

Cemre Nur BALCI

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

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

**PERİ-İMLANTİF DÖNEM FARE UTERUSUNDA
İNFLAMASYON İLİŞKİLİ PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ
PİROPTOZUN ARAŞTIRILMASI**

Cemre Nur BALCI

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

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

PERİ-İMLANTİF DÖNEM FARE UTERUSUNDA
İNFLAMASYON İLİŞKİLİ PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ
PİROPTOZUN ARAŞTIRILMASI

Cemre Nur BALCI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuray ACAR AYDEMİR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-5725 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

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

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nuray ACAR AYDEMİR
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. İbrahim İnanç MENDİLCİOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Aysel KÜKNER
Yakın Doğu 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.

Cemre Nur BALCI

İmza

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nuray ACAR AYDEMİR

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile tez sürecime yön veren ve gerçekleştirilmesini sağlayan, akademik hayatımda yoluma ışık tutan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nuray ACAR AYDEMİR'e,

Doktora eğitimimde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine ve manevi desteklerini esirgemeyen asistan arkadaşlarıma,

Güler yüzleri ile desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli tüm çalışanlarına,

Doktora eğitimime başladığım ilk günden beri yanımda olan, tüm süreçlerime tanıklık eden ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ekip arkadaşım Ezgi GOLAL'a,

Bu uzun ve meşakkatli akademik yolumda her zaman beni motive eden, destekleyen ve sonsuz inanan sevgili müstakbel eşim Caner GENÇ ve değerli ailesine,

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi her konuda beni destekleyen, yaptığım seçimlerde her zaman arkamda duran, bana inanan sevgili annem Sevda BALCI, canım babam Mustafa BALCI ve canım kardeşim Buğra BALCI'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Başarılı bir gebelik için implantasyon, desidualizasyon ve plasantasyonun sağlıklı şekilde gerçekleşmesi gerekir. Ayrıca trofoblast invazyonu, doku ve vasküler yeniden yapılanma gibi süreçlerde inflamatuvar yanıtın dengesi önemlidir. İnflamasyon ilişkili programlı hücre ölümü piroptozun gerçekleşmesinde NLRP3 inflamazom yolağı görev almaktadır. Çalışmamızda piroptozun farelerde peri-implantif dönemde rol alıp almadığını belirlemek için gebeliğin farklı günlerindeki farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinde NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18'in lokalizasyon ve ekspresyonlarını incelemeyi amaçladık.

Yöntem: Farelere ait östrus fazı uteruslar ile gebeliğin 1., 4., 5., 6. ve 8. günlerine ait uterus ve implantasyon bölgeleri elde edildi. Piroptozda rol alan NLRP3 inflamazom yolağı üyeleri NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 proteinlerinin lokalizasyon ve ekspresyonları immünohistokimya ve Western blot ile belirlendi.

Bulgular: Farelerde gebeliğin 5.gününde blastosistin tutunduğu lümen epitelinin hemen altındaki subepitelyal stroma hücrelerinde NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D ve IL-18 ekspresyonları gözlenmiştir. Gebeliğin erken evrelerinde uterus lümen ve bez epiteli proliferasyonu sırasında NLRP3'ün yoğun şekilde ekspre edildiği gözlenmiştir. Ayrıca sekonder desidual bölgeyi oluşturacak stromal hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması yani desidualizasyonu boyunca NLRP3 inflamazom yolağı üyelerinin ekspre edildiği gözlenmiştir. IL-1 β ve IL-18'in primer desidual bölgeye kıyasla sekonder desidual bölgede daha yoğun bir şekilde ekspre olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin ilerleyip plasantasyonun başlamasıyla birlikte sekonder desidual bölgede NLRP3 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir.

Sonuç: Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, inflamasyon ilişkili programlı hücre ölümü piroptoz ve NLRP3 inflamazom yolağının embriyo implantasyonu ve desidualizasyonda rol alabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: implantasyon, desidualizasyon, piroptoz, inflamazom, NLRP3

ABSTRACT

Objective: A successful pregnancy requires healthy implantation, decidualization and placentation. In addition, the balance of the inflammatory response is important for trophoblast invasion, tissue and vascular remodeling. The NLRP3 inflammasome pathway is involved in the inflammation related programmed cell death pyroptosis. In our study, we aimed to examine the localization and expression of NLRP3, Caspase-1, Gasdermin D, IL-1 β and IL-18 in the uterus and implantation sites to determine the role of pyroptosis in the peri-implantive period in mice.

Method: Uteri of estrous phase and uteri/implantation sites of 1st, 4th, 5th, 6th and 8th days of pregnancy from mice were obtained. The localization and expression of NLRP3, Caspase-1, Gasdermin D, IL-1 β and IL-18 proteins, members of the NLRP3 inflammasome pathway involved in pyroptosis, were determined by immunohistochemistry and Western blot.

Results: In mice, NLRP3, Caspase-1, Gasdermin D and IL-18 expressions were observed in the subepithelial stroma cells below the luminal epithelium where the blastocyst was attached on the 5th day of pregnancy. It was observed that NLRP3 was intensively expressed during the proliferation of uterine lumen and gland epithelium in the early stages of pregnancy. In addition, NLRP3 inflammasome pathway members were observed to be expressed during the proliferation and differentiation, decidualisation, of stromal cells that will form the secondary decidual zone. It was observed that IL-1 β and IL-18 were expressed more intensely in the secondary decidual zone compared to the primary decidual zone. It was observed that NLRP3 expression decreased in the secondary decidual zone with the progression of pregnancy and the onset of placentation.

Conclusion: In our study, our results suggest that inflammation-associated progressive cell death pyroptosis and the NLRP3 inflammasome pathway may play a role in embryo implantation and decidualization.

Key words: implantation, decidualization, pyroptosis, inflammasome, NLRP3

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dişi Genital Kanalların Embriyonik Gelişimi	3
2.1.1 Uterusun Embriyonik Gelişimi	3
2.2. İnsanda Uterus Histolojisi	4
2.3. Endometriyumda Menstrual Siklus Sırasında Gerçekleşen Fizyolojik Değişimler	6
2.3.1. Endometriyumun Proliferatif Fazı	7
2.3.2. Endometriyumun Sekretuar Fazı	8
2.4. Farelerde Dişi Genital Sistem Anatomisi	8
2.4.1. Ovaryum	9
2.4.2. Ovidakt	9
2.4.3. Uterus	9
2.4.4. Vajina ve Klitoris	9
2.5. Farelerde Uterus Histolojisi	10
2.6. Dişi Farede Üreme Fizyolojisi	11
	iii

2.7. İnsan ve Farede Pre-implantif Dönem Embriyo Gelişimi	13
2.8. İnsanda ve Farede Uterus Reseptivitesi	14
2.9. Embriyo İmplantasyonu	15
2.9.1. İmplantasyon Evreleri	16
2.9.2. İmplantasyon Tipleri	17
2.10. Peri-İmplantasyon Sürecinde Fare Endometriyumunda Gerçekleşen Hücresel Olaylar	18
2.11. Desidualizasyon	19
2.12. Gebelik Sırasında Gerçekleşen İmmün Yanıtlar ve Mikroçevre	20
2.13. İnflamasyon İlişkili Programlı Hücre Ölümü: Piroptoz	21
2.14. Piroptozun Morfolojik Özellikleri	22
2.15. Piroptozun Moleküler Mekanizmaları	24
2.15.1. Kanonikal İnflamazom Yolağı	25
2.15.2. Kanonikal Olmayan İnflamazom Yolağı	26
2.16. NLRP3 İnflamazom Yolağı	27
2.16.1. NLRP3	28
2.16.2. Kaspaz 1	30
2.16.3. Gasdermin D	32
2.16.4. İnterlökin 1 Beta	34
2.16.5. İnterlökin 18	36
2.17. Piroptoz ve Gebelik İle İlişkili Çalışmalar	36
2.18. Çalışmamızın Çıkış Noktası	40

3. GEREÇ ve YÖNTEM	42
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	42
3.2. Doku Takibi ve Parafin Blok Eldesi	49
3.3. İmmünohistokimya Yöntemi	49
3.3.1. İmmünohistokimya protokolü	51
3.4. İmmünohistokimyasal Image J Analizi	52
3.5. H-SCORE Analizi	53
3.6. Western Blot Yöntemi	53
3.6.1. Dokulardan Protein İzolasyonu ve Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	53
3.6.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Protokolü	55
3.6.3. Western Blot Bantlarının Kantitatif Değerlendirilmesi	59
3.7. İstatistiksel Analizler	60
4. BULGULAR	61
4.1. İmmünohistokimya Bulguları	61
4.1.1. NLRP3 İmmünohistokimyası Bulguları	61
4.1.2. Kaspaz-1 İmmünohistokimyası Bulguları	71
4.1.3. Gasdermin D İmmünohistokimyası Bulguları	82
4.1.4. IL-1 β İmmünohistokimyası Bulguları	93
4.1.5. IL-18 İmmünohistokimyası Bulguları	102
4.2. Western Blot Bulguları	112

4.2.1. NLRP3 Western Blot Analizi	112
4.2.2. Kaspaz-1 Western Blot Analizi	114
4.2.3. Gasdermin D Western Blot Analizi	116
4.2.4. IL-1 β Western Blot Analizi	118
4.2.5. IL-18 Western Blot Analizi	120
5. TARTIŞMA	123
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	137
KAYNAKLAR	139
ÖZGEÇMİŞ	154

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Östrus fazı ve peri-implantif dönem gebe fareler ile deney gruplarının oluşturulması	43
Tablo 3.2. İmmünohistokimya yönteminde kullanılan antikorlar ve dilüsyonları	52
Tablo 3.3. Western blot yöntemi sırasında kullanılan antikorlar ve dilüsyonları	59



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan dişi üreme sistemi ve uterus tabakaları	5
Şekil 2.2. İnsan endometriyumunda menstrual siklus ve hormonal düzenlenmesi	7
Şekil 2.3. Farelerde dişi genital sistem anatomisi.....	10
Şekil 2.4. Dişi farelerde östrus siklusu fazlarında görülen hücresel farklılıklar	13
Şekil 2.5. İnsan ve fare pre-implantif ve implantasyon süreci embriyo gelişimi	14
Şekil 2.6. İnsanlarda uterus reseptivitesi ve hormonal düzenlenmesi	15
Şekil 2.7. Farelerde uterus reseptivitesi ve hormonal düzenlenmesi	15
Şekil 2.8. Embriyo implantasyonu evreleri.....	16
Şekil 2.9. Embriyo implantasyonu tipleri	17
Şekil 2.10. Gebeliğin 1.-8. günlerinde fare uterusundaki morfolojik değişiklikler	19
Şekil 2.11. Apoptoz ve piroptoz arasındaki morfolojik farklar	24
Şekil 2.12. İnflamasyon ilişkili programlı hücre ölümü piroptozun moleküler mekanizmaları	25
Şekil 2.13. Kanonik ve kanonik olmayan inflamazom yolları.....	27
Şekil 2.14. NLRP3 inflamazomunun yapısı ve fonksiyonu.....	28
Şekil 2.15. Kaspaz-1 bağımlı piroptoz.....	32
Şekil 2.16. Gasdermin D ve piroptoz sırasında gerçekleşen por oluşumu.....	34
Şekil 3. 1. Çiftleşmenin ertesi günü tespit edilen vajinal plak görüntüsü.....	42
Şekil 3.2. Vajinal simir örneklerinin krezil viyole boyaması sonrası mikroskopik görüntüleri	45
Şekil 3.3. Gebeliğin 1. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü.	45
Şekil 3.4. Gebeliğin 1. gününde olan dişi farelerde zigot tespiti	46
Şekil 3.5. Gebeliğin 4. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü	46
Şekil 3.6. Gebeliğin 4. günündeki dişi farelerden elde edilen blastosistlerin mikroskopik görüntüleri	47
Şekil 3.7. Gebeliğin 5. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü	47
Şekil 3.8. Gebeliğin 6. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü	48
Şekil 3.9. Gebeliğin 8. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü, implantasyon bölgeleri çıplak gözle ayırt edilebilmektedir.....	48

Şekil 4.1. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki NLRP3 ekspresyonu.....	62
Şekil 4.2. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelindeki NLRP3 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri..	64
Şekil 4.3. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu.....	65
Şekil 4.4. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	67
Şekil 4.5. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki NLRP3 ekspresyonu.....	68
Şekil 4.6. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki NLRP3 ekspresyonu.....	69
Şekil 4.7. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasındaki NLRP3 ekspresyon düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri..	70
Şekil 4.8. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu.....	72
Şekil 4.9. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri..	74
Şekil 4.10. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu.....	75
Şekil 4.11. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri..	78
Şekil 4.12. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu.....	79

Şekil 4.13. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu.....	80
Şekil 4.14. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasında Kaspaz-1 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	82
Şekil 4.15. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu.	83
Şekil 4.16. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelinde Gasdermin D ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	85
Şekil 4.17. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu.	86
Şekil 4.18. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelinde Gasdermin D ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	88
Şekil 4.19. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonu.....	90
Şekil 4.20. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki Gasdermin D ekspresyonu.	90
Şekil 4.21. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasında Gasdermin D ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	93
Şekil 4.22. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonu.....	94
Şekil 4.23. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	96
Şekil 4.24. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki IL-1 β ekspresyonu.....	97
Şekil 4.25. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelinde IL-1 β ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	98

Şekil 4.26. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu.....	99
Şekil 4.27. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki IL-1 β ekspresyonu.	100
Şekil 4.28. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasında IL-1 β ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri..	102
Şekil 4.29. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu.....	103
Şekil 4.30. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelinde IL-18 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	105
Şekil 4.31. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonu.....	106
Şekil 4.32. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelinde IL-18 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	108
Şekil 4.33. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-18 ekspresyonu.....	109
Şekil 4.34. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki IL-18 ekspresyonu.....	110
Şekil 4.35. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasında IL-18 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri.	112
Şekil 4.36. Östrus fazı uteruslar ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen NLRP3 ve β -Aktin bantları ile istatistiksel analizi.....	114
Şekil 4.37. Östrus fazı uterusları ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen Kaspaz-1 ve β -Aktin bantları ile istatistiksel analizi.....	116

Şekil 4.38. Östrus fazı uterusları ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen Gasdermin D-N (GSDMD-N) ve β -Aktin bantları ile istatistiksel analizi.....	118
Şekil 4.39. Östrus fazı uterusları ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen IL-1 β ve β -Aktin bantları ile istatistiksel analizi.	120
Şekil 4.40. Östrus fazı uterusları ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen IL-18 ve β -Aktin bantları ile istatistiksel analizi.	122

SİMGELER ve KISALTMALAR

AIM: Absent in melanoma

ALA: Alfa-Lipoik Asit

APAF-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1

ASC: C-terminal kaspaz alım alanı içeren apoptoz ile ilişkili benek benzeri protein

CARD: Kaspaz aktivasyon ve toplama alanı

DAMP: Hasarla ilişkili moleküler paternler

dsDNA: Çift sarmallı DNA

E₂: Östrojen

ER: Endoplazmik retikulum

FSH: Folikül uyarıcı hormon

G1: Gebeliğin 1. günü

G4: Gebeliğin 4. günü

G5: Gebeliğin 5. günü

G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter-implantasyon bölgesi

G6: Gebeliğin 6. günü

G8: Gebeliğin 8. günü

gER: Granüllü endoplazmik retikulum

GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormonun

GPCR: G proteini-bağlı reseptör

GSDM: Gasdermin

GSDMD: Gasdermin D

GSDMD-C: Gasdermin D C-terminal

GSDMD-N: Gasdermin D N-terminal

hCG: İnsan koryonik gonadotropin hormon

HESC: İnsan endometriyal stroma hücreleri

HLA: İnsan lökosit antijeni

HOXA10: Homeobox A10

ICE1: IL-1 β dönüştürücü enzim

IFNT: İnterferon tau

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IL-1: İnterökin 1

IL-1 β : İnterökin 1 beta

IL-18: İnterlökin 18

IL-18BP: IL-18 bağlayıcı proteini

IL-18R: IL-18 reseptörü

IL-1R: İnterökin 1 sinyal reseptörü

IL-1 β : İnterlökin 1 beta

IL-6: İnterlökin 6

LH: Luteinize edici hormon

LIF: Lösemi inhibe edici faktör

LMWH: Düşük moleküler ağırlıklı heparin

LPS: Lipopolisakkarit

LRR: Lösin açısından zengin tekrar

MAPK: Mitojenle etkinleşen protein kinaz

MDP: Muramil dipeptid

NALP3: NACHT, LRR ve PYD alanları içeren protein 3

NF-κB: Nükleer faktör-κB

NK hücreleri: Doğal öldürücü hücreler

NLR: Nükleotid bağlanma alanı ve lösin açısından zengin tekrar içeren reseptörleri

NLRP3: NLR family pyrin domain containing 3

NOD2: Oligomerizasyon alanı içeren protein 2

Ö: Östrus

P₄: Progesteron

PAMP: Patojenle ilişkili moleküler patternler

PDB: Primer desidual bölge

PR: Progesteron reseptörü

PRR: Patern tanıma reseptörleri

PTGS2: Prostaglandin endoperoksit sentaz 2

PYD: Pirin alanı

ROS: Reaktif oksijen türleri

RS: Retikulum stresi

SDB: Sekonder desidual bölge

TGF-β: Transforme edici büyüme faktörü beta

TGK: Tekrarlayan gebelik kaybı

TİB: Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı

TLR: Toll benzeri reseptörleri

TNF-α: Tümör nekroz faktörü alfa

TSA: Tekrarlayan spontan abortus

UPR: Katlanmamış protein yanıtı

VEGF: Vasküler endotel büyüme faktörü

VEGF2: VEGF-reseptörü 2

1. GİRİŞ

Sağlıklı bir gebelik için fertilizasyon, embriyo gelişimi, implantasyon, desidualizasyon ve plasantasyonun sağlıklı bir biçimde gerçekleşmesi gerekir (Psychoyos, 1973). Bu süreçlerin herhangi birinde problem yaşanması durumunda infertilite meydana gelmektedir. Gebelik sırasında gerçekleşen trofoblast invazyonu, doku ve vasküler yeniden yapılanma, embriyo büyümesi ve doğumun başlatılması gibi süreçlerde inflamatuvar yanıtın dengesi önemlidir (Guzeloglu-Kayisli ve ark., 2009).

