

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

PERİ-İMLANTİF DÖNEM FARE
ENDOMETRİYUMUNDA FOXO1, FOXO3 VE FOXO4
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN
EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Dileyra ADIGÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017-ANTALYA

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

PERİ-İMLANTİF DÖNEM FARE
ENDOMETRİYUMUNDA FOXO1, FOXO3 VE FOXO4
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN
EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Dileyra ADIGÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2015-994 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 03/01/2017

Tez Danışmanı : Prof Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi

İmza

Üye : Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Nuray ACAR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Sinan ÖZKAVUKCU
Ankara Üniversitesi

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

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Narin. DERİN

ETİK BEYAN

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

Dileyra ADIGÜZEL

İmza

Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ

İmza

TEŐEKKÜR

Tez çalıŐmamın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. iler ÇELİK ÖZENCİ'ye,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına, asistan arkadaşlarıma ve çalıŐanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak, gece mesailerimde beni yalnız bırakmayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili kardeŐim GÖZDE ADIGÜZEL ve ailemin tüm üyelerine en içten saygı, sevgi ve teŐekkürlerimi sunuyorum.

Dileyra ADIGÜZEL

ÖZET

Amaç: Pre-implantif embriyo gelişimine paralel olarak, endometriyumun reseptif hale gelmesi gebeliğin gelişimi ve devam etmesindeki en kritik basamaklardandır. Bu çalışmada, hücre döngüsü, DNA tamiri, apoptoz ve hücre metabolizması gibi süreçlerde rolleri olduğu bilinen FoxO transkripsiyon faktörlerinin, fare peri-implantasyon sürecinde ekspre olup olmadığı; eğer oluyorsa, ekspresyonlarının hormon veya embriyonun varlığı ile ilişkili olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada; BALB/C ırkı 6-8 haftalık dişi fareler kullanılarak, herhangi bir gebeliğin söz konusu olmadığı östrus fazındaki ve gebeliğin 1, 4, 5, 6 ve 8. günlerine ait uterus kesitlerine immünohistokimya yöntemi uygulanarak FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonlarının varlığı ve lokalizasyonları belirlenmiştir. Ayrıca blastosistten ve varlığının oluşturacağı mekanik etkiden bağımsız olarak sadece hormonal ortamın taklit edildiği yalancı gebelik modelinde ve sadece blastosistin varlığının oluşturacağı mekanik etkinin taklit edilerek desidualizasyonun indüklendiği yapay desidualizasyon modelinde FoxO protein ekspresyonlarının nasıl bir değişim gösterdiği H-score analizleri ile değerlendirilerek, uygun istatistiksel analizler yapılmıştır.

Bulgular: FoxO proteinleri gebelik günlerine göre farklı lokalizasyon ve yoğunlukta nükleer/sitoplazmik ekspresyon göstermiştir. FoxO1'in gebeliğin 5. gününde ilk kez ortaya çıkan ve uterusun reseptif olduğu implantasyon anında endometriyum epitelinde ve bezlerdeki anlamlı ekspresyonu, FoxO3 ve FoxO4'ün ise gebeliğin 6 ve 8. günlerinde primer ve sekonder desidual alanlardaki belirgin ekspresyonları dikkat çekmiştir. Yapay desidualizasyon ve yalancı gebelik modellerindeki ekspresyonları değerlendirildiğinde; tüm proteinlerin ekspresyonlarının hormon ilişkili olduğu görülmekle birlikte, FoxO1 ve FoxO3'ün embriyonun varlığından bağımsız olarak ekspre edildiği, FoxO4 ekspresyonunun ise embriyo varlığı ile ilişkili olduğu görülmüştür.

Sonuç: Çalışmamızın bulguları erken gebelik sürecinde FoxO transkripsiyon faktörlerinin fare embriyo implantasyonunda, uterus reseptivitesi ve desidualizasyon süreçlerinde rolleri olabileceğini düşündürmüştü ve bu konuyla ilgili yeni çalışmaların planlanması için temel oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: fare, endometriyum, FoxO, implantasyon, peri-implantasyon

ABSTRACT

Objective: In parallel with pre-implantation embryo development, the formation of receptive endometrium is one of the most critical steps in development and continuation of pregnancy. The aim of this study was to investigate whether FoxO transcription factors that have important roles in cell cycle, DNA repair, apoptosis and cellular metabolism are expressed in mouse uterus during peri-implantation period, if so, whether their expressions are related pregnancy hormones and the presence of the embryo.

Method: In this study; using 6-8 weeks old BALB/C female mice, estrous phase and days 1–8 of pregnancy mouse uteri sections were obtained. Immunohistochemistry was performed for the evaluation of FoxO1, FoxO3 and FoxO4 proteins. In addition, pseudopregnancy and induced-decidualization for artificial decidualization models were performed. The expressions of all FoxOs in all groups were evaluated with H-score analysis and statistical analysis was performed.

Results FoxO proteins were expressed differentially with nuclear and/or cytoplasmic expressions during pregnancy. Interestingly, nuclear expression of FoxO1 in endometrial epithelium and glands on pregnancy day 5 when uterus receptive for implantation, FoxO3 and FoxO4 expressions were present in primer and secondary decidualization regions on days 6–8 of pregnancy respectively. When expressions of these proteins in pseudopregnancy and artificial decidualization models were evaluated, we found that their expressions seem to be related to steroid hormones. Besides, FoxO1 and FoxO3 expressions seems to be presence of the embryo Whereas FoxO4 expression seems to be related to presence of the embryo.

Conclusion: Our findings indicate that FoxO transcription factors are differentially expressed throughout early pregnancy and they may have important roles in mouse embryo implantation, uterus receptivity and decidualization processes.

Key words: mouse, endometrium, FoxO, implantation, peri-implantation

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Uterusun Embriyonik Gelişimi	5
2.2. İnsanda Uterus Histolojisi	6
2.3. İnsanda Uterusun Siklusa Bağlı Fizyolojik Değişimleri	8
2.3.1. Proliferatif Faz: Siklusun 5-14. günler arası	9
2.3.2. Sekretuar Faz: Siklusun 15-28. günler arası	9
2.4. Dişi Farede Genital Sistem Anatomisi	10
2.4.1. Ovaryum	11
2.4.2. Ovidukt	11
2.4.3. Uterus	11
2.4.4. Vajina ve Klitoris	12
2.5. Dişi Farede Üreme Fizyolojisi	12
2.6. Farelerde Uterus Histolojisi	14
2.7. İnsanda ve Farede Pre-İmplantif Embriyo Gelişimi	15
2.8. İnsanda ve Farelerde Uterus Reseptivitesi	16
2.9. Embriyo İmplantasyonu	17
2.9.1. İmplantasyon Tipleri	17
2.9.2. İmplantasyon Aşamaları	18
2.9.3. Peri-İmplantasyon Sürecinde Endometriyumdaki Hücresel Olaylar	19

2.10.	Forkhead Box O (FoxO) Transkripsiyon Faktörleri	21
2.10.1.	Forkhead Ailesi	21
2.10.2.	Forkhead Box O (FoxO) Alt Grubu	21
2.10.3.	PI3K/ AKT Sinyal Yolağı Tarafından FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Düzenlenmesi	22
2.10.4.	FoxO Transkripsiyon Faktörlerini Düzenleyen Diğer Üst Sinyal Yolları	25
2.10.5.	Foxo Transkripsiyon Faktörlerinin Post-Translasyonel Modifikasyonlarla Düzenlenmesi	26
2.10.6.	FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Hücredeki ve Organizmadaki Rollerini	29
2.10.7.	FoxO Transkripsiyon Faktörleri ve Endometriyum	31
2.10.8.	Çalışmamızın Çıkış Noktası	32
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1.	Grupların Oluşturulması	34
3.1.1.	Kontrol Östrus Grubunun Oluşturulması	34
3.1.2.	Normal Gebelik Gruplarının Oluşturulması	35
3.1.3.	Yalancı Gebelik Gruplarının Oluşturulması	38
3.1.4.	Yapay Desidualizasyon Gruplarının Oluşturulması	39
3.2.	Doku Takibi ve Parafin Gömme	40
3.3.	İmmünohistokimya	40
3.4.	Histolojik Skorlama (H-Score) Analizi	42
3.5.	İstatistiksel Analizler	42
4.	BULGULAR	43
4.1.	İmmünohistokimyasal Bulgular	43
4.1.1.	Peri-implantif Dönem Fare Endometriyumunda FoxO1 Protein Ekspresyonları	43
4.1.2.	Yalancı Gebelik Oluşturulmuş Fare Modeli Endometriyumunda FoxO1 Protein Ekspresyonları	48
4.1.3.	Yapay Desidualizasyon Oluşturulmuş Fare Endometriyumunda FoxO1 Protein Ekspresyonları	52

4.1.4.	Peri-implantif Dönem Fare Endometriyumunda FoxO3 Protein Ekspresyonları	56
4.1.5.	Yalancı Gebelik Oluşturulmuş Fare Modeli Endometriyumunda FoxO3 Protein Ekspresyonları	58
4.1.6.	Yapay Desidualizasyon Oluşturulmuş Fare Endometriyumunda FoxO3 Protein Ekspresyonları	60
4.1.7.	Peri-implantif Dönem Fare Endometriyumunda FoxO4 Protein Ekspresyonları	62
4.1.8.	Yalancı Gebelik Oluşturulmuş Fare Modeli Endometriyumunda FoxO4 Protein Ekspresyonları	65
4.1.9.	Yapay Desidualizasyon Oluşturulmuş Fare Endometriyumunda Foxo4 Protein Ekspresyonları	67
5.	TARTIŞMA	70
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	76
	KAYNAKLAR	78
	ÖZGEÇMİŞ	84

SİMGELER ve KISALTMALAR

Akt	:	Protein Kinaz B (PBK)
BTG1	:	B Hücresi Translokasyon Gen1
CBP	:	CREB-Bağlayıcı Protein
CK1	:	Kazein Kinaz 1
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DYRK	:	Çift Özgün Tirozin Fosforillenmiş ve Düzenlenmiş Kinaz
FH	:	Forkhead Domain
Fox	:	Fork Head Box
GADD45	:	DNA Hasarı ile İndüklenebilen Protein 45
G6Paz	:	Glikoz 6 Fosfataz
FSH	:	Folikül Sitümüle Edici Hormon
HAT	:	Histon asetil transferaz
IKK	:	I Kappa B Kinaz B
IRS	:	İnsülin Reseptör Substrat Proteini
JNK	:	Jun N-Terminal Kinaz
LH	:	Luteinizan Hormon
MnSOD	:	Manganez Süperoksit Dismutaz
NLS	:	Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz
PK1	:	3-Fosfoinositide Bağımlı Protein Kinaz 1
PIP2	:	Fosfatidilinositol (3,4) - Bifosfat
PI3K	:	Fosfatidilinositol (3,4,5) – Trisfosfata
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	:	Reseptör Tirozin Kinazlar
SGK	:	Serum ve Glukokortikoid İndüklenebilir Kinaz
Ser	:	Serin
SIRT1	:	Sirtuin1
Thr	:	Treonin
USP7	:	Ubikütin Spesifik Proteaz Deubikütilasyon Enzimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Paramezonefrik (Müller) kanalının gelişimi	5
Şekil 2.2.	Uterus ve tabakalarını gösteren çizim	7
Şekil 2.3.	Gonadotropinler ve ovaryan hormonlar aracılığı ile ovaryum ve uterus senkronizasyonu	8
Şekil 2.4.	Dişi farede genital sistem anatomisi	11
Şekil 2.5.	İnsanda ve farede preimplantif embriyo gelişim süreci	15
Şekil 2.6.	İnsan ve farede steroid hormonlar tarafından uterus reseptivitesinin düzenlenmesi	16
Şekil 2.7.	Memeli türünde blastosist ve uterus etkileşimleri temel alınarak tanımlanan implantasyon paternleri	18
Şekil 2.8.	Embriyo implantasyon aşamaları	19
Şekil 2.9.	Peri-implantasyon sürecindeki steroid hormon seviyeleri ve gebelik günlerine göre uterus enine kesitlerinin tanımlandığı diyagramlar	20
Şekil 2.10.	İnsülin ya da büyüme faktörlerinin varlığına bağlı olarak FoxO proteinlerinin inhibisyonu ve aktivasyonu	22
Şekil 2.11.	PI3K/ Akt sinyal yolağındaki PI3kinaz aktivasyonu	23
Şekil 2.12.	PI3K/ Akt sinyal yolağındaki Akt aktivasyonu	24
Şekil 2.13.	PI3K/ Akt sinyal yolağında, insülin ya da büyüme faktörleri tarafından FoxO'ların düzenlenmesi	24
Şekil 2.14.	Büyüme faktörleri ve stres koşullarına bağlı olarak kinaz kaskadları tarafından FoxO transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi	25
Şekil 2.15.	FoxO aktivitesinin fosforilasyon ile düzenlenmesi	27
Şekil 2.16.	FoxO'ların kinazlar tarafından fosforillenme bölgeleri	27
Şekil 2.17.	FoxO proteinlerinin asetilasyonu ve ubikütilasyonu	29
Şekil 2.18.	FoxO transkripsiyonları sonucu hücresel süreçteki rolleri	30
Şekil 3.1.	Dişi farelerde östrus siklusunun fazlarına göre değişen hücresel elemanlar	35

Şekil 3.2.	Östrus fazında olan fareye ait vajinal smear yayması	35
Şekil 3.3.	Dişi farelerde vajinal plak tespiti	36
Şekil 3.4.	Gebeliğin 1. günündeki 2 hücreli fare embriyo görüntüsü	36
Şekil 3.5.	Gebeliğin 4. gününde fare blastosist görüntüsü	37
Şekil 3.6.	Fare gebeliğinin 5. ve 6. günündeki implantasyon ve interimplantasyon alanları	37
Şekil 3.7.	Fare gebeliğinin 8. günündeki ilerlemiş implantasyon alanları	38
Şekil 3.8.	Yalancı gebelik günlerindeki uterus görüntüleri	39
Şekil 3.9.	Yapay desidualizasyon oluşturulan gruplarda uterus görüntüleri	40
Şekil 4.1.	Peri-implantif dönem gebeliğin 1,4,5,6, 8. günleri ve östrus fazı fare endometriyumunda FoxO1 protein ekspresyonu	44
Şekil 4.2.	Endometriyum lümen epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	45
Şekil 4.3.	Endometriyum bez epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	46
Şekil 4.4.	Endometriyum endotelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	47
Şekil 4.5.	Endometriyum stromasında FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	47
Şekil 4.6.	Yalancı gebelik oluşturulmuş fare modelinde gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO1 protein ekspresyonu	49
Şekil 4.7.	Endometriyum lümen epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	50
Şekil 4.8.	Endometriyum bez epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	50
Şekil 4.9.	Endometriyum endotelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	51
Şekil 4.10.	Yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modelinde 5, 6 ve 8. günlerdeki uteruslarda FoxO1 protein ekspresyonu	53
Şekil 4.11.	Endometriyum lümen epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	54

Şekil 4.12.	Endometriyum bez epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	55
Şekil 4.13.	Endometriyum endotelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	55
Şekil 4.14.	Peri-implantif dönem gebeliğin 1,4,5,6, 8. günleri ve östrus fazı fare endometriyumunda FoxO3 protein ekspresyonu	57
Şekil 4.15.	Endometriyum stromasında FoxO3 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	58
Şekil 4.16.	Yalancı gebelik oluşturulmuş fare modelinde gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO3 protein ekspresyonu	59
Şekil 4.17.	Endometriyum stromasında FoxO3 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	60
Şekil 4.18.	Yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modelinde 5, 6 ve 8. günlerdeki uteruslarda FoxO3 protein ekspresyonu	61
Şekil 4.19.	Endometriyum stromasında FoxO3 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	62
Şekil 4.20.	Peri-implantif dönem gebeliğin 1,4,5,6, 8. günleri ve östrus fazı fare endometriyumunda FoxO4 protein ekspresyonu	64
Şekil 4.21.	Endometriyum stromasında FoxO4 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	65
Şekil 4.22.	Yalancı gebelik oluşturulmuş fare modelinde gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO4 protein ekspresyonu	66
Şekil 4.23.	Endometriyum stromasında FoxO4 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	67
Şekil 4.24.	Yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modelinde 5, 6 ve 8. günlerdeki uteruslarda FoxO4 protein ekspresyonu	68
Şekil 4.25.	Endometriyum stromasında FoxO4 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi	69

TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa
3.1.	İmmünohistokimya analizlerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyon oranları	42

1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Memelilerde gebeliğin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için; fertilizasyondan sonra pre-implantif dönemde embriyo gelişimi, implantasyon ve desidualizasyonun doğru biçimde gerçekleşmesi gerekmektedir. Pre-implantif embriyo gelişimi ve bu sırada endometriyumun reseptif hale gelmesi, implantasyon ve gebeliğin devam etmesinde en kritik basamaklardan biridir. Uterusun endometriyumuna, gelişimini sağlıklı bir şekilde tamamlamış embriyo ancak endometriyum reseptif hale geldiği zaman implante olabilmektedir (Cha ve ark. 2012). Uterus reseptivitesi; embriyonun implantasyonuna izin veren sınırlı bir zaman dilimi olarak tanımlanmaktadır (Tu ve ark. 2014).

Sözü edilen tüm bu olaylar temel alındığında, embriyo implantasyonu için açılan bir pencere olan endometriyumun reseptif hale geçmesi ve devamında maternal endometriyuma tamamen gömülme süreci peri-implantasyon dönemi olarak isimlendirilmektedir. Bu süreç maternal ovaryan steroid hormonları kontrolünde ilerlerken diğer yandan hücresel düzeyde pek çok sinyal yolağı tarafından düzenlenen karmaşık moleküller serisi, embriyo ve maternal endometriyumun karşılıklı konuşmasını sağlamaktadır (Daftary ve Taylor 2001, Cha ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2013).

Peri-implantasyon sürecinde büyümeyi ve gelişmeyi destekleyen pek çok sinyal yolağı ve o sinyal yolağında görev alan moleküllerin rolleri yapılan çalışmalar ile aydınlatılmaktadır. PI3K/Akt büyümeyi ve gelişmeyi destekleyen sinyal yolaklarından biridir (Hemmings ve Restuccia 2012).

'Forkhead' ailesinin üyelerinden olan Forkhead Box O (FoxO) transkripsiyon faktörlerinin memelilerde; FoxO1 (FKHR/ FKH1), FoxO3 (FKHRL1/ FoxO3a), FoxO4 (AFX/ AFX1) ve FoxO6 olmak üzere dört üyesi vardır (Monsalve ve Olmos 2011, Eric W.-F. Lam 2013). FoxO ailesinin bir önemli özelliği insülin-PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından düzenlenmeleridir (Tzivion ve ark. 2011). FoxO transkripsiyon faktörleri; apoptozun düzenlenmesi, hücre siklusunun duraklaması, oksidatif strese karşı

dayanıklılık, DNA tamiri, glikoz metabolizması, enerji homeostazı ve hücrel farklanma gibi pek çok farklı süreçlerde önemli roller oynarlar (Huang ve Tindall 2007). FoxO proteinleri; pro-apoptotik genler ve farklılaşma, hücre siklusu duraklaması, oksidatif strese karşı savunma, DNA tamiri ile ilgili genleri düzenleme yetenekleri sayesinde hücre kaderinin anahtar araçlarıdır (Eric W.-F. Lam 2013). Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda üreme sistemindeki rolleri de önemli bir araştırma konusudur.

FoxO transkripsiyon faktörlerinin endometriyumdaki rollerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu *in vitro* çalışmalarda ortak görüş FoxO'ların desidualizasyon sürecinde progesteron bağımlı rol aldıkları yönündedir. Birçok *in vitro* çalışmanın ortak sonucu olarak insan endometrial hücrelerin desidualizasyonunda FoxO1'in indüklendiği, FoxO3'ün inhibe olduğu ve FoxO4'ün ise ekspres edilmediği farklı kaynaklarda gösterilmiştir. Ancak bu moleküllerin erken gebelik sürecindeki olası rolleri hakkında *in vivo* veri bulunmamaktadır (Gellersen ve Brosens 2003, Grinius 2006, Kajihara *ve ark.* 2006, Labied *ve ark.* 2006, Kyo 2011, Kajihara *ve ark.* 2013).

Tüm bu literatür bilgileri ışığında; erken gebelik sürecinde farklı gebelik günlerine ait endometriyal modellenmede; apoptoz, proliferasyon, farklılaşma, hipoksi, yaşam ve sağ kalım gibi heterojen olayların gerçekleşmesi, FoxO transkripsiyon faktörlerinin hücrelerdeki kritik rollerini hatırlatmıştır. Bu nedenle peri-implantasyon sürecinde FoxO'lar endometriyumun farklı kompartmanlarında ekspres oluyor olabilir.

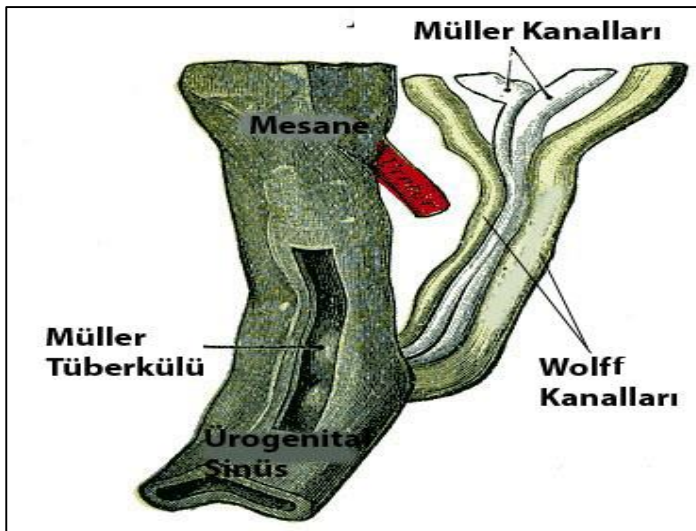
Bu çalışmanın amacı, desidualizasyon sürecinde progesteron bağımlı rolleri olabileceği öne sürülen FoxO transkripsiyon faktörlerinin; gebeliğin olmadığı östrus fazındaki endometriyum (Kontrol), gebeliğin 1, 4, 5, 6 ve 8. günlerinde ekspresyonlarının olup olmadığını, varsa lokalizasyonlarının nasıl olduğunu *in vivo* olarak araştırmaktır. Ayrıca bu çalışma, blastosistten bağımsız olarak sadece hormonal ortamın taklit edildiği, yalancı gebelik ve blastosistin varlığının oluşturacağı mekanik etkinin taklit edilerek desidualizasyonun embriyodan bağımsız olarak indüklendiği, yapay desidualizasyon modellerinde de FoxO protein ekspresyonlarının nasıl bir değişim gösterdiğini değerlendirmeyi hedeflemiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterusun Embriyonik Gelişimi

Genital sistem gelişimin başlangıcında mezodermden köken alır. Hem dişi hem de erkek embriyoda mezonefrik (Wolff) ve paramezonefrik (Müller) kanallar olmak üzere iki çift genital kanal oluşur. Gelişimin ilerleyen aşamalarında dişilerde, testosteron yokluğu mezonefrik kanalın gerilemesine neden olurken, anti-müllerian (Müller baskılayıcı) hormon yokluğu ise paramezonefrik kanalın ilerlemesine olanak sağlar ve dişiliğe farklılaşma gerçekleşir (Langman 1993).

Paramezonefrik kanalın gelişimi, ürogenital kabarıklığın ön ve yan yüzeyindeki sölom epitelinin uzunlamasına bir girinti yapması ile başlar. Kanallar kranial uçtan sölom boşluğu içine doğru huni şeklinde açılarak ilerler. Bu ilerleme, önce mezonefrik kanalın laterali yönünde gerçekleşirken onu çaprazladıktan sonra kaudomedial yönde devam eder. Bu şekilde orta hatta her iki paramezonefrik kanal birbirine yaklaşır. Başlangıçta bir septumla ayrılmış olan bu iki kanal, daha sonra birleşerek uterus kanalını oluştururlar. Birleşmiş olan kanalların kaudal ucu, ürogenital sinusun arka duvarına doğru ilerleyerek paramezonefrik ya da Müller tüberkülü denilen küçük bir şişkinliği oluştururken, mezonefrik kanallar ise bu tüberkülün her iki yanından ürogenital sinusa açılırlar (Langman 1993), (Şekil 2.1.).



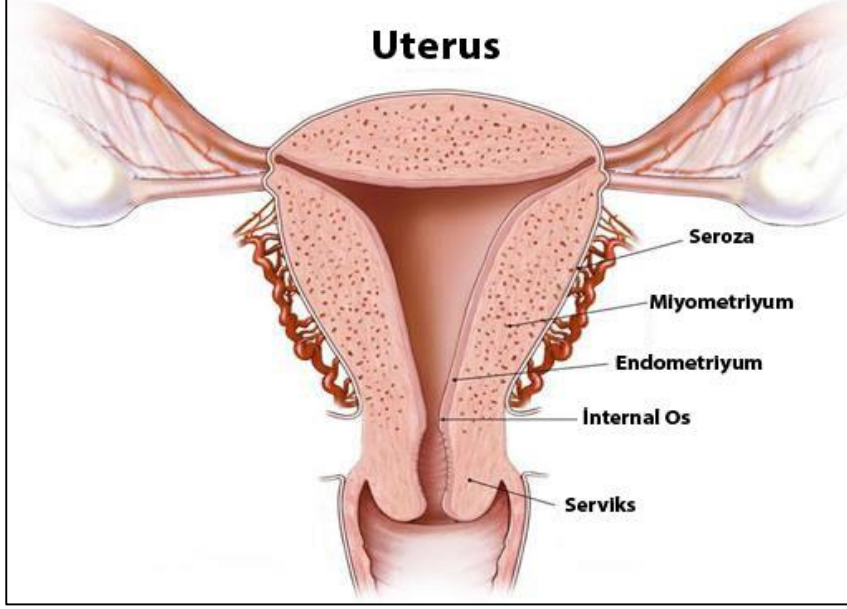
Şekil 2.1. Paramezonefrik (Müller) kanalının gelişimi (Gray 1918).

Dişilerde paramezonefrik kanalların her birinde başlangıçta, sölom boşluğuna açılan kranial vertikal bölüm, mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal bölüm ve karşı taraftaki eşiyile birleşen kaudal vertikal bölüm olmak üzere üç bölüm gözlemlenir. Kranial vertikal ve horizontal bölümden tuba uterinalar gelişirken, kaudal bölümlerin kaynaşması ile de uterus oluşur (Moore KL 2002).

Paramezonefrik kanallar birleştikten sonra geniş bir transvers pelvik katlantı yapar ve kaynaşmış haldeki kanalların lateralinden pelvis duvarına kadar uzanan bu katlantıya ligamentum latum uteri denir. Oluşan bu uterovaginal taslaktan uterusun fundus, korpus, istmus ve endometriyum epiteli ile bezleri gelişirken endometriyum stroması ve miyometriyum ise komşu splanik mezodermden gelişir (Langman 1993, Moore KL 2002). Uterusun temel yapısı 1. trimesterin sonunda oluşur, gebeliğin ortalarında bezlerin ve kas tabakasının gelişimi başlar ve diğer yapıların gelişmesi de 3. trimesterde gerçekleşir (Langman 1993).

2.2. İnsanda Uterus Histolojisi

Uterus; bir gövde(korpus) ve uterus kavitesinin daraldığı iç ağız (intenal os) ile iç ağızdan aşağıya doğru uzanan silindirik bir yapı olan serviksten meydana gelen armut şeklinde bir organdır. Uterusun gövdesi tavan kısmında kubbe biçimini alır ve bu bölümüne fundus adı verilir. Uterus duvarı üç katmandan oluşur. Organı en dıştan perimetriyum tabakası sarar ve bu tabaka uterusun farklı bölümlerine göre ya seroza (bağ dokusu ve mezotelyum) ya da adventisya (bağ dokusu) dokusudur. Diğer tabaka kalın bir düz kas tabakası olan miyometriyumdur. Organın lümeni tarafındaki en iç tabaka ise endometriyumdur (uterus mukozası) (Junqueira 2006), (Şekil 2.2.).

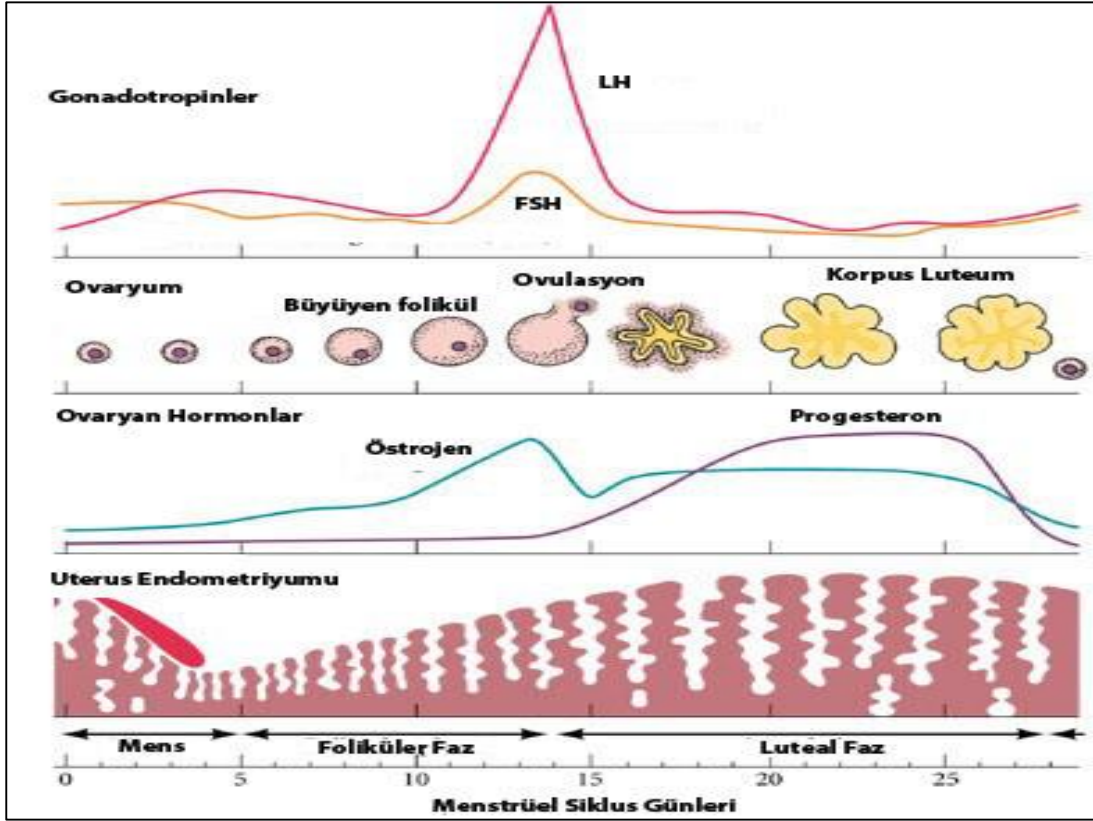


Şekil 2.2. Uterus ve tabakalarını gösteren çizim (<https://www.studyblue.com/notes/n/female-reproductive-tract/deck/6382603>).

