

Tekrarlayan Gebelik Kaybı ile İlişkili Apoptotik Ölüm Reseptörü-4 TRAIL Bağlanma Bölgesindeki C626G Polimorfizmi: Vaka-Kontrol Araştırması

C626G Polymorphism in the Apoptotic Death Receptor-4 TRAIL Binding Domain Associated with Recurrent Pregnancy Loss: Case-Control Research

Sevinç SÜRER TEKİN^a, Mustafa Ertan AY^a, Hüseyin DURUKAN^b, Kenan ÇEVİK^a,
Özlem İZCİ AY^a, Gurbet DOĞRU ÖZDEMİR^a, Ümit KARAKAŞ^c, Mehmet Emin ERDAL^a

^aMersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Mersin, TÜRKİYE

^bMersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD, Mersin, TÜRKİYE

^cBayburt Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Bayburt, TÜRKİYE

ÖZET Amaç: Embriyonik gelişim sürecinde hücrelerde apoptotik denge bozulması gebelik kayıplarına neden olabilmektedir. Bu çalışmada, nedeni belirlenemeyen tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) ile apoptotik uyarıcı ölüm reseptörü-4 [death receptor-4 (DR-4)] geni polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırıldı. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada, TGK tanısı almış 70 kadın ve kontrol grubu olarak 70 kadından genomik DNA elde edildi. Her 2 gruptaki DR-4 geni 3. ekzonundaki rs6557634 G422A, 4. ekzonundaki rs20575 C626G ve 5. ekzonundaki rs20576 A683C polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu-kısıtlayıcı enzim kesimi fragman uzunluk polimorfizmi yöntemi kullanılarak belirlendi. **Bulgular:** DR-4'nin ekstrasellüler kısmında TRAIL ligand bağlanma bölgesindeki 209. kodonda treoninin arginine değişimi ile sonuçlanan ekzon 4'teki bir missense değişim olan C626G polimorfizminin görülme sıklığının, TGK hastalarında kontrol grubuna göre arttığı saptandı. Araştırılan ekzon 3 ve ekzon 5 polimorfizmleri için TGK ve kontrol grubu arasında istatistiksel fark gözlenmedi. **Sonuç:** TGK hastalarında saptadığımız DR-4 genindeki missense ekzon 4 polimorfizminin, embriyonik gelişim sürecinde embriyona uterusu invazyonu ve immünolojik toleransındaki apoptotik denge bozulması yoluyla, gebelik kayıplarına neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz; tekrarlayan gebelik kaybı; TRAIL; ölüm reseptörü-4; polimorfizm

ABSTRACT Objective: Disruption of apoptotic balance in cells during embryonic development can lead to pregnancy losses. In this study, the relationship between unexplained recurrent pregnancy loss (RPL) and apoptotic inducing death receptor-4 (DR-4) gene polymorphisms was investigated. **Material and Methods:** In this study, genomic DNA was obtained from 70 women diagnosed with RPL and 70 women as a control group. The polymorphisms of rs6557634 G422A in the 3rd exon of the DR-4 gene, rs20575 C626G in the 4th exon and rs20576 A683C in the 5th exon were determined in both groups using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. **Results:** It was determined that the incidence of C626G polymorphism, which is a missense variant in exon 4 resulting in the change of threonine to arginine in the 209th codone in the extracellular TRAIL ligand binding domain of DR-4, increased in RPL cases compared to the controls. For the investigated exon 3 and exon 5 polymorphisms, no statistical difference was observed between the RPL and the control group. **Conclusion:** We conclude that the missense exon 4 polymorphism in the DR-4 gene, which we detected in patients with RPL, may cause pregnancy losses through the invasion of the embryo to the uterus during embryonic development and the disruption of the apoptotic balance in its immunological tolerance.

Keywords: Apoptosis; recurrent pregnancy loss; TRAIL; death receptor-4; polymorphism

Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %1-2'sini etkileyen tekrarlayan gebelik kayıplarının (TGK) nedenleri; endokrin sistem, anatomik yapı, immünolojik reaksiyon, enfeksiyöz ve trombofilik durumlar, çevresel ve genetik faktörler olarak sıralanabilir. TGK

hastaları, son yıllarda genetik ve moleküler birçok araştırmaya konu olmaktadır. Olguların %30'unda saptanan kromozomal sayısal ve yapısal anomalileri, genetik etkenlerin ilk sırasında yer almaktadır. Kromozomal değişimlerin yanı sıra hemoglobinopati,

Correspondence: Mustafa Ertan AY

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Mersin, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: ertanay@mersin.edu.tr

Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

Received: 07 Apr 2021

Received in revised form: 17 Jun 2021

Accepted: 22 Aug 2021

Available online: 26 Aug 2021

2146-9040 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



alfa talasemi gibi bazı hematolojik tek gen hastalıklarında da TKG görülebilmektedir.^{1,2} Bununla birlikte TKG'nin moleküler ve genetik temeli henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Gametogenezden başlayarak, embriyonik ve fetal gelişim basamaklarındaki tüm hücrel ve metabolik süreçlerin işleyişinin ve kontrol mekanizmalarının moleküler düzeyde aydınlatılmasına gereksinim vardır. Çünkü bilinen tüm bu etkenlere rağmen TKG'lerin yaklaşık %50'sinde etken tanımlanamamakta ve nedeni tanımlanamayan TKG olarak sınıflandırılmaktadır.³⁻⁵ Bununla birlikte yıllar boyunca nedeni tanımlanamayan TKG etiyojisinde yer alabilecek birçok risk faktörü ve bunlara bağlı tedavi seçenekleri tanımlanmış ve eleştirilmiştir. Ancak TKG için risk faktörleri ve tedavi seçenekleri konusunda birçok belirsizlik hâlen devam etmektedir.⁶

Programlanmış hücrel ölüm mekanizması olan apoptoz çok hücreli organizmaların gelişimi ve hücrel farklılaşması sırasında meydana gelen ve özgül genler tarafından düzenlenen, fizyolojik bir olaydır ve hücrenin kendini yok etmesi ile sonuçlanır.⁷ DNA hasarı gibi patofizyolojik koşullar ve oksidatif stres durumunda, hücre içi ve dışı sinyaller aracılığıyla aktive edilen apoptotik genler aracılığıyla düzenlenir.⁸ Apoptotik genler; efektör, uyarıcı (aktivatör) ve basıklayıcı (negatif düzenleyici) genlerdir. Apoptozun uyarılmasında işlevsel olan birçok hücrel ligand ve bunların bağlandığı spesifik reseptörler tanımlanmıştır. Bu uyarıların en önemlilerden biri tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi üyesi bir ligand olan TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligandır [TNF-related apoptozis-inducing ligand (TRAIL)]. TRAIL'in hücrel reseptörleri ise ölüm reseptörü-4 [death receptor-4 (DR-4), TRAIL-R1] ve DR-5'tir (TRAIL-R2). TNF reseptör süper ailesi 10A'nın (TNFRSF10A) bir üyesi olan DR-4; TRAIL reseptörü 1 (TRAILR1) olarak da bilinir.^{9,10}

Kromozom 8p21-22'de lokalize bir gen tarafından kodlanan transmembran bir protein olan DR-4'ün ekstraselüler ligand bağlanma, transmembran ve intraselüler bölgeleri (death domain) vardır. TRAIL'in DR-4'e bağlanması, reseptörün trimerizasyonu ile sonuçlanır. Trimerik reseptörün intraselüler domainine bir apoptotik adaptör molekül olan Fas ilişkili ölüm bölgesi [Fas associated death domain (FADD)] bağlanarak, prokaspaz 8 veya 10 üzerinden apoptotik

kaspaz yolunun uyarılmasını sağlar. Oluşan trimerik reseptör, FADD ve kaspaz yapısı ölümü uyarıcı sinyal kompleksi [death inducing signaling complex (DISC)] olarak adlandırılmaktadır. DISC'nin oluşumu sonrası kaspaz yolu aktivasyonu ile hücrenin apoptoza girmesi gerçekleşmektedir. DR-4, bu işlevi ile apoptozun uyarılmasında önemli ve anahtar bir role sahiptir.¹¹

Apoptoz, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofiler, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli süreçlerde yer alan önemli bir hücrel olaydır. Apoptozdaki değişimler (hücrelerde apoptoz oranının azalması veya artması), nörodegeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün bozukluklar ve birçok kanser türü dâhil olmak üzere birçok insan hastalığında önemli bir etiyojik faktördür.¹² Normal doku gelişiminde olduğu kadar sorunsuz bir gebelik için de fetal hücre çoğalması ve apoptoz arasında bir denge olması gerekir. Bu dengenin bozulmasının gebelik kayıplarına neden olabileceği düşünülebilir. Li ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, TKG hastalarının desiduasında DR-4 ligandı olan TRAIL-R1'in yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir. Bu durum, kaspaz 3'e bağımlı olarak yürütülen TNF ilişkili apoptozun, gebeliğin devamı ya da sonlanması arasındaki denge mekanizmasında etkili olduğunu düşündürmektedir.¹³

