecologica Scandinavica*, 95(8), 850–860.
- Hartsock, A., and Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, junction and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(3), 660–669.
- Harvey, J., Kliman, M. D., and Frankfurter, D. F. (2019). Clinical approach to recurrent implantation failure: Evidence-based evaluation of the endometrium. *Fertility and Sterility*, 111(4), 618–628.
- Havens, A. M., Jung, Y., Sun, Y. X., Wang, J., Shah, R. B., Bühring, H. J., and Taichman, R. S. (2006). The role of sialomucin CD164 (MGC-24v or endolyn) in prostate cancer metastasis. *BMC Cancer*, 6, 195.
- Hertig, A. T., Rock, J., and Adams, E. C. (1956). A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *American Journal of Anatomy*, 98(3), 435–493.

- Hey, N. A., and Aplin, J. D. (1996). Sialyl-Lewis x and Sialyl-Lewis a are associated with MUC1 in human endometrium. *Glycoconjugate Journal*, 13, 769–779.
- Hey, N. A., Graham, R. A., Seif, M. W., and Aplin, J. D. (1994). The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78(2), 337–342.
- Hinney, B., Henze, C. H., Kuhn, W., and Wuttke, W. (1996). The corpus luteum insufficiency: A multifactorial disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(2), 565–570.
- Hirano, T., Higuchi, T., Katsuragawa, H., Inoue, N. K., Park, K. R., Meaeda M., and Fujii, S. (1999). CD9 is involved in invasion of human trophoblast-like choriocarcinoma cell line, BeWo cells. *Molecular Human Reproduction*, 5(2), 168–174.
- Horne, A. W., White, J. O., and El Lalani, N. (2002). Adhesion molecules and the normal endometrium. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 109(6), 610–617.
- Huber, O., Bierkamp, C., and Kemler, R. (1996). Cadherins and catenins in development. *Current Opinion in Cell Biology* 8(5), 685–691.
- Hyman, R. W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L. C., and Davis, R. W. (2005). Microbes on the human vaginal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 7952–7957.
- Iacono, K. T., Brown, A. L., Greene, M. I., and Saouaf, S. J. (2007). CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Experimental and Molecular Pathology*, 83(3), 283–295.
- Igakura, T., Kadomatsu, K., Kaname, T., Muramatsu, M., Fan, Q. W., Miyauchi, T., Toyama, Y., Kuno, N., Yuasa, S., Takahashi, M., Senda, T., Taguchi, O., Yamamura, K., Arimura, K., and Muramatsu, T. (1998). A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri implantation development and spermatogenesis. *Developmental Biology*, 194, 152–165.
- Ihrke, G., Gray, S. R., and Luzio, J. P. (2000). Endolyn is a mucin-like type I membrane protein targeted to lysosomes by its cytoplasmic tail. *Biochemical Journal*, 345(2), 287–296.
- Illera, M. J., Cullinan, E., Gui, Y., Yuan, L., Beyler, S. A., and Lessey, B. A. (2000). Blockade of the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biology of Reproduction*, 62(5), 1285–1290.
- Illera, M. J., Lorenzo, P. L., Gui, Y. T., Beyler, S. A., Apparao, K. B., and Lessey, B. A. (2003). A role for $\alpha v \beta 3$ integrin during implantation in the rabbit model. *Biology of Reproduction*, 68(3), 766–771.

- Illingworth, I. M., Kiszka, I., Bagley, S., Ireland, G. W., Garrod, D. R., and Kimber, S. J. (2000). Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the preimplantation period of pregnancy: a mechanism for facilitation of implantation. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1764–1773.
- İnternet: National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. (2013). *Fertility problems: assessment and treatment. Clinical guideline*. URL: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156> adresinden 18 Kasım 2021'de alınmıştır.
- Jha, R. K., Titus, S., Saxena, D., Kumar, P. G., and Laloraya, M. (2006). Profiling of E-cadherin, β -catenin and Ca^{2+} in embryo-uterine interactions at implantation. *FEBS Letters*, 580(24), 5653–5660.
- Johannisson, E., and Nilsson, L. (1972). Scanning electron microscopic study of the human endometrium. *Fertility and Sterility*, 23(9), 613–625.
- Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Bazer, F. W., and Spencer, T. E. (2003). Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biology of Reproduction*, 69(5), 1458–1471.
- Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Spencer, T. E., Newton, G. R., Ott, T. L., and Bazer, F. W. (1999). Ovine osteopontin: II. Osteopontin and $\alpha(v)\beta(3)$ integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biology of Reproduction*, 61(4), 892–899.
- Johnson, G. A., Spencer, T. E., Burghardt, R. C., Taylor, K. M., Gray, C. A., and Bazer, F. W. (2000). Progesterone modulation of osteopontin gene expression in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, 62(5), 1315–1321.
- Johnson, J., and Tough, S. (2012). Delayed child-bearing. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 34(1), 80-93.
- Jones, C. J., and Aplin, J. D. (2004). Glycans as attachment and signalling molecules at the maternal-fetal interface. *Signalling molecules in Animal and Human Gestation*, 65–86.
- Jones, C. J., and Aplin, J. D. (2008). Glycosylation at the fetomaternal interface: does the glycode play a critical role in implantation?. *Glycoconjugate Journal*, 26, 359–366.
- Jones, C. J., Fazleabas, A. T., McGinlay, P. B., and Aplin, J. D. (1998). Cyclic modulation of epithelial glycosylation in human and baboon (*Papio anubis*) endometrium demonstrated by the binding of the agglutinin from *Dolichos biflorus*. *Biology of Reproduction*, 58(1), 20–27.
- Jones, R. (1991). Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbonhydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Development*, 111(4), 1156-1163.
- Junguieria, L. C., and Carneira, J. (1983). *Basic Histology*. (4th Ed.). Los Altos, California: Longe Medical Publications, 237-241.

