

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

EMBRİYO İMPLANTASYONU SÜRECİNDE HBEGF ve
AKT SİNYALİZASYONU ARACILIĞIYLA FOXO1
EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dileyra ADIGÜZEL KAYA

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

Dileyra ADIGÜZEL KAYA

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

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

EMBRİYO İMPLANTASYONU SÜRECİNDE HBEGF ve
AKT SİNYALİZASYONU ARACILIĞIYLA FOXO1
EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dileyra ADIGÜZEL KAYA

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Güler Leyla SATI DURAN

Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TDK-2019-5035 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

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

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Güler Leyla SATI DURAN
(Akdeniz Üniversitesi)

.....

: Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
(Koç Üniversitesi)

.....

Üye : Doç. Dr. Nuray ACAR AYDEMİR
(Akdeniz Üniversitesi)

.....

Üye : Prof. Dr. Mehmet ŞİMŞEK
(Akdeniz Üniversitesi)

.....

Üye : Prof. Dr. Özgür ÖKTEM
(Koç Üniversitesi)

.....

Üye : Doç. Dr. Yasemin SEVAL ÇELİK
(İzmir Ekonomi 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

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 KAYA

Prof. Dr. Güler Leyla SATI DURAN

Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ

TEŐEKKÖR

Tez çalışmamın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. iler ÇELİK ÖZENCİ'ye ve Prof. Dr. Güler Leyla SATI DURAN'a,

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

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 eşim Murat KAYA ve ailemin tüm üyelerine en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

EMBRIYO EPİTELYAL BARIYERİ AŞMA SÜRECİNDE EMBRİYONİK HBEGF, PI3K/AKT SİNYALİZASYONU İLE FOXO1'İ DÜZENLER

Amaç: Farede embriyo implantasyonu sürecinde endometriyal lümen epitelinde epitelyal bariyerin kaldırılması mekanizmasını kontrol ederek implantasyonu düzenleyen FoxO1 molekülünün, embriyonik HBEGF ve AKT sinyal yolları ile ilişkisini araştırmak.

Yöntem: Normal gebelikte epitelyal bariyerin kalkması sürecini içeren G4 gece (23:00), G5 sabah (09:00), G5 gece (23:00), G6 sabah (09:00) günlerinde ve HBEGF ve AKT sinyalini inhibe eden moleküller ile kaplanan boncukların (bead) transfer edildiği fare endometriyumunda HBEGF, AKT, p-AKT ve FoxO1 ekspresyonları immünofloresan işaretlemelerle değerlendirilmiştir.

Bulgular: PI3K sinyalizasyonunun aktivasyonu ile endometriyal lümen kapanması gerçekleşir. Embriyonik HBEGF, endometriyum epitelinde PI3K sinyalizasyonunu başlatır ve böylece AKT aktive olur. Bunun sonucunda embriyonun temas ettiği lümen epitelinde FoxO1 sitoplazmaya taşınır, epitelde apoptoz önlenir ve bunun yerine embriyo entozis ile epitelyal bariyeri aşar. Epitelyal bariyerin aşılmasından sonra, nükleusa geçen HBEGF kendi transkripsiyonel inhibisyonunu başlatır, böylece nükleer FoxO1 birikimine sebep olur ve kapanan lümen epitelinde apoptoz gerçekleşir.

Sonuç: Bu çalışmada, HBEGF, AKT, p-AKT ve FoxO1 sinyalizasyonunun embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecindeki rolleri ortaya konmuştur. Günümüzde tekrarlayan gebelik kayıplarının nedenleri arasında % 40-50'si ise açıklanamayan nedenler olarak belirtilmektedir. Bunlar göz önüne alındığında embriyonun epitelyal bariyeri aşamaması durumu insanda açıklanamayan gebelik kayıplarının sebepleri ile ilişkili olabilir. Diğer yandan AKT, p-AKT ve FoxO1 molekülleri sağlıklı bir gebeliğin yanı sıra sağlıklı bir endometriyal homeostaz için de önemli görünmektedir. Bu nedenle çalışmamızın sonuçları, endometriyal hastalıklar için terapötik hedef molekül geliştirilmesi bağlamında da yeni projeler yapılması için bir temel oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: FoxO1, HBEGF, kript epiteli, implantasyon, endometriyum

EMBRYONIC HBEGF REGULATES FOXO1 THROUGH PI3K/AKT SIGNALIZATION IN THE PROCESS OF REMOVAL OF THE EMBRYO- EPITHELIAL BARRIER

Objective: To investigate the relationship of embryonic HBEGF and AKT signaling pathways with FoxO1, which regulates implantation by controlling the mechanism of removal of the epithelial barrier in the endometrial luminal epithelium during embryo implantation in the mouse.

Method: Expression of HBEGF, AKT, p-AKT, and FoxO1 were evaluated by immunofluorescence labeling in the process of removal of the epithelial barrier in normal pregnancy, which includes D4 night (23:00), D5 morning (09:00), D5 night (23:00), D6 morning (09:00) groups, and in mouse endometrium where beads coated with HBEGF and as well as inhibit AKT signaling were transferred.

Results: During implantation, endometrial lumen closure occurs with the activation of PI3K signaling. Embryonic HBEGF initiates PI3K signaling in the endometrial epithelium, thereby activating AKT. As a result, in the luminal epithelium that the embryo encounters, FoxO1 is transported to the cytoplasm, apoptosis is prevented in the epithelium, and instead, the embryo crosses the epithelial barrier by entosis. Thereafter HBEGF, which migrates to the nucleus, initiates its own transcriptional inhibition, thus causing nuclear FoxO1 accumulation and apoptosis in the closed luminal epithelium.

Conclusion: In this study, the roles of HBEGF, AKT, p-AKT, and FoxO1 signaling in the embryonal crossing of the epithelial barrier were revealed. Currently, 40-50% of the causes of recurrent pregnancy loss are stated as unexplained causes. Considering these, the failure of the embryo to cross the epithelial barrier may be related to the causes of unexplained pregnancy losses in humans. On the other hand, AKT, p-AKT, and FoxO1 molecules seem to be important for a healthy pregnancy as well as a healthy endometrial homeostasis. For this reason, the results of our study have formed a basis for new projects in the context of developing therapeutic target molecules for endometrial diseases as well.

Key words: FoxO1, HBEGF, crypt epithelium, implantation, endometrium

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Embriyolojik Dönemde Uterusun Gelişimi	3
2.2. İnsan Uterusunun Anatomisi ve Histolojisi	5
2.3. İnsanda Uterusun Siklusa Bağlı Fizyolojik Değişimleri	6
2.3.1. İnsan Endometriyumunun Proliferatif Fazında Histolojik Değişimleri	8
2.3.2. İnsan Endometriyumunun Sekretuar Fazında Histolojik Değişimleri	9
2.4. Dişi Farede Genital Sistem Anatomisi	10
2.4.1. Dişi Farede Ovaryum Yapısı	11
2.4.2. Dişi Farede Ovidukt Yapısı	11
2.4.3. Dişi Farede Uterus Yapısı	11
2.4.4. Dişi Farede Vajina ve Klitoris Yapısı	12
2.5. Dişi Farede Üreme Fizyolojisi ve İnsan Üreme Fizyolojisi ile Farkları	12
2.6. Dişi Farede Genital Siklus	13

2.6.1. Dişi Farede Proöstrus Evresi	14
2.6.2. Dişi Farede Östrus Evresi	15
2.6.3. Dişi Farede Metöstrus Evresi	15
2.6.4. Dişi Farede Diöstrus Evresi	15
2.7. Dişi Farelerde Uterus Histolojisi	16
2.8. İnsanda ve Farede Pre-İmplantif Embriyo Gelişim Süreçleri	17
2.8. Uterus Reseptivitesi ve Selektivitesi	19
2.9. Embriyo İmplantasyonu ve Memelilerde İmplantasyon Tipleri	21
2.10. Embriyo İmplantasyon Aşamaları	23
2.11. Farede Peri-implantif Dönem ve Kript Formasyonu	24
2.11.1. Farede Peri-implantif Dönem	24
2.11.1. Fare Endometriyumunda Kript Formasyonu	26
2.12. Forkhead Box O 1 (FoxO1) Transkripsiyon Faktörü	27
2.13. Protein Kinaz B (AKT) ve FoxO1 sinyalizasyonu	33
2.14. FoxO1'in Büyüme Faktörleriyle Olan İlişkisi	35
2.15. Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF)	38
2.16. FoxO1, AKT sinyalizasyonu ve HBEGF'nin Embriyo İmplantasyon Süreci ile olan İlişkisi	39
2.17. FoxO1'in İmplantasyondaki Rollerine Üzerine Önceki Çalışmalarımız ve Doktora Tez Çalışmasının Çıkış Noktası	43

3. GEREÇ ve YÖNTEM	47
3.1. Grupların Oluşturulması	48
3.1.1. Normal Gebelik Gruplarının Oluşturulması	48
3.1.2. Boncuk (Bead) Transfer Gruplarının Oluşturulması	50
3.2. Doku Takibi ve Parafine Gömme	53
3.3. İmmünofloresan Analizler	54
3.4. Uterus Lümen açıklığı ölçümü	56
3.5. ImageJ analizi	56
3.6. İstatistiksel Analizler	57
4. BULGULAR	
4.1. İmmünofloresan Bulgular	58
4.1.1. Embriyonun Epitelyal Bariyeri Aştığı Süreçte Fare Endometriyumunda FoxO1 Protein Ekspresyonları	58
4.1.2. Embriyonun Epitelyal Bariyeri Aştığı Süreçte Fare Endometriyumunda HBEGF Protein Ekspresyonları	62
4.1.3. Embriyonun Epitelyal Bariyeri Aştığı Süreçte Fare Endometriyumunda AKT Protein Ekspresyonları	65
4.1.4. Embriyonun Epitelyal Bariyeri Aştığı Süreçte Fare Endometriyumunda pAKT Protein Ekspresyonları	68
4.1.5. Boncuk (Bead) Transfer Edilen Cerrahi Fare Modellerinde Uterus Endometriyumunda HBEGF Protein Ekspresyonları	71

4.1.6. Boncuk (Bead) Transfer Edilen Cerrahi Fare Modellerinde Uterus Endometriyumunda FoxO1 Protein Ekspresyonları	73
4.1.7. Boncuk (Bead) Transfer Edilen Cerrahi Fare Modellerinde Uterus Endometriyumunda AKT Protein Ekspresyonları	76
4.1.8. Boncuk (Bead) Transfer Edilen Cerrahi Fare Modellerinde Uterus Endometriyumunda pAKT Protein Ekspresyonları	79
4.2. Morfolojik Bulgular	82
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	105

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. İmmünfloresan analizlerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyon oranları

54



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Paramezonefrik (Müller) kanalının gelişimi	3
Şekil 2.2.	İnsan uterusunun anatomisini ve histolojik tabakalarını gösteren çizim	5
Şekil 2.3.	İnsan endometriyumunun anatomisini ve histolojik tabakalarını gösteren çizim	6
Şekil 2.4.	İnsan endometriyumunun anatomisini ve histolojik tabakalarını gösteren çizim	7
Şekil 2.5.	Menstrüal siklusta fazlara göre endometriyuma etki eden hormonlar	8
Şekil 2.6.	Dişi farede genital sistem anatomisi	10
Şekil 2.7.	İnsan ve farede gebelik tipi farkları	13
Şekil 2.8.	Dişi farelerde östrus siklusunun evrelerine göre smear yaymalarında değişen hücrel morfolojileri ve hücrel popülasyonlar	14
Şekil 2.9.	Gebe olmayan farelerde uterusun morfolojisi	17
Şekil 2.10.	İnsanda ve farede preimplantif embriyo gelişim evreleri	18
Şekil 2.11.	İnsan ve farede steroid hormonlar tarafından düzenlenen endometriyal reseptivite	20
Şekil 2.12.	Üreme başarısında endometriyal reseptivite ve selektivite dengesi	21
Şekil 2.13.	Memeli türünde blastosist ve uterus morfolojik etkileşimleri temel alınarak tanımlanan implantasyon tipleri	22
Şekil 2.14.	Embriyo implantasyon aşamaları	23

Şekil 2.15.	Peri-implantasyon sürecindeki steroid hormon seviyeleri ve gebelik günlerine göre uterus alanlarının enine kesitlerinin tanımlandığı diyagramlar	25
Şekil 2.16.	Peri-implantasyon sürecinde epitelyal evaginasyon sonucundaki oluşan kript formasyonu	26
Şekil 2.17.	Peri-implantasyon sürecinde blastosistin non-apoptotik hücre içinde hücre invazyonu süreci: Entozis	27
Şekil 2.18.	FoxO1 Domeyn Yapısı	29
Şekil 2.19.	FoxO1 FKH domeyn yapısının üç boyutlu görüntüsü ve DNA'ya H3 ile bağlanması	29
Şekil 2.20.	FoxO1'in Kinazlar tarafından Fosforillenmeleri sonucu inhibisyonu ve aktivasyonu sonucunda hücresel süreçteki rolleri	31
Şekil 2.21.	FoxO1'in hedef gen transkripsiyonu sonucu hücresel süreçteki rolleri	32
Şekil 2.22.	AKT sinyalizasyonunu başlaması	34
Şekil 2.23.	AKT tarafından FoxO1 inhibisyonu	35
Şekil 2.24.	Büyüme faktörleri varlığında ve yokluğunda FoxO proteinlerinin hücredeki fonksiyonları	37
Şekil 2.25.	Hücrede HBEGF oluşumu ve HBEGF'diğer hücreleri etkileme yolları	38
Şekil 2.26.	HBEGF ve İmplantasyon Süreci İlişkisi	42
Şekil 2.27.	Fare gebeliği 5 gün sabah, 5. gün akşam ve 6 günleri endometriyumda FoxO1 protein ekspresyonu	43

Şekil 2.28.	Farede gebeliğin 5. günü sabah endometriyumunda 4 farklı anneye ait implantasyon alanlarında FoxO1 protein ekspresyonu	44
Şekil 2.29.	Genital siklusun 21. gün, 4. gün ve 6. güne ait insan endometriyumunda FoxO1 protein ekspresyonu	44
Şekil 2.30.	Peri implantasyon süreci sırasında nükleer FoxO1 ekspresyonu gerileyen lümen epitelinde apoptozda role sahiptir ve Sitoplazmik FoxO1 ekspresyonu ise embriyonun yuvalandığı kript epitelinde entozis sürecinde rol almaktadır	45
Şekil 3.1.	Uterusların çoklu implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1'lik Chicago mavisi kuyruk veni enjeksiyonu sonrasında uterusda gözlenen mavi bantlar	48
Şekil 3.2.	Transfer gruplarının oluşturulmasını anlatan çizim	51
Şekil 3.3.	Transfer gruplarında uterusda gözlenen bantlar	51
Şekil 4.1.	Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda FoxO1 protein lokalizasyonları	60
Şekil 4.2.	Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda FoxO1 protein lokalizasyonları	61
Şekil 4.3.	Endometriyum kript epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu	61
Şekil 4.4.	Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün	

	sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda HBEGF protein lokalizasyonları	63
Şekil 4.5.	Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda HBEGF protein lokalizasyonları	64
Şekil 4.6.	Endometriyum kript epiteline HBEGF protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu	64
Şekil 4.7.	Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda AKT protein lokalizasyonları	66
Şekil 4.8.	Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda AKT protein lokalizasyonları	67
Şekil 4.9.	Endometriyum kript epiteline HBEGF protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu	67
Şekil 4.10.	Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda pAKT protein lokalizasyonları	69
Şekil 4.11.	Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda pAKT protein lokalizasyonları	70

Şekil 4.12.	Endometriyum kript epitelinde HBEGF protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu	70
Şekil 4.13.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus endometriyumunda HBEGF protein ekspresyonları	72
Şekil 4.14.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde endometriyum lumen epitelinde HBEGF protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu	73
Şekil 4.15.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus endometriyumunda FoxO1 protein ekspresyonları	75
Şekil 4.16.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde endometriyum lumen epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu	76
Şekil 4.17.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus endometriyumunda AKT protein ekspresyonları	78
Şekil 4.18.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde endometriyum lumen epitelinde AKT protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu	79
Şekil 4.19.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-	

	Wortmannin gruplarında uterus endometriyumunda pAKT protein ekspresyonları	81
Şekil 4.20.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde endometriyum lumen epitelinde AKT protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu	82
Şekil 4.21.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus lumen açıklığı ölçümü için hematoksilin eosin boyanmaları	83
Şekil 4.22.	Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus lumen açıklığı ölçüm analizi sonucu	83
Şekil 5.1.	HBEGF, AKT, p-AKT ve FoxO1'in embriyonun reseptif endometriyuma tutunmasında ve kript epiteline yerleşmesinde birlikte rol oynarlar	93

SİMGELER ve KISALTMALAR

AKT : Protein Kinaz B (PBK)

BSA: Bovin Serum Albumin

CK1 : Kazein Kinaz 1

DYRK : Çift Özgün Tirozin Fosforillenmiş ve Düzenlenmiş Kinaz

FH : Forkhead Domain

FoxO1 : Fork Head Box

GADD45 : DNA Hasarı ile İndüklenebilen Protein 45

FSH : Folikül Stimüle Edici Hormon

HBEGF : Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü

IRS : İnsülin Reseptör Substrat Proteini

IGFBP: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein

JNK : Jun N-Terminal Kinaz

LH : Luteinizan Hormon

MnSOD : Manganez Süperoksit Dismutaz

NLS : Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri

PBS : Fosfat Tamponlu Tuz

PDK1 : 3-Fosfoinositide Bağımlı Protein Kinaz 1

PI3K : Fosfatidilinositol (3,4,5) – Trisfosfata

RTK : Reseptör Tirozin Kinazlar

SGK : Serum ve Glukokortikoid İndüklenebilir Kinaz

1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

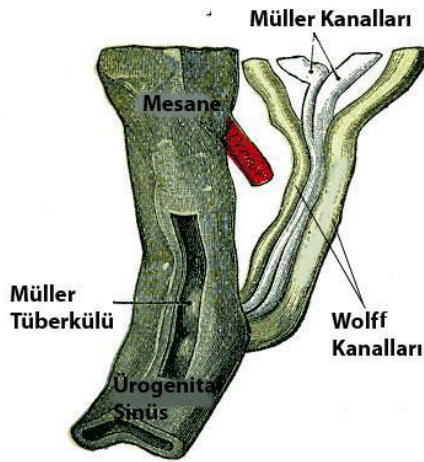
Sağlıklı bir gebelik oluşumunda, embriyo implantasyonunun gerçekleşmesi gebeliğin devam etmesinde en kritik basamaklardan biridir. Bu kritik basamaktaki ilk engel embriyonun maternal endometriyuma tutunmuş olduğu epitelyal bariyerdir ve embriyo implantasyonu için giriş kapısı olan bu bariyerin aşılması için maternal endometriyum ve embriyonun doğru moleküler etkileşim içinde olması sağlıklı bir embriyo implantasyonun temelidir. Hem moleküler olarak hem de morfodinamik olarak bir çok olayın gerçekleştiği embriyonun epitelyal bariyeri aşma süreci insanda ve farede bir çok yönden benzerlik göstermektedir. Farede gebeliğin ilk günlerinden itibaren başlayan ve giderek artan stromal ödem, bir yandan uterus lümeninin daralmasına ve beraberinde embriyo trofektodermi ile lümen epitelinin karşı karşıya gelip (apozisyon) yaklaşarak temas etmesini (adezyon) sağlarken diğer yandan da ‘epitelyal evaginasyon’ olarak isimlendirilen endometriyal morfodinamik süreç gerçekleştirmiş olur (Yuan ve ark., 2016). Stromal ödemin artışının lümen epitelindeki yaratmış olduğu bu mekanik etki gebeliğin 3. gününden 4. günü gecesine kadar devam ederek lümen epitelinin kript formasyonu ile sonuçlanmaktadır (Yuan ve ark., 2016). Gebeliğin 4. günü gece başlayan tutunma reaksiyonunu takiben 5. gün gece embriyo içinde adeta yuvalandığı kript epiteli bariyerini aşarak stromaya invazyonunu gerçekleştirir ve 6. günde embriyo tamamen stromaya gömülür, böylece implantasyon tamamlanmış olur (Cha ve ark., 2012). Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü (HBEGF) ekspresyonunun fare uterusunda bir implantasyon belirtici olduğu bilinmektedir. HBEGF tutunma reaksiyonuna eş zamanlı olarak, blastosistin yuvalandığı kript epiteli tarafından ve embriyodan aynı zamanda ve karşılıklı şekilde ekspre edilmeye başlar (Lim H. J. ve ark., 2009). Fosfatidilinositol 3 Kinaz/Protein Kinaz B (PI3K/AKT) sinyalizasyonu hücre büyümesi ve gelişmesini destekleyen pek çok sinyalizasyondan biridir ve AKT kendisinin fosforillenmesi sonucunda aktif forma geçer (Hemmings ve ark., 2012). Literatürde AKT sinyalizasyonunun peri-implantasyon sürecinde varlığını değerlendiren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Liu L. ve ark., 2014). PI3K/AKT sinyalizasyonun düzenlemesiyle ön plana çıkan ve bu sebeple sınıf ‘O’ (‘Others’) olarak isimlendirilen FoxO ailesinin

üyesi olan FoxO1; hücre siklusu duraklaması, oksidatif savunma, apoptoz, hücre sel farklanma gibi pek çok farklı süreçleri düzenler ve bu süreçlerle ilgili genlerin transkripsiyonunu sağlarlar (Huang H. ve ark., 2007). AKT tarafından fosforillenmesi sonucu sitoplazmada tutularak inaktivasyonu sağlanan FoxO1'in endometriyumdaki olası rolleri hakkında sınırlı sayıda ancak belirgin bir literatür bilgisi bulunmaktadır (Kajihara ve ark., 2013; Vasquez ve ark., 2018; Adiguzel ve ark., 2019). FoxO1'in implantasyon ile ilişkisini araştıran güncel bir çalışmada FoxO1'in implantasyon zamanı endometriyal epitelde upregüle olduğu ve bu transkripsiyon faktörünün koşullu delesyonunun infertilite ile sonuçlandığı bildirilmiştir. 2019 yılında yayınlanan çalışmamızda da; FoxO1 ekspresyonunun farede implantasyon zamanı mezometriyal tarafta kapanmış olan lümen epitelinde nükleer olduğunu, embriyonun yuvalandığı kript epitelinde ise daha çok sitoplazmik olarak olarak ekspre edildiğini bulduk ve sonuçlarımız FoxO1'in bu ekspresyon paterninin fare implantasyonunda bir 'navigatör' (kılavuz) molekül olabileceğini ortaya koymuştur (Adiguzel ve ark., 2019). Literatürde FoxO1'in AKT sinyalizasyonu ile düzenlediği bilinmekte, ancak fare implantasyonunda epiteldeki FoxO1 ekspresyonunun AKT tarafından düzenlendiğine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca HBEGF'nin FoxO1 ile fare peri-implantif dönemde zamansal ve mekansal olarak benzer ekspresyon göstermesi FoxO1, AKT ve HBEGF ilişkisi olabileceğini düşündürmüştür. Literatürde FoxO1, AKT ve HBEGF ilişkisini gösteren bir çalışmada; egzersizin, iskelet kasında HBEGF'yi upregüle ederek AKT fosforilasyonu sağladığı ve AKT'nin bu kinaz aktivasyonu FoxO1'in inhibisyonunu sağladığı ortaya konmuştur (Fukatsu ve ark., 2009). Mevcut literatür bilgisine ve bir önceki çalışmamıza dayanarak, FoxO1 ekspresyonunun farede reseptif endometriyumda lümen epiteli ve bez epitelinde nükleer olarak 'upregüle' olurken, embriyonun yuvalandığı kript epitelinde sitoplazmik olarak ekspre olmasının HBEGF ve AKT sinyalizasyonu aracılığıyla 'downregüle' olduğunu hipotez ettik. Bu nedenle farede embriyo implantasyon sürecinde lümen epitelinde HBEGF, AKT ve FoxO1 ilişkisini araştırmak amacıyla normal gebelikte epitelyal bariyerin kalkması sürecini içeren saatlerde kript epitelinde ve moleküller ile kaplanan boncukların (bead) transfer edildiği uterus endometriyumunda lümen epiteli ve kript epitelinde HBEGF, AKT, pAKT, FoxO1 ekspresyonları immüno Floresan işaretlemelerle değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Embriyolojik Dönemde Uterusun Gelişimi

Embriyonik gelişim sürecinde genital sistem gelişimi mezodermden köken alır. Genital sistem gelişirken hem dişi hem de erkekte başlangıçta mezonefrik (Wolff) ve paramezonefrik (Müller) kanalları olmak üzere iki çift genital kanal oluşur. Gelişimin ilerleyen aşamalarında dişilerde testosteron hormonu yokluğu nedeniyle mezonefrik kanal gerilerken, Müller baskılayıcı hormon (anti-Müllerian hormon) yokluğu nedeniyle de paramezonefrik kanal gelişimine devam eder ve iç ve dış genitallerde dişi yönde farklılaşma gerçekleşmiş olur (Langman, 1993). Paramezonefrik ürogenital kabarıklığının ön ve yan yüzeyindeki sölom epitelinin uzunlamasına bir girinti yapması ile genital sistem gelişimi başlar ve paramezonefrik kanallar kranial uçtan sölom boşluğu içine doğru huni şeklinde açılarak ilerler. Bu ilerleme, önce mezonefrik kanalın laterali yönünde gerçekleşirken sonrasında onu çaprazlayarak kaudomedial yönde gelişimine devam eder. Bu sayede orta hatta her iki paramezonefrik kanal birbirine yaklaşmış olur. Başlangıçta bir septumla ayrılmış olan bu iki kanal, daha sonra birleşerek uterus kanalını meydana getirirler. Birleşmiş olan kanalların kaudal ucu, ürogenital sinusun arka duvarına doğru ilerleyerek paramezonefrik ya da Müller tüberkülü denilen küçük bir şişkinliği oluştururken, mezonefrik kanallar ise ilerleyerek ürogenital sinusa açılır (Langman, 1993) (Şekil 2.1.).



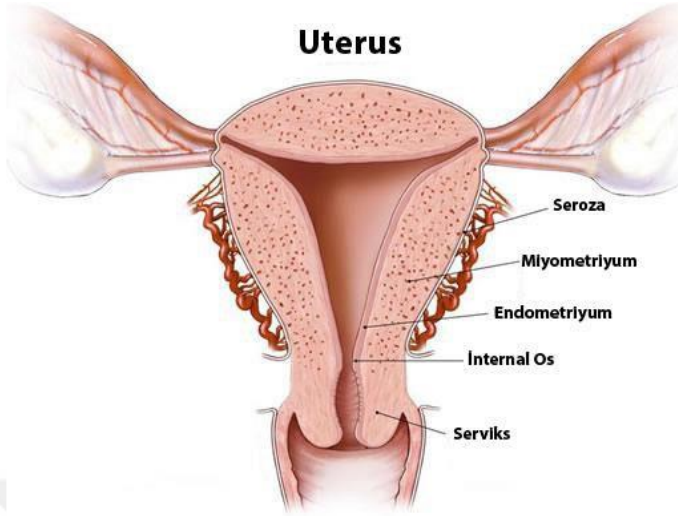
Şekil 2.1. Paramezonefrik (Müller) kanalının gelişimi referanstan düzenlenmiştir (Gray, 1918).

Dişilerde paramezonefrik kanalların her biri genital sistemin farklı organlarını oluşturacak olan üç bölümle ifade edilir. Bu bölümler sölom boşluğuna açılan kranial vertikal bölüm, mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal bölüm ve karşı taraftaki eşiyile birleşen kaudal vertikal bölümdür. Kranial vertikal ve horizontal bölümden tuba uterinalar gelişirken, kaudal bölümlerin kaynaşması ile de uterus meydana gelmektedir (Moore KL, 2002).

Birleşen paramezonefrik kanallar geniş bir transvers pelvik katlantı yapar. Kaynaşmış haldeki kanalların lateralinden pelvis duvarına kadar uzanan bu katlantıya ligamentum latum uteri olarak isimlendirilir ve oluşan bu uterovaginal taslaktan uterusun fundus, korpus, istmus ve endometriyum epiteli ile bezleri gelişmektedir. Uterus endometriyumunun stroması ve miyometriyumu ise komşu splanik mezodermden gelişir (Langman, 1993; Moore KL, 2002). Uterusun embriyolojik gelişimi gebeliğın üçüncü trimesterine kadar devam eder. Uterusa ait temel yapılar birinci trimesterin sonunda oluşmuş olur, sonrasında gebeliğın ortalarında bezlerin ve kas tabakasının gelişimi başlar ve diğer yapıların gelişmesi de üçüncü trimestere kadar uzanır (Langman, 1993).

2.2. İnsan Uterusunun Anatomisi ve Histolojisi

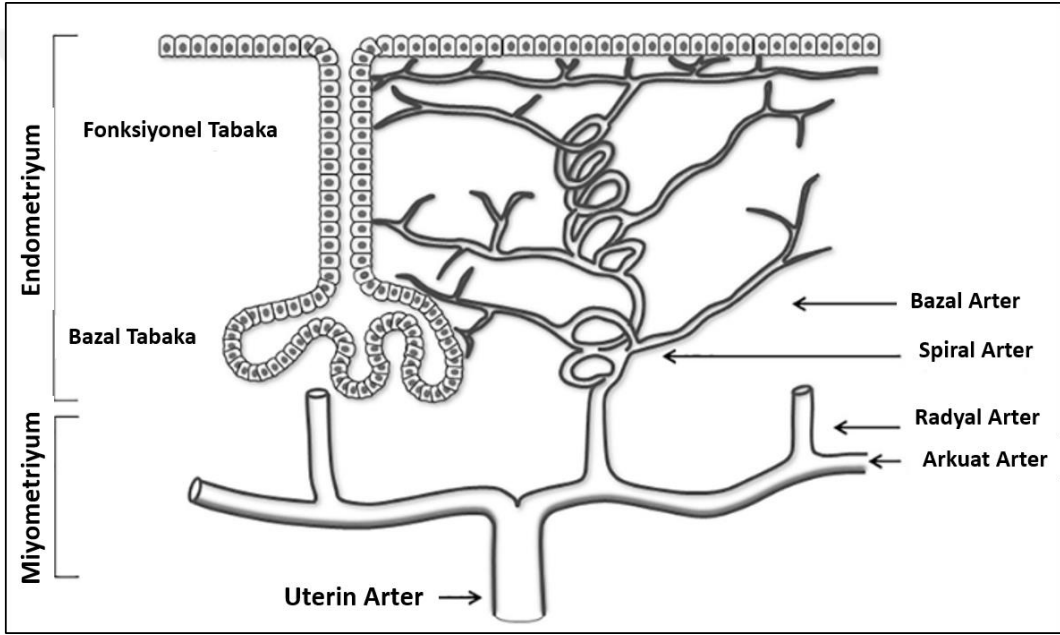
Uterus armut şeklinde ve ortasında kavitesi olan boşluklu bir organdır. Uterus anatomik olarak korpus, fundus ve serviks kısımlarından meydana gelmektedir. Uterusun korpusu (gövdesi) tavan kısmında kubbe biçimlidir ve bu bölüm fundus olarak isimlendirilirken, uterus kavitesinin aşağı doğru daraldığı iç ağız (internal os) kısmından aşağı doğru uzanan silindirik yapı ise serviks olarak isimlendirilir. Uterus duvarı dıştan içe doğru perimetriyum, miyometriyum ve endometriyum tabakalarından meydana gelmektedir. Organı en dıştan perimetriyum tabakası sarar ve bu tabaka uterusun farklı bölümlerine göre organ komşuluğu kısımlarında adventisya (bağ dokusu) dokusu ile sarılırken organ komşuluğu olmayan kısımlarında seroza (bağ dokusu ve mezotelyum) dokusu ile örtülüdür. Miyometriyum tabakası kalın bir düz kas tabakasıdır. Miyometriyum tabakasından sonra uterus mukozası olan ve organın lümenine bakan tabaka ise endometriyum tabakasıdır (JUNQUEIRA, 2006), (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. İnsan uterusunun anatomisini ve histolojik tabakalarını gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir. (<https://www.studyblue.com/notes/n/female-reproductive-tract/deck/6382603>)

Miyometriyum uterusun en kalın tabakasıdır ve bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinden oluşmuştur. Miyometriyum sınırları kısmen belirlenebilen dört tabakadan meydana gelmiştir. Birinci tabaka esas olarak longitudinal yerleşmiş kas liflerinden oluşmaktadır. İkinci ve üçüncü orta tabakalarında kas liflerinin yanı sıra arkuat arterler dairesel olarak yerleşmiş durumdadır. Arkuat arterlerden çıkan radyal arterlerin uzandığı miyometriyal tabaka ise dördüncü tabakadır. Miyometriyum uterin arterin dallanarak oluşturduğu arkuat ve radyal arterleri içerirken, endometriyum ise spiral ve bazal arterleri içermektedir (Şekil 2.3.). Endometriyumun epiteli tek katlı prizmatik epiteldir ve epitelin altında lamina propriya çok sayıda basit tübüler karakterde bezler içermektedir. Bu bezler miyometriyuma yakın olan kısımda dallanma göstermektedir. Endometriyumun bağ dokusu fibroblastlardan zengindir ve stromal hücreler hemen epitelin altında yer almaktadır. Bağ dokusu lifleri çoğunlukla tip III kollajenden meydana gelmiştir. Endometriyumun bir kısmı insanda menstrual siklus nedeniyle her ay yenilenmektedir. Bu nedenle endometriyumu bazal ve fonksiyonel kısım olarak iki ayrı kısımda incelemek mümkündür. Miyometriyumun hemen komşuluğundaki endometriyal tabaka bazal tabakadır. Bazal tabaka; lamina propriya ile birlikte uterus bezlerinin başlangıç kısmını ve bazal arterleri içermektedir. Fonksiyonel tabaka da lamina propriya ile birlikte spiral

aterleri, bezlerin yüzey epiteline doğru olan geri kalanı ve yüzey epitelinin içermektedir. Endometriyumun kan damarlarının beslenmesini miyometriyumdaki arkuat arterlerden çıkan ve endometriyumun bazal tabakasını besleyen düz arterler ve fonksiyonel tabakaya kan taşıyan kıvrımlı/spiral arterler sağlamaktadır (Şekil 2.3.). Endometriyumun fonksiyonel tabakası menstrual döngüde yenilenirken bazal tabaka ise hemen hemen değişmeden kalmaktadır (JUNQUEIRA, 2006).

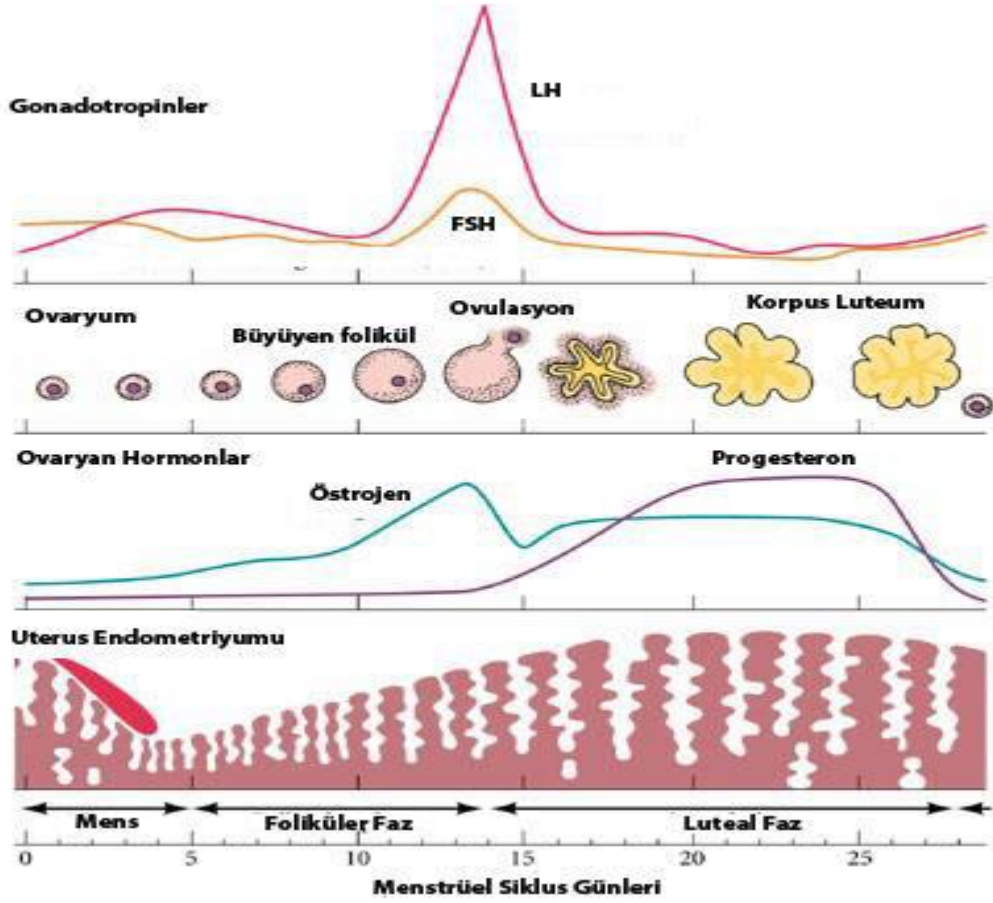


Şekil 2.3. İnsan endometriyumunun anatomisini ve histolojik tabakalarını gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Mizutani, 2019).