Bu bilgiler doğrultusunda, apoptotik mekanizmalardaki değişimlerin TKG'lerde etiopatolojik bir faktör olarak düşünülebilir. TKG'ye neden olabilecek apoptotik değişimlerin saptanması yeni tanısal belirteçlerin, koruyucu uygulamaların ya da tedaviye yönelik stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Bu çalışmada, nedeni belirlenemeyen TKG hastalarında apoptozun uyarılmasında etkin olan TRAIL'in reseptörlerinden DR-4'ün ekstraselüler bölgesini kodlayan 3. ekzonundaki rs6557634 G422A (His141Arg), ligand bağlanma bölgesini kodlayan 4. ekzonundaki rs20575 C626G (Thr209Arg) ve ekstraselüler iyi korunmuş sistein bakımından zengin bölgeyi kodlayan 5. ekzonundaki rs20576 A683C (Glu228Ala) polimorfizmleri, hasta ve kontrol gruplarında araştırıldı.^{14,15} Çalışmamıza konu olan her 3 polimorfizm de NCBI SNP veri tabanına göre DR-4 geninin kodlanan bölgesinde bulunduğu için protein

işlevini değiştirebilecek “missense varyasyon” olarak tanımlanmaktadır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Araştırılan polimorfizmlerin gen üzerindeki yerleşimlerinin kritik bölgelerde olmasından dolayı protein yapı ve işlevini değiştirebilme olasılığı yüksektir. Bu nedenle elde ettiğimiz verilerin, TKG etiyojindeki apoptotik mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 16.01.2009 tarihli 2009/5 sayılı karar ile onaylanmıştır. Çalışmaya katılan tüm bireylerden bilgilendirilmiş onay alınmıştır. Çalışma, Helsinki Deklarasyonu Prensipleri’ne uygun olarak planlanmış ve yürütülmüştür.

HASTA VE KONTROL GRUBU

Hasta grubuna Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD’de TKG tanısı almış gebe olmayan 70 kadın dâhil edildi. Tüm hastalarda bilinen diğer gebelik kayıp nedenleri, histerosalpingografi (hysterosalpingography) veya sonohisterografi (sonohysterography), parental sitogenetik karyotip analizi, antikardiyolipin antikor [immünglobulin G (IgG) ve IgM] ölçümleri, lupus antikoagülant ve tiroid stimulan hormon (TSH) vb. düzeyleri gösterilerek, öyküsünde TKG için kromozomal, anatomik, metabolik, hormonal, enfeksiyöz, otoimmün ve trombofilik nedenler olan bireyler hasta grubundan dışlandı. Hasta grubunun ortalama yaşı 29,04 yıl, ortalama gebelik kaybı sayısı 3.275’tir (minimum=2, maksimum=8, SD=1,4841). Hastaların 42’si (%60) primer TKG olgusu olup, ortalama gebelik kayıp sayısı 3.195’tir (SD=1,5687). Sekonder

TKG olgu sayısı ise 28 (%40) olup, bu gruptaki ortalama gebelik kayıp sayısı 3.393’tür (SD=1,3700).

Kontrol grubuna ise TKG öyküsü olmayan multi-par, çalışma anında gebe olmayan 70 kadın birey dâhil edildi. Her 2 grupta da hamilelik öncesinde veya sırasında kronik hastalığı olanlar, eş zamanlı tıbbi komplikasyonları olanlar, sigara, alkol veya herhangi bir uyuşturucu madde kullanıcısı olan kadınlar çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubunu oluşturan kadınların yaş ortalaması 30,88’dir. Çalışmaya dâhil olan tüm bireylerden, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere 7-8 mL venöz kan örneği alındı.

DNA ELDESİ, POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Genotiplendirme için genomik DNA eldesi kan örneklerinden klasik tuz ile çöktürme yöntemiyle gerçekleştirildi. DR-4 ekzon 3, 4, 5 polimorfizmlerinin saptanması için polimeraz zincir reaksiyonu-kısıtlayıcı enzim kesimi fragman uzunluk polimorfizmi [polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)] analizi kullanıldı. Tüm PCR çalışmaları 25 µL toplam reaksiyon hacmi içerisinde 10X PCR buffer (w/o MgCl₂), 1,5 mM MgCl₂, her bir primerden 20 pmol, 100 µM dNTPs, 1 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Litvanya) ve 100 ng kalıp DNA ile Thermal Cycler (Techne Flexigene, Cambridge, Birleşik Krallık) cihazında gerçekleştirildi. PCR koşulları; başlangıç denaturasyon için 2 dk/96°C, daha sonra toplam 35 döngüde denaturasyon için 1,5 dk/96°C, primer bağlanması için ekzon 3, ekzon 4 ve ekzon 5 için sırasıyla 1,5 dk/58°C, 59°C, 65°C ve uzama için 5 dk/72°C, son uzama içinse 7 dk/72°C’dir. Primer dizileri ve PCR ürün uzunlukları [Tablo 1](#)’de verilmektedir.