- Kakar-Bhanot, R., Brahmbhatt, K., Chauhan, B., Katkam, R.R., Bashir, T., Gawde, H., Mayadeo, N., Chaudhari, U. K., and Sachdeva, G. (2019). Rab11a drives adhesion molecules to the surface of endometrial epithelial cells. *Human Reproduction*, 34(3), 519–529.
- Kaplan, D. D., Meigs, T. E., and Casey, P. J. (2001). Distinct regions of the cadherin cytoplasmic domain are essential for functional interaction with Galpha 12 and beta-catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 44037–44043.
- Karczewski, J., Troost, F.J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebe M., Brummer, R. M., and Wells, J. M. (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298, 851–859.
- Kasinerker, W., Fiebiger, E., Stefanova, I., Baumruker, T., Knapp, W., and Stockinger, H. (1992). *Journal of Immunology*, 149(3), 847–854.
- Kawanishi, J., Kato, J., Sasaki, K., Fujii, S., Watanabe, N., and Niitsu, Y. (1995). Loss of E cadherin-dependent cell–cell adhesion due to mutation of the beta-catenin gene in a human cancer cell line, HSC-39. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1175–1181.
- Key, J. D., and Kempers, R. D. (1987). Citation classics: Most-cited articles from Fertility and Sterility. *Fertility and Sterility*, 47(6), 910–915.
- Kimber, S. (2008). Blastocyst implantation: The adhesion cascade. In J. D. Aplin, A. T. Fazleabas, S. R. Glasser, and L. C. Giudice (eds.), *The Endometrium*. London: Informa, 331–351.
- Kimber, S. J., Bentley, J., Ciemerych, M., Moller, C. J., and Bock, E. (1994). Expression of N-CAM in fertilized pre- and periimplantation and parthenogenetically activated mouse embryos. *European Journal of Cell Biology*, 63(1), 102–113.
- Kiziroğlu, İ. (2004). *Genel Biyoloji: Canlılar Bilimi*. (5. Baskı). Ankara: Birlik Yayıncılık, 67–69.
- Kliman, H. J., Feinberg, R. F., and Haimowitz, J. E. (1990). Human trophoblast-endometrial interactions in an in vitro suspension culture system. *Placenta*, 11(4), 349–367.
- Kumar, S., Zhu, L. J., Polihronis, M., Cameron, S. T., Baird, D. T., Schatz, F., Dua, A., Ying, Y. K., and Bagchi, I. C. (1998). Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(12), 4443–4450.
- Kuno, N., Kadomatsu, K., Fan, Q-W., Hagihara, M., Senda, T., Mizutani, S., and Muramatsu, T. (1998). Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. *FEBS Letters*, 425(2), 191–194.

- Laflamme, J., Akoum, A., and Leclerc, P. (2005). Induction of human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation by endometrial cells and interleukin-6. *Molecular Human Reproduction*, 11(2), 141-150.
- Lai, T. H., Shih I. M., Vlahos, N., Ho, C. L., Wallach, E., and Zhao, Y. (2005). Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*, 83(1), 1297-1302.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., and Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoblast epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(17), 8263-8267.
- Lau, K. S., Partridge, E. A., Grigorian, A., Reinhold, V. N., Demetriou, M., and Dennis, J. W. (2007). Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell*, 129(1), 123-134.
- Lawrence, Y., Whitaker, M., and Swann, K. (1997). Sperm-egg fusion is the prelude to the Ca^{++} increase at fertilization in the mouse. *Development*, 124(1), 233-241.
- Leclerc, P., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1998). Interaction between Ca^{2+} , cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *Journal of Andrology*, 19(4), 434-443.
- Lessey, B. A. (1998). Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Human Reproduction*, 13(3), 247-258; discussion 259-261.
- Lessey, B. A. (2000). Endometrial receptivity and the window of implantation. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 14(5), 775-788.
- Lessey, B. A. (2002). Adhesion molecules and implantation. *Journal of Reproductive Immunology*, 55(1-2), 101-112.
- Lessey, B. A. (2011). Assessment of endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, 96(3), 522-529.
- Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Sawin, S. W., Buck, C. A., Schinnar, R., Bilker, W., and Strom, B. L. (1994). Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 79(2), 643-649.
- Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Sawin, S. W., and Sun, J. (1995). Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 63(3), 535-542.
- Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Wolf, L., Greene, W., Paulson, M., and Fritz, M. A. (2000). Use of integrins to date the endometrium. *Fertility and Sterility*, 73(4), 779-787.