2.3. İnsanda Uterusun Siklusa Bağlı Fizyolojik Değişimleri

İnsanda puberte ile birlikte; hipotalamus gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) aracılığıyla ön hipofiz bezini uyarır ve buradan FSH, LH gibi gonadotropinlerin salınımını başlatmaktadır. Salınan gonadotropinler sayesinde 1. mayoz bölünme aşamasında duraklamış olan (diploten) primer/preantral foliküller gelişmesi için uyarılmış olur.

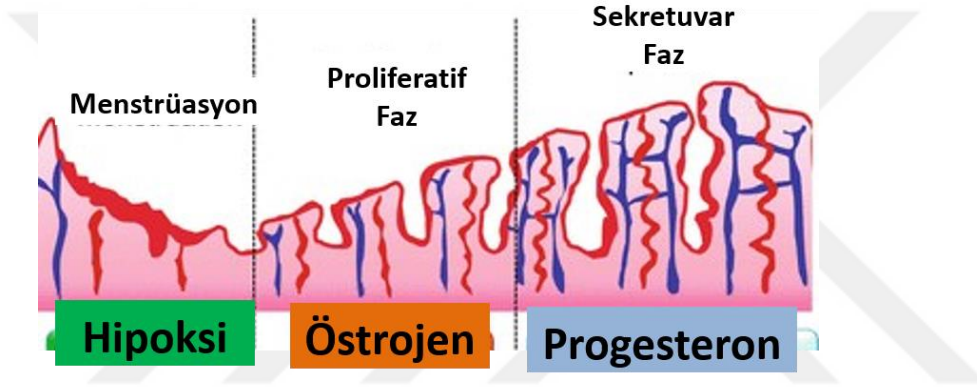
Böylece uterus endometriyumunun da senkronize olacağı menstrual döngü başlamış olur (Maybin ve ark., 2012), (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. İnsan endometriyumunun anatomisini ve histolojik tabakalarını gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Barresi, 2016).

Primer foliküller Folikül uyarıcı hormonun (FSH) etkisi ile uyarılır ve teka interna tabakası aktif olarak östrojen üretmeye başlar. Bu sayede kandaki östrojen miktarı artar ve endometriyum bu östrojenik ile birlikte prolifer olmaya başlar böylece endometriyum proliferasyon fazına girmiş olur. Endometriyumun proliferasyonu ovulasyona kadar devam eder ve ovulasyon ile birlikte luteinize edici hormonun (LH) ani artışı ile proliferasyon fazından luteal faza geçilmiş olur. Ovulasyondan sonra arda kalan folikül, hücreleri farklılaşır ve korpus luteumu meydana getirir. Korpus luteum progesteron üretmeye başlar böylece uterus endometriyumunu da sekretuar faza geçiş yapmış olur.

Endometriyum proliferasyon fazında östrojen hormonu aktif rol oynarken, sekretuar fazında ise progesteron hormonu daha aktif rol oynamaktadır (Şekil 2.5.). Endometriyumun sekresyon fazı yaklaşık olarak 14 gün sürerken proliferasyon fazının süresi kişiden kişiye değişim gösterebilir ve ortalama 10 gün sürmektedir. Ovaryan hormonların aracılık ettiği bu süreç ovaryumda oositin gelişmesi ve endometriyumun gebelik için hazır hale gelmesinde senkronizasyon sağlar. Bu senkronizasyon gebeliğin sağlıklı bir şekilde kurulumu için önemlidir (Cha ve ark., 2012).



Şekil 2.5. Menstrüal siklusta fazlara göre endometriyuma etki eden hormonları gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Maybin ve ark., 2012).

2.3.1. İnsan Endometriyumunun Proliferatif Fazında Histolojik Değişimleri

Menstruasyon ile birlikte endometriyum fonksiyonel tabakasını kaybettikten sonra proliferasyon fazında kaybedilen bu fonksiyonel tabaka yeniden oluşur. Fonksiyonel tabakadaki tüm hücresel elemanlar yeniden oluşmaya başlar, bu durum östrojenin endometriyumun bazal tabakası hücreleri üzerindeki mitotik etkisi sayesinde gerçekleşir. Endometriyumda bulunan bezler, kan kapillerleri, stromal hücreler ve endometriyum epitel hücreleri yeni bir fonksiyonel tabaka oluşturmak üzere çoğalırlar. Endometriyum bezleri yeni oluşum nedeniyle bu fazda dar lümenli ve düz tübüllü formlardır. Bez hücrelerinde granüllü endoplazma retikulumu sisternalarının sayısı ve Golgi kompleksi boyutları giderek artar ve böylece salgılama kapasitesi kazanırlar. Endometriyum

proliferatif fazda bu hücrel popölasyon artışı ile birlikte 3-4 mm kalınlığa ulaşır (JUNQUEIRA, 2006; Salamonsen ve ark., 2021).

2.3.2. İnsan Endometriyumunun Sekretuar Fazında Histolojik Değişimleri

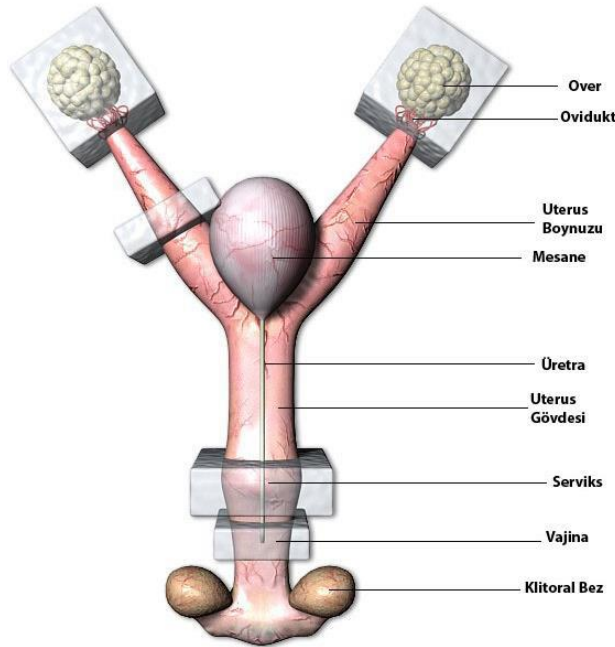
Ovulasyondan sonra luteinize olmuş folikül hücrelerinin progesteron salgılamasıyla birlikte, östrojen sayesinde gelişmiş olan endometrial bezleri sekresyon için uyarır. Bezler bu aşamada bol miktarda glikoprotein yapıdaki salgı ürünlerini üretmeye başlar ve bu üretim bezlerin lümeninin genişleyerek kıvrımlı bir hal almasına neden olur. Proliferasyon fazı sonrası endometrial hücre popölasyonunun artması ve sekretuar fazda da bezlerin salgı nedeniyle hacimlerinin artması ile birlikte stromal ödem meydana gelmiş olur ve sonuç olarak bu fazda endometriyum maksimum kalınlığa (5-6 mm) ulaşır. Sekretuar fazda hücrel mitotik aktivasyon proliferasyon fazına kıyasla daha sınırlıdır (Mara H. Rendi, 2012).

Ovulasyondan sonra fertilizasyon gerçekleşmesi durumunda bu fazda embriyonun implantasyona hazır hale gelmiş endometriyum duvarına tutunması gerçekleşir. Embriyo implantasyonunu takiben embriyonik trofoblast hücreleri insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu üretmeye başlar. Bu hormon gebeliğin devamlılığının sağlanması için korpusluteumdan progesteron salınımını plasantasyon gerçekleşene kadar uyarır. Erken gebelik sürecinde progesteron salınımı miyometriyum düz kas hücrelerinin kasılmasını baskılar ve embriyo implantasyonu tehlikeye girmesini engeller. Diğer yandan bu fazda salınmaya başlayan bu hormon stromal hücrelerin desidualizasyonunu indükler. Progesteron sayesinde hem desidualizasyon hem de embriyo gelişiminin paralel bir şekilde devam etmiş olur. Desidualizasyonda stromal hücreler glikojen ve lipid gibi maddeleri depolarlar ve polinükleer hale gelirler. Bunların yanı sıra desidual hücreler korpus luteumun gelişimini destekleyen desidual prolaktini, insülin benzeri büyüme faktörünü (IGF) ve onu bağlayan insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinini (IGFBP) ve prostaglandinler gibi birçok erken gebelik sürecine etki edecek maddeleri salgırlar (JUNQUEIRA, 2006; Mara H. Rendi, 2012).

Fertilizasyonu takiben embriyo implantasyonu gerçekleşmediği zaman, korpus luteumun gerilemesi ve ortadan kalkması yaklaşık 14 gün sürer. Böylece kandaki progesteron seviyesi hızla düşer ve sonrasında spiral arterlerde kasılmalar başlar bu da kan akımı engellenerek dokuda iskemi meydana getirir. Oluşan iskemi damar duvarının ve endometriyumun fonksiyonel tabakasının büyük bir kısmının ölümüne/nekrozuna yol açar. Progesteron yokluğuna bağlı olarak miyometriyum tabakasındaki kasılmalar ile kan damarları yırtılır ve kanama başlar. Böylece endometriyumun fonksiyonel tabakasının büyük bir kısmı ayrılır. Menstrüel döngü sonunda endometriyum genellikle ince bir tabaka haline gelir ve hormonal uyarımlarla yeni bir döngünün başlamasına hazır hale gelir (JUNQUEIRA, 2006; Maybin ve ark., 2012).

2.4. Dişi Farede Genital Sistem Anatomisi

Dişi farede genital sistem insandan farklılıklar göstermektedir. Anatomik olarak dişi farede bir çift ovaryum, oviduktlar, uterus, serviks, vajina, klitoris ve klitoral bez genital sistemi oluşturmaktadır. (Şekil 2.4.).



Şekil 2.6. Dişi farede genital sistem anatomisini gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (<http://www.niehs.nih.gov/research/resources/visual-guides/guides/female-repro/index.cfm>).

2.4.1. Dişi Farede Ovaryum Yapısı

Ovaryumlar, böbreklerin posterolateral kutuplarına yerleşmiş olup, her biri ince şeffaf bir elastik kapsül olan bursa ile çevrilidir ve mezovaryum ile dorsal vücut duvarına asılı haldedir. Ovaryumun damar ve sinirlenmesi şu şekildedir: mezovaryumdaki kan damarları ve sinirler hilus denilen bölgeden ovaryuma girer ve ovaryumu terkeder (DZ., 2005).

2.4.2. Dişi Farede Ovidukt Yapısı

Ovidukt ovaryumu uterus boynuzuna bağlar ve periovaryan boşluğa uzanan 1.8 cm uzunluğundaki kıvrımlı bir tüptür. Ovidukt, dorsal vücut duvarından mezovaryum, ovaryan bursa ve uterus mezometriyumu ile devam eden çift katlı bir membran olan mezotubaryum tarafından ayrılmaktadır. 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 meydana gelmiştir. Ampulla, bölgesi ise infundibulum aracılığıyla periovaryan boşluğa açılmaktadır. (www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame1.shtml; DZ., 2005)

2.4.3. Dişi Farede Uterus Yapısı

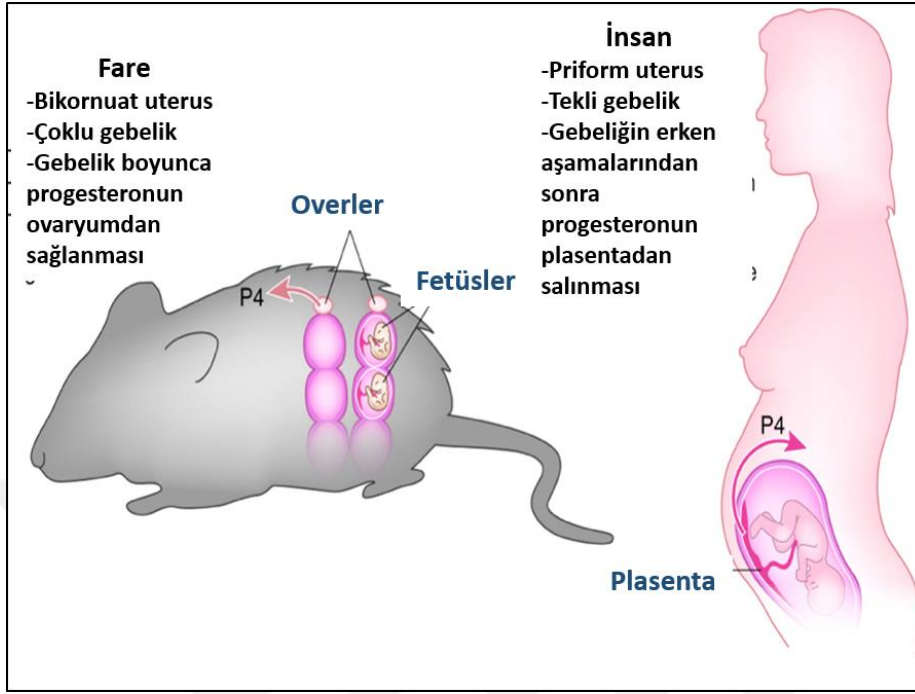
Fare uterusu, bikornuat yapıdadır ve Y şeklindeki bu yapı 2 lateral boynuz (kornua) ile tek bir medyan gövde kısmından (korpus) oluşur. Uterus boynuzları, oviduktlardan posteromediyal olarak mesanenin dorsal pozisyonuna uzanırlar ve burada birleşerek korpusu meydana getirirler. Boynuzlar, dorsal vücut duvarından kan, lenf damarları ve sinirlerin bulunduğu mezometriyum ile ayrılırlar. Uterusun gövde kısmı medyan septum tarafından ayrılır ve iki boşluk içeren kraniyal kısım ve bölünmemiş olan kaudal kısımdan oluşur. Uterusun bu kaudal kısmı vajinal boşluğuna çıktığı bölgeye boyun ya da serviks denilmektedir (DZ., 2005).

2.4.4. Dişi Farede Vajina ve Klitoris Yapısı

Kısa ve müsküler yapıda olan vajina, serviks devamındaki vücudun ventral yüzeyinde olan anüsün anteriyorundeki eksternal açıklığa uzanır. Vajina dorsalde rektuma komşu ve ventralde üretraya komşu olmakla birlikte bu bölgelere gevşek şekilde bağlı haldedir. Klitoris vajinal açıklığın anteriyor duvarında yer alır ve ventrale doğru uzanan küçük bir yükselti şeklindedir. Klitorisin yüzeyinin büyük bir kısmı kıllı ince deri ile örtülmüştür. Klitorisin anterolateral kısmında subkutan bağ doku içerisine gömülü olan klitoral bezler ihtiya eder (www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame1.shtml; DZ., 2005).

2.5. Dişi Farede reme Fizyolojisi ve İnsan reme Fizyolojisi ile Farkları

Hipotalamustan salınan gonadotropin salıcı hormon (GnRH); hipofizden salınan FSH ve LH, ovaryumdan salınan E2 ve P4 hormonları memelilerde üreme sistemini kontrol eden ortak hormonlar olmasına rağmen türler arasında bir takım farklılıklar söz konusudur. Bunlardan en belirgin olanı genital sikluslarındaki farklılıklardır. Dişi farelerde genital siklus olarak östrus siklusu görülmektedir. strus siklusuna sahip olan türlerde seksüel aktivite östrus fazı boyunca gerçekleşirken, insanlarda olduğu gibi menstrüel siklusa sahip olan türlerde ise böyle bir seksüel aktivite sınırlaması yoktur ve menstrüel sikluslarının herhangi bir zaman diliminde aktif olabilirler. Diğer bir fark ise gebeliğin gerçekleşmemesi durumunda menstrüel siklusa sahip türlerde menstrüasyon döneminde endometriyumlarının fonksiyonel tabakaları dökülürken, östrus siklusuna sahip olan türlerde ise endometriyum dökülmez ve sadece reabsorbe edilir (P.Grasso, 1998; DZ., 2005). Diğer yandan farede bikornuat tip uterus yer alırken insan piriform tip uterusu sahiptir. Bu nedenle farede doğal şartlarda çoklu gebelik gerçekleşirken (10-12) insanda ise genelde çok daha az sayıda (2-3) ya da tekli gebelik gerçekleşmektedir. İnsan ve farede progesteronun gebelik boyunca salınması şekli de diğer bir farklılıklardandır. Farede tüm gebelik boyunca ovaryumdan sağlanırken, insanda ise plasantasyon oluşana kadar ovaryumdan ve sonrasında plasantasyon gerçekleşip plasenta fonksiyonel hale gelince plasentadan salınmaya devam eder (Ratajczak, 2010) (Şekil 2.7.).

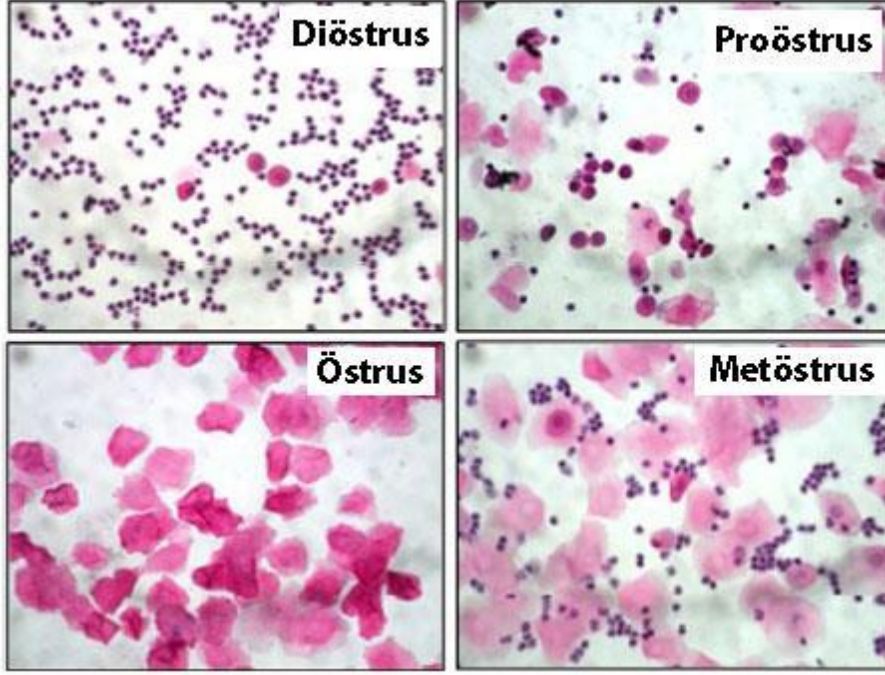


Şekil 2.7. İnsan ve farede gebelik tipi farkları gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Ratajczak, 2010).

2.6. Dişi Farede Genital Siklus

Dişi fareler poliöstrik hayvanlardır ve üreme fizyolojisi mevsime bağlı değildir. Puberte başlangıcından yaşlılığa kadar döngüsel aktivite gösterirler. Farelerde östrus siklusu dört faza ayrılmaktadır ve toplamda siklus süreleri 4-5 gün ile sınırlıdır. Östrus siklusunda ovaryan gelişimin meydana geldiği foliküler faz proöstrus ve östrus fazlarını içerirken, korpus luteumun oluşarak fonksiyon gördüğü luteal fazı ise metöstrus ve diöstrus fazları kapsamaktadır. Diğer yandan hipofiz ve overlerden salgılanan hormonlar ile oositin aktive edilmesi sonucundaki değişiklikler vajinal bölgedeki hücre morfolojisini de etkiler. Bu hücre morfolojilerini ve tiplerini farelerden alınan vajinal smearlere yayma işlemi uygulaması sonrasında gözlemlemek mümkündür (DZ., 2005; Zehra Dilşad Çoban 2016). Östrus siklusu fazlarını smear yaymalarında üç farklı hücre popülasyon yoğunluğuna göre belirlemek mümkündür. Bunlar, lökosit, nükleuslu ve nükleusunu kaybetmiş epitel hücrelerinin birbirine sayıca oranları gözlemlenerek fazlar belirlenebilmektedir. Diöstrus fazında çok yoğun bir şekilde lökosit ve nadir nükleuslu epitel gözlenmektedir. Proöstrus fazında, çoğunlukla nükleuslu ve nükleusunu kaybetmiş epitel hücreleri bulunmakta ve buna ek olarak az sayıda lökositler yer almaktadır. Östrus fazında sadece çok sayıda

nükleuslarını kaybetmiş epitel hücreleri (yassı epitel) gözlemlenmektedir. Metaöstrus fazında ise nükleuslarını kaybetmiş epitel hücreleri ve lökositleri gözlemlenmek mümkündür (McLean ve ark., 2012; Zenclussen ve ark., 2014; Zehra Dilşad Çoban 2016) (Şekil 2.8.). Bu östrus evreleri, araştırmalarda farelerin çiftleştirme için aktif (reseptif) olduğu zamanı belirlememizi sağlar.



Şekil 2.8. Dişi farelerde östrus siklusunun evrelerine göre smear yaymalarında değişen hücresel morfolojileri ve hücresel popülasyonları gösteren fotoğraflar referanstan düzenlenmiştir (McLean ve ark., 2012).

2.6.1. Dişi Farede Proöstrus Evresi

Dişi farelerde östrus fazlarına bağlı olarak genital organlarında çeşitli morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Proöstrusta vajina ağzı kırmızı-pembe renkte ve nemli gözlenmektedir ve bu dönemde dişi henüz seksüel olarak reseptif değildir. Ovaryan faz olarak foliküler faz karakterindeki bu dönemde ovaryum folikülleri büyümeye başlarken, diğer yandan bu foliküller tarafından üretilen östrojen ile de endometriyum gelişmeye

prolifere olmaya başlar. Proöstrus fazı dişi farede yaklaşık olarak bir gün sürmektedir (P.Grasso, 1998; DZ., 2005; Zehra Dilşad Çoban 2016).

2.6.2. Dişi Farede Östrus Evresi

Dişi fareler östrus fazında seksüel olarak reseptif hale gelir ve bu nedenle bu dönem ‘kızgınlık’ evresi olarak da isimlendirilir. Ayrıca fizyolojik ve hormonal değişiklikler nedeniyle belirgin bir şekilde arka ayaklarını kaldırdıkları lordosis refleksi gibi, seksüel olarak reseptif olduğunu gösteren davranışlar sergileyebilirler. Östrus evresinde ovaryum folikülleri gonadotropik hormonların etkisi altında tamamen olgunlaşmıştır ve ovulasyon bu dönemde meydana gelmektedir. Dolaşımdaki yüksek östrojen nedeniyle uterus lümeninde biriken sıvı ve vasküler geçirgenlikteki artış proöstrus ve östrus fazları boyunca uterusun kademeli olarak şişmesine ve sonucunda stromal ödeme neden olurlar. Bu dönemde vajina görüntüsü ise proöstrustakinden daha açık renktedir ve belirgin biçimde ödemli görünümündedir (DZ., 2005; Zehra Dilşad Çoban 2016).

2.6.3. Dişi Farede Metöstrus Evresi

Ovaryan siklusa göre luteal faza geçişin olduğu metöstrus döneminde östrojen azalır ve ovaryumda korpus luteum gözlemlenmektedir. Uterus dokusundaki ödem ve hiperemiye azalma görülmektedir. Ayrıca uterus lümen epitelinde dejenerasyonlar gözlemlenebilir. Vajinal morfolojilerde ise ödem azalmış, kuru ve solgun bir görünüm kazanmıştır (DZ., 2005; Zehra Dilşad Çoban 2016).

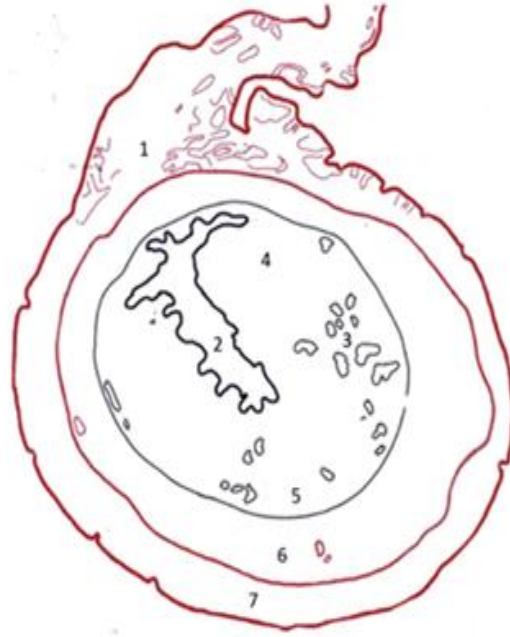
2.6.4. Dişi Farede Diöstrus Evresi

Dişi farede fertilizasyonun gerçekleşmediği zaman bu fazda progesteron üreten korpus luteum aktivitesi azalır ve gerilemesiyle son bulur. Endometriyum tabakası gelecek siklus için yeniden rejenere olamaya başlarken bu dönemde ovaryumda folliküller tekrardan

gelişmeye başlamaktadır. Uterusta ise stromal ödem neredeyse tamamen kaybolmuştur ve doku damarlanmaya daha başlamadığı için daha soluk renkli bir görünümündedir. Bu evrede vajinal morfoloji ise soluk renkte ve kapalı haldedir (DZ., 2005; Zehra Dilşad Çoban 2016).

2.7. Dişi Farelerde Uterus Histolojisi

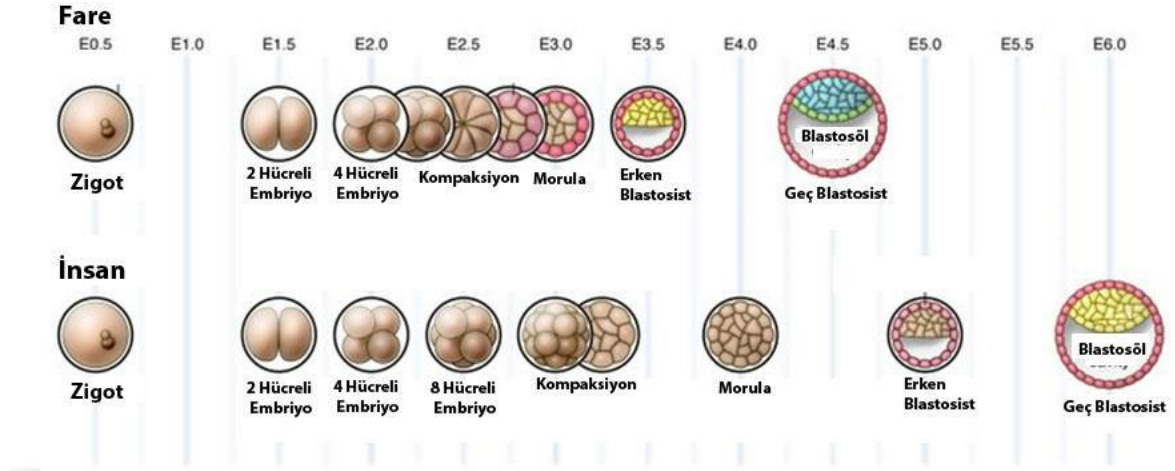
Gebe olmayan farelerde uterus dokusunun enine kesit histolojisi incelendiği zaman 3 tabaka gözlemlenmektedir Şekil. En dıştaki perimetrium tabakasıdır ve bu bağ dokusu olan seroza katmanı dorsal kısımda mezometriyum ile devamlılık gösterir. Sonraki tabaka miometriyum olarak isimlendirilir ve kalın bir kas tabakasıdır. Burada kas tabakaları dışta longitudinal olarak düzenlenirken içte sirküler yerleşim göstermektedir. Longitudinal ve sirküler kas tabakasının arasında bağ doku yer alır ve vasküler yapıdaki bu gevşek bağ dokusu stratum vaskulozum olarak isimlendirilir. En içte ise uterus mukozası olan endometriyum tabakasıdır. Endometriyum kan damarları ve sinirleri içermekle birlikte epiteli basit prizmatik epiteldir. Endometriyal stromada yer alan ve endometriyal lümene açılan dallı tübüler bezler endometriyumun en belirgin özelliklerindendir. Endometriyumun stromasında birçok küçük polihedral yapıda olan stromal hücre ve lenfosit içeren retiküler bağ doku yer almaktadır. Uterus boynuzlarının orta hatta bir araya geldiği yerde 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 ile döşelidir. Uterus gövdesinin serviks yakın kısımları, serviks ve vajina çok katlı yassı epitel ile karakterizedir. Uterus boynuzlarının birleştiği gövdenin lamina propriyası boynuzlara göre daha az hücre içerirken daha çok lifsel eleman içermektedir. Serviksin kraniyal üçte ikisinin duvarı sirküler yerleşimli düz kas tabakasını daha çok içermektedir. Kaudal üçte birinin duvarı ise kollajen lif demetlerince daha çok zengindir (DZ., 2005; Mara H. Rendi, 2012) (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Gebe olmayan farelerde uterusun morfolojisini gösteren çizim; 1:Mezometriyum, 2: Uterus Lümeni, 3: Uterus Bezleri, 4: Mezometriyal Endometriyum, 5: Anti-Mezometriyal Endometriyum, 6: Miyometriyum (sirküler), 7: Miyometriyum (longitudinal) (Croy, 2014).

2.8. İnsanda ve Farede Pre-İmplantif Embriyo Gelişim Süreçleri

Preimplantasyon evresindeki embriyonun gelişimi boyunca görülen en belirgin iki özelliği fertilizasyondan sonra zigotun yarıklanması ve embriyonik hücrelerin blastosist aşamasında iç hücre kitlesi ve trofoektoderme farklılaşmasıdır (Yoshinaga K., 1988; Stewart ve ark., 1997). İnsanda ve farede preimplantif dönem embriyo gelişimi her iki türde de embriyo, zigot aşamasından blastosist aşamasına geldikten sonra uterusa ulaşmaktadır. Ancak preimplantif embriyo gelişim sürecinde bu gelişim aşamaları insanda ve farede zamanlama olarak farklılıklar göstermektedir. Zigot oluşumunu gebeliğin 0,5. günü olarak baz alındığında farede erken blastosist aşamasına embriyonik 3,5. günde ulaşırken insanda ise embriyonik 5. günde ulaşmaktadır. Preimplantif gelişimin tamamlandığı geç blastosist aşamasına farede embriyonik 4,5. günde, insanda ise 6. günde ulaşmakta (Magnuson T, 1987; Cockburn ve ark., 2010) (Şekil 2.10.).

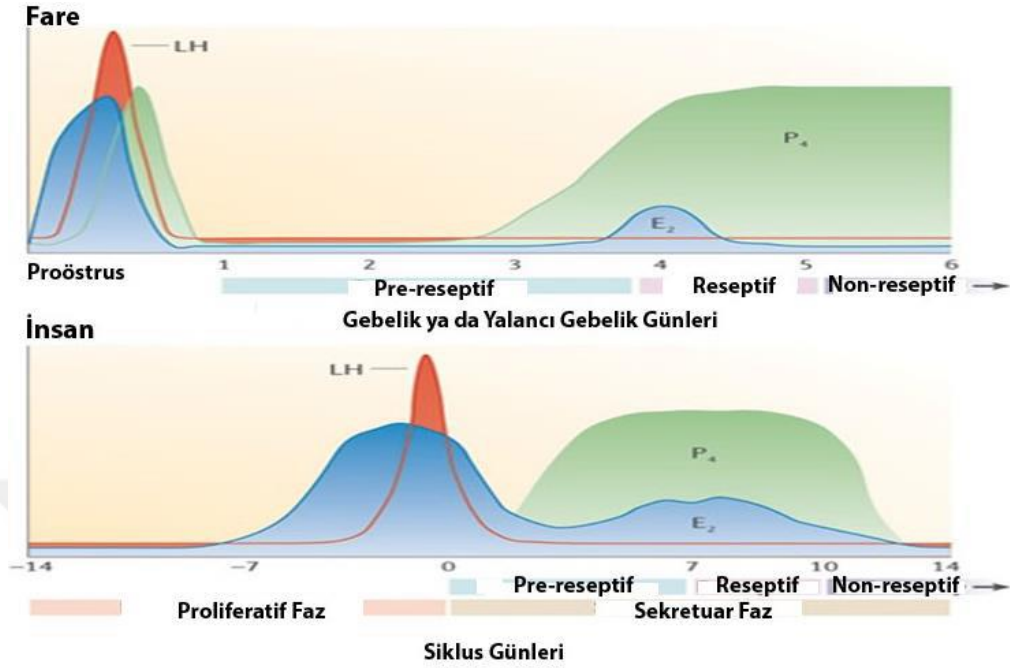


Şekil 2.10. İnsanda ve farede preimplantif embriyo gelişim evreleri gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Magnuson T, 1987; Cockburn ve ark., 2010).

Erişkin bir dişi fare normal şartlarda her siklusta 8-10 adet oosit ovule eder. Farelerde ovulasyondan sonra oositler ovidukt kanalına girerler ve buradan oviduktun ampulla kısmına ulaşırlar. Farelerde fertilizasyon ampulla kısmında gerçekleşir ve preimplantif embriyo gelişim süreci bu bölgede başlar. Fertilizasyondan sonra oluşan zigot mitoz bölünmeler geçirerek blastosist evresine ulaşır sonrasında takiben uterusu geçer. Çiftleşmeden sonra hipofizden salınan prolaktin ovaryumda fonksiyonel bir korpus luteum oluşumuna neden olur ve gebeliğin devamı için başka bir ovulasyon ya da siklusun olmasını bu sayede engellemiş olur (Soares MJ, 2006). Embriyonik 3,5. günde fare blastosistinde trofoektoderm ve iç hücre kitlesi meydana gelir. Blastosist 4,5. güne geldiğinde embriyoyu oluşturacak olan primitif endoderm ile primitif ektoderm ve tüm trofoblastik dokuyu oluşturacak olan trofoektoderm olmak üzere üç hücre tipi bulunmaktadır (Gardner, 1982; Snell GD, 1996). Trofoblast, implantasyona aracılık eder ve memeli konseptüsünün yaşaması için gerekli olan, fetüs ile anne arasında besin, gaz değişimini sağlayan plasentayı oluşturur. Blastosist trofoektoderm hücreleri iki farklı bileşenden oluşur: polar ve mural trofoblastlar. Mural trofoektoderm iç hücre kitlesine en distalde yer alan hücrelerden meydana gelirken, polar trofoektoderm ise iç hücre kitlesinin komşuluğundaki hücrelerdir (Dickson, 1963; Rossant J, 2002).

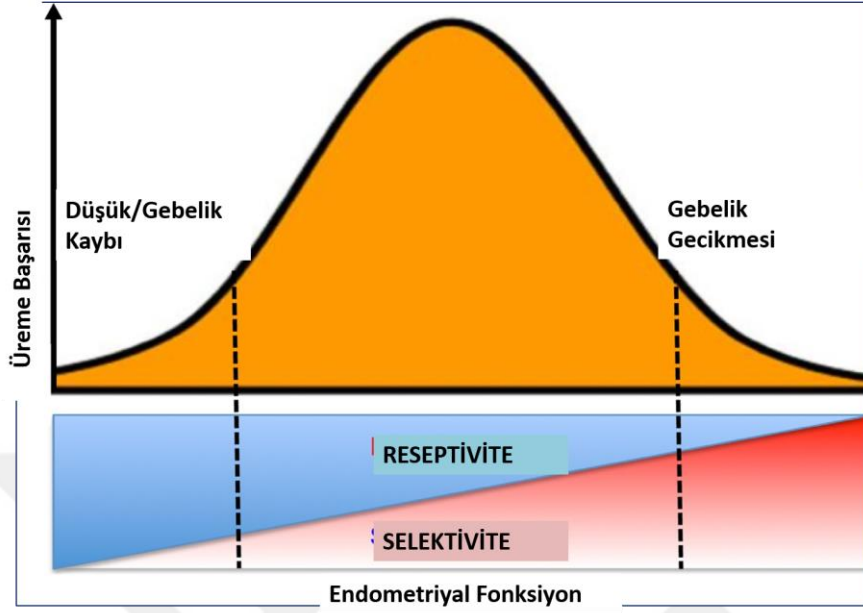
2.8. Uterus Reseptivitesi ve Selektivitesi

Uterus ya da endometriyal reseptivite ve selektivite, sağlıklı bir embriyonun sağlıklı bir maternal endometrium tarafından kabul görmesi esasına dayanmaktadır. Uterus reseptivitesi endometriumun blastosistin implantasyonuna izin verdiği sınırlı bir zaman dilimi olarak tanımlanırken selektivitesi ise bu sınırlı zaman diliminde implantasyona sağlıklı bir embriyo seçebilmesidir (Teklenburg ve ark., 2010; Weimar ve ark., 2012; Brosens ve ark., 2014). Erken gebelikte endometrium östrojen ve progesteron hormonlarına özgün biçimde yanıt veren heterojen hücre topluluğundan oluştuğundan endometriyal reseptivite ve selektivitenin de bu hormonların kontrolünde olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Wang H. ve ark., 2006; Cha ve ark., 2012; Zhang S. ve ark., 2013). Farede ve insanda endometriyal reseptivite; pre-reseptif (nötral), reseptif ve non-reseptif faz olmak üzere üç ayrı fazda incelenir. 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 reseptif olmayan refraktör faza geçer. Gebe ya da yalancı gebe farede ise endometrium 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 H. ve ark., 2006; Zhang S. ve ark., 2013) (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. İnsan ve farede steroid hormonlar tarafından düzenlenen endometrial reseptiviteyi anlatan çizim referanstan düzenlenmiştir (Wang H. ve ark., 2006).

Sağlıklı bir endometriyum reseptif dönemde aynı zamanda embriyoya karşı seçicidir ve selektif haldedir. Selektif endometriyum genetik ya da morfolojik olarak kötü embriyonun implantasyonuna reseptif dönemde izin vermez ve endometriyum embriyo için bir biyosensör görevi görür. Endometrial reseptivite ve selektivite sağlıklı endometriyumda bir denge halindeyken, bu denge bozulduğunda gebelik kaybı ya da gebelik elde edememe gibi durumlara neden olur (Şekil 2.12.)