Gebeliğin erken döneminde embriyo implantasyonu ve desidualizasyon mekanizmalarında apoptoz, entoz ve otofaji gibi farklı hücre ölümleri rol aldığı bilinmektedir. Proinflamatuvar programlanmış hücre ölümünü tanımlamak için kullanılan piroptoz terimi, Yunanca ateş anlamına gelen "pyro" ve düşme/ölüm anlamına gelen "ptosis" köklerinden türetilmiştir (Cookson ve ark., 2001). Piroptoz, DNA hasarı, nüklear yoğunlaşma ve kaspaz aktivasyonu gibi apoptozda görülen özelliklere sahip olmakla birlikte, kendine özgü morfolojik özellikler de gösterir (Bergsbaken ve ark., 2007; Jorgensen ve ark., 2015; Xu ve ark., 2018). Piroptoz mekanizmasında inflamazomlar görev almaktadır. İnflamazomlar patern tanıma reseptörleri içeren multimoleküler kompleksler olup, inflamatuvar yanıtları uyarmaktadır. NLRP3 inflamazomu esas olarak bir sitosolik sensör molekülü olan NLRP3, ASC proteini ve efektör molekül olarak bir sistein proteaz prokaspaz-1'den oluşur. NLRP3 inflamazomu, Kaspaz-1 aktivasyonuna aracılık ederek pro IL-1 β (interlökin 1 beta) ve pro IL-18'in (interlökin 18) olgunlaşmasına ve salınmasına yol açar. Ayrıca Kaspaz-1 Gasdermin D'yi spesifik olarak keserek N ve C terminallerine ayırır. Gasdermin D'nin N terminali plazma membranında por oluşturmakta ve bu porlardan sitosolik proteinlerin salınımı gerçekleşir (Fernandes-Alnemri ve ark., 2007; Kayagaki ve ark., 2011).

Literatürde peri-implantif dönemde inflamasyon ilişkili programlı hücre ölümü piroptozun ve piroptozda görev alan NLRP3 inflamazom yolağının rolleri henüz aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada erken gebelikte farelerin uterus/implantasyon

bölgelerinde inflamasyon ilişkili programlı hücre ölümü piroptoz sırasında rol alan NLRP3 inflamazom yolağı üyeleri NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18'in lokalizasyon ve ekspresyonlarını immünohistokimya ve Western blot yöntemi ile belirledik. Bulgularımız ile piroptoz ve NLRP3 inflamazom yolağının erken gebelikteki olası rollerini yorumlamadık. Çalışmamıza ait bulguların inflamasyon ilişkili programlı hücre ölümü piroptozun erken gebelikteki olası rollerinin aydınlatılmasına ve klinikte tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve gebelik kayıpları gibi komplikasyonların sebeplerinin aydınlatılmasına katkı sağlayabileceğini düşünüyoruz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Genital Kanalların Embriyonik Gelişimi

Embriyonik gelişimin yaklaşık beşinci ve altıncı haftalarında genital sistem farklılaşmamış evrede iken her iki cinsiyette mezonefrik ve paramezonefrik kanal bulunmaktadır. Gelişimin ilerleyen aşamalarında ise bu kanallar her iki cinsiyette dişi ve erkek genital sistemi oluşturmak üzere farklılaşmaktadır. Erkek genital sistem gelişiminde mezonefrik kanal (diğer adıyla Wolffian kanalı) görev alırken, dişi genital sistem gelişiminde paramezonefrik kanal (diğer adıyla Müller kanalı) rol oynamaktadır. Dişi embriyolarda, testosteron hormonunun eksikliği ile mezonefrik kanalın gerilerken, anti-müllerian hormonun eksikliği paramezonefrik kanal gelişiminin destekler; böylelikle genital sistem dişi yönde farklılaşır (Sadler, 2010).

Paramezonefrik kanal gelişimi ürogenital kabarıklığın yan ve ön yüzeyinde başlamakta olup, ilk olarak sölom epitelin longitudinal girintiler yapmasıyla gerçekleşir. Bu girintiler birbiri ile kaynaşarak paramezonefrik kanalları oluşturmaktadır. Bu kanalların kranial uçları huni şeklinde açılarak sölom boşluğuna doğru ilerler. Bu ilerleme pelvik bölgeye ulaşıncaya kadar mezonefrik kanalların paralelinde kaudal yönde seyrederken, pelvik bölgede mezonefrik kanalları çaprazlayarak kaudomedial yönde devam eder ve orta hatta birleşir. Birleşen ve kaynaşan paramezonefrik kanallar ‘Y’ şeklinde uterovajinal primordiyumu oluşturur (Moore ve ark., 2008).

2.1.1 Uterusun Embriyonik Gelişimi

Birleşen paramezonefrik kanalların kaudal ürogenital sinüsün dorsal duvarına doğru ilerleyerek kabartı halinde sinüs tüberkülünü (paramezonefrik ya da Müller tüberkülü) oluşturmaktadır. Sinüs tüberkülünün her iki yanından ise mezonefrik kanallar ürogenital sinüslere açılmaktadır (Sadler, 2010).

Gelişim sırasında paramezonefrik kanalların üç ayrı bölümünden dişi genital sisteme ait farklı yapılar oluşmaktadır; tuba uterinalar sölom boşluğuna giren birleşmemiş kranial bölümler ve mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal bölümlerden gelişirken, uterus

ve vajina paramezonefrik kanalların kaynaşan ‘Y’ şeklinde uterovajinal primordiyumu oluşturan kaudal bölümden gelişmektedir. Paramezonefrik kanalların orta hatta birleşmesiyle birlikte geniş transvers bir pelvik katlantı meydana gelir. Bu katlantı paramezonefrik kanalların lateralinden pelvik duvara doğru uzanır ve ligamentum latum uteri (broad ligament) olarak isimlendirilir (Moore ve ark., 2008).

Uterovajinal primordiyumdan uterusun kısımları olan fundus, korpus, istmus ve endometriyal epiteli ile bezler köken almakta iken, endometriyal stroma ve miyometriyum komşu splanik mezodermden köken almaktadır. Uterus taslağı gebeliğin ilk trimesteri sonunda, endometriyal bezler ve miyometriyum ikinci trimesterde, uterusu ait diğer oluşumlar ise üçüncü trimesterde gelişmektedir (Sadler, 2010).

2.2. İnsanda Uterus Histolojisi

Uterus, mesane ve rektum komşuluğunda, içi boş armut biçiminde bir organ olup anatomik olarak iki kısımdan (korpus ve serviks) oluşmaktadır. Uterus bir gövde (korpus), uterus kavitesinin daralmasıyla oluşan bir iç ağız (internal os) ve buradan aşağıya doğru silindirik yapı şeklinde uzanan serviksten oluşmaktadır. Korpusun anterior duvarı düz, posterior duvarı konveks yapıda olup uterusun büyük üst kısmını oluşturmaktadır. Korpusun tuba uterinalar ile bağlantı yaptığı tavan kısmında genişleyip kubbe biçimini alan bölge fundus olarak isimlendirilmektedir (Şekil 2.1.).

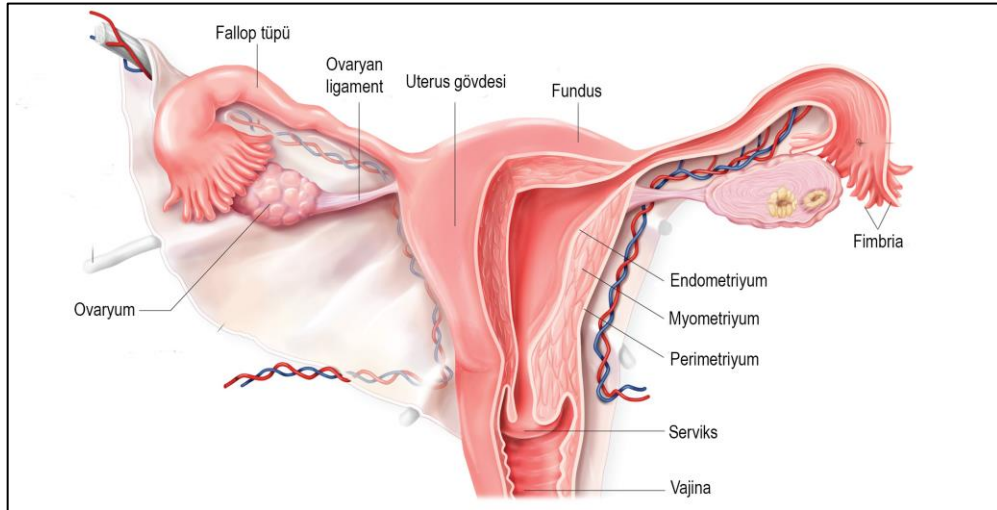
Uterus dıştan içe doğru perimetrium, miyometriyum ve endometriyum olarak üç katmandan oluşmaktadır. Uterusu en dıştan saran perimetrium tabakası organ komşuluğuna göre seroza (mezotelyum) veya adventisya (bağ dokusu) dokusundan oluşmaktadır. Perimetrium abdominal periton ve pelvis ile devamlılık göstermektedir. Kalın bir düz kas tabakası olan miyometriyum vajina ve tuba uterinaların kas tabakaları ile devam eder. Uterusun en iç tabakası endometriyum ise uterusun mukozasını oluşturmaktadır (Ross ve ark., 2013).

Miyometriyum tabakasında sınırları ayırt edilemeyen üç adet düz kas katmanı bulunmaktadır. İlk ve üçüncü düz kas tabakaları longitudinal olarak yerleşmiş kas liflerinden oluşmaktadır. Sirküler yerleşimli orta kas tabakası ise en kalın kas katmanı

olup arkuat arterler ve lenfatikleri içerdiğinden stratum vaskulozum olarak isimlendirilir (Ross ve ark., 2013).

Uterusun iç tabakası olan endometriyuma ait lümeni döşeyen epitel tek katlı silyalı prizmatik epitel karakterindedir. Endometriyumun lamina propriyası ise çok sayıda basit tübüler bez içermektedir. Bu bezler miyometriyum tabakasına yakın olduğunda dallanmalar gösterebilmektedir. Bol miktarda fibroblast ve temel madde içeren endometriyumun bağ dokusu tip III kollajence zengin liflerden oluşmaktadır.

Endometriyum bazal (stratum bazale) ve fonksiyonel (stratum fonksiyonale) tabaka olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Bazal tabaka uterus bezlerinin başlangıç kısmının bulunduğu bir lamina propriyadan oluşan ve miyometriyuma yakın olan tabakadır. Fonksiyonel tabaka ise bazal tabakanın üzerine oturmuş lamina propriya, uterus bezlerinin devamı ve lümeni çevreleyen yüzey epitelinden oluşmaktadır. Miyometriyumun stratum vaskulozum tabakasında bulunan arkuat arterler dallanarak endometriyum tabakasına girmektedir. Arkuat arterlerin dallarından biri düz arterler olup bazal tabakaya kan taşıırken, diğeri olan spiral arterler fonksiyonel tabakaya kan taşımaktadır. Her ay gerçekleşen menstrual siklus boyunca fonksiyonel tabaka dökülür, bazal tabaka değişmeden kalarak fonksiyonel tabakanın yenilenmesini sağlar (Ross ve ark., 2013).



Şekil 2.1. İnsan dişi üreme sistemi ve uterus tabakaları (Hashem ve ark., 2021)

2.3. Endometriyumda Menstrual Siklus Sırasında Gerçekleşen Fizyolojik Değişimler

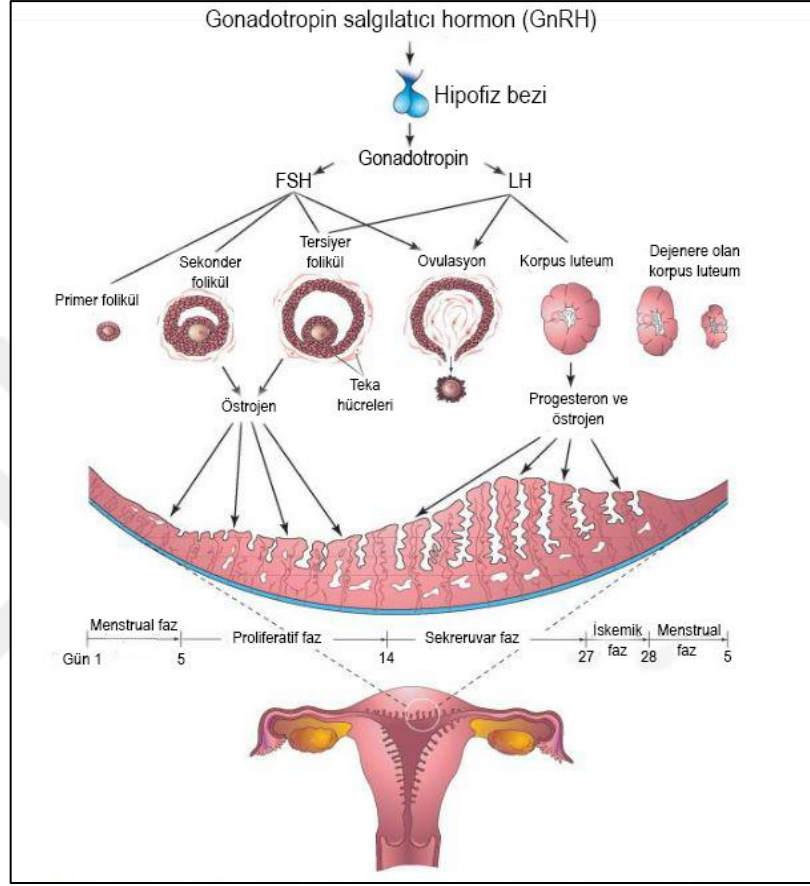
Üreme çağındaki kadınlarda her ay gerçekleşen menstrual siklusla embriyo implantasyonu ve gebeliği desteklemek için endometriyum fizyolojik olarak hazırlanmaktadır. Menstrual siklus boyunca endometriyumun fonksiyonel tabakasında bir dizi gelişimsel ve fizyolojik değişimler meydana gelmektedir (Şekil 2.2.).

Pubertede hipotalamus gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) ön hipofiz bezini uyarmasıyla beraber Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve Luteinize edici hormonun (LH) salınması başlamaktadır. FSH ve LH, 1. mayoz bölünmenin diploten aşamasında kalan primordiyal folikülleri uyarak endometriyumda gerçekleşen menstrual siklus ile senkronize bir döngüyü başlatmaktadır (Cha ve ark., 2012; Rendi ve ark., 2012; Anthony, 2015).

Menstrual siklus ortalama 28 gün süren, puberteden başlayarak menopoza kadar devam eden bir döngüdür. Menstrual siklusun son fazı olan menstrual faz ise ortalama dört- beş gün sürmektedir. Menstruasyon sonrası tekrar siklusa giren endometriyumda proliferasyon (çoğalma) ve sekretuvar (luteal, salgılanma) fazları gerçekleşmektedir (Rendi ve ark., 2012; Anthony, 2015).

Primer foliküldeki folikül hücreleri hızlı bir şekilde çoğalarak çok tabakalı bir hal alırlar ve bu aşamadan sonra folikül hücreleri granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar. Granüloza hücreleri proliferasyon olurken etrafındaki stroma hücreleri teka tabakasını oluşturur. Daha sonra bu tabaka, teka interna ve eksterna olarak iki tabakaya ayrılır. LH reseptörü teka internada yer alan hücrelerdeki reseptörüne bağlanır ve bu hücrelerden androstenedion üretilir. Teka internada üretilen androstenedion granüloza hücrelerine taşınır ve FSH'nin granüloza hücrelerindeki reseptörüne bağlanmasına cevap olarak androstenedion aromataz enzimi aracılığıyla östrojene (E_2) dönüştürülür. Plazmada artan ovaryan E_2 'nin etkisi ile birlikte endometriyum proliferatif faza girer. LH'nin ani artışı ile gerçekleşen ovulasyon sonucu korpus luteumun oluşur ve progesteron (P_4) salgısı başlar. P_4 'ün etkisi ile endometriyum sekretuvar faza geçiş

yapmaktadır. E_2 ve P_4 aracılığı ile gerçekleşen endometriyumdaki fizyolojik hazırlık gebeliğin oluşması ve devamlılığı için önemlidir (Maybin ve ark., 2015).