- Lessey, B. A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S. M., and Buck, C. A. (1992). Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(1), 188–195.
- Lessey, B. A., Ilesanmi, A. O., Lessey, M. A., Riben, M., Harris, J. E., and Chwalisz, K. (1996). Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception, and infertility. *American Journal of Reproductive Immunology*, 35(3), 195–204.
- Li, H. Y., Shen, J. T., Chang, S. P., Hsu, W. L., and Sung, Y. J. (2008). Calcitonin promotes outgrowth of trophoblast cells on endometrial epithelial cells: involvement of calcium mobilization and protein kinase C activation. *Placenta*, 29(1), 20–29.
- Li, K., and Nowak, R. A. (2020). The role of basigin in reproduction society for reproduction. *Society for Reproduction and Fertility*, 159(2), 97–109.
- Li, K., Li, Q., Bashir, S. T., Bany, B. M., and Nowak, R. A. (2021). Loss of Basigin expression in uterine cells leads to subfertility in female mice. *Biology of Reproduction*, 105(4), 859–875.
- Li, Q., Bagchi, M. K., and Bagchi, I. C. (2006). Identification of a signaling pathway involving progesterone receptor, calcitonin, and tissue transglutaminase in Ishikawa endometrial cells. *Endocrinology*, 147(5), 2147–2154.
- Li, Q., Wang, J., Armant, D. R., Bagchi, M. K., and Bagchi, I. C. (2002). Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46447–46455.
- Li, Y., Bharti, A., Chen, D., Gong, J., and Kufe, D. (1998). Interaction of glycogen synthase kinase 3 β with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and β -catenin. *Molecular and Cellular Biology*, 18(12), 7216–7224.
- Linda, C., and Giudice, M. D. (2016). Challenging dogma: the endometrium has a microbiome with functional consequences. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(6), 682–684.
- Lindenberg, S. (1991). Experimental studies on the initial trophoblast endometrial interaction. *Danish Medical Bulletin*, 38(5), 371–380.
- Lindsay, L., and Murphy, C. (2008). The cytoskeleton of uterine epithelial and stromal cells. In J. D. Aplin, A. T. Fazleabas, S. R. Glasser, and L. C. Giudice (eds.), *The Endometrium. Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives*. London: Informa, 66–75.
- Liu, Q., Yan, X., Li, Y., Zhang, Y., Zhao, X., and Shen, Y. (2004). Pre-eclampsia is associated with the failure of melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) expression by intermediate trophoblast. *Laboratory Investigation*, 84, 221–228.

- Liu, Q., Zhang, B., Zhao, X., Zhang, Y., Liu, Y., and Yan, X. (2008). Blockade of adhesion molecule CD146 causes pregnancy failure in mice. *Journal of Cellular Physiology*, 215(3), 621–626.
- Longo, F. J. (1997). *Fertilization*. (2nd Ed.). London: Chapman and Hall, 183–185.
- Lopata, A., Bentin-Ley, U., and Enders, A. (2002). ‘Pinopodes’ and implantation. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 3(2), 77–86.
- Lunter, P. C., van Kilsdonk, J. W., van Beek, H., Cornelissen, M. H. A., Bergers, M., Willems, H. G. M., and Swart, G. W. M. (2005). Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity. *Cancer Research*, 65(19), 8801–8808.
- Ma, B., Forney, L. J., and Ravel, J. (2012). Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annual Review of Microbiology*, 66, 371–389.
- MacCalman, C. D., Getsios, S., and Chen, G. T. (1998). Type 2 cadherins in the human endometrium and placenta: their putative roles in human implantation and placentation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 39(2), 96–107.
- Macklaim, J. M., Gloor G. B., Anukam, K. C., Cibby, S., and Reid, G. (2011). At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4688–4695.
- Mandal, A., Naaby-Hansen, S., Wolkowicz, M. J., Klotz, K., Shetty, J., Retief, J. D., Coonrod, S. A., Kinter, M., Sherman, N., Cesar, F., Flickinger, C. J., and Herr, J. C. (1999). FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 61(5), 1184–1197.
- Marchesi, J. R., and Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome*, 3, 31.
- Margalioth, E. J., Ben-Chetrit, A., Gal, M., Eldar-Geva, T. (2006). Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVFET. *Human Reproduction*, 21(12), 3036–3043.
- Martel, D., Frydman, R., Glissant, M., Maggioni, C., Roche, D., and Psychoyos, A. (1987). Scanning electron microscopy of postovulatory human endometrium in spontaneous cycles and cycles stimulated by hormone treatment. *Journal of Endocrinology*, 114(2), 319–NP.
- Matsuzaki, S., Darcha, C., Maleysson, E., Canis, M., and Mage, G. (2010). Impaired down-regulation of E-Cadherin and β -Catenin protein expression in endometrial epithelial cells in the mid-secretory endometrium of infertile patients with endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(7), 3437–3445.
- Mendling, W. (2016). Vaginal microbiota. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 902, 83–93.