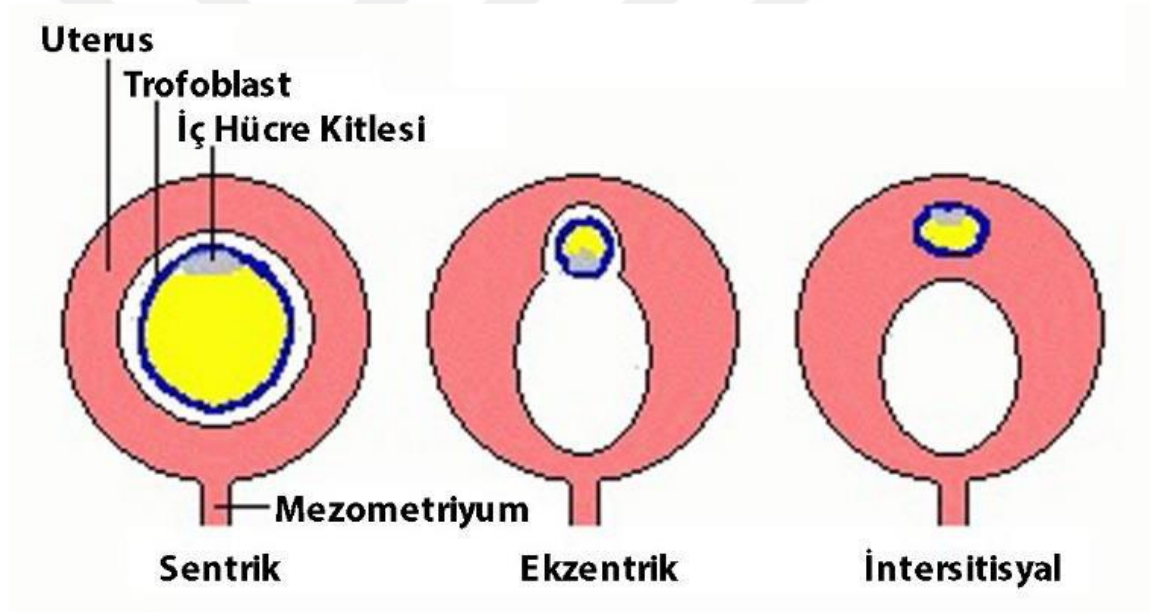


Şekil 2.12. Üreme başarısında endometriyal reseptivite ve selektivite dengesini anlatan çizim referanstan düzenlenmiştir (Brosens ve ark., 2014).

2.9. Embriyo İmplantasyonu ve Memelilerde İmplantasyon Tipleri

Memelilerde gebeliğin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için fertilizasyondan sonra pre-implantif dönemde embriyo gelişimi, implantasyon ve desidualizasyonun doğru bir şekilde meydana gelmesi gerekmektedir (Psychoyos, 1973). İmplantasyon, embriyonun maternal endometriyuma yerleşmesi ve gömülmesi sürecidir. Embriyo implantasyonun temel olaylarını şu şekilde özetlemek mümkündür: blastosistin maternal endometriyuma yakınlaştığı alanda kapiler geçirgenlik ve kan akışının artması, semiallojenik embriyonun maternal immün saldırıdan kaçması, blastosistin endometriyum lümen epiteline tutunmasının hemen ardından çevresindeki endometriyal stromanın bölgesel desidualizasyonu, embriyonik trofoblastlar tarafından gerçekleştirilen kontrollü invazyonu (Psychoyos, 1973; Beer ve ark., 1978). Özetlenen tüm durumlarda hem embriyo hem de endometriyumdaki hücre tiplerinde zamana ve bölgeye bağımlı olarak

proliferasyon, farklılaşma, göç ve yeniden şekillenme gibi hücresel olaylar meydana gelmektedir. Bu kritik olaylar, progesteron ve östrojen hormonlarına yanıt veren hücre özgün etkileşimlerine bağlıdır. Embriyonun uterus ile karşılıklı etkileşimleri ve bunun sonucunda meydana gelen implantasyon süreci incelendiği zaman memelilerde birçok ortak özellikleri içermesinin yanı sıra embriyonun maternal endometriyuma gömülme tarzı türden türe farklılıklar göstermektedir. Blastosist ve uterusun implantasyon anındaki etkileşimlerini morfolojik olarak temel alan Bonnet, implantasyonu memelilerde merkezi (sentrik), ekzentrik ve intersitisyal olmak üzere 3 gruba ayırmıştır (Cha ve ark., 2014) (Şekil 2.13.).



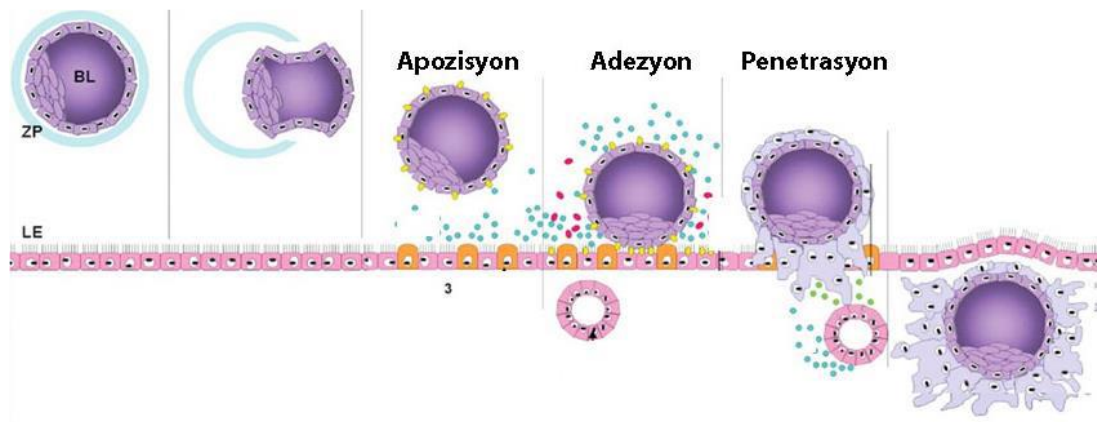
Şekil 2.13. Memeli türünde blastosist ve uterus morfolojik etkileşimleri temel alınarak tanımlanan implantasyon tiplerini gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/implant.html>).

Merkezi implantasyonun görüldüğü türler tavşan, dağ gelinciği ve bazı keseli hayvanlardır. Bu türlerde blastosist implantasyondan önce yüzeyel olarak yoğun bir şekilde genişleyerek endometriyuma temasını sağlar ve bu şekilde tutunduktan sonra implante olur. Blastosistin yapmış olduğu yüzeyel genişleme nedeniyle merkezi implantasyon tipi, yüzeyel implantasyon olarak da isimlendirilmektedir. Fare, sıçan ve

hamster gibi kemirgen türlerinde ise ekzentrik implantasyon gözlemlenmektedir. Bu canlılarda blastosistler yüzeyel olarak çok az bir genişleme göstermekle birlikte uterus lümeni invaginasyonla adeta bir cep oluşturur ve bu cebe implantasyon gerçekleşir. İnsandaki implantasyon tipi intersitisyel implantasyondur. Burada blastosist lümen epiteli bariyerini adeta mekanik bir şekilde aşar ve epitelin hemen altındaki stromal doku ile etkileşimde bulunarak boraya gömülür. İmplantasyon insanda epitelten içeri girme ve stromal dokuya gömülme şeklinde gerçekleşmiş olur. İntersitisyel implantasyon aynı zamanda kobay ve şempaze gibi memeli türlerinde de gözlemlenir (R., 1884; Cha ve ark., 2014).

2.10. Embriyo İmplantasyon Aşamaları

Enders ve Schlafke, implantasyonun apozisyon (yakınlaşma), adezyon (tutunma) ve penetrasyon (içine girme) olarak üç aşamada gerçekleştiğini göstermişlerdir (Enders A. C. a. S. S., 1969). Apozisyon aşaması, embriyonun trofektoderm hücrelerinin endometriyum lümen epiteline yakınlaşmasının gerçekleştiği evredir. Sonraki aşama olan adezyon evresinde trofektoderm ile lümen epiteli arasındaki ilişki blastosistin yıkama ile uzaklaştırılmasına izin vermeyecek kadar ilerlemiş durumdadır ve tutunma sağlanmıştır. Son evrede penetrasyon aşaması ile trofektoderm lümen epiteline invazyonu gerçekleşmektedir (Enders A. C. a. S. S., 1969) (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14. Embriyo implantasyon aşamalarını gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Fitzgerald ve ark., 2008). BL: blastosist, ZP: zona pelusida, LE: lümen epiteli.

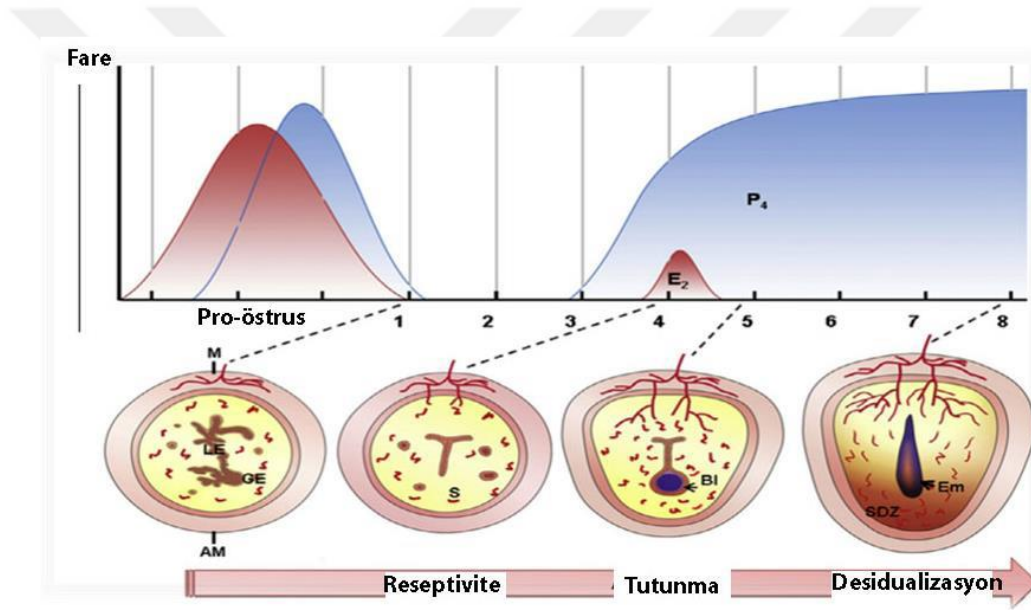
2.11. Farede Peri-implantif Dönem ve Kript Formasyonu

2.11.1. Farede Peri-implantif Dönem

Memelilerde, embriyonun apozisyonu başlamadan önce endometrial stromal ödem oluşur. Stromal ödem, uterus lümeninin daralmasına neden olarak trofektodermin mikrovillusları ile lümen epitelinin parmaklı çıkıntılar oluşturmaları (apozisyon) ve birbirlerine yakınlaşmalarına (adezyon) neden olarak implantasyonu başlatmış olur (Zhang S. ve ark., 2013; Croy, 2014). Embriyonun epitele tutunması sonucunda blastosistin olduğu bölgede stromal vasküler geçirgenlik artar. Endometrial lümenin kapanması olayı gebelik süresince uterusun tamamında gerçekleşir ve bu durum blastosist varlığından bağımsız şekilde gerçekleşebileceği de ortaya konmuştur. Stromal ödem ve uterus lümeninin daralarak kapanması blastosist olmasa da gerçekleşebilirken, progesteron olmadığında gerçekleşmemektedir (Zhang S. ve ark., 2013). Farelerde implantasyon, lümen epitelinin kan damarlarınca zengin bölge olan mezometriumun zıt tarafında bulunan anti-mezometrial kutbunda gerçekleşmektedir (Croy, 2014). İmplantasyon zamanı, anti-mezometrial lümen epiteline blastosistin hangi navigatör mekanizma ile yönlendirildiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Farede blastosistler, lümenin kapanmasının başlamasıyla birlikte uterus eksenine boyunca uterus lümeninin anti-mezometrial tarafına hizalanırlar. Tutunma olayı başladığında blastosist iç hücre kitleleri mezometrial kutba bakacak şekilde embriyo pozisyonunu almaktadırlar (Wang H. ve ark., 2006; Zhang S. ve ark., 2013). Farelerde embriyonun endometriumuna tutunma reaksiyonunun ilk belirtisi gebeliğin 4. gününün gece saatlerinde meydana gelmektedir (Psychoyos, 1973).

Gebe fare uterusunda endometrial yanıt östrojen ve progesteron hormonları kontrolünde morfolojik olarak değişim gösterir. Gebeliğin 1. gününde fare uterusunun lümen epiteli dallanmış haldedir. Stromal ödemin giderek artmasıyla birlikte gebeliğin 4. gününde lümen gittikçe daralır ve T şeklini almaktadır. Endometrium stromasında ödem ve vaskülarizasyon artmış durumda olması nedeniyle uterus lümeninin daralır ve blastosist için bir cep oluşturur. Böylece gebeliğin 4. günü reseptif hale geçen endometrium ile

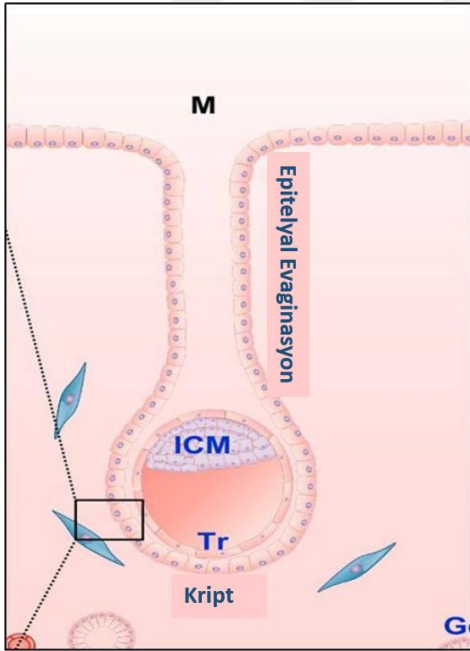
blastosistin yaklaşması stromal ödem sağlanmış olur ve 5. güne gelindiğinde blastosist mural trofoektoderm tarafından anti-mezometrial lümen epiteline tutunarak implante olur. Embriyonun implante olduğu bölgedeki subepitelyal stromal hücreler 5. günden sonra avasküler olan birincil desidual bölgeyi (PDZ) oluşturmak üzere proliferer olur ve farklılaşırlar. Gebeliğin 6. günü PDZ oluşmuş olur ve 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 2.15.).



Şekil 2.15. Peri-implantasyon sürecindeki steroid hormon seviyeleri ve gebelik günlerine göre uterus alanlarının enine kesitlerinin tanımlandığı diyagramlar referanstan düzenlenmiştir (Zhang S. ve ark., 2013). LE: lümen epiteli, GE: bez epiteli, AM: anti mezometriyum, M: mezometriyum, S: stroma, Bl: blastosist, Em: embriyo, SDZ: sekonder desidual alan.

2.11.1. Fare Endometriyumunda Kript Formasyonu

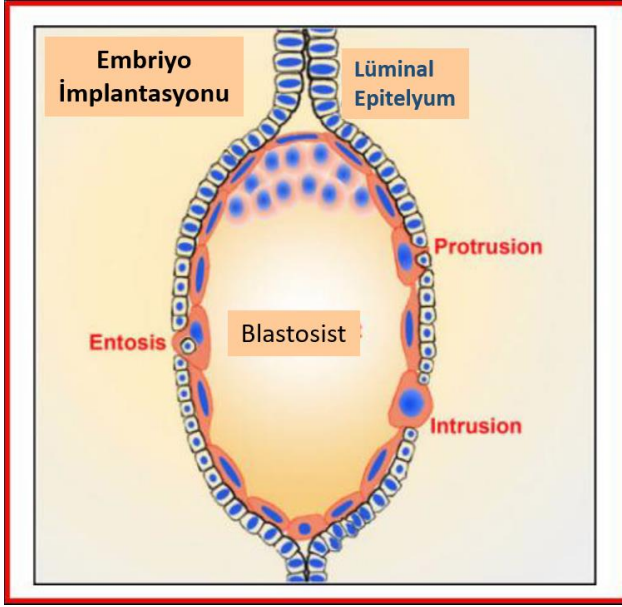
Kript formasyonu fare uterusunda embriyo implantasyonu başlamadan hemen önce gerçekleşen ve implantasyon ile son bulan bir morfo dinamiktir. Fare gebeliğinde stromal ödemin artmasıyla birlikte ‘epitelyal evaginasyon’ olarak isimlendirilen süreç gerçekleşmeye başlar. Epitelyal evaginasyon gebeliğin 3. gününden 4. gün geceye kadar devam ederek kript formasyonunu meydana getirir (Şekil 2.16). Oluşan kript embriyonun yuvalandığı ve 4. günü gece ilk tutunma reaksiyonunun meydana geldiği implantasyon sürecine bir hazırlık ortamı hazırlamış olur. Farede periimplantasyon sürecinde stromal ödeme yanıt olarak lümen epitelinin yapmış olduğu bu morfokinetik harekete epitelyal evaginasyon ve bunun sonucunda oluşan yapıya ise kript denilmektedir (Yuan ve ark., 2016).



Şekil 2.16. Peri-implantasyon sürecinde epitelyal evaginasyon sonucundaki oluşan kript formasyonunu gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Yuan ve ark., 2016).

Gebeliğin 4. günü gece başlayan tutunma reaksiyonu ve bunu takiben 5. gün gece epitelyal bariyerin ortadan kalkmasıyla embriyo invazyonu gerçekleşmektedir. Epitelyal bariyerin kalkmasına ilişkin literatürde şimdiye kadar yaygın bilinen bilgi epitel hücrelerin

apoptoza uğrayarak bu bariyerin kalkması ve bunu takiben blastosistin stromaya invazyonunun gerçekleşmesi yönündeydi (Zhang S. ve ark., 2013). Ancak yapılan son çalışmalar peri-implantasyonda blastosist ile lümen epiteli arasında non-apoptotik bir hücre içinde hücre invazyon sürecinin gerçekleştiği yani ‘entosis’ olarak isimlendirilen bir mekanizma ile epitelyal bariyerin aşıldığı ortaya konmuştur (Li ve ark., 2015) (Şekil 2.17.). Entosis şeklindeki implantasyon, blastosiste ait trofektoderm hücrelerinin direkt temasta oldukları lümen epiteli hücrelerini adeta yutarak epitelyal bariyeri geçtiği ve bu bariyeri aşmalarından sonra geriye kalan lümen epiteli hücrelerinin blastosist ile temasta olamayacak şekilde apoptoza uğramasıdır (Li ve ark., 2015).



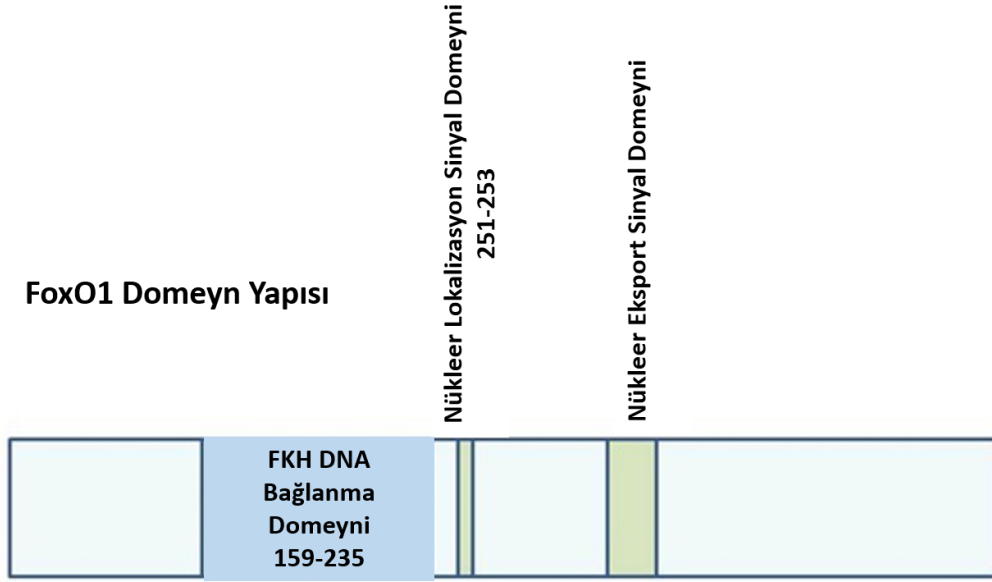
Şekil 2.17. Peri-implantasyon sürecinde blastosistin non-apoptotik hücre içinde hücre invazyonu sürecini (Entozis) anlatan çizim referanstan düzenlenmiştir (Li ve ark., 2015).

2.12. Forkhead Box O 1 (FoxO1) Transkripsiyon Faktörü

Transkripsiyonel düzenleyici olan Forkhead ailesi ilk olarak *Drosophila*'da tanımlanmış olup bu genin *Drosophila*daki mutasyonu ile çatal şeklinde ektopik baş morfolojileri ortaya çıkması sebebiyle bu aile Forkhead olarak isimlendirilmiştir (Carter ve ark., 2007).

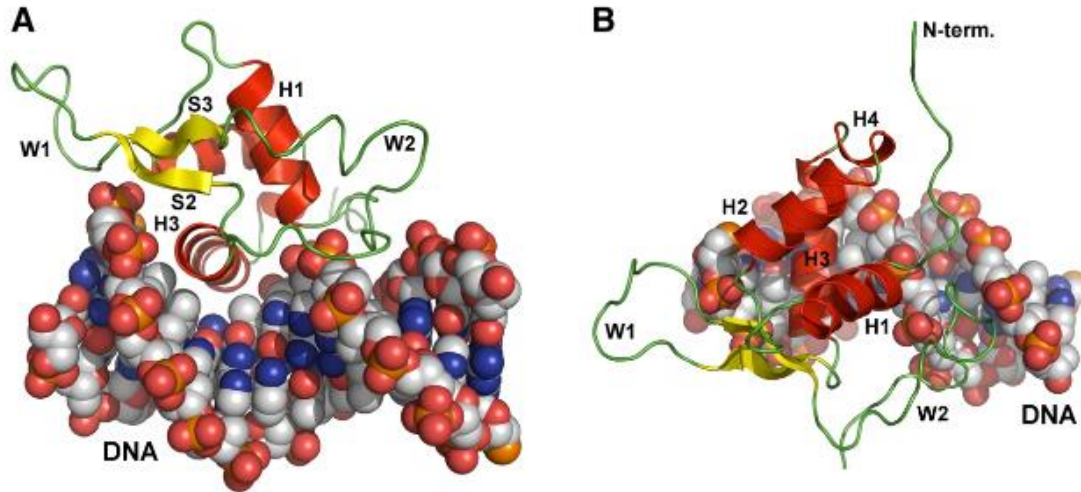
Evrimsel olarak korunmuş olan bu ailenin diğerk bir isimlendirmesi ise bu proteinlerin X-ray kristallograflerinde, DNA bağlanma domeynleri 3 boyutlu bir yapı sergiler ve 3 alfa helix yapıları kelebek kanatlarını andıran iki karakteristik loop ile çevrili olaması nedeniyle ise ‘Winged Helix’ proteinleri olarak da ifade edilir. Bu ailenin insanda 100’den fazla üyesi bulunmakla birlikte gen sekans benzerliğı temel alınarak FoxA’dan FoxR’ye kadar sınıflandırılmaktadır (Kaestner ve ark., 2000; Carter ve ark., 2007). Forkhead ailesinin kendilerine has korunmuş DNA bağlanma bölgeleri vardır ve bu bölgeler FKH/FH domeyni olarak isimlendirilmektedir (Huang H. ve ark., 2007). Forkhead Box O (FoxO) Transkripsiyon faktörleri Forkhead ailesinin bir alt sınıfı/grubudur ve FoxO1 bu sınıfta yer alır. FoxO transkripsiyon faktörlerinin memelilerde; FoxO1 (FKHR/ FKH1), FoxO3 (FKHRL1/ FoxO3a), FoxO4 (AFX/ AFX1) ve FoxO6 olmak üzere dört üyesi vardır (Biggs ve ark., 2001). FOXO1 FOXO3 ve FOXO4 olmak üzere bu FOXO genleri insanda ilk olarak rapdomyosarkoma ve akut miyeloid lösemi kromozomal translokasyonlarında tanımlanmıştır (Galili ve ark., 1993).

FoxO1 transkripsiyon faktörü ailenin diğerk üyeleri ile yapısal olarak birçok benzerlik taşısa da fonksiyon bakımından farklılık gösterebilir. İnsanda FOXO1 ekspresyon kaybı, prostat tümörogenezini tetikleyen kromozom 13’teki delesyon kaynaklıdır (Yang ve ark., 2017). FoxO1 proteininin üç boyutlu yapısı kelebeğe benzer bir şekildedir (Clark ve ark., 1993) ve yüksek şekilde korunmuş FKH domeyni, nükleer lokalizasyon sinyal domeyni, nükleer eksport sinyal domeyni ve transaktivasyon domeynini içerir (Huang H. ve ark., 2007) (Şekil 2.18.).



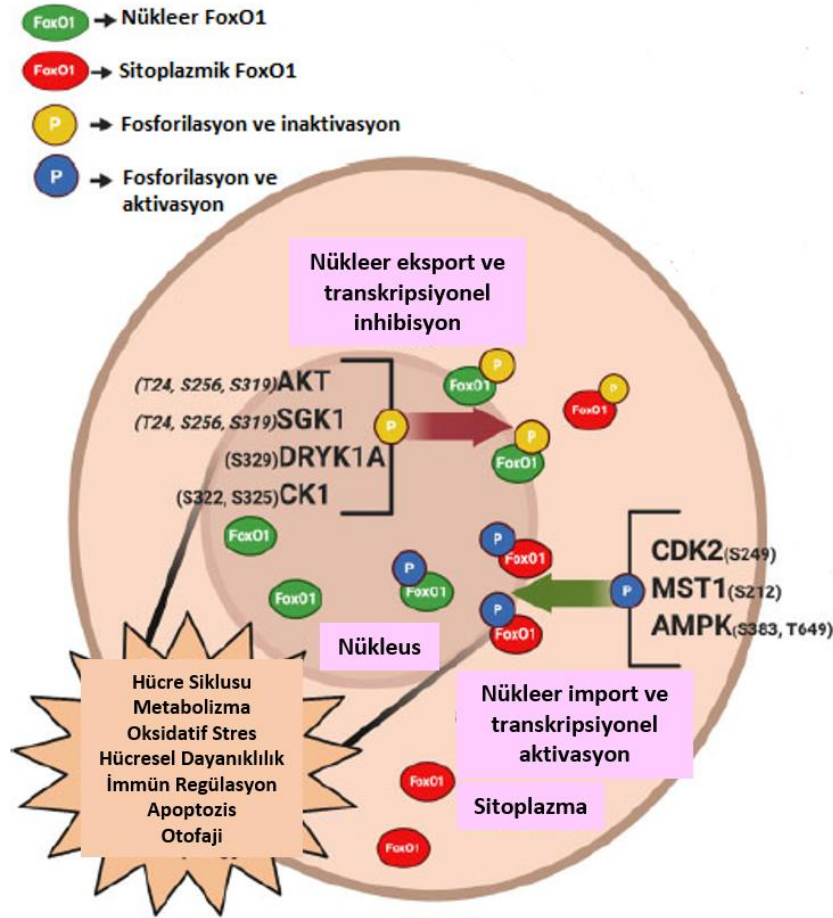
Şekil 2.18. FoxO1 domeyn yapısı gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Megan Keniry, 2014).

FoxO1'in FKH domeyni dört alfa heliks (H1, H2, H3 ve H4), üç beta zinciri (S1,S2 ve S3), iki adet 'winged loop' (W1ve W2) yapısı içerir ve H3 alfa heliksi ile direkt olarak DNA hedef sekansına bağlanabilir (Obsil ve ark., 2008) (Şekil 2.19.).



Şekil 2.19. FoxO1 FKH domeyn yapısının üç boyutlu görüntüsü ve DNA'ya H3 ile bağlanmasını gösteren çizim (Obsil ve ark., 2011)

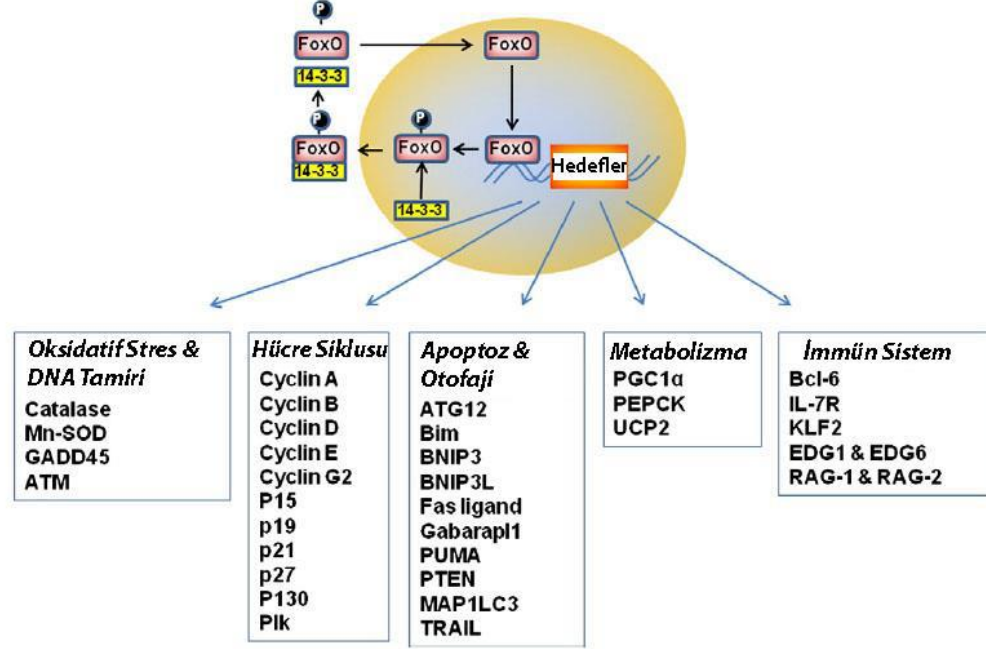
FoxO1 iki farklı DNA sekansına bağlanır. Bunlardan biri Daf-16 bağlanma elementi olan 5'-GTAAA (T/C) AA-3' sekansı ve insülin duyarlı element olan 5'- (C/A) (A/C) AAA(C/T) AA-3' sekanslarıdır (Obsil ve ark., 2008, 2011). FoxO1 proteininin transkripsiyonel olarak aktivasyonu fosforilasyon, übikütilasyon, asetilasyon, deasetilasyon, arjinin metilasyon ve O-GlcN asetilasyon gibi post-transkripsiyonel modifikasyonlarla düzenlenir (Wang Z. ve ark., 2016). Bu transkripsiyonel modifikasyonların çoğu FoxO1'in hücre içinde nükleus/sitoplazmik geçişini sağlayarak inhibisyonunu ya da aktivasyonunu sağlar (Link, 2019). İnsülin ya da büyüme faktörleri varlığında FoxO1 birçok kinazlar tarafından fosforile edilir ve kendisini hücre nükleusundan hücre sitoplazmasına taşımasına sebep olan trans aktivasyonları engellenir. Ancak FoxO1'in fosforilasyonu her zaman transkripsiyonel aktivasyonun inhibe edilmesiyle sonuçlanmaz. FoxO1'in Protein Kinaz B (PKB/AKT), Serum ve Glukokortikoid İndüklenebilir Kinaz 1 (SGK1), Kazein Kinaz 1 (CK1) ve Dual Spesifik Trozin-Fosforile edici ve Düzenleyici 1A (DYRK1A) aracılı fosforilasyonları nükleustan çıkmasına ve transkripsiyonel olarak inhibisyonuna neden olur. Diğer yandan Siklin Bağımlı Kinaz (CDK2), Memeli Steril 20 benzeri Kinaz (MST1) ve AMP aktive edilmiş Protein Kinaz (AMPK) aracılı fosforilasyonlar ise hücre içine transportu ile hedef genlerin transkripsiyonunu sağlayarak hücreyel dayanıklılık, metabolizma, hücre siklusu, immün regülasyon, otofaji, oksidatif stres yanıtı ve apoptosis gibi birçok süreçlerde görev alır (Huang H. ve ark., 2006; Huang H. ve ark., 2007; Lam ve ark., 2013; Link, 2019; Saline ve ark., 2019) (Şekil 2.20.).



Şekil 2.20. FoxO1'in kinazlar tarafından fosforillenmeleri sonucu inhibisyonu ve aktivasyonu sonucunda hücresel süreçteki rollerini gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Adiguzel ve ark., 2021).

Evrimsel olarak korunmuş olan FoxO1 transkripsiyon faktörleri birçok hedef geninin transkripsiyonunu sağlayarak önemli hücresel süreçlerde görev alır (Maiese ve ark., 2009). Memeli hücrelerinde FoxO1 transkripsiyon faktörlerinin insülin ya da büyüme faktörlerinin olması durumunda ve hücresel stres koşullarındaki aktivasyonu/inhibisyonu düzenleyen bir çok sinyalizasyon vardır (Brownawell ve ark., 2001; Brunet ve ark., 2001; Huang H. ve ark., 2006). FoxO1 oksidatif stres, DNA tamiri, immün sistem, 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 tam zıttı diğer süreçleri de gerçekleştirebilir. Bu şekilde hücrede dayanıklılık,

yaşam süresi, ölüm ve sağ kalım kararları ile hücrenin kaderini belirler (Carter ve ark., 2007; Wang Y. ve ark., 2014) (Şekil 2.21.).



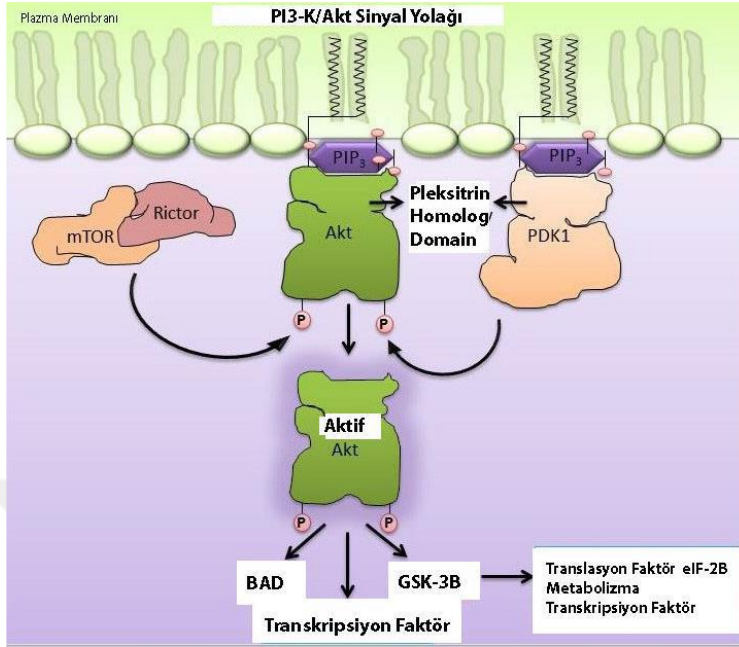
Şekil 2.21. FoxO1'in hedef gen transkripsiyonu sonucu hücresel süreçteki rollerini gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Zhang X. ve ark., 2011).

Hücrede 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 alır. Diğer yandan p21cip1 ve p27kip1 gibi genlerin transkripsiyonel düzenlemeleri ile hücre siklusunun duraklamasına neden olabilir. Bu transkripsiyonlar ile hücre siklusunda görev alan siklinlerin (siklin A, B, D, E,G2) ekspresyonlarının azalışına neden olur. Aynı şekilde hücre siklusu duraklamasında ekspresyonu artan retinoblastoma ailesi üyesi olan p130 molekülünün de transkripsiyonunu gerçekleştirerek hücrede FoxO-bağımlı G1 duraklamasına neden olur. FoxO1 pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bim'in, TRAIL

gibi ölüm sitokinlerinin ve ölüm reseptör ligandı olan FasL'nin transkripsiyonunu sağlayarak apoptozu başlatabilir (Brunet ve ark., 1999; Gilley ve ark., 2003; Zhang X. ve ark., 2011). FoxO1 birçok farklı hücre ve dokuda farklı görevler üstlenebilir. Örneğin adiposit ve miyoblastlarda aktif olan FoxO1 farklanmayı inhibe eder (Nakae ve ark., 2003).