Miyometriyum bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinden meydana gelmiştir ve uterusun en kalın tabakasıdır. Düz kas demetleri sınırları iyi belirlenemeyen dört tabaka oluşturmaktadır. Birinci ve dördüncü tabaka esas olarak longitudinal yerleşmiş kas liflerinden oluşur. Miyometriyumun orta tabakalarında arkuat arterler dairesel olarak yerleşmiştir. Endometriyum tek katlı silyalı silindirik epitel ve çok sayıda basit tübüler bezler içeren lamina propriyadan meydana gelmektedir. Miyometriyuma yakın olan bölümlerdeki bezler bazen dallanmalar göstermektedir. Uterus bezlerinin epiteli yüzey epiteli gibi tek katlı prizmatik epitelidir ancak silyalı hücreler çok azdır. Endometriyumun bağ dokusu fibroblastlardan zengindir ve bol miktarda temel madde içerir. Bağ dokusu lifleri çoğunlukla tip III kollajenden meydana gelmiştir. Endometriyum bazal ve fonksiyonel tabaka olmak üzere iki kısma ayrılır. Miyometriyumun komşuluğundaki bazal tabaka lamina propriya ve uterus bezlerinin başlangıç kısmını içermektedir. Fonksiyonel tabaka da lamina propriya ve bezlerin geri kalanı ve yüzey epitelini içermektedir. Miyometriyumun orta tabakalarındaki arkuat arterlerden endometriyumu besleyen iki grup damar çıkar. Bunlar bazal tabakayı besleyen düz arterler ve fonksiyonel tabakaya kan taşıyan kıvrımlı/spiral arterlerdir. Fonksiyonel tabaka her aylık döngüde yenilenirken bazal tabaka ise hemen hemen değişmeden kalmaktadır (Junqueira 2006).

2.3. İnsanda Uterusun Siklusa Bağlı Fizyolojik Değişimleri

Puberte ile birlikte; hipotalamus gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) aracılığıyla ön hipofiz bezini uyarır ve buradan gonadotropinlerin (FSH, LH) salınımını başlatmış olur. Salınan gonadotropinler 1. mayoz bölünme aşamasında duraklamış olan (diploten) primer/preantral folikülleri uyararak uterus endometriyumunun da senkronize olacağı bir döngüyü başlatmış olurlar (Junqueira 2006, Cha ve ark. 2012, Mara H. Rendi 2012). Menstrüel siklus puberteden başlayarak menapoza kadar devam eden 28 günlük bir döngüdür. Menstrüel faz ortalama 4-5 gün sürmektedir. Daha sonra çoğalma (proliferasyon) ve salgılanma/sekretuar (luteal) evre gelmektedir (Junqueira 2006, Mara H. Rendi 2012), (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Gonadotropinler ve ovaryan hormonlar aracılığı ile ovaryum ve uterus senkronizasyonu (<http://www.yourarticlelibrary.com/biology/human-reproduction/female-reproductive-system-ovarian-cycle-gametogenesis-menstrual-cycle/29624/>).

Folikül uyarıcı hormonun (FSH) etkisi ile primer foliküllerin gelişimi uyarılırken diğer yandan bu etki ile teka internaları gelişen bu foliküller aktif olarak östrojen salgılamaya başlar ve östrojen plazmada giderek artmaya başlar. Uterus endometriyumu ovaryumun

bu östrojenik etkisi ile birlikte proliferasyon fazına girmiş olur. Luteinize edici hormonun (LH) ani artışı ile ovulasyon sürecine kadar endometriyumun proliferasyon fazı devam eder. Ovulasyondan sonra arda kalan folikül, korpus luteuma dönüşerek progesteron üretmeye başladığı zaman uterus endometriyumu da sekretuvar faza geçiş yapar. Sekretuvar faz yaklaşık 14 gün sürerken proliferasyon fazının süresi değişkendir ve ortalama 10 gün sürmektedir (Şekil 2.3.). Ovaryan hormonlar aracılığı ile sağlanan bu senkronizasyon endometriyumun gebelik için hazırlanmasında önemlidir (Cha ve ark. 2012, Mara H. Rendi 2012, Maybin ve Critchley 2015).

2.3.1. Proliferatif Faz: Siklusun 5-14. günler arası

Proliferasyon fazında; mensturuasyonda kaybedilen endometriyumun fonksiyonel tabakası yeniden oluşur. Menstrüasyondan sonra uterus mukozası incidir. Fonksiyonel kısmın yeniden oluşması östrojenin endometriyum üzerindeki mitotik etkisi ile sağlanır. Bu şekilde endometriyumda bulunan bezlerin, kan kapillerlerin, stromanın ve endometriyum epitel hücrelerinin çoğalması gerçekleşir. Tek katlı silindirik epitelden oluşan bezler, dar lümenli düz tübüller oluşturur. Bu hücrelerde salgılama aktivitesine hazırlık olarak, granüllü endoplazma retikulumu sistemalarının sayısı ve Golgi kompleksi boyutları giderek artar. Proliferasyon fazı sonunda endometriyum 3-4 mm kalınlığa ulaşır (Junqueira 2006, Mara H. Rendi 2012).

2.3.2. Sekretuvar Faz: Siklusun 15-28. günler arası

Sekretuvar fazda; korpus luteum tarafından salgılanan progesteron, östrojenin etkisi ile gelişmiş olan bezler üzerinde etki göstererek bezleri sekresyon için uyarır. Bol miktarda üretilmiş olan glikoprotein yapıdaki salgı ürünleri bezlerin lümeninin genişlemesine neden olur ve bezler son derece kıvrımlı bir hale gelmeye başlar. Bu fazda salgıların birikmesi ve stromadaki ödemin sonucunda endometriyum, maksimum kalınlığa (5-6 mm) ulaşır. Sekretuvar faz sırasında hücre bölünmesi proliferasyon fazına göre sınırlıdır (Junqueira 2006, Mara H. Rendi 2012).

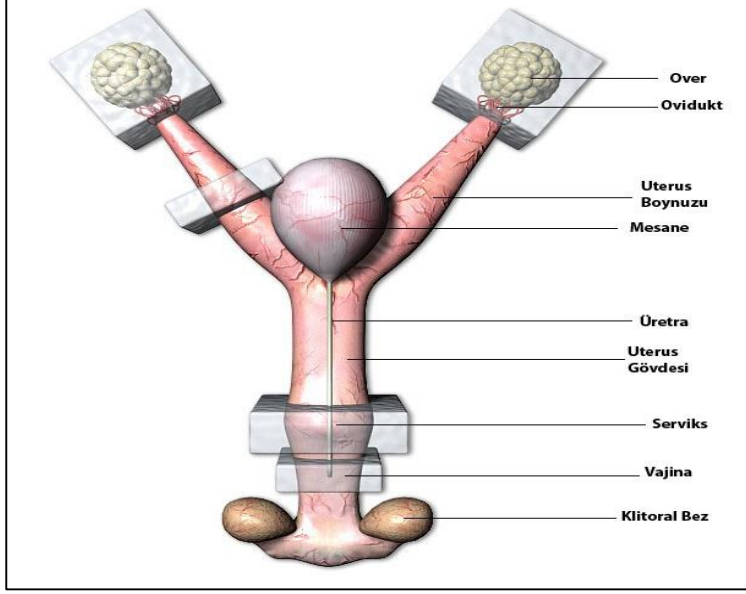
Fertilizasyonu takiben embriyonun endometriyum duvarına tutunması ve implantasyonun gerçekleşmesi ile birlikte embriyonik trofoblast hücreleri insan koryonik gonadotropin

(hCG) hormonu üretmeye başlar. Üretilen hCG korpus luteumdan gebeliğin devamlılığının sağlanması için progesteron salınımını uyarır. Progesteron embriyo implantasyonunun tehlikeye girmemesi için miyometriyumun düz kas hücrelerinin kasılmalarını baskılamak için gebelik için stroma hücrelerinde desidualizasyonu indükler. Progesteronun devamlı hale gelmesiyle desidualizasyon embriyo implantasyonuna paralel bir şekilde gelişim gösterir. Desidualizasyon süreci ile stromal hücreler glikojen ve lipitçe zengin hale gelirler polinükleer hale gelerek desidual hücrelere farklılaşırlar. Desidual hücreler; desidual prolaktin (korpus luteumun gelişimini destekler) prostaglandinler (implantasyon alanında lenfosit, makrofaj ve nötrofillerin toplanmasını sağlar), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve onu bağlayan insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP) (endometriyal bezlerin ve endometriyal hücrelerin çoğalmasını engeller) gibi birçok madde salgırlar (Junqueira 2006, Cha ve ark. 2012, Mara H. Rendi 2012).

Fertilizasyon ya da embriyo implantasyonu gerçekleşmediği zaman, korpus luteumun işlevi yaklaşık 14 gün sonra sona erer. Böylece kandaki progesteron ve östrojen seviyeleri hızla düşer ve spiral arterlerde kasılmalar başlar. Dolayısıyla kan akımı engellenerek dokuda iskemi meydana gelir. Oluşan iskemi damar duvarının ve endometriyumun fonksiyonel tabakasının büyük bir kısmının ölümüne/nekrozuna neden olur. Progesteron yokluğuna bağlı olarak miyometriyum tabakasındaki kasılmalar ile kan damarları yırtılır ve kanama başlar. Endometriyumun fonksiyonel tabakasının büyük bir kısmı ayrılır ve endometriyumun geri kalanı ise interstisyel sıvı kaybına bağlı olarak büzülür. Menstrüel döngü sonunda endometriyum genellikle ince bir tabaka haline gelir ve yeni bir döngünün başlaması ve hormonal uyarımlarla mitotik aktivitesi tekrar başlar (Junqueira 2006, Mara H. Rendi 2012).

2.4. Dişi Farede Genital Sistem Anatomisi

Dişi farede genital sistem bir çift ovaryum, oviduktlar, uterus, serviks, vajina, klitoris ve klitoral bezden meydana gelmektedir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Dişi farede genital sistem anatomisi (<http://www.niehs.nih.gov/research/resources/visual-guides/guides/female-repro/index.cfm>).

2.4.1. Ovaryum

Ovaryumlar, böbreklerin posterolateral kutuplarına yerleşmiş olup, her biri ince şeffaf bir elastik kapsül olan bursa ile çevrelenmiştir ve mezovaryum ile dorsal vücut duvarına tutunmaktadır. Mezovaryumdaki kan damarları ve sinirler hilus denilen bölgeden ovaryuma girer ve ovaryumu terkeder (Sezer 2005).

2.4.2. Ovidukt

Ovidukt periovaryan boşluğu uterus boynuzuna bağlar ve 1.8 cm uzunluğundaki kıvrımlı bir tüptür. Dorsal vücut duvarından mezotubaryum tarafından ayrılır. Mezotubaryum; mezovaryum, ovaryan bursa ve uterus mezometriyumu ile devam eden çift katlı bir membrandır. Ovidukt ovaryan bursaya yakın olan kısım ampulla; uzun, dar ve sıkıca paketlenmiş olan kısım isthmus ve uterus duvarı içinde kalan internal kısım olmak üzere üç segmentten oluşmaktadır. Ampulla, infundibulum aracılığıyla periovaryan boşluğa açılmaktadır. Fimbriya denilen saçak benzeri uzantılar bu açılışı çevreler ve periovaryan boşluğa doğru uzanır (www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame1.shtml , Sezer 2005).

2.4.3. Uterus

Fare uterusu, bikornuat yapıdadır ve Y şeklindeki bu yapı 2 lateral boynuz (kornua) ile tek bir medyan gövde kısmından (korpus) meydana gelmektedir. Uterus boynuzları, oviduktlerden posteromediyal olarak mesanenin dorsal pozisyonuna uzanırlar ve burada korpusu oluşturmak üzere birleşirler. Boynuzlar, dorsal vücut duvarından kan, lenf damarları ve sinirlerin bulunduğu geniş bir ligament olan mezometriyum ile ayrılırlar. Uterusun gövde kısmı medyan septum tarafından ayrılması ile iki boşluk içeren kraniyal kısım ve bölünmemiş olan kaudal kısımdan meydana gelir. Bölünmemiş olan bu kaudal kısmın vajina boşluğuna çıktığı bölge boyun ya da serviks kısmını oluşturmaktadır. Serviks ve vajinanın duvarları dorsal ve ventral olarak devamlılık göstermektedir ancak lateralde vajina lümeninde bu devamlılık kesilmektedir (Sezer 2005).

2.4.4. Vajina ve Klitoris

Kısa, kalın ve müsküler yapıda olan vajina, uterus gövdesi ve devamındaki serviksten vücudun ventral yüzeyinde olan anüsün anteriorundeki eksternal açıklığa uzanmaktadır. Vajina dorsalde rektum ve ventralde üretraya gevşek şekilde bağlı haldedir. Vajinal açıklığın anterior duvarında ventrale doğru uzanan küçük yükselti klitoristir ve yüzeyinin büyük bir kısmı kıl barındıran ince deri ile örtülüdür. Küçük armut şekilli klitoral bezler ise bu kısımda anterolateral olarak subkutan bağ doku içerisine gömülü haldedir (www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame1.shtml. , Sezer 2005, P.Grasso 1998).

2.5. Dişi Farede Üreme Fizyolojisi

Hipotalamustan salınan gonadotropin salıcı hormon (GnRH); hipofizden salınan FSH ve LH, ovaryumdan salınan E2 ve P4 hormonları memelilerde üreme sistemini kontrol eden ortak mekanizmalar olmasına rağmen türler arasında farklılıklar söz konusudur. Bunlardan en belirgin olanı ise üreme sikluslarındaki değişkenliklerdir. Farelerde olduğu gibi östrus siklusuna sahip olan türlerde seksüel aktivite östrus fazı boyunca sınırlı iken, insanlarda olduğu gibi menstrüel siklusa sahip olan türlerde ise böyle bir seksüel aktivite sınırlaması yoktur ve sikluslarının herhangi bir zaman diliminde aktif olabilirler. Diğer bir fark ise gebeliğin gerçekleşmemesi durumunda menstrüel siklusa sahip türlerde menstrüasyon döneminde endometriyumlarını dökerken, östrus siklusuna sahip olan türler ise endometriyumlarını reabsorbe etmektedirler (Sezer 2005, P.Grasso 1998).

Fareler, mevsime bağılı olmayan poliöstrik hayvanlardır ve puberte başlangıcından yaşlılığa kadar döngüsel aktivite gösterirler. Farelerde östrus siklusu 4 faza ayrılmaktadır ve siklus süreleri toplamda 4-5 gündür. Östrus siklusu ayrıca foliküler ve luteal faz olmak üzere iki ovaryan fazda incelemek mümkündür. Ovaryan gelişimin meydana geldiği foliküler fazı proöstrus ve östrus kapsarken, korpus luteumun oluşarak fonksiyon gördüğü luteal fazı ise metöstrus ve diöstrus kapsamaktadır (Sezer 2005).

a) Proöstrus Evresi

Dişi farelerde seksüel siklus evrelerine bağılı olarak genital organlarında çeşitli morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Proöstrusta vajinaları kırmızı-pembe renkte ve nemli gözlenmektedir ve bu dönemde dişi henüz seksüel olarak reseptif değildir. Ovaryan faz olarak foliküler faza ait olan bu dönemde ovaryum folikülleri büyümeye başlarken E2 ve P4'ün etkisi altında da endometriyum gelişmeye başlar. Bu faz yaklaşık olarak 1 gün sürmektedir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Estrus#Estrus> , Sezer 2005).

b) Östrus Evresi

Dişi fareler bu fazda seksüel olarak reseptiftir. Bu nedenle bu dönem 'kızgınlık' evresi olarak da isimlendirilir. Ayrıca fizyolojik değişiklikler nedeniyle belirgin bir şekilde arka ayaklarını kaldırdıkları lordozis refleksi gibi, seksüel olarak reseptif davranış gösterirler. Fare ovaryum folikülleri gonadotropik hormonların etkisi altında tamamen olgunlaşmıştır ve bu dönemde ovulasyon meydana gelmektedir. Dolaşımdaki yüksek östrojen nedeniyle uterus lümeninde biriken sıvı ve vasküler geçirgenlikteki artış proöstrus ve östrus fazları boyunca uterusun şişmesine neden olur. Vajina morfolojileri ise proöstrustakinden daha açık renktedir ve belirgin biçimde ödemli görünümündedir (Sezer 2005).

c) Metöstrus Evresi

Ovaryan luteal faza geçişin olduğu bu dönemde östrojen azalır ve ovaryumda korpus luteum görülmektedir. Uterus dokusunda şişlik ve hiperemide azalma görülmektedir. Ayrıca uterus lümen epitelinde dejenerasyonlar görülmektedir. Vajinalarında ödem azalmış, kuru ve solgun bir görünüm kazanmıştır (Sezer 2005).

d) Diöstrus

Fertilizasyonun gerçekleşmediği takdirde bu fazda progesteron üreten korpus luteum aktivitesi azalır ve gerilemesiyle son bulur. Endometriyum tabakası gelecek siklus için yeniden şekillenirken bu dönemde ovaryumda folliküller gelişmeye tekrar başlarlar. Uterus dokusunda ise şişlik tamamen kaybolmuştur ve doku soluk renkli bir görünümde dir. Farelerin vajinaları da benzer görünümde olup kapalıdır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Estrus#Estrus> , Sezer 2005).

Farelerde çiftleştirme monogami (bir dişi fare ile erkeğin çiftleştirilmesi) poligami (bir erkek ile 2-4 dişi farenin bir kafeste çiftleştirilmesine gerçekleştirilen üreme) şeklinde yapılabilir. Çiftleşme östrus fazının gece periyodunda ovulasyonun gerçekleşmesini takiben meydana gelmektedir. Çiftleşmeden sonra sperm ve yardımcı bezlerin salguları ile meydana gelen semen vajinal salgı ile birlikte koyulaşarak balmumu gibi sertleşir. Bu yapı çiftleşmenin sabahında vajinada bir tıpa şeklinde görülür ve vajinal plak olarak isimlendirilir. Vajinal plak çiftleşmeden 24-36 saat sonra uzaklaştırılır (www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame1.shtml , Sezer 2005).

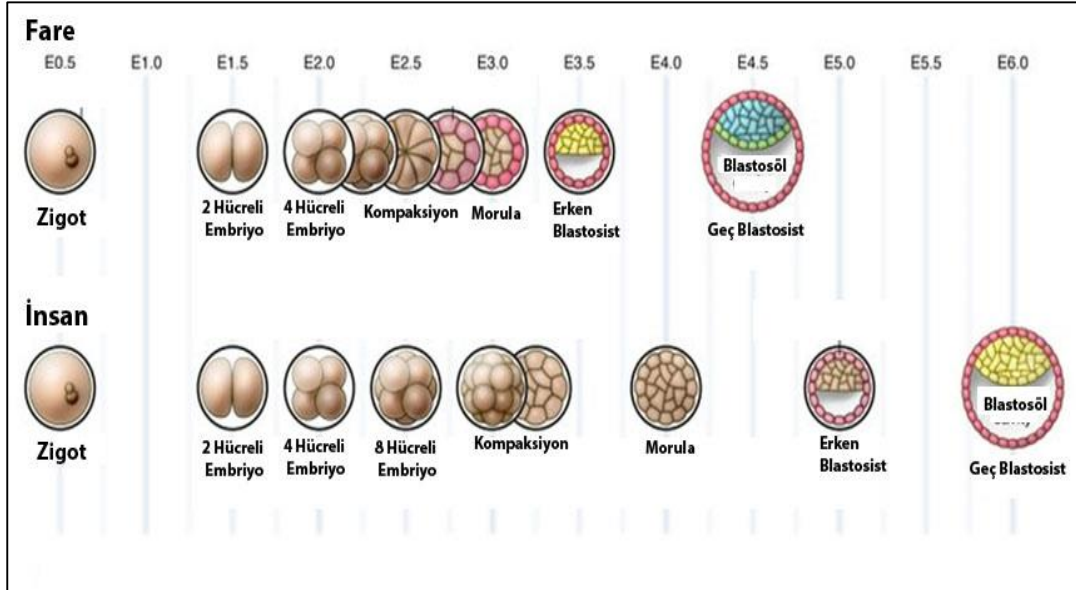
2.6.Farelerde Uterus Histolojisi

Gebe olmayan farelerde Uterus boynuzlarının histolojisi incelendiği zaman 3 tabaka göze çarpar. En dıştaki perimetriyum tabakasıdır ve bu seroza katmanı mezometriyum ile devamlılık gösterir. Sonraki tabaka miyometriyum kas tabakasıdır. Burada kas tabakaları dışta longitudinal içte sirküler yerleşim gösterir. Longitudinal ve sirküler kas tabakasının arasında vasküler yapıdaki gevşek bağ dokusu stratum vaskulozum olarak isimlendirilir. En içte ise uterus mukozası endometriyum tabakasıdır. Endometriyum kan damarları ve sinirleri içerir. Epiteli basit prizmatik epitelidir ve endometriyal stromaya girinti yapan dallı tübüler bezlere uzanmaktadır. Endometriyumun stromasında birçok küçük polihedral yapıda hücre ve lenfosit içeren retiküler bağ dokusu yer almaktadır. Uterus boynuzları orta hatta bir araya geldikçe mediyal duvarları serozayı, stratum vaskulozum ve bazı kas liflerini kaybederler. Uterus gövdesinin anterior kısımları boynuzlardakine benzer şekilde basit prizmatik epitel ile döşelidir ancak diğer bölgelerde ve özellikle medyal duvarlarda çok katlı yassı epitel gözlemlenmektedir. Uterus gövdesinin serviks yakın kısımları,

serviks ve vajina çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Uterus gövdesinin lamina propriyası boynuzlara göre daha az hücre içerirken daha fazla lifsel eleman içermektedir. Serviksin kranial üçte ikisinin duvarı sirküler yerleşimli düz kas tabakası içerirken kaudal üçte birinin duvarı ise kollajen lif demetleri içermektedir (Sezer 2005, Mara H. Rendi 2012).

2.7. İnsanda ve Farede Pre-İmplantif Embriyo Gelişimi

Preimplantasyon evresindeki embriyonun gelişimi ve aktivasyonu boyunca görülen iki önemli özellik fertilizasyondan sonra zigotun yarıklanması ve embriyonik hücrelerin blastosist safhasında iç hücre kitlesi ve trofoektoderme farklılaşmasıdır (Yoshinaga K. 1988, Stewart ve Cullinan 1997). İnsanda ve farede preimplantif dönem embriyo gelişim sürecinde her iki türde de embriyo, zigot aşamasından blastosist aşamasına geldikten sonra uterusu ulaşır. Ancak preimplantif embriyo gelişim aşamaları insanda ve farede zamanlama olarak farklılıklar göstermektedir. Her iki türde zigot oluşumunu gebeliğin 0,5. günü olarak baz alındığında farede erken blastosist aşamasına embriyonik 3,5. günde ulaşırken insanda ise embriyonik 5. günde ulaşır. Preimplantif gelişimin son aşaması olan geç blastosist aşamasına ise farede embriyonik 4,5. günde, insanda ise 6. günde ulaşır (Magnuson T 1987, Cockburn ve Rossant 2010), (Şekil 2.5.).

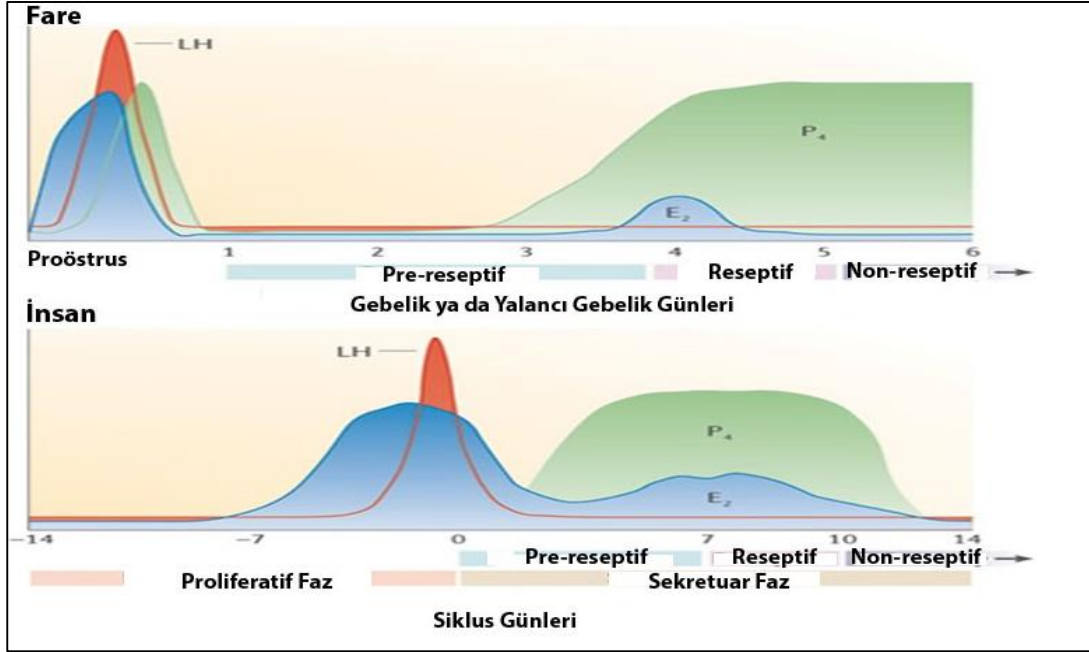


Şekil 2.5. İnsanda ve farede preimplantif embriyo gelişim süreci (Cockburn ve Rossant 2010).

Dişi fareler normal şartlarda her siklusta 8-10 adet oosit yumurtlarlar. Farelerde ovulasyondan sonra oositler bağlı oldukları ovidukta girerler ve buradan oviduktun ampulla kısmına ulaşırlar. Farelerde fertilizasyon ampulla kısmında gerçekleştiğinde preimplantif embriyo gelişim süreci burada başlar. Fertilizasyondan sonra zigot mitoz bölünmeler geçirerek blastosist evresine ulaşır. Çiftleşmeden sonra hipofizden prolaktin salınımı başlar, bu da ovaryumda fonksiyonel bir korpus luteum oluşumuna neden olur ve gebeliğin devamı için başka bir ovulasyon ya da siklusun olmasını engellemiş olur (Soares MJ 2006). Embriyonik 3,5. günde fare blastosistinde trofoektoderm ve iç hücre kitlesi farklılaşır. 4,5. günde; embriyoyu oluşturacak olan primitif endoderm ile primitif ektoderm ve tüm trofoblastik dokuyu oluşturacak olan trofoektoderm olmak üzere üç hücre tipi bulunur (Gardner 1982, Snell GD 1996). Trofoblast, memeli konseptüsünün yaşaması için gereklidir çünkü implantasyona aracılık eder ve sonrasında fetüs ile anne arasında besin, gaz değişimini sağlayan plasentayı oluşturur. Trofoektoderm hücreleri iki farklı bileşenden oluşur: polar ve mural trofoblastlar. Mural trofoektoderm iç hücre kitlesine en distalde yer alan hücrelerden oluşur. Polar trofoektoderm ise iç hücre kitlesinin komşuluğundaki hücrelerdir (Dickson 1963, Rossant J 2002).

2.8. İnsanda ve Farelerde Uterus Reseptivitesi

Uterus reseptivitesi ya da endometriyal reseptivite, maternal endometriyumun blastosistin implantasyonuna izin verdiği sınırlı bir zaman dilimi olarak tanımlanmaktadır. Uterus, değişen östrojen ve progesteron salgılarına özgün biçimde yanıt veren heterojen hücre popülasyonlarından oluştuğundan endometriyal reseptivitenin de bu hormonların kontrolünde olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Wang ve Dey 2006, Cha ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2013, Tu ve ark. 2014), (Şekil 2.8.).



Şekil 2.6. İnsan ve farede steroid hormonlar tarafından uterus reseptivitesinin düzenlenmesi (Wang ve Dey 2006).

Farede ve insanda endometriyal reseptivite; pre-reseptif (nötral), reseptif ve non-reseptif fazlara ayrılmaktadır. İnsanda pre-reseptif faz ovulasyondan sonraki 7. güne kadar devam eder, 7. günden 10. güne kadar reseptif, 10. günden sonra ise blastosist varlığına yanıt vermez ve non-reseptif faza geçer (Şekil 2.6.). Gebe ya da yalancı gebe farede ise endometriyum sadece 4-5. günde (implantasyon günü) reseptif olur, 5. günden sonra non-reseptiftir ve blastosistin varlığına ya da desidual reaksiyon oluşturmak amacıyla yapılan travmatik uyarılara yanıt vermez (Wang ve Dey 2006, Cha ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2013), (Şekil 2.6.).

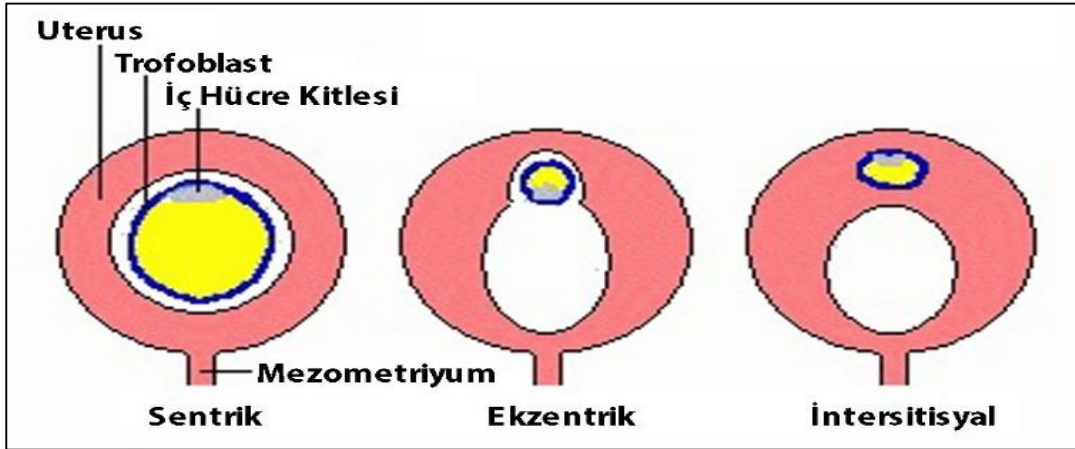
2.9. Embriyo İmplantasyonu

Memelilerde gebeliğin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için fertilizasyondan sonra pre-implantif dönemde embriyo gelişimi, implantasyon ve desidualizasyonun doğru bir şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir (Psychoyos 1973). İmplantasyon, embriyonun uterusu yerleşmesi sürecidir ve implantasyonun temel olaylarını şu şekilde özetlemek mümkündür: blastosistin uterusu yaklaştığı alanda kapiler geçirgenlik ve kan akışının artması, semiallogenik embriyonun annenin immünolojik yanıtlarından kaçması, blastosistin endometriyum lümen epiteline tutunmasının hemen ardından çevresindeki

endometriyal stromanın bölgesel desidualizasyonu, embriyonik trofoblastlar tarafından gerçekleştirilen kontrollü uterus invazyonu (Beer ve Billingham 1978, Psychoyos 1973). Özetlenen tüm durumlarda hem embriyo hem de uterustaki hücre tiplerinde zamana ve bölgeye bağımlı olarak proliferasyon, farklılaşma, göç ve yeniden şekillenme gibi hücresel olaylar meydana gelir. Bu kritik olaylar, progesteron ve östrojenin aracı olduğu hücre tiplerine özgün etkileşimlere bağlıdır. Progesteron/östrojen bağımlı bu süreçlerin moleküler ve hücresel mekanizmaları henüz net olarak aydınlatılamamıştır. İnsanlardaki embriyo-uterus etkileşiminin moleküler düzeyde incelenmesindeki etik kısıtlamalar nedeniyle bu konuda elde edilen bilgilerin çoğu özellikle fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalara dayanmaktadır (Cha ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2013).