TABLO 1: DR-4 geni için kullanılan PCR primer dizileri ve ürün büyüklükleri.

DR-4 polimorfizmi	rs no*	Primer Dizisi	PCR ürünü
Ekzon 3 G422A	rs6557634	F: 5'-ATCCTCTGGGAACCTCTGTGG-3' R: 5'-TACCACTCCCACCTTCACTGC-3'	230 bp
Ekzon 4 C626G	rs20575	F: 5'-GGTGGTGAGGAAAGGTCAAG-3' R: 5'-ATGGGGTCAGGGCTGATAG-3'	220 bp
Ekzon 5 A683C	rs20576	F: 5'-CCCCTGCAGATACGAGGAG-3' R: 5'-CAGAAAAGACAGGAGTCTCG-3'	201 bp

*<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>; DR-4: Ölüm reseptörü-4; PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

GENOTİPLENDİRME

Elde edilen *DR-4* ekzon 3, 4 ve 5 PCR ürünleri sırasıyla BseGI (FokI), AclI (DraIII), TaqI (MBI Fermentas) restriksiyon enzimleri ile kesildi. Oluşan restriksiyon enzim kesim fragmanları 120 V akımda 40-50 dk %3,5 agaroz jelde elektroforetik olarak ayrıldı. Elektroforez işleminde her bir jel kuyusu için 100 bp marker (Thermo Fisher Scientific, Litvanya) uzunluk standardı olarak kullanıldı. Elektroforez jeli ultraviyole ışık ile Gel Electrophoresis Visualizing System (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak görüntülendi. Jel görüntüleri vaka/kontrol ayrımının farkında olmayan 2 yorumcu tarafından bağımsız olarak restriksiyon enzim kesim fragmanlarının uzunluklarına (RFLP) göre okunarak genotip analizi gerçekleştirildi.

***DR-4* Ekzon 3 rs6557634 G422A (His141Arg) Polimorfizminin Genotiplendirmesi**

DR-4 ekzon 3 PCR ürünleri (230 bp), 10 U BseGI restriksiyon endonükleaz ile 5 saat 55 °C'de 1XBuffer Tango (10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 mg/mL BSA) içinde kesildi. BseGI restriksiyon kesim sonuçlarına göre *DR-4* ekzon 3 G422A için; 230 bp fragman GG (yabanıl tip), 230, 160 ve 70 bp fragmanlar GA (heterozigot), 160 ve 70 bp fragmanlar AA (mutant tip) olarak genotiplendirildi.

***DR-4* Ekzon 4 rs20575 C626A (Thr209Arg) Polimorfizminin Genotiplendirmesi**

220 bp'lik *DR-4* ekzon 4 PCR ürünleri, 10 U AclI restriksiyon endonükleaz ile 1XBuffer G (0,1 mg/mL BSA) içinde 37 °C'de 1 gece bekletilerek kesildi. Ekzon 4 C626G için 164 ve 56 bp fragmanlar CC (yabanıl tip), 220, 164 ve bp fragmanlar CG (heterozigot), 220 bp'lik fragman GG (mutant tip) olarak değerlendirildi.

***DR-4* Ekzon 5 rs20576 A683C (Glu228Ala) Polimorfizminin Genotiplendirmesi**

PCR sonrası elde edilen 201 bp'lik *DR-4* ekzon 5 ürünleri 10 U TaqI restriksiyon endonükleaz ile 1XBuffer Taq içinde 5 saat 65°C'de bekletilerek kesildi. Elde edilen kesim fragmanlarının büyüklüklerine göre genotiplendirme yapıldı. Sırasıyla 110 bp/91 bp, 210 bp/110 bp/91 bp, ve 210 bp'lik ürünler; AA (yabanıl tip), AC (heterozigot) ve CC (mutant tip) olarak genotiplendirildi.

DR-4 geni ekzon 3, 4, 5 için uygulanan PCR-RFLP genotiplendirme örnekleri Şekil 1'de verilmektedir.