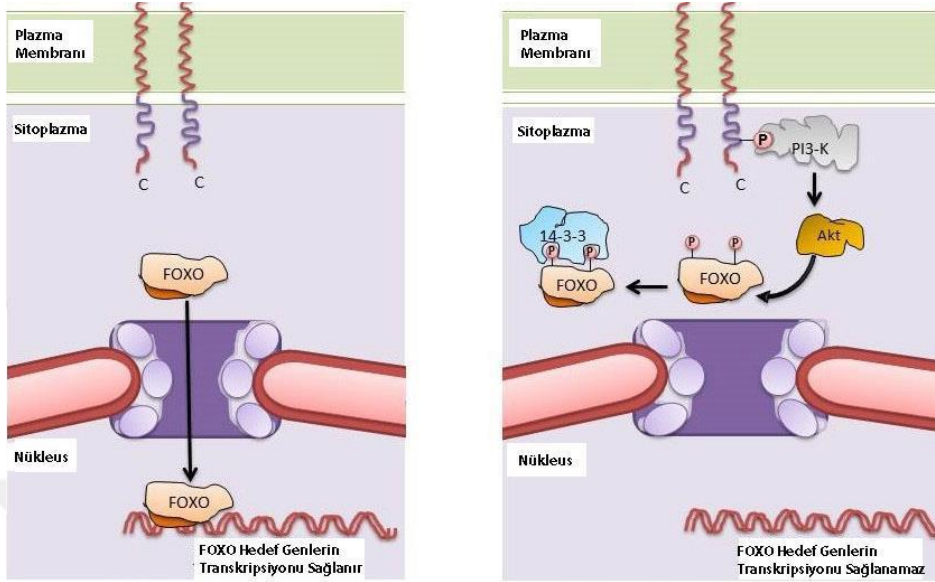
2.13. Protein Kinaz B (AKT) ve FoxO1 sinyalizasyonu

AKT olarak da bilinen Protein Kinaz B (PKB) glukoz metabolizması, apoptoz, hücre proliferasyonu, transkripsiyon ve hücre göçü gibi bir çok hücresel süreçte anahtar rol oynayan serin/treonin spesifik protein kinazdır. PI3K (Fosfatidilinositol 3-Kinaz)/Akt sinyal yolağı FoxO proteinlerini düzenlemeleriyle de birçok önemli hücresel sürece katılırlar. Hatta FoxO transkripsiyon faktörleri, PI3K /Akt sinyal yolağı tarafından düzenlenmeleri ile karakterizelerdir ve bu nedenle 'other' diğer anlamına gelen 'O' sınıflamasına girerler (Tzivion ve ark., 2011). Büyümeyi ve gelişmeyi destekleyen pek çok sinyal yolağından biri olan PI3K/Akt sinyal yolağı insülin ya da diğer büyüme faktörleri tarafından aktive edilmektedir. Sinyalizasyonu başlatan bu büyüme faktörleri hücre membranındaki yüzeyel reseptör tirozin kinazlara (RTKs) bağlanarak alt adaptörleri uyarırlar. Böylece insülin reseptör substrat protein (IRS) gibi bu alt adaptörler PI3K'ı aktive ederek hücredeki kaskadı başlatmış olurlar (Alessi ve ark., 1997; Hemmings ve ark., 2012) Sonrasında 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)'e dönüştürmüş olur. Ardından AKT ve PDK1, PIP3 tarafından plazma membranına bağlanır. AKT, PDK1 tarafından fosforillenmesi sonucunda aktif formuna geçmiş olur (Alessi ve ark., 1997; Brunet ve ark., 1999; Hemmings ve ark., 2012) (Şekil 2.22.)



Şekil 2.22. AKT sinyalizasyonunun başlamasını anlatan çizim referanstan düzenlenmiştir (Alessi ve ark., 1997).

Aktive olan Akt, FoxO1'i doğrudan 3 farklı serin/treonin bölgesinden fosforile eder (Thr 24, Ser 256 ve Ser 319). AKT tarafından fosforillenen FoxO1 proteinlerine 14-3-3 şaperon proteinleri bağlanarak sitoplazmada tutulurlar. 14-3-3 şaperon proteinleri FoxO1'in nükleer lokalizasyon sinyal domeynini (NLS) maskeleyerek ve Akt tarafından fosforillenmesi nedeniyle FoxO1 proteini nükleusa transportunu sağlayamaz ve hedefindeki genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirilemez. PI3K/Akt yolu çalışmadığında ise FoxO1 nükleusta lokalize olur ve transkripsiyonel aktivasyonunu gerçekleştirebilir (Carter ve ark., 2007; Hemmings ve ark., 2012) (Şekil 2.23.).

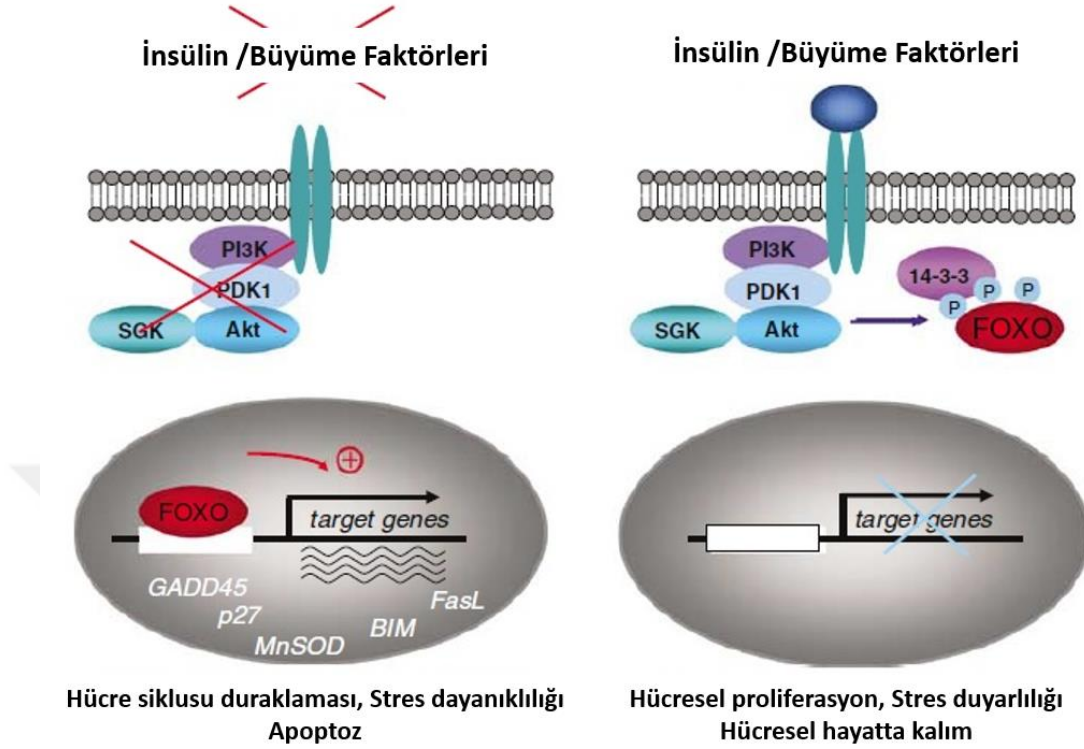


Şekil 2. 23. AKT tarafından FoxO1 inhibisyonunu anlatan çizim referanstan düzenlenmiştir (Alessi ve ark., 1997).

2.14. FoxO1'in Büyüme Faktörleriyle Olan İlişkisi

Büyüme faktörleri, hücresel gelişimi, hücre proliferasyonunu, yara iyileşmesini ve bazen de hücresel farklılaşmayı uyarabilen, doğal olarak salgılanan bir moleküllerdir. Bu tanım artık günümüzde yapılan çalışmalar ile birlikte, mitozu teşvikde edebilir inhibe de edebilir şekilde genişletilmiştir (Stone ve ark., 2022). Büyüme faktörleri genellikle salgılanan bir protein ve ya bir steroid hormon olabilir. Bu faktörler çeşitli hücresel süreçleri düzenlemek için önemlidir. Tipik olarak hücreler arasında sinyal molekülleri olarak işlev görürler ve hedef hücrenin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak fonksiyon gösterirler. Büyüme faktörleri genel olarak hücrede farklılaşma ve olgunlaşmayı desteklemek üzere görev alırlar (Herschman ve ark., 1980). Örneğin, epidermal büyüme faktörü (EGF) osteojenik farklılaşmayı artırır (Del Angel-Mosqueda ve ark., 2015), Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) deri iyileşmesini sağlar, fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF) ise kan damarı farklılaşmasını (anjyogenez) uyarır (Herschman ve ark., 1980; Stone ve ark., 2022). FoxO transkripsiyon faktörlerinin büyüme faktörleri varlığında ve yokluğunda

hücresel süreçlerde bir çok farklı görevler aldığı bilinmektedir. Hücre nükleusunda transkripsiyonel olarak FoxO proteinleri gelen büyüme faktörü sinyalini farklı hücresel aracı moleküllerle alarak nükleus/sitoplazma gitgelleri yapmaktadır (Gan ve ark., 2005; Moll ve ark., 2012; Farhan ve ark., 2017; Brown ve ark., 2018). FoxO proteinleri farklı büyüme faktörleri için farklı düzenleyici bölgelerinde fosforillenerek sitoplazma tutulabilir. Bunlar insulin, interlekin 3, Sinirsel Büyüme Faktörü (NGF), IGF, eritropoietin ve EGF gibi büyüme faktörleri olabilir (Brown ve ark., 2018). FoxO transkripsiyon faktörlerinin en çok ilişkide olduğu büyüme faktörleri insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1)'tir (Moll ve ark., 2012; Mirdamadi ve ark., 2015; Skarra ve ark., 2015; O'Neill ve ark., 2016). İnsülin ve IGF-1, tirozin kinaz reseptörüne bağlanarak etki eder ve fosfoinositid 3 kinazın (PI3K) aktivasyonunu sağlar. PI3K, sırayla, protein kinazları Akt ve SGK'nın (serum glukokortikoid ile indüklenebilir kinaz) aktivasyonunu tetikleyen plazma zarındaki fosfolipitleri fosforile eder sonuç olarak FoxO proteinleri de AKT tarafından fosforile edilip sitoplazmada tutulur ve transkripsiyonel inaktivasyonu sağlanarak hücresel proliferasyon, stres dayanıklılığı, hücresel sağ kalım sağlanırken büyüme faktörleri olmadığında ise FoxO1 proteini nükleusa geçer ve hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar bu sayede hücre siklusunu duraklatabilir hatta apoptoza neden olabilir (Greer ve ark., 2005) (Şekil 2.24.).

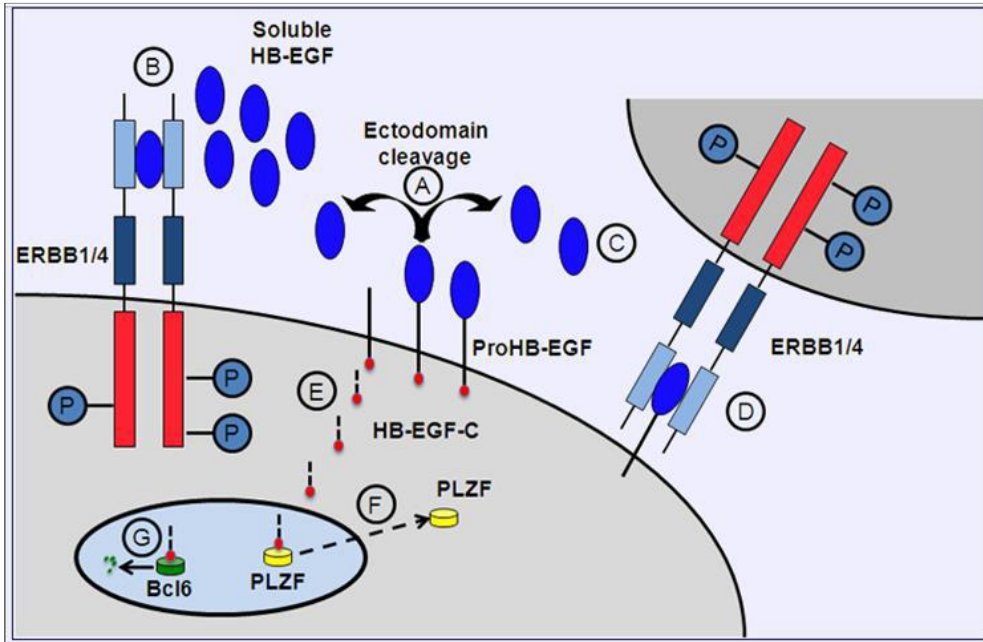


Şekil 2. 24. Büyüme faktörleri varlığında ve yokluğunda FoxO proteinlerinin hücredeki fonksiyonlarını gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Greer ve ark., 2005).

İnsülin ve büyüme faktörleri varlığında ve yokluğunda FoxO proteinleri açısından (FoxO1, FoxO3 ve FoxO4) transkripsiyonel aktivasyon ve inhibisyon yanıtı ortaktır. Diğer yandan FoxO1 insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 1 (IGFBP1)'in transkripsiyonunu düzenler (Kim ve ark., 2004; Kim ve ark., 2005). Ortamda insülin ya da büyüme faktörleri olduğu zaman ise FoxO1 yine IGFBP1'transkriptte edemez ve sitoplazmaya göç eder, IGFBP1 ise inhibe olmuş olur. IGFBP1, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP) ailesinin bir üyesidir ve bir IGFBP N-terminal alanı ve bir tiroglobulin tip-I alanı olan bir proteindir. Esas olarak karaciğerde eksprese edilen bu protein, plazmada dolaşır ve hem IGF1'i hem de IGF2'yi bağlayarak yarı ömürlerini uzatır ve hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşimlerini değiştirir. IGFBP1 proteini hücre göçü ve metabolizmasında önemlidir. Bu proteinin insanda düşük seviyeleri bozulmuş glukoz toleransı, vasküler hastalık ve hipertansiyona neden olur.

2.15. Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF)

Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinin bir üyesidir. HBEGF insanda HBEGF geni tarafından kodlanır. İlk olarak insan makrofaj benzeri hücrelerin koşullu medyumunda keşfedilmiştir. Genelde epidermal büyüme faktörleri, monosit ve makrofajlar tarafından sentezlendiği gibi epitel hücresi gibi başka hücreler tarafından da sentezlenebilir ve heparine olan affinitelerinden dolayı bu formu HBEGF olarak isimlendirilir. Yara iyileşmesinde, kardiyak hipertrofide, kalp gelişiminde ve fonksiyonunda rol alan HBEGF hücre membranına bağlı olarak mitojenik ve kemotaktik bir glikoprotein olarak sentezlenir (Jin ve ark., 2002; Nanba ve ark., 2004). Hücre membranına bağlı olarak üretilen HBEGF'nin bağlı şeklindeki ilk üretildiği formuna pro-HBEGF denir. Pro-HBEGF uygun koşul ve sinyaller altında ekto domeynlerinin dökülmesi sonucunda çözünür olgun form HBEGF oluşur. HBEGF'nin bu ektodomeynleri bölünmeler geçirerek sayısını artırır, sayıca artan çözülebilir formdaki HBEGF jukstakrin, otokrin ve parakrin yollar ile hedef hücreyi etkiler (Şekil 2.25.).



Şekil 2. 25. Hücrede HBEGF oluşumu ve HBEGF'nin diğer hücreleri etkileme yollarını gösteren çizim referanstan düzenlenmiştir (Nanba ve ark., 2004).

ERBB1/4 reseptörlerine bağlanma özelliği göstererek bu reseptörün fosforillenmesini sağlayarak hücreleri uyaran olgun çözünmüş HBEGF, aynı zamanda pro-HBEGF olarak doğrudan hücre-hücre bağlantılı halde ERBB1/4 reseptörlerine bağlanma özelliği gösterebilmektedir. Ayrıca HBEGF'nin ektodomeynlerinin çözülmesi sonucunda membranda kalan sitozolik C terminali yine reseptör görevi görebilir. Diğer yandan HBEGF kendisinin transkripsiyonel olarak baskılanmasını da gerçekleştirebilir. HBEGF'nin sitozolik C terminali nükleusa geçerek Bcl6 tarafından degradasyonunu indükleyebilir ya da kendi transkripsiyonunu da sağlayan PLZF'yi nükleustan çıkararak kendisinin üretimini baskılayabilir (Jin ve ark., 2002; Nanba ve ark., 2004; Nanba ve ark., 2008) (Şekil 2.25.).

2.16. FoxO1, AKT Sinyalizasyonu ve HBEGF'nin Embriyo İmplantasyon Süreci ile olan İlişkisi

FoxO1 transkripsiyon faktörlerinin endometriyum ve embriyo implantasyonu ile ilişkili olası rolleri hakkında sınırlı sayıda literatür bilgisi bulunmaktadır. Bunlardan 2013 yılında yapılan bir çalışmada FoxO'ların desidual sürecin kritik düzenleyicileri olduğu bildirilmiştir (Kajihara ve ark., 2013). Diğer çalışmalarda da FoxO1'in insan endometriyum farklılaşmasının progesteron bağımlı majör bir düzenleyicisi olduğu in vitro koşullarda ortaya konmuştur (Gellersen ve ark., 2003; Kajihara ve ark., 2013). Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise FoxO1'in ve implantasyondaki epitelyal polarite ilişkisi ortaya konmuştur (Vasquez ve ark., 2018). İmplantasyon sürecinde embriyonun temasta olduğu kript epiteline hücre polaritesi değişiklik göstererek epitelyal disintegrasyona sebep olur ve bu sayede trofoblastın lümen epiteline tutunmasına ve invazyonu olanak sağlanmış olur. Bu çalışma FoxO1'in reseptif fazda endometriyumda özellikle lümen epiteli ve bezlerde upregüle olduğu, FoxO1'in endometrial epitelde koşullu delesyonunun infertilite ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada; FoxO1 delesyonlu dişi farelerde E-cadherin (CDH1), konneksin 26 (GJB2) ve ZO-1 (TJP1) gibi epitelyal polarite ile ilişkili moleküllerin ekspresyonu incelendiğinde bu moleküllerin ekspresyon

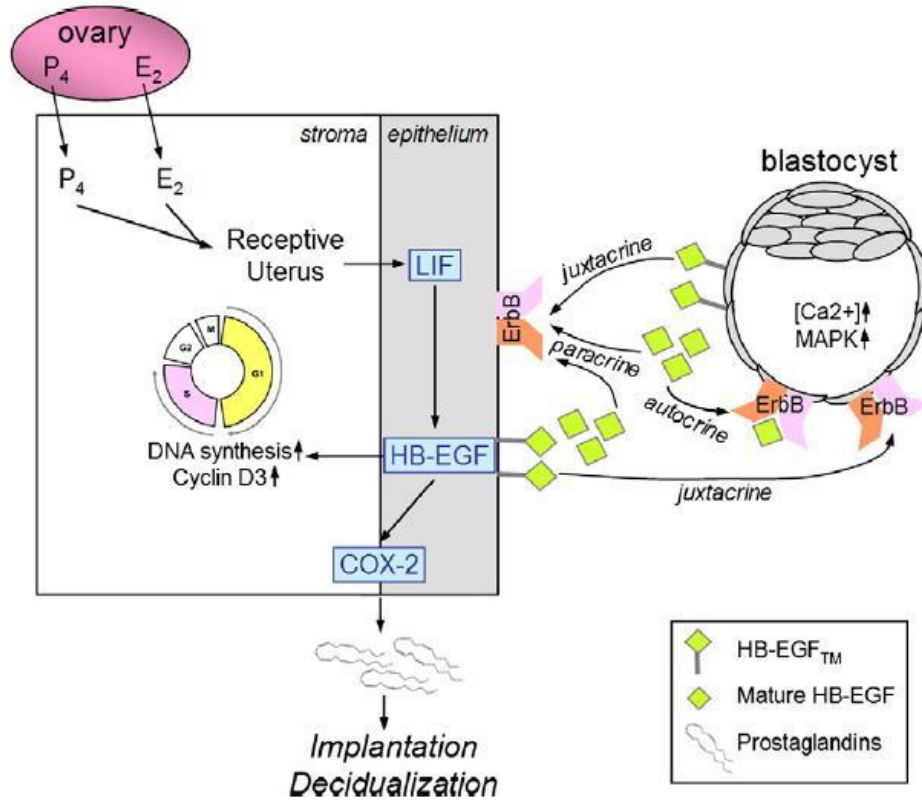
paterni değiştirerek lümen epiteli polarizasyonu defektine sebep olduğu ortaya konmuştur. Özellikle implantasyon zamanında normalde E-cadherin ekspresyonunun yok olması gerekirken FoxO1 delesyon durumunda varlığını sürdürmüştür. Sonuç olarak, epitelyal bariyerin trofoblast invazyonu tarafından kaldırılamaması nedeniyle gebeliğin devam edemediği bilgisine ulaşılmıştır. Böylece FoxO1'in hücre invazyonu, moleküler transport, apoptoz ve beta-katenin sinyal yolağını aktive ederek reseptif fazın kurulmasını sağladığını ve implantasyonu düzenlediğini ortaya konulmuştur. Aynı zamanda, insan endometriyum epitelinde FoxO1'in ekspresyonunun erken sekretuar evrede sitoplazmik ve orta sekretuar evreye geçişle nükleer upregulasyonunun varlığı da gösterilmiştir (Vasquez ve ark., 2018)

Literatürde AKT sinyalizasyonunun peri-implantasyon sürecinde varlığını değerlendiren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, AKT ekspresyonunun fare gebeliğinde 5. gün implantif ve inter implantif alanlarda farklılık göstermezken aktif formu olan p-AKT'nin implantif alanda inter implantif alana göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (Liu L. ve ark., 2014). Ayrıca gebeliğin 4. günü AKT inhibitörünün (LY294002) intra-uterin enjeksiyonu sonrasında 5. gün implantasyon alanları değerlendirilmiş ve AKT'nin inhibe edildiği uterus boynuzlarında implantasyon sayısı anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Liu, Wang et al. 2014). Pre-implantif dönemde, AKT ve p-AKT ekspresyonunu embriyolarda değerlendiren başka bir çalışmada, blastosistte de AKT ve p-AKT ekspresyonlarının varlığı ve PI3K/Akt sinyal yolağının fonksiyonu ortaya konmuştur (Riley ve ark., 2005).

Büyüme faktörlerinin embriyo implantasyonunda birçok aşamada görev aldığı bilinmektedir (Guzeloglu-Kayisli ve ark., 2009). Bunlardan biri olan ve bu süreçte önemli bir molekül olan HBEGF ekspresyonu bir implantasyon belirtcidir ve embriyo-maternal endometriyumun karşılıklı iletişiminde önemli bir aracı moleküldür (Wang X. ve ark., 2002; Lim H. J. ve ark., 2009). HBEGF ilk olarak gebeliğin 4. günü akşamında (16:00) endometriyum lümen epitelinde ekspre edilmeye başlar ve bu sırada embriyo ve epitel karşı karşıyadır ancak herhangi bir tutunma henüz gerçekleşmemiştir. Gebeliğin 4. günü gece (22:00-23:00) saatleri tutunma reaksiyonuna eş zamanlı olarak blastosist

çevresindeki lümen epiteli (kript epiteli) ve implantasyona yetkin hale gelmiş olan aktif blastosist tarafından HBEGF ekspresyonu karşılıklı şekilde devam eder ve bu ekspresyon 5. gün sabah en yüksek seviyeye ulaşır (Wang X. ve ark., 2002). HBEGF'in peri-implantasyon sürecinde bu özgün ekspresyonuna dayanarak olası rollerini araştıran çalışmalar yapılmıştır (Paria ve ark., 2001; Chobotova ve ark., 2002; Jin ve ark., 2002; Hamatani ve ark., 2004; Tan ve ark., 2004; Lim H. J. ve ark., 2009; Prince ve ark., 2010; Liu J. ve ark., 2017; Cao ve ark., 2020). Genetik çalışmalar, HBEGF geni silinen dişi farelerin doğum başına düşük yavru sayısı sebebiyle subfertil olduğunu göstermiştir (Xie ve ark., 2007). Diğer yandan elde edilen HBEGF geni silinen blastosistler normal dişi annelere transfer edildiğinde ise fertilite korunmuştur (Xie ve ark., 2007). Çözünebilir HBEGF (HBEGF'nin soluble formunu) kaplanmış ve kontrol olarak ise BSA kaplanmış blastosist boyutundaki boncuklar yalancı gebe farelere 4. günde transfer edildiğinde 5. günde implantasyon reaksiyonu olup olmadığını göstermek amacıyla mavi boya enjeksiyonu yapılmış ve bunun sonucunda sadece HBEGF kaplı boncukların gönderildiği uteruslarda implantasyon alanları benzeri mavi bantlar (vasküler geçirgenlik artışı) gözlenmiştir. Ayrıca HBEGF'nin uterus lümen epitelindeki varlığının kendi gen ekspresyonunu da uyarmasına neden olduğu ortaya konmuştur (Paria ve ark., 2001). HBEGF'nin bu özgün ekspresyonu yalancı gebelikte ve gecikmiş implantasyon modeli oluşturulan uterusda gözlenmezken, gecikmiş implantasyonun östrojen enjeksiyonu ile blastosist aktivasyonunu sağlamasıyla implantasyonun gerçekleşmesiyle benzer şekildeki HBEGF ekspresyonu ortaya çıkmıştır (Lim H. J. ve ark., 2009). Dormant haldeki blastosist (implantasyona hazır olmayan ve maternal östrojen enjeksiyonu sonrası aktif hale gelebilen embriyo) ve aktif haldeki blastosistlerin HBEGF ekspre edip etmediği incelenildiğinde; dormant blastosistlerin HBEGF ekspre etmediği, aktif blastosistlerin ise yoğun HBEGF ekspre ettiği gösterilmiştir (Hamatani ve ark., 2004). Yapılan başka bir çalışmada HBEGF ile kültüre edilen 8 hücreli embriyoların erken 'hatching' olduğu ortaya konmuştur (Das ve ark., 1994). Özetle, aktif blastosist HBEGF aracılığı ile kript epiteli ile jukstakrin, otokrin ve parakrin yollarla iletişime geçer ve endometriyum kript epitelinde HBEGF ekspresyonunun artmasına neden olur. HBEGF blastosist için implantasyona yetkin hale gelmeyi sağlarken endometriyum epiteli açısından blastosistin tutunması için gerekli ortamın sağlanmasına neden olur ve bu nedenlerle HBEGF'nin

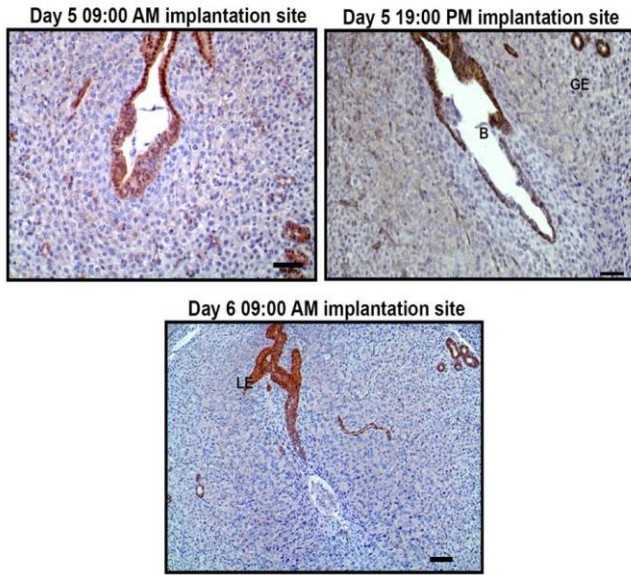
implantasyon sürecinde embriyo ve uterus iletişiminin özgün aracıları olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.26.) (Raab ve ark., 1996; Lim H. J. ve ark., 2009). HBEGF ile ilgili insan endometriyum epitelindeki ekspresyonuna ilişkin bulgular ise erken sekretuar fazda ekspresyonunun başladığını ve reseptif insan endometriyumunda lümen epitelinde apikal yüzeyde upregüle olduğu şeklindedir (Chobotova ve ark., 2002). Ayrıca HBEGF'nin reseptörü olan ErbB4'ün insan embriyo trofektoderm yüzeyinde bölgesel olarak ekspresyonunun arttığı gösterilmiş ve sonuç olarak insanda da HBEGF ve reseptörleri aracılığı ile endometriyal epitele tutunma gerçekleştirdiği ortaya konmuştur (Chobotova ve ark., 2002).



Şekil 2.26. HBEGF ve implantasyon süreci ilişkisini özetleyen çizim referanstan düzenlenilmiştir (Lim and Dey 2009).

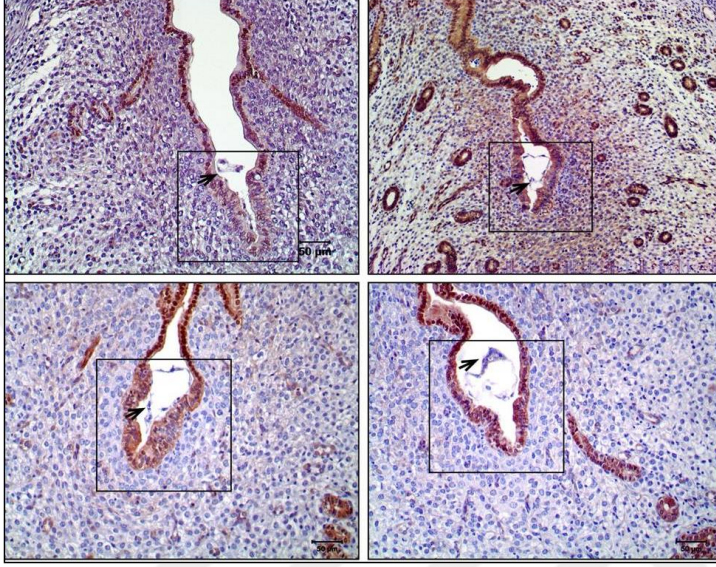
2.17. FoxO1'in İmplantasyondaki Rollerini Üzerine Önceki Çalışmalarımız ve Doktora Tez Çalışmasının Çıkış Noktası

Plos One dergisinde 2019 yılında yayınlanan makalemize ait bulgulara göre fare gebeliğinin 5.gününde endometriyum lümen epiteli ve bezlerde yoğun nükleer FoxO1 ekspresyonu gözlenmiştir (Adiguzel ve ark., 2019). Embriyo implantasyonunun başladığı gebeliğin 5. günündeki FoxO1'in endometriyum lümen epitelindeki özgün ekspresyonunu yakından incelediğimizde ilginç olarak blastosistin implantasyon için birebir ilişki içinde olduğu kript epitelinde FoxO1 sitoplazmik ekspresyon gösterirken, mezometriyal taraftaki kapanmış olan lümen epitelinde FoxO1 nükleer ekspresyon göstermekteydi. Beşinci gün akşam ise endometriyal epitelyal bariyer kalktıktan sonra kript epitelinde nükleer FoxO1 ekspresyonu görülmüştür. Gebeliğin 6. gün sabahında ise kript epiteli bariyeri embriyo tarafından aşıldığında, mezometriyal taraftaki daha önceden kapanmış olan lümen epitelinde yoğun nükleer FoxO1 ekspresyonu gözlemlenmiştir (Adiguzel ve ark., 2019) (Şekil 2.27.).



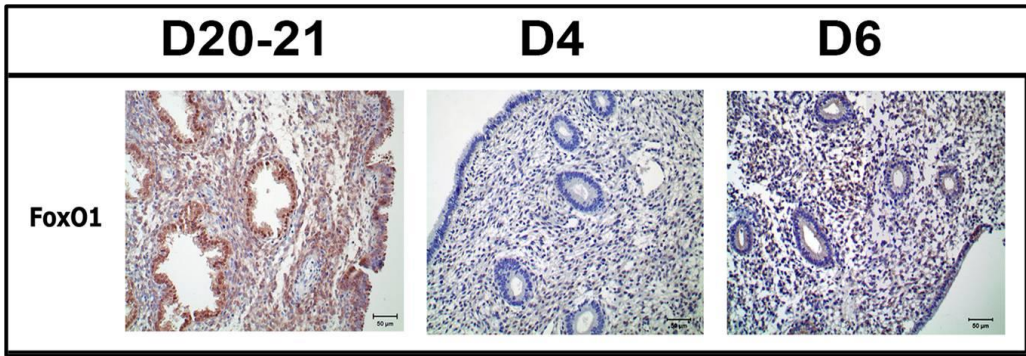
Şekil 2.27. Fare gebeliğinin 5 gün sabah, 5. gün akşam ve 6. günlerinde endometriyumda FoxO1 protein ekspresyonu (Adiguzel ve ark., 2019)

Bu ekspresyon paternini 4 farklı anneye ait olan implantasyon alanlarında incelediğimizde aynı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 2.27.) (Adiguzel, Sahin et al. 2019).



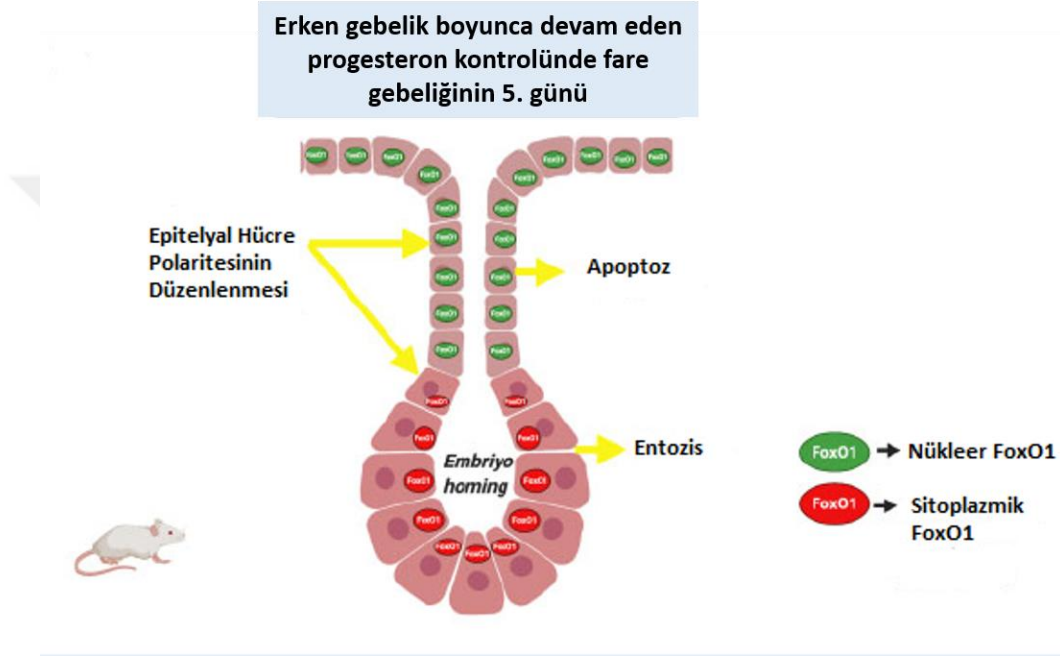
Şekil 2.28. Farede gebeliğin 5. günü sabah endometriyumunda 4 farklı anneye ait implantasyon alanlarında FoxO1 protein ekspresyonu (Adiguzel ve ark., 2019).

Diğer yandan insan endometriyumunda yapmış olduğumuz çalışma sonucunda FoxO1'in implantasyon penceresine (20-23. günler) karşılık gelen 21. günde epitelde nükleer ekspresyonu olduğunu ve proliferatif faza ait daha erken siklus günlerinde (4. gün ve 6. günlerde) ise lümen epitelinde belirgin bir FoxO1 ekspresyonu olmadığını gösterdik (Şekil 2.29.).



Şekil 2.29. Genital siklusun 21. gün, 4. gün ve 6. güne ait insan endometriyumunda FoxO1 protein ekspresyonu

Çalışmamızın sonuçlarını ve mevcut literatür bilgisini derlediğimiz Human Reproduction Update dergisinde yayınlanan makalemizde FoxO1'in kript epitelinde entozisi yönettiğini, embriyonun temas etmediği geriye kalan lümen epitelinde ise apoptozu sağladığını tartıştık (Adiguzel ve ark., 2021) (Şekil 2.30).



Şekil 2.30. Peri implantasyon süreci sırasında nükleer FoxO1 ekspresyonu gerileyen lümen epitelinde apoptozda role sahiptir ve sitoplazmik FoxO1 ekspresyonu ise embriyonun yuvalandığı kript epitelinde entozis sürecinde rol almaktadır (Adiguzel ve ark., 2021).

Embriyonun temasta bulunduğu endometriyum kript epitelinde sitoplazmik ve embriyonun temas etmediği kapanmış olan lümen epitelindeki nükleer FoxO1 ekspresyon paterni, HBEGF'nin kript epitelinde artan ekspresyon paterni ile aynı zaman diliminde gerçekleşmektedir. HBEGF gebeliğin 5. gününde endometriyum kript epitelinde upregüle olmaktadır. FoxO1 ekspresyonu kript epitelinde sitoplazmik ekspre olmaktadır ve dolayısıyla FoxO1 bir transkripsiyon faktörü olarak downregüledir. Hücrede FoxO1'in downregülasyonunu sağlayan kinazlardan biri AKT'dir ve literatürde pek çok farklı dokuda FoxO1'in AKT sinyalizasyonu ile düzenlediği bilinmektedir (Brunet ve ark., 1999; Brownawell ve ark., 2001). Ancak fare peri-implantif dönemde epiteldeki

ekspresyonunun AKT tarafından düzenlendiğine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. HBEGF'nin FoxO1 ile fare peri-implantif dönemde zamansal ve mekansal olarak özgün ekspresyon paterni göstermesi, daha önceki farklı doku ve sistemlerde bu sinyalin birlikte çalıştığının gösterilmesi embriyo reseptivitesi sürecinde de HBEGF, AKT ve FoxO1 ilişkisi olabileceğini düşündürmüştür. Literatürde HBEGF, AKT ve FoxO1 ilişkisini gösteren bir çalışmada; egzersizin, iskelet kasında HBEGF'yi upregüle ederek AKT'nin kinaz aktivasyonu sağlayarak FoxO1'in inhibisyonuna neden olduğu (sitoplazmaya taşıyarak) ve böylece lipid metabolitlerinin zararlı etkisini ve iskelet kasında fazla miktarda biriken glikozun atılmasını sağladığı ortaya konmuştur (Fukatsu ve ark., 2009).