Şekil 2.2. İnsan endometriyumunda menstrual siklus ve hormonal düzenlenmesi (Moore ve ark., 2008)

2.3.1. Endometriyumun Proliferatif Fazı

Östrojenin etkisiyle başlayan proliferatif faz sırasında fonksiyonel tabakanın yenilenmesi gerçekleşmektedir. Menstruasyon ile fonksiyonel tabakanın dökülmesiyle birlikte incelen endometriyum mukozasında mitotik aktiviteler E_2 ile indüklenmektedir. Böylelikle mukozada bulunan endometriyal bezler, kapillerler, stromal ve epitel hücrelerin proliferasyonu başlamaktadır. Bu evredeki endometriyal bezlerin lümeni dardır ve düz tübüller oluşturur. Bezlere ait hücrelerde sekresyonu sağlamak için granüllü endoplazmik retikulum (gER) ve Golgi kompleksinin sayıları ve boyutlarında artış olmaktadır. Başlangıçta 1 mm olan fonksiyonel tabakanın kalınlığı proliferasyonun

etkisiyle 3-4 mm'ye ulaşmaktadır. Endometriyumun proliferasyon fazı yaklaşık 10-14 gün sürmektedir (Rendi ve ark., 2012; Anthony, 2015).

2.3.2. Endometriyumun Sekretuar Fazı

Ovulasyon sonrası oluşan korpus luteumdan salgılanan P_4 'ün etkisi ile endometriyal bezlerden sekresyon indüklenmektedir. Endometriyal bezlerce üretilen glikoprotein yapısındaki salgı ürünleri bezlerin dar lümenlerini genişleterek kıvrımlı hal almasını sağlamaktadır. Üretilen salgıların birikmesi ve stromada ödemin artmasıyla birlikte fonksiyonel tabaka sekretuar fazda yaklaşık 5-6 mm kalınlığa ulaşmaktadır (Rendi ve ark., 2012; Anthony, 2015).

Embriyo implantasyonu gerçekleşmediği takdirde korpus luteum gerilemeye başlar ve kandaki E_2 ve P_4 seviyelerinin ani düşüşüyle birlikte fonksiyonel tabakanın spiral arterleri kasılmaya başlar. Spiral arterlerin kasılması ile fonksiyonel tabakaya kan akımı engellenir ve dokuda iskemiye sebep olur. Fonksiyonel tabakada gerçekleşen iskemik hasar hücre ölümünü başlatır. Ayrıca P_4 'ün düşüşü ile miyometriyum tabakasında da kasılmalar meydana gelerek kan damarlarının yırtılmasına sebep olur. Hücre ölümü gerçekleşen hücreler fonksiyonel tabakanın ayrılır ve kan ile birlikte menstrual sıvı olarak atılır. Menstruasyon sonunda ince bir tabaka halinde kalan endometriyum, hormonların etkisi ile tekrar prolifer olmaya başlayarak yeni bir döngüye katılır (Rendi ve ark., 2012; Anthony, 2015).

Embriyo implantasyonu gerçekleşince trofoblast hücrelerinden insan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) salgılanır. hCG korpus luteumu uyararak P_4 salınımını devam ettirir. Böylelikle devam eden P_4 salınımı miyometriyumda gerçekleşen kas kasılmalarını inhibe eder ve endometriyum stroma hücrelerinin farklılaşmasını sağlayan desidualizasyon mekanizmasını indükler.

2.4. Farelerde Dişi Genital Sistem Anatomisi

Farelerin dişi genital sistemi bir çift ovaryum ve ovidakt, uterus, serviks, vajina ve klitoristen oluşmaktadır (Şekil 2.3.).

2.4.1. Ovaryum

Fare ovaryumları böbreklerin posterolateral konumunda yerleşiktir. Ovaryumlar ince elastik yapıda bulunan kapsül (bursa) ile çevrili olup mezovaryumlar ile abdominal duvarın dorsoline tutunmaktadır. Kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler ovaryumun hilus bölgesinden giriş yapmakta ve tekrar hilus bölgesinden çıkarak ovaryumu terk etmektedir (Fox, 2006) .

2.4.2. Ovidakt

Ovidaktlar 1.8 cm uzunluğunda kıvrımlı bir tüp olup periovaryan boşluğu uterusu bağlamaktadır. Ovidaktlar mezotubaryum ile dorsal abdominal duvardan ayrılmaktadır. Ovidaktlar istmus, ampulla, infundibulum ve fimbriya olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. İstmus sıkıca paketlenmiş ve dar bir yapıya sahip olup ampulla ile infundibulumu bağlanmaktadır. İfundibulum periovaryan boşluğa açılmakta ve bu açıklığı saçak benzeri uzantılara sahip fimbriya çevrelemektedir (Fox, 2006; Rendi ve ark., 2012).

2.4.3. Uterus

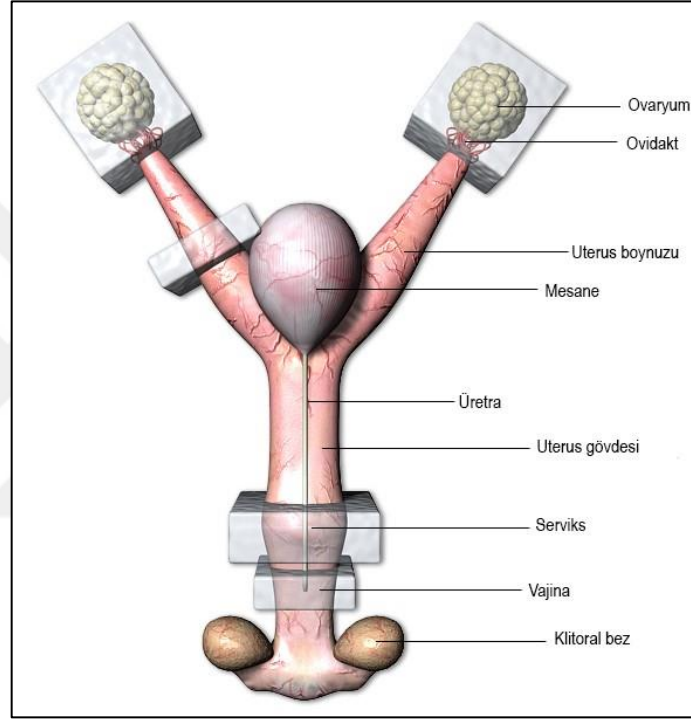
Farelerde uterus bikornuat (iki boynuzlu) olup iki adet lateral boynuz (kornua) ve bir adet medyan gövdeden (korpus) oluşmaktadır. Fare uterusu ‘Y’ şeklinde tübüler bir yapıdır. Kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirleri içeren mezometriyum ligamenti ile dorsal abdominal duvardan ayrılan uterus boynuzları mesanenin dorsalinde birleşerek korpusu oluşturmaktadır. Korpus kraniyal ve kaudal olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Korpusun kraniyal kısmı medyan septum ile bölünen iki boşluğa sahiptir. Uterusun kaudal kısmı ise bölünmez, vajina boşluğuna açılarak serviksi oluşturmaktadır (Fox, 2006; Rendi ve ark., 2012).

2.4.4. Vajina ve Klitoris

Vajina, uterus korpusu ve serviksten başlayıp anüsün anteriorunda bulunan eksternal açıklığa kadar uzanmaktadır. Vajina kısa ve kalın müsküler yapıda bir kanaldır.

Vajinanın dorsalinde rektum ventralinde üretra olup bu yapılara gevşek bir şekilde tutunmuştur.

Klitoris vajinal açıklıkta anterior duvarda ventrale doğru uzanmış küçük bir yükselti olup yüzeyi deri ile örtülüdür. Klitorisin subkutan bağ dokusu içinde bulunan klitoral bezler de lateralde klitoral fossadaki açıklığa uzanır (Fox, 2006; Rendi ve ark., 2012).



Şekil 2.3. Farelerde dişi genital sistem anatomisi (Ruehl-Fehlert ve ark., 2003)

2.5. Farelerde Uterus Histolojisi

Fare uterusu içten dışa doğru endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Uterusun en dış tabakası perimetriyum seroza katmanı olan mezometriyum ile devam etmektedir. Perimetriyumun üzerindeki orta tabaka olan miyometriyum ise kalın bir kas tabakası olup içte sirküler dışta longitudinal yerleşimli kas tabakalarından oluşmakta olup, bu iki kas tabakası arasında vasküler gevşek bağ dokusu olan stratum vaskulozum bulunmaktadır. İç tabaka olan endometriyum ise uterusun mukozasını oluşturmaktadır. Endometriyumun basit prizmatik epiteli stromaya doğru girinti yaparak dallı tübüler bez karakterindeki bezlere uzanır. Endometriyum stroması retiküler bağ doku ile desteklenmiş olup polihedral hücreler, lenfositler, kan

damarları ve sinirleri içermektedir. Orta hatta uterus boynuzlarının kaynaşması ile oluşan uterus gövdesi seroza ve stratum vaskulozum içermemektedir. Uterus gövdesinin anterior duvarını örten epitel basit prizmatik epitel karakterinde olup medyal duvarında bu epitel serviksin ve vajinanın epiteli olan çok katlı yassı epitel karakterindedir. Gövdenin lamina propriyası ise uterus boynuzlarına kıyasla daha yoğun lifsel eleman ve daha az hücre içermektedir (Rendi ve ark., 2012).

2.6. Dişi Farede Üreme Fizyolojisi

Memeli türleri arasında hormonal olarak benzerlik gözlenmesine rağmen üreme sikluslarında farklılıklar mevcuttur. İnsanlarda menstrual siklus sırasında seksüel anlamda sınırlama yok iken, farelerde seksüel aktivite yalnızca östrus siklusunun östrus fazında gerçekleşmektedir. Diğer bir farklılık ise insanlarda menstrual siklus sırasında gebelik gerçekleşmezse endometriyumun fonksiyonel tabakası menstruasyon ile atılırken, östrus siklusuna sahip diğer memelilerde gebelik gerçekleşmediğinde endometriyum rezorbe edilir (Grasso P. ve ark., 1998).

Poliöstrik olan fareler puberteden yaşlılığa kadar mevsime bağlı olmadan seksüel aktivite göstermektedir. Farelerde östrus siklusu dört fazdan oluşmaktadır. Farelerde östrus siklusu yaklaşık 4-5 gün sürmektedir (Şekil 2.4.).

Proöstrus Fazı

Farelerde ovaryan foliküler faz sırasında ovaryumda foliküller büyümeye başlarken E_2 ve P_4 hormonlarının etkisiyle proöstrus fazda uterus embriyo implantasyonu için hazırlanmaya başlamaktadır. Dişi fareler proöstrus fazında seksüel olarak aktif değildir. Yaklaşık bir gün süren proöstrus fazında dişi farelerin vajinaları kırmızı-pembe renkli ve nemlidir. Bu fazda alınan vajinal simir örneklerinde çoğunlukla çekirdekli ve az sayıda kornifiye hücrelerin yanı sıra bir miktar lökosit gözlenir (Zenclussen ve ark., 2014).

Östrus Fazı

Östrus fazında dişi fareler seksüel olarak aktif olduğundan bu evre kızgınlık evresi olarak bilinir. Östrus evresinde ovulasyon gerçekleşir ve E_2 hormonu en yüksek seviyededir. E_2 'nin etkisi ile uterus lümeninde sıvı birikmekte ve uterus vasküler

geçirgenlik artmaktadır. Bu durumdan dolayı uterus boynuzları ödemli bir hal almaktadır. Fare vajinası östrus fazında açık pembe renkli ve ödemlidir. Bu fazda alınan vajinal simir örneklerinde sadece kornifiye hücreler gözlenir (Zenclussen ve ark., 2014).

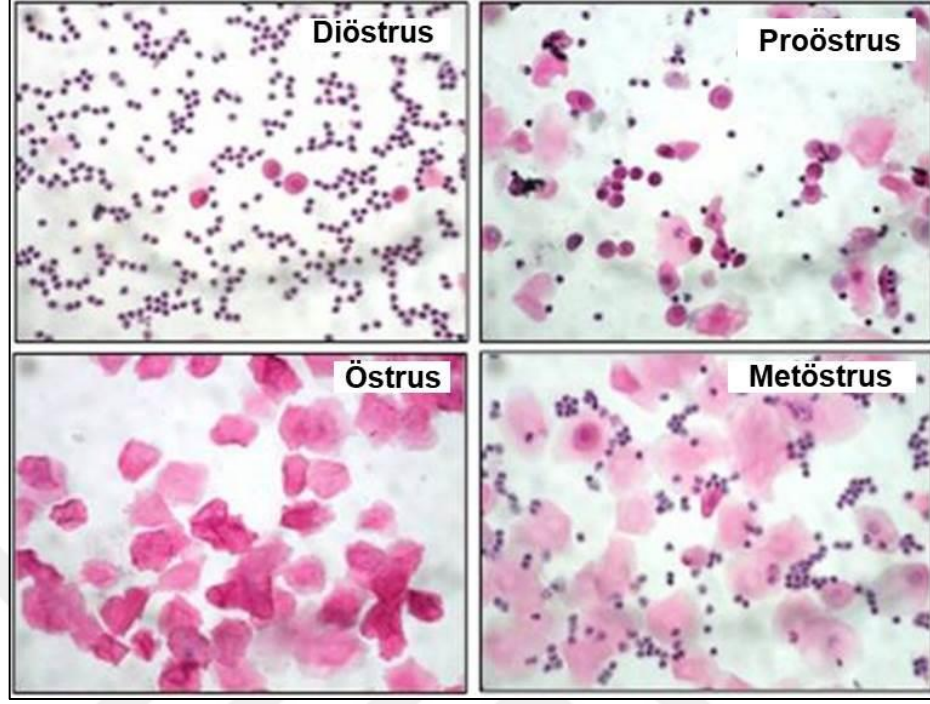
Metöstrus Fazı

Farelerde ovaryan luteal faz sırasında metöstrus fazına geçiş olmaktadır. Luteal fazda düşen E₂ seviyesi ile birlikte uterusta boynuzlarında şişkinlik ve hiperemi (kan artışı) azalmaktadır. Bu fazda dişi farelerin vajinası soluk renkte, ödemi azalmış ve kuru görünmektedir. Bu fazda alınan vajinal simir örneklerinde kornifiye epitel hücreleri ve lökositler gözlenir (Zenclussen ve ark., 2014).

Diöstrus Fazı

Gebelik gerçekleşmemiş ise diöstrus fazında luteal fazda oluşan korpus luteum gerilemesi ve P₄ seviyesinin düşüşü gerçekleşir. Bundan dolayı endometriyum dokusu bir sonraki siklus boyunca yeniden şekillenmek için rezorbe olur. Luteal fazın bitmesi ile birlikte ovaryum folikülleri tekrar gelişmeye başlamaktadır. Diöstrus fazında bulunan dişi farelerin vajinaları kapalı olarak görünmektedir. Bu fazda alınan vajinal simir örneklerinde çok az sayıda çekirdekli epitel hücrelerin eşlik ettiği yoğun lökosit gözlenir (Zenclussen ve ark., 2014).

Dişi farelerin çiftleştirme yöntemi poligami (bir erkek ile 2-4 dişinin çiftleştirilmesi) veya monogami (bir erkek ile bir dişinin çiftleştirilmesi) olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Dişi farelerin çiftleşmesi çoğunlukla östrus fazında gerçekleşen ovulasyon ile gece gerçekleşmektedir. Çiftleşme sonrası erkek farelerin spermi ve yardımcı bezlerin salgıları vajinal sıvı ile birleşerek koyulaşır ve sertleşir. Salgıların sertleşmesi sonucu dişi farelerin vajinasında bir tıpa meydana gelmektedir. Vajinal plak olarak da isimlendirilen bu tıpa çiftleşme sonrası 24-36 içinde kaybolur.



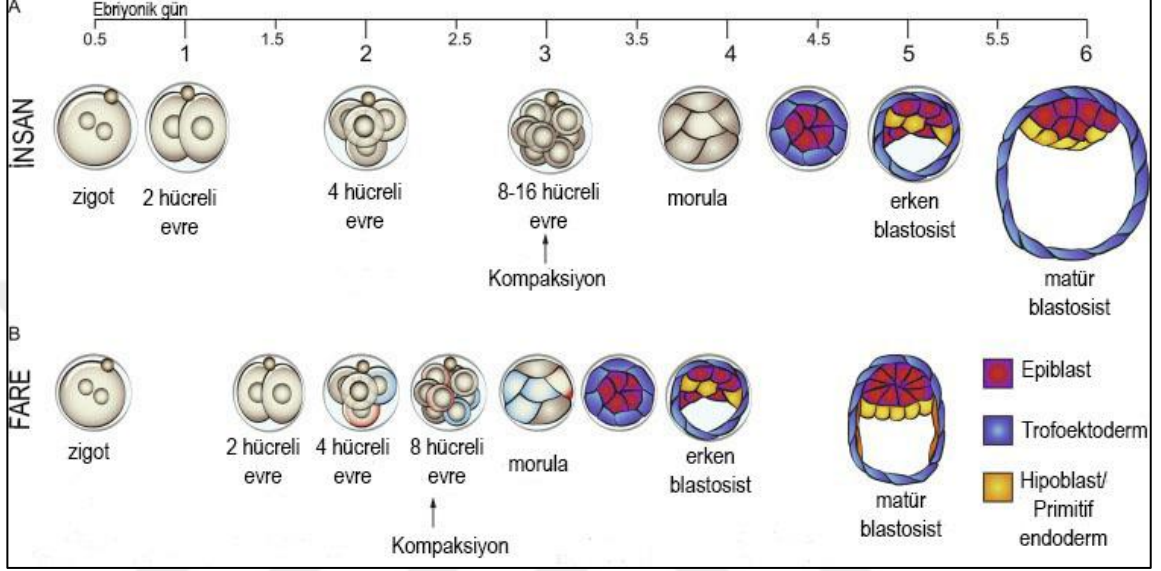
Şekil 2.4. Dişi farelerde östrus siklusu fazlarında görülen hücresel farklılıklar (Zenclussen ve ark., 2014)

2.7. İnsan ve Farede Pre-implantif Dönem Embriyo Gelişimi

Pre-implantif dönem sırasında zigot yarıklanması ile blastosist aşamasında embriyonik hücrelerin iç hücre kitlesini ve trofektodermi oluşturması gibi iki önemli olay gerçekleşmektedir (Stewart ve ark., 1997). Zamanlama açısından insan ve fare pre-implantif dönem embriyo gelişimi farklılık göstermektedir. Fare embriyosu 3,5. günde erken blastosist aşamasına gelirken insan embriyosu erken blastosist aşamasına 5. günde gelmektedir. Fare embriyosu geç blastosist aşamasına 4,5. günde gelirken insan embriyosu ise geç blastosist aşamasına 6. günde gelmektedir (Şekil 2.5.) (Cockburn ve ark., 2010).