2.9.1. İmplantasyon Tipleri

Embriyonun uterus ile karşılıklı etkileşimleri ve bunun sonucunda meydana gelen implantasyon süreci incelendiği zaman memelilerde birçok ortak özellikleri içermesinin yanı sıra türden türe farklılıklarda söz konusudur. Blastosist ve uterusun etkileşimlerini morfolojik olarak temel alan Bonnet, implantasyonu memelilerde merkezi (sentrik), ekzentrik ve intersitisyal olmak üzere 3 sınıfa ayırmıştır (Bonnet 1884), (Şekil 2.7.).



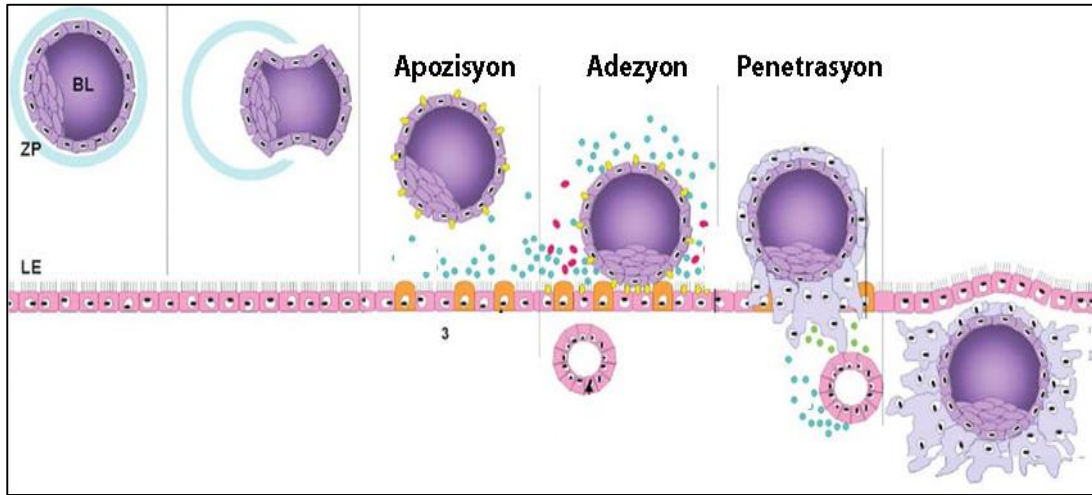
Şekil 2.7. Memeli türünde blastosist ve uterus etkileşimleri temel alınarak tanımlanan implantasyon paternleri (<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/implant.html>).

Merkezi implantasyon tavşan, dağ gelinciği ve bazı keseli türlerinde görülmektedir. Bu türlerde blastosist implantasyondan önce yüzeyel olarak yoğun bir şekilde genişler ve maternal endometriyuma ilk dokunuşu bu şekilde gerçekleştirdikten sonra implante olur.

Blastosistin yapmış olduğu yüzeyel genişleme özelliğinden dolayı merkezi implantasyon, yüzeyel implantasyon olarak da isimlendirilmektedir. Fare, sıçan ve hamster gibi kemirgen türlerde ekzentrik implantasyon görülmektedir. Bu canlılarda blastosistler yüzeyel olarak çok az bir genişleme gösterir ve uterus lümeni invaginasyonla bir cep oluşturur. Bu şekilde blastosist ile endometriyum arasında temas sağlanarak implantasyon gerçekleşir. İnsandaki implantasyon tipi ise intersitisyel implantasyondur. Burada blastosist lümen epitelini geçerek epitelin hemen altındaki stromal doku ile etkileşimde bulunur. İmplantasyon insanda epitelten içeri girme ve stromal dokuya gömülme şeklinde gerçekleşmiş olur. İntersitisyel implantasyon aynı zamanda kobay ve şempaze gibi memeli türlerinde de görülmektedir (Bonnet 1884).

2.9.2. İmplantasyon Aşamaları

Enders ve Schlafke, implantasyonun 3 evreye ayrılabilceğini göstermiştir: apozisyon (yakınlaşma), adezyon (tutunma) ve penetrasyon (içine girme) (Enders ve Schlafke 1969). Apozisyon, embriyonik trofektoderm hücrelerinin lümen epiteline yaklaşmasının gerçekleştiği evredir. Sonraki evre olan adezyon evresinde trofektoderm ile lümen epiteli arasındaki ilişki blastosistin yıkama ile uzaklaştırılmasına izin vermeyecek kadar ilerlemiştir. Son evre olan penetrasyon evresi trofektodermin lümen epiteline invaze olmasını içerir (Enders ve Schlafke 1969, Fitzgerald *ve ark.* 2008), (Şekil 2.8.).

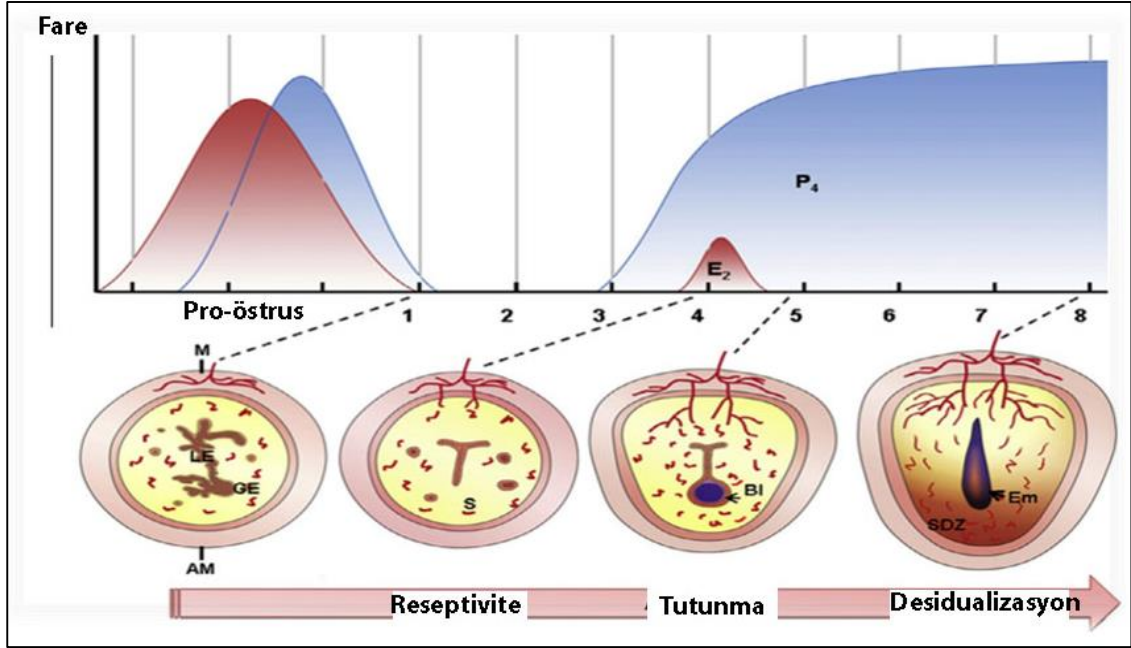


Şekil 2.8. İnsana ait embriyonun implantasyon aşamaları (Fitzgerald *ve ark.* 2008). BL: blastosist, ZP: zona pelusida, LE: lümen epiteli.

2.9.3. Peri-İmplantasyon Sürecinde Endometriyumdaki Hücresel Olaylar

Memelilerde, özellikle kemirgenlerde, apozisyon başlamadan önce stromal ödem oluşur. Stromal ödem, uterus lümeninin daralmasına neden olarak trofektodermin mikrovillusları ile lümen epitelinin parmaklı çıkıntılar oluşturması (apozisyon) ve birbirlerine yakınlaşmalarına (adezyon) neden olur (Zhang *ve ark.* 2013, Croy 2014). Embriyonun epitele tutunması sonucunda blastosistin olduğu bölgede stromal vasküler geçirgenlik bölgesel olarak artış gösterir. Lümenin kapanması olayı gebelik süresince uterusun tamamında gerçekleşir ve blastosistin varlığından bağımsızdır. Stromal ödem ile uterus lümeninin daralması ve kapanması blastosist olmasa da gerçekleşebilirken, progesteron olmadığında gerçekleşemez (Zhang *ve ark.* 2013, Croy 2014). Ardından gerçekleşen adezyon olayı ve stromal vasküler geçirgenliğin bölgesel olarak artış göstermesi için ise östrojen gereklidir (Harper 1989, Zhang *ve ark.* 2013). Farelerde implantasyon, lümen epitelinin kan damarlarınca zengin bölge olan mezometriyumun zıt tarafında bulunan anti-mezometrial kutbunda gerçekleşir (Zhang *ve ark.* 2013, Croy 2014).

İmplantasyon zamanı, anti-mezometriyal lümen epiteline blastosistin hangi mekanizma ile yönlendirildiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Farede blastosistler, lümenin kapanmasının başlamasıyla birlikte uterus eksenine boyunca uterus lümeninin anti-mezometriyal tarafına yerleşirler. Tutunma olayı başladığında blastosist iç hücre kitleleri mezometriyal kutba bakacak şekilde embriyo pozisyonunu alır (Wang *ve Dey* 2006, Zhang *ve ark.* 2013). Farelerde tutunma reaksiyonunun ilk belirtisi gebeliğin 4. gününün gece saatlerinde (20.00-24.00) görülür (Psychoyos 1973). Fare ve insanlarda lümen epiteli hücreleri tutunmadan sonra apoptoza uğrar, blastosistin etrafındaki stromal hücrelerde desidualizasyon görülür ve sonuçta embriyo anti-mezometriyal stroma içine gömülmüş olur (Zhang *ve ark.* 2013).



Şekil 2.9. Peri-implantasyon sürecindeki steroid hormon seviyeleri ve gebelik günlerine göre uterus alanlarının enine kesitlerinin tanımlandığı diyagramlar (Zhang ve ark. 2013). LE: lümen epitel, GE: bez epitel, AM: anti mezometriyum, M: mezometriyum, S: stroma, Bl: blastosist, Em: embriyo, SDZ: sekonder desidual alan.

Gebeliğin 1. gününde fare uterusunun lümenal epitel dallanmış şekildedir. Stromal ödemin giderek artmasıyla birlikte gebeliğin 4. gününde lümen daralarak T şeklini alır. Oluşan stromal ödem sayesinde bu günde reseptif durumda olan endometriyum ile blastosistin yaklaşması sağlanmış olur. Stromada vaskülerizasyon artarken diğer yandan daralan lümen epitel blastosist için bir cep oluşturmuştur ve 5. güne gelindiğinde blastosist mural trofoektoderm tarafından anti-mezometrial lümen epiteline bağlanarak implante olur. Embriyonun implante olduğu bölgedeki stromal hücreler 5. günden sonra avasküler olan birincil desidual bölgeyi (PDZ) oluşturmak üzere farklılaşır ve proliferer olurlar. PDZ oluşuktan sonra desidual hücreler 8. güne kadar farklılaşmaya ve çoğalmaya devam eder ve sonrasında da vasküler olan ikincil desidual bölgeyi (SDZ) oluştururlar (Cha ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2013), (Şekil 2.9.).

2.10. Forkhead Box O (FoxO) Transkripsiyon Faktörleri

2.10.1. Forkhead Ailesi

Transkripsiyonel düzenleyici olan Forkhead ailesi ilk olarak *Drosophila*'da tanımlanmıştır. FoxA olarak alt gruba ayrılmış olan bu genin *Drosophila*daki mutasyonu ile çatal şeklinde ektopik baş morfolojileri ortaya çıkması sebebiyle bu aile Forkhead olarak isimlendirilmiştir (Carter ve Brunet 2007).

Evrimsel olarak korunmuş olan bu ailenin diğer bir isimlendirmesi ise 'Winged Helix' proteinleridir. Bu proteinlerin X-ray kristallograflerinde, DNA bağlanma domeynleri 3 boyutlu bir yapı sergiler ve 3 alfa helix yapıları kelebek kanatlarını andıran iki karakteristik loop ile çevrilidir. Forkhead Box/ Fox ailesinin insanda 100'den fazla üyesi bulunmaktadır. Sekans benzerliği temel alınarak FoxA'dan FoxR'ye kadar sınıflandırılmaktadır (Kaestner *ve ark.* 2000, Carter ve Brunet 2007).

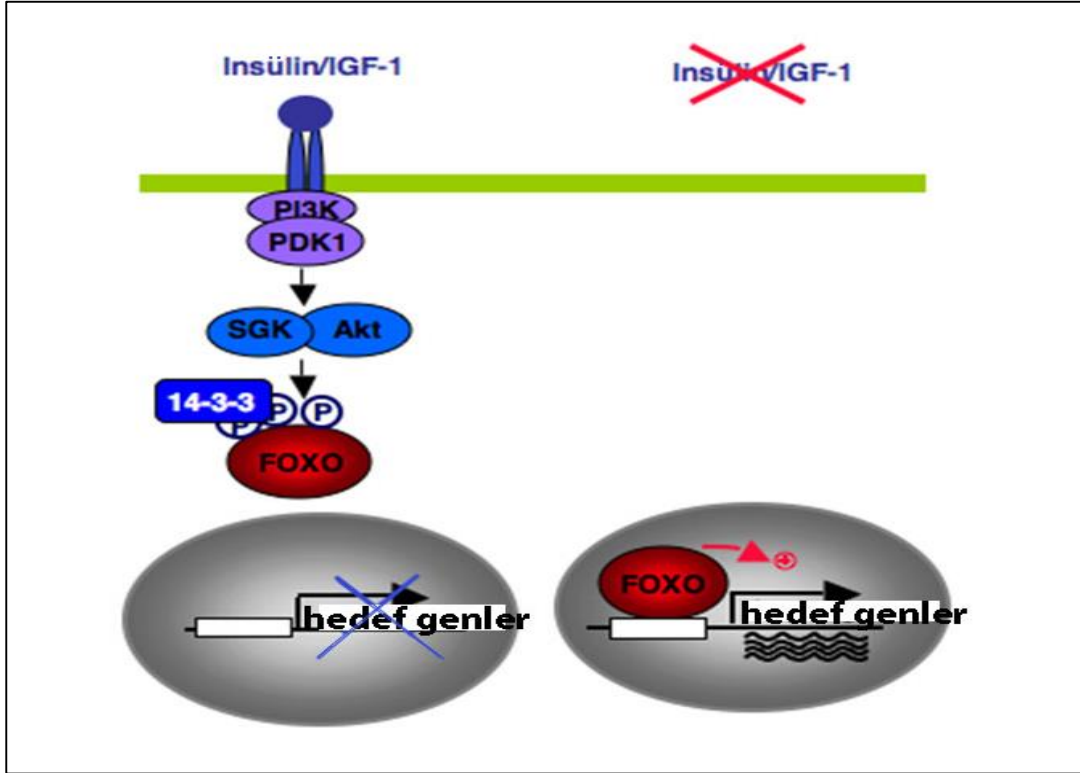
Forkhead ailesinin kendilerine has korunmuş DNA bağlanma bölgeleri mevcuttur. Bu aile üyelerinin protein olarak DNA bağlanma bölgeleri FKH/FH domeyni olarak isimlendirilmektedir (Kaestner *ve ark.* 2000, Huang ve Tindall 2007). Bu proteinler çok çeşitli fonksiyonlarda görev almaktadırlar. Örneğin FoxE3 özgün olarak göz gelişimi için gerekliyken, FoxP2 ise beyinde dil kazanımında rol oynamaktadır (Carter ve Brunet 2007).

2.10.2. Forkhead Box O (FoxO) Alt Grubu

Forkhead Box O (FoxO) Transkripsiyon faktörleri Forkhead ailesinin bir alt sınıfı/grubudur. FoxO transkripsiyon faktörlerinin memelilerde; FoxO1 (FKHR/ FKH1), FoxO3 (FKHRL1/ FoxO3a), FoxO4 (AFX/ AFX1) ve FoxO6 olmak üzere dört üyesi vardır (Biggs *ve ark.* 2001). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, ailenin bulunan en son üyesi olan FoxO6'da diğer grup üyelerinde ortak bir şekilde bulunan C terminalindeki tüm gruplarda ortak olan Akt fosforillenme bölgesinin olmadığını göstermektedir. Bu sebeple FoxO6'nın diğer üyelerden farklı düzenlenme ve görevinin olabileceği düşünülmektedir (Van Der Heide *ve ark.* 2004). FOXO2 ve FOXO5 ise FOXO3 ile özdeşdir ve memelilerde bulunmamaktadır (Carter ve Brunet 2007).

2.10.3 PI3K/ AKT Sinyal Yolağı Tarafından FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Düzenlenmesi

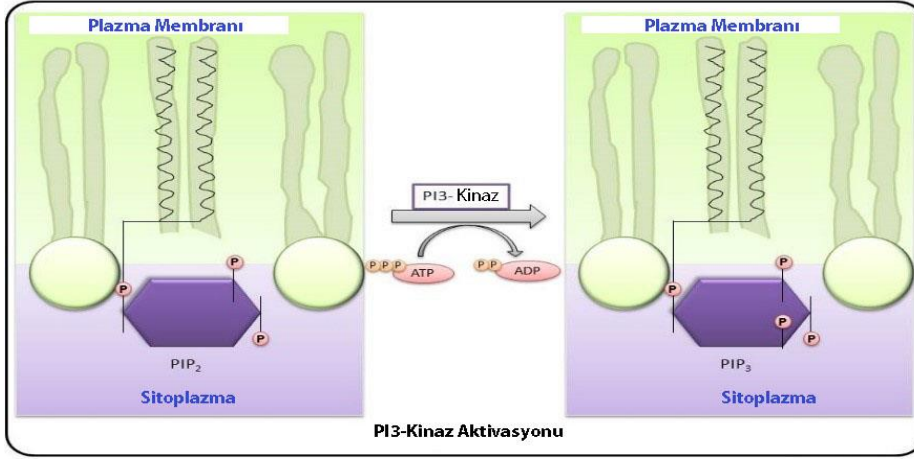
FoxO proteinleri transkripsiyonel gen aktivasyonu görevlerini nükleusta gerçekleştiren moleküllerdir. Bu proteinler insülin/PI3K (Fosfatidilinositol 3-Kinaz)/Akt (PBK, protein kinaz B) sinyal yolağı tarafından düzenlenmeleri ile karakterizelerdir ve bu nedenle 'other' diğer anlamına gelen 'O' sınıflamasına girerler. FoxO'ların transkripsiyonel gen aktivasyon görevleri insülin/büyüme faktörleri stimülasyonu ile Akt tarafından fosforillenmeleri sonucunda inhibe edilir (Huang ve Tindall 2007, Tzivion *ve ark.* 2011, Zhang *ve ark.* 2011), (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. İnsülin ya da büyüme faktörlerinin varlığına bağlı olarak FoxO proteinlerinin inhibisyonu ve aktivasyonu (Greer ve Brunet 2005) numaralı kaynaktan düzenlenmiştir.

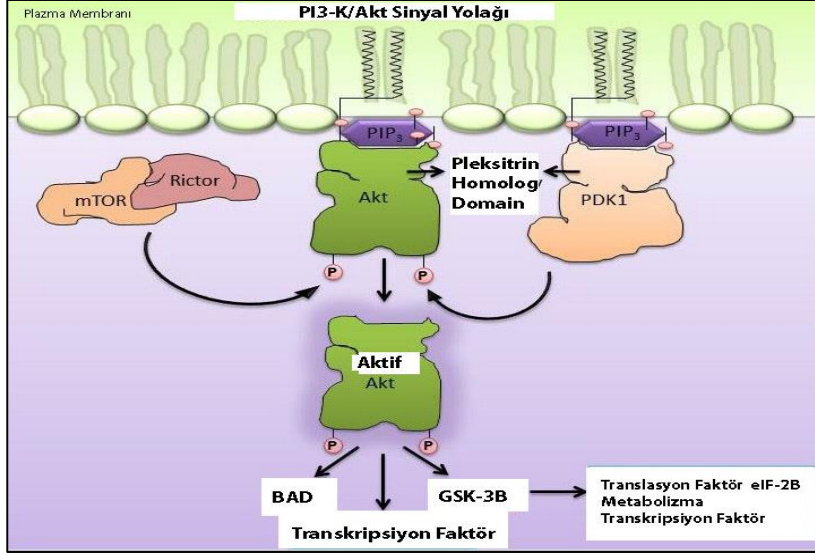
Büyüme ve gelişmeyi destekleyen pek çok sinyal yolağından biri olan PI3K/Akt sinyal yolağı insülin ya da diğer büyüme faktörleri tarafından aktive edilir. Bu faktörler hücre membranındaki yüzeyel reseptör tirozin kinazlara (RTKs) bağlanarak alt adaptörleri uyarırlar. İnsülin reseptör substrat protein (IRS) gibi bu alt adaptörler PI3K'ı aktive ederek hücredeki kaskadı başlatmış olurlar (Alessi *ve ark.* 1997, Hemmings ve Restuccia 2012).

Alt adaptörlerin uyarısı ile PI3K, 3-fosfoinositidine bağımlı protein kinaz 1 (PDK1)'i ve Akt'yi aktive etmek için hücre membranında bir takım enzimatik işlem gerçekleştirir. ATP (Adenozin trifosfat)'ı ADP(Adenozin difosfat)'a dönüştürerek kazandığı fosfatı, fosfatidilinositol bifosfata (PIP₂) bağlar. Böylece PI3K, PIP₂'yi fosfatidilinositol trifosfata (PIP₃) dönüştürür (Alessi *ve ark.* 1997, Brunet *ve ark.* 1999, Tang *ve ark.* 1999, Hemmings ve Restuccia 2012), (Şekil 2.11.).



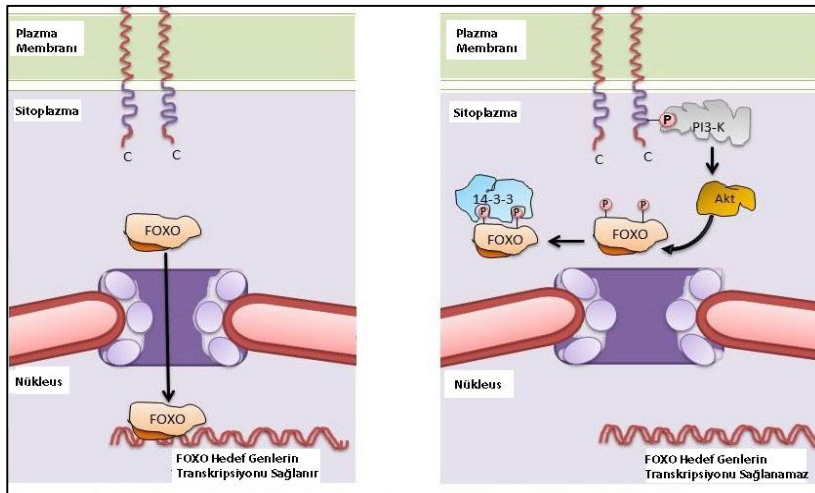
Şekil 2.11. PI3K/ Akt sinyal yolağındaki PI3kinaz aktivasyonu
(<http://namrataheda.blogspot.com.tr/2013/03/signal-transduction-pathway-pi3-kakt.html>)

Sonraki süreçte AKT ve PDK1, PIP₃ tarafından plazma membranına bağlanır. PDK1 tarafından fosforillenmesi sonucunda da Akt aktif formuna geçer (Brunet *ve ark.* 1999, Tang *ve ark.* 1999, Tzivion *ve ark.* 2011), (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. PI3K/ Akt sinyal yolağındaki Akt aktivasyonu
(<http://namrataheda.blogspot.com.tr/2013/03/signal-transduction-pathway-pi3-kakt.html>).

Aktive olan Akt, FoxO proteinlerini doğrudan 3 farklı serin/treonin bölgesinden fosforile eder. Sonrasında fosforillenen FOXO proteinlerine 14-3-3 şaperon proteinleri bağlanarak sitoplazmada tutulurlar. 14-3-3 şaperon proteinlerinin nükleer lokalizasyon sinyallerini (NLS) maskeleyerek ve Akt tarafından fosforillenmesi nedeniyle FOXO proteinleri nükleusa transportunu sağlayamaz ve hedefindeki genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirmez (Van Der Heide *ve ark.* 2004, Huang ve Tindall 2007, Tzivion *ve ark.* 2011, Zhang *ve ark.* 2011, Hemmings ve Restuccia 2012), (Şekil 2.13.).

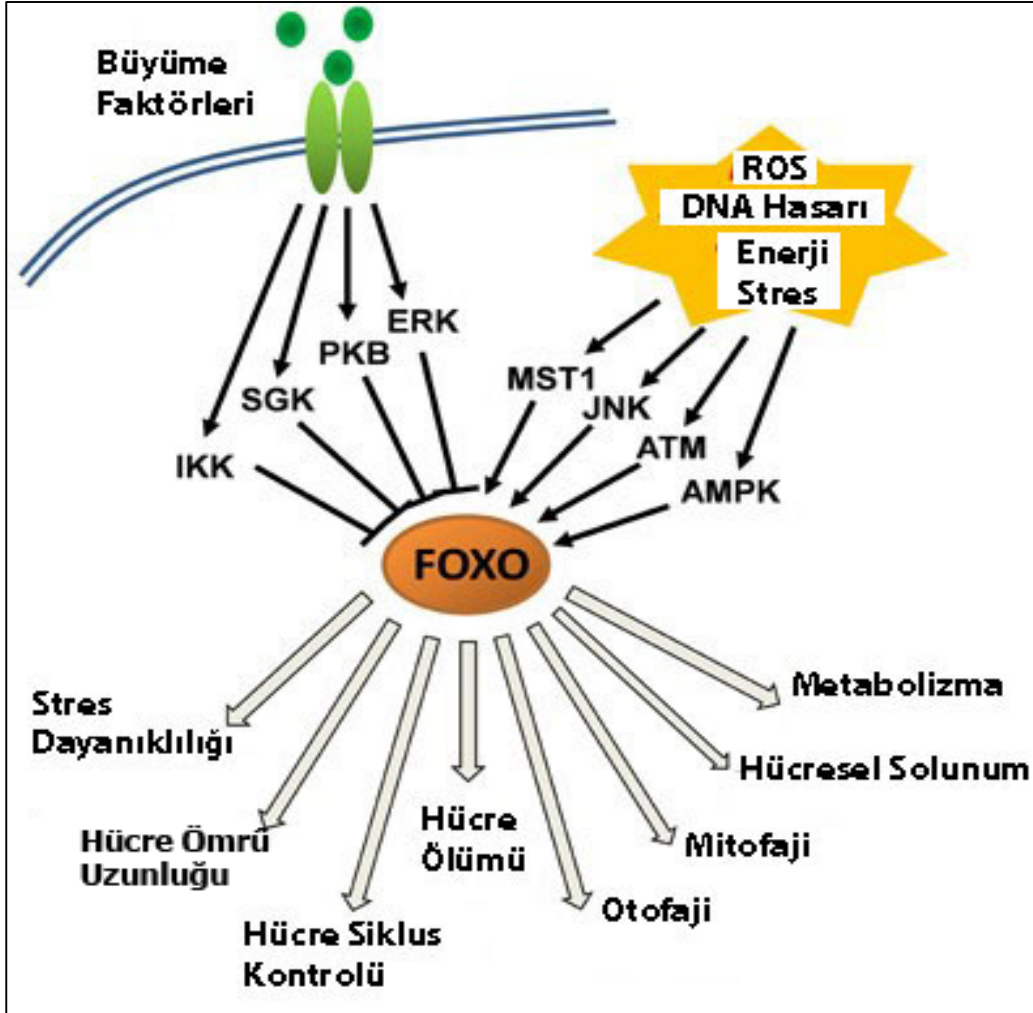


Şekil 2.13. PI3K/ Akt sinyal yolağında, insülin ya da büyüme faktörleri tarafından FoxO'ların düzenlenmesi
(<http://namrataheda.blogspot.com.tr/2013/03/signal-transduction-pathway-pi3-kakt.html>).

PI3K/Akt yolağı çalışmadığında ise FoxO proteinleri nükleusta lokalize olurlar ve transkripsiyonel aktivasyonlarını gerçekleştirebilirler (Carter ve Brunet 2007, Zhang ve ark. 2011, Xie ve ark. 2012).

2.10.4 FoxO Transkripsiyon Faktörlerini Düzenleyen Diğer st Sinyal Yolları

Memeli hücrelerinde FoxO transkripsiyon faktörlerinin insülin yada büyüme faktörlerinin olması durumunda ya da hücresel stres koşullarındaki aktivasyonu ve inhibisyonu düzenleyen bir çok sinyalizasyon vardır. Büyüme faktörleri varlığında ya da yokluğunda ve stres koşullarında hücrede kinaz sinyal kaskadları FoxO'ların transkripsiyon görevlerini kontrol etmektedir (Biggs ve ark. 1999, Brunet ve ark. 1999, Brownawell ve ark. 2001, Brunet ve ark. 2001), (şekil 2.14.).



şekil 2.14. Büyüme faktörleri ve stres koşullarına bağlı olarak kinaz kaskadları tarafından FoxO transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi (Hagenbuchner ve Ausserlechner 2013).

Büyüme faktörü sinyali aracılı olarak PBK (Akt)'nin yanı sıra, serum ve glukokortikoid indükleyici kinaz (SGK), I κ B-kinaz (IKK), ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK) FoxO transkripsiyon faktörlerini nükleustan transportunu sağlayarak inaktivasyonunu sağlarlar (Brunet *ve ark.* 2001, Rena *ve ark.* 2002, Hu *ve ark.* 2004, Yang *ve ark.* 2008, Yang *ve ark.* 2008, Boccitto ve Kalb 2011).

Hücrel stres koşullarında aktive olan Jun-N-terminal kinaz (JNK) ve memeli STE20-benzeri protein kinaz 1(MST1) FoxO'ların nükleer birikimine neden olurlar. Hücrede DNA hasarı ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi JNK'nın aktivasyonunu tetikleyerek nükleer FoxO transkripsiyon aktivasyonlarına neden olur. Stres koşulları altında ayrıca aktif ataxia telangiectesia mutant (ATM) kinaz hem kendisinin hemde FoxO'ların nükleer birikimine neden olur. AMP aktif edilmiş kinazlar (AMPK) ise hem yetersiz büyüme faktörleri hem de hücrel stres koşullarında FoxO transkripsiyon faktörlerinin nükleer aktivasyonu sağlar ve hedef DNA sekansına bağlanmalarını yönlendirirler (Essers *ve ark.* 2004, Greer *ve ark.* 2007, Jang *ve ark.* 2007, Boccitto ve Kalb 2011).