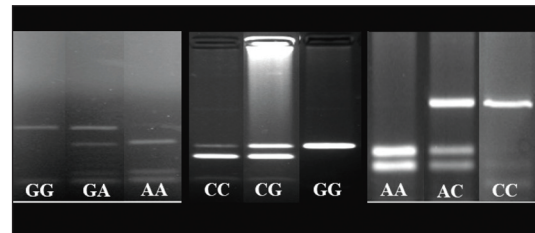
İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Veriler, Windows sürüm 13.0 için SPSS (SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi. Hasta ve kontrol grupları yaş bakımından independent samples t-test, genotip frekansları ise Hardy-Weinberg dengesi dikkate alınarak ki-kare testi ile incelendi. Güven aralığı %95 olarak seçildi. Kategorik değişken olarak genotip frekansı ve yüzde değerler kullanıldı. $p < 0,05$ için ise sonuçlar anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hasta ve kontrol grupları arasında yaş bakımından fark olmadığı gösterildi ($p=0,180$). *DR-4* geninin 3. ekzonundaki G422A polimorfizmi için yapılan genotiplendirme sonucunda, proteinin ekstraselüler kısmında 141. kodonda arginin amino asidinin, histidin amino asidine değişimine (missense değişim) yol açan G/A polimorfizmi, hasta grubunun %30'unda kontrol grubunun ise %24,3'ünde saptandı. Kontrol ve hasta gruplarının ekzon 3 G422A polimorfizmi açısından Hardy-Weinberg dengesinde olduğu belirlendi (kontrol grubu için $p=0,220$, hasta grubu için $p=0,933$). Yapılan istatistiksel inceleme sonucunda, *DR-4* ekzon 3 G422A polimorfizmi ile TGK arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0,673$) (Tablo 2).

Ekzon 4 için yapılan genotipleme sonucunda kontrol ve hasta gruplarının incelenen ekzon 4 C626G polimorfizmi için Hardy-Weinberg denge-



ŞEKİL 1: *DR-4* geni ekzon 3 G422A, ekzon 4 C626G ve ekzon 5 A683C polimorfizmi için PCR-RFLP ile saptanan genotipler. Her bir genotip için RFLP fragman uzunlukları metin içinde verilmiştir. Y: Yabanıl; H: Heterozigot; M: Mutant; PCR-RFLP: Polimeraz zincir reaksiyonu-kısıtlayıcı enzim kesimi fragman uzunluk polimorfizmi.

TABLO 2: TRAIL DR-4 geninde saptanan genotip frekansları.

Genotip	Hasta (n%)	Kontrol (n%)	p değeri
DR-4 ekzon 3 G422A			
GG (yabani)	13/18,6	14/20	p=0,673
GA (heterozigot)	40/57,1	25/50	p> 0,05
AA (mutant)	17/24,3	21/30	p=0,673
DR-4 ekzon 4 C626G			
CC (yabani)	11/12,9	9/15,7	p>0,05
CG (heterozigot)	19/27,1	36/51,4	p=0,002
GG (mutant)	40/57,1	25/35,7	p=0,009
DR-4 ekzon 5 A683C			
AA (yabani)	38/54,3	46/65,7	p>0,05
AC (heterozigot)	30/42,9	22/31,4	p=0,368
CC (mutant)	2/2,9	2/2,9	p>0,05

*<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>; DR-4: Ölüm reseptörü-4; PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

sinde olduğu saptandı (kontrol grubu için p=0,476, hasta grubu için p=0,225). DR-4 geni 626. nükleotidde, DR-4'ün ekstraselüler kısmında 209. kodonda treoninin, arginine değişimi (Thr209Arg) ile sonuçlanan bir missense değişim olan C/G dönüşümü hem kontrol hem de hasta grubunda saptandı. Hasta grubunda polimorfik GG genotipinin görülme oranının (%57,1) (40/70), kontrol grubuna göre (%35,7) (25/70), istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterildi (p=0,009). Ayrıca kontrol grubunda; heterozigot CG genotipinin görülme oranı (%51,4) (36/70), hasta grubuna göre (%27,1) (19/70) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı (p=0,002). Yabani tip CC genotip frekansı bakımından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel fark gözlenmedi (p=0,629). Sonuç olarak ekzon 4 C626G polimorfizmi ile TGK arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Tablo 2).

DR-4 geni ekzon 5 A683C polimorfizmi (Glu228Ala) için kontrol ve hasta gruplarının Hardy-Weinberg dengesinde olduğu saptandı (kontrol grubu için p=0,166, hasta grubu için p=0,743). Yapılan istatistiksel incelemeye göre ekzon 5 A683C polimorfizmi için AA (yabani tip), AC (heterozigot) ve CC (mutant) genotipleri için TGK ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,368) (Tablo 2).