Mevcut literatür bilgisi ve önceki çalışmalarımıza göre; FoxO1 ekspresyonu farede reseptif endometriyumda lümen epiteli ve bez epitelinde nükleer olarak upregüle olurken, farede embriyonun yuvalandığı kript epitelinde sitoplazmik olarak downregüledir. Bu nedenle embriyonun ve yuvalandığı lümen epitelinin (kriptin) yoğun HBEGF ekspresyonun, AKT'nin kinaz aktivasyonunu sağlayarak FoxO1'i kript epitelinde downregüle ettiğini ve böylece embriyo implantasyonun HBEGF-AKT-FoxO1 sinyalizasyonu ile düzenleyebileceğini hipotez etmemizi sağlamıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 05.07.2019 tarihli 919 başvuru numaralı ve 2019.06.15 protokol 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 anesteziye alındıktan sonra cerrahi işlemler gerçekleştirilmiştir. Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuştur;

1. Normal Gebelik Grubu:

- a) Normal Gebelik G4 gece (23:00) (n=6)
- b) Normal Gebelik G5 sabah (09:00) (n=6)
- c) Normal Gebelik G5 gece (23:00) (n=6)
- d) Normal Gebelik G6 sabah (09:00) (n=6)

2. Boncuk (Bead) Transfer Grubu:

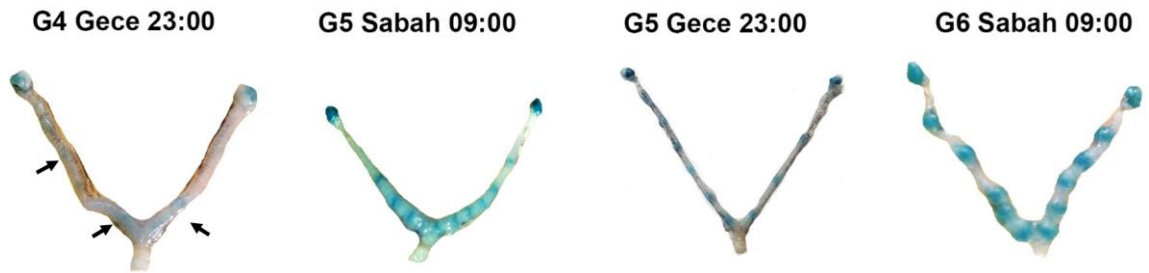
- a) **BSA Bead-PBS (n=6):** BSA ile inkübe edilmiş boncukların PBS çözgeni içerisinde transfer edildiği grup.
- b) **BSA Bead- Wortmannin (n=6):** BSA ile inkübe edilmiş boncukların 40 µM PI3K inhibitörü (Wortmannin) içeren solüsyon ile transfer edildiği grup.
- c) **HBEGF Bead-PBS (n=6):** HBEGF ile inkübe edilmiş boncukların PBS çözgeni içerisinde transfer edildiği grup.

d) HBEGF Bead- Wortmannin (n=6): HBEGF ile inkübe edilmiş boncukların 40 µM PI3K inhibitörü (Wortmannin) içeren solüsyon ile transfer edildiği grup.

3.1. Grupların Oluşturulması

3.1.1. Normal Gebelik Gruplarının Oluşturulması

Dişi ve erkek fareler gece siklusu boyunca çiftleşirmeye bırakıldıktan sonra ertesi sabah dişi farede vajinal plak tespiti yapıp, vajinal plak görüldüğü gün gebeliğin 1. günü olarak kabul edilmiştir. Gebeliğin 4. günü gece başlayan embriyonun endometriyuma tutunma sürecinde 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 tayini için G4 gece(23:00), G5 sabah (09:00), G5 gece (23:00), G6 sabah (09:00) gün ve saatlerindeki uterusların çoklu implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1'lik Chicago mavisi enjeksiyonu yapılmıştır. Kuyruk veni enjeksiyonu sonrasında uterusda gözlenen mavi bantlar şeklindeki implantasyon bölgeleri alınmıştır (Şekil 3.1.). Alt gruplar aşağıdaki şekilde sıralanmıştır:



Şekil 3.1. Uterusların çoklu implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1'lik Chicago mavisi kuyruk veni enjeksiyonu sonrasında uterusda gözlenen mavi bantlar.

a) Normal Gebelik G4 gece (23:00): Fare gebeliğinin 4. günü gece 22:00-23:00 saatleri arası embriyonun maternal endometriyuma ilk temasının başladığı zaman dilimidir.

Blastosistin olduğu bölgede stromal vasküler geçirgenlik bölgesel olarak artış gösterir ancak bu saatlerde tutunma henüz yeni başladığı için 0,1 ml %1'lik Chicago mavisinin (Sigma, C8679) kuyruk veni enjeksiyonu sonrasında uterusda gözlenen mavi bantlar daha zayıf bantlar şeklinde gözlemlenir. Uterustan elde edilen implantasyon bölgeleri olan zayıf bantlar alınmıştır.

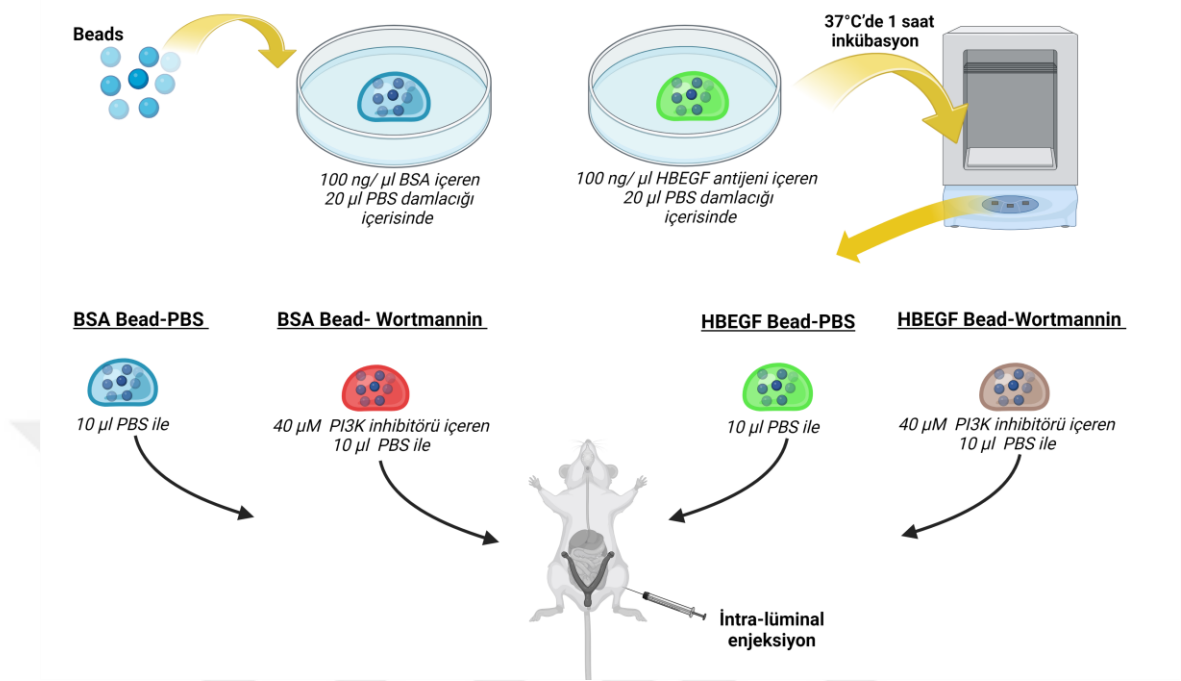
b) Normal Gebelik G5 sabah (09:00): Fare gebeliğın 5. günde embriyonun endometriyuma tutunması sonucunda blastosistin olduğu bölgede stromal vasküler geçirgenlik bölgesel olarak artış gösterir. Bu grupta gebeliğın tespiti için 5. gün sabah 09:00 saatlerinde uterusların çoklu implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1'lik Chicago mavisini intravenöz enjeksiyonu yapılarak 3-4 dakika sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Uterusta gözlemlenen mavi bantlar şeklindeki implantasyon bölgeleri alınmıştır.

c) Normal Gebelik G5 gece (23:00): Fare gebeliğın 5. günü gece 23:00 saatlerinde embriyo maternal epitelyal bariyeri aşmak üzeredir. Yine bu grupta da blastosistin olduğu bölgede stromal vasküler geçirgenlik bölgesel olarak artış gösterir. Uterusların çoklu implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1'lik Chicago mavisini intravenöz enjeksiyonu yapılarak 3-4 dakika sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Uterusta gözlemlenen mavi bantlar şeklindeki implantasyon bölgeleri alınmıştır.

d) Normal Gebelik G6 sabah (09:00): Fare gebeliğın 6. günü sabah 09:00 saatlerinde embriyo subepitelyal stromaya gömülmüş durumdadır ve mavi bantlar daha belirgin bir şekildedir. Uterusların çoklu implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1'lik Chicago mavisini intravenöz enjeksiyonu sonrasında uterusda gözlemlenen mavi bantlar şeklindeki implantasyon bölgeleri elde edilmiştir.

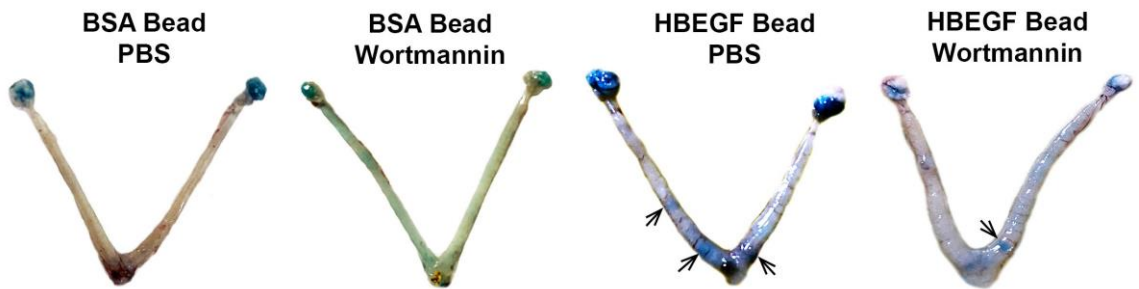
3.1.2. Boncuk (Bead) Transfer Gruplarının Oluşturulması

Bu modeli oluşturmak için önce vazektomize edilmiş erkek modeli oluşturulmuştur. Vazektomize işlemi için 8-10 haftalık erişkin erkek farelere cerrahi işlem uygulanarak üreme kanalı duktus deferensin kısa bir bölümünün çıkarılması gerçekleştirilmiştir. Cerrahi girişim ile testiste üretilen spermleri diğeri üreme kanallarına bağlayan duktus deferensin iki ayrı noktası sutur ile bağlanıldıktan sonra, ortadaki küçük parçanın çıkarılmasıyla seminal sıvıya spermlerin geçişi engellenmiştir (Liu N. ve ark., 2013; Bermejo-Alvarez ve ark., 2014) . Erkek fareler hem iyileşme süreçleri için hem de üreme sistemi kanallarında bulunabilecek spermlerin atılması için 2-3 hafta beklenilmiştir. Daha sonra dişi fareler ve oluşturulmuş olan vazektomize erkek fareler gece siklusu boyunca iftleştirmeye bırakıldıktan sonra ertesı sabah dişi farede erkek üreme sistemi bezlerinin salgıları ile oluşan ve sperm içermeyen vajinal plak tespiti yapılıp, vajinal plak görüldüğü gün yalancı gebeliğin 1. günü olarak kabul edilmiştir. Yalancı gebeliğin 4. gününde mini-laparotomi cerrahi girişimi ile uterusun her iki boynuzuna utero-tubal bölgeden 5-6 boncuk (bead) (katalog numarası:153-7302, BIO-RAD) transferi gerçekleştirilmiştir. Transfer edilecek boncuklar her grup için ayrı ayrı hazırlanmıştır (şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Transfer gruplarının oluşturulmasını anlatan çizim.

Transfer işleminin ertesi günü, 5. gün kuyruk veni enjeksiyonu sonrasında uterusu gözlenen mavi bantlar şeklindeki implantasyon bölgeleri alınmıştır (Şekil 3.3.). Bu alt grupların oluşturulması ayrıntılı şekilde aşağıdaki gibidir:



Şekil 3.3. Transfer gruplarında uterusların çoklu implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1'lik Chicago mavisi kuyruk veni enjeksiyonu sonrasında uterusu gözlenen mavi bantlar.

- a) BSA Bead-PBS: BSA ile inkübe edilmiş boncukların PBS çözgeni ile transfer edildiği grup:** Bu grup kontrol grubu olarak oluşturulmuştur. Yalancı gebe farelere gebeliğin 4. gününde her iki uterus boyunuzuna transfer edilecek olan ve her biri bir blastosist büyüklüğündeki boncuklar transfer işlemi öncesinde beş kez PBS (Phosphate Buffer Salin) ile yıkanmıştır. Sonrasında 100 ng/ μ l BSA (bovine serum albumin) konsantrasyonundaki 20 μ l PBS damlacıkları içinde 37°C’de bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra BSA kaplı olan boncuklar 10 μ l PBS içerisine aktarılmıştır (Paria ve ark., 2001). Daha sonra hazırlanan bu boncuk içeren solüsyon mikro pipet yardımıyla uterotubal bölgeden uterusu gönderilmiştir. Transferi takiben gebeliğin 5. günü sabah (09:00) implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1’lik Chicago mavisi intravenöz enjeksiyonu yapılarak 3-4 dakika sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Sonrasında uterus dokuları elde edilmiştir.
- b) BSA Bead-Wortmannin: BSA ile inkübe edilmiş boncukların 40 μ M AKT inhibitörü (Wortmannin) içeren solüsyon ile transfer edildiği grup:** Yalancı gebe farelere gebeliğin 4. gününde her iki uterus boyunuzuna transfer edilecek olan ve her biri bir blastosist büyüklüğündeki boncuklar işlem öncesinde beş kez PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında 100 ng/ μ l BSA konsantrasyonundaki 20 μ l PBS dropları içinde 37°C’de bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra BSA kaplı olan boncuklar toplamda hacmi 10 μ l ve 40 μ M konsantrasyonda PI3K inhibitörü (Wortmannin, katalog numarası: 19545-26-7, Cayman) içeren PBS içerisine aktarılmıştır. Daha sonra hazırlanan bu boncuk içeren solüsyon mikro pipet yardımıyla uterotubal bölgeden uterusu gönderilmiştir. Transferi takiben gebeliğin 5. günü sabah (09:00) implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1’lik Chicago mavisi intravenöz enjeksiyonu yapılarak 3-4 dakika sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Sonrasında uterus dokuları elde edilmiştir.
- c) HBEGF Bead-PBS: HBEGF ile inkübe edilmiş boncukların PBS çözgeni ile transfer edildiği grup:** Yalancı gebe farelere gebeliğin 4. gününde her iki uterus boyunuzuna transfer edilecek olan ve her biri bir blastosist büyüklüğündeki

boncuklar işlem öncesinde beş kez PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında 100 ng/ µl HBEGF antijeni (katalog numarası: SRP6050, mouse recombinant, Sigma) konsantrasyonundaki 20 µl PBS damlacıkları içinde 37°C’de bir saat inkübe edilmiştir (Paria ve ark., 2001). İnkübasyondan sonra HBEGF kaplı olan boncuklar 10 µl PBS içerisine aktarılmıştır. Daha sonra hazırlanan bu boncuk içeren solüsyon mikro pipet yardımıyla uterotubal bölgeden uterusu gönderilmiştir. Transferi takiben gebeliğin 5. günü sabah (09:00) implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1’lik Chicago mavisi intravenöz enjeksiyonu yapılarak 3-4 dakika sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Sonrasında uterus dokuları elde edilmiştir.

d) HBEGF Bead- Wortmannin: HBEGF ile inkübe edilmiş boncukların 40 µM PI3K inhibitörü (Wortmannin) içeren solüsyon ile transfer edildiği grup:

Yalancı gebe farelere gebeliğin 4. gününde her iki uterus boyunuzuna transfer edilecek olan ve her biri bir blastosist büyüklüğündeki boncuklar işlem öncesinde beş kez PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında 100 ng/ µl HBEGF antijeni konsantrasyonundaki 20 µl PBS damlacıkları içinde 37°C’de bir saat inkübe edilmiştir (Paria ve ark., 2001). İnkübasyondan sonra HBEGF kaplı olan boncuklar toplamda hacmi 10 µl ve 40 µM konsantrasyonda PI3K inhibitörü (Wortmannin) içeren PBS içerisine aktarılmıştır. Daha sonra hazırlanan bu boncuk içeren solüsyon mikro pipet yardımıyla uterotubal bölgeden uterusu gönderilmiştir. Transferi takiben gebeliğin 5. günü sabah (09:00) implantasyon bölgelerinin tespitinde 0,1 ml %1’lik Chicago mavisi intravenöz enjeksiyonu yapılarak 3-4 dakika sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Sonrasında uterus dokuları elde edilmiştir.

3.2. Doku Takibi ve Parafine Gömme

Tüm gruplardan elde edilen uterus dokuları parafin doku takibi yapılmak üzere %5’lik formalin çözeltisi içerisine alınmıştır. Bu çözeltide 12-24 saat bekletilerek dokunun

fiksasyon işlemi sağlanmıştır. Fiksatifin uzaklaştırılması için 4-5 saat boyunca çeşme suyu ile yıkandıktan sonra birer gün boyunca sırasıyla %70, %80, %90 alkol serilerinde bekletilmiştir. Ertesi gün son olarak 3 saat %100 lük alkolde bekletildikten sonra ksilol ile şeffaflaştırma işlemi ve sonrasında parafine gömme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3. İmmünofloresan Analizler

HBEGF, FoxO1, AKT ve p-AKT protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi için immünofloresan yöntemi uygulanmıştır. Analizde kullanılmış olan primer ve sekonder antikorlar uygulandıkları dilüsyonlar ile birlikte Tablo 3.1.'de gösterilmiştir. İmmünofloresan boyama protokolü aşağıdaki maddeler uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. İmmünofloresan 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	Alexa Flour 488 /1:000	Invitrogen A11008
HBEGF /1:100	SANTA CRUZ SC-365182	Alexa Flour 488 /1:000	Invitrogen A11017
AKT / 1:100	CELL SIGNALING 9272S	Alexa Flour 488 /1:000	Invitrogen A11008
pAKT / 1:100	CELL SIGNALING 9271S	Alexa Flour 488 /1:000	Invitrogen A11008

1. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler, süper frost lamlar üzerine alınarak bir gece 56 °C'lik etüvde bekletilmiştir.
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 bekletilmiştir.
3. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla 0.01 M sitrat tamponu çözeltisinde (pH:5.0) 750 watt'ta 5'er dakika olmak üzere art arda 3 kez kaynatılarak antijen retrieval uygulaması yapıldı ve 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır.
4. Soğuyan kesitler PBS (Phosphate Buffer Salin, pH: 7.2-7.4) solüsyonunda çalkalandıktan sonra permeabilizasyon işlemi için %0.03'lük Triton 100x (kat:X100, Sigma) solüsyonunda 1 saat bekletilmiştir.
5. Permeabilizasyon işleminden sonra kesitler PBS solüsyonunda 3 kez 5'er dakika yıkandı ve hidrofobik kalemle dokuların etrafı damlatılacak antikorların birbirine karışmaması amacıyla çizilmiştir.
6. Oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu ile 10 dakika muamele edilmiştir.
7. Serumun fazlası alınarak kesitler, primer antikorları ile +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir.
8. Ertesi gün kesitler PBS solüsyonunda 3 kez 5'er dakika yıkandı ve bu basamaktan sonraki işlemler karanlıkta yapılmıştır.

9. Her bir primer antikör için uygun seçilen sekonder antikörler kesitlere damlatılıp 1 saat boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir.
10. Sonrasında kesitler PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı ve hücre nükleus boyanmaları için Hoechst 1/2000 oranındaki (kat: 33342, Invitrogen) solüsyonu ile 5 dakika muamele edilmiştir.
11. Görüntüleme öncesinde floresan görüntüleme için kapatma medyum (gliserol, kat:G5516, SIGMA) doku üzerine damlatılarak kesitler kapatılmıştır.
12. Ortaya çıkan reaksiyon floresan mikroskobu altında (Olympus BX61 floresan mikroskobu) incelenip fotoğraflar çekilmiştir.

3.4. Uterus Lümen açıklığı ölçümü

Kontrol ve deney gruplarında boncuk transfer edilen ve 5. gün uterus dokuları alınan cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus lümen açıklığı ölçülmüştür (Hobbie ve ark., 2020). Her grubun uterus kesitlerine hematoksilin-eozin boyama işlemi gerçekleştirildikten sonra, uterusun mezometriyal- antimezometriyal kutba 90 derece açı yapacak şekilde, lümenal açıklığı her kesit için ayrı ayrı 3 farklı bölgeden ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır. Her grup için n=6 kesit kullanılmıştır.

3.5. Image-J analizi

FoxO1, AKT, p-AKT ve HBEGF floresan boyama sonrası kript epitelinde bu proteinlerin boyanma şiddetleri ImageJ programında (NIH, Bethesda, MD) ölçülerek istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analizler

Her grup için hesaplanan ImageJ verilerinin istatistiksel analizi, Varyans Analizi (ANOVA) ile yapılmıştır ve ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak hesaplanmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda gruplar arasındaki anlamlılıklar post-hoc Tukey testi kullanılarak değerlendirilmiştir. İkili karşılaştırmalarda t-testi kullanılarak gruplar arasında istatistiksel anlamlılık değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism (versiyon 6.0) programı ile gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. İmmüno Floresan Bulgular

Bu çalışmada fare gebeliğinde embriyonun epitelyal bariyeri aştığı süre içeren normal gebelik günleri (G4 gece 23:00, G5 sabah 09:00, G5 gece 23:00 ve G6 sabah 09:00) ve uterusu boncuk (bead) transfer edilen cerrahi fare modelleri (BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin grupları) oluşturulmuştur. Oluşturulan tüm gruplarda fare endometriyumlarında FoxO1, HBEGF, AKT ve pAKT protein ekspresyonları ve yerleşim yerleri immüno floresan yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve ImageJ analizleriyle değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. FoxO1, HBEGF, AKT ve pAKT'nin tüm gruplarda immüno floresan işaretlemelerinin özgünlüğünü göstermek amacıyla kullanılan izotip boyamaları sonucu negatiftir.

4.1.1. Embriyonun Epitelyal Bariyeri Aştığı Süreçte Fare Endometriyumunda FoxO1 Protein Ekspresyonları

Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. günü gece saat 23:00, 5. günü sabah saat 09:00, 5. günü gece saat 23:00 ve 6. günü sabah saat 09:00'da endometriyumda FoxO1 protein lokalizasyonları belirlendi. Gebeliğin 4. günü gece saat 23:00 ve 5. günü sabah saat 09:00'da alınmış olan uterus dokularında embriyo kript epiteline FoxO1 ekspresyon düzeyleri ImageJ analizleriyle karşılaştırıldı. İmmüno floresan bulgulara göre FoxO1'in gebeliğinin 4. gün gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda gebelik günlerine göre farklı lokalizasyon ve yoğunlukta olmakla birlikte genel olarak nükleer ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.1.).

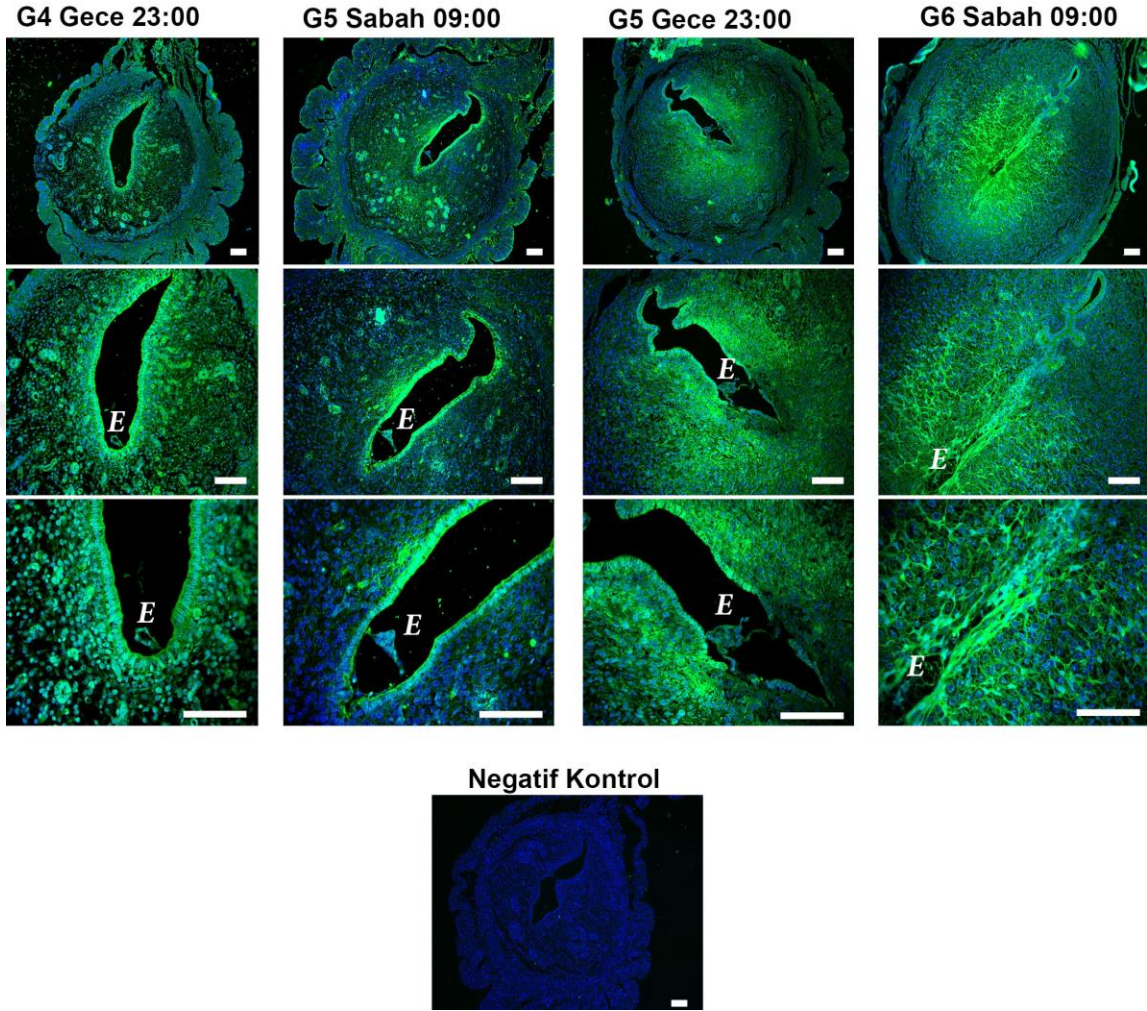
Gebeliğin 4. günü gece 23:00'te endometriyum lümen epitelinde, bezlerde, endotelde ve özellikle subepitelyal stromadaki stromal hücrelerde yoğun nükleer boyanma vardı. Ayrıca bu günde embriyonun henüz yeni tutunmaya başlayacak olduğu kript epitelinde FoxO1 yoğun olarak nükleer boyandı (Şekil 4.1.).

Gebeliğin 5. günü sabah 09:00'te endometriyumda lümen epiteli, bezler ve endotelde yoğun nükleer FoxO1 boyanması devam ederken stromal hücrelerdeki nükleer ekspresyon şiddeti azalmış ve neredeyse kaybolmuştu ve bu hücrelerde daha çok sitoplazmik boyanma vardı. Bu grupta embriyo artık kript epiteline tamamen tutunmuş durumdaydı ve embriyonun kriptte yerleşmiş olduğu epitel hücrelerinde nükleer FoxO1 ekspresyonu azalmıştı. Diğer yandan bu günde kriptin dışında kalan lümen epiteli ise yoğun nükleer FoxO1 ekspresyonuna devam etmektedir (Şekil 4.1.).

Gebeliğin 5. günü gece 23:00'te embriyonun kript epiteli bariyerini aşma aşamasında olduğu belirgin bir şekilde görünmekteydi. Kript epitelinin bazı kısımları embriyo tarafından disorganize edilmişti ve kript epitelindeki FoxO1 ekspresyonu yine belirgin bir şekilde azdı. Kriptin dışında kalan lümen epiteli yoğun nükleer FoxO1 ekspresyonuna devam etmekteydi. Diğer yandan stromada primer desidual alanda FoxO1'in yoğun sitoplazmik ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.1.).

Gebeliğin 6. günü sabah 09:00'da embriyo kript epitelini tamamen aşmış ve subepitelyal stromaya gömülmüş olarak gözlemlendi. Kript epiteli hücreleri neredeyse tamamen ortadan kalmış durumdaydı ve kriptin dışında kalan lümen epitelinde ise nükleer FoxO1 ekspresyonunun devam ettiği gözlemlendi. Stromada primer ve sekonder desidual alanda yoğun sitoplazmik ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.1.).

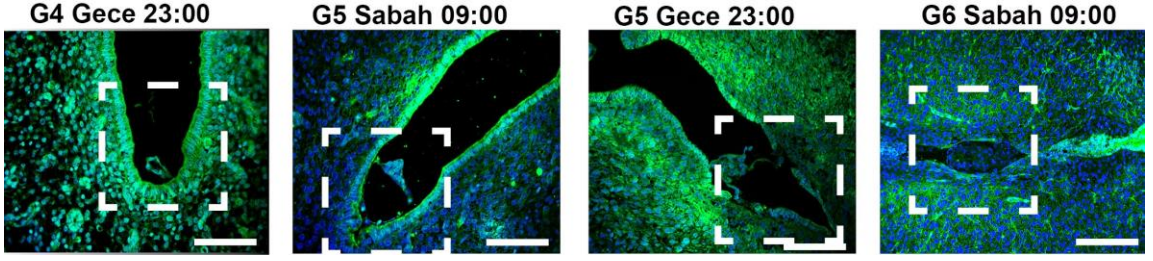
FoxO1/ Hoechst



Şekil 4.1. Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda FoxO1 protein lokalizasyonları. E: embriyo, Yeşil sinyal: FoxO1, Mavi sinyal: Hücre nükleusları

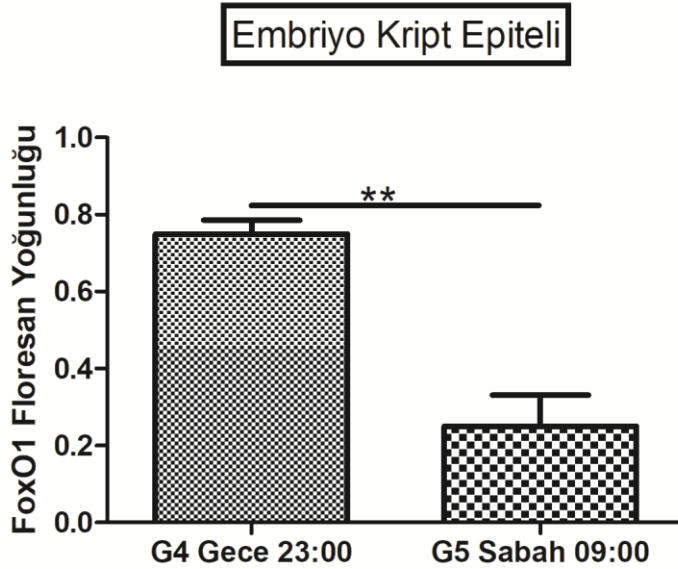
Gebeliğinin 4. günü gece 23:00 ve 5. günü sabah 09:00 grupları arasında İmage J analizi ile FoxO1 ekspresyonları değerlendirildi (Şekil 4.2.). Gebeliğin 5. günü gece 23:00'te ve 6. günü sabah 09:00'da kript epiteli disorganize olduğu için İmageJ analizlerine dahil edilmemiştir.

FoxO1/ Hoechst



Şekil 4.2. Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda FoxO1 protein lokalizasyonları. Kesikli çizgi içindeki alan kript bölgesini ifade etmektedir. Yeşil sinyal: FoxO1, Mavi sinyal: Hücre nükleusları

Endometriyum kript epitelinin FoxO1 ekspresyon seviyesi gruplar arasında İmage J analizi ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; G4 Gece 23:00 grubu, G5 Sabah 09:00 grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.0001$) (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Endometriyum kript epiteline FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu.

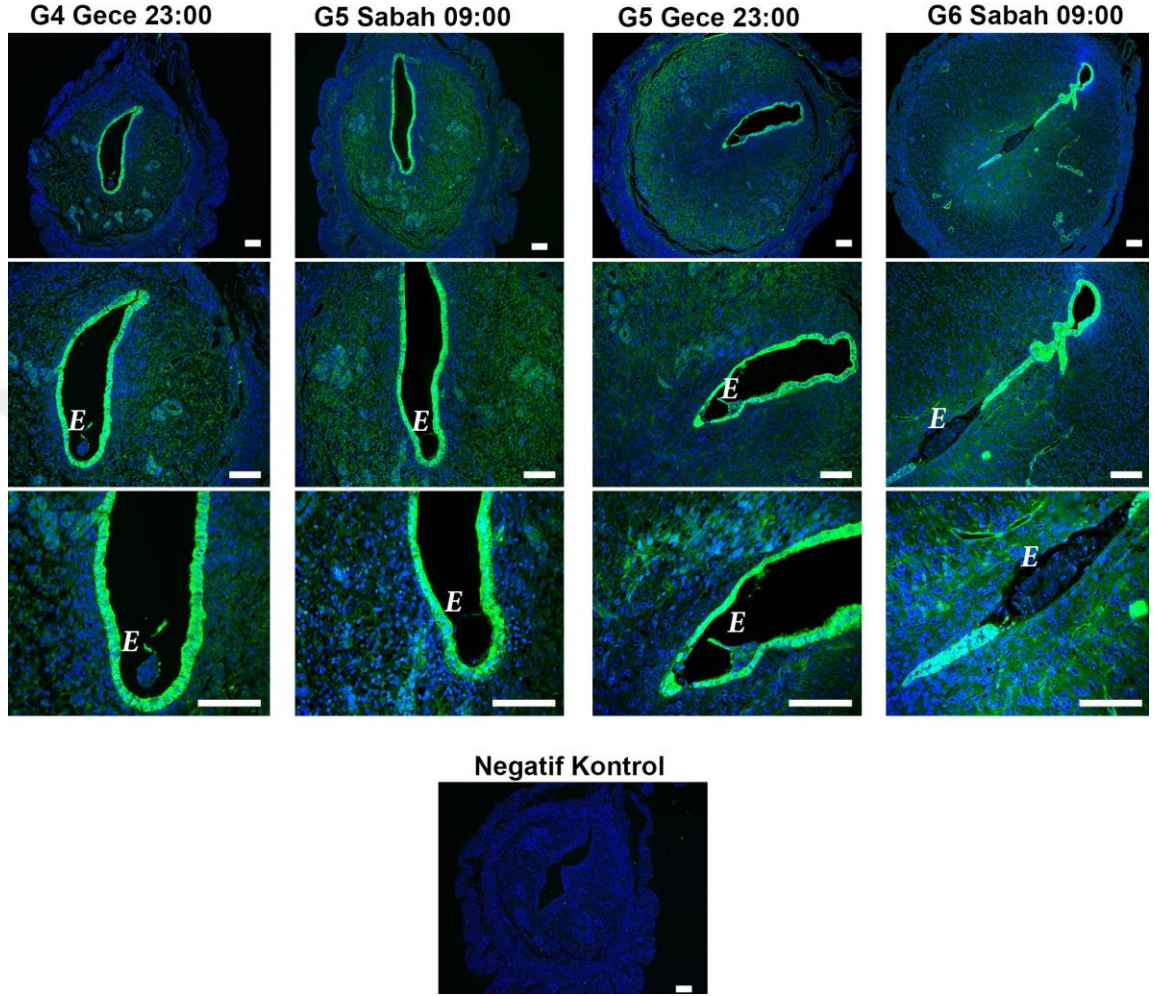
4.1.2. Embriyonun Epitelyal Bariyeri Aştığı Süreçte Fare Endometriyumunda HBEGF Protein Ekspresyonları

Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. günü gece saat 23:00, 5. günü sabah saat 09:00, 5. günü gece saat 23:00 ve 6. günü sabah saat 09:00'da endometriyumda HBEGF protein lokalizasyonları belirlendi. Gebeliğin 4. günü gece saat 23:00 ve 5. günü sabah saat 09:00'da alınmış olan uterus dokularında embriyo kript epiteline HBEGF ekspresyon düzeyleri ImageJ analizleriyle karşılaştırıldı. İmmünofloresan bulgulara göre HBEGF'nin gebeliğinin 4. gün gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda genel olarak lümen epiteline yoğun sitoplazmik ve nükleer ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.4.).

Gebeliğin 4. günü gece 23:00 ve Gebeliğin 5. günü sabah 09:00'da endometriyum lümen epiteline yoğun olarak sitoplazmik HBEGF ekspresyonu gözlemlendi ve buna karşılık; bezlerde, endotelde ve stromal hücrelerde ise zayıf HBEGF ekspresyonu vardı (Şekil 4.4.).

Gebeliğin 5. gün gece 23:00 ve gebeliğin 6. günü sabah 09:00'da birbirine benzer şekilde bazı stromal hücrelerde, bezlerde ve endotelde sitoplazmik reaksiyon gözlemlendi. Lümen epiteline ise sitoplazmik HBEGF ekspresyonunun yanı sıra yer yer kript epiteline ve gerileyen lümen epiteline nükleer ekspresyonu da mevcuttu (Şekil 4.4.).