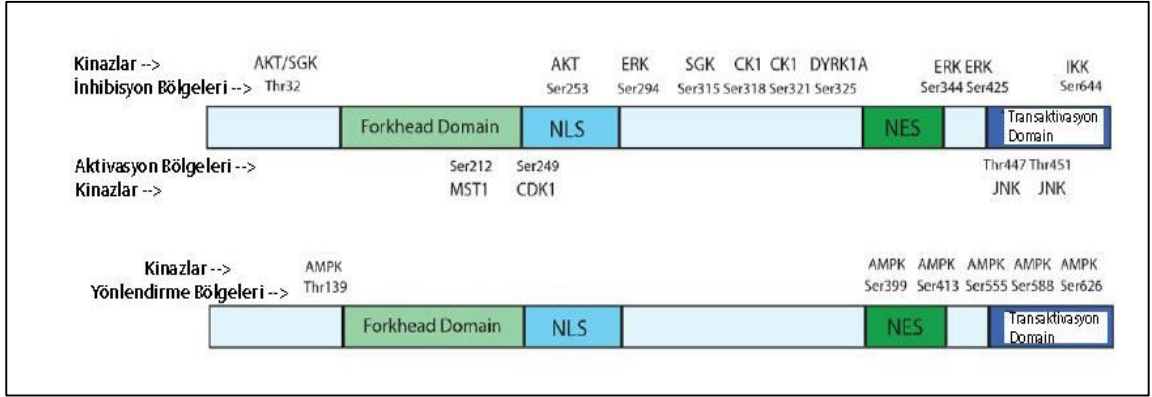
2.10.5. FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Post-Translasyonel Modifikasyonlarla Düzenlenmesi

FoxO'ların Fosforilasyonu

FoxO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu bir çok kinaz tarafından gerçekleştirilir. Bu kinazların FoxO'ları fosforile etmesi her zaman inhibisyonuna neden olmaz. Bazı kinazların gerçekleştirdiği fosforilasyon FoxO'ların transkripsiyonel olarak aktivasyonu ile sonuçlanır (Boccitto ve Kalb 2011, Burgering 2013, Eric W.-F. Lam 2013).

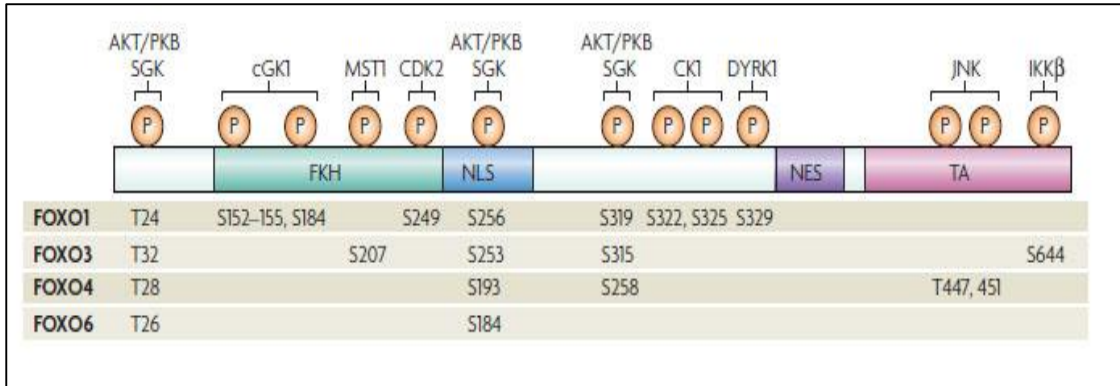
FoxO proteinleri; AKT/PBK, SGK, DYRK1 (çift özgün tirozin fosforillenmiş ve düzenlenmiş kinaz 1), IKK β (I κ B kinaz), ERK (ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar), CK1(kazein kinaz 1) tarafından fosforillenmeleri sonucunda inhibe edilirler ve transkripsiyonel aktivasyonlarını gerçekleştiremezler. JNK (Jun-N-terminal kinaz), CDK1-2 (Siklin bağımlı kinaz 1 ve 2), MST1(memeli STE20-benzeri protein kinaz 1) fosforilasyonu ise FoxO transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel olarak

aktivasyonunu sağlar (Brunet *ve ark.* 2001, Essers *ve ark.* 2004, Hu *ve ark.* 2004, Boccitto ve Kalb 2011, Burgering 2013, Eric W.-F. Lam1 2013). AMP aktif edilmiş kinazlar (AMPK) ise FoxO transkripsiyon faktörlerinin hem nükleer aktivasyonu sağlar ve hem de hedef DNA sekansına bağlanmalarını yönlendiren kinazlardır (Boccitto ve Kalb 2011, Burgering 2013, Eric W.-F. Lam1 2013), (Şekil 2.15.).



Şekil 2.15. FoxO aktivitesinin fosforilasyon ile düzenlenmesi (Boccitto ve Kalb 2011).

Fosforilasyon mekanizmasında söz konusu olan her kinazın, FoxO'ların her bir izoformu için farklı ya da benzer fosforilasyon bölgeleri mevcut olabilir. Örneğin Akt fosforilasyon bölgeleri; FoxO1 için treonin (Thr)24, serin (Ser) 256 ve Ser319 bölgesi iken; FoxO3 için Thr32, Ser253 ve Ser315'dir. FoxO4 için ise; Thr 28, Ser193 ve Ser258 bölgelerinden Akt tarafından fosforilasyonu gerçekleşir (Boccitto ve Kalb 2011, Xie *ve ark.* 2012), (Şekil 2.16.).



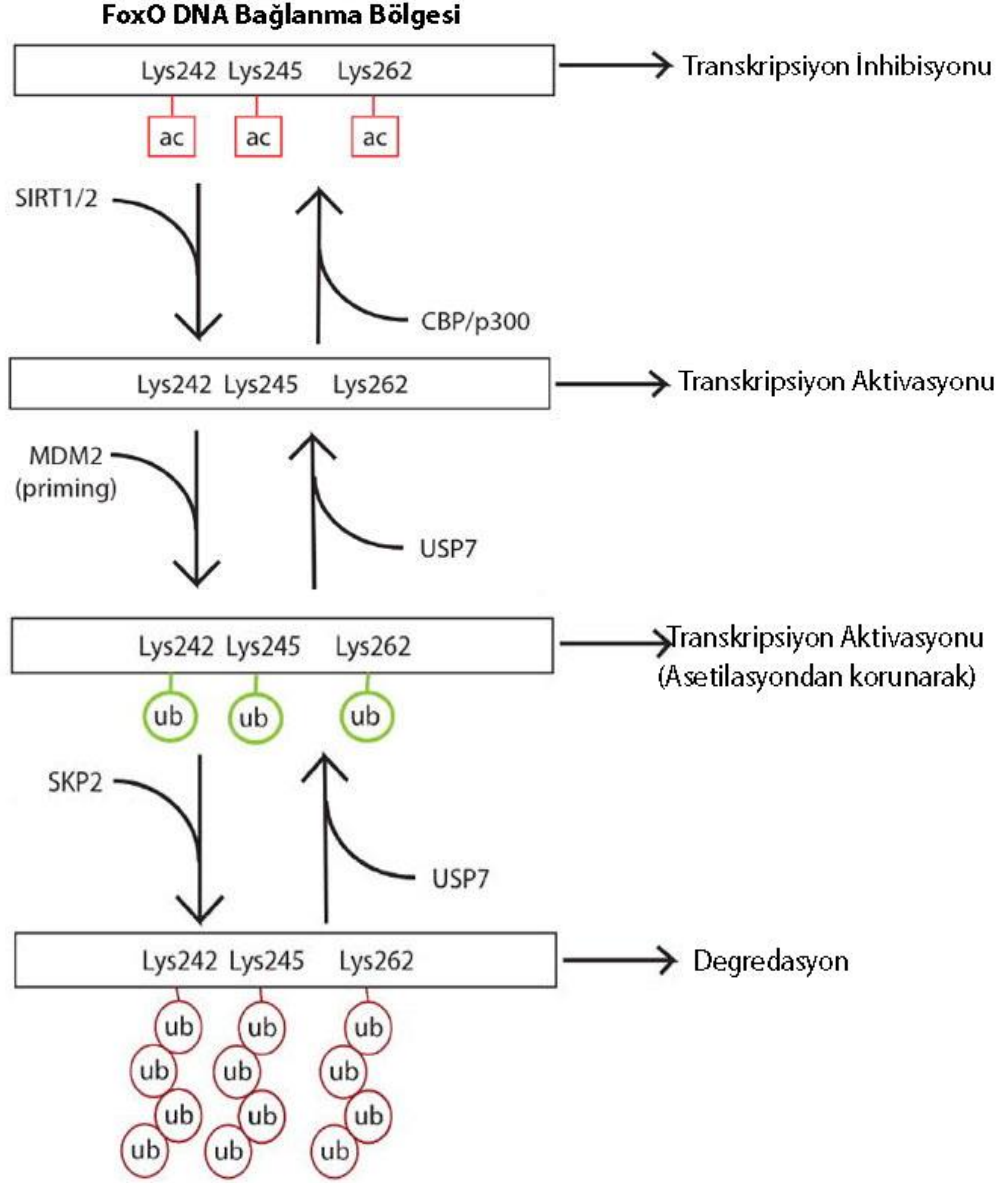
Şekil 2.16. FoxO'ların kinazlar tarafından fosforillenme bölgeleri (Eric W.-F. Lam1 2013).

FoxO'ların Asetilasyonu

Post-translasyonel modifikasyon olarak asetilasyonun FoxO'ların üzerindeki aktivitesi Sirtuin (SIRT)1 ve SIRT2 gibi histon deasetilazlar (HDAC) ile CREB bağlayıcı protein (CBP) ve p300 gibi histon asetil transferazlar (HAT) arasındaki dengeye bağlıdır. CBP ve p300 koaktivatörlerin histon asetil transferaz aktivitesi indirek olarak FoxO transkripsiyonunu yeni kromatin modellenmesi ve histon asetillenmesi yeterliliklerine göre arttırabilir (Wang *ve ark.* 2009, Boccitto ve Kalb 2011, Burgering 2013). Buna karşılık FoxO asetilasyonunun DNA bağlanma kapasitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Matsuzaki *ve ark.* 2005). Bu negatif feed-back mekanizması, SIRT1 ve SIRT2'nin FoxO'lar üzerindeki deasetilasyon aktivitesi ile dengelendiği düşünülmektedir. Asetilasyonun meydana geldiği FoxO lizinlerinin monoübikütülasyonu FoxO'ları non-asetile tutabilir. FoxO'ların bu şekildeki non-asetile durumu DNA promotor bölgeleri ile ilişkilerine bağlı olarak uzayabilir (Brunet *ve ark.* 2004, Wang *ve ark.* 2009, Boccitto ve Kalb 2011, Burgering 2013, Eric W.-F. Lam1 2013).

FoxO'ların Ubikütülasyonu

FoxO proteinlerinin düzenlenmesinde übikütülasyon mekanizmaları olarak; SPK2 (di-asilgliserol kinaz 2) ile poliübikütülasyon, USP7 (ubikütün spesifik proses proteaz 7) ile deübikütülasyon ve MDM2 (E3 ubikütün-protein ligaz 2) ile monoübikütülasyonları önemli rol oynamaktadır (Boccitto ve Kalb 2011, Daitoku *ve ark.* 2011). FoxO'lar diğer proteinler gibi, poliübikütülasyon ile proteazomal degradasyona uğrarlar. Ubikütülasyonun bu standart mekanizmasına ek olarak FoxO'ların monoubikütülasyonu hücrede meydana gelen ROS aktivitesine cevabında rol oynamaktadır. Bu şekilde FoxO'ların lokalizasyonu ve transkripsiyonel aktivasyonları kontrol edilir. Monoubikütülasyon lizin rezidüllerinin asetilasyondan korunmasını sağlayarak FoxO'ların transkripsiyonel olarak aktivasyonuna izin verirken poliübikütülasyon ise direk olarak degradasyonunu sağlar (Brenkman *ve ark.* 2008). FoxO'ların poliübikütülasyonu ve deübikütülasyonu ile degradasyonu sebebiyle uzun zamanlı FoxO inaktivasyonu gerçekleşeceği için, eğer hücrede hızlı bir FoxO reaktivasyonu gerekli ise monoubikütillenmiş durumda kalabilir (Boccitto ve Kalb 2011, Xie *ve ark.* 2012), (Şekil 2.17.).



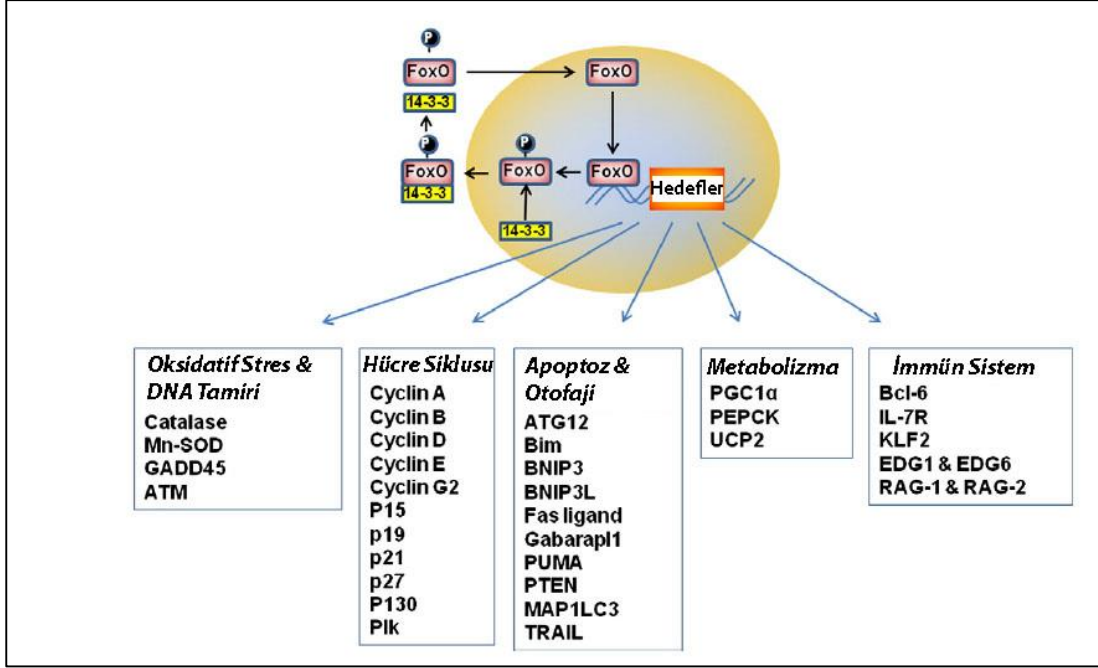
Şekil 2.17. FoxO proteinlerinin asetilasyonu ve ubikütilasyonu (Bocitto ve Kalb 2011).

2.10.6. FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Hücredeki ve Organizmadaki Rollerini

Evrimsel olarak korunmuş olan Forkhead ailesinin alt sınıfı olan FoxO transkripsiyon faktörleri birçok hedef genin transkripsiyonunu sağlayarak önemli hücresel süreçlerde görev alırlar (Kenneth Maiese 2009, Bocitto ve Kalb 2011).

FoxO transkripsiyon faktörleri; oksidatif stres, DNA tamiri, immünolojik süreçler, hücre siklusu, apoptoz, otofaji ve hücre metabolizması gibi süreçlerdeki rol oynayan birçok

genin transkripsiyonu gerçekleştirir. Bu hedef genlerin transkripsiyonel çıktıları metabolizma ve DNA tamir süreçlerini içerebileceği gibi, hücre siklusunun duraklaması, apoptoz ve otofaji gibi diğer süreçleri de içerebilir. Bu şekilde hücrede dayanıklılık, yaşam süresi, ölüm ve sağ kalım kararları ile hücrenin kaderini belirlerler (Carter ve Brunet 2007, Wang ve ark. 2014, Martins ve ark. 2016), (Şekil 2.18.).



Şekil 2.18. FoxO transkripsiyonları sonucu hücresel süreçteki rolleri (Zhang ve ark. 2011) numaralı kaynaktan düzenlenmiştir.

FoxO proteinleri asetilasyon ve ubikütilasyon mekanizmaları ile düzenlenerek fosforilasyon mekanizmalarının kontrolünde de transkripsiyon için nükleusa giriş-çıkışlarını gerçekleştirirler (Xie ve ark. 2012). Hücrede stres koşullarında, örneğin oksidatif stres meydana geldiği zaman, ROS detoksifikasyonunu sağlayan iki enzim olan katalaz ve mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) transkripsiyonu ile strese dayanıklılığı sağlarlar (Sedding 2008). Büyüme durdurucu ve DNA hasarı ile indüklenebilen protein 45 (GADD45) ve hasar spesifik DNA bağlayıcı protein 1 (DDB1) genlerinin upregülasyonu ile de DNA hasarının tamirinde rol alırlar.

FoxO ailesi, p21cip1 ve p27kip1 gibi genlerin transkripsiyonel düzenlemeleri ile hücre siklusunun duraklamasına neden olabilirler. Bu transkripsiyonlar ile hücre siklusunda görev alan siklinlerin (siklin A, B, D, E, G2) ekspresyonlarının azalışına neden olurlar.

Aynı şekilde hücre siklusu duraklamasında ekspresyonu artan retinoblastoma ailesi üyesi olan p130 molekülünün de transkripsiyonunu gerçekleştirerek hücrede FoxO-bağımlı G1 duraklamaya neden olur. FoxO'lar pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bim'in, TRAIL gibi ölüm sitokinlerinin ve ölüm reseptör ligandı olan FasL'nin transkripsiyonunu sağlayarak apoptozu başlatabilirler (Brunet *ve ark.* 1999, Gilley *ve ark.* 2003, Zhang *ve ark.* 2011).

FoxO moleküllerinin glikoz metabolizması üzerine de önemli etkileri bulunmaktadır. Bu etkisini, glikoz 6 fosfatı glikoza dönüştüren glikoz 6 fosfataz (GAPaz) enzim aktivitesini artırarak glukoneogenezi gerçekleştirerek yaparlar (Nakae *ve ark.* 2001).

FoxO ailesinin izoformlarına ve hücre tipine bağlı olarak hücrel farklanma sürecinde farklanmayı inhibe edici ve destekleyici fonksiyonları olabilir. Örneğin; adiposit ve miyoblastlarda aktif olan FoxO1 farklanmayı inhibe ederken (Nakae *ve ark.* 2003), FoxO3 eritrositlerde B hücresi translokasyon gen 1 (BTG1)'i indükleyerek farklanmayı destekleyici şekilde çalışmaktadır (Bakker *ve ark.* 2004).

2.10.7. FoxO Transkripsiyon Faktörleri ve Endometriyum

FoxO transkripsiyon faktörlerinin hücrel süreçteki önemli rolleri ve geni silinmiş fare modellerinde üreme sistemi bozukluklarının ortaya çıkması hakkındaki bulgular, FoxO'ların üreme sistemi alanınında da önemli bir araştırma konusu olmasını sağlamıştır. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular şöyledir; FoxO1 geni silinmiş farelerde anjiyogenez defektleri sonucu embriyonik 10,5. günde ölürlür, FoxO3 geni silinmiş dişi farelerde yaşa bağlı infertilite gözlenir, FoxO4 geni silinmiş farelerde ise belirgin bir fenotip gözlenmez (Greer ve Brunet 2005, Carter ve Brunet 2007).

Literatürde FoxO transkripsiyon faktörleri ve endometriyum ile ilişkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar esasen *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışmalardır. Yapılan çalışmalarda insan endometriyal stromal hücrelerin *in vitro* şartlarda desidualizasyonunda FoxO1'in indüklendiği, FoxO3'ün inhibe olduğu ve FoxO4'ün ise ekspre edilmediği gösterilmiştir (Christian *ve ark.* 2002, Labied *ve ark.* 2006). Yine *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda Akt aktivasyonunun bozulması ile

FoxO1'in nükleer birikimi olduğu ve bunun progesteronun etkisini arttırdığı ortaya konmuştur (Kyo 2011).

FoxO transkripsiyon faktörlerinin hücrel farklılaşma ile ilişkili rolleri hakkında yine insan endometriyumunda yapılan başka çalışmalarda ise, FoxO1'in insanda progesteron bağımlı olarak desidualizasyonu ve endometriyum farklılaşmasını indüklediği bildirilmiştir (Gellersen ve Brosens 2003, Grinius 2006, Kajihara *ve ark.* 2013).

FoxO1 ve FoxO3'ün endometriyumda; desidualizasyonda, menstural dökülmede ve gebelik boyunca oksidatif hasara karşı fetomaternal korumanın kritik bir düzenleyicisi olabilecekleri farklı ve sınırlı sayıda çalışmalarda bildirilmiştir (Grinius 2006, Kajihara *ve ark.* 2006).

2.10.8. Çalışmamızın Çıkış Noktası

Sağlıklı gebelik oluşumunda oosit, sperm ve embriyo kalitesinin yanı sıra, endometriyumun uygunluğu en önemli unsurlardandır. Pre-implantif embriyo gelişimine paralel olarak, endometriyumun implantasyona reseptif hale gelmesi gebeliğin gelişimi ve devam etmesindeki en kritik basamaklardan biridir. PI3K/Akt, peri-implantasyon sürecinde büyümeyi ve gelişmeyi destekleyen pek çok sinyal yollarından birisidir. Transkripsiyonel gen aktivasyonu görevlerini nükleusta gerçekleştiren ve aktiviteleri PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından düzenlen FoxO transkripsiyon faktörlerinin memelilerde FoxO1, FoxO3, FoxO4 ve FoxO6 olmak üzere dört üyesi vardır. FoxO ailesi; apoptozun düzenlenmesi, oksidatif strese karşı dayanıklılık, DNA tamiri ve hücrel farklılaşma gibi pek çok farklı süreçlerdeki rollerinden dolayı son yıllarda üreme sisteminde önemli bir araştırma konusudur. Tüm bu bilgiler; yoğun transkripsiyonel aktivasyonların olduğu peri-implantasyon sürecinde endometriyumda varlıkları bilinen PI3K/Akt gibi sinyal yollarının alt basamağı olarak çalışan FoxO transkripsiyon faktörlerinin de bu süreçte ekspresyonlarının ve buna bağlı rollerinin olabileceğini akla getirmiştir. Literatürdeki bilgiler ışığında bu çalışmada FoxO transkripsiyon faktörlerinin; östrus fazında (Kontrol), gebeliğin 1, 4, 5, 6 ve 8. günlerinde uterusda ekspresyonlarının olup olmadığı, varsa lokalizasyonlarının nasıl olduğunu *in vivo* olarak araştırılmıştır.

Ayrıca bu çalışma, blastosistten ve varlığının oluşturacağı mekanik etkiden bağımsız olarak sadece hormonal ortamın taklit edildiği yalancı gebelik modelinde ve blastosistin varlığının oluşturacağı mekanik etkinin taklit edildiği yapay desidualizasyon modelinde de FoxO protein ekspresyonlarının nasıl bir değişim gösterdiğini değerlendirmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu'nun 20.05.2015 tarihli 439 numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra yapılmıştır. Bu araştırmada Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edilen daha önce hiçbir deneye girmemiş ve çiftleşmemiş BALB/C ırkı dişi ve erkek fareler kullanılmıştır. Deneyde kullanılan fareler su ve besin kısıtlaması olmaksızın 12'şer saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde tutulmuştur. Erişkin olarak kabul edilen BALB/C ırkı 6-8 haftalık dişi fareler ve çiftleştirme için 12-18 haftalık BALB/C ırkı normal erkek fareler ile vazektomize edilmiş erkek fareler kullanılmıştır.

Deney bitiminde dişi fareler öncesinde eter ile bayıldıktan sonra servikal dislokasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Cerrahi işlemin uygulandığı fareler ise öncesinde tartılıp ağırlıklarına göre uygun ketamin/xylasin anestezi madde kombinasyonu intraperitonel olarak enjekte edilmiştir. Ketamin 100-200 mg/kg; xylasin ise 5-16 mg/kg dozunda kullanılmış olup anestezide alındıktan sonra cerrahi işlemler gerçekleştirilmiştir. Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuştur;

1. Kontrol (Östrus) Grubu (n=6)

2. Normal Gebelik Grubu

a) Gebeliğin 1. Günü (n=6) (NG-G1)

b) Gebeliğin 4. Günü (n=6) (NG-G4)

c) Gebeliğin 5. Günü (n=6)

-İmplantasyon alanı (NG-G5)

(Embriyonun endometriyuma tutunduğu uterus bölgeleri)

-İnter-implantasyon alanı (NG-G5-İ)

(Embriyonun endometriyuma tutunmadığı bölgeler)

d) Gebeliğin 6. Günü (n=6)

-İmplantasyon alanı (NG-G6)

(Embriyonun endometriyuma tutunduğu uterus bölgeleri)

-İnter-implantasyon alanı (NG-G6-İ)

(Embriyonun endometriyuma tutunmadığı bölgeler)

e) Gebeliğin 8. Günü (n=6) (NG-G8)

3. Yalancı Gebelik Grubu

a) Gebeliğin 5. Günü (n=6) (YG-G5)

b) Gebeliğin 6. Günü (n=6) (YG-G6)

c) Gebeliğin 8. Günü (n=6) (YG-G8)

4. Yapay Desidualizasyon Grubu

a) Gebeliğin 5. Günü (n=6) (YD-G5 ve YDK-G5)

b) Gebeliğin 6. Günü (n=6) (YD-G6 ve YDK-G6)

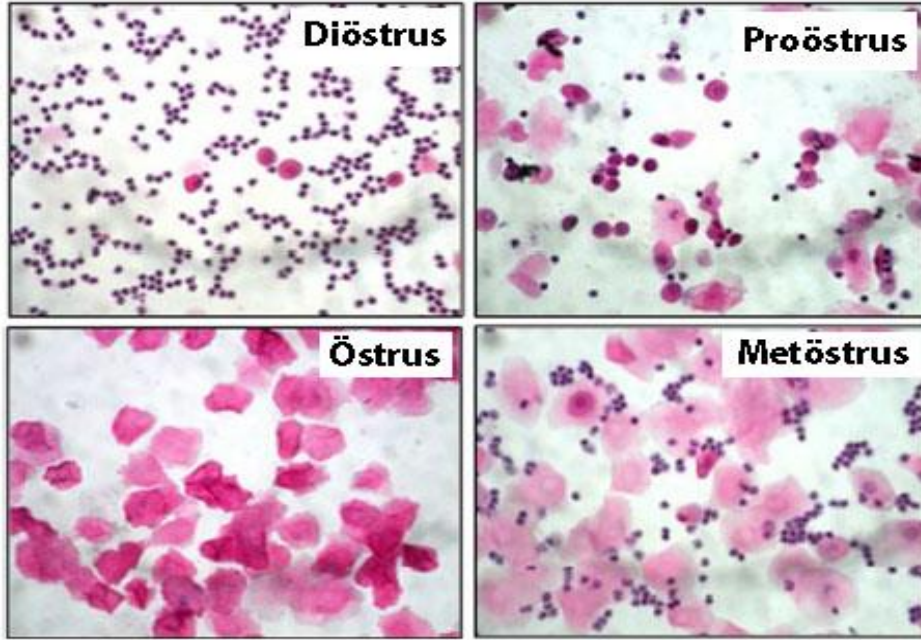
c) Gebeliğin 8. Günü (n=6) (YD-G6 ve YDK-G6)

3.1. Grupların Oluşturulması

3.1.1. Kontrol Östrus Grubunun Oluşturulması

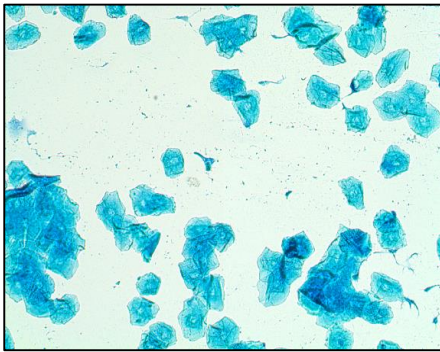
Bu grupta gebe olmayan farelerden alınan vajinal smearlerden, yayma işlemi sonrasında gözlemlenen hücresel elemanlara göre östrus fazı belirlenmiştir.

Östrus siklusu fazlarını belirlemek için smear yaymalarında lökosit, nükleuslu ve nükleusunu kaybetmiş epitel hücrelerinin birbirine sayıca oranları gözlemlenerek fazlar belirlenmiştir. Diöstrusta çok yoğun bir şekilde lökosit ve nadir nükleuslu epitel gözlemlenir. Proöstrus fazında, çoğunlukla nükleuslu ve nükleusunu kaybetmiş epitel hücreleri ile birlikte az sayıda lökositler yer almaktadır. Östrus fazında ise sadece çok sayıda nükleuslarını kaybetmiş epitel hücreleri (yassı epitel) bulunmaktadır. Metaöstrus fazında nükleuslarını kaybetmiş epitel hücreleri ve lökositler gözlemlenir (Ashleigh C. McLean 2012, Maria Laura Zenclussen 2014), (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Dişi farelerde östrus siklusunun fazlarına göre değişen hücresel elemanlar (Maria Laura Zenclussen 2014).

Östrus siklusunun östrus fazında olduğu belirlenen (Şekil 3.2.) farelerin uterusları deneye alınmıştır.



Şekil 3.2. Östrus fazında olan fareye ait vajinal smear yayması.

3.1.2. Normal Gebelik Gruplarının Oluşturulması

Dişi ve erkek fareler her kafeste bir erkek ve bir dişi olmak üzere gece boyunca çiftleşmeye bırakılmıştır. Ertesi sabah dişi farede vajinal plak tespiti yapıp, vajinal plak görüldüğü gün gebeliğin 1. günü olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.3.)



Şekil 3.3. Dişi farelerde vajinal plak tespiti.

NG-G1: Farelerde gebeliğin 1. gününde zigot ya da 2 hücreli embriyo oviduktta bulunmaktadır (Martin ve Finn 1970). Fertilizasyonu tespit etmek ve gebelikten emin olmak amacıyla incelenmek üzere bu gündeki uterusların oviduktları alınmıştır. Alınan oviduktlar petri kabında PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat Tamponlu Tuz) solüsyonu damlası içinde parçalanıp stereomikroskop altında zigot ya da 2 hücreli embriyo gözlemlendikten (Şekil 3.4.) sonra uteruslar alınmıştır.