TARTIŞMA

Olguların %50'sinde etken saptanamadığından TGK etiyojik ve prognostik faktör belirlenmesinde en yetersiz kalınan obstetrik sorunlardan biridir.^{5,16} İster sporadik isterse habituel olsun, beklenen bir bebeğin kaybı, çocuk sahibi olmak isteyen aileler için oldukça sıkıntılı ve üzücü bir durum olmakla birlikte klinik araştırmalar sorunun nedenini çok nadir ortaya koyabilmektedir.¹⁷ Son yıllarda TGK'ye neden olabilecek birçok hüresel/genetik mekanizma üzerinde araştırmalar yoğunlaşmış olsa da diğer etiyojik nedenler de dâhil edildiğinde olguların yarısından fazlasının nedeni hâlâ açıklanabilmiş değildir. Bu araştırmanın amacı, klinik tüm olası TGK nedenleri dışlandıktan sonra hâlâ nedeni açıklanamayan TGK olgularında, apoptotik mekanizmalarda uyarıcı olarak görevli TRAIL ligandının bağlandığı DR-4 reseptörünü kodlayan gendeki polimorfizmlerin, TGK olguları üzerinde etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

Gebelik sürecindeki apoptoz; farklı organ ve dokularda nonfonksiyonel hücrelerin yok edilmesi ve yeni hücrelerin oluşturulması arasındaki denge için önemlidir. Bu dengenin her 2 yönden de bozulması, gebelik kayıplarının nedeni olabilir. Ancak TGK'de apoptotik mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalara, literatürde kısıtlı sayıda rastlanmaktadır. Apoptoz ile ilişkili proinflatuar bir sitokin olan TNF süper ailesi ligandlarının ve reseptörlerinin, insan plasentasında ifade edildiği ve programlanmış veya aktive edilmiş hücre ölümüne katkıda bulunduğu Phillips ve ark. tarafından gösterilmiştir.¹⁸ Keogh ve ark., gebelik sırasında uterin spiral arterlerinin yeniden düzenlenmesinde endotelial ve düz kas hücrelerinin kaybının altında yatan mekanizmanın TRAIL tarafından tetiklenen apoptozis ile ilişkili olduğunu gösterdiler.¹⁹ Apoptoz ve TRAIL'in gebelik sürecindeki etkileri tanımlanmış olmakla birlikte TGK hastalarında DR-4 gen polimorfizmlerinin etkilerinin araştırıldığı çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. TRAIL ve reseptörleri apoptotik mekanizmalarda önemli işlevlere sahip olduğundan araştırmalar daha çok kanser olguları üzerinde yoğunlaşmaktadır. Araştırmamıza konu olan 3 DR-4 geni polimorfizminin, Hindu popülasyonunda safra kesesi kanseri gelişiminde risk faktörü olduğu tanımlanmıştır. Bu riskin, apoptozun azalması

yönünde etki oluşturduğu araştırmacılar tarafından belirtilmektedir.²⁰ Hepatoselüler karsinoma hastalarında yapılan bir çalışmada ise *DR-4* C626G ve A683C polimorfizmlerinin kanser gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu saptandı.²¹ Akciğer kanseri hastalarında *DR-4* ekzon 3 G422A polimorfizmi hastalıkla ilişkilendirilirken, over kanserli hastalarda bu polimorfizm ile hastalık arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır.^{22,23} Meme, akciğer, kolorektal ve kemik (osteosarkom) kanserleri ile ekzon 4 C626G polimorfizmi arasında ilişki gösterilmişken, over kanseri ile bu polimorfizm arasında bir ilişki saptanmamıştır.²²⁻²⁶ Ekzon 5 A683C polimorfizmi prostat kanseri ve meme kanseri için önemli bir risk faktörüdür.^{23,27} Chen ve ark.nın metaanalizine göre *DR-4* genine ait C626G polimorfizminin ve A1322G G alleli ile A683C C allelinin birçok kanser tipi için risk faktörü olduğu tanımlanmıştır. Bu çalışmada, özellikle C626G polimorfizmi için heterozigot genotipin (CG genotipi) kontrol gruplarında hastalara göre önemli derecede yüksek olduğu ve bunun azalmış kanser riski ile ilişkili olabileceği istatistiksel olarak gösterilmiştir.²⁸ Literatürde, her ne kadar çelişkili sonuçlar da olsa birçok hastalığın etiolojisinde *DR-4* genindeki yapısal değişimlerin yer aldığı görülmektedir. Ancak TKG hastalarında *DR-4* geni polimorfizmlerinin etkileri hâlâ belirsizliğini korumaktadır.