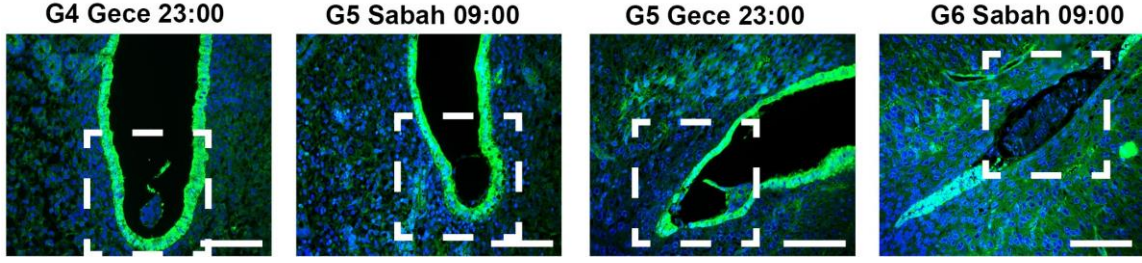
HBEGF/Hoechst



Şekil 4.4. Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda HBEGF protein lokalizasyonları. E: embriyo, Yeşil sinyal: HBEGF, Mavi sinyal: Hücre nükleusları

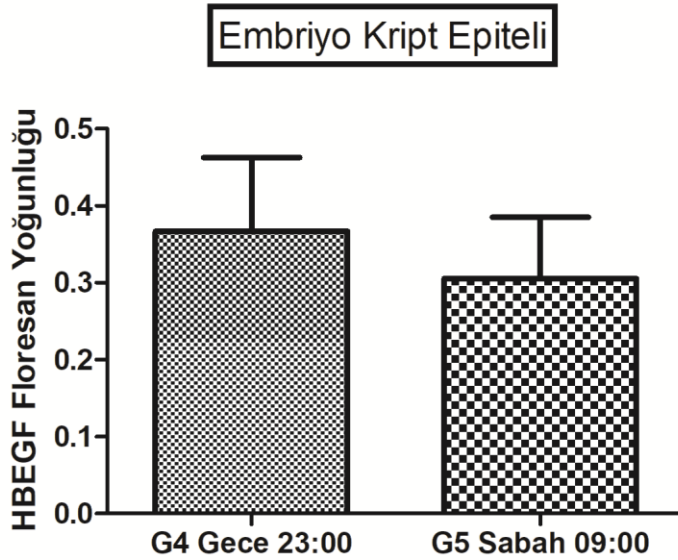
Gebeliğinin 4. günü gece 23:00 ve 5. günü sabah 09:00 grupları arasında İmageJ analizi ile HBEGF ekspresyonları değerlendirildi (Şekil 4.5.). Gebeliğin 5. günü gece 23:00'te ve 6. günü sabah 09:00'da kript epiteli disorganize olduğu için İmageJ analizlerine dahil edilmedi.

HBEGF/ Hoechst



Şekil 4.5. Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda HBEGF protein lokalizasyonları. Kesikli çizgi içindeki alan kript bölgesini ifade etmektedir. Yeşil sinyal: HBEGF, Mavi sinyal: Hücre nükleusları.

Endometriyum kript epitelinin HBEGF ekspresyon seviyesi gruplar arasında İmageJ analizi ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; G4 Gece 23:00 grubu ve G5 Sabah 09:00 grubu arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Endometriyum kript epitelinde HBEGF protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu.

4.1.3. Embriyonun Epitelyal Bariyeri Aştığı Süreçte Fare Endometriyumunda AKT Protein Ekspresyonları

Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. günü gece saat 23:00, 5. günü sabah saat 09:00, 5. günü gece saat 23:00 ve 6. günü sabah saat 09:00'da endometriyumda AKT protein lokalizasyonları belirlendi. Gebeliğin 4. günü gece saat 23:00 ve 5. günü sabah saat 09:00'da alınmış olan uterus dokularında embriyo kript epiteline AKT ekspresyon düzeyleri ImageJ analizleriyle karşılaştırıldı. İmmünofloresan bulgulara göre AKT'nin gebeliğinin 4. gün gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda genel olarak tüm kompartmanlarda yaygın sitoplazmik ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 4.7.).

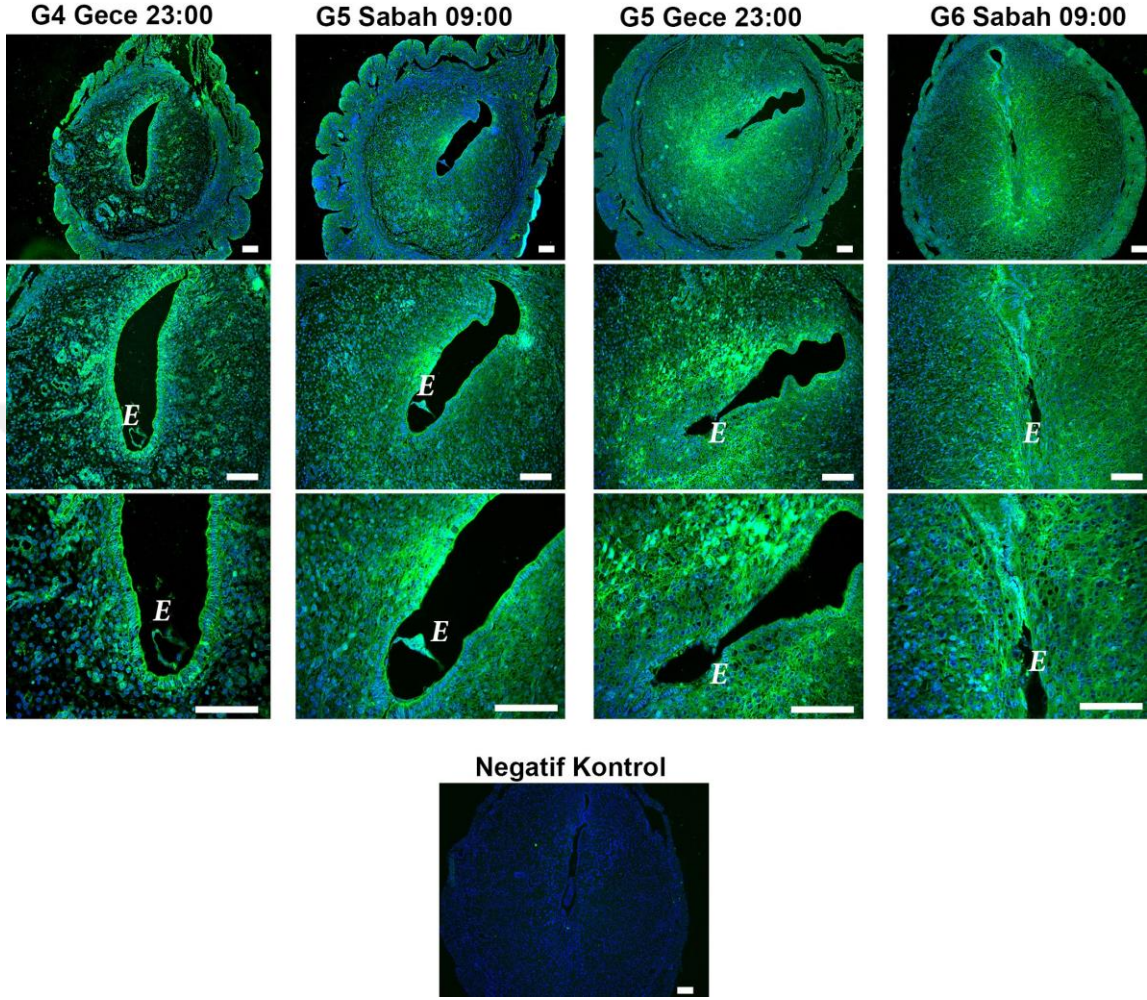
Gebeliğin 4. günü gece 23:00'te endometriyum lümen epiteli, bezler ve endotelde AKT'nin yoğun sitoplazmik ekspresyonu gözlenirken stromal hücrelerde ise daha zayıf sitoplazmik ekspresyonu vardır. Kript epitelindeki sitoplazmik AKT reaksiyon şiddeti tüm lümen epitelindeki reaksiyon şiddeti ile aynı görünmekteydi (Şekil 4.7.).

Gebeliğin 5. günü sabah 09:00'te endometriyumda stromal hücrelerde özellikle primer desidual alanda sitoplazmik AKT ekspresyonu artmış durumdaydı. Epitelin tamamında sitoplazmik AKT ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.7.).

Gebeliğin 5. günü gece 23:00'te primer desidual alanda yoğun sitoplazmik AKT ekspresyonu gözlemlendi. Kript epiteline ve kriptin dışında kalan lümen epiteline sitoplazmik AKT ekspresyonu gözlenmeye devam etti (Şekil 4.7.).

Gebeliğin 6. günü sabah 09:00'da stromada primer ve sekonder desidual olanada yoğun sitoplazmik AKT ekspresyonu gözlemlendi. Bu günde kript epiteli ortadan kalkmış durumdadır ve gerileyen lümen epiteline ise yoğun nükleer AKT reaksiyonu belirgin bir şekilde gözlemlendi (Şekil 4.7.).

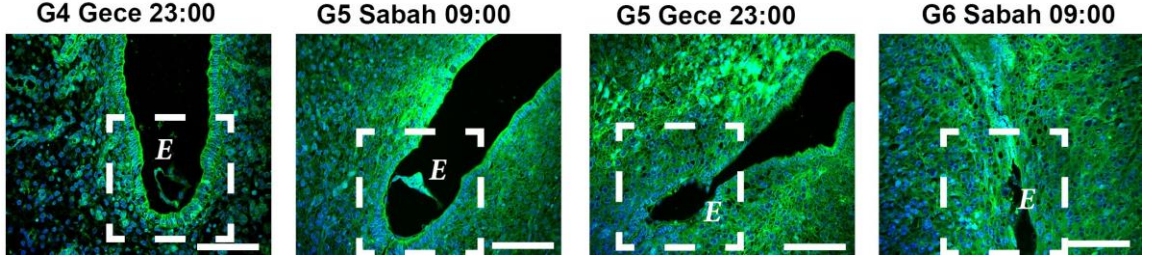
AKT/ Hoechst



Şekil 4.7. Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriumda AKT protein lokalizasyonları. E: embriyo, Yeşil sinyal: AKT, Mavi sinyal: Hücre nükleusları

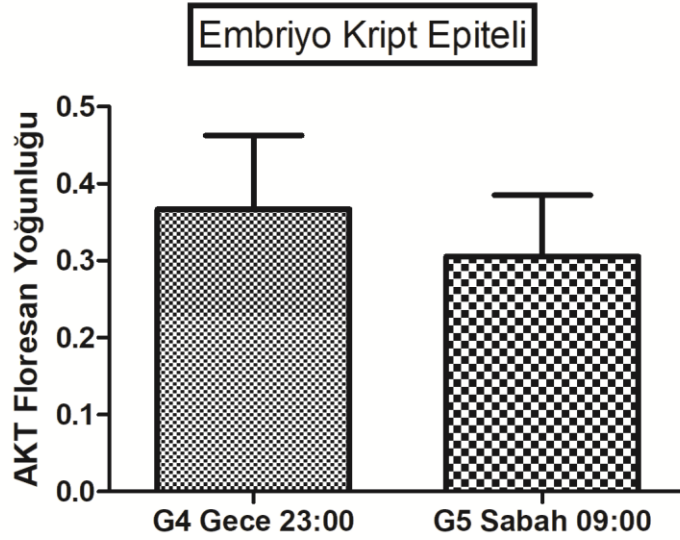
Gebeliğinin 4. günü gece 23:00 ve 5. günü sabah 09:00 grupları arasında İmage J analizi ile AKT ekspresyonları değerlendirildi (Şekil 4.8.). Gebeliğin 5. günü gece 23:00'te ve 6. günü sabah 09:00'da kript epiteli disorganize olduğu için İmage J analizlerine dahil edilmedi.

AKT/ Hoechst



Şekil 4.8. Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda AKT protein lokalizasyonları. Kesikli çizgi içindeki alan kript bölgesini ifade etmektedir. E: embriyo, Yeşil sinyal: AKT, Mavi sinyal: Hücre nükleusları

Endometriyum kript epitelinin AKT ekspresyon seviyesi gruplar arasında İmage J analizi ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; G4 Gece 23:00 grubu ve G5 Sabah 09:00 grubu arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Endometriyum kript epitelinde AKT protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu.

4.1.4. Embriyonun Epitelyal Bariyeri Aştığı Süreçte Fare Endometriyumunda pAKT Protein Ekspresyonları

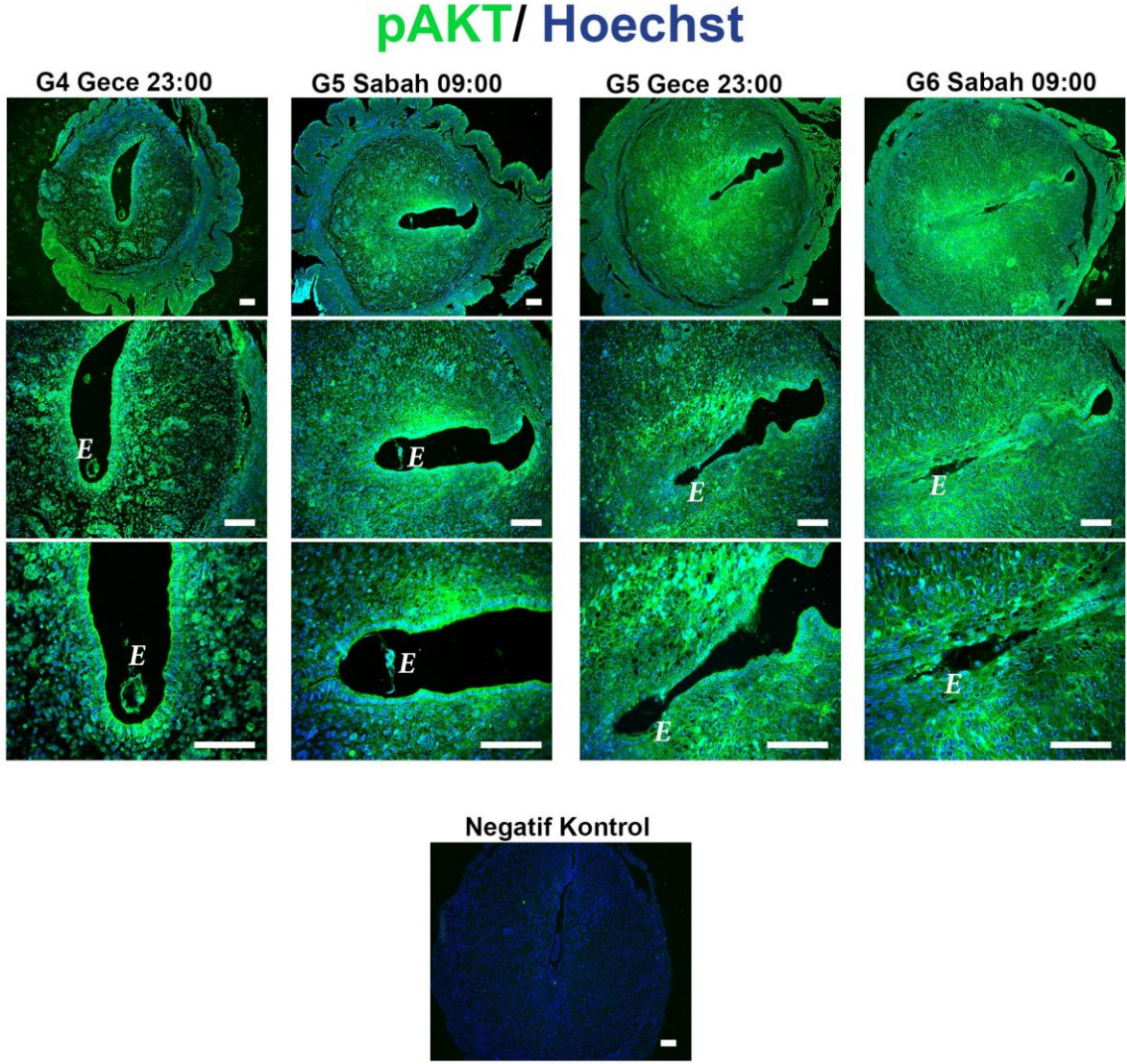
Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. günü gece saat 23:00, 5. günü sabah saat 09:00, 5. günü gece saat 23:00 ve 6. günü sabah saat 09:00'da endometriyumda pAKT protein lokalizasyonları belirlendi. Gebeliğin 4. günü gece saat 23:00 ve 5. günü sabah saat 09:00'da alınmış olan uterus dokularında embriyo kript epiteline pAKT ekspresyon düzeyleri ImageJ analizleriyle karşılaştırıldı. İmmünofloresan bulgulara göre pAKT gebeliğinin 4. gün gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda genel olarak tüm kompartmanlarda yaygın sitoplazmik ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 4.10.).

Gebeliğin 4. günü gece 23:00'te endometriyum lümen epiteli, bezler ve endotelde pAKT'nin yoğun sitoplazmik ekspresyonu gözlenirken stromal hücrelerde daha zayıf sitoplazmikti (Şekil 4.10.).

Gebeliğin 5. günü sabah 09:00'te endometriyumda stromal hücrelerde özellikle primer desidual alanda yoğun sitoplazmik pAKT ekspresyonu gözlenmişti. Bu günde lümen epitelinin tamamında sitoplazmik pAKT ekspresyonu vardı (Şekil 4.10.).

Gebeliğin 5. günü gece 23:00'te primer desidual alanda yoğun sitoplazmik pAKT ekspresyonu gözlemlendi. Lümen epitelinin tamamında sitoplazmik pAKT ekspresyonu vardı (Şekil 4.10.).

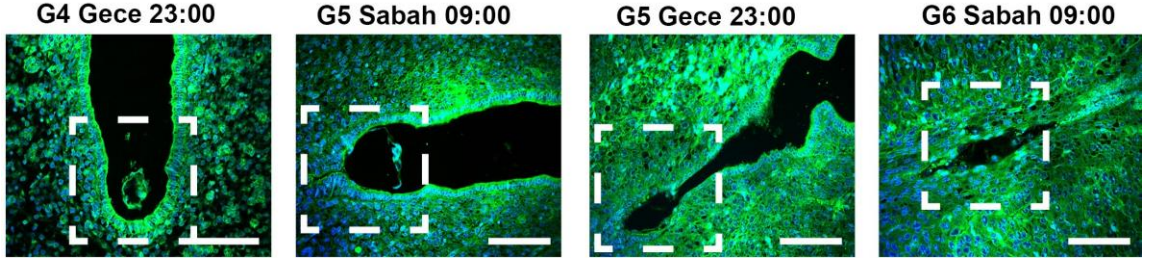
Gebeliğin 6. günü sabah 09:00'da stromada primer ve sekonder desidual olanada yoğun sitoplazmik pAKT ekspresyonu gözlemlendi. Bugünde kript epiteli ortadan kalkmış durumdadır ve gerileyen lümen epitelinde ise yoğun nükleer pAKT reaksiyonu belirgin bir şekilde gözlemlendi (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda pAKT protein lokalizasyonları. E: embriyo, Yeşil sinyal: pAKT, Mavi sinyal: Hücre nükleusları

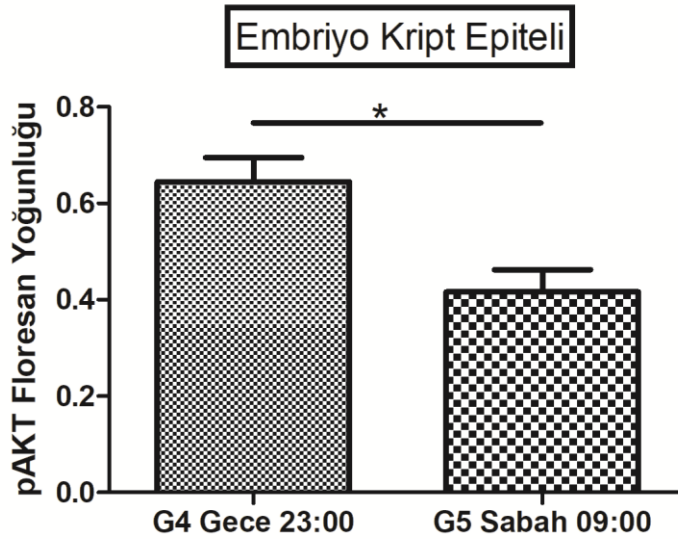
Gebeliğinin 4. günü gece 23:00 ve 5. günü sabah 09:00 grupları arasında İmage J analizi ile pAKT ekspresyonları değerlendirildi (Şekil 4.11.). Gebeliğin 5. günü gece 23:00'te ve 6. günü sabah 09:00'da kript epiteli disorganize olduğu için İmage J analizlerine dahil edilmedi.

pAKT/ Hoechst



Şekil 4.11. Embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecini içeren fare gebeliğinin 4. gün gece 23:00, 5. gün sabah 09:00, 5. gün gece 23:00 ve 6. gün sabah 09:00 saatlerinde endometriyumda pAKT protein lokalizasyonları. Kesikli çizgi içindeki alan kript bölgesini ifade etmektedir. E: embriyo, Yeşil sinyal: AKT, Mavi sinyal: Hücre nükleusları.

Endometriyum kript epitelinin pAKT ekspresyon seviyesi gruplar arasında İmage J analizi ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; G4 Gece 23:00 grubu, G5 Sabah 09:00 grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.001$) (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Endometriyum kript epitelinde pAKT protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu.

4.1.5. Boncuk (Bead) Transfer Edilen Cerrahi Fare Modellerinde Uterus Endometriyumunda HBEGF Protein Ekspresyonları

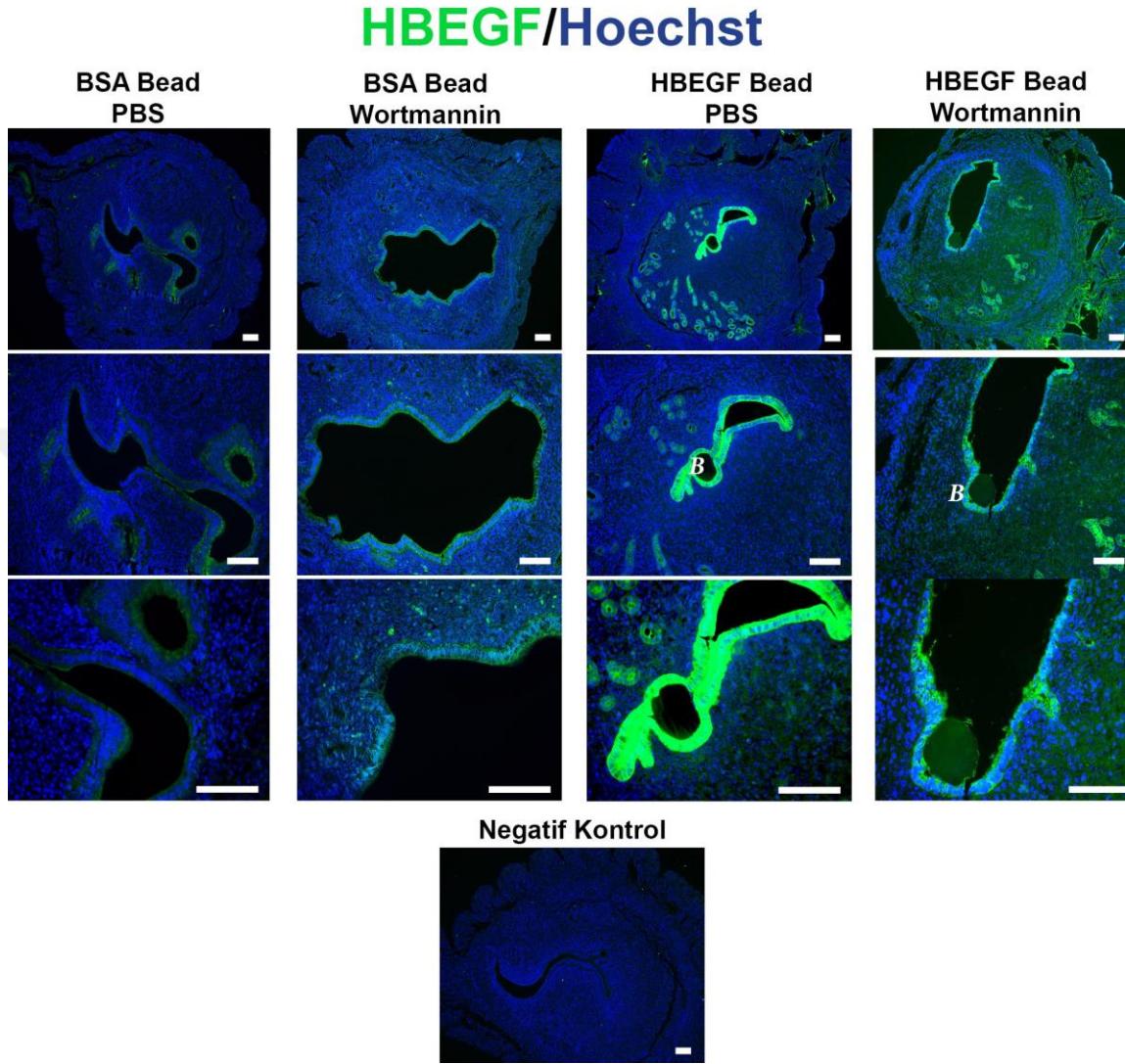
Cerrahi işlem ile uterus lümenine boncuk (bead) transfer edilmesiyle oluşturulan BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarındaki uteruslarda HBEGF lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.13.). Oluşturulan modelde farklı gruplardaki lümen epiteli HBEGF ekspresyon düzeyleri ImageJ analizleri ile karşılaştırıldı.

BSA Bead-PBS grubunda; immünofloresan bulgulara göre HBEGF'nin, endometriyumda sadece lümen epiteli ve bezlerde zayıf sitoplazmik ekspresyonu gözlemlendi. (Şekil 4.13.).

BSA Bead-Wortmannin grubunda; immünofloresan bulgulara göre HBEGF'nin, endometriyumda lümen epitelinde zayıf sitoplazmik ve nükleer ekspresyonu gözlemlendi. Bununla birlikte lümen epitelinin çevresinde stromadaki bazı hücrelerde de HBEGF ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.13.).

HBEGF Bead-PBS grubunda; immünofloresan bulgulara göre HBEGF'nin, endometriyumda lümen epiteli ve bezlerde sitoplazmik ekspresyonu gözlemlendi. Lümen epitelindeki HBEGF ekspresyonu sitoplazmik olarak çok şiddetli gözlemlendi. Boncuğun çevresindeki kript epitelinde ise yine yoğun sitoplazmik HBEGF ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.13.).

HBEGF Bead-Wortmannin grubunda; immünofloresan bulgulara HBEGF'nin, göre endometriyumda lümen epiteli ve bezlerde zaayıf sitoplazmik ekspresyonu gözlemlendi. Boncuğun çevresindeki kript epitelinde ise zayıf sitoplazmik HBEGF ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus endometriyumunda HBEGF protein ekspresyonları B: Boncuk (Bead) Yeşil sinyal: HBEGF, Mavi sinyal: Hücre nükleusları

BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında lümen epitelinde İmage J analizi ile HBEGF ekspresyonları değerlendirildi. HBEGF ekspresyon seviyesi gruplar arasında karşılaştırıldığında HBEGF Bead-PBS grubu; BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.0001$). HBEGF Bead-

Condition	HBEGF Floresan (approx.)
BSA BEAD-PBS	0.12
D-WORTMANNIN	0.24
BEGF BEAD-PBS	0.58
D-WORTMANNIN	0.48

4.1.6. Boncuk (Bead) Transfer Edilen Cerrahi Fare Modellerinde Uterus Endometriyumunda FoxO1 Protein Ekspresyonları

73

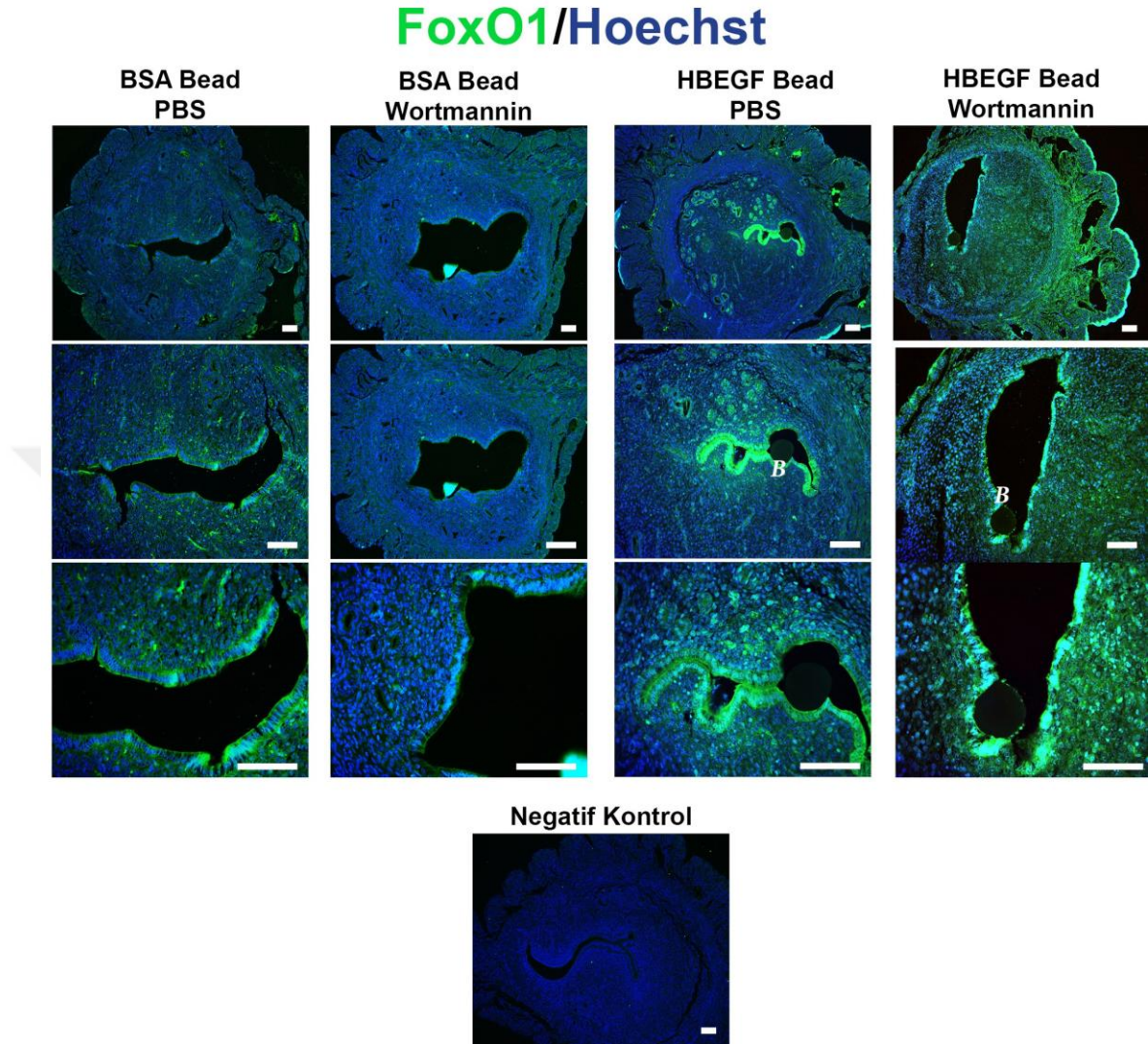
modelde farklı gruptaki lümen epiteli FoxO1 ekspresyon düzeyleri ImageJ analizleri ile karşılaştırıldı.

BSA Bead-PBS grubunda; immünofloresan bulgulara göre FoxO1'in, endometriyumda lümen epiteli, bezler ve endotelde zayıf/orta derecede ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.15.).

BSA Bead-Wortmannin grubunda; immünofloresan bulgulara göre FoxO1'in, endometriyumda lümen epitelinde zayıf sitoplazmik ve nükleer ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.15.).

HBEGF Bead-PBS grubunda; immünofloresan bulgulara göre FoxO1'in, endometriyumda lümen epitelinde yoğun nükleer ekspresyonu gözlemlenmiştir. FoxO1 bu grupta bezlerde sitoplazmik ve nükleer ekspresyon paterni gösterdi ve lümen epitelinin çevresinde primer desidual alandaki hücrelerde de FoxO1'in nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu görüldü. Boncuğun çevresindeki kript epitelinde ise daha çok sitoplazmik FoxO1 ekspresyonu vardı ve nükleer FoxO1 ekspresyonu daha az gözlemlendi (Şekil 4.15.).

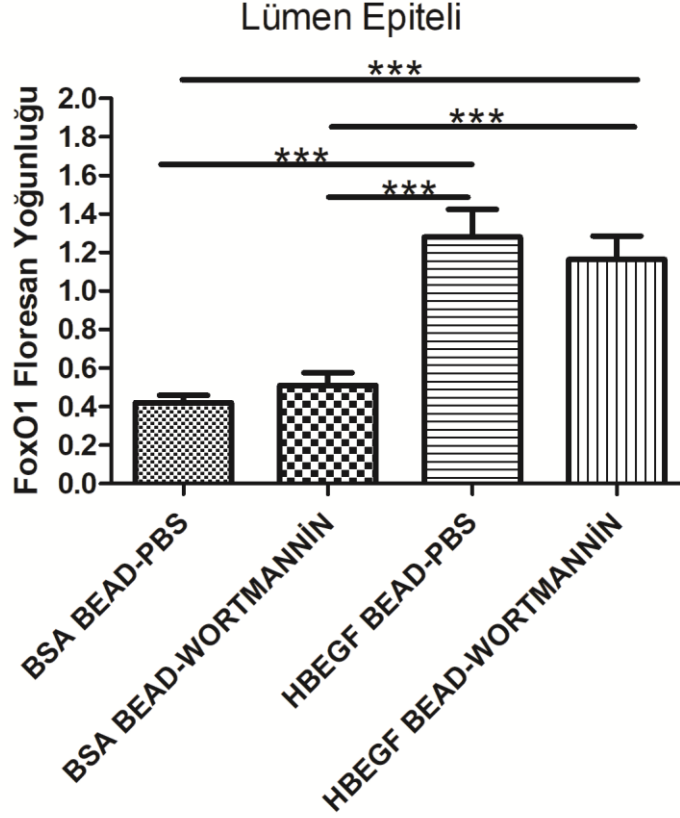
HBEGF Bead-Wortmannin grubunda; immünofloresan bulgulara göre FoxO1'in, endometriyumda lümen epitelinde yoğun nükleer ekspresyonu gözlemlendi. Bununla birlikte lümen epiteli çevresinde primer desidual alan bölgesinde sitoplazmik FoxO1 ekspresyonu gözlemlendi. Boncuğun çevresindeki kript epitelinde ise şiddetli nükleer FoxO1 gözlemlendi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus endometriyumunda FoxO1 protein ekspresyonları. B: Boncuk (Bead), Yeşil sinyal: FoxO1, Mavi sinyal: Hücre nükleusları

BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında lümen epitelinde İmage J analizi ile HBEGF ekspresyonları değerlendirildi. FoxO1 ekspresyon seviyesi gruplar arasında karşılaştırıldığında; HBEGF Bead-PBS grubu; BSA Bead-PBS ve BSA Bead-Wortmannin gruplarına göre $p < 0.0001$ anlamlı olarak yüksekti. HBEGF Bead-Wortmannin grubundaki FoxO1 ekspresyon

düzeyi ise BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin grubuna göre $p < 0.0001$ anlamlı yüksekti.



Şekil 4.16. Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde endometriyum lumen epitelinde FoxO1 protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu.

4.1.7. Boncuk (Bead) Transfer Edilen Cerrahi Fare Modellerinde Uterus Endometriyumunda AKT Protein Ekspresyonları

Cerrahi işlem ile uterus lümenine boncuk (bead) transfer edilmesiyle oluşturulan BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarındaki uteruslarda AKT lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.17.). Oluşturulan

modelde farklı gruplardaki lümen epitelı AKT ekspresyon düzeyleri ImageJ analizleri ile karşılaştırıldı.

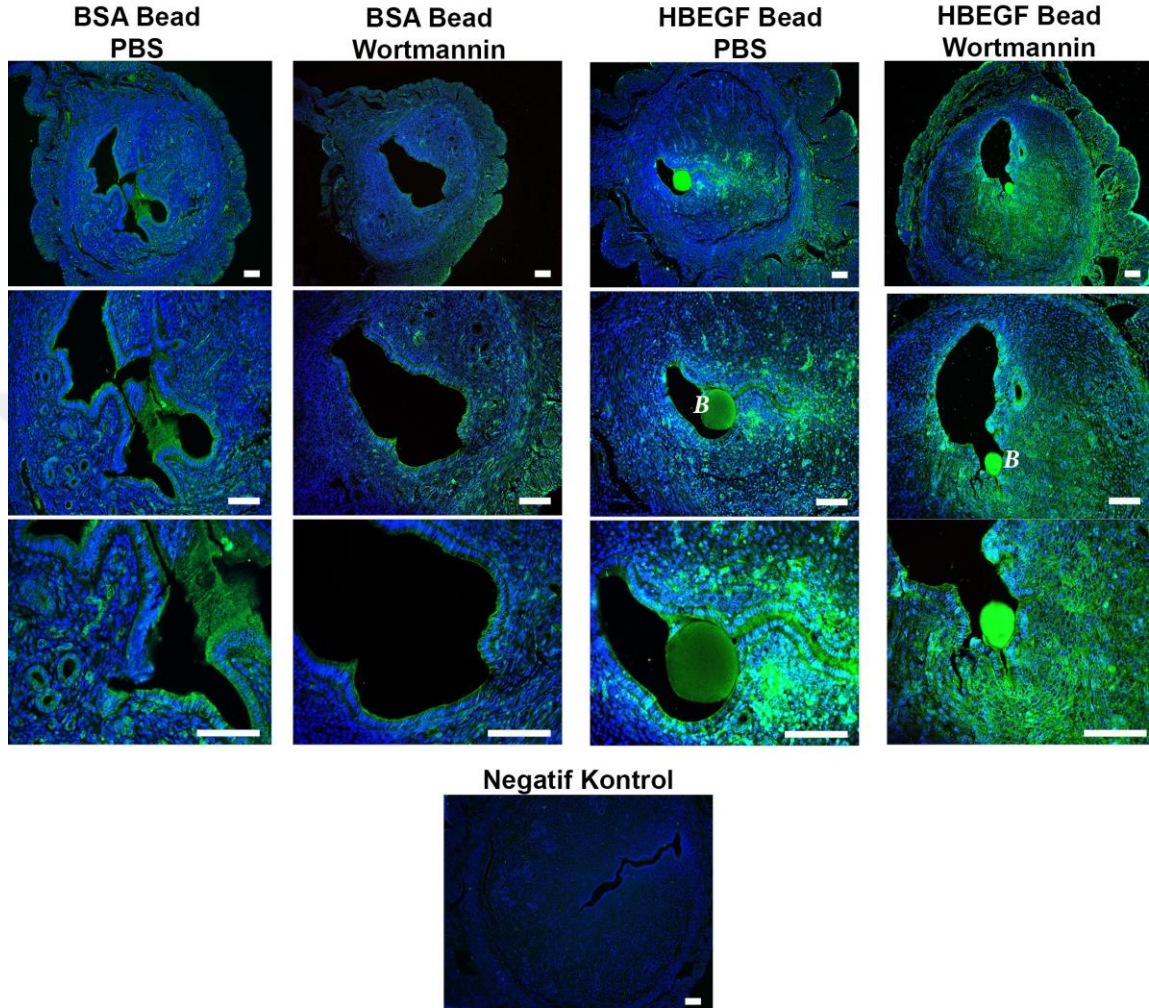
BSA Bead-PBS grubunda; immünofloresan bulgulara göre AKT'nin, endometriyumda lümen epitelinde, bezlerde ve endotelde zayıf sitoplazmik ekspresyonu gözlandı (Şekil 4.17.).