- Meseguer, M., Aplin, J. D., Caballero-Campo, P., O'Connor, J. E., Martin, J. C., Remohi, J., Pellicer, A., and Simon, C. (2001). Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biology of Reproduction*, 64(2), 590–601.
- Mishra, A., Galvankar, M., Vaidya, S., Chaudhari, U., and Modi, D. (2020). Mouse model for endometriosis is characterized by proliferation and inflammation but not epithelial-to-mesenchymal transition and fibrosis. *Journal of Biosciences*, 45(1), 1–15.
- Mohamed, O. A., Jonnaert, M., Labelle-Dumais, C., Kuroda, K., Clarke, H. J., and Dufort, D. (2005). Uterine Wnt/beta-catenin signaling is required for implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8579–8584.
- Moreno, I., Codoner, F. M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J. F., Jimenez-Almazan, J., Alonso, R., Alama, P., Remohi, J., Pellicer, A., Ramon, D., and Simon, C. (2016). Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American Journal of Obstetrics Gynecology*, 215(6), 682–703.
- Murphy, C. R., Rogers, P. A., Hosie, M. J., Leeton, J., and Beaton, L. (1992). Tight junctions of human uterine epithelial cells change during the menstrual cycle: A morphometric study. *Acta Anatomica*, 144, 36–38.
- Murphy, C. R., Rogers, P. A., Leeton, J., Hosie, M., Beaton, L., and Macpherson, A. (1987). Surface ultrastructure of uterine epithelial cells in women with premature ovarian failure following steroid hormone replacement. *Acta Anatomica*, 130, 348–350.
- Murray, M. J., Zhang, J., and Lessey, B. A. (1999). Expression of alpha6 and beta4 integrin subunits throughout the menstrual cycle: no correlation with uterine receptivity. *Fertility and Sterility*, 72(3), 522–526.
- Nargund, G., Fauser, B. C., Macklon, N. S., Ombelet, W., Nygreen, K., and Frydman, R. (2007). The Ismaar proposal on terminology for ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction*, 22(11), 2801–2804.
- Navot, D., Scott, R. T., Driesch, K., Veeck, L. L., Liu, H. C., and Rosenwaks, Z. (1991). The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertility and Sterility*, 55(1), 114–118.
- Nikas, G. (1999). Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Human Reproduction*, 14(2), 99–106.
- Nilsson, O. (1958). Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. 3. Late effect of estrogen administered to spayed animals. *Journal of Ultrastructure Research*, 2(2), 185–199.
- Noguchi, Y., Sato, T., Hirata, M., Hara, T., Ohama, K., and Ito, A. (2003). Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(12), 6063–6072.

- Norwitz, E. R., Schust, D. J., and Fisher, S. J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 345(19), 1400-1408.
- Noyes, R. W., Hertig, A. T., and Rock, J. (1950). Dating the endometrial biopsy. *Fertility and Sterility*, 1(1), 5-25.
- Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H., and Koren, O. (2016). Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1031.
- Omigbodun, A., Ziolkiewicz, P., Tessler, C., Hoyer, J. R., and Coutifaris, C. (1997). Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta?. *Endocrinology*, 138(10), 4308-4315.
- Oyama, T., Kanai, Y., Ochiai, A., Akimoto, S., Oda, T., Yanagihara, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Shibamoto, S., Ito, F., Takeichi, M., Matsuda, H., and Hirohashi, S. (1994). A truncated β -catenin disrupts the interaction between E-cadherin and α -catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. *Cancer Research*, 54(23), 6282-6287.
- O'Shea, K. S., Liu, L. H., Kinnunen, L. H., and Divit, V. M. (1990). Role of the extracellular matrix protein thrombospondin in the early development. *Journal of Cell Biology*, 111, 2713-2723.
- Öner, H., Öner, J., and Demir, R. (2006). Expression of nidoges in rat uterus and embriyo during decidualization and implantation. *Journal of Morphology*, 267(7), 822-830.
- Öner, J. ve Öner, H. (2013). Gebelikte matriks metalloproteinazlar (MMP) ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP). *Selçuk Tıp Dergisi*, 29(2), 95-99.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., and van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340(8810), 17-18.
- Paria, B. C., Reese, J., Das, S. K., and Dey, S. K. (2002). Deciphering the cross-talk of implantation: Advances and challenges. *Science*, 296(5576), 2185-2188.
- Park, K. R., Inoue, T., Ueda, M., Hirano, T., Higuchi, T., Meade, M., Konishi, I., and Fujii, S. (2000). CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins $\alpha 6$, $\alpha 3$ and $\beta 1$. *Molecular Human Reproduction*, 6(3), 252-257.
- Payan-Carreira, R., Pires, M. A., Santos, C., Holst, B.S., Colaço, J., and Rodriguez-Martinez, H. (2016). Immunolocalization of E-cadherin and β -catenin in the cyclic and early pregnant canine endometrium. *Theriogenology* 86(4), 1092-1101.
- Perez-Munoz, M. E., Arrieta, M. C., and Ramer-Tait, A. E. (2017). Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5(1), 48.

- Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., Bonazzi, V., McEwen, J. E., Wetterstrand, K. A., Deal, C., Baker, C. C., Di Francesco, V., Howcroft, T. K., Karp, R. W., Lunsford, R. D., Wellington, C. R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, A.R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M. H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B., and Guyer, M. (2009). The NIH human microbiome project. *Genome Research*, 19(12), 2317–2323.
- Poirier, F., and Robertson, E. J. (1993). Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development*, 119(4), 1229–1236.
- Poncelet, C., Leblanc, M., Walker-Combrouze, F., Soriano, D., Feldmann, G., Madelenat, P., Scoazec, J. Y., and Darai, E. (2002). Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 81(3), 195–203.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2008). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 90(6), 1603.
- Preston, A. M., Lindsay, L. A., and Murphy, C. R. (2004). Progesterone treatment and the progress of early pregnancy reduce desmoglein 1&2 staining along the lateral plasma membrane in rat uterine epithelial cells. *Acta Histochemica*, 106(5), 345–351.
- Psychoyos, A. (1973). Hormonal control of ovo implantation. *Vitamins and Hormones*, 31, 205–225.
- Quenby, S., Anim-Somuah, M., Kalumbi, C., Farquharson, R., and Aplin, J. D. (2007). Different types of recurrent miscarriage are associated with varying patterns of adhesion molecule expression in endometrium. *Reproductive Biomedicine Online*, 14(2), 224–234.
- Rabinovich, G. A., Toscano, M. A., Jackson, S. S., and Vasta, G. R. (2007). Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(5), 513–520.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle R., Russell J., Davis C. C., and Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiom of reproductive-age woman. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4680–4687.
- Reardon, S. N., King, M. L., Mann, J. L., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., and Hayashi, K. (2012). Cdh1 Is Essential for Endometrial Differentiation, Gland Development, and Adult Function in the Mouse Uterus. *Biology of Reproduction*, 86(5), 1–10.
- Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foluk, R., McMaster, M., and Fisher, J. S. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *Journal of Clinical Investigation*, 114(6), 744–754.

- Reese, J., Das, S. K., Paria, B. C. Lim, H., Song, H., Matsumoto, H., Knutson, K. L., and Dey, S. K. (2001). Global Gene Expression Analysis to Identify Molecular Markers of Uterine Receptivity and Embryo Implantation*210. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 44137–44145.
- Riethmacher, D., Brinkmann, V., and Birchmeier, C. (1995). A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *The Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 92(3), 855–859.
- Robinson, S. D., Frenette, P. S., Rayburn, H. Commiskey, M., Cullere, U., Wagner, D. D., and Hynes, R. O. (1999). Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *The Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 96(20), 11452–11457.
- Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L., and Juliano, R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1242(1), 77–98.
- Rosenwalda, A. G., Gaurav S. A., Ramana, M., Jennifer, R. C., and Janet, S. R. (2012). The human microbiome project: An opportunity to engage undergraduates in research. *Procedia Computer Science*, 9, 540-549.
- Sadler, T. W. (1985). *Gametogenesis. Langman's Medical Embryology*. (5th Ed.). Baltimore: Williams and Wilkins, 13-30.
- Sadler, T. W. (2006). *Langman's Medical Embryology*. (10th Ed.). Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 68-88.
- Sadler, T. W. (2010). *Langman's Medical Embryology*. (11th Ed.), Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 31-50.
- Sadler, T. W. (2017). *Medikal Embriyoloji (Langman)*. (13. Baskı). A. C. Başaklar (Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık, 37-47.
- Selam, B., and Topçuoğlu, A. (2004). Luteal faz fizyolojisi ve overi stimüle eden ajanlarla değişimi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 30(3), 217-220.
- Shih, H. C., Shiozawa, T., Miyamoto, T., Kashima, H., Feng, Y. Z., Kurai, M., and Konishi, I. (2004). Immunohistochemical expression of E-cadherin and β -catenin in the normal and malignant human endometrium: an inverse correlation between E-cadherin and nuclear β -catenin expression. *Anticancer Research*, 24(6), 3843-3850.
- Shih, I. M., Nesbit, M., Herlyn, M., and Kurman, R. J. (1998b). A new Mel- CAM (CD146) specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffinembedded tissue. *Modern Pathology*, 11(11), 1098–1106.
- Shih, I., Wang, T., Wu, T., Kurman, R. J., and Gearhart, J. D. (1998a). Expression of Mel-CAM in implantation site intermediate trophoblastic cell line, IST-1, limits its migration on uterine smooth muscle cells. *Journal of Cell Science*, 111(17), 2655–2664.

- Shimizu, Y., Kabir-Salmani, M., Azadbakht, M., Sugihara, K., Sakai, K., and Iwashita, M. (2008). Expression and localization of galectin-9 in the human uterodome. *Endocrine Journal*, 55(5), 879-887.
- Shirane, A., Wada-Hiraike, O., Tanikawa, M., Seiki, T., Hiraike, H., Miyamoto, Y., and Taketani, Y. (2012). Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(3), 604-610.
- Shufaro, Y., and Schenker, J. G. (2011). Implantation failure, etiology, diagnosis and treatment. *International Journal of Infertility and Fetal Medicine*, 2(1), 1-7.
- Simon, C., Martin, J. C., and Pellicer, A. (2000). Paracrine regulators of implantation. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 14(5), 815-826.
- Singh, H., and Aplin, J. D. (2009). Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *Journal of Anatomy*, 215(1), 3-13.
- Sirichoat, A., Buppasiri, P., Engchanil, C., Namwat, W., Faksri, K., Sankuntaw, N., Pasomsub, E., Chantratita, W., and Lulitanond, V. (2018). Characterization of vaginal microbiota in Thai women. *PeerJ*, 6, e5977.
- Sirota, I., Zarek, S. M., and Segars, J. H. (2014). Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. In *Seminars in reproductive medicine*, 32(01), 035-042. *Thieme Medical Publishers*.
- Smith, S. B., and Ravel, J. (2017). The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *The Journal of Physiology*. 595(2), 451-463.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., and Burghardt, R. C. (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*, 128(6), 657-668.
- Stavreus-Evers, A., Nikas, G., Sahlin, L., Eriksson, H., and Landgren, B. M. (2001). Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertility and Sterility*, 76(4), 782-791.
- Stemmler, M. P. (2008). Cadherins in development and cancer. *Molecular BioSystems*, 4(8), 835-850.
- Steptoe, P. C., and Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet*, 312(8085), 366.
- Svalander, P. C., Odin, P., Nilsson, B. O., and Obrink, B. (1987). Trophoctoderm surface expression of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 on rat blastocysts. *Development*, 100(4), 653-660.
- Svalander, P. C., Odin, P., Nilsson, B. O., and Obrink, B. (1990). Expression of cellCAM-105 in the apical surface of rat uterine epithelium is controlled by ovarian steroid hormones. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88, 213-221.
- Tan, S. L., and Child, T. J. (2002). *In-vitro* maturation of oocytes from unstimulated polycystic ovaries. *Reproductive Biomedicine Online*, 4, 18-23.