Araştırma sonuçlarımıza göre TKG hastalarında kontrol grubuna göre apoptotik mekanizmada önemli bir düzenleyici reseptör gen olan *DR-4*'ün ekzon 3 G422A ve ekzon 5 A683C polimorfizmleri için istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmazken, *DR-4* ekzon 4 C626G (rs20575) polimorfik (GG) genotipinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı. Elde edilen bu veri, özellikle kanser olgularında bozulmuş apoptozla ilişkilendirilen araştırma sonuçları ile uyumludur. Yine ekzon 4 için kontrol grubumuzda saptanan heterozigot CG genotip sıklığının yüksek oluşu Chen ve ark.nın metaanaliz sonuçlarıyla uyumludur.²⁸ Polimorfik varyasyon saptadığımız TKG hastalarında, *DR-4* reseptörünün ekstraselüler ligand bağlanma bölgesini kodlayan ekzon 4 polimorfizminin, reseptörün liganda bağlanmasında işlev bozukluğuna neden olabileceğini, böylece anne adaylarında apoptotik mekanizmanın, beklenen normal fizyolojik işlev/işlevlerinin kaybı ile

gebeliğin kaybı yönünde katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Saptanan reseptör polimorfizminin ligandın bağlanma afinitesini artırması, apoptozun fizyolojik düzeyden daha yüksek oranda artmasına, ligandın bağlanma afinitesinin azalması ise apoptozun uyarılamaması yönünde etki ortaya koyabilir. Her 2 durumda da gebeliğin normal bir şekilde devamını olumsuz yönde etkileyerek, gebelik kayıplarına neden olabilecek etkiye sahip olabilir. Bu nedenle elde ettiğimiz veriler, TKG etiolojisinin belirlenmesine katkı sunabileceği gibi yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine de katkı sağlayabilir.

Araştırmamıza dâhil edilen hasta ve kontrol gruplarının birey sayılarının yeterliği, çalışmanın etkinliği açısından "power analiz" ile istatistiksel olarak çalışma öncesinde test edilmiştir (data verilmemiştir). Bununla birlikte elde ettiğimiz sonuçların, daha büyük hasta ve kontrol gruplarında teyit edilmesi gerekir. Aynı zamanda, polimorfizm durumunda etkilenmesi düşünülen ileri yöndeki apoptotik mekanizmaların araştırılması, *DR-4* gen polimorfizmlerinin TKG etiolojisindeki yerinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır.

SONUÇ

DR-4 hücrelerde apoptozun uyarılmasından sorumlu reseptördür. TRAIL'in bağlanması ile aktive edilir ve hücreler apoptoza girer. Embriyonik gelişim sırasında fetal hücrelerdeki anormal apoptoz gebelik kayıp nedenleri arasındadır. Araştırmamızda, TKG hastalarının *DR-4* geninde polimorfizm/nükleotid değişimi saptadık. Bu değişim, reseptörün ligand bağlanma bölgesinde, apoptotik yollarda anormalliğe neden olabilecek yapısal bir değişimdir. Saptanan nükleotid değişiminin gebelik kayıplarıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Teşekkür

İstatistiksel analizleri yapan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Biyoinformatik ABD'ye ve çalışmaya katılmayı kabul eden hasta ve kontrol grubundaki bireylere katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma

ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Mustafa Ertan Ay, Sevinç Sürer Tekin; **Tasarım:** Mustafa Ertan Ay, Sevinç Sürer, Özlem İzci Ay, **Denetleme/Danışmanlık:** Mustafa Ertan Ay, Mehmet Emin Erdal; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Hüseyin Durukan; **Analiz ve/veya Yorum:** Sevinç Sürer Tekin, Gurbet Doğru, Kenan Çevik, Ümit Karakaş; **Makalenin Yazımı:** Mustafa Ertan Ay, Sevinç Sürer Tekin; **Eleştirel İnceleme:** Özlem İzci Ay, Mehmet Emin Erdal.