Dişi farelerde ovulasyon sonrası atılan oositler ovidakta girerek ovidaktın ampullasına doğru ilerler ve bu kısımda fertilizasyon gerçekleşir. Fertilizasyonu takiben oluşan zigot mitoz bölünmeler geçirerek blastosist aşamasına gelmektedir. Hipofiz bezinden salgılanan prolaktin hormonu farelerde korpus luteumun devamlılığını sağlamaktadır. Böylelikle korpus luteum farelerde yeni siklusu engeller (Soares ve ark., 2006). Gebeliğin 3,5. gününde fare blastosistinde iç hücre kitlesi ve trofektoderm oluşmaktadır. Gebeliğin 4,5. gününde fare blastosistinde primitif endoderm, primitif ektoderm ve

trofektoderm oluşmuştur (Gardner, 1982). Oluşan trofoblast hücreleri implantasyona aracılık ederek fetüs ile anne arasında besin ve gaz değişiminde görev alan plasentayı oluşturmaktadır (Dickson, 1963).

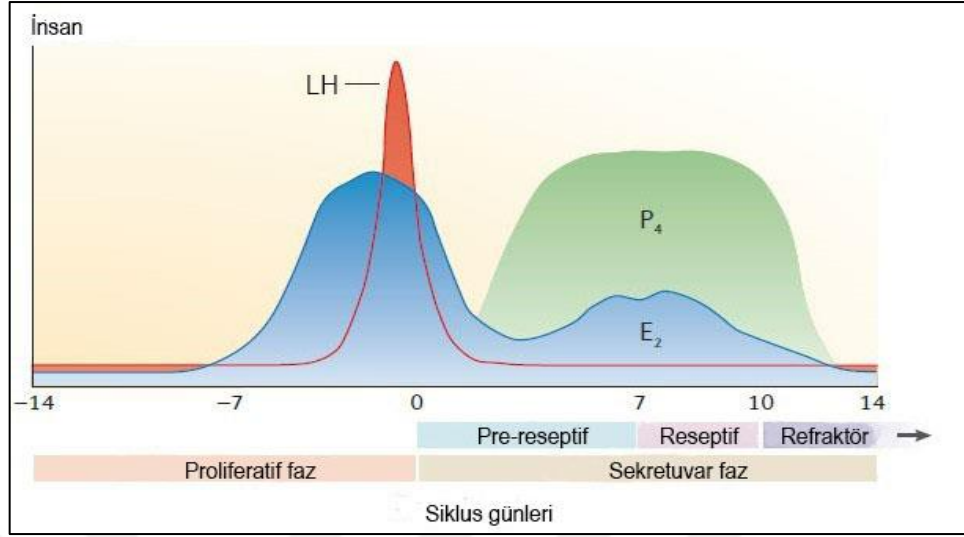


Şekil 2.5. İnsan ve fare pre-implantif ve implantasyon süreci embriyo gelişimi (Mole ve ark., 2020)

2.8. İnsanda ve Farede Uterus Reseptivitesi

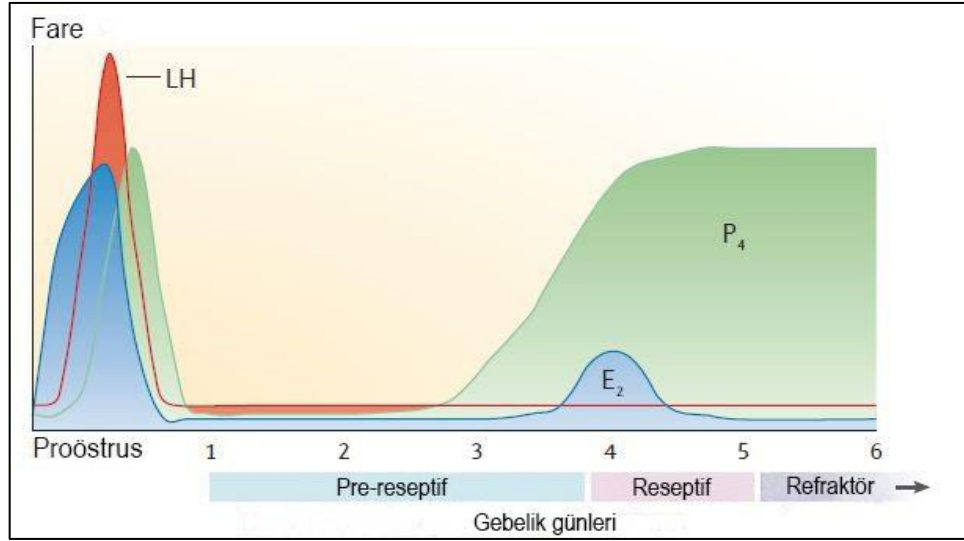
Endometriyal reseptivite veya uterus reseptivitesi endometriyumun embriyo implantasyonuna izin verdiği bir süreçtir. Uterus reseptivitesi, endometriyumun fizyolojik ve morfolojik olarak farklanmasını sağlayan E_2 ve P_4 hormonlarının etkisi altında gerçekleşmektedir (Tu ve ark., 2014).

İnsan ve fare uterusunda uterus reseptivitesi, pre-reseptif, reseptif ve non-reseptif olmak üzere 3 fazda gerçekleşmektedir. İnsanlarda pre-reseptif faz ovulasyondan sonraki ilk 7 güne denk gelmekte olup (menstrual siklusun 14.-21. günleri) uterus embriyo implantasyonuna izin vermemektedir. İnsan uterusu ovulasyondan sonra 7.-10. günleri arasında (menstrual siklusun 21.-23. günleri) reseptif fazda olup embriyo implantasyonuna izin vermektedir. Reseptif faz sonrası uterus non-reseptif faza geçerek embriyo varlığında bile implantasyona izin vermemektedir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. İnsanlarda uterus reseptivitesi ve hormonal düzenlenmesi (Wang H. ve ark., 2006)

Dişi farelerde ise uterus sadece gebeliğin 4. ve 5. günlerinde reseptif fazda olup embriyo implantasyonuna izin vermektedir. Gebeliğin 5. gününden sonra fare uterusu non-reseptif faza geçerek blastosistin varlığına yanıt vermez ve embriyo implantasyonu gerçekleşmez (Şekil 2.7.) (Cha ve ark., 2012).



Şekil 2.7. Farelerde uterus reseptivitesi ve hormonal düzenlenmesi (Wang H. ve ark., 2006)

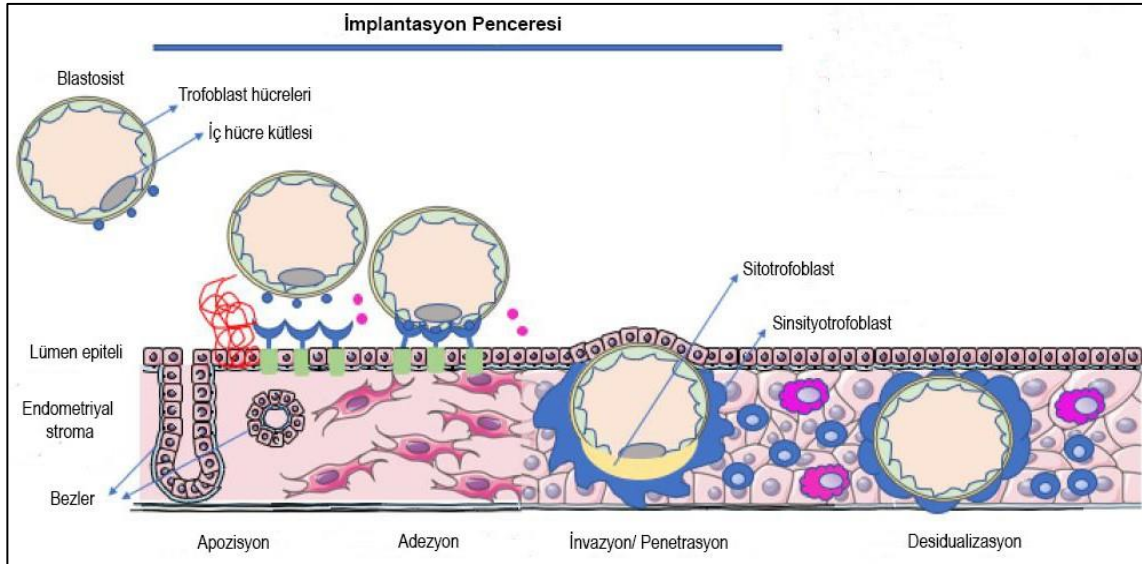
2.9. Embriyo İmplantasyonu

İmplantasyon reseptif bir uterusu embriyonun yerleşme sürecidir. Memelilerde gebeliğin ilerlemesi için pre-implantif dönem embriyo gelişimi, embriyo implantasyonu ve

desidualizasyon mekanizmasının sağlıklı olarak gerçekleşmesi gerekmektedir (Psychoyos, 1973). Embriyo implantasyonu sırasında uterus vasküler geçirgenlik ile birlikte kan akışı artmakta ve endometriyal stroma hücrelerin desidua hücrelerine farklılaşma süreci olan desidualizasyon başlamaktadır (Psychoyos, 1973; Beer ve ark., 1978). E_2 ve P_4 hormonlarının etkisi ile hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve migrasyon gibi hücresel olaylar gerçekleşmektedir ancak moleküler mekanizmalar net değildir. İnsanlarda embriyo ve endometriyum arasındaki moleküler etkileşimler etik kısıtlamalardan dolayı fare ve sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Zhang ve ark., 2013).

2.9.1. İmplantasyon Evreleri

Embriyo implantasyonu apozisyon (yakınlaşma), adezyon (tutunma) ve penetrasyon olmak üzere üç evrede gerçekleşmektedir (Enders ve ark., 1969) (Şekil 2.8.). İmplantasyonun ilk evresi olan apozisyon evresinde blastosistin trofektoderm hücreleri endometriyumun lümen epiteli ile karşı karşıya konumlanarak lümen epiteline yaklaşmaktadır. Adezyon evresinde ise trofektoderm hücreleri endometriyumun lümen epiteline tutunur ve bu bağlantı yıkama ile uzaklaştırılmayacak kadar ilerlemiş durumdadır. İmplantasyonun son evresi olan penetrasyon evresinde ise blastosistin trofektoderm hücreleri lümen epiteline invazyonu gerçekleşir (Fitzgerald ve ark., 2008).



Şekil 2.8. Embriyo implantasyonu evreleri (Ochoa-Bernal ve ark., 2020)

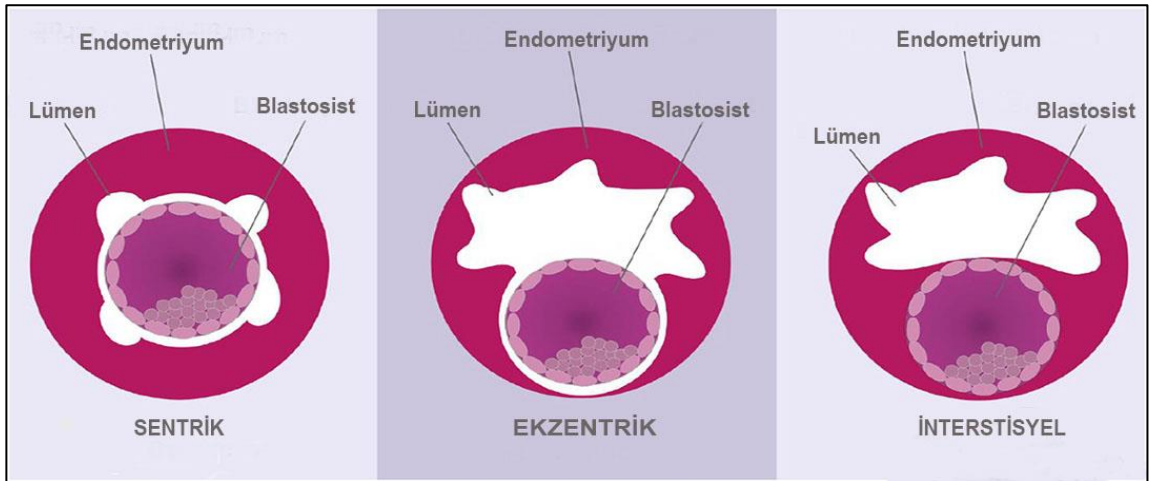
2.9.2. İmplantasyon Tipleri

Memelilerde embriyo implantasyonu sürecinde benzerlikler olmasına rağmen blastosist ve endometriyum etkileşimi sırasında türler arası farklılıklar bulunmaktadır. Embriyo implantasyonu sırasında bu etkileşim merkezi, ekzentrik ve interstisyel implantasyon olmak üzere üç farklı tipe ayrılmıştır (Bonnet, 1884) (Şekil 2.9.).

Bazı keseli memeli türlerinde, tavşan, dağ gelinciği gibi türlerde görülen merkezi implantasyon sırasında blastosist oldukça genişlemekte olup, bu şekilde endometriyuma temas etmesiyle ilk etkileşim meydana gelmektedir. Blastosist genişlemesi yüzeysel bir şekilde olduğundan bu implantasyon tipine yüzeysel implantasyon da denmektedir (Bonnet, 1884).

Hamster, sıçan ve fare türlerinde gerçekleşen implantasyon tipi ekzentrik implantasyon olup, bu implantasyon sürecinde blastosist yüzeysel olarak az miktarda genişleme göstermektedir. Uterusun lümeninden invajinasyon ile bir cep oluşmasıyla blastosist ve endometriyum arasında ilk temas sağlanır (Bonnet, 1884).

İnterstisyel implantasyon ise insanlarda rastlanan implantasyon tipi olup, blastosist direkt olarak uterusun lümen epitelini geçerek endometriyal stroma ile etkileşime girmektedir. Kobay ve şempanze gibi memeli türlerinde de embriyo implantasyonu interstisyel implantasyon ile gerçekleşmektedir (Bonnet, 1884).



Şekil 2.9. Embriyo implantasyonu tipleri (Bellofiore ve ark., 2021)

2.10. Peri-İmplantasyon Sürecinde Fare Endometriyumunda Gerçekleşen Hücresel Olaylar

İmplantasyonun aposizyon evresinden hemen önce farelerde endometriyal stromada başlayan ödem ile lümen daralmaktadır. Endometriyumda lümenin daralmasıyla birlikte trofektoderm hücrelerin mikrovillusları ile lümen epitelinin parmaklı çıkıntıları birbirine yaklaşır (aposizyon fazı). Blastosistin lümen epiteline tutunması ile birlikte (adezyon fazı), blastosistin tutunduğu bölgede stromada vasküler geçirgenlik artar (Zhang ve ark., 2013; Croy B.A. ve ark., 2014). Bu olaylar hormon bağımlı olup stromadaki ödem artışı ve lümenin kapanması P_4 aracılı (Zhang ve ark., 2013; Croy B.A. ve ark., 2014), stromadaki vasküler geçirgenlik ise E_2 aracılı gerçekleşmektedir (Harper, 1989; Zhang ve ark., 2013).