Şekil 3.4. Gebeliğin 1. günündeki 2 hücreli fare embriyo görüntüsü

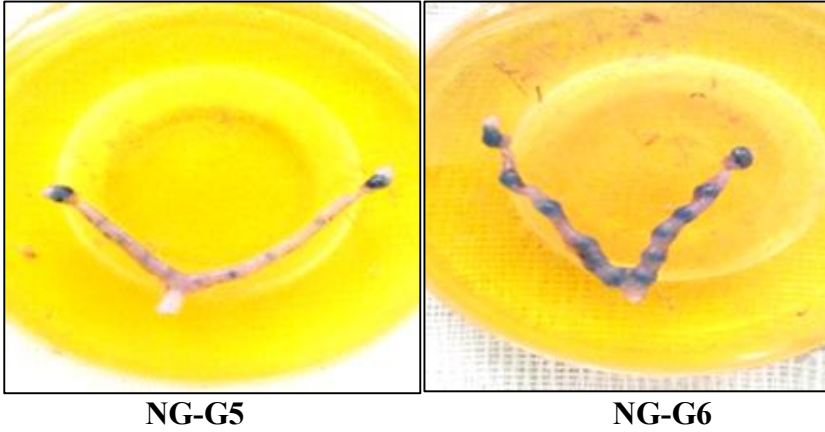
NG-G4: Farede gebeliğin 4. gününde blastosist uterus lümeninde yüzer haldedir (Martin ve Finn 1970). Bu gündeki uterusun tek boynuzu gebelik tayini için petri kabında PBS solüsyonu ile yıkanmıştır ve stereomikroskop altında blastosistler gözlemlendikten (Şekil 3.5.) sonra uterusun diğer boynuzu deneye alınmıştır.



Şekil 3.5. Gebeliğin 4. gününde fare blastosist görüntüsü

NG-G5, NG-G5-İ, NG-G6, NG-G6-İ: Fare gebeliğin 5. günde embriyonun endometriyuma tutunması sonucunda blastosistin olduğu bölgede stromal vasküler geçirgenlik bölgesel olarak artış gösterir ve mavi renkteki bazı makromoleküler boyaların intravenöz enjeksiyonu ile bu durum gözlenebilir (Morrow *ve ark.* 1992).

Gebeliğin tespiti için 5. ve 6. günündeki uterusların çoklu implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1'lik Chicago mavisi (Sigma, C8679) intravenöz enjeksiyonu yapılarak 3-4 dakika sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Uterusta gözlemlenen mavi bantlar şeklindeki implantasyon bölgeleri ve beyaz bantlar şeklindeki inter-implantasyon bölgeleri (Şekil 3.6.) ayrı ayrı deney grubuna alınmıştır.



Şekil 3.6. Fare gebeliğinin 5. ve 6. günündeki implantasyon ve interimplantasyon alanları.

NG-G8: Gebeliğin 8. gününde uterustaki implantasyon bölgeleri göz ile seçilebilir ve (Alam *ve ark.* 2007) her bir implantasyonun ilerlediği ayrı ayrı tomurcuk şeklindeki yapılar alınmıştır (Şekil 3.7.).



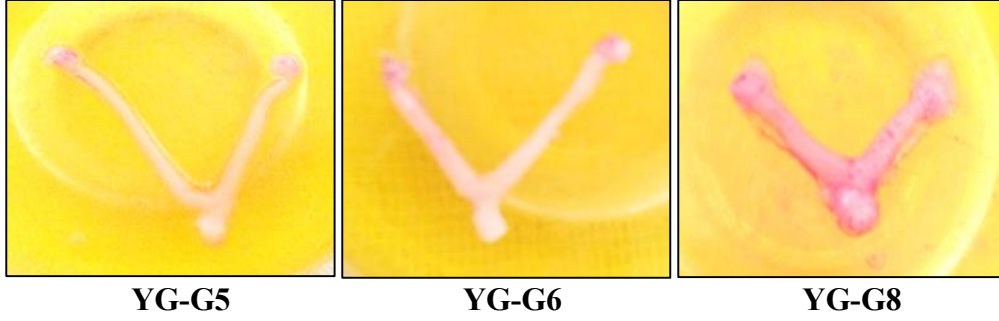
NG-G8

Şekil 3.7. Fare gebeliğinin 8. günündeki ilerlemiş implantasyon alanları.

3.1.3. Yalancı Gebelik Gruplarının Oluşturulması

Bu model, blastosistten ve oluşturacağı mekanik etkiden bağımsız olarak sadece hormonal ortamın taklit edildiği yalancı gebelikte FoxO protein ekspresyonlarının nasıl bir değişim gösterdiğini değerlendirmek amacıyla oluşturulmuştur. Yalancı gebelik modelinde dişi fareler vazektomize edilmiş erkek fareler ile gece siklusu boyunca çiftleştirmeye bırakılmıştır (Liu *ve ark.* 2013, Bermejo-Alvarez *ve ark.* 2014, Kumar *ve ark.* 2015, Li *ve ark.* 2015). Bu modeli oluşturmak için kullanılan 8-10 haftalık erişkin erkek farelere cerrahi işlem uygulanarak üreme kanalı duktus deferensin kısa bir bölümünün çıkarılması gerçekleştirilmiştir. Cerrahi girişim ile testiste üretilen spermleri diğer üreme kanallarına bağlayan duktus deferensin iki ayrı noktası sutur ile bağlandıktan sonra, ortadaki küçük parçanın çıkarılmasıyla seminal sıvıya spermlerin geçişi engellenmiştir (Liu *ve ark.* 2013, Bermejo-Alvarez *ve ark.* 2014, Kumar *ve ark.* 2015). Erkek fareler hem iyileşme süreçleri için hem de üreme sistemi kanallarında bulunabilecek spermlerin atılması için 2-3 hafta beklenildikten sonra çiftleştirmeye atılmıştır.

YG-G5, YG-G6 ve YG-G8: Dişi farelerin vazektomize erkekler ile gece siklusuna bırakılarak çiftleştirilmesi sağlanmıştır. Çiftleşme sonucunda dişi farede vazektomize erkek farenin üreme sistemi bezlerinin salgıları ile oluşan ve sperm içermeyen vajinal plak tespiti yapılmıştır. Farelerde vajinal plak görüldüğü gün yalancı gebeliğin 1. günü olarak kabul edilmiş ve 5. , 6. ve 8. günlerdeki uteruslar elde edilmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Yalancı gebelik günlerindeki uterus görüntüleri.

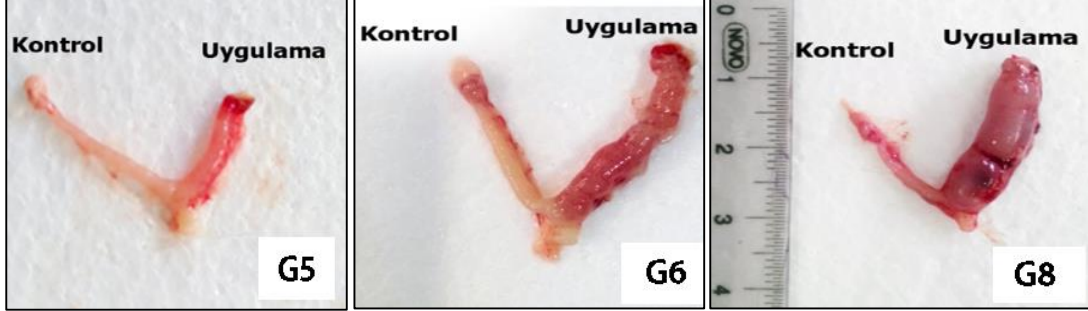
3.1.4. Yapay Desidualizasyon Gruplarının Oluşturulması

Bu modelde blastosistin oluşturacağı mekanik etkinin taklit edilerek desidualizasyon yapay bir şekilde indüklenmiştir. Yapay desidualizasyon modeli, sadece desidualizasyonun gerçekleştiği embriyosuz ortamda FoxO protein ekspresyonlarının nasıl bir değişim gösterdiğini değerlendirmek amacıyla oluşturulmuştur. Bu modelin oluşturulması için yalancı gebelik grubundaki gibi dişi fareler ve vazektomize edilmiş erkek fareler gece siklusu boyunca çiftleştirmeye bırakılmıştır. Aynı şekilde dişi farede erkek üreme sistemi bezlerinin salgıları ile oluşan ve sperm içermeyen vajinal plak tespiti yapıp vajinal plak görüldüğü gün yalancı gebeliğin 1. günü olarak kabul edilmiştir.

Yalancı gebelik modelinden farklı olarak bu grupta yapay desidualizasyonun sağlanması için, gebeliğin 4. gününde uterus lümeninde mekanik bir etki oluşturmak gereklidir. Bu etki için farklı mısır yağı zeytinyağı gibi yoğun sıvılar kullanılabilmeyle birlikte çoğunlukla susam yağı tercih edilmektedir. Uterusa fare yalancı gebeliğinin 4. gününde bu yoğun sıvıların belli miktarlardaki intralüminal enjeksiyonu ile uterus stromasında desidualizasyonu 10. güne kadar sürdürmek mümkündür (Deb ve ark. 2006, Liu ve ark. 2013, Bermejo-Alvarez ve ark. 2014, Davila ve ark. 2015, Kumar ve ark. 2015, Li ve ark. 2015).

YD-G5, YDK-G5; YD-G6, YDK-G6 ve YD-G8, YDK-G8: Bu gruptaki dişi farelere yalancı gebeliğinin 4. gününde (09.00-09.30) mini-laparotomi cerrahi girişimi ile uterusun tek boynuzuna utero-tubal olarak yavaş bir şekilde 50 µl susam yağı (Sigma, susame oil, S3547) enjeksiyonu yapılmıştır. Diğer boynuz alt kontrol grubu oluşturmak

amacıyla herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Bu işlemden sonra yalancı gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerdeki desidual ve kontrol uterus boynuzları elde edilmiştir (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Yapay desidualizasyon oluşturulan gruplarda uterus görüntüleri.

3.2. Doku Takibi ve Parafine Gömme

Tüm gruplardan elde edilen uterus dokuları parafin doku takibi yapılmak üzere %5'lik formalin çözeltisi içerisine alındı. Bu çözeltide 12-24 saat bekletilerek dokunun fiksasyon işlemi sağlandı. Fiksatifin uzaklaştırılması için 4-5 saat boyunca çeşme suyu ile yıkandıktan sonra birer gün boyunca sırasıyla %70, %80, %90 alkol serilerinde bekletildi. Ertesi gün son olarak 3 saat %100 lük alkolde bekletildikten sonra ksilol ile şeffaflaştırma işlemi ve sonrasında parafine gömme işlemi gerçekleştirildi.

3.3. İmmünohistokimya

FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi için immünohistokimya tekniği uygulanmıştır. Analizde kullanılmış olan primer ve sekonder antikorlar uygulandıkları dilüsyonlar ile birlikte Tablo3.1'de gösterilmiştir.

1. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler, Poli L-Lizin kaplı lamalar üzerine alınarak bir gece 56 °C'lik etüvde bekletildi.
2. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirilip her birinde 5 dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinde bekletildi. Son olarak 5 dakika boyunca distile suda bekletildi.

3. Daha sonra antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla sitrat tamponu çözeltisinde (pH:6.0) 750 watt'ta 7 dakika boyunca kaynatılarak antijen retrieval uygulaması yapıldı ve 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı.
4. Soğuyan kesitler distile suda yıkandıktan sonra, dokuda endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için %3'lük hidrojen peroksit solusyonu (63ml metanol+7ml hidrojen peroksit) ile kesitler 15 dakika muamele edildi.
5. Bu işlemden sonra kesitler PBS (Phosphate Buffer Salin, pH: 7.2-7.4) solusyonunda 3 kez 5'er dakika yıkandı ve hidrofobik kalemle dokuların etrafı çizildi.
6. Oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla, bloklama serumu (Ultra V Block THERMO TA-125-UB) ile 7 dakika muamele edildi.
7. Bloklama işleminden sonra primer antikorlar kullanma kılavuzlarında belirtilen dilüsyonlarda ve miktarlarda kesitler üzerine uygulanmıştır. Negatif kontrol için kullanılacak kesitlere primer antikor ile aynı protein miktarında izotip kontrol uygulandı ve +4 derecede gece boyu kesitler inkübe edildi.
8. Ertesi gün PBS solusyonunda 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra hazırlanan sekonder antikor kesitler üzerine damlatılarak 60 dakika oda ısısında (25 derece) bekletildi.
9. Sekonder antikor ile inkübasyondan sonra PBS solusyonunda 3 kez 5'er dakika yıkanan kesitler streptavidin peroksidaz solüsyonu (THERMO, TS-125-HR) ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
10. İnkübasyondan sonra DAB (Di-Amino Benzidine, SIGMA, DA168) kromojeni uygulanarak reaksiyon görünür hale getirildi.

Kesitlere GILL III Hematoksilen (Merck) ile zıt boyama yapıldı ve rehidratasyondan sonra kesitler entellan (Merck) ile kapatıldı. Sonrasında FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 boyanmaları ışık mikroskobunda değerlendirilerek fotoğaflandı.

Tablo 3.1. : İmmünohistokimya analizlerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyon oranları.

Primer Antikor/Kullanılan Dilüsyon	Katalog Numarası	Sekonder Antikor /Kullanılan Dilüsyon	Katalog Numarası
FoxO1 1:100	CELL SIGNALING 2880S	Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG 1:500	VECTOR - BA 1000
FoxO3 1:100	CELL SIGNALING 12829S	Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG 1:500	VECTOR - BA 1000
FoxO4 1:100	SANTA CRUZ sc-25359	Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG 1:500	VECTOR - BA 1000

3.4. Histolojik Skorlama (H-Score) Analizi

Her bir kesit için ışık mikroskobu altında 40X büyütmede kesit düzleminde bulunan uterus endometriyum tabakalarındaki lümen epiteli, bez epiteli, endotel ve stromal hücrelerdeki sitoplazmik veya nükleer boyanmaları incelenmiştir. H-Score analizleri boyanma yoğunluklarına göre; 0 (boyanma yok), +1 (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma), +2 (orta şiddetli boyanma) ya da +3 (yoğun boyanma) değerleri verilerek aşağıdaki formülde hesaplamalar gerçekleştirilmiştir (Hirsch *ve ark.* 2003, Ishibashi 2003, John *ve ark.* 2009).

H-Score Formülü: $[1 \times (\% \text{ hücrelerin } 1+) + 2 \times (\% \text{ hücrelerin } 2+) + 3 \times (\% \text{ hücrelerin } 3+)]$ Skorlama sonucunda ekspresyon yoğunluğunu ifade eden değer aralığı 0 ile 300 arasındadır (Hirsch *ve ark.* 2003, Ishibashi 2003, John *ve ark.* 2009).

Örneğin; Lümen epiteli yapısını oluşturan tüm hücreler yoğun bir şekilde boyanıyor ise: $1x (\%0) + 2x(\%0) + 3x(\%100) = 300$ değeri ortaya çıkmaktadır.

3.5. İstatistiksel Analizler

Her grup için hesaplanan H-score analiz verilerinin istatistiksel analizi, Varyans Analizi (ANOVA) ile yapılmıştır ve ortalama \pm standart hata (SEM) olarak hesaplanmıştır. Çoklu karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanılarak gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism versiyon 6.0 programı ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

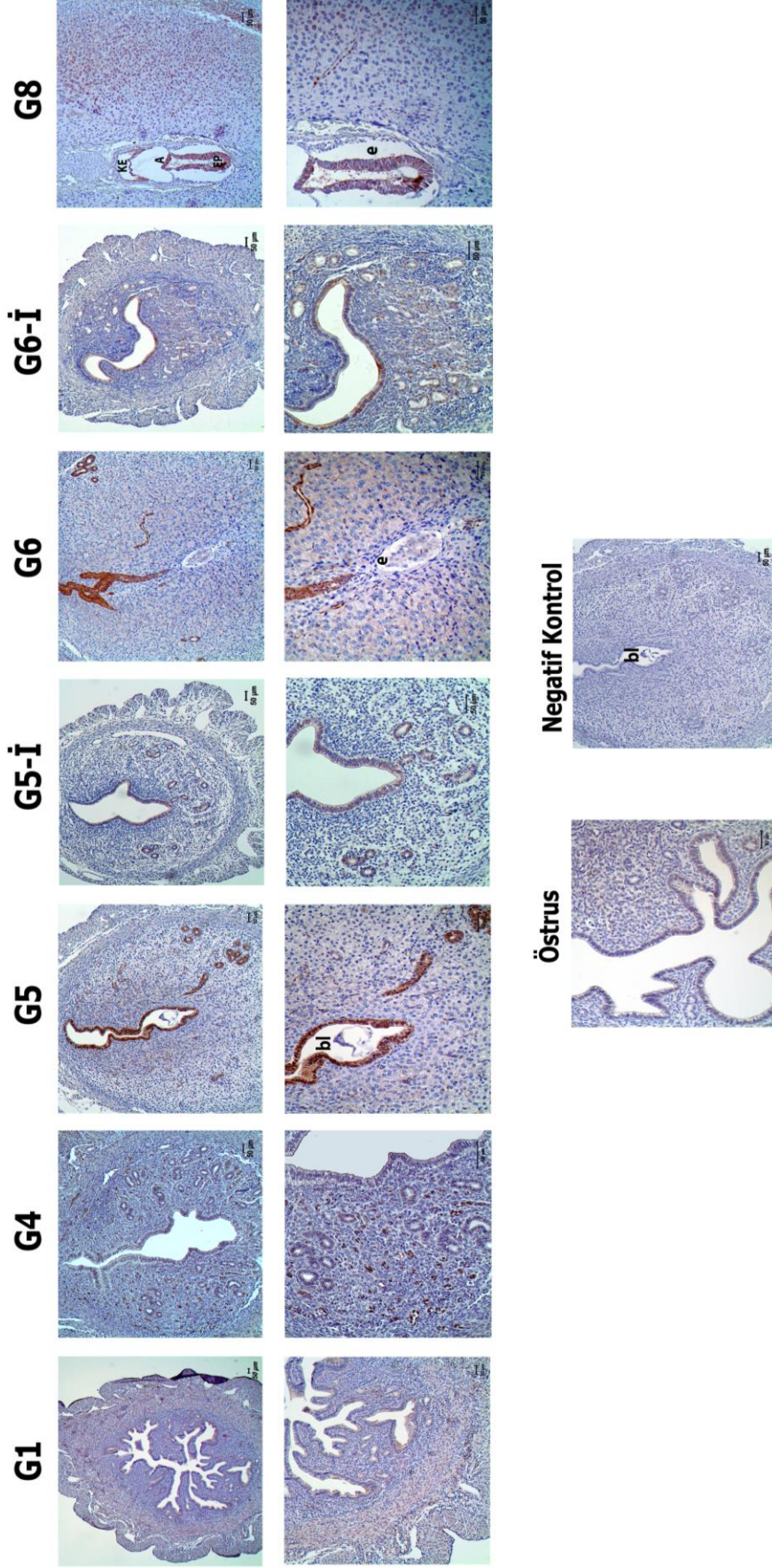
Yapılan bu çalışmada östrus fazı, normal gebelik peri-implantasyon süreci, yalancı gebelik ve yapay desidualizasyon modelleri oluşturulmuş fare endometriyumlarındaki FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 protein ekspresyonları ve yerleşim yerleri immünohistokimya yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

4.1.1. Peri-implantif Dönem Fare Endometriyumunda FoxO1 Protein

Ekspresyonları

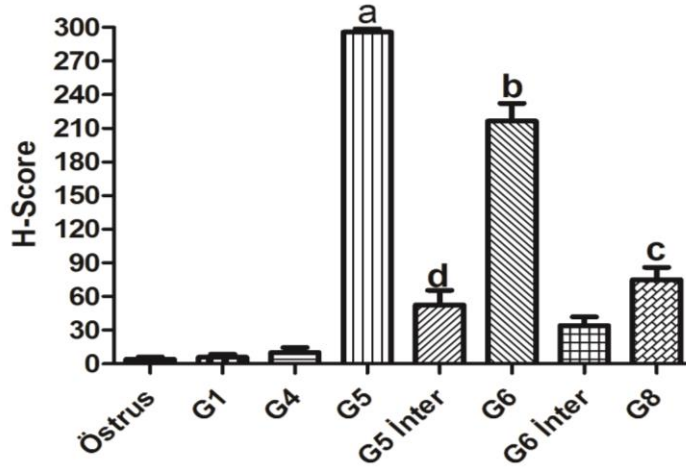
Peri-implantasyon sürecinde fare gebeliğinin 1, 4, 5, 6, 8. günlerindeki ve östrus fazındaki uteruslarda FoxO1 protein varlığı ve lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.1.). Gebelik günleri ve östrus fazındaki FoxO1 ekspresyon düzeyleri; H-score analizleriyle lümen epiteli, bez epiteli, endotel ve stromadaki lokalizasyonlarına göre ayrı ayrı karşılaştırıldı.

İmmünohistokimya sonuçlarına göre, FoxO1'in gebeliğin 1, 4, 5, 6, 8. günlerindeki ve östrus fazındaki uterus dokularında gebelik günlerine göre farklı lokalizasyon ve yoğunlukta olmakla birlikte genel olarak nükleer ekspresyonu gözlemlendi. Kontrol grubu olarak gebeliğin olmadığı östrus fazında endometriyumda birkaç stroma hücresi dışında belirgin bir FoxO1 ekspresyonu yoktur (Şekil 4.1.). Gebeliğin 1. gününde ve 4. gününde endometriyum stromasında bazı hücrelerde nükleer FoxO1 ekspresyonu görülmekle birlikte, gebeliğin 4. gününde neredeyse tüm endotel yapılarında yoğun bir nükleer ekspresyon vardır. Gebeliğin 5.ve 6. gününde implantasyon alanlarında lümen epiteli ve bezlerde şiddetli nükleer FoxO1 ekspresyonu izlendi. Bu ekspresyon gebeliğin 8. gününde nispeten azalırken, 5. ve 6. günlerdeki inter-implantasyon alanlarında ise yok denecek kadar azdır (Şekil 4.1.). Ayrıca 4. günde endoteldeki FoxO1 ekspresyonu gebeliğin 5, 6 ve 8. günlere doğru nispeten azalarak devam etmektedir. Gebeliğin 8. gününde ise; FoxO1'in endometriyum stromasında orta dereceli ve nükleer ekspresyonu vardı. Bu ekspresyon daha çok sekonder desidual alanda izlendi. Ayrıca bu günde, gelişmekte olan embriyonun koryonik ektoderm, amniyon ve epiblast tabakasında belirgin FoxO1 ekspresyonu görüldü (Şekil 4.1.).



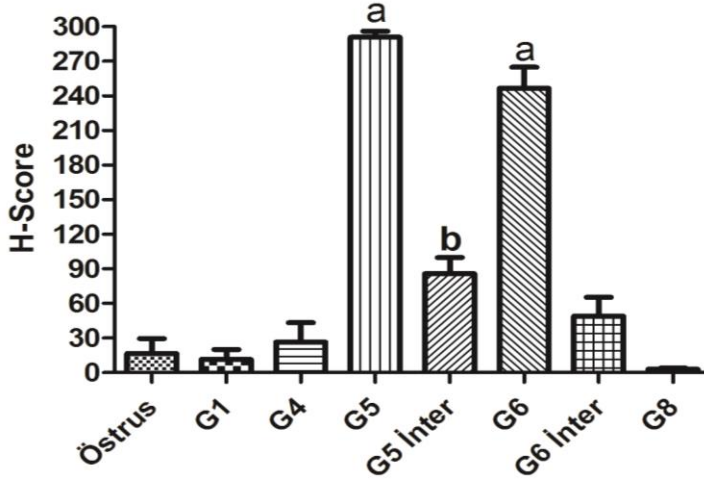
Şekil 4.1. Peri-implantatif dönem gebeliğin 1,4,5,6, 8. günleri ve östrus fazı fare endometriyumunda FoxO1 protein ekspresyonu. bl: blastosist, e: embriyo, KE: koryonik ektoderm, A: amniyon tabakası, EP: epiblast

Endometriyum lümen epitelinin FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; G5 grubu Östrus, G1, G4, G5İ, G6, G6İ, G8 gruplarına göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0.0001$); G6 grubu Östrus, G1, G4, G5İ, G6İ, G8 gruplarına göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0.0001$); G8 grubu Östrus, G1, G4, G6İ gruplarına göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0.05$); G5i grubu Östrus, G1, G4 gruplarına göre anlamlı olarak yüksektir ($p < 0.05$) (Şekil4.2.).



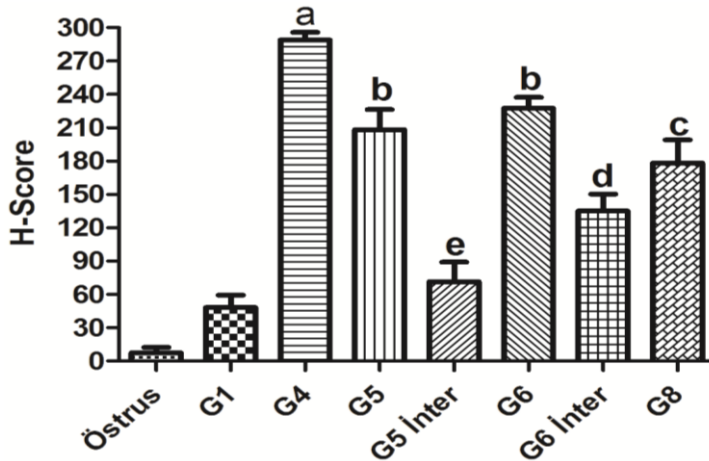
Şekil 4.2. Endometriyum lümen epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi. a: Östrus, G1, G4, G5İ, G6, G6İ, G8'e göre anlamlı ($p < 0.0001$); b: Östrus, G1, G4, G5İ, G6İ, G8'e göre anlamlı ($p < 0.0001$); c: Östrus, G1, G4, G6İ'ye göre anlamlı ($p < 0.05$); d: Östrus, G1, G4'e göre anlamlı ($p < 0.05$).

Endometriyum bez epitelinin FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; G5 ve G6 grupları Östrus, G1, G4, G5İ, G6İ, G8 gruplarına göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0.0001$); G5İ grubu ise Östrus, G1, G4, G8 gruplarına göre anlamlı olarak yüksektir ($p < 0.05$) (Şekil 4.3.).



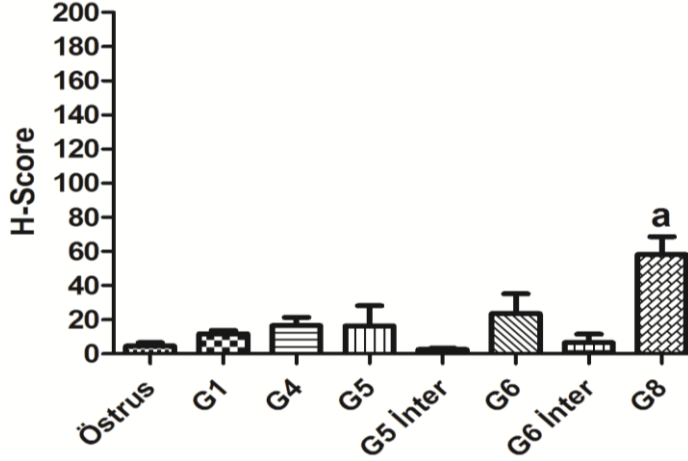
Şekil 4.3. Endometriyum bez epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi. a: Östrus, G1, G4, G5İ, G6İ, G8'e göre anlamlı($p < 0.0001$); b: Östrus, G1, G4, G8'e göre anlamlı ($p < 0.05$)

Endometriyum damar endotelinde FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; G4 grubu Östrus ve G1 gruplarına göre $p < 0.0001$; G5, G5İ, G6İ, G8 gruplarına göre ise $p < 0.05$ anlamlı olarak yüksektir. G5 ve G6 grupları Östrus ve G1 gruplarına göre $p < 0.0001$, G5İ, G6İ gruplarına göre ise $p < 0.05$ anlamlı olarak yüksektir. G8 grubu Östrus, G1, G5İ gruplarına göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0.05$); G6İ grubu Östrus, G1'e göre anlamlı artış($p < 0.05$); G5İ grubu Östrus grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p < 0.05$) (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Endometriyum damar endotelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi. a: Östrus, G1 ($p < 0.0001$), G5, G5İ, G6İ, G8'e göre anlamlı ($p < 0.05$); b: Östrus, G1 ($p < 0.0001$), G5İ, G6İ'ye göre anlamlı ($p < 0.05$); c: Östrus, G1, G5İ'ye göre anlamlı ($p < 0.05$); d: Östrus, G1'e göre anlamlı ($p < 0.05$); e: Östrus'a göre anlamlı ($p < 0.05$).

Endometriyum stromasında FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise; G8 grubu Östrus, G1, G4, G5İ, G6, G6İ, G8 gruplarına göre anlamlı ($p < 0.05$) artış göstermiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Endometriyum stromasında FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi
a: Östrus, G1, G4, G5İ, G6, G6İ, G8'e göre anlamlı ($p < 0.05$).

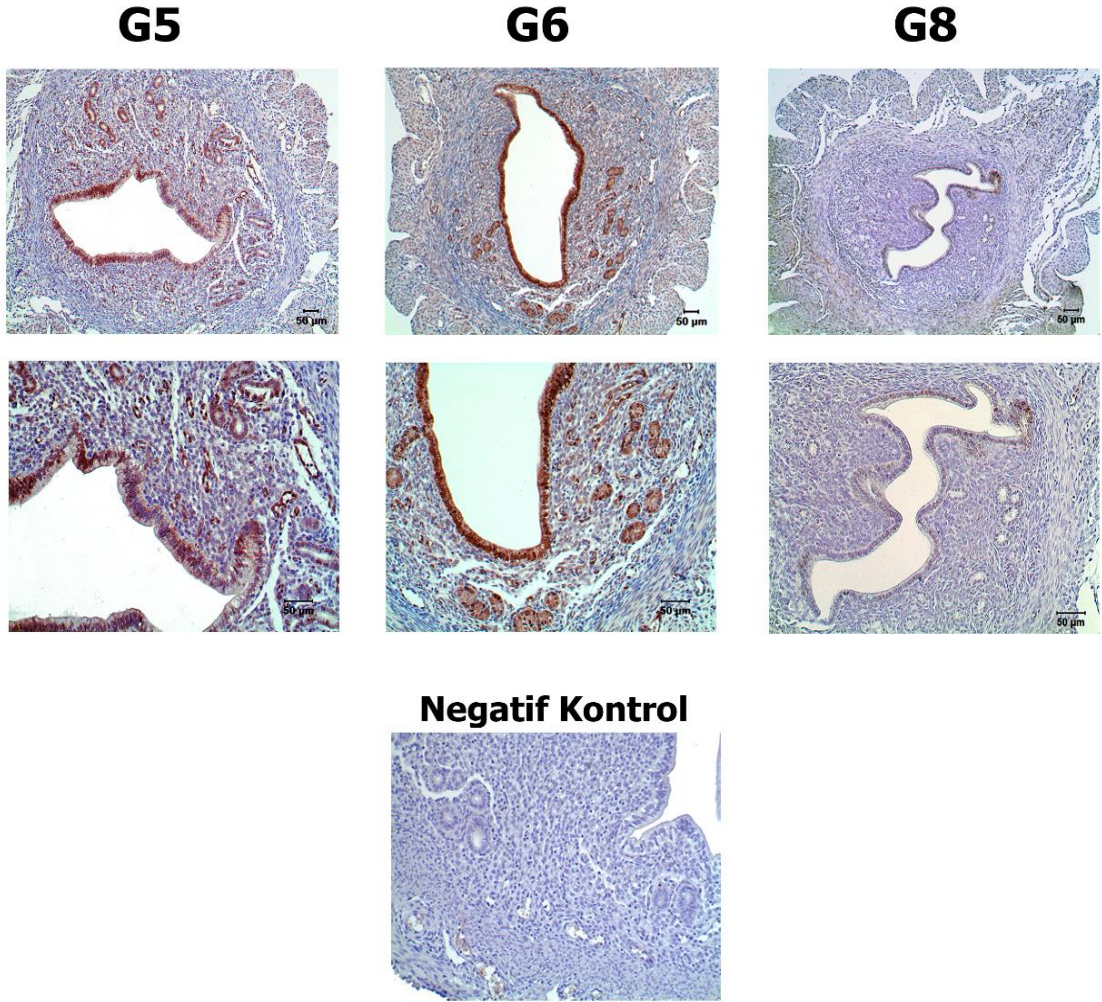
4.1.2. Yalancı Gebelik Oluşturulmuş Fare Modeli Endometriyumunda FoxO1

Protein Ekspresyonları

Yalancı gebelik oluşturulmuş fare modelinde gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO1 protein varlığı ve lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.6.). Yalancı gebelik günlerindeki FoxO1 ekspresyon düzeyleri H-score analizleri ile lümen epiteli, bez epiteli ve endotel lokalizasyonlarına göre ayrı ayrı karşılaştırıldı.