BSA Bead-Wortmannin grubunda; immünofloresan bulgulara göre AKT'nin lümen epitelinde, bezlerde ve endotelde zayıf sitoplazmik ekspresyonu gözlandı (Şekil 4.17.).

HBEGF Bead-PBS grubunda; immünofloresan bulgulara göre AKT'nin, endometriyumda lümen epitelinde şiddetli nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu gözlandı. Bu grupta AKT'nin bezlerde zayıf sitoplazmik ve epitelinin çevresinde primer desidual alandaki hücrelerde nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu görüldü, ayrıca endotelde yoğun nükleer ve sitoplazmik ekspresyon gözlandı (Şekil 4.17.).

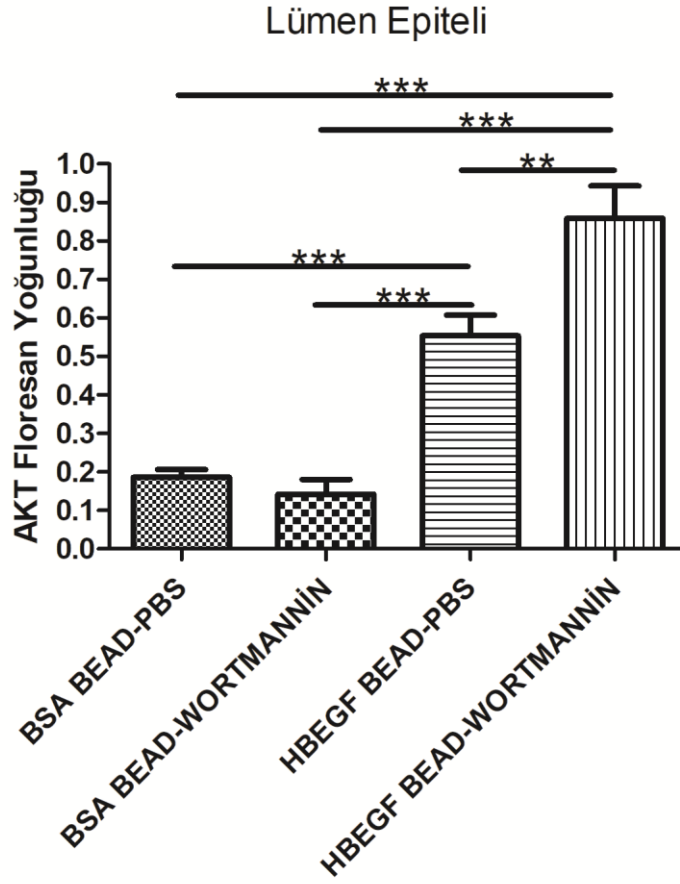
HBEGF Bead-Wortmannin grubunda; immünofloresan bulgulara göre AKT'nin endometriyumda lümen epitelinde şiddetli nükleer ekspresyonu gözlandı. AKT bu grupta bezlerde zayıf sitoplazmik, ancak epitelinin çevresinde primer desidual alandaki hücrelerde yoğun sitoplazmik gözlandı (Şekil 4.17.)

AKT/Hoechst



Şekil 4.17. Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus endometriyumunda AKT protein ekspresyonları. B: Boncuk (Bead), Yeşil sinyal: AKT, Mavi sinyal: Hücre nükleusları.

BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında lümen epitelinde İmage J analizi ile AKT ekspresyonları değerlendirildi. AKT ekspresyon seviyesi gruplar arasında karşılaştırıldığında HBEGF Bead-PBS grubunda; BSA Bead-PBS ve BSA Bead-Wortmannin gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.0001$). HBEGF Bead-Wortmannin grubu ise BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS ve BSA Bead-Wortmannin gruplarına göre anlamlı olarak yüksek AKT ekspresyonu gösterdi ($p < 0.0001$), (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde endometriyum lumen epitelinde AKT protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu.

4.1.8. Boncuk (Bead) Transfer Edilen Cerrahi Fare Modellerinde Uterus Endometriyumunda pAKT Protein Ekspresyonları

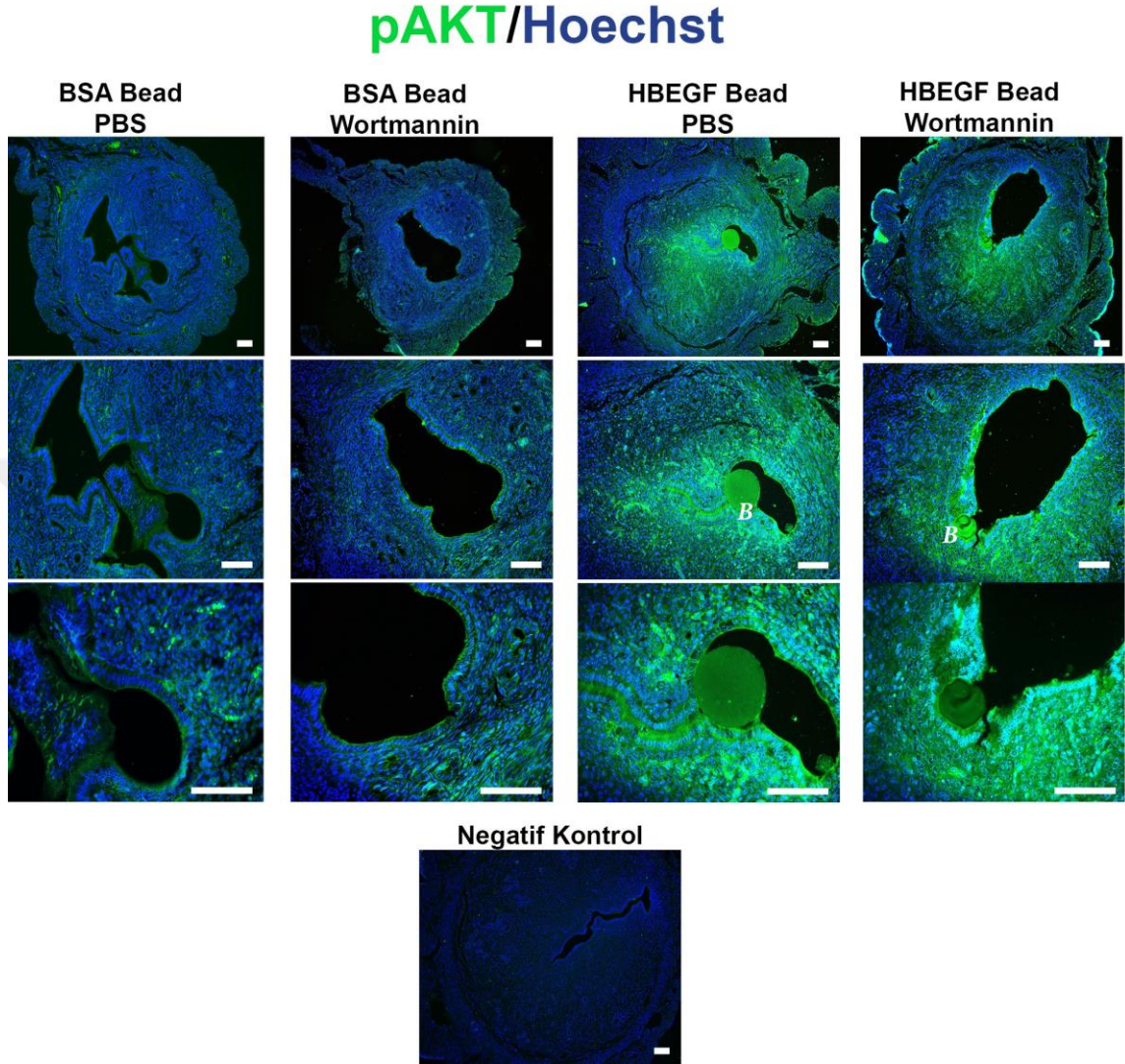
Cerrahi işlem ile uterus lümenine boncuk (bead) transfer edilmesiyle oluşturulan BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarındaki uteruslarda pAKT lokalizasyonları belirlendi (Şekil 4.19.). Oluşturulan modelde farklı gruplardaki lümen epiteli Pakt ekspresyon düzeyleri ImageJ analizleri ile karşılaştırıldı.

BSA Bead-PBS grubunda; immünofloresan bulgulara göre pAKT'nin, endometriyumda lümen epiteli ve bezlerde zayıf sitoplazmik ekspresyonu gözlemlendi. Ayrıca stromadaki bazı hücrelerde de pAKT'nin ekspresyonu vardı (Şekil 4.19.).

BSA Bead-Wortmannin grubunda; immünofloresan bulgulara göre pAKT'nin lümen epitelinde, bezlerde ve endotelde zayıf ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.19.).

HBEGF Bead-PBS grubunda; immünofloresan bulgulara göre pAKT'nin, endometriyumda lümen epitelinde nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu gözlemlendi. Bu grupta pAKT'nin epitelinin çevresindeki primer desidual alandaki hücrelerde nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu görüldü. Ayrıca endotelde de yoğun nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.19.).

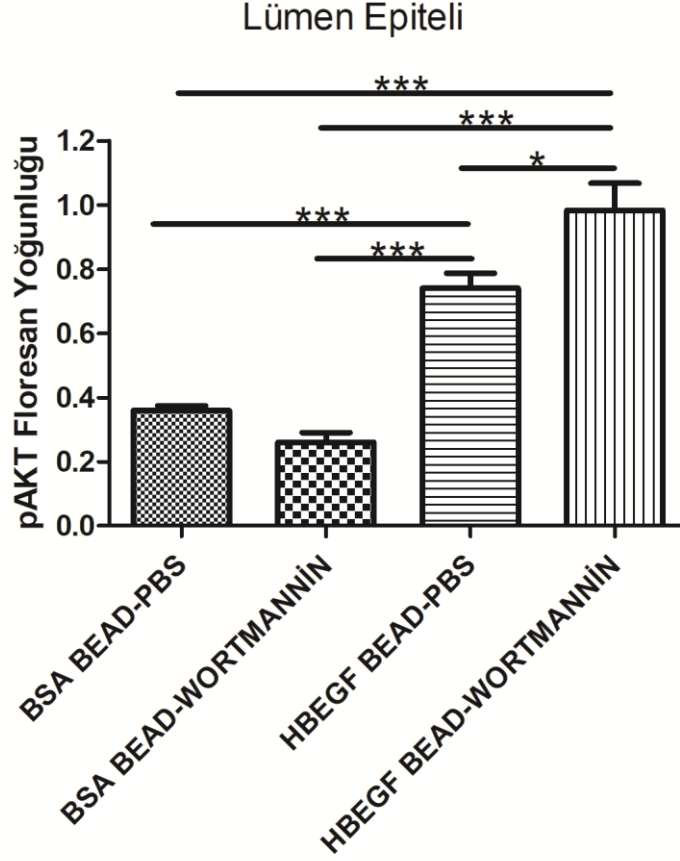
HBEGF Bead-Wortmannin grubunda; immünofloresan bulgulara göre pAKT'nin endometriyumda lümen epitelinde yoğun nükleer ekspresyonu gözlemlendi. Bu grupta pAKT epitelin çevresinde primer desidual alandaki hücrelerde sitoplazmik ve yoğun nükleer boyanmalar vardı (Şekil 4.19.)



Şekil 4.19. Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus endometriyumunda pAKT protein ekspresyonları. B: Boncuk (Bead), Yeşil sinyal: pAKT, Mavi sinyal: Hücre nükleusları.

BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında lümen epitelinde İmage J analizi ile pAKT ekspresyonları değerlendirildi. pAKT ekspresyon seviyesi gruplar arasında karşılaştırıldığında HBEGF Bead-PBS grubunda; BSA Bead-PBS ve BSA Bead-Wortmannin gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.0001$). HBEGF Bead-Wortmannin grubunda ise BSA Bead-PBS,

HBEGF Bead-PBS ve BSA Bead-Wortmannin gruplarına göre anlamlı olarak yüksek pAKT ekspresyonu vardı ($p < 0.0001$), (Şekil 4.20.).

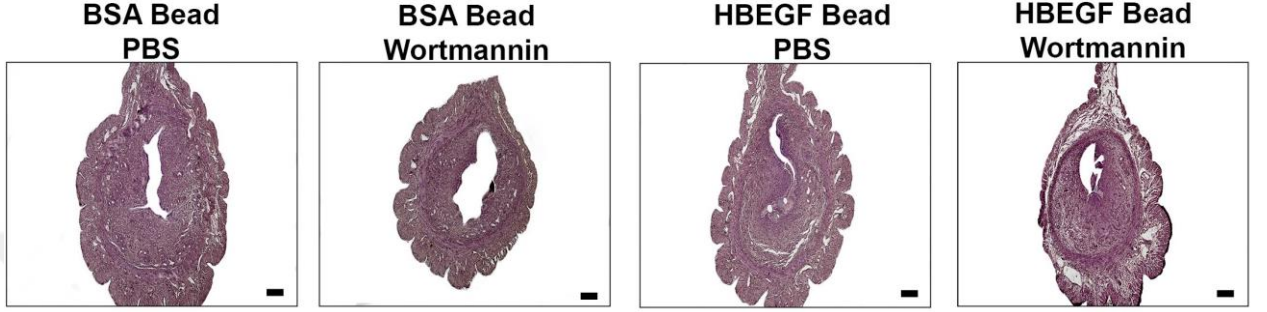


Şekil 4.20. Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde endometriyum lumen epitelinde AKT protein ekspresyon seviyelerinin ImageJ analizi sonucu.

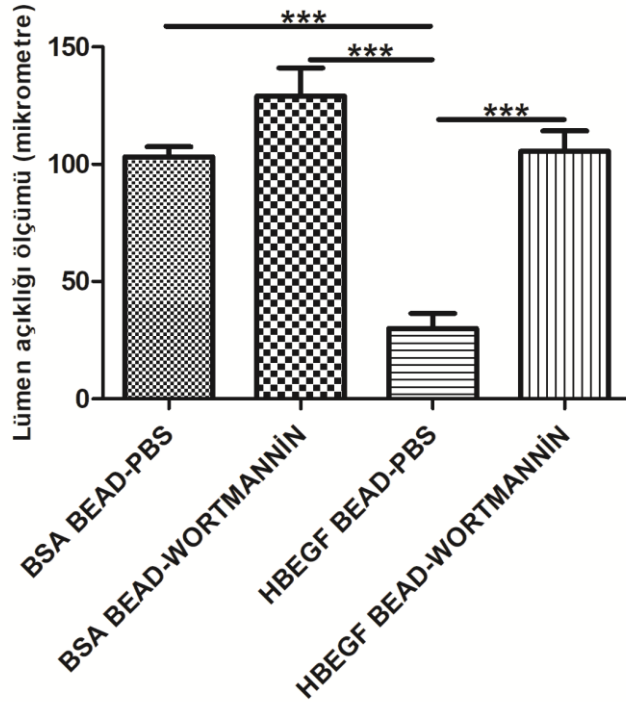
4.2. Morfolojik Bulgular

Yapılan bu çalışmada fare yalancı gebeliğinde 4. gün uterusu boncuk (bead) transfer edilen ve 5. gün uterus dokuları alınan cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin grupları arasında

lümen açıklığı ölçümü sonucunda BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin grupları HBEGF Bead-PBS grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.0001$), (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus lumen açıklığı ölçümü için hematoxilen eosin boyanmaları



Şekil 4.22. Boncuk (Bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde BSA Bead-PBS, HBEGF Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarında uterus lumen açıklığı ölçümü analizi sonucu

5. TARTIŞMA

Sağlıklı bir gebelik oluşması için, pre-implantif embriyo gelişimine senkron bir şekilde endometriumun reseptif hale gelmesi ve sonrasında embriyonun implantasyonunda ilk engel basamağı olan endometriyal epitelyal bariyerin aşılması gebeliğin devam etmesinde en kritik basamaklardan biridir (Cha ve ark., 2012).

Embriyo, epitelyal bariyeri aşarken maternal endometrium ile karşılıklı moleküler etkileşim halindedir. Hem moleküler olarak hem de morfolodinamik olarak bir çok olayın gerçekleştiği embriyonun epiteli aşma süreci, farelerde endometriumun kript formasyonu ile başlayıp implantasyon ile son bulmaktadır. Fare gebeliğinin ilk günlerinden itibaren başlayan ve giderek artan stromal ödem, epitelyal evaginasyona neden olur ve bu durum embriyonun yaklaşarak temas etmesini sağlayabileceği bir implantasyon kripti formuna neden olur. Farelerde uterus kript formasyonunu sağlayan moleküler mekanizma literatürde büyük ölçüde aydınlatılmıştır (Yuan ve ark., 2016). Gebeliğin 4. günü gece başlayan tutunma reaksiyonu ve bunu takiben 5. gün gece embriyo içerisinde adeta yuvalandığı kript epiteli bariyerini aşarak stromaya invazyonunu gerçekleştirir ve 6. günde tamamen stromaya gömülü olan embriyo ile implantasyon tamamlanmış olur (Cha ve ark., 2012). Embriyonun kript epiteli aşma yöntemi önceki çalışmalarda epitel hücrelerinin apoptozunun sağlanması yönünde tartışmalı hale gelmiştir (Zhang S. ve ark., 2013). Son yapılan çalışmalarda embriyo ve kript epiteli arasında non-apoptotik bir şekilde hücre içinde hücre invazyonu (entozis) ile epitelyal bariyerin aşıldığı gösterilmiştir. Embriyonun epitelyal bariyeri entozis ile aşmasını takiben tüm lümen epiteli hücrelerinin apoptoz ile ortadan kaybolduğunu ve böylece embriyonun apoptotik hücre sinyallerine temas etmeden maternal endometriyuma tamamen gömüldüğü ortaya konmuştur (Li ve ark., 2015).

Bir büyüme faktörü olan HBEGF endometriyal stromal ve epitel hücreleri tarafından ekspre edilerek endometriumda hücre proliferasyonunu, glandular epitel sekresyonunu ve desidual transformasyonu düzenler (Lim H. J. ve ark., 2009). Özgün ekspresyonu nedeniyle HBEGF hem fare de hem de insanda endometriyal reseptivite belirtecidir (Lim H. J. ve ark., 2009; Wang H. ve ark., 2018). Ayrıca HBEGF ekspresyonu fare uterusunda

bir implantasyon belirticidir ve tutunma reaksiyonuna eş zamanlı olarak, implantasyon için hazır olan aktif blastosist tarafından ve kript epiteli tarafından yoğun bir şekilde ekspre edilir (Xie ve ark., 2007). HBEGF gibi hücrede esasen benzer amaçlar için görev alan PI3K/AKT sinyalizasyonu hücre büyümesi ve gelişmesini destekleyen pek çok sinyalizasyondan biridir (Hemmings ve ark., 2012). AKT sinyalizasyonu doğru bir şekilde gerçekleşmediğinde embriyo implantasyonu gerçekleşemez (Liu L. ve ark., 2014). PI3K/AKT sinyalizasyonun düzenlediği en önemli alt sinyallerden biri de FoxO ailesinin üyesi olan FoxO1 transkripsiyon faktörüdür (Zhang X. ve ark., 2011). FoxO1 hücre siklusu duraklaması, oksidatif savunma, DNA tamiri, enerji homeostazı, apoptoz gibi hücrede pek çok farklı süreçleri düzenler (Huang H. ve ark., 2007). AKT tarafından fosforillenmesi sonucu sitoplazmada tutularak inaktivasyonu sağlanan (nükleusa gitmesi engellenen) FoxO1'in endometriyumdaki olası rolleri hakkında sınırlı sayıda literatür bilgisi bulunmaktadır (Kajihara ve ark., 2013; Vasquez ve ark., 2018; Adiguzel ve ark., 2019). Önceki çalışmamızda FoxO1 ekspresyonunun farede implantasyon zamanı ve peri implantasyon sürecinde endometriyum lümen epiteli ve bezlerde nükleer olarak upregüle olduğunu, bir endometriyal reseptivite belirtici olduğunu ve FoxO1'in progesteron ile düzenlendiğini ortaya koyduk (Adiguzel ve ark., 2019). Diğer yandan mezometriyal tarafta kapanmış olan lümen epitelinde FoxO1'in nükleer olurken, embriyonun yuvalandığı kript epitelinde ise daha çok sitoplazmik olarak olarak ekspre edildiğini gösterdik. FoxO1'in bu ekspresyon paterninin fare embriyo implantasyonunda bir 'navigatör' (kılavuz) molekül olabileceğini düşündürdü ve FoxO1'in bu özgün ekspresyon paternini düzenleyen moleküler mekanizmasını aydınlatmak amacıyla bu doktora tezi çalışmasını gerçekleştirdik. Literatürde FoxO1'in AKT sinyalizasyonu ile düzenlendiği bilinmekte, ancak fare implantasyonunda epiteldeki FoxO1 ekspresyonunun AKT tarafından düzenlendiğine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Fare peri-implantif dönemde epiteldeki özgün HBEGF ekspresyonu zamansal ve mekansal olarak FoxO1'le olan izdüşümü; insülin ve büyüme faktörleri varlığında aktive olan PI3K/AKT sinyalizasyonunun embriyodan gelen büyüme faktörü HBEGF ile aktive olabileceği ve kript epitelinde bu sebeple FoxO1'in downregüle olabileceğini düşündürmüştür

Çalışmamızda in vivo olarak HBEGF, AKT, pAKT ve FoxO1'in implantasyonu sürecinde embriyonun epitelyal bariyeri aştığı zaman dilimini içeren G4 gece (23:00), G5 sabah

(09:00), G5 gece (23:00), G6 sabah (09:00) günleri ve saat aralıklarındaki ekspresyonlarını değerlendirdik. Diğer yandan yine *in vivo* olarak boncuk (bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde uterus endometriyumunda HBEGF, AKT, p-AKT, FoxO1 ve ekspresyonlarının nasıl bir değişim gösterdiğini araştırdık.

Önceki çalışmamızda literatürdeki diğer çalışmalar ile birlikte FoxO1'in endometrial reseptivite belirteci olduğunu ortaya koymuştuk (Vasquez ve ark., 2018; Adiguzel ve ark., 2019; Adiguzel ve ark., 2021). FoxO1 ekspresyonu bu dönemde ilk olarak gebeliğin 4. günü sabah saatlerinde (09:00) zayıf sitoplazmik olarak ortaya çıkmıştı. 4. günü akşam saatlerinde (19:00) ise FoxO1 lümen epitelinde nükleusa yoğun şekilde transloke olmuştu. Fare uterusunun reseptivitesi, 4 gün başlayan ve ertesi gün (5.gün) sabah saatlerinde son bulan bir süreci kapsamaktadır (Cha ve ark., 2012). Embriyonun reseptif endometriyuma tutunması ise 4. gün gece (20:00-24:00) gerçekleşen saat sınırları net belirlenemeyen endometriyum ve embriyonun moleküler iletişiminin dinamiğine bağlı olaylardır (Wang H. ve ark., 2006; Lim H. J. ve ark., 2009; Maurya ve ark., 2021). Bu çalışmada bu dinamiğin FoxO1 açısından nasıl değiştiğinin sınırlarını daha net belirlemek amacıyla belirli saatlerde ekspresyonlarını inceledik. FoxO1 gebeliğin 4. günü gece (23:00) endometriyum lümen epitelinde, bezlerde, endotelde ve özellikle subepitelyal stromadaki stromal hücrelerde yoğun nükleer boyanma gözlemledik. Önceki çalışmamızda FoxO1 i gebeliğin 19:00 saatlerinde incelediğimizde farklı olarak subepitelyal stromada bu yoğun nükleer boyanmayı görmemiştik (Adiguzel ve ark., 2019). Diğer yandan hem önceki bulgularımızda hem de bu çalışmada gebeliğin 5. günü sabah (09:00) stromal hücrelerde bu nükleer FoxO1 ekspresyonu neredeyse hiç yoktur. Farelerde desidualizasyon embriyo varlığı ile ya da yapay olarak (susam yağı/boncuk gibi ajanların intralümenal enjeksiyonuna bağlı olarak) indüklenebilmektedir (Lim H. ve ark., 1997). FoxO1'in insan stromal hücrelerde, birçok desidual genin (dPRL, IGFBP1 ve WNT4 en çok ekspresyonunu sağladığı genler) transkripsiyonunu sağladığı bilinmektedir (Christian ve ark., 2002; Kim ve ark., 2003; Buzzio ve ark., 2006; Labied ve ark., 2006). Fare gebeliğinde embriyonun ilk tutunma reaksiyonlarının gerçekleştiği gebeliğin 4. Günü gece saatlerinde (23:00) FoxO1 in subepitelyal stromal hüclerdeki nükleer ekspresyonu, desidual hedef genlerin transkripsiyonunu sağlamak amacıyla yoğun nükleer lokalizasyonuna neden olabileceğini düşündürmüştür. İnsan stromal hücrelerin

desidualizasyonu çalışmalarında Progesteron ve cAMP ile muamele sonrası kültürün 2. Gününde önce FoxO1'in arttığı ve 48 saat sonra FoxO1'in hızla azalıp, IGFBP ve dPRL'in kültürün 4. ve 6. günleri hızla arttığı gözlenmiştir (Buzzio ve ark., 2006; Grinius ve ark., 2006). İnsan endometriyal hücre kültüründe 2. günden sonra desidual form kazanan hücreler görülmeye başlar (Pan-Castillo ve ark., 2018). FoxO1'in progesteron ve cAMP ile muamele edilen insan stromal hücrelerinde 2. gün ani artışı ve 4. gün ani azalışı kısa sürede desidual genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirip nükleustan çıktığını göstermektedir. Bu çalışma FoxO1'in subepitelyal stromal hücrelerdeki nükleer ekspresyonun gebeliğin 4. günü gece saatlerinde (23:00) başlaması ve 5. gün sabah saatlerinde son bulması; insan endometriyal stromal hücre kültüründeki gibi FoxO1'in hızlı bir şekilde desidual genleri transkripte edip nükleustan çıktığını göstermektedir. İnsan ve fare çalışmalarının benzerlik göstermesi farede diğer tanımlanmaya çalıştığımız moleküller ve sinyalizasyonların da benzeyebileceği hakkında temel oluşturmaktadır.

Çalışmamızda kript epitelinde FoxO1, HBEGF, AKT ve pAKT ekspresyonlarını değerlendirdik. Ancak bu değerlendirmeyi embriyo 5. gün gece kript epiteli bariyerini aşma aşamasında olması nedeniyle ve 6. gün sabah (09:00) endometriyuma gömülü olması nedeniyle, epitel reaksiyon sınırları embriyo reaksiyonundan ayırt edilemez durumdadır. Bu sebeple normal gebelik gruplarında kript epitelindeki FoxO1, HBEGF, AKT ve pAKT ekspresyonlarının değerlendirilmesini gebeliğin 4. gün gece (23:00) ve 5. gün sabah (09:00) gerçekleştirdik. Gebeliğin 5. günü sabah (09:00) FoxO1'in önceki çalışmamızla (Adiguzel ve ark., 2019) uyumlu bir şekilde embriyonun yuvalandığı kript epitelinde sitoplazmik bir şekilde ekspre edildiğini ve downregüle olduğunu gördük. Diğer yandan bugünde kriptin dışında kalan lümen epiteli ise yine önceki çalışmamızla uyumlu bir şekilde yoğun nükleer FoxO1 ekspresyonuna devam etmekteydi. FoxO1'in nükleer birikimi apoptoza neden olur (Labied ve ark., 2006) ve FoxO1'in nükleer protein dozajı hücrede apoptoza gitmeyi belirleyen unsurlardan biridir (Lu ve ark., 2021). Embriyonun temas etmediği, kriptin dışında kalan lümen epiteli implantasyon sonrası apoptoza uğrar (Zhang S. ve ark., 2013; Li ve ark., 2015). Embriyonun yuvalandığı kript epitelinde ise embriyonun non-apoptotik bir süreçle 'entosis' denilen hücre içinde hücre invazyonu şeklinde embriyo epitelyal bariyeri aşar (Li ve ark., 2015). Bu nedenle yazdığımız derlemede, FoxO1'in kript epitelinde sitoplazmik bir şekilde downregüle

olmasını embriyodan gelen sinyallerin neden olabileceğini ve bu sayede FoxO1'in kript epiteline enstozis sürecini yönettiğini ve kript dışında kalan lümen epiteline nükleer bir şekilde birikimini ise burada da apoptozu yönettiğini tartıştık. Yapılan bu çalışmada fare gebeliğinin embriyonun kript epiteline yerleştiği G4 gece 23:00 ve G5 sabah 09:00'da kript epiteline FoxO1, HBEGF, AKT ve pAKT ekspresyonlarını karşılaştırdığımızda G4 gece 23:00'te kript epiteline FoxO1 ve pAKT ekspresyonları G5 sabah 09:00'da anlamlı derecede azalmıştır. Literatürde FoxO1'in aktif AKT (pAKT) tarafından inhibe edilerek sitoplazmaya çıkarıldığı bilinmektedir (Zhang X. ve ark., 2011). pAKT'nin kript epiteline G4 gece (23:00) yoğun ekspre edilmesi, kript epiteline temas etme sürecinde olan embriyonun göndermiş olduğu büyüme faktörleri sayesinde olduğunu ve amacının ise G4 gece tüm epitelde nükleer olarak upregüle olan FoxO1'i G5 sabah kript epiteline sitoplazmaya çıkararak downregüle etmek olduğunu düşündürmektedir. Diğer yandan gebeliğin 5. günü sabah (09:00) sitoplazmik olan FoxO1 ekspresyonunun, gebeliğin 5. günü gece (23:00) embriyo epitelyal bariyeri entozis ile aşma sürecindeyken nükleer olmaya başladığını gözlemledik. FoxO1 6. gün sabah (09:00)'da ise gerileyen lümen epiteline tamamen nükleerdi. FoxO1'in nükleer birikimin apoptozu neden olduğu (Lu ve ark., 2021) ve lümen epiteli ve kript epitelinin entozis sonrası apoptozu uğradığı (Li ve ark., 2015) literatür bilgisini göz önünde bulundurduğumuzda FoxO1'in kript epiteline entozis sonrası apoptozu yönettiğini akla getirmiştir.

G4 gece 23:00 ve G5 sabah 09:00'da kript epiteline HBEGF ve AKT ekspresyonları ise değişmemiştir. Ancak HBEGF 5. gün sabah embriyonun tutunmasından sonra reaksiyon şiddeti nükleer olarak yoğunlaştığını gözlemledik. Literatürde HBEGF'nin nükleer ekspresyonunun kendi ekspresyonunu baskıladığı ve bunu kendi transkripsiyonunu da sağlayan PLZF'yi nükleustan çıkararak yaptığı bilinmektedir (Hieda ve ark., 2008). Bu bilgiyi göz önünde bulundurduğumuzda HBEGF, embriyonun yuvalanma ve tutunma görevini yerine getirdikten sonra kendi transkripsiyonunu baskılayarak gebeliğin 5. Gün geceden sonra gerileyen lümen epitelinin nükleer FoxO1 aracılı apoptozu uğraması için gerekli sinyalizasyonu sağladığını düşündürmüştür.

Sonuçlarımızda transmembran form HBEGF hem tüm lümen epiteli hem de blastosist tarafından ekspre edilmektedir ve bu sonuçlarımız literatür ile uyumludur (Raab ve ark.,

1996). Hem embriyodaki hem de kript epitelindeki tranmembran form HBEGF bir reseptör görevi görmekte ve aynı zamanda blastosistin kript epiteline tutunmasını sağladığı bilinmektedir (Chobotova ve ark., 2002; Xie ve ark., 2007; Lim H. J. ve ark., 2009). Bu nedenle buradaki embriyodan gelen çözünebilir form HBEGF etkisini daha doğru değerlendirmek amacıyla HBEGF kaplı embriyo boyutunda boncuk (bead) transfer edilen cerrahi fare modelleri oluşturduk. PI3K inhibisyonunu sağlayarak AKT'nin dolaylı yoldan inhibe eden Wortmannin çözgeni ile BSA kaplı boncukları transfer ettik. Çözünebilir form HBEGF ile inkübe edilmiş boncukları PBS çözgeni ya da wortmanin çözgeni ile intralüminal transfer ettik. BSA ile inkübe edilen boncukları PBS çözgeni ile gönderildiği grupta literatür ile uyumlu bir şekilde 5. gün sabah herhangi bir implantasyon alanı saptanmadı (Paria ve ark., 2001). Benzer şekilde BSA ile inkübe edilen boncukları Wortmannin ile gönderildiği grupta literatür ile uyumlu bir şekilde 5. gün sabah herhangi bir implantasyon alanı saptanmadı (Liu L. ve ark., 2014). PI3K/AKT inhibisyonunun embriyo implantasyonunu engellediği literatürde ortaya konmuştur (Liu L. ve ark., 2014). HBEGF ile inkübe edilen boncukların PBS ile gönderildiği grupta yine literatür ile uyumlu bir şekilde implantasyon alanları 5. günde saptanabilirken, ilginç bir şekilde HBEGF ile inkübe edilen boncukların Wortmannin ile gönderildiği grupta da sayıca daha az olmalarına rağmen implantasyon alanları saptanmıştır.

Oluşturulan gruplarda HBEGF ekspresyonunu lümen epitelinde incelediğimizde HBEGF Bead-PBS grubunda; BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarına göre anlamlı olarak yüksektir. Çözünebilir form HBEGF'nin bölünmeler geçirerek jukstakrin, otokrin ve parakrin yollar ile kendi sayısını arttırabilme yeteneği sayesinde hem kript epitelinin hem de embriyonun yoğun HBEGF ekspresyonuna neden olur (Lim H. J. ve ark., 2009). Dolayısıyla, BSA Bead-PBS grubunda HBEGF ekspresyonu yok denecek kadar azdır ve literatür ile uyumlu bir şekilde kendi ekspresyonunu sağlayamamıştır (Paria ve ark., 2001). BSA Bead-Wortmannin grubunda HBEGF ekspresyonu yine oldukça düşüktür. HBEGF'nin bir implantasyon belirteci olduğu bilinmektedir (Lim H. J. ve ark., 2009) ve bu grupta ortamda Wortmannin implantasyonu engellediği için ve diğer yandan da çözünebilir HBEGF ortamda olmadığı için lümen epitelinin HBEGF ekspresyon etmediğini gösterdik. HBEGF Bead-Wortmannin grubu HBEGF Bead-PBS grubuna göre anlamlı derecede düşük olsa da HBEGF

ekspresyonu HBEGF taşıyan bead sayesinde kısmen kendi ekspresyonu indükleyebildiği gösterdik. Literatürde HBEGF'nin PI3K aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir (Elenius ve ark., 1997). PI3K inhibitörünün HBEGF kaplı boncuklar ile gönderilmesi, lümen epitelinde HBEGF'nin PI3K'nın aktivasyonunu kısmen arttırarak implantasyon reaksiyonunu ve kendi ekspresyonunu indükleyebildiğini düşündürmektedir.