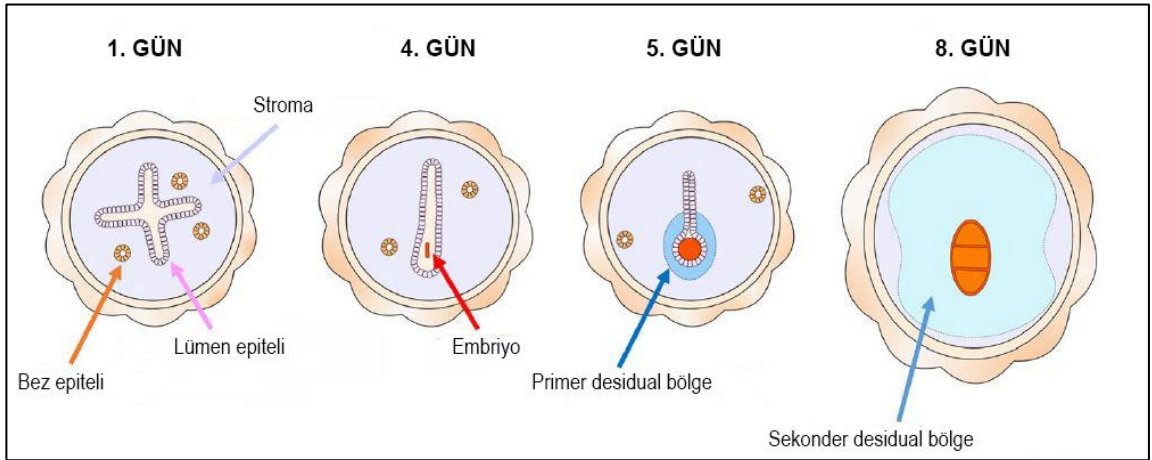
Farelerde ovulasyondan hemen önce E_2 salınımı gebeliğin birinci ve ikinci günleri endometriyum lümen ve bez epitelinin proliferasyonunu sağlar. Korpus luteumun oluşmasıyla ekspre olan P_4 pre-ovulatuvar E_2 ile birleşir ve gebeliğin üçüncü gününde proliferasyonun epitelden stromaya kaymasını sağlar. Stromada hücre proliferasyonu gebeliğin 4. gününde E_2 salgısı ile etkili hale getirilir (Parr, 1987). Farelerde embriyo implantasyonu kan damarlarından zengin mezometriyum bölgesinin zıt kutbunda bulunan anti-mezometriyal bölgede gerçekleşmektedir (Zhang ve ark., 2013; Croy B.A. ve ark., 2014). Farede blastosist, lümenin kapanmasının başlamasıyla birlikte anti-mezometriyal bölgeye yerleşir (Zhang ve ark., 2013). Blastosist yüzeyindeki trofektoderm, lümen epiteline tutunabilme potansiyeline sahiptir ve bu tutunma zona pellusida kaybı sonrası gerçekleşmektedir (Finn ve ark., 1975). Farelerde gebeliğin 4. günü gecesinde (20.00-24.00) blastosistin ilk tutunma reaksiyonu görülmektedir (Psychoyos, 1973).

Blastosistin tutunma reaksiyonundan sonra insan ve fareye ait endometriyum lümen epiteli apoptoza uğrar, stroma hücrelerinde desidualizasyon başlar ve blastosist trofektoderm hücrelerinin invazyonu ile anti-mezometriyal stromaya gömülür (Zhang ve ark., 2013).

2.11. Desidualizasyon

Pre-implantasyon E₂ ve blastosistin olduğu bölgede kapiller geçirgenliğin artması stroma hücrelerinin desidua hücrelerine farklılaşmasını sağlar. Desidualizasyon mekanizması sırasında stroma hücrelerinin desidua hücrelerine farklılaşması ile hücreler poliploid (polinükleer) hale gelir ve glikojen ve lipidçe zengin hücreler olarak karakterize edilir. Desidua hücreleri ayrıca korpus luteumun devamlılığını destekleyen desidual prolaktini, implantasyon bölgesine immün hücrelerin göçünü sağlayan prostaglandinleri, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi birçok faktörü salgılamaktadır (Cha ve ark., 2012; Rendi ve ark., 2012; Anthony, 2015).

Farelerde gerçekleşen desidualizasyonda gebeliğin 5. gününde başlangıçta embriyoyu çevreleyen subepitelyal stroma hücreleri avasküler primer desidual bölgeyi (PDB) oluşturur. PDB dışındaki stromal hücreler prolifer olmaya devam eder ve gebeliğin 6. gününde farklılaşarak vasküler bir sekonder desidual bölgeyi (SDB) oluşturmaya başlar (Şekil 2.10.) (Huet-Hudson ve ark., 1989; Namiki ve ark., 2018). Farelerde desidualizasyon süreci, transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve hücre döngüsünü düzenleyen faktörler gibi birçok faktör tarafından düzenlenir (Namiki ve ark., 2018).



Şekil 2.10. Gebeliğin 1.-8. günlerinde fare uterusundaki morfolojik değişiklikler (Namiki ve ark., 2018).

İnsanlarda ovulasyonu takiben menstrual siklusun sekretuar fazında doku yeniden şekillenmesi başlar ve endometriyum gebelik için hazırlanır. Farelere benzer şekilde, insanlarda endometriyal yeniden şekillenmenin ayırt edici özelliği, desidualizasyon sürecidir. İnsanlarda desidualizasyon geç sekretuar fazda uterusun spiral arterlerini

çevreleyen endometriyum stroma hücrelerinde başlamaktadır. Farklılaşmanın bir sonucu olarak, desidua hücreleri implantasyonu destekleyen benzersiz biyokimyasal ve hücresel özellikler kazanır. Farelerin aksine, insanlarda desiduanın oluşumu rutin olarak gerçekleşir ve embriyo yokluğunda endometriyumdan ayrılır (Ramathal ve ark., 2010).

2.12. Gebelik Sırasında Gerçekleşen İmmün Yanıtlar ve Mikroçevre

Sağlıklı bir gebeliğin her üç aylık döneminde (trimester) farklı mikro çevre ve immün yanıtlar gerçekleşir. İnsanlarda 1. trimesterde implantasyon ve plasentasyona izin veren proinflatuvar bir çevre hakimdir. Gebeliğin 2. trimesterinde, fetal gelişim ve büyüme anti-inflatuvar bir çevrede gerçekleşir. Gebeliğin sonunda, anti-inflatuvar ortam doğumu desteklemek için proinflatuvar hale geri döner.

Seminal sıvı, embriyo implantasyonundan hemen önce immün tolerans için içerdiği prostaglandinler, transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) ve insan lökosit antijeni (human leukocyte antigen/HLA) aracılığıyla proinflatuvar yanıtı destekler (Robertson ve ark., 2016; Saito ve ark., 2016). Embriyo implantasyonu ve desidualizasyonda gerçekleşen hücresel olaylara paralel olarak sitokinler, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri, prostaglandinler ve adezyon moleküllerinde modülasyonlar gerçekleşir (Paria ve ark., 2002; Wang H. ve ark., 2006). Endometriyal hücreler tarafından ekspre edilen sitokinler, blastosisti implantasyon bölgesine yönlendirerek endometriyumun lümen epiteli ile ilk etkileşimini sağlamaktadır. Bu aşamadaki inflamatuvar ortam, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, blastosistin tutunmasını önleyen müsin tabakasının ortadan kaldırılması gibi olayları indüklemektedir (Mor ve ark., 2017). Ayrıca implantasyon sonrası trofoblast hücreleri ile invaze oldukları maternal endometriyum işbirliğinde plasenta gelişir. Bu olay interlökin 6 (IL-6), lösemi inhibe edici faktör (LIF), interlökin 8 (IL-8) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi proinflatuvar sitokinlerin dahil olduğu proinflatuvar yanıt ile karakterize edilir (Dominguez ve ark., 2005; van Mourik ve ark., 2009). Sitokinler aracılığıyla desiduaya göç eden immün hücrelerin %65-70'i NK hücreleri (doğal öldürücü hücreler/Natural Killer cells), %10-20'si makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerdir. (Kammerer, 2005; Hanna ve ark., 2006). Makrofajlar ve dendritik hücreler, gebelik boyunca desiduada kalarak maternal-fetal arayüzde antijene özgü adaptif immün yanıtlara aracılık ederler.

Dendritik hücreler doku yeniden şekillenmesi ve anjiyogenezi düzenleyerek uterus reseptivitesine katkıda bulunur (Plaks ve ark., 2008). Ayrıca makrofajların trofoblast invazyonunu düzenlediği ve trofoblast apoptozundan kaynaklanan kalıntıları fagosite ederek gelişmekte olan fetüse karşı immün yanıtı önlediği düşünülmektedir (Abrahams ve ark., 2004; van Mourik ve ark., 2009).

İmplantasyon ve plasentasyon gerçekleşikten sonra, immün hücreler gebeliğin 2. trimesterinde fetal ve plasental büyümeyi desteklemek için anti-inflamatuvar sitokinler ekspre ederler (Faas ve ark., 2017). Mikro çevrede NK hücreleri, makrofajlar ve Treg hücreleri çoğunluktadır. NK hücreleri makrofajlarla etkileşime girerek Treg hücrelerinin oluşumunu indüklemektedir (Vacca ve ark., 2010). Gebelik sırasında Treg hücreleri, paternal antijenlere karşı gelişen immün yanıtları önleyerek anti-inflamatuvar bir ortamın korunmasında merkezi bir role sahiptir (Erlebacher, 2013). Gebeliğin 3. trimesterinde ise, uterus proinflamatuvar bir ortam hakimdir, immün hücreler miyometriyuma göç ederek doğum sırasında uterusun kasılmasına ve plasentanın ayrılmasına aracılık eder (Mor ve ark., 2011)

2.13. İnflamasyon İlişkili Programlı Hücre Ölümü: Piroptoz

Hayatta kalma, proliferasyon, farklılaşma ve hücre ölümü yaşamın temel süreçlerini temsil eder. Hücre ölümü, embriyo gelişimde rol oynar, organizmanın homeostazını sağlar ve hasarlı hücreleri ortadan kaldırır. Programlı hücre ölümü, hücre içi sinyal iletim yolları tarafından yönlendirilir. Hücre hasarının bir sonucu olarak gerçekleşen beklenmedik hücre ölümleri ise programlı hücre ölümü sınıfına girmez (Yan, 2020).

Piroptoz, doğuştan gelen bağışıklık sisteminde hücre dışı veya hücre içi yolaklar ile düzenlenen ve belirli morfolojik özelliklere sahip programlı hücre ölümüdür (Jorgensen ve ark., 2015). Proinflamatuvar programlı hücre ölümünü tanımlamak için kullanılan piroptoz terimi, Yunanca ateş anlamına gelen "pyro" ve düşme/ölüm anlamına gelen "ptosis" köklerinden türetilmiştir (Cookson ve ark., 2001).

Piroptoz ilk olarak 1992 yılında apoptozdan morfolojik olarak farklı bir şekilde seyreden ancak kaspaz bağımlı programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Zychlinsky ve ark.,

1992). 2001 yılında ise Cookson ve arkadaşları inflamasyon ilişkili programlı hücre ölümünü tanımlamak için ‘piroptoz’ terimini önermiştir (Cookson ve ark., 2001).

Piroptoz immün yanıtları düzenleyerek bakteriyel ve viral kaynaklı enfeksiyonların engellenmesinde rol oynamaktadır (Jorgensen ve ark., 2015).

Hücrelerde gerçekleşen piroptotik ölüm, hücre şişmesi, plazma membranının lizisi ve proinflamatuvar sitokinler olan interlökin 1 beta (IL-1 β) ve interlökin 18’in (IL-18) hücre dışına salınması ile karakterizedir (Zaki ve ark., 2011; Wallach ve ark., 2014). Piroptozun makrofajlar, monositler ve dendritik hücreler gibi özelleşmiş immün hücrelerde gerçekleşmesine ek olarak, bağırsak epitel hücreleri (Lei-Leston ve ark., 2017), trofoblast hücreleri (Cheng S. B. ve ark., 2019) ve hepatosit hücrelerinde (Li H. ve ark., 2019) gerçekleştiği rapor edilmiştir.

2.14. Piroptozun Morfolojik Özellikleri

Piroptoz, apoptoz ve nekrozdan sonra keşfedilen yeni bir programlı ve inflamatuvar ölümdür (Li H. ve ark., 2019)

Apoptoz, hücre büzülmesi, nüklear yoğunlaşma, nüklear fragmentasyon ve membran tomurcuklanması gibi morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Nekroz (diğer adıyla onkoz) ise sitoplazmik şişme, organellerin genişlemesi, kromatin yoğunlaşmasının olmaması ve hücre içi içeriğin düzensiz dağılması ile karakterizedir (Majno ve ark., 1995).

Piroptoz, DNA hasarı, kromatin yoğunlaşması ve kaspaz aktivasyonu gibi apoptozda görülen özelliklere sahipken, kendine özgü morfolojik özellikleriyle apoptozdan ayrılmaktadır (Şekil 2.11). Piroptotik hücrelerde kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu gözlenmesine rağmen, apoptotik hücrelerden farklı olarak nükleusları bozulmadan kalır (Bergsbaken ve ark., 2007; Jorgensen ve ark., 2015; Xu ve ark., 2018). Piroptotik hücreler DNA hasarı gösterir ve TUNEL pozitifler ancak bu kriterler apoptotik hücelere kıyasla düşük yoğunlukta gözlenir (Jorgensen ve ark., 2015).

Ayrıca piroptoz sırasında meydana gelen por oluşumu, hücre içine su girişine neden olur, hücrelerde şişme ve ozmotik lizise sebep olur (Fink ve ark., 2006; Jorgensen ve

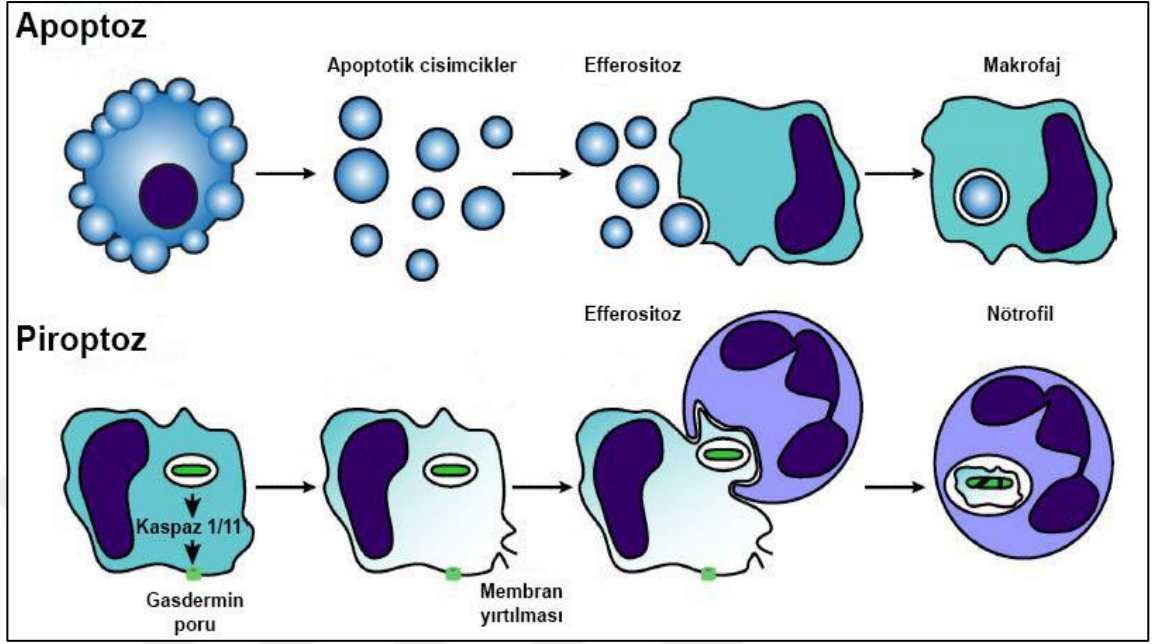
ark., 2015). Piroptoz görülen hücreler ile karşılaştırıldığında, apoptoz görülen hücreler membran bütünlüğünü korumaktadır (Brennan ve ark., 2000).

Nekroz ve piroptoz, hücrenin parçalanmasına ve sitosolik içeriğin salınmasına neden olurken, apoptozda hücre apoptotik cisimlere ayrılmaktadır. Apoptotik cisimler bir membran ile çevrili olup apoptoza uğrayan hücrelerin çekirdek ve sitoplazma parçalarını içermektedir. Apoptoz sırasında sitosolik içerikler salınmaz, apoptotik cisimciklerin fagosite edilmesiyle ortadan kaldırılır, ancak fagositoz gerçekleşmezse apoptotik cisimler sekonder nekroz adı verilen bir süreç ile parçalanırlar (Majno ve ark., 1995)

Apoptotik cisimlerin miktarı makrofajların fagositoz kapasitesini aşmadıkça dokuya zarar vermeden ortadan kaldırılmakta, böylelikle inflamasyon gerçekleşmemektedir. Nekroz ve piroptoz sırasında ise inflamasyon meydana gelmektedir (Majno ve ark., 1995).

Apoptoz ve piroptoz kaspaz aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Kaspaz-3, 6, 7, 8 aktivasyonu yalnızca apoptoz sırasında meydana gelir. Piroptoz sırasında inflamatuvar kaspazlar olan kaspaz-1, kaspaz-4 ve kaspaz-5 (farelerde kaspaz-11) (Brennan ve ark., 2000; Kayagaki ve ark., 2011; Kolb ve ark., 2014) aktivasyonu gerçekleşir. Bununla birlikte, apoptozun ayırt edici özelliği olarak kabul edilen kaspaz-3'ün de piroptozda da rol aldığı keşfedilmiştir (Wang Y, 2017).