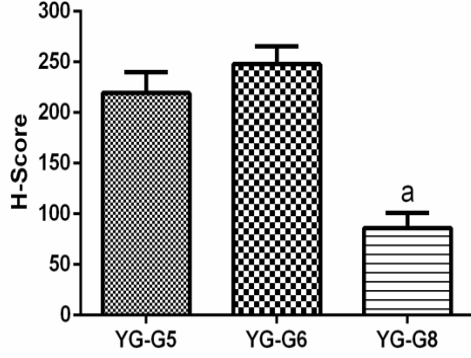
İmmünohistokimya sonuçlarına göre, FoxO1'in yalancı gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uterus dokularında günlere göre farklı yoğunlukta olmakla birlikte genel olarak nükleer ekspresyonu gözlemlendi. Bu ekspresyonlar esasen lümen epiteli, bez epiteli ve endotelde lokalize olup yoğun olarak nükleerdi. 5. günde lümen epitelindeki nükleer ekspresyon 6. güne gelince nispeten artmıştı (Şekil 4.6.). Ancak bu artış H-score analizleri sonucu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yalancı gebeliğin 8. gününde lümen epitelindeki nükleer ekspresyonlar gözle görünür derece dramatik ve istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir (Şekil 4.6.). Damar endotel ve bez epitelinde 5. ve 6. günlerdeki FoxO1

protein ekspresyon yoğunluğu birbirine benzerlik göstermekle birlikte H-score analizleri sonucu birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. 8. günde ise hem endoteldeki hemde bezdeki nükleer FoxO1 protein ekspresyonları dramatik bir şekilde düşerek, yok denecek kadar az nükleer ekspresyonlar izlenilmiştir (Şekil 4.6.). Bu modelde özellikle 5. ve 6. günlerde stromada hem nükleer hem de sitoplazmik FoxO1 ekspresyonları gözlemlenmiş olsa da skorlama yapılabilecek düzeyde değildir (Şekil 4.6.).



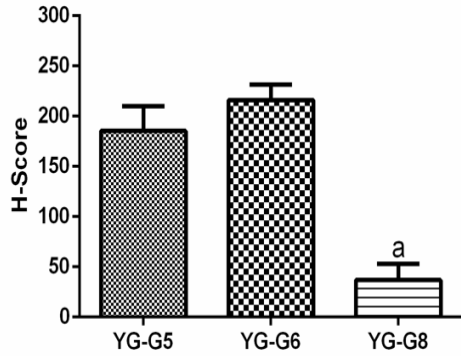
Şekil 4.6. Yalancı gebelik oluşturulmuş fare modelinde gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO1 protein ekspresyonu.

Endometriyum lümen epitelinin FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; YG-G8 grubu, YG-G5 ve YG-G6 gruplarına göre anlamlı olarak düşüktür ($p < 0.0001$) (Şekil 4.7.).



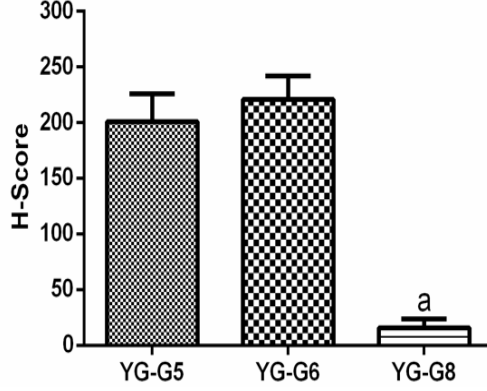
Şekil 4.7. Endometriyum lümen epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi. a: YG-G5 ve YG-G6'ya göre anlamlı ($p < 0.0001$).

Endometriyum bez epitelinin FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; YG-G8 grubu, YG-G5 ve YG-G6 gruplarına göre anlamlı olarak düşüktür ($p < 0.0001$) (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Endometriyum bez epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi. a: YG-G5 ve YG-G6'ya göre anlamlı ($p < 0.0001$).

Endometriyum damar endotelinde FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; YG-G8 grubu, YG-G5 ve YG-G6 gruplarına göre anlamlı olarak düşüktür ($p < 0.0001$) (Şekil 4.9.).



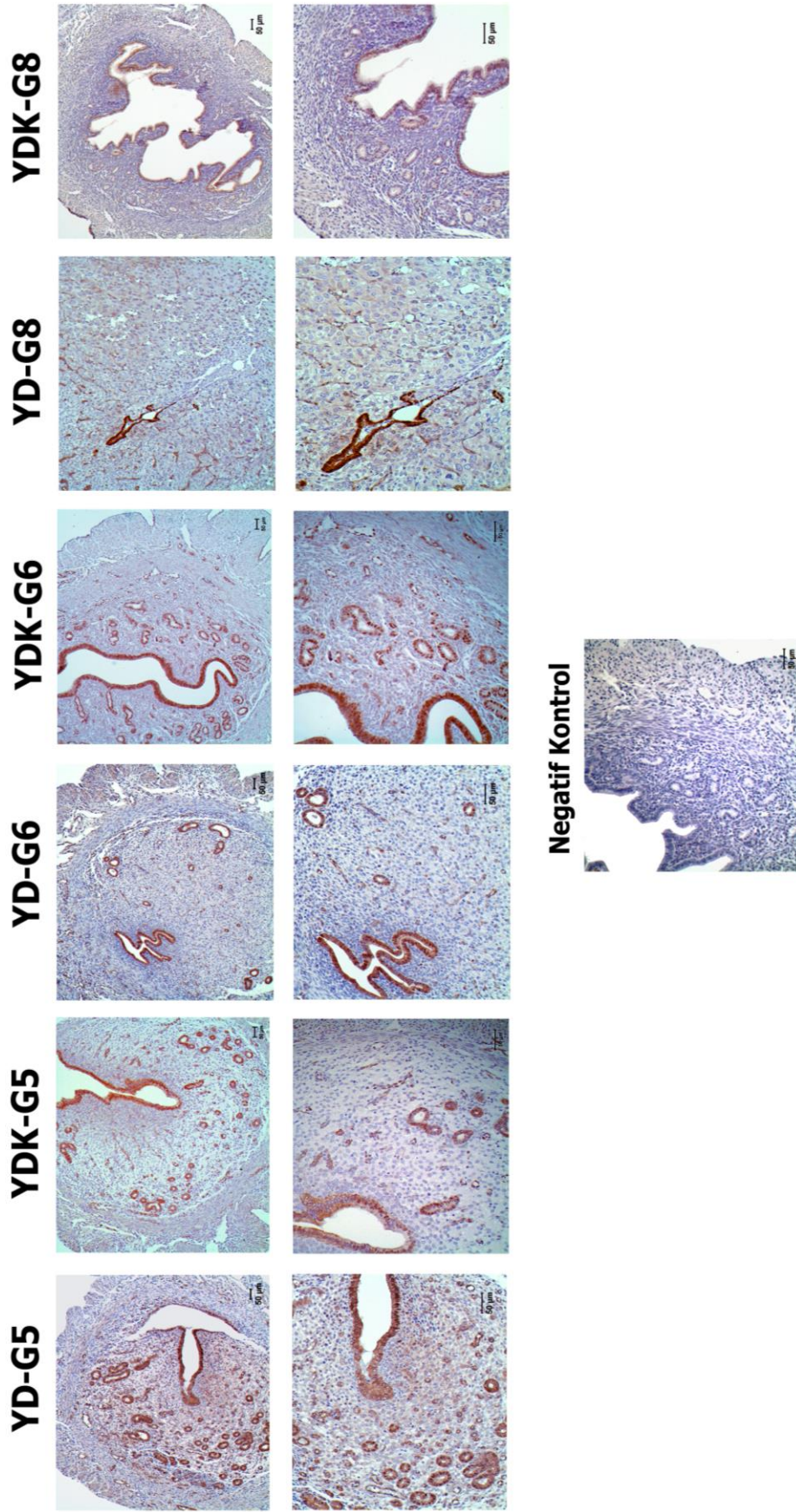
Şekil 4.9. Endometriyum damar endotelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi. a: YG-G5 ve YG-G6'ya göre anlamlı ($p < 0.0001$).

4.1.3. Yapay Desidualizasyon Oluşturulmuş Fare Endometriyumunda FoxO1 Protein Ekspresyonları

Yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modelinde 5, 6 ve 8. günlerdeki uteruslarda FoxO1 protein varlığı ve lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.10.). Oluşturulan modelde yalancı gebelik günlerindeki FoxO1 ekspresyon düzeyleri H-score analizleri ile lümen epiteli, bez epiteli ve endotel lokalizasyonlarına göre ayrı ayrı karşılaştırıldı.

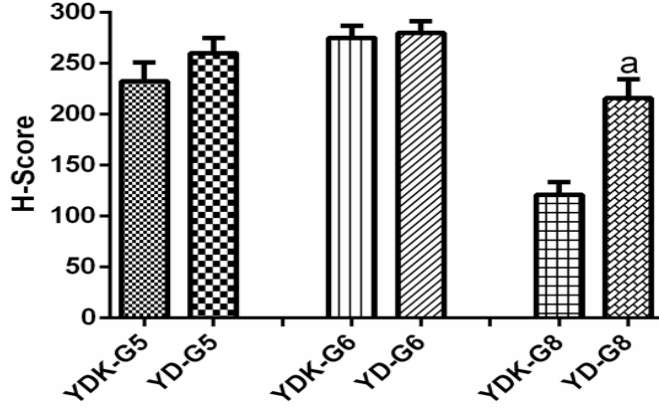
İmmünohistokimya sonuçlarına göre, FoxO1'in yapay desidualizasyon modelinde 5, 6 ve 8. günlerde hem desidual hem de kontrol uterus dokularında esasen lümen epiteli, bez epiteli ve damar endotelinde lokalize olup yoğun olarak nükleer ekspresyonu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10.).

Bu günlerdeki yapay desidual gruplar arasında lümen epiteli, bez epiteli ve endoteldeki FoxO1 ekspresyonlarının H-score analizleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermemektedir. Ancak lümen epiteli, bez epiteli ve endoteldeki nükleer ekspresyonlar normal gebelik süreci ve yalancı gebelik sürecindeki kadar yoğun gözlemlenmiştir (Şekil 4.10.). Yapay desidualizasyonun uygulanmadığı (desidual uterus boynuzlarının diğer eşi) kontrol uteruslarda 5. ve 6. günlerde de lümen epiteli, bez epiteli ve endoteldeki FoxO1'in nükleer ekspresyonları normal gebelik süreci ve yalancı gebelik sürecindeki kadar yoğun gözlemlenmiştir (Şekil 4.10.).



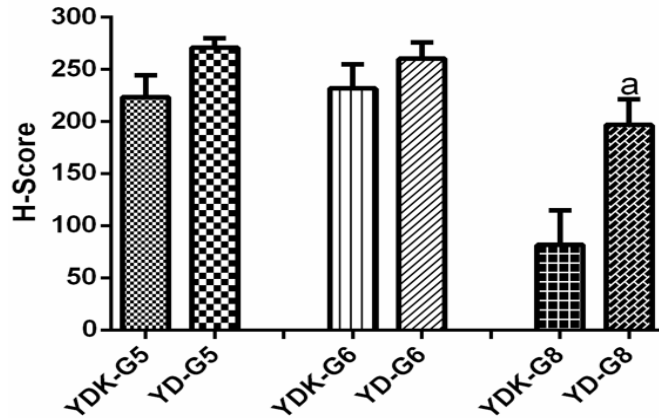
Şekil 4.10. Yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modelinde 5, 6 ve 8. günlerdeki uteruslarda FoxO1 protein ekspresyonu.

Endometriyum lümen epitelinde FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; YD-G8, YDK-G8 grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.005$) (Şekil 4.11.).



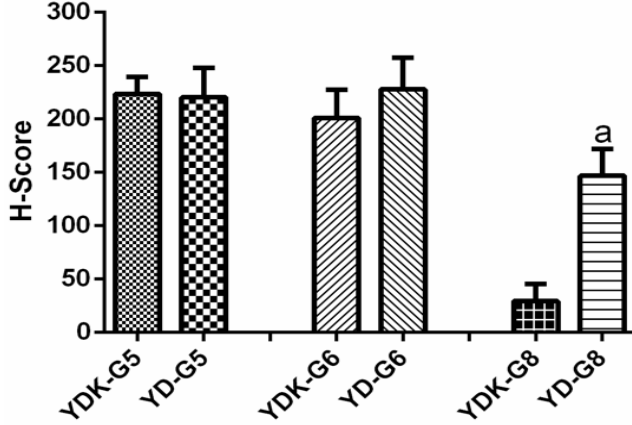
Şekil 4.11. Endometriyum lümen epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi.
a: YDK-G8'e göre anlamlı ($p < 0.005$).

Endometriyum bez epitelinde FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; YD-G8, YDK-G8 grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.05$) (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Endometriyum bez epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi.
a: YDK-G8'e göre anlamlı ($p < 0.05$).

Endometriyum damar endotelinde FoxO1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; YDK-G8, YD-G8 grubuna göre anlamlı derecede düşüktür (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Endometriyum endotelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi.
a: YD-G8'e göre anlamlı ($p < 0.05$).

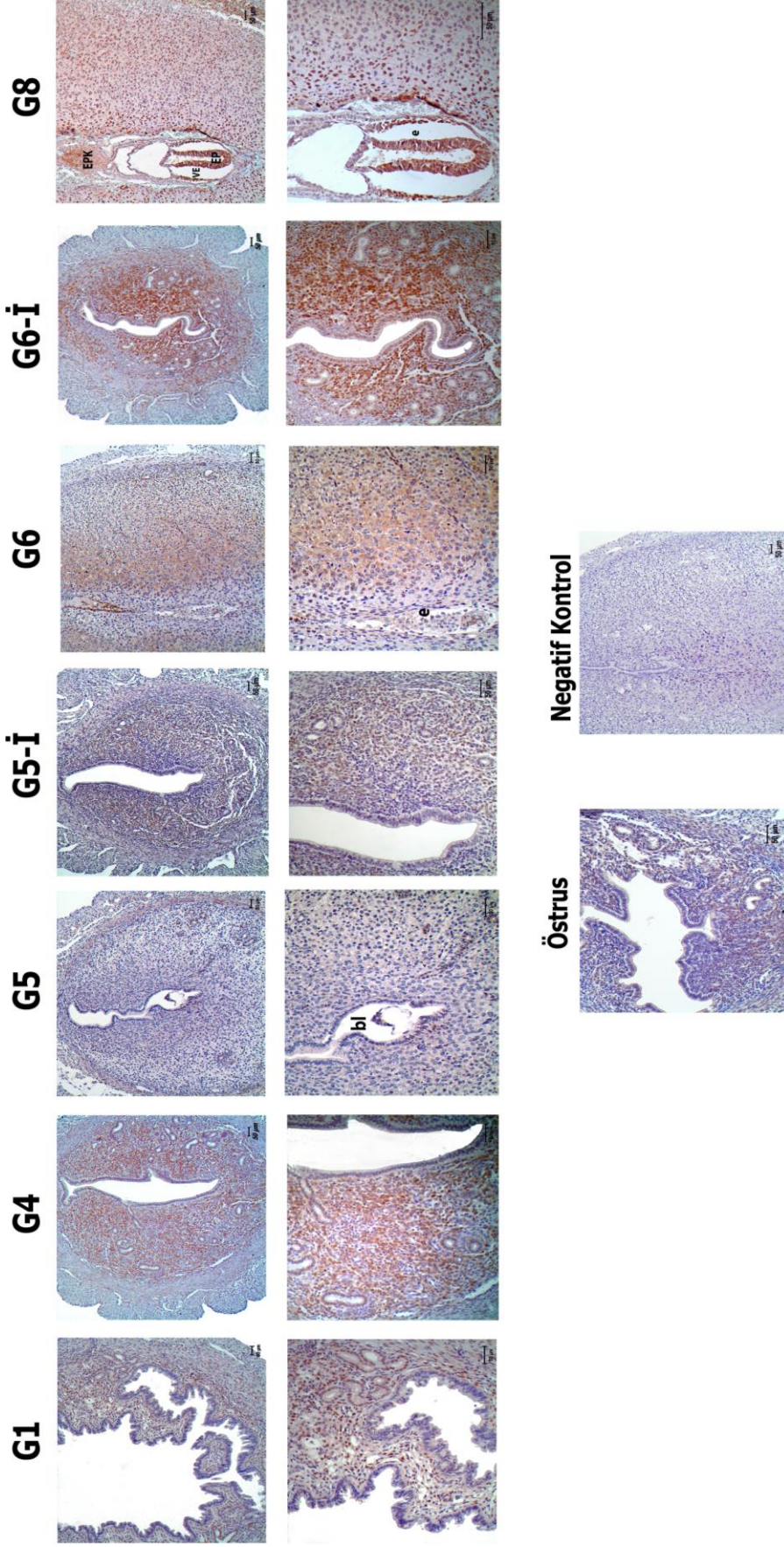
4.1.4. Peri-implantif Dönem Fare Endometriyumunda FoxO3 Protein Ekspresyonları

Peri-implantasyon sürecinde fare gebeliğinin 1, 4, 5, 6, 8. günlerindeki ve östrus fazındaki uteruslarda FoxO3 protein varlığı ve lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.14). Gebelik günleri ve östrus fazındaki FoxO3 ekspresyon düzeyleri H-score analizleri ile endometriyumdaki lokalizasyonlarına göre karşılaştırıldı. İmmünohistokimya sonuçlarına göre, FoxO3 proteini peri-implantasyon sürecinde çoğunlukla stromada ekspre oluyordu. Bu ekspresyonlar bazı gebelik günlerinde ve implantasyon/interimplantasyon alanlarında değişim göstererek nükleer ya da sitoplazmikti.

FoxO3 proteininin sitoplazmik ve nükleer ekspresyonu gebeliğin 1,4, 6 ve 8. günlerinde gözle görünür derecede stromada yoğun olmasına rağmen, 5.günde implantasyon alanında yok denecek kadar azdır ve inter-implantasyon alanında zayıf nükleer ekspresyonu gözlemlendi. Gebeliğin 6. gününde, stromada özellikle sekonder desidual alanda FoxO3 ekspresyonu neredeyse tamamen sitoplazmik izlenirken, inter-implantasyon alanında

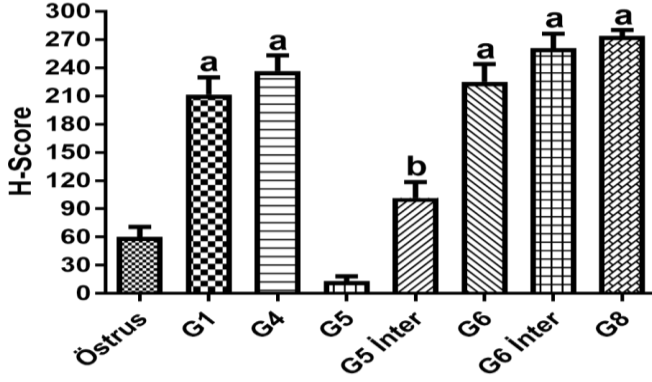
yoğun ve büyük çoğunlukta nükleer görünmektedir. Gebeliğin 8. gününe gelindiğinde desidual alanda yoğun nükleer FoxO3 ekspresyonu izlenmektedir. Ayrıca 5. gündeki blastosist iç hücre kitlesinde zayıf sitoplazmik ekspresyonu ile birlikte 8. günde gelişmekte olan embriyonun ektoplasental yapı, visseral endoderm ve epiblast tabakasında belirgin ekspresyon görüldü. Östrus fazında FoxO3 proteinin stromadaki ekspresyonu çok zayıf gözlemlenmiştir.

FoxO3 proteininin endometriyum lümen epiteli, bez epiteli ve damar endoteli gibi yapılarda anlamlı derecede bir ekspresyonu gözlenmemiştir.



Şekil 4.14. Peri-implantatif dönem gebeliğin 1,4,5,6 , 8. günleri ve östrus fazı fare endometriyumunda FoxO3 protein ekspresyonu. bl: blastosist, e: embriyo, EPK: ektoplasantal koni, VE: visseral endoderm, EP: epiblast

Endometriyum stromasında FoxO3 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; G1, G4, G6, G6İ, G8 grupları östrus, G5, G5İ gruplarına göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0.0001$). G5İ grubunda ise sadece G5 grubuna göre anlamlı derecede yüksek FoxO3 ekspresyonu gözlenmiştir ($p<0.005$) (Şekil 4.15).

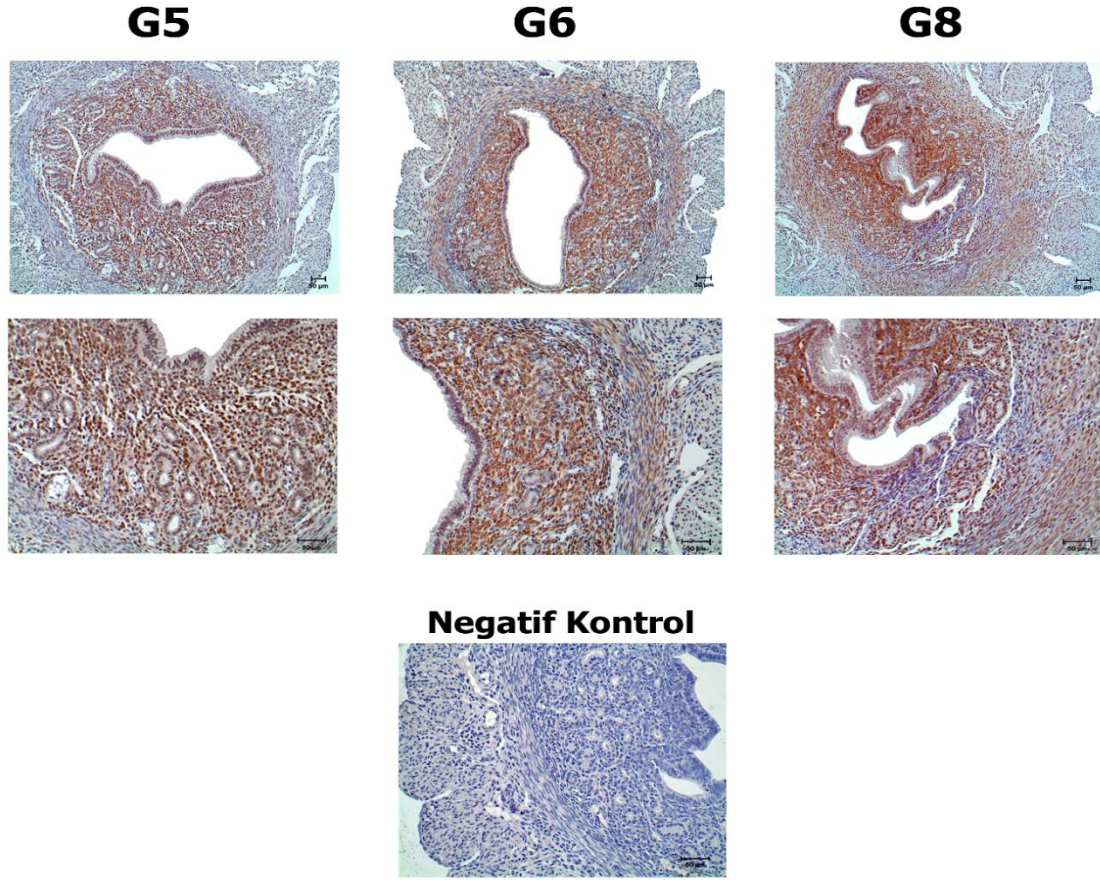


Şekil 4.15. Endometriyum stromasında FoxO3 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi
a: Östrus, G5, G5İ'ye göre anlamlı ($p<0.0001$) b: G5'e göre anlamlı ($p<0.005$).

4.1.5. Yalancı Gebelik Oluşturulmuş Fare Modeli Endometriyumunda FoxO3

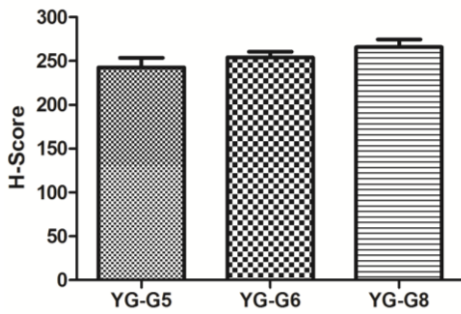
Protein Ekspresyonları

Yalancı gebelik oluşturulmuş fare modelinde gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO3 protein varlığı ve lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.16.). Yalancı gebelik günlerindeki FoxO3 ekspresyon düzeyleri H-score analizleri ile stromadaki lokalizasyonlarına göre karşılaştırıldı. İmmünohistokimya sonuçlarına göre, FoxO3'ün yalancı gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uterus dokularında günlere göre çok değişmeyen şiddetli yoğunlukta olmakla birlikte genel olarak nükleer protein ekspresyonu gözlendi. Bu ekspresyonlar 5. ve 6. güne göre 8. güne gelince nispeten artmış görünmektedir (Şekil 4.16.). Ancak bu artış H-score analizleri sonucu istatistiksel olarak anlamlılık gösterecek düzeyde değildi.



Şekil 4.16. Yalancı gebelik oluşturulmuş fare modelinde gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO3 protein ekspresyonu.

Endometriyum stromasında FoxO3 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.17.).

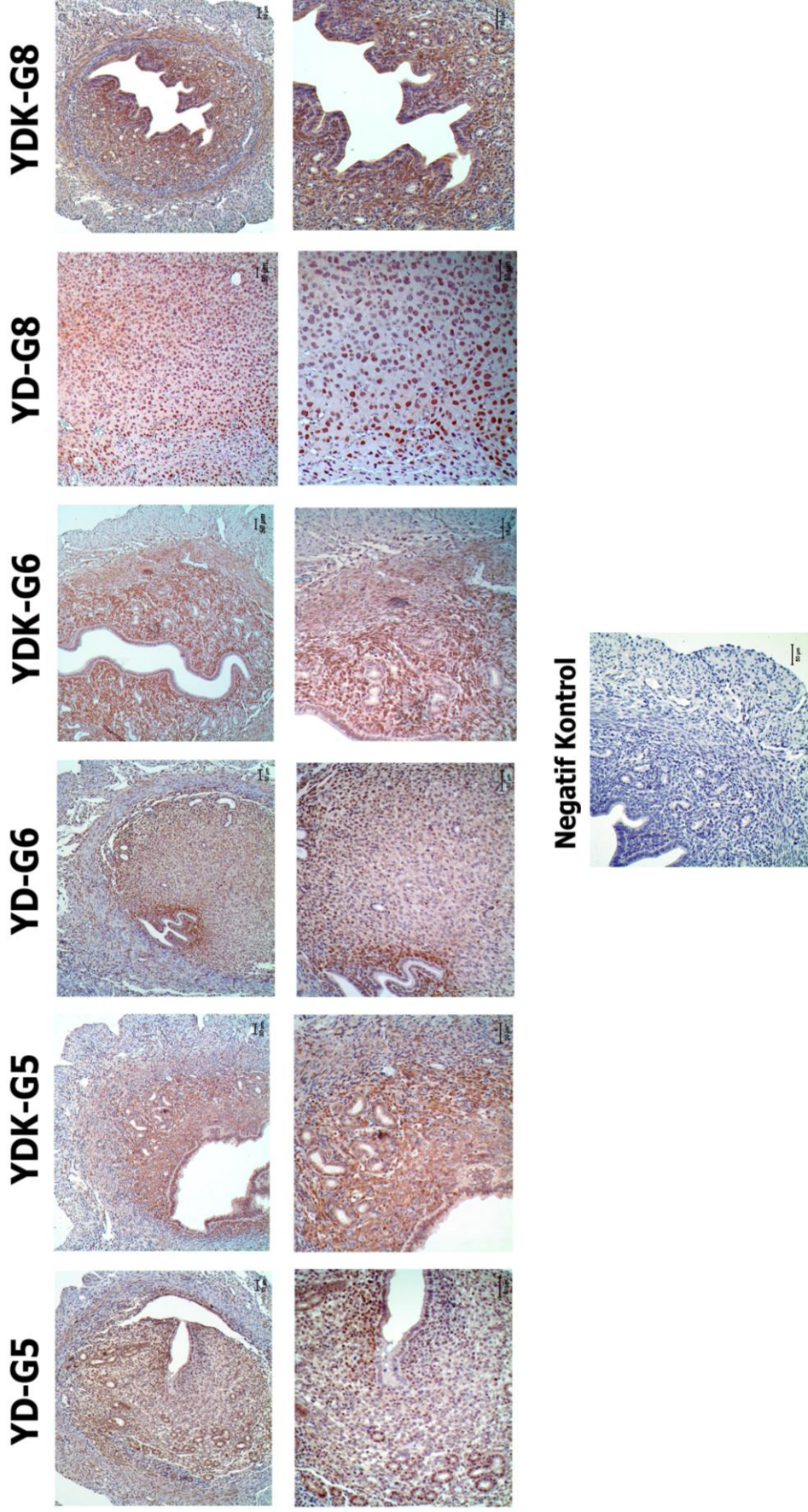


Şekil 4.17. Endometriyum stromasında FoxO3 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi.