- Taskan, T., and Gonenc, A. (2020). The role of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 9(2), 116-124.
- Thomson, A. J., Greer, M. R., Young, A., Boswell, F., Telfer, J. F., Cameron, I. T., and Campbell, S. (1999). Expression of intercellular adhesion molecules ICAM-1 and ICAM-2 in human endometrium: regulation by interferon- γ . *Molecular Human Reproduction*, 5(1), 64-70.
- Trounson, A. O., Leeton, J. F., Wood, C., Webb, J., and Wood, J. (1981). Pregnancies in humans by fertilization *in vitro* and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science*, 212(4495), 681-682.
- Tsuchiya, B., Sato, Y., Kameya, T., Okayasu, I., and Mukai, K. (2006). Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. *Archives of Histology and Cytology*, 69(2), 135-145.
- Tulac, S., Nayak, N. R., Kao, L. C., Van Waes, M., Huang, J., Lobo, S., and Giudice, L. C. (2003). Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(8), 3860-3866.
- Turpeenniemi-Hujanen, T., Feinberg, R. F., Kauppila, A., and Puistola, U. (1995). Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertility and Sterility*, 64(1), 132-138.
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., and Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70(1), 38-44.
- Usadi, R. S., Murray, M. J., Bagnell, R. C., Fritz, M. A., Kowalik, A. I., Meyer, W. R., and Lessey, B. A. (2003). Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertility and Sterility*, 79(4), 970-974.
- Van de Stolpe, A., and Van der Saag, P. T. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Molecular Medicine*, 74(1), 13-33.
- Van der Linden, P. J., de Goeij, A. F., Dunselman, G. A., Erkens, H. W., and Evers, J. L. (1995). Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*, 63(6), 1210-1216.
- Van Kempen, L. C., Nelissen, J. M., Degen, W. G., Torensma, R., Weidle, U. H., Bloemers, H. P., Figdor, C. G., and Swart, G. W. (2001). Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 25783-25790.

- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, C., Kraft, A., Levitsky, M., Lewis, X., Liu, J., Lopez, D., Ma, W., Majoros, J., McDaniel, S., Murphy, L., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., and Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304–1351.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., and Kalush, F. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304–1351.
- Verma, R. K., Soni, U. K., Chadchan, S. B., Maurya, V. K., Soni, M., Sarkar, S., Pratap, J. V., and Jha, R. K. (2021). miR-149-PARP-2 signaling regulates E-cadherin and N-cadherin expression in the murine model of endometrium receptivity. *Reproductive Sciences*, 1-18.

- Von Wolff, M., Wang, X., Gabius, H. J., and Strowitzki, T. (2005). Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. *Molecular Human Reproduction*, 11(3), 189-194.
- Walensky, L. D., and Snyder, S. H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *Journal of Cell Biology*, 130(4), 857-869.
- Wang, X., Matsumoto, H., Zhao, X., Das, S. K., and Peria, B. C. (2004). Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *Journal of Cell Science*, 117(1), 53-62.
- Wassarman, P. M. (1987). The biology and chemistry of fertilization. *Science*, 235(4778), 553-560.
- Wassarman, P., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, C., Qi, H., and Williams, Z. (1999). Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *Journal of Experimental Zoology*, 285(3), 251-258.
- Wen, Y., Caffrey, T. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., and Hollingsworth, M. A. (2003). Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and β -Catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 38029–38039.
- Whitby, S., Zhou, W., and Dimitriadis, E. (2020). Alterations in epithelial cell polarity during endometrial receptivity: A systematic review. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 596324
- White F. J., Burghardt, R. C., Hu, J., Joyce, M. M., Spencer, T. E., and Johnson, G. A. (2006). Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation. *Reproduction*, 132(6), 919–929.
- Widelitz, R. (2005). Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: Recent progress. *Growth Factors*, 23(2), 111–116.
- Wilcox, A. J., Baird, D. D., and Weinberg C. R. (1999). Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, 340, 1796–1799.
- World Health Organization (WHO). (1991). *Infertility: A Tabulation of Available Data on Prevalence of Primary and Secondary Infertility*. Geneva: Programme on Maternal and Child Health and Family Planning, Division of Family Health.
- Wu, R. J., and Zhon, F. I. (2003). Expression of matrix metalloproteinases-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 mRNA in the endometrium during midluted phase in women with unexplained infertility. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 38(6), 346-349.