KAYNAKLAR

- Wapner RJ, Lewis D. Genetics and metabolic causes of stillbirth. *Semin Perinatol.* 2002; 26(1):70-4. [Crossref] [PubMed]
- ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, Middeldorp S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open.* 2018;2018(2):hoy004. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briët E, Berntorp E, Conard J, et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet.* 1996;348(9032):913-6. [Crossref] [PubMed]
- Lee RM, Silver RM. Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Semin Reprod Med.* 2000;18(4):433-40. [Crossref] [PubMed]
- Hong Li Y, Marren A. Recurrent pregnancy loss: A summary of international evidence-based guidelines and practice. *Aust J Gen Pract.* 2018;47(7):432-6. [Crossref] [PubMed]
- Youssef A, Vermeulen N, Lashley EELO, Goddijn M, van der Hoorn MLP. Comparison and appraisal of (inter)national recurrent pregnancy loss guidelines. *Reprod Biomed Online.* 2019;39(3):497-503. [Crossref] [PubMed]
- Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:533-73. [Crossref] [PubMed]
- Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors.* 1998;8(1-2):1-5. [Crossref] [PubMed]
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science.* 1997;276 (5309):111-3. [Crossref] [PubMed]
- Jiang Y, Wen T, Yan R, Kim SR, Stowell SR, Wang W, et al. O-glycans on death receptors in cells modulate their sensitivity to TRAIL-induced apoptosis through affecting on their stability and oligomerization. *FASEB J.* 2020;34(9):11786-801. [Crossref] [PubMed]
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995;81(4):495-504. [Crossref] [PubMed]
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Li C, Zhang X, Kang X, Chen C, Guo F, Wang Q, et al. Upregulated TRAIL and reduced DcR2 mediate apoptosis of decidual PMN-MDSC in unexplained recurrent pregnancy loss. *Front Immunol.* 2020;11:1345. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Isi H, Erdal ME, Akdeniz S, Oral D, İzci Ay Ö, Tekes S, et al. The Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) gene-308 G/A polymorphism and The Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) gene polymorphisms in Behcet's Disease. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2010;24(3):2014-19. [Crossref]
- Sandoughi M, Salimi S, Shahraki-Ghadimi H, Saravani M. The impact of TRAIL (C1595T and G1525A) and DR4 (rs20576) gene polymorphisms on systemic lupus erythematosus. *Biochem Genet.* 2020;58(4):649-59. [Crossref] [PubMed]
- Saravelos SH, Regan L. Unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2014;41(1):157-66. [Crossref] [PubMed]
- Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189(2): 397-400; discussion 400-2. [Crossref] [PubMed]
- Phillips TA, Ni J, Hunt JS. Death-inducing tumour necrosis factor (TNF) superfamily ligands and receptors are transcribed in human placenta, cytotrophoblasts, placental macro phages and placental cell lines. *Placenta.* 2001;22(8-9):663-72. [Crossref] [PubMed]
- Keogh RJ, Harris LK, Freeman A, Baker PN, Aplin JD, Whitley GS, et al. Fetal-derived trophoblast use the apoptotic cytokine tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand to induce smooth muscle cell death. *Circ Res.* 2007;100(6):834-41. [Crossref] [PubMed]
- Rai R, Sharma KL, Sharma S, Misra S, Kumar A, Mittal B. Death receptor (DR4) haplotypes are associated with increased susceptibility of gallbladder carcinoma in north Indian population. *PLoS One.* 2014;9(2):e90264. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Alsawalay NF, Darwish RK, Kamal MM, ElTaweel AE, Shousha HI, Elbaz TM. Evaluation of trail receptor 1 (DR4) polymorphisms C626G and A683C as risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Med Virol.* 2018;90(3): 490-6. [Crossref] [PubMed]
- Fisher MJ, Virmani AK, Wu L, Aplenc R, Harper JC, Powell SM, et al. Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6): 1688-97. [PubMed]
- Horak P, Pils D, Roessler M, Tomek S, Elandt K, Zeillinger R, et al. Common death receptor 4 (DR4) polymorphisms do not predispose to ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2005;97(2): 514-8. [Crossref] [PubMed]
- Frank B, Hemminki K, Shanmugam KS, Meindl A, Klaes R, Schmutzler RK, et al. Association of death receptor 4 haplotype 626C-683C with an increased breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2005;26(11):1975-7. [Crossref] [PubMed]
- Zahoor A, Mansoor Q, Farooqi AA, Fayyaz S, Naz G, Ismail M. Genetic variants in the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and death receptor (DR4) genes contribute to susceptibility to colorectal cancer in pakistani population. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2015;61(6):108-12. [PubMed]
- Dechant MJ, Fellenberg J, Scheuerpflug CG, Ewerbeck V, Debatin KM. Mutation analysis of the apoptotic "death-receptors" and the adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in osteosarcoma tumor samples and osteosarcoma cell lines. *Int J Cancer.* 2004;109(5):661-7. [Crossref] [PubMed]
- Langsenlehner T, Langsenlehner U, Renner W, Kapp KS, Krippel P, Hofmann G, et al. The Glu228Ala polymorphism in the ligand binding domain of death receptor 4 is associated with increased risk for prostate cancer metastases. *Prostate.* 2008;68(3):264-8. [Crossref] [PubMed]
- Chen B, Liu S, Wang XL, Xu W, Li Y, Zhao WH, et al. TRAIL-R1 polymorphisms and cancer susceptibility: an evidence-based meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2009;45(14): 2598-605. [Crossref] [PubMed]