4.1.6. Yapay Desidualizasyon Oluşturulmuş Fare Endometriyumunda FoxO3 Protein Ekspresyonları

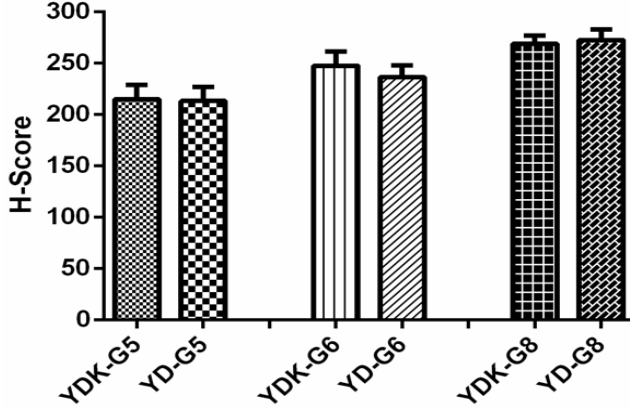
Yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modelinde 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO3 protein varlığı ve lokalizasyonları belirlendi (şekil 4.18.). Oluşturulan modelde yapay desidualizasyon günlerindeki FoxO3 ekspresyon düzeyleri H-score analizleri ile stromadaki lokalizasyonlarına göre karşılaştırıldı.

İmmünohistokimya sonuçlarına göre, FoxO3'n yapay desidualizasyon gruplarında 5, 6 ve 8. günlerde hem desidual hem de kontrol uteruslarda stromal lokalizasyon gösteren ve çoğunlukla şiddetli nükleer protein ekspresyonu gözlendi. Bu ekspresyonlar 5. ve 6. güne göre 8. güne gelince hem desidual hem de kontrol uterusda nispeten artmış görünmektedir (şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modelinde 5, 6 ve 8. günlerdeki uteruslarda FoxO3 protein ekspresyonu.

Endometriyum stromasında FoxO3 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; yapay desidualizasyon grupları ile kontrol grupları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. Endometriyum stromasında FoxO3 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi

4.1.7. Peri-implantif Dönem Fare Endometriyumunda FoxO4 Protein

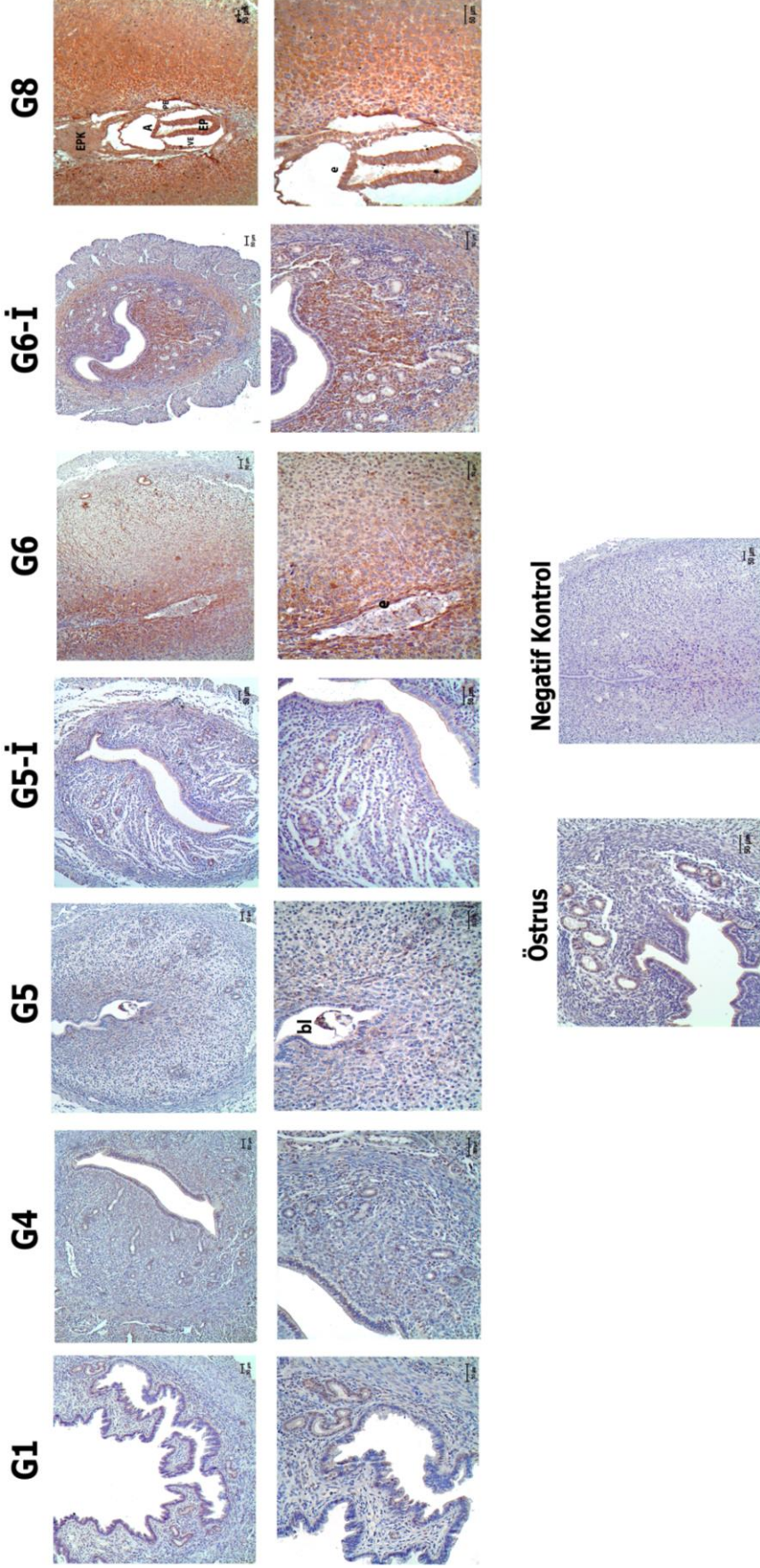
Ekspresyonları

Peri-implantasyon sürecinde fare gebeliğinin 1, 4, 5, 6, 8. günlerindeki ve östrus fazındaki uteruslarda FoxO4 protein varlığı ve lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.20.). Gebelik günleri ve östrus fazındaki FoxO4 ekspresyon düzeyleri H-score analizleri ile stromadaki lokalizasyonlarına göre karşılaştırıldı. İmmünohistokimya sonuçlarına göre, FoxO4 proteininin gebeliğin 6 ve 8. günlerinde desidual bölgede, implantasyon/interimplantasyon alanlarında değişim göstererek nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu izlenmiştir.

FoxO4 protein ekspresyonu gebeliğin 6. gününde primer desidual bölgede daha yoğun olmakla birlikte neredeyse tamamen sitoplazmik görünmektedir. 6. günün inter-implantasyon alanında ise yoğun bir şekilde ve büyük çoğunlukta nükleer ekspresyonu görünmektedir. 8. güne gelindiğinde ise tamamen sitoplazmik ve tüm desidual alanı kaplayan şiddetli bir ekspresyonu izlenmektedir. 8. günde aynı şekilde bu yoğun

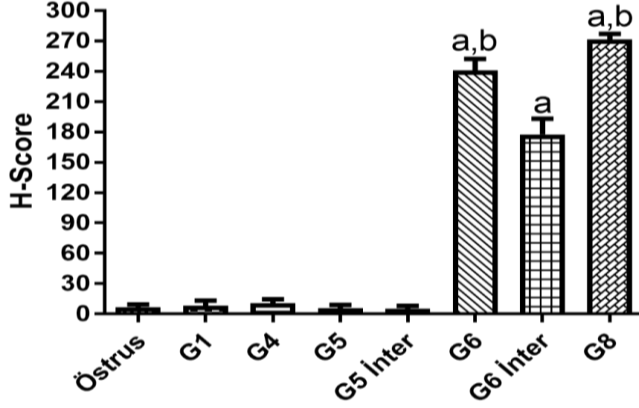
ekspresyon gelişmekte olan embriyonun epiblast, ektoplasental yapı, amniyon, koryonik endoderm, visseral ve pariyetal endoderm tabakalarında da mevcuttur.

FoxO4'ün diğer gebelik günleri ve östrus fazındaki uteruslarda belirgin bir protein ekspresyonu izlenilmemektedir. Diğer yandan, 5. günde implantasyon alanında embriyo iç hücre kitlesinde sitoplazmik ekspresyonları görölmektedir.



Şekil 4.20. Peri-implantatif dönem gebeliğin 1,4,5,6 , 8. günleri ve östrus fazı fare endometriyumunda FoxO4 protein ekspresyonu. bl: blastosist, e: embriyo, EPK: ektoplasental koni, A: amniyon tabakası, VE: visseral endoderm, PE: pariyetal endoderm, EP: epiblast

Endometriyum stromasında FoxO4 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; G6, G6İ ve G8 grupları Östrus, G1, G4, G5, G5İ'ye göre anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0.0001$). Ayrıca G6 ve G8 grupları G6İ'ye göre de anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.21.).

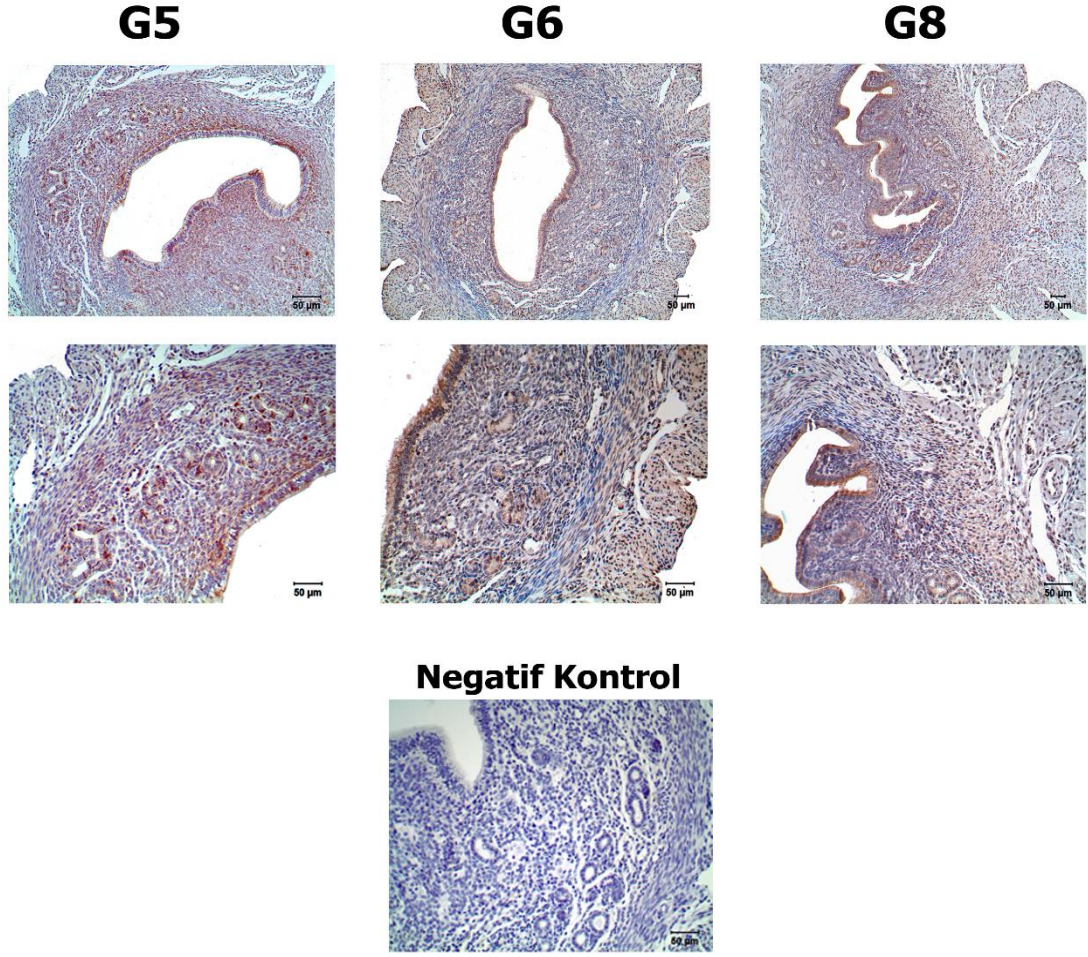


Şekil 4.21. Endometriyum stromasında FoxO4 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi
a: Östrus, G1, G4, G5, G5İ'ye göre anlamlı ($p<0.0001$); b: G6İ'ye göre anlamlı($p<0.0001$)

4.1.8. Yalancı Gebelik Oluşturulmuş Fare Modeli Endometriyumunda FoxO4 Protein Ekspresyonları

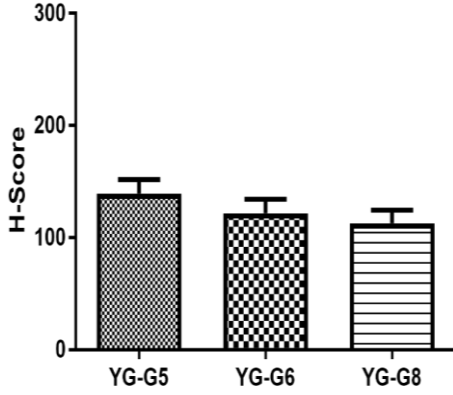
Yalancı gebelik oluşturulmuş fare modelinde gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO4 protein varlığı ve lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.22.). Yalancı gebelik günlerindeki FoxO4 ekspresyon düzeyleri H-score analizleri ile stromadaki lokalizasyonlarına göre karşılaştırıldı.

İmmünohistokimya sonuçlarına göre, FoxO4'ün yalancı gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerde stromal lokalizasyon gösteren, günlere göre çok değişmeyen zayıf sitoplazmik/nükleer ekspresyonları gözlemlendi. Bu zayıf ekspresyonlar 8. günde daha da azalmış görünmektedir ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.22. Yalancı gebelik oluşturulmuş fare modelinde gebeliğin 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO4 protein ekspresyonu

Endometriyum stromasında FoxO4 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.23.).

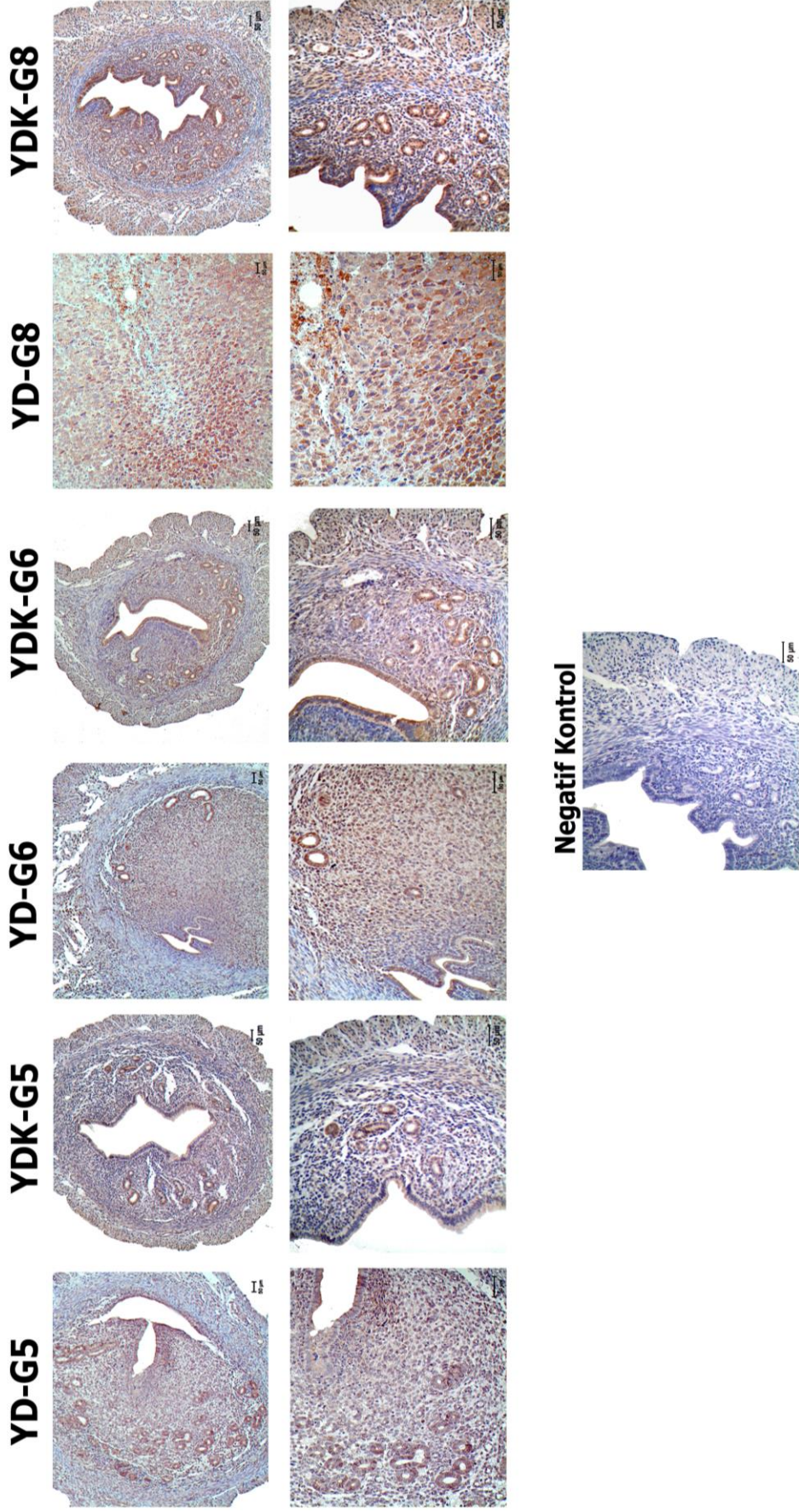


Şekil 4.23. Endometriyum stromasında FoxO4 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi.

4.1.9. Yapay Desidualizasyon Oluşturulmuş Fare Endometriyumunda FoxO4 Protein Ekspresyonları

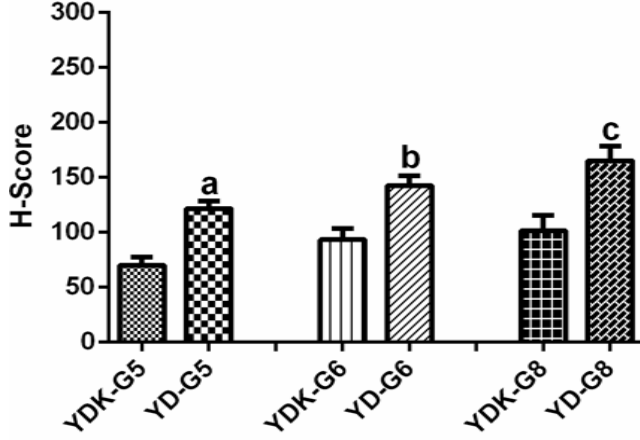
Yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modelinde 5, 6 ve 8. günlerindeki uteruslarda FoxO4 protein varlığı ve lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.24.). Oluşturulan modelde yapay desidualizasyon günlerindeki FoxO4 ekspresyon düzeyleri H-score analizleri ile stromadaki lokalizasyonlarına göre karşılaştırıldı.

İmmünohistokimya sonuçlarına göre, FoxO4'ün 5, 6 ve 8. günlerde çoğunlukla stromada lokalize olup yapay desidualizasyon oluşturulan uteruslarda orta derece ve sitoplazmik, kontrol uteruslarda ise zayıf ve nükleer/sitoplazmik protein ekspresyonları görünmektedir.



Şekil 4.24. Yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modelinde 5, 6 ve 8. günlerdeki uteruslarda FoxO4 protein ekspresyonu

Endometriyum stromasında FoxO4 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;Şekil 4.25.). YD-G5, YDK-G5'e göre; YD-G6, YDK-G6'ya göre, YD-G8, YDK-G8'e göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0.05$).



Şekil 4.25. Endometriyum stromasında FoxO4 protein ekspresyon seviyelerinin H-Score analizi. a: YDK-G5'e göre, b: YDK-G6'ya göre, c: YDK-G8'e göre anlamlı ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Sağlıklı bir gebelik oluşumunda; oosit, sperm ve embriyo kalitesinin yanı sıra, endometriyumun uygunluğu önemli bir unsurdur. Pre-implantif embriyo gelişimiyle endometriyumun senkronizasyonu ve implantasyona duyarlaşarak reseptif hale geçmesi gebeliğin gelişimi ve devam etmesindeki en kritik basamaktır. Uterusun endometriyumuna, gelişimini sağlıklı bir şekilde tamamlamış bir embriyo ancak endometriyum reseptif hale geldiği zaman implante olabilmektedir (Deb ve ark. 2006, Cha ve ark. 2012, Mara H. Rendi 2012).

Embriyo implantasyonu için adeta açılan bir pencere olan endometriyumun reseptif hale geçmesi ve devamında maternal endometriyuma tamamen gömülme süreci peri-implantasyon dönemi olarak isimlendirilmektedir. Bu süreç embriyo ve maternal endometriyumun karşılıklı konuşmasını sağlayan birçok karmaşık molekülleri içermektedir (Cha ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2013, Oh ve ark. 2016, Pollock ve ark. 2016). Çoğu hala bilinmeyen ve araştırma konusu olan bu kompleks moleküler mekanizma, embriyo ya da maternal endometriyum kaynaklı transkripsiyonlarla sağlanılabildiği gibi birbirlerinin transkripsiyonunu yönlendiren mekanizmalarla da sağlanmaktadır (Vilella ve ark. 2015, Desrochers ve ark. 2016). Küçük ölçekteki bu moleküler mekanizmalar kadar büyük ölçekteki ovaryum steroid hormonları da bu sürece dahil olan düzenleyicilerdir. Progesteron ve östrojen endometriyal reseptif dönemin oluşumunda, implantasyonun gerçekleşmesinde ve gebeliğin devamı için gerekli olan unsurlardır. Peri-implantasyon sürecindeki bu karmaşık moleküler mekanizmaları aydınlatmak için yapılan çalışmalarda, moleküllerin progesteron tarafından düzenlenmesi önemli rollerine ilişkin ipuçları sağlamaktadır. Hem endometriyal reseptivitede hem de implantasyonda görev aldığı bilinen birçok molekül progesteron bağımlı çalışmaktadır (Cha ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2013, Maria Laura Zenclussen 2014, Tu ve ark. 2014, Kumar ve ark. 2015, Psychoyos 1973).

FoxO proteinleri hücre siklusu duraklaması, oksidatif savunma, DNA tamiri, enerji homeostazı, apoptozun düzenlenmesi, hücreyel farklılaşma gibi pek çok farklı süreçlerde

rol oynarlar ve bu süreçlerle ilgili genlerin transkripsiyonunu sağlama yetenekleri sayesinde hücre kaderinin anahtar araçlarıdır. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda üreme sistemindeki ve gebelik sürecindeki rolleri de önemli bir araştırma konusudur (Kajihara *ve ark.* 2013). FoxO transkripsiyon faktörlerinin önemli bir düzenleyicisi olan PI3K/Akt sinyal yolağının fare preimplantif embriyo gelişim sürecindeki varlığı ve bu süreçte embriyo gelişimindeki önemli rolleri önceki bir çalışmada ortaya konmuştur (Riley *ve ark.* 2005). Bu çalışmadan bir yıl sonra, 2006'da, Toyofuku ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yine Akt aktivasyonunun insan endometriyum ve desidualizasyonunda varlığı gösterilmiş ve ekstra-selüler matriks modellenmesinde rolü olabileceği vurgulanmıştır (Toyofuku *ve ark.* 2006). Daha sonraki yıllarda PI3K/Akt sinyal yolağının RhoA aracılığı ile fare embriyo implantasyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Liu *ve ark.* 2014). 2016 yılında Salker ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise FoxO transkripsiyon faktörlerinin önemli düzenleyicilerinden SGK1 ve AKT kinaz aktivasyonlarının fare embriyo implantasyonunda bir denge oluşturduğu ve bu süreçteki rolleri ortaya konmuştur (Salker *ve ark.* 2016).

Ancak SGK1 ve PI3K/Akt sinyal yolağı alt basamağında görev alan FoxO transkripsiyon faktörlerinin peri-implantasyon sürecindeki varlıkları bilinmemekle birlikte, insan endometriyum ile ilişkili olarak konuyu irdeleyen çok sınırlı sayıda literatür bilgisi bulunmaktadır. Bu çalışmalar genellikle *in vitro* koşullarda olmakla birlikte ortak görüş FoxO'ların desidualizasyon sürecinde progesteron bağımlı olarak rol aldıkları yönündedir. 2006'da Labied, 2011'de Kyo ve arkadaşlarının yaptığı araştırmaların her ikisinde de FoxO transkripsiyon faktörlerinin insan endometriyumunda desidualizasyon sürecinde progesteron bağımlı rol aldıkları ve özellikle FoxO1'in Akt aktivasyonunun bozulması ile nükleer birikimine ve progesteronun etkisinin artmasına neden olduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir (Labied *ve ark.* 2006, Kyo 2011).

Sonraki yıllarda birçok çalışmanın ortak sonucu olarak insan endometrial hücrelerin desidualizasyonunda FoxO1'in indüklendiği, FoxO3'ün inhibe olduğu ve FoxO4'ün ise ekspre edilmediği farklı kaynaklarda gösterilmiştir (Christian *ve ark.* 2002, Gellersen ve Brosens 2003, Kim *ve ark.* 2003, Kajihara *ve ark.* 2006). Özellikle FoxO ailesi üyesi

FoxO1'in progesteron bağımlı farklılaşmada, menstrüel dökülmede ve gebelik boyunca oksidatif hasara karşı fetomaternal korumada kritik düzenleyici olarak önemli bir özelliğe sahip olabileceği vurgulanmıştır (Grinius 2006, Kajihara ve ark. 2006, Kajihara ve ark. 2013).

Tüm bu literatür bilgileri doğrultusunda, yoğun transkripsiyonel aktivasyonların olduğu peri-implantasyon sürecinde varlıkları gösterilen PI3K/Akt ve SGK1 sinyal yollarının alt basamağı olarak FoxO transkripsiyon faktörlerinin de bu süreçte ekspresyonlarının ve buna bağlı rollerinin olabileceğini akla getirmiştir. Literatürde FoxO transkripsiyon faktörlerinin peri-implantasyon sürecindeki ekspresyonları bilinmemektedir. Çalışmamızda; üreme sistemi ve desidualizasyondaki progesteron bağımlı rolleri *in vitro* ortaya konmuş olan FoxO transkripsiyon faktörlerinin fare östrus fazı ve erken gebelik sürecindeki ekspresyonlarının var olup olmadığını, varsa lokalizasyonlarının nasıl olduğunu *in vivo* olarak araştırdık. Çalışmamız literatürde FoxO transkripsiyon faktörlerinin farelerde *in vivo* olarak herhangi bir gebeliğin söz konusu olmadığı östrus fazı, gebeliğin 1, 4, 5, 6 ve 8. günlerindeki ekspresyonlarını değerlendiren ilk çalışmadır. Ayrıca blastosistten ve oluşturacağı mekanik etkiden bağımsız olarak hormonal taklit edilen yalancı gebelik modelindeki ve blastosistin oluşturacağı mekanik etkinin taklit edildiği yapay desidualizasyon modelindeki ekspresyonlarını değerlendiren ilk çalışmadır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre; FoxO1 gebeliğin 1, 4, 5, 6, 8. günlerindeki ve östrus fazındaki uterus dokularında, gebelik günlerine göre farklı lokalizasyon ve yoğunlukta ekspresyon göstermiştir. Bu nedenle farklı bölgelerdeki ekspresyonları gebelik günlerinde ayrı ayrı H-score analizleri ile değerlendirilmiştir. İlginç olarak FoxO1'in gebeliğin 5. gününde endometriyum epitelinde ve bezlerde ilk kez ortaya çıkan özgün nükleer ekspresyonunu gözlemledik. İmplantasyon günü olan 5. gündeki implantasyon alanındaki bu ekspresyon, aynı gün implantasyonun olmadığı alanlarda ise yok denecek kadar az ve anlamlı derecede düşüktü. Bu ekspresyon paterninin gebeliğin diğer günlerine doğru (6 ve 8. günlerde) gerileyen lümen epitelinde ve bezlerde nispeten azaldığını gözlemledik. Embriyo yokluğunda gebelik sürecinin hormonal olarak taklit edildiği yalancı gebelik

modelindeki bu özgün ekspresyonun olup olmadığını incelediğimizde; yalancı gebeliğin 5. günde yine lümen ve bez epitelinde bu ekspresyonların varlığını gördük ve gebeliğin 8. gününe doğru hormonal gerilemeye paralel bir şekilde ekspresyonun da gerilediğini gözlemledik. Blastosistten bağımsız olarak bu hormonal paralelliğin devam edip etmediğini yapay desidualizasyon modelinde incelediğimizde desidualizasyonun ilerlemesi ve dolayısıyla progesteron artışı ile birlikte lümen epiteli ve bezlerdeki yoğun ekspresyonun 5, 6 ve 8. günlerde devam ettiğini nispeten 8. güne doğru azaldığını gözlemledik.

FoxO1'in peri-implantasyon sürecinde endometriyum epiteli ve bezlerinde progesteron seviyesine paralel olarak artışı ve azalışını gösteren bulgularımız, FoxO1'in progesteron tarafından düzenlendiğini bildiren *in vitro* çalışmalar ile uyumludur (Christian ve ark. 2002, Gellersen ve Brosens 2003, Kajihara ve ark. 2006, Kajihara ve ark. 2013). Sonuçlarımızdan yola çıkarak; gebeliğin oluşumu, devam etmesi ve uterus reseptivitesinde progesteronun kritik basamak olduğunu göz önünde bulundurduğumuzda, peri-implantasyon sürecindeki FoxO1 ekspresyonu burada önemli olabilir.

Yoğun transkripsiyonel aktivasyonların olduğu peri-implantasyon sürecinde, endometriyal reseptif formun oluşumunda bir çok transkripsiyon faktörü ve adezyon molekülleri görev almaktadır. Bu moleküller zamanlama olarak özgün ekspresyonları olmalarından dolayı endometriyal reseptivitenin belirteçleridir. En çok bilinen endometriyal reseptivite belirteçleri, $\alpha V\beta 3$ İntegrin, Muc1 (müsin1), L-selektin, LIF (lösemi inhibitör faktör), trophinin, HB-EGF (heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü) gibi adezyon molekülleri ve büyüme faktörlerinin yanı sıra, HoxA10, Klf5 (Kruppel benzeri faktör), HoxA 7(Msx1) gibi transkripsiyon faktörleri de yer almaktadır (Tu ve ark. 2014). Literatürde FoxO transkripsiyon faktörlerinin implantasyonda ve endometriyal reseptivitede görev alan bazı moleküller ile ilişkili çalışmaları yer almaktadır. Örneğin endometriyal reseptivite için gerekli olduğu bilinen (Du ve ark. 2010) HoxA-10'un baboon endometriyumunda desidualizasyonda FoxO1 ile birlikte çalışarak

yine endometriyal reseptivite belirteçlerinden biri olan (Daftary ve Taylor 2001) IGFBP-1'in promotor aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir (Kim ve ark. 2003).