- Wynne, F., Ball, M., McLellan, A. S., Dockery, P., Zimmermann, W., and Moore, T. (2006). Mouse pregnancy-specific glycoproteins: tissuespecific expression and evidence of association with maternal vasculature. *Reproduction*, 131(4), 721–732.
- Xiao, L. J., Chang, H., Ding, N. Z., Ni, H., Kadomatsu, K., and Yang, Z. M. (2002a). Basigin expression and hormonal regulation in mouse uterus during the peri-implantation period. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 63(1), 47-54.
- Xiao, L. J., Diao, H. L., Ma, X. H., Ding, N. Z., Kadomatsu, K., Muramatsu T., and Zang, Z. M. (2002b). Basigin expression and hormonal regulation in the rat uterus during the peri-implantation period. *Reproduction*, 124(2), 219-225.
- Yamamoto, M., Bharti, A., Li, Y., and Kufe, D. (1997). Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and B-Catenin in cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12492-12494.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In E. Knobil, and J. D. Neill (eds.), *Physiology of Reproduction*. (2nd Ed.). New York: Raven Press, 189-317.
- Yoon, S. J., Choi, D. H., Lee, W. S., Cha, K.Y., Kim, S. N., and Lee, K. A. (2004). A molecular basis for embryo apposition at the luminal epithelium. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 219(1-2), 95–104.
- Yoshinaga, K. (1988). Uterine receptivity for blastocyst implantation. *Annals of New York Academy of Sciences*, 541(1), 424-431.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., and van der Poel, S. (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the WHO revised glossary on ART terminology. *Human Reproduction*, 24(11), 2683-2687.
- Zhang, H., Niu, Y., Feng, J., Guo, H., Ye, X., and Cui, H. (2006). Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls. *Fertility and Sterility*, 86(2), 274–282.
- Zhou, X., Hansmann, M.A., Davis, C.C., Suzuki, H., Brown, C. J., Schutte, U., Pierson, J. D., and Forney, L. J. (2010). The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 58(2), 169–181.
- Zhu, L. J., Bagchi, M. K., and Bagchi, I. C. (1998a). Attenuation of calcitonin gene expression in pregnant rat uterus leads to a block in embryonic implantation. *Endocrinology*, 139(1), 330–339.
- Zhu, L. J., Cullinan-Bove, K., Polihronis, M., Bagchi, M. K., and Bagchi, I. C. (1998b). Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation. *Endocrinology*, 139(9), 3923–3934.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Kararı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Tüp Bebek Uygulamalarında Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı olan Hastaların Endometrial Mikrobiyotasının ve Histolojik Gününlün İmplantasyon Başarısızlığı Olmayan Hastalar ile Karşılaştırılması					
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		KA-17103					
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	☒	Açıklama				
	SİGORTA	☒	06.11.2017 tarihli teklifi				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	08.11.2017 imza tarihli				
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	☒	21.11.2017 imza tarihli				
	İLAN	☐					
	YILLIK BİLDİRİM	☐					
	SONUÇ RAPORU	☐					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐					
DİĞER:	☒	Dr. Öğr. Üyesi İdil YET, Dr. Öğr. Üyesi Çağman TAN, Dr. Öğr. Gör. Süheyla Esra ÖZKOÇER ait özgeçmişler					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2020/02-32 (KA-17103)	Toplantı Tarihi: 06.02.2020					
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Gürkan BOZDAĞ'ın sorumlu araştırmacısı olduğu, Uzm. Hande YEĞENOĞLU'nun yüksek lisans tezini de içeren, Prof. Dr. Çiğdem ELMAS, Prof. Dr. Lale Karakoç SÖKMENSÜER ve Uzm. Dr. Sezcan MÜMÜŞOĞLU ile birlikte çalışacakları " Tüp Bebek Uygulamalarında Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı olan Hastaların Endometrial Mikrobiyotasının ve Histolojik Gününlün İmplantasyon Başarısızlığı Olmayan Hastalar ile Karşılaştırılması " başlıklı proje dosyası; araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; çalışmaya alınacak gönüllülerin çalışma kapsamında sigortalanması koşuluyla tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur.						
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Mutlu HAYRAN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım*	İmzası:	
Prof. Dr. Mutlu HAYRAN Başkan	Preventif Onkoloji	Hacettepe Ü. Onkoloji Enstitüsü	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Türkan ELDEM Başkan Yardımcısı	Farmasötik Biyoteknoloji	Hacettepe Ü. Ezc. F.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Erdem KARABULUT (Bildirimlerden Sorumlu Üye)	Biyoistatistik	Hacettepe Ü. Tıp F.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Murat YURDAKÖK	Çocuk Sağl. ve Hst. (Neonatoloji)	Hacettepe Ü. Tıp F.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Nilgün SAYINALP	İç Hst. Hematoloji	Hacettepe Ü. Tıp F.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Nüket ÖRNEK BUKEN	Tıp Tarihi ve Etik	Hacettepe Ü. Tıp F.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Ayşe KÜÇÜKDEVECİ	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	Ankara Ü. Tıp F.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Mehmet UĞUR	Biyofizik	Ankara Ü. Tıp F.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Mehmet Hakan ÖZSOY	Ortopedi ve Travmatoloji	Memorial Ankara Hastanesi	E	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒		
Prof. Dr. M. Yıldırım SARA	Tıbbi Farmakoloji	Hacettepe Ü. Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Abdullah Cevdet AKMAN	Periodontoloji	Hacettepe Ü. Diş Hekimliği F.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Hatice Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Hacettepe Ü. Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Doç. Dr. Zafer ARIK	İç Hst. Tıbbi Onkoloji	Hacettepe Ü. Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Av. Meltem ONURLU	Avukat	Hacettepe Ü. Hukuk Müşavirliği	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Fatma Nesrin ŞEYHİSMAİLOĞLU	Sivil Üye	-	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		