Piroptoz ve apoptozda gözlenen diğer bir ortak özellik ise annexin V ile pozitif boyanmalarıdır. Annexin V, hücre membranının iç yaprağındaki fosfatidil serine bağlanır. Apoptoz sırasında, fosfatidil serin iç yaprakta dış yaprağa yer değiştirerek annexin V ile pozitif hücre boyanmasına neden olur (Koopman ve ark., 1994). Piroptoz sırasında ise plazma membranında oluşan porlar sayesinde annexin V hücreye girerek membranın iç yaprağındaki fosfatidil serine bağlanabilmektedir. Ayrıca 7-aminoaktinomisin veya propidyum iyodür gibi membran geçirimsiz boyalar gözeneklerden girerek piroptotik hücreleri boyarken apoptotik hücreleri boyamaz (Brennan ve ark., 2000; Edgeworth ve ark., 2002; Fink ve ark., 2006; Silveira ve ark., 2010).



Şekil 2.11. Apoptoz ve piroptoz arasındaki morfolojik farklar (Kovacs ve ark., 2017)

2.15. Piroptozun Moleküler Mekanizmaları

Piroptozun moleküler mekanizmasında inflamazomlar görev almaktadır. İnflamazomlar PRR (pattern recognition receptor/patern tanıma reseptörleri) içeren multimoleküler kompleksler olup, inflamatuvar yanıtları uyarak piroptozu tetiklemektedir (Kolb ve ark., 2014; Guo H. ve ark., 2015; Wang Y, 2017). PRR, PAMP (pathogen-associated molecular patterns/patojenle ilişkili moleküler patternler) ve DAMP'ları (damage-associated molecular patterns/hasarla ilişkili moleküler paternler) tanır (Lamkanfi ve ark., 2014; Guo H. ve ark., 2015). PRR ailesi tipik olarak TLR (Toll-like receptors/ Toll benzeri reseptörleri), NLR (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat receptor/ nükleotid bağlanma alanı ve lösin açısından zengin tekrar içeren reseptörleri) ve AIM (absent in melanoma) benzeri reseptörleri içerir (Takeda ve ark., 2005; Kanneganti ve ark., 2007; Thi HTH ve ark., 2017).

NLR'ler, ASC (Apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain/C-terminal kaspaz alım alanı içeren apoptoz ile ilişkili benek benzeri protein) ile birlikte DAMP'leri ve PAMP'leri tanıdıktan sonra kaspaz-1'i aktive ederek piroptozu başlatır. Piroptoz, kanonik inflamazom yolağında kaspaz-1 aktivasyonu ile kanonik olmayan inflamazom yolağında ise insanlarda kaspaz-4/5 aktivasyonu ve farelerde

olur (Aachoui ve ark., 2013). NLRP1 inflamazomu athrax öldürücü toksini ve MDP'yi (muramil dipeptid) tanır (Franchi ve ark., 2009a). NLRC4 inflamazomu flagellin ve MDP gibi PAMP'lar tarafından uyarılır (Miao ve ark., 2010; Zhao ve ark., 2011). AIM2 inflamazomu endojen veya patojen kaynaklı çift sarmallı DNA (dsDNA) tarafından aktive edilir (Roberts ve ark., 2009). NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3/diğer adıyla NALP3) inflamazomu, reaktif oksijen türleri (ROS), mitokondriyal DAMP'lar, bakteriyel por oluşturuucu toksinler ve hücre dışı RNA'nın yanı sıra monosodyum ürat ve kolesterol gibi kristal yapılar tarafından aktive edilir (Davis ve ark., 2011; Latz ve ark., 2013; Rathinam ve ark., 2016). ASC, kaspaz-1'in aktivasyonuna aracılık eder, prokaspaz-1'in yarıklanarak aktive olmasını sağlar. (Schroder ve ark., 2010). Prokaspaz-1'in yarıklanması ile p10 ve p20 tetramerleri oluşur (Schroder ve ark., 2010; Sun Q. ve ark., 2016) (Şekil 2.13.).

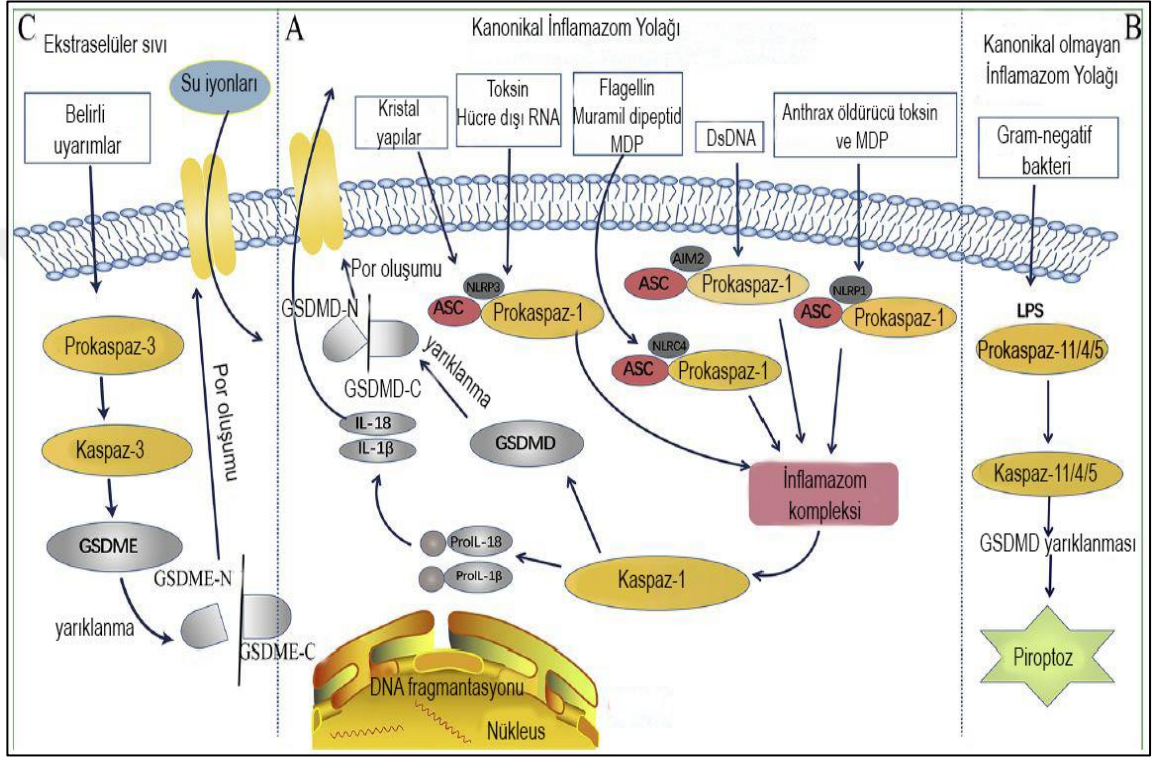
Kaspaz-1 aktivasyonu pro IL-18 ve pro IL-1 β 'yı proteolitik olarak keserek inflamatuvar reaksiyonları tetikleyen IL-18 ve IL-1 β 'nın aktif formlarını oluşturur (de Gassart ve ark., 2015). Olgun inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine ek olarak aktif kaspaz-1 Gasdermin D'yi (GSDMD) keserek N-terminal (GSDMD-N) ve C-terminal fragmanlarına (GSDMD-C) ayırır. GSDMD-N, plazma membranında 10-15 nm iç çapa sahip porları oluşturur. Plazma membran porları, artmış ozmotik basınca, hücreye su girerek şişmesine, ozmotik lizise ve inflamatuvar hücre içi içeriklerin salınmasına neden olur (Fink ve ark., 2006)

2.15.2. Kanonikal Olmayan İnflamazom Yolağı

Kanonikal olmayan inflamazom yolağı, farelerde kaspaz-11 ve insanlarda kaspaz-4/5 tarafından tetiklenir (Şekil 2.13.). Gram-negatif bakteri veya konakçı kaynaklı lipopolisakkarit (LPS) doğrudan kaspaz-4/5/11'e bağlanır ve kaspaz aktivasyonunu gerçekleştirir (Kayagaki ve ark., 2015; Silke ve ark., 2017). Aktif kaspaz-4/5/11 GSDMD'nin fragmanlarına bölünmesini ve piroptozu indükler (Kayagaki ve ark., 2015).

Kanonikal ve kanonikal olmayan inflamazom yolaklarından bağımsız olarak yeni bir yolak keşfedilmiştir; apoptoz substratı olarak kabul edilen olgun kaspaz-3, GSDME'nin C-terminal fragmanı (GSDME-C) ve N-terminal fragmanı (GSDME-N) olarak

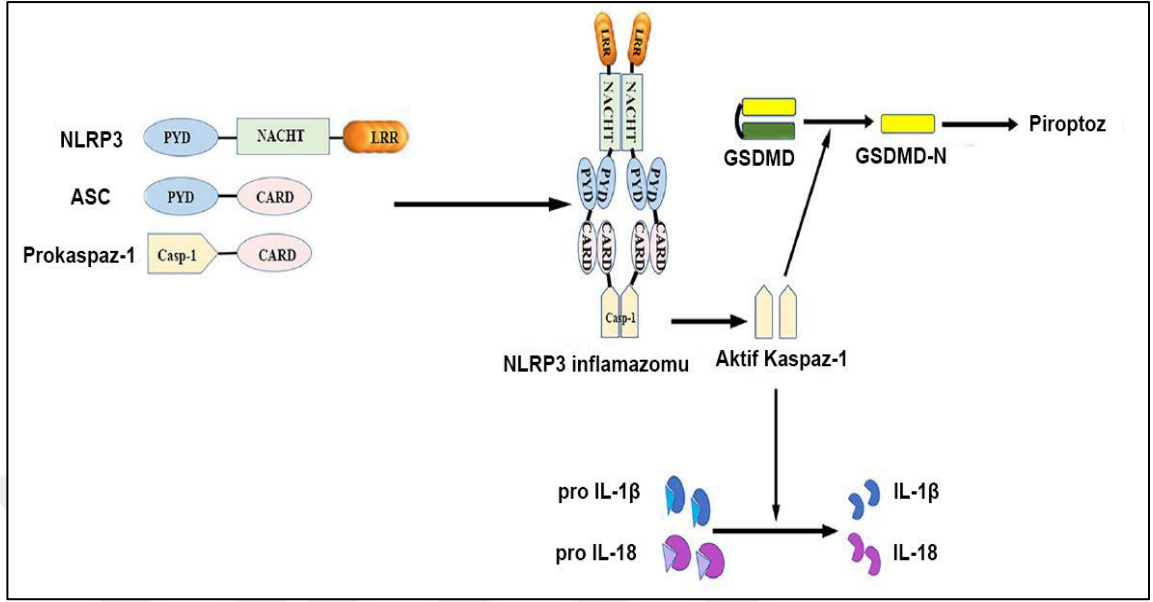
yarıklanmasını indükler. GSDME-N por oluşumuna katılarak piroptozu başlatır. Önceki çalışmalar kaspaz-3'ü apoptoz için önemli bir belirteç olarak rapor etmiştir. Yakın zamanda, kaspaz-3'ün GSDME'yi keserek aktive edebildiği ve bunun da piroptozu neden olduğu bulunmuştur (Şekil 2.13.) (Wang Y, 2017).



Şekil 2.13. Kanonik ve kanonik olmayan inflamazom yolları (Fang ve ark., 2020).

2.16. NLRP3 İnflamazom Yolağı

NLRP3 inflamazomu esas olarak NLRP3, ASC ve efektör molekül olarak bir sistein proteaz prokaspaz-1'den oluşur (Agostini ve ark., 2004). NLRP3-ASC tarafından gerçekleşen kaspaz-1 aktivasyonu (Schroder ve ark., 2010), IL-18 ve IL-1β'nin aktif formlarını oluşturarak hücre dışına salınımını sağlar (de Gassart ve ark., 2015). Ayrıca aktif kaspaz-1 Gasdermin D'yi (GSDMD) keser, serbest kalan N-terminal fragmanı plazma membranında por oluşturur ve piroptozu başlatır (Fink ve ark., 2006) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. NLRP3 inflamazomunun yapısı ve fonksiyonu (Song L. ve ark., 2017).

2.16.1. NLRP3

NLRP3, bir aminoterminal PYD alanı, bir nükleotit bağlayıcı NACHT alanı ve bir karboksiterminal lösin açısından zengin tekrar (LRR) alanı içeren üçlü bir proteindir (Mangan ve ark., 2018). NLRP3 (NACHT, LRR ve PYD alanları içeren protein 3 [NALP3], diğer adıyla kriyopirin), insanlarda kromozom 1'in uzun kolunda bulunan NLRP3 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Hoffman ve ark., 2000). Sitosolik doğal bağışıklık sensörü olan NLRP3, enfeksiyon ve steril inflamasyon tarafından tetiklenir (Akbal ve ark., 2022).

NLRP3'ün NACHT domeyni ATPaz aktivitesine sahiptir. NLRP3 aktivasyonu için ATP'nin NACHT domeynine bağlanması gerekmekte, NACHT domeynindeki bir mutasyon NLRP3 aktivasyonunu inhibe etmektedir (Duncan ve ark., 2007). NLRP3 inflamazomunun en güçlü ve seçici inhibitörlerinden biri olarak kabul edilen MCC950'nin NLRP3 NACHT domeyni Walker B motifine doğrudan bağlanarak NLRP3 inflamazom oluşumunu bloke ettiği bildirilmiştir (Coll ve ark., 2019). Ayrıca NLRP3, viral RNA, lizozomal hasar, hücre dışı ATP, glikolitik veya mitokondriyal metabolizmanın inhibisyonu ve hücre membranının potasyum iyonlarına

permeabilizasyonu dahil olmak üzere birçok uyarılar ile aktive olduğundan hücresel stresin önemli bir entegrasyon noktası olduğu düşünülmektedir (Liston ve ark., 2017).

Dinlenme halindeki hücrelerde bulunan NLRP3 miktarı aktivasyon için tek başına yeterli değildir. ASC ve pro-kaspaz 1 seviyeleri de hücre içinde stabil olduğundan mevcut NLRP3 miktarının inflamazom aktivasyonunu düzenleyen önemli bir sınırlayıcı faktör olduğu düşünülmektedir (Bauernfeind ve ark., 2009).

Birçok hücrede NLRP3 aktivasyonu için iki sinyal gerekmektedir. İlk sinyal NLRP3 geninin transkripsiyonunu başlatmakta, hücreyi hazırlamakta ve NLRP3 ekspresyonunu artırmaktadır. Bu sinyal hazırlama (priming) aşaması olup nükleer faktör- κ B'yi (NF- κ B) aktive eden Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein 2 (NOD2), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) reseptörü ve tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörlerin dahil olduğu PRRlerin devreye girmesiyle gerçekleşir (Bauernfeind ve ark., 2009; Franchi ve ark., 2009b). NF- κ B ve bu reseptörler tarafından aktive edilen olası diğer transkripsiyon faktörleri, NLRP3'ün transkripsiyonunu ve pro-IL-1 β dahil olmak üzere diğer önemli proinflamatuvar genleri indükler.

Hazırlanma aşaması NLRP3'ün translasyonunu engelleyen mikroRNA'lar, hücresel metabolik yolların aktivitesi ve G proteini-bağlı reseptör (GPCR) sinyal kaskadları dahil olmak üzere birçok mekanizma ile düzenlenmektedir (Prochnicki ve ark., 2017). NLRP3 aktivasyon aşaması ise hazırlanan hücrenin hücresel bağlamda aktive edici bir uyarana maruz kalmasıyla birlikte NLRP3'ün ASC ve kaspaz 1 ile bir kompleks oluşturmasıyla gerçekleşir.

NLRP3 inflamazomu ilk olarak Muckle-Wells otoinflamatuvar hastalığı ile karakterize edilmiştir (Martinon ve ark., 2002; Agostini ve ark., 2004). Kaspaz-1 aktivasyonuna aracılık ederek IL-1 β ve IL-18'in işlenmesine ve salınmasına yol açan NLRP3 inflamazomu, hem akut hem de kronik inflamatuvar tepkilerin gelişmesinde önemlidir (Sutterwala ve ark., 2006; Masters ve ark., 2010; Walsh ve ark., 2014).

2.16.2. Kaspaz 1

Apoptotik ve piroptotik hücre ölümlerini başlatan kaspaz ailesi üyeleri tanımlanmış diğer programlı hücre ölümlerinde rol almamaktadır. Proteaz olan kaspaz üyeleri, aspartik asit kalıntılarını takiben hedef proteinleri parçalamak için aktif bölge sistein residularını (kalıntılarını) kullanmaktadır (Miao ve ark., 2011; Molla ve ark., 2020). Bu proteazlar apoptotik (Kaspaz-2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) veya inflamatuvar (Kaspaz-1, 4, 5, 11) olarak sınıflandırılmaktadır (Siegel, 2006).

Apoptotik kaspazlar ya başlatıcı ya da efektör kaspazlar olarak tanımlanmaktadır. Başlatıcı kaspazlar, intrinsik veya ekstrinsik yolları aktive eden belirli bir başlatıcı olaya yanıt vererek apoptozun başlamasını indüklemektedir (Siegel, 2006). Apoptotik kaspazların aksine, inflamatuvar kaspazlar için başlatıcı ve efektör fonksiyonlar tanımlanmamıştır.