Bu nedenle FoxO1'in 5. gündeki uterusun reseptif olduğu implantasyon zamanı lümen epiteli ve bezlerdeki bu özgün ekspresyonu uterusun reseptif form kazandığının bir göstergesi ve implantasyon için önemli bir molekül olabilir. Çünkü FoxO1'in lümen epiteli ve bezlerdeki ekspresyonu hem yalancı gebeliğin 5. gününde hem de yapay desidualizasyonun 5. gününde bulunması nedeniyle blastosist varlığından bağımsız ancak progesteron bağımlı görünmektedir. Diğer yandan FoxO1'in 5. gün ve diğer günlerdeki farklı lokalizasyonları farklı görevler üstlenebileceğini de düşündürmektedir. Örneğin fare gebeliğinde 5. günden sonra gerileyen lümen epitelinin apoptoza uğradığı bilinmektedir (Zhang ve ark. 2013). FoxO1'in apoptozu başlatmadaki bilinen görevlerini göz önünde bulundurduğumuzda gerileyen lümen epitelindeki devam eden ekspresyonları apoptozdaki rolleri ile ilişkili olabilir. Bunların yanı sıra, FoxO1'in anjiyogenezdeki rolleri literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir (Dharaneeswaran ve ark. 2014, Slopock ve ark. 2014, Kim ve ark. 2016, Wilhelm ve ark. 2016). FoxO1'in lümen epiteli ve bezlerdeki ekspresyonunun yanı sıra ilk olarak 4. günde ortaya çıkan endoteldeki nükleer ekspresyonu peri-implantasyon sürecinde de anjiyogenezin başlatılmasında bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda FoxO3 ve FoxO4 ekspresyonları büyük ölçüde stromada lokalizasyon göstermiştir. Normal gebelik sürecinde hem FoxO3 hem de FoxO4 ekspresyonu ilginç olarak 5. gün implantasyon alanında yok denecek kadar az bulunmaktadır. Gebeliğin 6. gününde sekonder desidualizasyon alanında FoxO3'ün, primer desidualizasyon alanında ise FoxO4'ün yoğun sitoplazmik ekspresyonu gözlemlenmiştir. Gebeliğin 8. gününde desidual stromada yine ilginç olarak FoxO3'ün yoğun nükleer ekspresyonu bulunmaktayken, FoxO4'ün ise yoğun sitoplazmik ekspresyonunu gözlemledik. Bu ekspresyonların hem nükleus/sitoplazma yerleşimi açısından hem de desidual lokalizasyonlar açısından sırası ile yer değiştirerek dikkat çekici bir ekspresyon sergilemesi, FoxO3 ve FoxO4'ün esasen desidualizasyonda ve belki de birlikte rollerinin olabileceğini düşündürmüştür.

Yalancı gebelik ve yapay desidualizasyon modellerinde FoxO3 ve FoxO4'ün ekspresyonlarını değerlendirdiğimizde FoxO3 hem yapay desidualizasyon modelinde hem de yalancı gebelik modelinde stromada yoğun ekspresyonlar gösterirken FoxO4'ün bu modellerdeki ekspresyonları normal gebelik sürecindeki kadar yoğun değildir. Özellikle FoxO3'ün embriyo varlığından bağımsız bir şekilde stromadaki ekspresyonları her iki modeldeki gebelik günleri boyunca devam ederken, FoxO4'ün embriyonun olmadığı iki modelde ekspresyonlarındaki azalışı dikkat çekmiştir. Bu sonuçlarımızdan yola çıkarak, FoxO3'ün embriyodan bağımsız, FoxO4'ün ise embriyo bağımlı olarak ekspresyon artışı ile stromal desidualizasyonda görev aldığını öne sürebiliriz. Aynı zamanda, FoxO4'ün embriyoya bağlı olarak bu modellerdeki ekspresyonlarının anlamlı azalışı, literatürdeki *in vitro* endometriyal desidualizasyon çalışmalarında FoxO4 ekspresyonu olmamasının nedeni olarak ortamda embriyo yokluğuna dayandırılabilir (Kajihara ve ark. 2006, Labied ve ark. 2006, Kajihara ve ark. 2013). Bunların yanı sıra FoxO1, FoxO3 ve FoxO4'ün gebeliğin 8. gününde gelişmekte olan embriyonun farklı tabakalarındaki spesifik ekspresyonları nedeniyle peri-implantasyonda olduğu kadar post-implantasyon sürecinde de, embriyo ve embriyonik yapıların gelişiminde rolleri olabileceğini düşündürmüştür.

Hücre kaderinin önemli düzenleyicileri olan FoxO'ların fare peri-implantif embriyo gelişim sürecinde embriyonun uterusu implantasyonu ve desidualizasyonda farklı ekspresyonları vardır. Sonuçlarımıza bağlı olarak ve FoxO transkripsiyon faktörlerinin hücresel süreçlerdeki önemli düzenleyici rolleri göz önünde tutulduğunda, bu moleküllerin peri-implantasyon döneminde uterus reseptivitesi ve implantasyonda önemli rollerinin olabileceğini düşünmekteyiz. Bugün tüp bebek tedavilerinde embriyo implantasyon oranı %25-30 aralığında (de los Santos ve ark. 2003) olup, uygunsuz uterin reseptivite implantasyon başarısızlığının yaklaşık 2/3'ünden sorumlu tutulmaktadır. Bu başarısızlıkta embriyonun payı ise 1/3 ile sınırlıdır (Ledee-Bataille ve ark. 2002). Son yıllarda literatürde endometriyal reseptivitenin tayininde, Endometriyal Reseptivite Array (ERA) bugüne dek gösterilen bir test olarak ön plana çıkmaktadır. ERA'da tek bir dizide, endometriyal siklusun farklı dönemlerinde regüle edilen 238 gen analiz edilmektedir.

Bunlardan 134 tanesi reseptif faza ait spesifik transkriptomik yapılardır ve yapılan çalışmalarla birlikte bu panele her gün yenisi eklenmektedir (Diaz-Gimeno *ve ark.* 2013). FoxO1'in endometriyal reseptivite belirteci adayı olarak göstermek ve bu anlamda yardımcı üreme tekniklerine katkı sağlamak için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bunların yanı sıra FoxO1, FoxO3 ve FoxO4'ün implantasyonda ve desidual süreçte rollerinin ortaya konulmasına ihtiyaç vardır. Böylece klinikteki tekrarlayan gebelik kayıpları ve implantasyon bozukluklarının mekanizmalarını aydınlayabilecek yeni moleküler düzenlemelerin ortaya konması sağlanabilecek ve tüp bebek tedavi süreçlerine katkı sağlayabilecektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada; östrus fazı, peri-implantif dönem gebelik, yalancı gebelik ve yapay desidualizasyon oluşturulmuş fare modellerine ait uterus endometriyumunda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 transkripsiyon faktörlerinin var olup olmadığını ve varsa lokalizasyonlarının nerede olduğu immünohistokimya yöntemi ile araştırılmış ve Hscore analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre sonuçlar maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Fare östrus fazı, peri-implantif dönem, yalancı gebelik ve yapay desidualizasyon oluşturulmuş modellere ait uterus endometriyumunda; FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ve lokalizasyonu *in vivo* olarak literatürde ilk kez gösterilmiştir.
2. FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 transkripsiyon faktörlerinin erken gebelik sürecinde günlere göre hem sitoplazmik/nükleer hem de bölgesel olarak lokalizasyon farklılığı gösteren ekspresyonlarının yalancı gebelik ve yapay desidualizasyon modelleri oluşturularak hormon bağımlı ya da embriyo bağımlı olup olmadığı ortaya konmuştur.
3. Bulgularımız FoxO'ların progesteron bağımlı olduklarını ortaya koyan *in vivo* çalışmalar ile paralellik göstermekle birlikte *in vivo* şartlardaki ve gebelik sürecindeki değişen ekspresyonların gösterilmesi ile literatürdeki bilgilere destek ve tamamlayıcılık sağlamaktadır.
4. PI3K/Akt sinyal yolağının peri-implantasyon sürecinde varlığını gösteren çalışmalar ile birlikte progesteron bağımlı olduğu bilinen FoxO transkripsiyon faktörlerinin peri-implantasyon sürecindeki varlığı ve progesteron varlığı ile ilişkili sonuçlarımız başlangıçtaki hipotezimizi doğrulamaktadır.

5. Çalışmamızın bulguları, erken gebelik sürecinde FoxO transkripsiyon faktörlerinin embriyo implantasyonu, desidualizasyon ve uterus reseptivitesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştü ve buna yönelik yeni fonksiyonel çalışmalar için temel oluşturmuştur.
6. Bu çalışma, literatürde FoxO, endometriyum ve erken gebeliğe ilişkin çok sınırlı sayıdaki araştırmaların bulgularına önemli bir katkı sağlamıştır. Ayrıca FoxO'ların hem implantasyon hem de endometriyum reseptivitesine ilişkin moleküler mekanizmasının araştırılmasının önemini işaret etmiştir. Böylece, buradan yola çıkılarak yapılacak yeni çalışmalara bir veri tabanı oluşturarak, implantasyon ve erken gebelikteki rollerinin daha kapsamlı araştırılması için yeni projeler üretilmesine olanak sağlamıştır.
7. Klinikte tekrarlayan gebelik kayıpları ve implantasyon bozuklukları mekanizmalarına atıfta bulunabilecek yeni projelerin üretilmesi ve implantasyon bozuklukları ile ilişkili olası terapötik hedef molekül geliştirilmesi için temel oluşturmuştur.

KAYNAKLAR

Alam, S. M., T. Konno, G. Dai, L. Lu, D. Wang, J. H. Dunmore, A. R. Godwin and M. J. Soares (2007). "A uterine decidual cell cytokine ensures pregnancy-dependent adaptations to a physiological stressor." *Development* 134(2): 407-415.

Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." *Curr Biol* 7(4): 261-269.

Ashleigh C. McLean, N. V., Stephen Fai, Steffany A.L. Bennett (2012). Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological

Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. 1Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, Neural Regeneration Laboratory and Ottawa Institute of Systems Biology.

Bakker, W. J., M. Blazquez-Domingo, A. Kolbus, J. Besooyen, P. Steinlein, H. Beug, P. J. Coffey, B. Lowenberg, M. von Lindern and T. B. van Dijk (2004). "FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1." *J Cell Biol* 164(2): 175-184.

Beer, A. E. and R. E. Billingham (1978). "Immunoregulatory aspects of pregnancy." *Fed Proc* 37(10): 2374-2378.

Bermejo-Alvarez, P., K. E. Park and B. P. Telugu (2014). "Utero-tubal embryo transfer and vasectomy in the mouse model." *J Vis Exp*(84): e51214.

Biggs, W. H., 3rd, W. K. Cavenee and K. C. Arden (2001). "Identification and characterization of members of the FKHR (FOXO) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse." *Mamm Genome* 12(6): 416-425.

Biggs, W. H., 3rd, J. Meisenhelder, T. Hunter, W. K. Cavenee and K. C. Arden (1999). "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7421-7426.

- Bocitto, M. and R. G. Kalb (2011). "Regulation of Foxo-dependent transcription by post-translational modifications." *Curr Drug Targets* 12(9): 1303-1310.
- Bonnet, R. (1884). "Beitrage zur embryologie der wiederkauer, gewonnen am schafei." *Arc Anat Physiol*: 170-230.
- Brenkman, A. B., P. L. de Keizer, N. J. van den Broek, A. G. Jochemsen and B. M. Burgering (2008). "Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4." *PLoS One* 3(7): e2819.
- Brownawell, A. M., G. J. Kops, I. G. Macara and B. M. Burgering (2001). "Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX." *Mol Cell Biol* 21(10): 3534-3546.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* 96(6): 857-868.
- Brunet, A., J. Park, H. Tran, L. S. Hu, B. A. Hemmings and M. E. Greenberg (2001). "Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a)." *Mol Cell Biol* 21(3): 952-965.
- Brunet, A., L. B. Sweeney, J. F. Sturgill, K. F. Chua, P. L. Greer, Y. Lin, H. Tran, S. E. Ross, R. Mostoslavsky, H. Y. Cohen, L. S. Hu, H. L. Cheng, M. P. Jedrychowski, S. P. Gygi, D. A. Sinclair, F. W. Alt and M. E. Greenberg (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." *Science* 303(5666): 2011-2015.
- Burgering, A. E. a. B. M. T. (2013). "FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Carter, M. E. and A. Brunet (2007). "FOXO transcription factors." *Curr Biol* 17(4): R113-114.
- Cha, J., X. Sun and S. K. Dey (2012). "Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy." *Nat Med* 18(12): 1754-1767.

Christian, M., X. Zhang, T. Schneider-Merck, T. G. Unterman, B. Gellersen, J. O. White and J. J. Brosens (2002). "Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells." *J Biol Chem* 277(23): 20825-20832.

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

Croy, A. (2014). "The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy." Elsevier.

Daftary, G. S. and H. S. Taylor (2001). "Molecular markers of implantation: clinical implications." *Curr Opin Obstet Gynecol* 13(3): 269-274.

Daitoku, H., J. Sakamaki and A. Fukamizu (2011). "Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions." *Biochim Biophys Acta* 1813(11): 1954-1960.

Davila, J., M. J. Laws, A. Kannan, Q. Li, R. N. Taylor, M. K. Bagchi and I. C. Bagchi (2015). "Rac1 Regulates Endometrial Secretory Function to Control Placental Development." *PLoS Genet* 11(8): e1005458.

de los Santos, M. J., A. Mercader, A. Galan, C. Albert, J. L. Romero and A. Pellicer (2003). "Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture." *Placenta* 24 Suppl B: S13-19.

Deb, K., J. Reese and B. C. Paria (2006). "Methodologies to study implantation in mice." *Methods Mol Med* 121: 9-34.

Desrochers, L. M., F. Bordeleau, C. A. Reinhart-King, R. A. Cerione and M. A. Antonyak (2016). "Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation." *Nat Commun* 7: 11958.

Dharaneeswaran, H., M. R. Abid, L. Yuan, D. Dupuis, D. Beeler, K. C. Spokes, L. Janes, T. Sciuto, P. M. Kang, S. C. Jaminet, A. Dvorak, M. A. Grant, E. R. Regan and W. C. Aird (2014). "FOXO1-mediated activation of Akt plays a critical role in vascular homeostasis." *Circ Res* 115(2): 238-251.

Diaz-Gimeno, P., M. Ruiz-Alonso, D. Blesa, N. Bosch, J. A. Martinez-Conejero, P. Alama, N. Garrido, A. Pellicer and C. Simon (2013). "The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity." *Fertil Steril* 99(2): 508-517.

Dickson, A. D. (1963). "Trophoblastic Giant Cell Transformation of Mouse Blastocysts." *J Reprod Fertil* 6: 465-466.

Du, H., D. Vitiello, J. L. Sarno and H. S. Taylor (2010). "3-Phosphoglycerate dehydrogenase expression is regulated by HOXA10 in murine endometrium and human endometrial cells." *Reproduction* 139(1): 237-245.

Enders, A. C. and S. Schlafke (1969). "Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation." *Am J Anat* 125(1): 1-29.

Eric W.-F. Lam¹, J. J. B., Ana R. Gomes¹ and Chuay-Yeng Koo¹ (2013). "Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony." *Nature*.

Essers, M. A., S. Weijzen, A. M. de Vries-Smits, I. Saarloos, N. D. de Rooter, J. L. Bos and B. M. Burgering (2004). "FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK." *EMBO J* 23(24): 4802-4812.

Fitzgerald, J. S., T. G. Poehlmann, E. Schleussner and U. R. Markert (2008). "Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)." *Hum Reprod Update* 14(4): 335-344.

Gardner, R. L. (1982). "Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo." *J Embryol Exp Morphol* 68: 175-198.

Gellersen, B. and J. Brosens (2003). "Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair." *J Endocrinol* 178(3): 357-372.

Gilley, J., P. J. Coffey and J. Ham (2003). "FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons." *J Cell Biol* 162(4): 613-622.

Gray, H. (1918). *Anatomy of the Human Body*, Philadelphia: Lea & Febiger.

Greer, E. L. and A. Brunet (2005). "FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression." *Oncogene* 24(50): 7410-7425.

Greer, E. L., P. R. Oskoui, M. R. Banko, J. M. Maniar, M. P. Gygi, S. P. Gygi and A. Brunet (2007). "The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor." *J Biol Chem* 282(41): 30107-30119.

Grinius, L. (2006). " Forkhead transcription factor FOXO1A is critical for induction of human decidualization." *J Endocrinol*: 189(181): p. 179-187.

Hagenbuchner, J. and M. J. Ausserlechner (2013). "Mitochondria and FOXO3: breath or die." *Front Physiol* 4: 147.

Harper, M. J. (1989). "Platelet-activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of reproduction?" *Biol Reprod* 40(5): p. 907-13.

Hemmings, B. A. and D. F. Restuccia (2012). "PI3K-PKB/Akt pathway." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(9): a011189.

Hirsch, F. R., G. V. Scagliotti, C. J. Langer, M. Varela-Garcia and W. A. Franklin (2003). "Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies." *Lung Cancer* 41 Suppl 1: S29-42.

Hu, M. C., D. F. Lee, W. Xia, L. S. Golfman, F. Ou-Yang, J. Y. Yang, Y. Zou, S. Bao, N. Hanada, H. Saso, R. Kobayashi and M. C. Hung (2004). "I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a." *Cell* 117(2): 225-237.

Huang, H. and D. J. Tindall (2007). "Dynamic FoxO transcription factors." *J Cell Sci* 120(Pt 15): 2479-2487.

Ishibashi, H., T. Suzuki (2003). "Sex steroid hormone receptors in human thymoma." *J Clin Endocrinol Metab*.

Jang, S. W., S. J. Yang, S. Srinivasan and K. Ye (2007). "Akt phosphorylates MstI and prevents its proteolytic activation, blocking FOXO3 phosphorylation and nuclear translocation." *J Biol Chem* 282(42): 30836-30844.

John, T., G. Liu and M. S. Tsao (2009). "Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors." *Oncogene* 28 Suppl 1: S14-23.

Junqueira, L. C. (2006). *Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevleri*.

Kaestner, K. H., W. Knochel and D. E. Martinez (2000). "Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors." *Genes Dev* 14(2): 142-146.

Kajihara, T., J. J. Brosens and O. Ishihara (2013). "The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy." *Med Mol Morphol* 46(2): 61-68.

Kajihara, T., M. Jones, L. Fusi, M. Takano, F. Feroze-Zaidi, G. Pirianov, H. Mehmet, O. Ishihara, J. M. Higham, E. W. Lam and J. J. Brosens (2006). "Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization." *Mol Endocrinol* 20(10): 2444-2455.

Kenneth Maiese, Z. Z. C., Jinling Hou, and Yan Chen Shang (2009). "The "O" Class: Crafting Clinical Care with FoxO Transcription Factors." NIH Public Access.

Kim, J. J., H. S. Taylor, G. E. Akbas, I. Foucher, A. Trembleau, R. C. Jaffe, A. T. Fazleabas and T. G. Unterman (2003). "Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 promoter activity by FKHR and HOXA10 in primate endometrial cells." *Biol Reprod* 68(1): 24-30.

Kim, S. Y., Y. S. Ko, J. Park, Y. Choi, J. W. Park, Y. Kim, J. S. Pyo, Y. B. Yoo, J. S. Lee and B. L. Lee (2016). "Forkhead Transcription Factor FOXO1 Inhibits Angiogenesis in Gastric Cancer in Relation to SIRT1." *Cancer Res Treat* 48(1): 345-354.

Kumar, V., V. K. Maurya, A. Joshi, S. M. Meeran and R. K. Jha (2015). "Integrin beta 8 (ITGB8) regulates embryo implantation potentially via controlling the activity of TGF-B1 in mice." *Biol Reprod* 92(4): 109.

Kyo, S. (2011). "Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progesterone to inhibit endometrial epithelial cell growth." *Clin Cancer Res*: 17(13): p. 525-537.

Labied, S., T. Kajihara, P. A. Madureira, L. Fusi, M. C. Jones, J. M. Higham, R. Varshochi, J. M. Francis, G. Zoumpoulidou, A. Essafi, S. Fernandez de Mattos, E. W. Lam and J. J. Brosens (2006). "Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium." *Mol Endocrinol* 20(1): 35-44.

Langman, S. T. (1993). *Medical Embryology*.

Ledee-Bataille, N., G. Lapree-Delage, J. L. Taupin, S. Dubanchet, R. Frydman and G. Chaouat (2002). "Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation." *Hum Reprod* 17(1): 213-218.

Li, D. D., C. H. Guo, L. Yue, C. C. Duan, Z. Q. Yang, H. Cao, B. Guo and Z. P. Yue (2015). "Expression, regulation and function of Hmgn3 during decidualization in mice." *Mol Cell Endocrinol* 413: 13-25.

Liu, L., Y. Wang and Q. Yu (2014). "The PI3K/Akt signaling pathway exerts effects on the implantation of mouse embryos by regulating the expression of RhoA." *Int J Mol Med* 33(5): 1089-1096.

Liu, N., C. Zhou, Y. Chen and J. Zhao (2013). "The involvement of osteopontin and beta3 integrin in implantation and endometrial receptivity in an early mouse pregnancy model." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 170(1): 171-176.

Magnuson T, E. C. (1987). "The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation." New York: Plenum.

Mara H. Rendi, R. L. G., Kelly L. Boyd (2012). *Female Reproductive System, in Comparative Anatomy and Histology*.

Maria Laura Zenclussen, P. A. C., Federico Jensen, KatjaWoidacki and Ana Claudia Zenclussen (2014). "Hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate heme oxygenase-1 expression in the uterus." *Frontiers in ENDOCRINOLOGY*.

Martin, L. and C. A. Finn (1970). "The effects of an intra-uterine device on uterine cell division and epithelial morphology during early pregnancy in the mouse." *J Endocrinol* 48(3): 347-354.

Martins, R., G. J. Lithgow and W. Link (2016). "Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity." *Aging Cell* 15(2): 196-207.

Matsuzaki, H., H. Daitoku, M. Hatta, H. Aoyama, K. Yoshimochi and A. Fukamizu (2005). "Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(32): 11278-11283.

Maybin, J. A. and H. O. Critchley (2015). "Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond." *Hum Reprod Update* 21(6): 748-761.

Monsalve, M. and Y. Olmos (2011). "The complex biology of FOXO." *Curr Drug Targets* 12(9): 1322-1350.

Moore KL, P. T. (2002). *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. İstanbul Nobel Matbaacılık.

Morrow, J. D. J. A. Awad, H. J. Boss, I. A. Blair and L. J. Roberts, 2nd (1992). "Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 10721-10725.

Nakae, J., T. Kitamura, Y. Kitamura, W. H. Biggs, 3rd, K. C. Arden and D. Accili (2003). "The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation." *Dev Cell* 4(1): 119-129.

Nakae, J., T. Kitamura, W. Ogawa, M. Kasuga and D. Accili (2001). "Insulin regulation of gene expression through the forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) requires kinases distinct from Akt." *Biochemistry* 40(39): 11768-11776.

Oh, Y. S., W. H. Nah, B. Choi, S. H. Kim and M. C. Gye (2016). "Coxsackievirus and Adenovirus Receptor, a Tight Junction Protein, in Peri-Implantation Mouse Embryos." *Biol Reprod* 95(1): 5.

P.Grasso (1998). "In vivo effects of human follicle-stimulating hormone-related synthetic peptide hFSH-beta-(81-95) and its subdomain hFSH-beta-(90-95) on the mouse estrous cycle." *Biol Reprod*: 58(53):821-825.

Pollock, T., L. J. Greville, B. Tang and D. deCatanzaro (2016). "Triclosan elevates estradiol levels in serum and tissues of cycling and peri-implantation female mice." *Reprod Toxicol* 65: 394-401.

Psychoyos, A. (1973). *Endocrine Control of Egg Implantation*.

Rena, G., Y. L. Woods, A. R. Prescott, M. Peggie, T. G. Unterman, M. R. Williams and P. Cohen (2002). "Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion." *EMBO J* 21(9): 2263-2271.

Riley, J. K., M. O. Carayannopoulos, A. H. Wyman, M. Chi, C. K. Ratajczak and K. H. Moley (2005). "The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo." *Dev Biol* 284(2): 377-386.

Rossant J, C. J. (2002). *Extraembryonic lineages, in Mouse Development; Patterning, Morphogenesis and Organogenesis*. San Diego: Academic.

Salker, M. S., J. H. Steel, Z. Hosseinzadeh, J. Nautiyal, Z. Webster, Y. Singh, S. Brucker, F. Lang and J. J. Brosens (2016). "Activation of SGK1 in Endometrial Epithelial Cells in Response to PI3K/AKT Inhibition Impairs Embryo Implantation." *Cell Physiol Biochem* 39(5): 2077-2087.

Sedding, D. G. (2008). "FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing--a new fork on the way to longevity?" *Biol Chem* 389(3): 279-283.

Sezer, Z. (2005). *Ergot Alkaloidleri Ve Yarı Sentetik Türevlerinin Uterus Üzerindeki Etki Mekanizmaları Tıpta Uzmanlık Tezi*. Kayseri.

Slopack, D., E. Roudier, S. T. Liu, E. Nwadozi, O. Birot and T. L. Haas (2014). "Forkhead BoxO transcription factors restrain exercise-induced angiogenesis." *J Physiol* 592(18): 4069-4082.

Snell GD, S. L. (1996). *Early Embryology, in Biology of the Laboratory Mouse*. New York: McGraw-Hill.

Soares MJ, H. J. (2006). *Methods in Molecular Medicine Placenta and Trophoblast Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey, Humana Press.

Stewart, C. L. and E. B. Cullinan (1997). "Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors." *Dev Genet* 21(1): 91-101.

Tang, E. D., G. Nunez, F. G. Barr and K. L. Guan (1999). "Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt." *J Biol Chem* 274(24): 16741-16746.

Toyofuku, A., T. Hara, T. Taguchi, Y. Katsura, K. Ohama and Y. Kudo (2006). "Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro." *Hum Reprod* 21(5): 1122-1128.

Tu, Z., H. Ran, S. Zhang, G. Xia, B. Wang and H. Wang (2014). "Molecular determinants of uterine receptivity." *Int J Dev Biol* 58(2-4): 147-154.

Tzivion, G., M. Dobson and G. Ramakrishnan (2011). "FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins." *Biochim Biophys Acta* 1813(11): 1938-1945.

Van Der Heide, L. P., M. F. Hoekman and M. P. Smidt (2004). "The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation." *Biochem J* 380(Pt 2): 297-309.

Vilella, F., J. M. Moreno-Moya, N. Balaguer, A. Grasso, M. Herrero, S. Martinez, A. Marcilla and C. Simon (2015). "Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome." *Development* 142(18): 3210-3221.

Wang, F., C. B. Marshall, G. Y. Li, K. Yamamoto, T. W. Mak and M. Ikura (2009). "Synergistic interplay between promoter recognition and CBP/p300 coactivator recruitment by FOXO3a." *ACS Chem Biol* 4(12): 1017-1027.

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

Wang, Y., Y. Zhou and D. T. Graves (2014). "FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation." *Biomed Res Int* 2014: 925350.

Wilhelm, K., K. Happel, G. Eelen, S. Schoors, M. F. Oellerich, R. Lim, B. Zimmermann, I. M. Aspalter, C. A. Franco, T. Boettger, T. Braun, M. Fruttiger, K. Rajewsky, C. Keller,

J. C. Bruning, H. Gerhardt, P. Carmeliet and M. Potente (2016). "FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium." *Nature* 529(7585): 216-220.

Xie, Q., J. Chen and Z. Yuan (2012). "Post-translational regulation of FOXO." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44(11): 897-901.

Yang, J. Y., C. S. Zong, W. Xia, H. Yamaguchi, Q. Ding, X. Xie, J. Y. Lang, C. C. Lai, C. J. Chang, W. C. Huang, H. Huang, H. P. Kuo, D. F. Lee, L. Y. Li, H. C. Lien, X. Cheng, K. J. Chang, C. D. Hsiao, F. J. Tsai, C. H. Tsai, A. A. Sahin, W. J. Muller, G. B. Mills, D. Yu, G. N. Hortobagyi and M. C. Hung (2008). "ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation." *Nat Cell Biol* 10(2): 138-148.

Yang, W., N. G. Dolloff and W. S. El-Deiry (2008). "ERK and MDM2 prey on FOXO3a." *Nat Cell Biol* 10(2): 125-126.

Yoshinaga K., T. M. (1988). Development of preimplantation mammalian embryos and their environment. Satellite symposium of the 8th International Congress of Endocrinology. Japan.

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

Zhang, X., N. Tang, T. J. Hadden and A. K. Rishi (2011). "Akt, FoxO and regulation of apoptosis." *Biochim Biophys Acta* 1813(11): 1978-1986.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Dileyra	Uyruğu	TC
Soyadı	ADIGÜZEL	Tel no	0545 681 62 87
Doğum tarihi	13.10.1987	e-posta	dileyraa@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Atatürk Anadolu Lisesi	2004
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Antalya Özel Gelecek Tüp Bebek Merkezi	4

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	60.00

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Sıçanlarda nesfatin-1 tedavisinin isoproterenol ile indüklenen myokard infarktüsüne karşı koruyucu etkisinin değerlendirilmesi: PI3K/Akt/GSK-3 β yolağının rolü	BAP	2014-2015
Peri-implantif dönem fare endometriyumunda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının ve rollerinin araştırılması	TÜBİTAK	2015-2018

Burslar-Ödüller:

1) **‘FoxO Transkripsiyon Faktörleri Peri-İmplantif Dönem Fare Endometriyumunda İmplantasyonu Düzenliyor Olabilir: FoxO1’in İmplantasyon Penceresindeki Özgün Ekspresyonu’ başlıklı çalışma, V. Üreme Tıbbı Ve Cerrahisi Derneği Kongresi’nde poster bildiri dalında üçüncülük ödülü, Antalya, 2015**

Yayımlar ve Bildiriler:

1) **Çiler Çelik Özenci, Dileyra Adıgüzel, FoxO Transkripsiyon Faktörleri Peri-İmplantif Dönem Fare Endometriyumunda İmplantasyonu Düzenliyor Olabilir: FoxO1’in İmplantasyon Penceresindeki Özgün Ekspresyonu, V. Üreme Tıbbı Ve Cerrahisi Derneği Kongresi, P012, Antalya, 2015**

2) **Gamze Badakul, Dileyra Adıgüzel, Emre Bakırcıoğlu, Çiler Çelik Özenci, Npas2 Ekspresyonu İnsan Spermatogenez ile İlişkilidir, Uluslar Arası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, P080, Çeşme-İzmir, 2016**

3) **Dileyra Adıgüzel, Nuray Acar, Nilay Kuşçu, Çiler Çelik Özenci, FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Peri-İmplantasyon Sürecindeki Rollerini: Endometriyal Reseptivitenin Olası Yeni Belirteci, Uluslar Arası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, S03, Çeşme-İzmir, 2016**