*: Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mutlu HAYRAN
İmzası

Not: Etik Kurul Başkanı'nın her sayfada imzası yer almalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YEĞENOĞLU AKÇINAR, Hande
Uyruğu : T. C

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2013
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2009
İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2014-2021	Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar ve Çeviriler

- Akçınar, H. Y., Aslim, B., Torul, H., Güven, B., Zengin, A., Suludere, Z., Boyacı, İ.H. ve Tamer, U. (2020). Immunomagnetic separation and *Listeria monocytogenes* detection with surface-enhanced Raman scattering. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(4), 1157-1167.
- Gardner, D.K. ve Simon, C. (Edt.). *In Vitro Fertilizasyon El Kitabı*. G. S. Günalp (Çev. edt.), Chapter: 14, H. Yeğenoğlu Akçınar (Çev.), *Embriyo Kültür Sistemleri*, 205-244.
- Tamer, U., Cetin, D., Suludere, Z., Boyacı, I. H., Temiz, H. T., Yegenoglu, H., Daniel, P., Dincer, İ ve Elerman, Y. (2013). Gold-coated iron composite nanospheres targeted the detection of *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6223-6240.
- Yegenoglu, H., Aslim, B., Guven, B., Zengin, A., Boyaci, I. H., Suludere, Z., ve Tamer, U. (2017). The comparison of antioxidant capacity and cytotoxic, anticarcinogenic, and genotoxic effects of Fe@ Au nanosphere magnetic nanoparticles. *Turkish Journal of Biology*, 41(2), 302-313.

- Yegenoglu, H., Oke, F. ve Aslim, B. (2012). Comparison of Antioxidant Capacities of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singerby Using Different In-Vitro Methods. *Journal of Medicinal Foods*, 14(5), 512-516.
- Yeğenoğlu, H., Aslim, B. ve Tamer, U. (2013). Gıda patojenlerinin tanısında kullanılan nanoboyutlu immünosensör tasarımı. *Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(1).
- Yeğenoğlu, H., Bozdağ, G., ve Karakoç-Sökmensüer, L. (2017). Fertilite uzmanları vajinal mikrobiyom hakkında neler bilmeliler?. *Blast*.

Kongre Poster Sunumları

- Karakoc-Sokmensuer, L., Mumusoglu, S., Bozdag, G., Yegenoglu, H., Coskun, N., Sever, A. ve Gunalp, S. (2015). *The impact of paternal age on intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) cycle outcome in ART: a retrospective study*, Baltimore, USA, October 17-21.
- Sipahi, M., Mümüşoğlu, S., Bozdağ, G., Sever, A., Yeğenoğlu, H., Coşkun Akçay, N., Karakoç Sökmensüer, L. ve Yaralı, H. (2018). *Embryology (incl. IVF - ICSI, oocyte and embryo selection, culture, cryopreservation, developmental biology, quality control)*, 1-4 July, European Society of Human Reproduction and Embryology, Barcelona, Spain.
- Sipahi, M., Mümüşoğlu, S., Bozdağ, G., Sever, A., Yeğenoğlu, H., Coşkun-Akçay, N., Karakoç-Sökmensüer, L. ve Yaralı, H. (2018). *Supplementation of Granulocyte – Macrophage Colony – Stimulating Factor to Culture Medium Might Rectify Pregnancy Rates in Patients Having History of Failed IVF Due to Embryo Development Arrest*, (COGI), London, UK November 23-25.
- Yeğenoğlu, O. Aslim, B. ve Küçükboyacı, N. (2011). *Antioxidant Properties of Water and Methanol Extracts from Teucrium orientale*. 1st Int. Sym. on Secondary Metabolites Chemical, Biological and Biotechnological Properties, Issmet, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.
- Yeğenoğlu, O. Aslim, B. ve Tamer, U. (2011). *Antioxidant Properties of Magnetic Gold Nanosphere by Using In-vitro Methods*. Workshop on Vibrational Spectroscopy in Nanotechnology Cost Action MP0901 NANOTP WG 2 AND 3-june 26 and 29, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul.
- Yeğenoğlu, O., Torul, H., Zengin, A., Aslim, B., Çetin, D., Suludere, Z., Boyacı, İ.H. ve Tamer, U. (2016/5-7 Ekim). *Detection of Listeria Monocytogenes Using Anisotropic Magnetic Nanoparticle Based Surface Enhanced Raman Spectroscopy*. Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Yeğenoğlu-Akçınar, H., Elmas, Ç., Özkoçer, S.E., Bozdağ, G., Mümüşoğlu, S., Güneş, A.C., Karakoç, L. ve Yet, İ. (2021). *Tüp Bebek Uygulamalarının Başarısında; Basigin, E-kadherin ve Occludin Proteinlerinin Rolünün İmmünohistokimyasal olarak İncelenmesi*, 4. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, 20-22 Mayıs.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