Kaspaz-1 en iyi tanımlanan inflamatuvar kaspazdır. İlk olarak IL-1 β dönüştürücü enzim olarak tanımlanmış (IL-1 β converting enzyme, ICE1) Kaspaz-1, inflamatuvar sitokinler IL-1 β ve IL-18'in yanı sıra piroptozun başlamasını indükleyen Gasdermin D'nin öncül formlarını proteolitik olarak aktif olgun peptitlere bölen evrimsel olarak korunmuş bir enzimdir (Cerretti ve ark., 1992; Thornberry ve ark., 1992; Mariathasan ve ark., 2004; Denes ve ark., 2012). Bu nedenle Kaspaz-1, inflamatuvar süreçlerin anahtar bir aracı olarak kabul edilmektedir.

Kaspaz-1, 20 kDa (p20) ve 10 kDa (p10) alt birimlerinden oluşan bir zimojendir. Sitoplazmada aktif olmayan pro formunda bulunan Kaspaz-1 proteolitik bölünmeler ile aktive edilmektedir. Aktif Kaspaz 1, p20 ve p10'dan oluşan iki heterodimer içerir. Hem p20 hem de p10 alt birimlerini kapsayan aktif katalitik bir alanı içermesinin yanı sıra, katalitik olmayan bir kaspaz aktivasyon ve toplama alanı (CARD) içermektedir (Wilson ve ark., 1994).

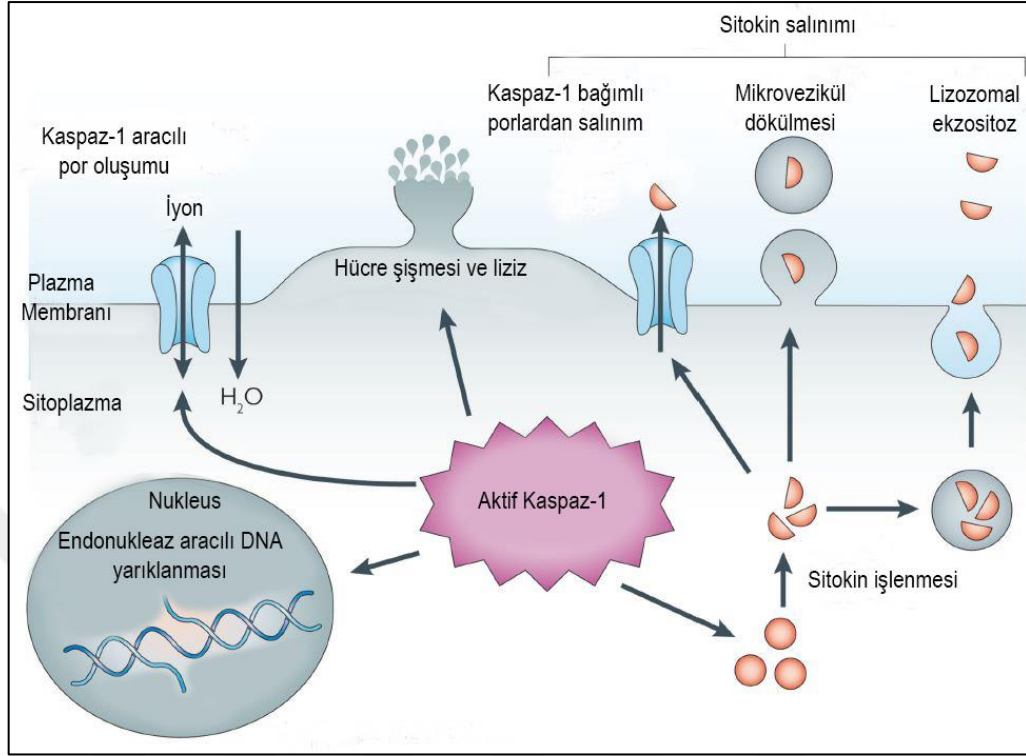
Kaspaz-1'in CARD alanı ASC ve NLR'lere ait CARD alanlarına bağlanarak CARD-CARD etkileşimleri yoluyla inflamazomu oluşturmaktadır (Mariathasan ve ark., 2004; Lu A. ve ark., 2016).

Kaspaz aktivasyon mekanizmaları ilk olarak NLR ailesi üyesi olan Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apoptotic protease activating factor 1, APAF-1) ile tanımlanmıştır. APAF-1, bir CARD sinyalleme alanı ve bir WD40 tekraralama alanı içermektedir. WD40 tekrarları APAF-1'in NOD alanı ile etkileşime girerek inaktif formda kalmasını sağlamaktadır. WD40 tekrarlarının sitokrom C'ye bağlanmasıyla birlikte ise yedi APAF-1 monomeri bir araya gelerek apoptozom adı verilen bir yapıyı oluşturması için oligomerizasyonuna izin vermektedir (Bao ve ark., 2007).

Kaspaz-1 aktivasyonu da apoptozomlara benzer yapıda bulunan ve inflamazom olarak isimlendirilen protein kompleksleri tarafından düzenlenmektedir.

NLRC4 ve murin NLRP1b, Kaspaz-1'in CARD alanı ile doğrudan etkileşime giren CARD alanlarını içermekte ve durum inflamazomları APAF-1 apoptozomuna doğrudan benzemektedir (Miao ve ark., 2007).

NLRC4 ASC ihtiyacını ortadan kaldırarak doğrudan Kaspaz-1'i aktive edebilmesine ek olarak (Richards ve ark., 2001), CARD-CARD etkileşimi yoluyla da ASC odaklarının oluşumunu indüklemektedir. Bu durum NLRC4'ün ASC bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla Kaspaz-1'i aktive edebildiğini göstermektedir (Miao ve ark., 2011). NLRC4'den farklı olarak NLRP3 ise bir CARD alanı yerine bir Pyrin sinyalleme alanı içermektedir. NLRP3'ün Pyrin alanı, adaptör protein olan ASC'nin Pyrin alanı ile etkileşime girer. Bir Pyrin ve bir CARD alanlarından oluşan ASC, CARD-CARD etkileşimleri yoluyla Kaspaz-1'i aktive etmektedir (Schroder ve ark., 2010). NLR ailesi dışında AIM2 de inflamazom oluşturmaktadır. AIM2 ASC'yi tanıyan ve Kaspaz-1'in aktivasyonunda rol alan bir HIN200 alanı ve bir Pyrin alanı içermektedir (Hornung ve ark., 2010).



Şekil 2.15. Kaspaz-1 bağımlı piroptoz (Bergsbaken ve ark., 2009)

2.16.3. Gasdermin D

Kromozom 8 (8q24.3) üzerinde bulunan GSDMD geni tarafından kodlanan Gasdermin D, bir peptit bağlayıcı ile birbirine bağlanan 31 kDa N-terminal (GSDMD-N) ve 22 kDa C-terminal (GSDMD-C) alanlarından oluşmaktadır. Gasdermin D, Gasdermin A, B, C, D, E ve DFNB59 üyelerinin bulunduğu ve por oluşturma yeteneğine sahip korunmuş protein ailesinin bir üyesidir. Gasdermin ailesinin çoğu üyesi bir por oluşturu alan ve baskılayıcı alan içermekte ancak peptit bağlayıcıları açısından birbirinden farklıdır (Shi ve ark., 2015).

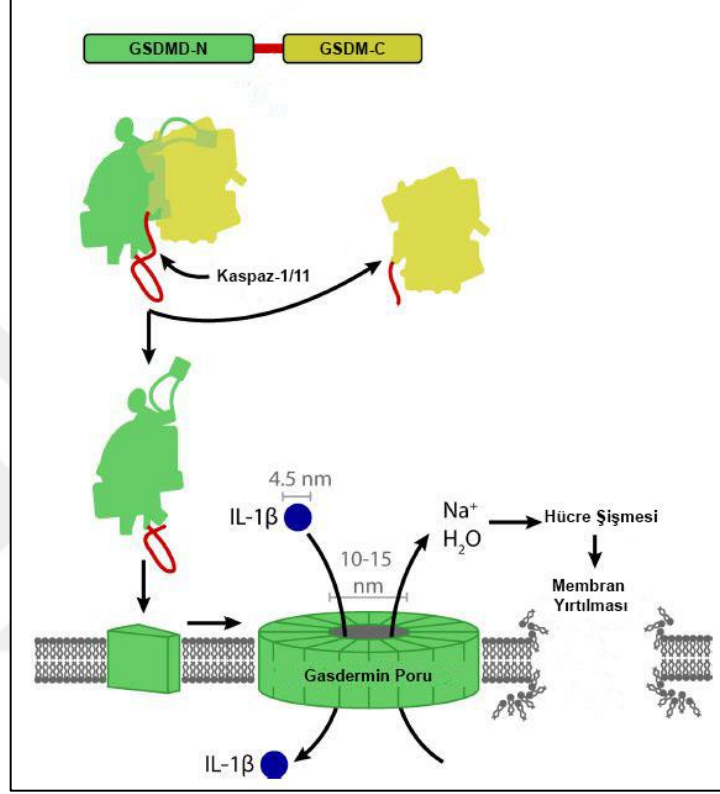
DFNB59 diğer Gasdermin ailesi üyelerinden farklı olarak kısa bir C-terminal alanı içermektedir. Gasdermin ailesi üyelerinin por oluşturu alanları ile birlikte hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir, ancak DFNB59'un hücre ölümünde rolü olup olduğu henüz bilinmemektedir (Kayagaki ve ark., 2015; Shi ve ark., 2015; Ding ve ark., 2016; Rogers ve ark., 2017).

Gasdermin D, 43 amino asitlik peptit bağlayıcı alan, 199 amino asitlik karboksi-terminal alanı (GSDMD-C) ve bağlanan 242 amino asitlik amino-terminal alanından (N GSDMD-N) oluşmaktadır. Gasderminin amino-terminal alanı por oluşturu alan olarak adlandırılmakta ve böylelikle piroptozu aracılık etmektedir (Shi ve ark., 2015; Ding ve ark., 2016; Liu X. ve ark., 2016). Bununla birlikte, por oluşturma mekanizması baskılayıcı alan olarak adlandırılan karboksi-terminal alanı tarafından kontrol altında tutulur (Shi ve ark., 2015).

Peptit bağlayıcı bu iki alan arasından ayrıldıktan sonra serbest kalan yaklaşık 16 por oluşturu alan, 10-15 nm çapında bir por oluşturmaya üzere oligomerize olur ve hücre membranına bağlanır (Aglietti ve ark., 2016; Ding ve ark., 2016; Liu X. ve ark., 2016). Gasdermin D poru, gliserol yapı iskelesinde (kardiyolipin) veya fosforlanmış baş gruplarda (fosfatidilinositol fosfat) çift fosfatlı lipidler içeren lipozomlar için afiniteye sahiptir. Negatif yüklü lipid türleri için en yüksek afiniteye sahip olan GSDMD-N, yüklü olmayan baş grup lipid fosfatidilinositole veya pozitif yüklü baş grup lipidleri fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamine bağlanmaz (Ding ve ark., 2016; Liu X. ve ark., 2016). Fosfatidilinositol fosfat türleri ve fosfatidilserin, plazma membranın sitosolik yaprağı ile sınırlı olduğundan, Gasdermin D yalnızca sitoplazmaya bakan yüzde por oluşturabilir. Böylece komşu hücreler, bitişik hücrelerdeki Gasdermin D'nin indüklendiği piroptozdan korunmaktadır (Liu X. ve ark., 2016).

Gasdermin D'nin plazma membranında por oluşturmaya birlikte plazma membranının normal geçirgenlik bariyeri bozulmaktadır. Bu bariyerin bozulmasıyla hücre içi sodyum ve potasyum dengesi değişmektedir. Normal şartlarda hücre içinde sodyum düşük, potasyum ise yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu konsantrasyon gradyanı, pozitif iyonları nispeten negatif sitoplazmaya çeken plazma membranı boyunca gerçekleşen elektriksel gradyan ile gerçekleşir. Plazma membranında por oluştuğunda potasyumu hücre dışına iten konsantrasyon gradyanının yarattığı kuvvetler, potasyumu sitoplazmaya çeken elektriksel kuvvetlerle dengelenmektedir. Ancak sodyumun hem konsantrasyon gradyanı hem de elektriksel gradyan tarafından hücre içine çekilmesiyle su girişi gerçekleşir ve hücre hacmi artar. Hücre hacmi membranın desteklediği kapasiteyi aştığında plazma membranı içi sıvı dolu büyük balonlar içinde kortikal hücre

iskeletinden ayrılmaya başlar ve sitosolik içeriklerin serbest kalmasına neden olan membran yırtılması gerçekleşir. Membran yırtılmasından sonra hücre içi ozmotik basıncın yeniden dengelendiği varsayılmaktadır (Kovacs ve ark., 2017).



Şekil 2.16. Gasdermin D ve piroptoz sırasında gerçekleşen por oluşumu (Kovacs ve ark., 2017)

2.16.4. İnterlökin 1 Beta

İnterökin 1 (IL-1) sistemi, iki agonist (IL-1 α ve IL-1 β), bir fonksiyonel sinyal reseptörü (IL-1R1), bir yardımcı protein (IL-1R), bir antagonist (IL -1RN) ve bir tuzak inhibitör reseptör (IL-1R2) içermektedir (Dinarello, 1994, 2011). Fare ve insanların IL-1 α ve IL-1 β cDNA dizileri arasında yüksek bir benzerlik vardır (March ve ark., 1985).

IL-1 ailesinin tüm bileşenleri 2. kromozom üzerinde bulunur. Her iki agonist başlangıçta 31 kDa'lık öncü proteinler olarak sentezlenir. Olgun proteinlerin moleküler ağırlığı 17 kDa'dır (Dower ve ark., 1986).

Her iki agonist aynı reseptöre bağlanmakta ve bu nedenle aynı aşağı akış sinyalini indüklemektedir ancak aktivasyon yolları farklıdır. IL-1 α ve IL-1 β 'nın aktivasyonu için

öncül formlarının proteolitik olarak işlenmesi gerekmektedir. Öncül formlarından proteolitik olarak N-terminal alanın kesilmesiyle C-terminal alanı reseptörleri ile etkileşime girmektedir.

IL-1 α 'nın kalpainler tarafından (Kobayashi ve ark., 1990), IL-1 β 'nin Kaspaz-1 tarafından (Thornberry ve ark., 1992) kesilerek aktif formlarına dönüştüğü bilinmektedir. Kaspaz-1 aktivasyonu pro IL-1 β 'in N-terminal alanını keserek IL-1 β 'nin aktif formunu oluşturur (de Gassart ve ark., 2015). Kaspaz-1'e ek olarak Kaspaz-8, Elastaz, Kimaz ve Proteinaz 3 gibi bir dizi doku ve/veya hücre tipi spesifik proteazın IL-1 β 'nin aktivasyonuna aracılık ettiği rapor edilmiştir (Pyrillou ve ark., 2020).

IL-1 sistemi, implantasyon ve pre-implantasyon embriyo gelişimi ile yakından ilgilidir. İnsanlarda endometriyum, trofoblast ve plasenta hücrelerinde ekspre edilen ve implantasyon ile embriyo gelişiminde rol alan faktörlerin IL-1 β tarafından indüklendiği gösterilmiştir. Bu sitokin, LIF (leukemia inhibitory factor/lösemi inhibe edici faktör) (Sawai ve ark., 1997; Gonzalez ve ark., 2004), PTGS2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2/prostaglandin endoperoksit sentaz 2 veya COX2) (Huang J. C. ve ark., 1998; Tamura ve ark., 2002) ve leptinin (Dimitriadis ve ark., 2005) endometriyumdaki ekspresyonlarını artırmaktadır. Ayrıca *in vitro* bir çalışmada IL-1 β 'nin insan sitotrofoblast metalloproteinaz aktivitesini ve invazyonunu artırdığı gösterilmiştir (Librach ve ark., 1994). İnsanlarda orta sekretuar faz endometriyumda IL-1 β ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Simon C ve ark., 1993). Kadınlarda, implantasyon penceresine karşılık gelen orta sekretuar faz endometriyumda, IL-1 β ekspresyonunun azalmasının abortusa sebep olduğu rapor edilmiştir (von Wolff ve ark., 2000). IL-1R1 endometriyum epitel ve stroma hücrelerinde mevcuttur, ekspresyonu menstrual siklus boyunca artar ve geç sekretuar fazda maksimum seviyeye ulaşmaktadır (Simon C ve ark., 1993; Bigonnesse ve ark., 2001). Farelerde IL-1 β 'nin endometriyum endotel hücrelerinde (Tackacs L, 1988), subepitel stroma ve daha derindeki stroma hücrelerinde (McMaster ve ark., 1992) ekspresyonu ve lokalizasyonu tespit edilmiştir. Fare peri-implantif dönem uterusu IL-1 β ekspresyon seviyesi gebeliğin 3. gününde artmaya başlayarak, gebeliğin 4. ve 5. günleri arasında en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Gebe farelere IL-1 antagonisti uygulandığında implantasyonun engellendiği rapor edilmiştir

(Simón C ve ark., 1998). Bu bulgular IL-1 β 'nın peri-implantif dönemde embriyo ve endometriyum arasındaki etkileşimde rol alarak embriyo implantasyonunu desteklediğini göstermektedir.