Oluşturulan gruplarda FoxO1 ekspresyonunu lümen epitelinde incelediğimizde HBEGF Bead-PBS grubu; BSA Bead-PBS ve BSA Bead-Wortmannin gruplarına göre lümen epitelinde anlamlı olarak yüksektir. Literatürde ovaryum granuloza hücrelerinde FoxO1 sinyalinin HBEGF tarafından arttırıldığı bilinmektedir (Huang J. C. ve ark., 2022). Bu sonuç FoxO1'in lümen epitelindeki ekspresyon artışı için embriyonik HBEGF sinyaline ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. FoxO1 ekspresyonu HBEGF Bead-PBS grubunda, normal gebeliğin 5. günündeki ekspresyon paternine çok benzemektedir. Özellikle HBEGF Bead-PBS grubunda boncuğun çevresindeki kript epitelinde aynı normal gebeliğin 5. gününde embriyonun çevresindeki kript epitelindeki gibi daha çok sitoplazmik ekspresyonu vardır. Bu sonuç HBEGF büyüme faktörünün FoxO1'in transkripsiyonel aktivitesini kript epitelinde inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

Lümen epitelinde FoxO1'in ekspresyon şiddeti açısından HBEGF Bead-PBS grubu HBEGF Bead-Wortmannin grubu arasında anlamlı bir fark yoktur. Ancak HBEGF Bead-Wortmannin grubunda boncuğun çevresindeki kript epitelinde FoxO1 nükleer olarak ekspre olmaktadır ve sitoplazmik olarak inhibisyonu da sağlayamamıştır. FoxO1'in büyüme faktörleri varlığında PI3K/AKT sinyalizasyonu ile sitoplazmaya taşınarak inhibe olduğu bilinmektedir (Greer ve ark., 2005; Salih ve ark., 2008). HBEGF Bead-Wortmannin grubunda ortamdaki embriyonik HBEGF sinyali FoxO1 ekspresyonunu tüm epitelde sağlayabilse de kript epitelinde sitoplazmik olarak downregüle olması gerekirken PI3K inhibitörü nedeniyle nükleer olarak kalmıştır. Bu sonuç FoxO1 ekspresyonunun artışı için embriyonik HBEGF sinyaline ihtiyaç duymasının yanı sıra embriyonun yuvalandığı kript epitelindeki inhibisyonu için PI3K'nın aktive olması gerektiğini göstermektedir.

Oluşturulan gruplarda AKT ve pAKT ekspresyonunu lümen epitelinde incelediğimizde HBEGF Bead-PBS grubunda; BSA Bead-PBS ve BSA Bead-Wortmannin gruplarına göre

lümen epitelinde anlamlı olarak yüksektir. Bu sonuç AKT ve pAKT'nin lümen epitelindeki ekspresyonlarının HBEGF sinyaline bağlı olduğunu göstermektedir. AKT sinyalizasyonu büyüme faktörlerinin varlığına göre düzenlenir. Bu bilgileri ve sonuçlarımızı göz önünde bulundurduğumuzda endometriyum lümen epitelinde embriyonik HBEGF büyüme faktörünün, lümen epitelindeki AKT ve pAKT ekspresyonlarını düzenleyebileceğini düşündürmüştür. Diğer yandan AKT ve pAKT ekspresyonu, HBEGF Bead-Wortmannin grubunda HBEGF Bead-PBS grubuna göre anlamlı olarak yüksektir. Wortmannin bir PI3K inhibitörüdür ve AKT'nin aktivasyonunu PI3K yoluyla inhibe ettiği bilinmektedir (Liu Y. ve ark., 2005). Diğer yandan literatürde Wortmannin PI3K inhibisyonunun AKT ve pAKT ekspresyonunu arttırdığını gösteren farklı çalışmalarda vardır (Teranishi ve ark., 2009; Abliz ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda da ortamdaki HBEGF büyüme faktörünün varlığı, PI3K'dan bağımsız olarak, doğrudan AKT ve pAKT ekspresyonunun artışına ve birikimine neden olmuştur.

Tüm bunlara ek olarak; BSA Bead-PBS, BSA Bead-Wortmannin, HBEGF Bead-PBS ve HBEGF Bead-Wortmannin gruplarına ait uterus kesitlerinde lümen açıklığı ölçümü analizlerini değerlendirdiğimizde HBEGF Bead-PBS grubunda lümenal kapanmanın en diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek olduğunu gördük. Lümenal kapanma; gebeliğin ilk günlerinden itibaren başlayan ve giderek artan stromal ödemin fizyolojik ve mekanik bir sonucudur. Bu endometriyal morfolodinamik sürecin gerçekleşmesi sonucunda bir yandan uterus lümeni daralır ve diğer yandan da embriyonun yuvalanacağı kript formasyonu gerçekleşerek, embriyo trofektodermi ile kript lümen epitelinin karşı karşıya gelmesi için önemlidir (Yuan ve ark., 2016). Literatürde lümenal kapanma ve kript formasyonuna ilişkin yapılan bir çalışmada doğru kript formasyonu için lümen epitelinde Celsr1, Vangl, Scribble ve Dvl gibi moleküllerin yer aldığı düzlemsel hücre polarite sinyali (PCP, Planar cell polarity signaling) ve stromada ise Wnt5a-ROR sinyalinin doğru gerçekleşmesi gerektiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca kript formasyonu için epitelin yanı sıra subepitelyal stroma ile doğru sinyalizasyon gerektiğini savunmuşlardır (Yuan ve ark., 2016). Kendi bulgularımızda HBEGF kaplı boncukların transfer edildiği grupta lümenal kapanma ve kript formasyonu gerçekleşirken, HBEGF kaplı boncukların Wortmannin PI3K inhibitörü ile gönderilen grupta implantasyon reaksiyonu gerçekleşse de kript formasyonu ve lümenal kapanma tam anlamıyla gerçekleşmediğini gözlemledik. Bu

sonuçlarımıza ve literatür bilgisine dayanarak embriyonik HBEGF sinyali implantasyon reaksiyonu için yeterli olsa da PI3K sinyalizasyonu doğru bir şekilde çalışmadığında lümenal kapanma ve kript formasyonu gerçekleşmemektedir.

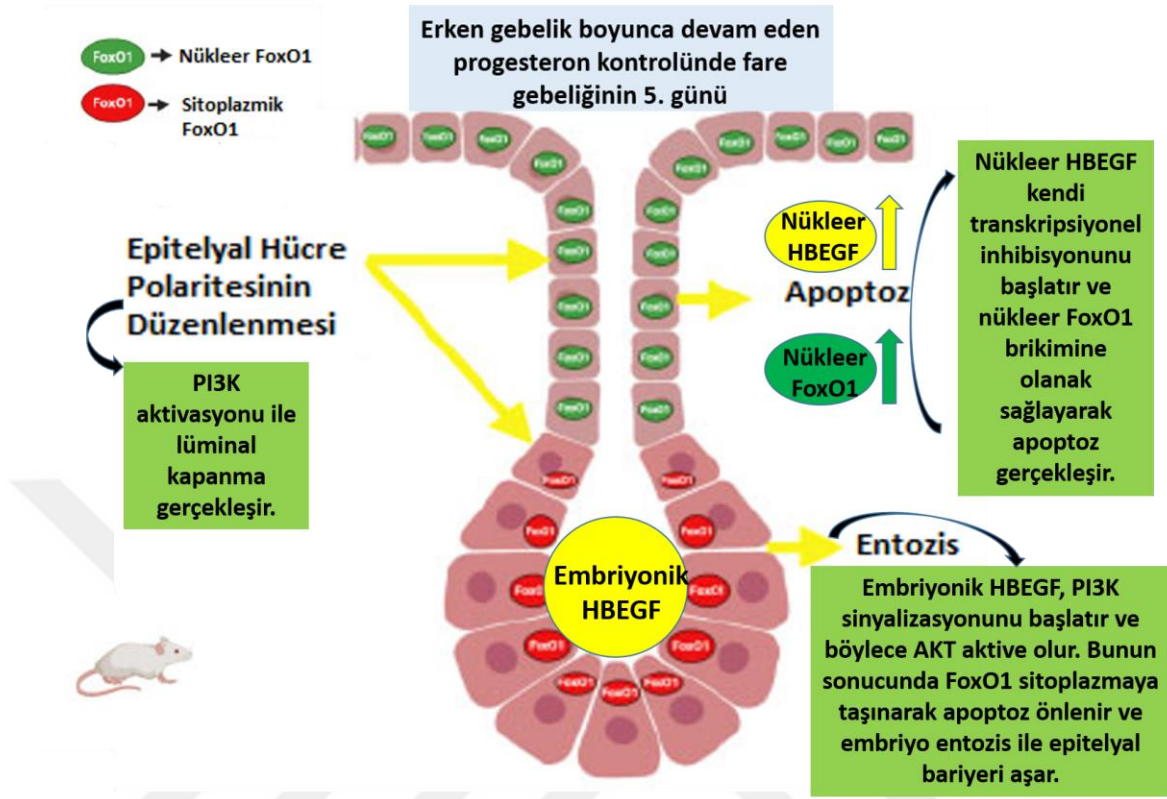
Literatürde FoxO1, AKT ve HBEGF ilişkisini gösteren bir çalışmada; egzersizin, iskelet kasında HBEGF'yi upregüle ederek AKT fosforilasyonu sağladığı ve AKT'nin bu kinaz aktivasyonu FoxO1'in inhibisyonunu sağladığı ortaya konmuştur (Fukatsu ve ark., 2009). Yaptığımız çalışmayı değerlendirdiğimizde bu literatür bilgisiyle, HBEGF, AKT, p-AKT ve FoxO1'in lümen epitelindeki birlikte olan iletişimleri benzerlik göstermektedir. Sonuç olarak bu çalışmada embriyonun endometriyal lümen epiteli bariyerini aşma sürecinde gerçekleşen olayları ve sinyalizasyonu sırasıyla özetleyecek olursak;

1) Embriyonik HBEGF kript epitelinde PI3K sinyalizasyonunu kullanarak AKT/pAKT aktivasyonunu sağlar ve FoxO1'i kript epitelinde downregüle ederek sitoplazmaya çıkarır. Dolayısıyla FoxO1 sitoplazmaya çıkarak kript epitelinde apoptoz önlenmiş olur ve embriyo entozis ile nonapoptotik bir sinyalizasyonla epitelyal bariyeri aşar(Li ve ark., 2015).

2) Embriyo epitelyal bariyeri aşmasını takiben kript epitelinde kendi transkripsiyonunu baskılamak için nükleer HBEGF artar ve beraberinde kript epitelinde FoxO1 birikimi başlar.

3) Diğer yandan bu süre zarfında kript dışındaki lümen epitelinde de nükleer HBEGF kendi transkripsiyonunu hızla downregüle ederken, FoxO1'in nükleer birikmesine neden olur ve sonuç olarak hem kript epiteli hem de lümen epiteli apoptoza uğrar şeklindedir.

Bu çalışma ile ortaya koyduğumuz embriyo-kript epiteli sinyalizasyonu ile daha önce yayınladığımız derlemede araştırılması gerektiğini ileri sürdüğümüz sorular aydınlatılmış oldu. Aydınlattığımız bu moleküler mekanizma aşağıdaki figürde özetlenmiştir (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. HBEGF, AKT, p-AKT ve FoxO1'in embriyonun reseptif endometriyuma tutunmasında ve kript epiteline yerleşmesinde birlikte rol oynarlar.

Embriyo maternal endometriyuma implante olurken maternal immünite gibi embriyo implantasyonunu olumsuz etkileyecek bütün sinyallerden kaçmaktadır. FoxO1'in büyüme faktörleri yokluğunda apoptozu indüklediğini düşündüğümüzde embriyonun HBEGF sinyalizasyonu kript epiteline adezyonu sağlamanın yanı sıra, büyüme sinyalleri göndererek iki yönlü bir şekilde kript epiteline de HBEGF ekspresyonunu artırıp büyüme sinyalinin upregülasyonunu sağlaması apoptoz gibi olası olumsuz sinyalleri downregüle etmesine ve böylelikle embriyonun stratejik olarak hayatta kalmasını sağladığını düşündürmektedir. Bu çalışmada literatürde ilk olarak implantasyonundaki embriyonun maternal endometriyuma ilk ve direk temastaki iletişim moleküllerinden literatürde bilinen HBEGF'ye ek olarak AKT, pAKT ve FoxO1 moleküllerinin rolü olduğunu ve birlikte olan sinyalizasyonlarını tanımladık.

İnsan ve fare özellikle embriyo implantasyon sürecinde morfodinamik olarak farklılıklar gösterse de moleküler iletişim yönünden çok fazla benzerlik göstermektedir (Maurya ve

ark., 2021). FoxO1 ve HBEGF insan endometriyum lümen epitelinde reseptif endometriyumdaki ekspresyonları ortaya konmuştur (Chobotova ve ark., 2002; Vasquez ve ark., 2018). Ayrıca kript formasyonu gibi uterus lümen epitelinin morfokinetik hareketine benzer epitelyal ondulasyon hareketlerinin insan endometriyumunda da varlığı ileri sürülmektedir (Hertig ve ark., 1956; Yuan ve ark., 2016). Bu nedenle lümen epitelinde özellikle de embriyonun direk temasta olduğu kriptle ekspre olan molekülller, implantasyon anında embriyo ve maternal iletişimin en önemli araçlarındandır. FoxO1'in farelerde endometriyum epitelinde koşullu delesyonu sonucu normal gebelikteki gibi desidualizasyon devam ederken blastosistin epitelyal bariyeri aşamadığı için lümen içerisinde absorbe olduğu ortaya konmuştur (Vasquez ve ark., 2018). Günümüzde tekrarlayan gebelik kayıplarının nedenleri arasında % 2-5 genetik, %10-15 anatomik, otoimmünite %15-20, enfeksiyon %0,5-5 ve %15-20 hormonal nedenler gösterilirken % 40-50'si ise açıklanamayan nedenler olarak belirtilmektedir. Bunlar göz önüne alındığında embriyonun epitelyal bariyeri aşamaması durumu insanda açıklanamayan gebelik kayıplarının sebepleri ile ilişkili olabilir. Bu nedenle embriyonun maternal endometriyuma implantasyonu sürecinde epitel bariyeri doğru bir şekilde aşmasına ilişki moleküler sinyalizasyonların aydınlatılması klinikte açıklanamayan infertilite tedavilerine ilişkin yeni bir yol haritası oluşturabilir.

Sağlıklı bir gebelik için sağlıklı bir endometriyum gereklidir. Ancak uterus üreme sağlığının yanı sıra hormonal kontrolü de ele alan, hatta olumsuz koşullarda endometriyal hastalıklara sebep olabilmektedir. Klinikte endometriozisli hastalarda yapılan bir çalışmada PI3K/AKT sinyalizasyonunun endometriozisli endometriyumda kontrol endometriyuma göre değiştiğini ve pAKT ekspresyonunun anlamlı bir şekilde arttığı ortaya konmuştur. Ayrıca bu sinyal değişiminin ve pAKT ekspresyon şiddetinin endometriozis evreleri ile doğru orantılı olduğu gözlemlenmiştir (Madanes ve ark., 2020). Benzer şekilde başka bir çalışmada endometriyal intraepitelyal neoplazi hastalarında ise FOXO1 ekspresyon yokluğu ve pAKT protein ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığını pAKT ve FOXO1 moleküllerinin endometriyal neoplazide tanı için bir biyobelirteç olabileceği ileri sürülmüştür (Strickland ve ark., 2019). Bu nedenle araştırdığımız bu moleküller sağlıklı bir gebeliğin yanı sıra sağlıklı bir endometriyal homeostaz için de önemli görünmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada; HBEGF, AKT, pAKT ve FoxO1'in embriyonun epitelyal bariyeri aştığı zaman dilimini içeren G4 gece (23:00), G5 sabah (09:00), G5 gece (23:00), G6 sabah (09:00) günleri ve boncuk (bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde uterus endometriyumunda HBEGF, AKT, p-AKT, FoxO1 ve ekspresyonları immünfloresan yöntemi ile araştırılmış ve ImageJ analizleri ile istetikselsel olarak değerlendirilmiştir. Buna ek olarak boncuk (bead) transfer edilen cerrahi fare modellerine ait uterus kesitlerinde hematomksilen-eozin boyaması sonrasında lümen açıklığı ölçülerek analiz edilmiş ve istetikselsel olarak değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre sonuçlar maddeler halinde özetlenmiştir.

- 1) Embriyonun epitelyal bariyeri aştığı zaman dilimini içeren G4 gece (23:00), G5 sabah (09:00), G5 gece (23:00), G6 sabah (09:00) günlerinde kript epitelindeki HBEGF, AKT, pAKT ve FoxO1 ekspresyonları *in vivo* olarak literatürde ilk kez ölçülerek değerlendirilmiştir.
- 2) Boncuk (bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde uterus endometriyumunda HBEGF, AKT, p-AKT ve FoxO1 ve ekspresyonları lümen epiteli ve kript epitelinde değerlendirilerek birbirleriyle olan moleküler etkileşimleri ve embriyonun epitelyal bariyeri aşma sürecindeki rolleri ortaya konmuştur.
- 3) Bulgularımız HBEGF, AKT, p-AKT ve FoxO1'in literatürde çalışılan diğer doku ve organlardaki moleküler etkileşimleriyle paralellik göstermekte olup embriyonun implantasyonu sürecinde bu moleküllerin birlikte sinyalizasyonu ilk kez ortaya konmuştur.
- 4) Boncuk (bead) transfer edilen cerrahi fare modellerinde bu moleküllerin yapay olarak embriyonik HBEGF varlığında ve yokluğunda, diğer yandan PI3K inhibisyonunda HBEGF, AKT, p-AKT ve FoxO1 moleküllerinin göstermiş olduğu ekspresyon değişimi başlangıçtaki hipotezimizi doğrulamaktadır.

- 5) Çalışmamızın bulguları, implantasyon sürecinde embriyodan gelen HBEGF büyüme sinyali ile kript epitelinde PI3K sinyalizasyonu başlatıldığını ve AKT/pAKT aktivasyonunu sağlanarak FoxO1'i kript epitelinde downregüle olduğunu ve embriyonun bu hayatta kalma stratejisi sayesinde entozis ile nonapoptotik bir şekilde epitelyal bariyeri aştığını düşündürmüştür ve bu konuya ilişkin ileri çalışmalar için fonksiyonel bir çalışma niteliği taşımaktadır.
- 6) Bu çalışma, embriyonun maternal endometriyuma implantasyonu sürecinde epitel bariyeri doğru bir şekilde aşmasına ilişkin moleküler sinyalizasyonların aydınlatılmasına katkıda bulunmuş olup, klinikte açıklanamayan infertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları ve implantasyon bozuklukları mekanizmalarına atıfta bulunabilecek yeni projelerin üretilmesine ve ayrıca hem endometriyal kaynaklı infertilite için hemde endometriyal hastalıklar için terapötik hedef molekül geliştirilmesine temel oluşturmuştur.

KAYNAKLAR

- Abliz A, Deng W, Sun R, Guo W, Zhao L, Wang W. Wortmannin, pi3k/akt signaling pathway inhibitor, attenuates thyroid injury associated with severe acute pancreatitis in rats. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015; 8: 13821-13833.
- Adiguzel D, Celik-Ozenci C. Foxo1 is a cell-specific core transcription factor for endometrial remodeling and homeostasis during menstrual cycle and early pregnancy. *Human reproduction update*. 2021; 27: 570-583.
- Adiguzel D, Sahin P, Kuscü N, Ozkavukcu S, Bektas NI, Celik-Ozenci C. Spatiotemporal expression and regulation of foxo1 in mouse uterus during peri-implantation period. *PloS one*. 2019; 14: e0216814.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB , ve ark. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase balpha. *Current biology : CB*. 1997; 7: 261-269.
- Barresi SFGvMJF. The biochemistry of oocyte maturation. *Developmental biology*. 2016.
- Beer AE, Billingham RE. Immunoregulatory aspects of pregnancy. *Federation proceedings*. 1978; 37: 2374-2378.
- Bermejo-Alvarez P, Park KE, Telugu BP. Utero-tubal embryo transfer and vasectomy in the mouse model. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014: e51214.
- Biggs WH, 3rd, Cavenee WK, Arden KC. Identification and characterization of members of the fkhrl1 (fox o) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 2001; 12: 416-425.
- Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES , ve ark. Uterine selection of human embryos at implantation. *Scientific reports*. 2014; 4: 3894.
- Brown AK, Webb AE. Regulation of foxo factors in mammalian cells. *Current topics in developmental biology*. 2018; 127: 165-192.
- Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM. Inhibition of nuclear import by protein kinase b (akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor fkhrl1. *Molecular and cellular biology*. 2001; 21: 3534-3546.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS , ve ark. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*. 1999; 96: 857-868.
- Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME. Protein kinase sgk mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor fkhrl1 (foxo3a). *Molecular and cellular biology*. 2001; 21: 952-965.
- Buzzio OL, Lu Z, Miller CD, Unterman TG, Kim JJ. Foxo1a differentially regulates genes of decidualization. *Endocrinology*. 2006; 147: 3870-3876.
- Cao D, Liang J, Feng F, Shi S, Tan Q, Wang Z. Mir-183 impeded embryo implantation by regulating hbegf and lamc1 in mouse uterus. *Theriogenology*. 2020; 158: 218-226.

- Carter ME, Brunet A. Foxo transcription factors. *Current biology : CB*. 2007; 17: R113-114.
- Cha J, Dey SK. Cadence of procreation: Orchestrating embryo-uterine interactions. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014; 34: 56-64.
- Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nature medicine*. 2012; 18: 1754-1767.
- Chobotova K, Spyropoulou I, Carver J, Manek S, Heath JK, Gullick WJ , ve ark. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor erbb4 mediate implantation of the human blastocyst. *Mechanisms of development*. 2002; 119: 137-144.
- Christian M, Zhang X, Schneider-Merck T, Unterman TG, Gellersen B, White JO , ve ark. Cyclic amp-induced forkhead transcription factor, fkhr, cooperates with ccaat/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277: 20825-20832.
- Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. Co-crystal structure of the hnf-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone h5. *Nature*. 1993; 364: 412-420.
- Cockburn K, Rossant J. Making the blastocyst: Lessons from the mouse. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120: 995-1003.
- Croy A. *The guide to investigation of mouse pregnancy*. Elsevier. 2014.
- Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M , ve ark. Heparin-binding egf-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: A possible ligand for interaction with blastocyst egf-receptor in implantation. *Development*. 1994; 120: 1071-1083.
- Del Angel-Mosqueda C, Gutierrez-Puente Y, Lopez-Lozano AP, Romero-Zavaleta RE, Mendiola-Jimenez A, Medina-De la Garza CE , ve ark. Epidermal growth factor enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. *Head & face medicine*. 2015; 11: 29.
- Dickson AD. Trophoblastic giant cell transformation of mouse blastocysts. *Journal of reproduction and fertility*. 1963; 6: 465-466.
- DZ. S. Ergot alkaloidleri ve yarı sentetik türevlerinin uterus üzerindeki etki mekanizmaları tıpta uzmanlık tezi. Kayseri. 2005.
- Elenius K, Paul S, Allison G, Sun J, Klagsbrun M. Activation of her4 by heparin-binding egf-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *The EMBO journal*. 1997; 16: 1268-1278.
- Enders AC, Schlafke S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am J Anat*. 1969; 125: 1-29.
- Enders A CaSS. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am J Anat*. 1969.
- Farhan M, Wang H, Gaur U, Little PJ, Xu J, Zheng W. Foxo signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *International journal of biological sciences*. 2017; 13: 815-827.
- Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR. Trophoblast invasion: The role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (stat3). *Human reproduction update*. 2008; 14: 335-344.
- Fukatsu Y, Noguchi T, Hosooka T, Ogura T, Kotani K, Abe T , ve ark. Muscle-specific overexpression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor increases peripheral glucose disposal and insulin sensitivity. *Endocrinology*. 2009; 150: 2683-2691.

- Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, 3rd, Emanuel BS , ve ark. Fusion of a fork head domain gene to pax3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature genetics*. 1993; 5: 230-235.
- Gan L, Zheng W, Chabot JG, Unterman TG, Quirion R. Nuclear/cytoplasmic shuttling of the transcription factor foxo1 is regulated by neurotrophic factors. *Journal of neurochemistry*. 2005; 93: 1209-1219.
- Gardner RL. Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1982; 68: 175-198.
- Gellersen B, Brosens J. Cyclic amp and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: A decidualizing affair. *The Journal of endocrinology*. 2003; 178: 357-372.
- Gilley J, Coffey PJ, Ham J. Foxo transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *The Journal of cell biology*. 2003; 162: 613-622.
- Gray H. *Anatomy of the human body*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1918.
- Greer EL, Brunet A. Foxo transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 2005; 24: 7410-7425.
- Grinius L, Kessler C, Schroeder J, Handwerker S. Forkhead transcription factor foxo1a is critical for induction of human decidualization. *The Journal of endocrinology*. 2006; 189: 179-187.
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: Endocrine and paracrine interactions. *Seminars in reproductive medicine*. 2009; 27: 62-79.
- Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS , ve ark. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101: 10326-10331.
- Hemmings BA, Restuccia DF. Pi3k-pkb/akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012; 4: a011189.
- Herschman HR, Lusis AJ, Groopman JE. Growth factors. *Annals of internal medicine*. 1980; 92: 650-662.
- Hertig AT, Rock J, Adams EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat*. 1956; 98: 435-493.
- Hieda M, Isokane M, Koizumi M, Higashi C, Tachibana T, Shudou M , ve ark. Membrane-anchored growth factor, hb-egf, on the cell surface targeted to the inner nuclear membrane. *The Journal of cell biology*. 2008; 180: 763-769.
- Hobbie KR, Dixon D. Evaluation of cystic endometrial hyperplasia and the normal estrous cycle in longitudinal sections of uterus from female harlan sprague-dawley rats. *Toxicologic pathology*. 2020; 48: 616-632.
- <http://www.niehs.nih.gov/research/resources/visual-guides/guides/female-repro/index.cfm>.
- <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/implant.html>.
- <https://www.studyblue.com/notes/note/n/female-reproductive-tract/deck/6382603>.
- Huang H, Regan KM, Lou Z, Chen J, Tindall DJ. Cdk2-dependent phosphorylation of foxo1 as an apoptotic response to DNA damage. *Science*. 2006; 314: 294-297.

- Huang H, Tindall DJ. Dynamic foxo transcription factors. *Journal of cell science*. 2007; 120: 2479-2487.
- Huang JC, Duan CC, Jin S, Sheng CB, Wang YS, Yue ZP , ve ark. Hb-egf induces mitochondrial dysfunction via estrogen hypersecretion in granulosa cells dependent on camp-pka-jnk/erk-ca(2+)-foxo1 pathway. *International journal of biological sciences*. 2022; 18: 2047-2059.
- Jin K, Mao XO, Sun Y, Xie L, Jin L, Nishi E , ve ark. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: Hypoxia-inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002; 22: 5365-5373.
- JUNQUEIRA LC. Temel histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri. 2006.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & development*. 2000; 14: 142-146.
- Kajihara T, Brosens JJ, Ishihara O. The role of foxo1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Medical molecular morphology*. 2013; 46: 61-68.
- Kim JJ, Buzzio OL, Li S, Lu Z. Role of foxo1a in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: Interaction with progesterone receptor. *Biology of reproduction*. 2005; 73: 833-839.
- Kim JJ, Fazleabas AT. Uterine receptivity and implantation: The regulation and action of insulin-like growth factor binding protein-1 (igfbp-1), hoxa10 and forkhead transcription factor-1 (foxo-1) in the baboon endometrium. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2004; 2: 34.
- Kim JJ, Taylor HS, Akbas GE, Foucher I, Trembleau A, Jaffe RC , ve ark. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 promoter activity by fkhr and hoxa10 in primate endometrial cells. *Biology of reproduction*. 2003; 68: 24-30.
- Labied S, Kajihara T, Madureira PA, Fusi L, Jones MC, Higham JM , ve ark. Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor foxo1 in differentiating human endometrium. *Molecular endocrinology*. 2006; 20: 35-44.
- Lam EW, Brosens JJ, Gomes AR, Koo CY. Forkhead box proteins: Tuning forks for transcriptional harmony. *Nature reviews. Cancer*. 2013; 13: 482-495.
- Langman ST. *Medical Embryology*. 1993.
- Li Y, Sun X, Dey SK. Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation. *Cell reports*. 2015; 11: 358-365.
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM , ve ark. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 1997; 91: 197-208.
- Lim HJ, Dey SK. Hb-egf: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Experimental cell research*. 2009; 315: 619-626.
- Link W. Introduction to foxo biology. *Methods in molecular biology*. 2019; 1890: 1-9.
- Liu J, Gao F, Liu YF, Dou HT, Yan JQ, Fan ZM , ve ark. Hb-egf regulates prss56 expression during mouse decidualization via egfr/erk/egr2 signaling pathway. *The Journal of endocrinology*. 2017; 234: 247-254.
- Liu L, Wang Y, Yu Q. The pi3k/akt signaling pathway exerts effects on the implantation of mouse embryos by regulating the expression of rhoa. *International journal of molecular medicine*. 2014; 33: 1089-1096.

- Liu N, Zhou C, Chen Y, Zhao J. The involvement of osteopontin and beta3 integrin in implantation and endometrial receptivity in an early mouse pregnancy model. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2013; 170: 171-176.
- Liu Y, Shreder KR, Gai W, Corral S, Ferris DK, Rosenblum JS. Wortmannin, a widely used phosphoinositide 3-kinase inhibitor, also potently inhibits mammalian polo-like kinase. *Chemistry & biology*. 2005; 12: 99-107.
- Lu J, Huang J, Zhao S, Xu W, Chen Y, Li Y , ve ark. Foxo1 is a critical switch molecule for autophagy and apoptosis of sow endometrial epithelial cells caused by oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021; 2021: 1172273.
- Madanes D, Bilotas MA, Baston JJ, Singla JJ, Meresman GF, Baranao RI , ve ark. Pi3k/akt pathway is altered in the endometriosis patient's endometrium and presents differences according to severity stage. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2020; 36: 436-440.
- Magnuson T EC. The mammalian preimplantation embryo: Regulation of growth and differentiation. New York: Plenum. 1987.
- Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. The "o" class: Crafting clinical care with foxo transcription factors. *Advances in experimental medicine and biology*. 2009; 665: 242-260.
- Mara H. Rendi RLG, Kelly L. Boyd Female reproductive system, in comparative anatomy and histology. 2012.
- Maurya VK, DeMayo FJ, Lydon JP. Illuminating the "black box" of progesterone-dependent embryo implantation using engineered mice. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021; 9: 640907.
- Maybin JA, Critchley HO. Steroid regulation of menstrual bleeding and endometrial repair. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2012; 13: 253-263.
- McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012: e4389.
- Megan Keniry LM. Distinctive roles for the foxo1 transcription factor in immunological development, homeostasis and malignancy. *Journal of Clinical Immunology & Immunotherapy*. 2014.
- Mirdamadi Y, Thielitz A, Wiede A, Goihl A, Papakonstantinou E, Hartig R , ve ark. Insulin and insulin-like growth factor-1 can modulate the phosphoinositide-3-kinase/akt/foxo1 pathway in sz95 sebocytes in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015; 415: 32-44.
- Mizutani S. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2019.
- Moll L, Schubert M. The role of insulin and insulin-like growth factor-1/foxo-mediated transcription for the pathogenesis of obesity-associated dementia. *Current gerontology and geriatrics research*. 2012; 2012: 384094.
- Moore KL PT. Klinik yönleri ile İnsan embriyolojisi. Nobel Matbaacılık. 2002.
- Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ, 2nd. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (f2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89: 10721-10725.

- Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Developmental cell*. 2003; 4: 119-129.
- Nanba D, Higashiyama S. Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding egf-like growth factor. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004; 15: 13-19.
- Nanba D, Inoue H, Shigemi Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. An intermediary role of prohb-egf shedding in growth factor-induced c-myc gene expression. *Journal of cellular physiology*. 2008; 214: 465-473.
- O'Neill BT, Lee KY, Klaus K, Softic S, Krumpoch MT, Fentz J , ve ark. Insulin and igf-1 receptors regulate foxo-mediated signaling in muscle proteostasis. *The Journal of clinical investigation*. 2016; 126: 3433-3446.
- Obsil T, Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of foxo transcription factors. *Oncogene*. 2008; 27: 2263-2275.
- Obsil T, Obsilova V. Structural basis for DNA recognition by foxo proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813: 1946-1953.
- P.Grasso. 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. 1998.
- Pan-Castillo B, Gazze SA, Thomas S, Lucas C, Margarit L, Gonzalez D , ve ark. Morphophysical dynamics of human endometrial cells during decidualization. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2018; 14: 2235-2245.
- Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Dey SK , ve ark. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 1047-1052.
- Prince RN, Schreiter ER, Zou P, Wiley HS, Ting AY, Lee RT , ve ark. The heparin-binding domain of hb-egf mediates localization to sites of cell-cell contact and prevents hb-egf proteolytic release. *Journal of cell science*. 2010; 123: 2308-2318.
- Psychoyos A. Endocrine control of egg implantation. 1973.
- R. B. Beitrage zur embryologie der wiederkauer, gewonnen am schafei. *Arc Anat Physiol*. 1884.
- Raab G, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzell RM, Klagsbrun M. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding egf-like growth factor. *Development*. 1996; 122: 637-645.
- Ratajczak CK. Preventing preterm bir eterm birth: The past limitations and new potential of th: The past limitations and new potential of animal models. Washington University School of Medicine in St. Louis 2010.
- Riley JK, Carayannopoulos MO, Wyman AH, Chi M, Ratajczak CK, Moley KH. The pi3k/akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Developmental biology*. 2005; 284: 377-386.
- Rossant J CJ. Extraembryonic lineages, in mouse development; patterning, morphogenesis and organogenesis. San Diego: Academic. 2002.
- Salamonsen LA, Hutchison JC, Gargett CE. Cyclical endometrial repair and regeneration. *Development*. 2021; 148.

- Salih DA, Brunet A. Foxo transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Current opinion in cell biology*. 2008; 20: 126-136.
- Saline M, Badertscher L, Wolter M, Lau R, Gunnarsson A, Jacso T , ve ark. Ampk and akt protein kinases hierarchically phosphorylate the n-terminus of the foxo1 transcription factor, modulating interactions with 14-3-3 proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2019; 294: 13106-13116.
- Sedding DG. Foxo transcription factors in oxidative stress response and ageing--a new fork on the way to longevity? *Biological chemistry*. 2008; 389: 279-283.
- Skarra DV, Thackray VG. Foxo1 is regulated by insulin and igf1 in pituitary gonadotropes. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015; 405: 14-24.
- Snell GD SL. Early embryology, in biology of the laboratory mouse. New York: McGraw-Hill. 1996.
- Soares MJ HJ. Methods in molecular medicine placenta and trophoblast methods and protocols. Totowa, New Jersey, Humana Press. 2006.
- Stewart CL, Cullinan EB. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Developmental genetics*. 1997; 21: 91-101.
- Stone WL, Leavitt L, Varacallo M. Physiology, growth factor. In Statpearls. Treasure Island (FL); 2022.
- Strickland AL, Rivera G, Lucas E, John G, Cuevas I, Castrillon DH. Pi3k pathway effectors pakt and foxo1 as novel markers of endometrioid intraepithelial neoplasia. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2019; 38: 503-513.
- Tan Y, Li M, Cox S, Davis MK, Tawfik O, Paria BC , ve ark. Hb-egf directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin d3 during implantation. *Developmental biology*. 2004; 265: 181-195.
- Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, Macklon NS, Brosens JJ. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: Impaired natural embryo selection. *Molecular human reproduction*. 2010; 16: 886-895.
- Teranishi F, Takahashi N, Gao N, Akamo Y, Takeyama H, Manabe T , ve ark. Phosphoinositide 3-kinase inhibitor (wortmannin) inhibits pancreatic cancer cell motility and migration induced by hyaluronan in vitro and peritoneal metastasis in vivo. *Cancer science*. 2009; 100: 770-777.
- Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. Foxo transcription factors; regulation by akt and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813: 1938-1945.
- Vasquez YM, Wang X, Wetendorf M, Franco HL, Mo Q, Wang T , ve ark. Foxo1 regulates uterine epithelial integrity and progesterone receptor expression critical for embryo implantation. *PLoS genetics*. 2018; 14: e1007787.
- Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nature reviews. Genetics*. 2006; 7: 185-199.
- Wang H, Shi G, Li M, Fan H, Ma H, Sheng L. Correlation of il-1 and hb-egf with endometrial receptivity. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018; 16: 5130-5136.
- Wang X, Wang H, Matsumoto H, Roy SK, Das SK, Paria BC. Dual source and target of heparin-binding egf-like growth factor during the onset of implantation in the hamster. *Development*. 2002; 129: 4125-4134.
- Wang Y, Zhou Y, Graves DT. Foxo transcription factors: Their clinical significance and regulation. *BioMed research international*. 2014; 2014: 925350.

- Wang Z, Yu T, Huang P. Post-translational modifications of foxo family proteins (review). *Molecular medicine reports*. 2016; 14: 4931-4941.
- Weimar CH, Kavelaars A, Brosens JJ, Gellersen B, de Vreeden-Elbertse JM, Heijnen CJ , ve ark. Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high- and low-quality human embryos. *PloS one*. 2012; 7: e41424.
- www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame1.shtml.
- Xie H, Wang H, Tranguch S, Iwamoto R, Mekada E, Demayo FJ , ve ark. Maternal heparin-binding-egf deficiency limits pregnancy success in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104: 18315-18320.
- Yang Y, Blee AM, Wang D, An J, Pan Y, Yan Y , ve ark. Loss of foxo1 cooperates with tmprss2-erg overexpression to promote prostate tumorigenesis and cell invasion. *Cancer research*. 2017; 77: 6524-6537.
- Yoshinaga K. TM. Development of preimplantation mammalian embryos and their environment. *Satellite symposium of the 8th International Congress of Endocrinology*. 1988.
- Yuan J, Cha J, Deng W, Bartos A, Sun X, Ho HH , ve ark. Planar cell polarity signaling in the uterus directs appropriate positioning of the crypt for embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113: E8079-E8088.
- Zehra Dilşad Çoban ŞG, Ertan Altaylı, Hakan Kayır, Barış Baykal. Farede östrus siklusu tayininde hızlı, kolay ve etkin bir yöntem. *Gülhane Tıp Derg*. 2016.
- Zenclussen ML, Casalis PA, Jensen F, Woidacki K, Zenclussen AC. Hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate heme oxygenase-1 expression in the uterus. *Frontiers in endocrinology*. 2014; 5: 32.
- Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H , ve ark. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular aspects of medicine*. 2013; 34: 939-980.
- Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, foxo and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813: 1978-1986.