2.16.5. İnterlökin 18

IL-18 sistemi, IL-18, IL-18 reseptörü (IL-18R), IL-18 bağlayıcı proteini (IL-18BP) ve IL-18 öncüsü (proIL-18) üyelerini içeren bir polipeptit ailesidir. IL-1 β gibi inaktif formda üretilen IL-18, aktif kaspaz-1 veya diğer kaspazlar tarafından aktif forma dönüştürülür (Tsutsui ve ark., 1999; de Gassart ve ark., 2015; Fang ve ark., 2020). IL-18, IL-1 protein ailesi ile yapısal benzerliklere sahip olan proinflamatuvar bir sitokindir. Yapılan bir çalışmada IL-18 ekspresyonunun, insan endometriyumunda implantasyon penceresi sırasında arttığı gösterilmiştir (Huang H. Y. ve ark., 2006). IL-18 spiral arterlerin düz kas hücrelerinde tespit edilmiştir (Ledee-Bataille ve ark., 2005). Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB) görülen kadınların endometriyum dokularında IL-18'in düzensiz ekspresyonu gözlenmiştir (Ledee-Bataille ve ark., 2004; Ledee-Bataille ve ark., 2005; Petitbarat, 2011). IL-12 varlığında IL-18, interferon gama (IFN- γ) ve anormal matriks metalloproteinaz aktivitesini indükler, IL-12 yokluğunda ise IL-4 ve IL-13 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olmaktadır (Smeltz ve ark., 2001; Abraham ve ark., 2002). IL-12 ve IL-18 fare implantasyon bölgelerinde, uterus NK hücrelerinin aktivasyonunu sağlamakta ve anjiyogenik süreci kontrol etmektedir (Croy B. A. ve ark., 2003).

2.17. Piroptoz ve Gebelik İle İlişkili Çalışmalar

Ashworth ve arkadaşları 2010 yılında gebe olmayan ve gebe domuzlarda yaptıkları çalışmada IL-18 ve Kaspaz-1'in endometriyal ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Gebe olmayan endometriyum dokularına kıyasla gebe endometriyumda Kaspaz-1 ve IL-18 ekspresyonlarında artış gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada gebe domuzlara östrojen uygulaması yapılmış ve östrojen maruziyetinin endometriyumda IL-18 ve Kaspaz-1 ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Gebeliğin erken dönemlerinde östrojene maruz kalan domuzların endometriyumlarında Kaspaz-1 ekspresyonunun östrojene maruz kalmayan domuzlara kıyasla arttığı rapor edilmiştir. Tüm bu bulgular

sonucunda, endometriyal Kaspaz-1 ve IL-18'in domuzlarda gebeliğin oluşması ile ilişkili olduğunu ve gebeliğin erken döneminde östrojen maruziyetinin gebelerde endokrin bozulmaya sebep olarak, Kaspaz-1 ve IL-18 ekspresyonunu artırdığı yorumunu yapmışlardır (Ashworth ve ark., 2010).

Suzuki ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada gebe ve gebe olmayan sığırlardan elde edilen endometriyum dokuları ile embriyodan salgılanan gebelik tanıma sinyal molekülü olan Interferon tau (IFNT) ile kültüre edilmiş endometriyum epitel hücrelerinde apoptoz ve piroptoz hücre ölüm yollarını araştırmışlardır. Gebe olmayan gruba kıyasla, gebe endometriyum dokularında Kaspaz-7/8 ve Fas ilişkili ölüm alanına sahip protein (Fas associated protein with death domain/FADD) (apoptozla ilişkili), Kaspaz-4/11 ve NLRP3'ün (piroptozla ilişkili) ekspresyonunun yüksek olduğu tespit edilmiştir. IFNT ile kültüre edilmiş endometriyum epitel hücrelerinde gebe endometriyum dokularına benzer şekilde, apoptozla ilişkili Kaspaz-8 ve piroptozla ilişkili Kaspaz-11'in artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkan araştırmacılar gebe sığır endometriyal epitel hücrelerinde apoptoz, piroptoz gibi hücre ölüm yollarının gebelik sürecinde rol aldığını ve apoptoz ve piroptoz ile ilişkili proteinlerin IFNT tarafından indüklendiğini rapor etmişlerdir (Suzuki ve ark., 2018).

2016 yılında yapılan bir çalışmada fertil ve tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) görülen kadınlardan, menstrual siklusun 19-24. günleri arasında (implantasyon penceresi) endometriyum dokuları elde edilmiştir. NALP-3 ve ASC protein ekspresyonları Western blot tekniğiyle, Kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18 seviyeleri ise ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir. Fertil kadınların endometriyum dokularına kıyasla TGK görülen kadınların endometriyum dokularında, NALP-3 ve ASC ekspresyonları, Kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18 seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular sonucunda patojen veya hasarla ilişkili moleküler patenler tarafından uyarılan inflamazomun, endometriyumun anormal aktivasyonuna ve endometriyum reseptivitesinin olumsuz etkilenmesine sebep olarak tekrarlayan gebelik kayıplarının oluşmasına neden olabileceği yorumu yapılmıştır (D'Ippolito ve ark., 2016).

Gao ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) yaşayan ve fertil kadınlardan küretaj yoluyla villus ve desidua dokuları elde

etmişler ve inflamazomların rolünü Western blot, immüno Floresan ve RT-PCR yöntemleriyle araştırmışlardır. TGK yaşayan kadınların villus ve desidua dokularındaki NLRP3, ASC, Kaspaz-1, IL-1 β ekspresyonlarının fertil gruba kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada trofoblast hücre hattı TEV-1, lipopolisakkarit (LPS) veya düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) ile inkübe edilmiş, LPS ile inkübe edilen TEV-1 hücrelerinde, inflamazom ekspresyonunun arttığı ve invazyon aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir. TEV-1 hücrelerinin LPS’li ortamı ile kültüre edilen makrofaj hücre hattı RAW264.7 hücrelerinde ise inflamazom ekspresyonu ve hücre aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. LMWH ortamı ile kültürlenmiş hücrelerde ise LPS etkisinin inhibe edildiği gözlenmiştir. Tüm bu bulgular, TGK yaşayan hastalarda, anormal inflamatuvar yanıtı maternal-fetal arayüzdeki NLRP3 inflamazomunun aracılık edebileceğini, bu da trofoblast invazyonunu azaltabileceğini ve makrofaj aktivitesini artırarak erken dönemdeki embriyoda implantasyon başarısızlığına yol açabileceğini düşündürmüştür (Gao ve ark., 2020).

2019 yılında yapılan bir çalışmada TGK’lı hastaların endometriyumlarında, Kaspaz-1 aktivitesi, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonlarının sağlıklı kadınların endometriyumlarına kıyasla arttığı bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar CBA/J dişi fareler ile DBA/2J erkek fareleri çifleştirilerek elde ettikleri TSA (Tekrarlayan spontan abortus) fare modelinde Kaspaz-1 inhibitörü Ac-YVAD-CHO enjeksiyonu yapmışlar ve bu farelerde CD4+, CD25+ Treg hücrelerinin arttığını tespit etmişlerdir. Bunun yanında CD4+, IL-17A+ Th17 hücrelerinin azaldığını göstermişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkan araştırmacılar aktive edilmiş NLRP3 inflamazomunun Th17 ve Treg dengesizliğine sebep olarak TSA’nın patogeneğinde rol oynayabileceği yorumunu yapmışlardır (Lu M. ve ark., 2019).

2019 yılında yapılan bir çalışmada anti-inflamatuvar aktiviteye sahip Alfa-Lipoik Asit (ALA) ve miyoinositol’ün idiyopatik TGK yaşayan kadınlarda endometriyal NALP-3 ekspresyonu ve aktivasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sağlıklı ve TGK yaşayan kadınlardan orta sekretuar faza ait endometriyum dokuları elde edilmiştir. Daha sonra TGK görülen kadınlar 3 ay boyunca ALA ve miyoinositol ile tedavi edilmiş ve tedavi sonrası endometriyum dokuları elde edilmiştir. Dokularda immünohistokimya ve

Western blot ile NALP3, ELISA ile Kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18'in ekspresyonları belirlenmiştir. ALA+miyoinositol tedavisinin, TGK yaşayan kadınlarda endometriyal inflamazom ekspresyonu ve aktivasyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada TGK görülen kadınlardan tedavi öncesi alınan endometriyum dokuları *ex vivo* deneyler için kullanılmış ve ALA, miyoinositol ve ALA+miyoinositol ile kültüre edilmiştir. *Ex vivo* deneyler sonucunda da ALA'nın endometriyal inflamazom aktivitesini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar ALA tedavisinin TGK patogeneğinde gerçekleşen inflamazom aktivasyonunu engelleyebileceğini ve böylelikle tedavi geliştirilebileceğini bildirmişlerdir (Di Nicuolo F, 2019)

siRNA kullanılarak uteruslarında NLRP3 ekspresyonu knockdown edilen farelerde gebeliğin 7.5 günündeki implantasyon bölge sayılarının kontrol grubuna kıyasla azaldığı gösterilmiştir. Bu farelerin endometriyum epitel hücrelerinde epitel-mezenkimal geçişte rol alan E-kaderin, sitokeratin-7 ekspresyonlarının arttığı; N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar NLRP3'ün epitelyal-mezenkimal geçişi indükleyebileceği, uterusun reseptivite kazanması ve embriyonun endometriyum epitel hücrelerine tutunmasını destekleyebileceği yorumunu yapmışlardır (Cheng X. ve ark., 2021).

İnsan endometriyal stroma hücreleri (HESC) ile oluşturulan *in vitro* desidualizasyon modelinde endoplazmik retikulum stres (reticulum stress/RS) sensörleri (ATF6, PERK ve IRE1 α), katlanmamış protein yanıtı (unfolded protein response/UPR) belirteçleri (sXBP1 ve CHOP) ve NLRP3 protein ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, fertil kadınlara kıyasla TGK yaşayan kadınların endometriyum örneklerinde daha fazla IRE1 α ve daha az sXBP1 ve NLRP3 ekspre edildiği, RIF'li kadınların endometriyum dokularında ise fertil kadınlardan daha düşük sXBP1 ve NLRP3 ekspresyonu olduğu rapor edilmiştir (Grasso E. ve ark., 2018). Bu sonuçlar NLRP3 inflamazom yolağının desidua hücrelerinde gerçekleşen RS ve UPR ile bağlantılı olabileceğini, RS/UPR ve NLRP3 inflamazom aktivasyonunun endometriyal reseptivite ve trofoblast invazyonunu destekleyebileceğini düşündürmektedir.

2.18. Çalışmamızın Çıkış Noktası

Gebeliğin sağlıklı bir şekilde ilerleyebilmesi için embriyonun uterusu implante olması ve desidualizasyonun sağlıklı bir şekilde ilerlemesi önemlidir. Ayrıca peri-implantasyon periyodunda gerçekleşen inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde gerekli olan sitokin sinyallerindeki denge gebeliğin devamlılığı için önemlidir. Embriyo ve endometriyum arasındaki etkileşimin kısmen parakrin sitokinler tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Ayrıca farelerde yapılan çalışmalarda, embriyo implantasyonu sırasında hücre ölümleri olan apoptoz (Pampfer, 1999a), entoz (Li Y. ve ark., 2015) ve otofajinin (Su ve ark., 2020) blastosistin endometriyal lümen epiteli ve stromaya invaze olmasını kolaylaştırdığı rapor edilmiştir. Peri-implantasyon periyodunda gerçekleşen apoptoz, entoz ve otofaji hücre ölümlerine ek olarak piroptozun, embriyo implantasyonu, desidualizasyon mekanizmaları ve peri-implantasyon periyodunda gerçekleşen inflamatuvar yanıtta rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

Pro-inflamatuvar programlanmış hücre ölümünü tanımlamak için kullanılan piroptoz sırasında olgun inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine ek olarak aktif Kaspaz-1 plazma membranında por oluşumuna aracılık ederek, ozmotik basınç artışı, su akışı, hücre şişmesi, ozmotik lizis ve inflamatuvar hücre içi içeriklerin salınmasına neden olur. Piroptoz mekanizmasında rol alan NLRP3 inflamazom yolağı aktivasyonunun tekrarlayan gebelik kaybı (D'Ippolito ve ark., 2016; Di Nicuolo ve ark., 2019; Lu M. ve ark., 2019; Gao ve ark., 2020), endometriyoz (Guo X. ve ark., 2021; Irandoost ve ark., 2023), pre-eklampsia (C. Weel ve ark., 2017; Cheng S. B. ve ark., 2019; Nunes ve ark., 2021) patolojilerinde arttığı gösterilmiş olmasına rağmen embriyo implantasyonu ve desidualizasyon süreçlerinde NLRP3 inflamazom yolağının rolleri hakkındaki çalışmalar kısıtlıdır (Grasso E. ve ark., 2018; Cheng X. ve ark., 2021).

Gebeliğin erken döneminde uterusu görülen hücre ölüm mekanizmaları apoptoz, entoz ve otofajinin yanı sıra inflamasyon ilişkili programlı hücre ölümü piroptozun görev alıp almadığını belirlemek için piroptoz yolağı üyelerinin lokalizasyon ve ekspresyonlarını peri-implantatif dönem fare uterusu ve implantasyon bölgelerinde araştırdık.

Projemizde gebe olmayan östrus faz ve peri-implantif dönem dişilerin uterus/implantasyon bölgeleri ve 5. gebelik gününün inter implantasyon bölgelerinde NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18'in lokalizasyon ve ekspresyonlarını, immünohistokimya ve Western blot teknikleri ile belirledik. İnsanlarda implantasyon çalışmaları zorlukları ve etik kısıtlamalardan dolayı mümkün olamamaktadır. Bu alandaki bilgiler kemirgenlerde yapılan çalışmalardan elde edilmektedir. Bu nedenle NLRP3 inflamazom yolağı üyelerinin ekspresyon paternlerini peri-implantif dönemdeki farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinde araştırdık. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular ile bu yolağın gebeliğin erken dönemindeki olası rolleri hakkında temel bilgilere katkı sağlamayı hedefledik.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 08.02.2021 tarihli 1255/2021.02.009 protokol numaralı etik kurul onayı sonrası gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen Balb/c ırkı 36 adet dişi fare (6-8 haftalık) ve 10 adet erkek fare (10-12 haftalık) kullanılmıştır. Fareler su/besin kısıtlaması olmaksızın 12'şer saatlik aydınlık/karanlık döngüde tutulmuştur.

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneylerde kullanılacak fare sayısı için G*Power 3.1.9.4 programı ile güç analizi gerçekleştirilmiştir. Örneklem hesabı için Cohen d katsayısı 0,8 (geniş etki büyüklüğü) olarak alınmıştır. Her bir deney grubunun fare sayıları eşit olduğunda, alfa 0,05 anlamlılık ve 0,85 güç düzeyinde her grup için 6 farenin gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Peri-implantif dönem gebe fare gruplarını oluşturmak için, dişi fareler erkek fare ile aynı kafeste çiftleşmeleri sağlanmış, ertesi gün vajinal plak kontrolü yapılmıştır. Vajinal plak görülen dişiler gebeliğin birinci gününde olduğu kabul edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Çiftleşmenin ertesi günü tespit edilen vajinal plak görüntüsü (ok: vajinal plak)

Vajinal plağın görülmesi ile birlikte gebeliğin 1. gününde olduğu kabul edilen gebe fareler ile oluşturulan deney grupları aşağıda açıklanmış olup Tablo 3.1’de özetlemiştir.

Çalışmamıza ait deney grupları aşağıdaki gibidir;

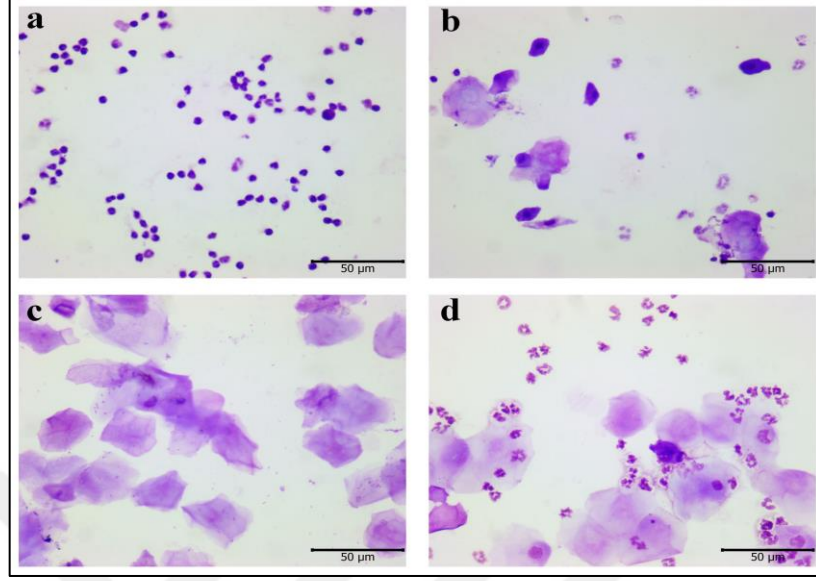
1. Östrus grubu (Ö) (n=6)
2. Gebeliğin 1. günü grubu (G1) (n=6)
3. Gebeliğin 4. günü grubu (G4) (n=6)
4. Gebeliğin 5. günü grubu (G5) (n=6)
 - I. İmplantasyon bölgesi (G5)
 - II. İnter-implantasyon bölgesi (G5-İ)
5. Gebeliğin 6. günü grubu (G6) (n=6)
6. Gebeliğin 8. günü grubu (G8) (n=6)

Tablo 3.1. Östrus fazı ve peri-implantif dönem gebe fareler ile deney gruplarının oluşturulması (Ö; Östrus Grubu, G1; Gebeliğin 1. günü grubu, G4; Gebeliğin 4. günü grubu, G5; Gebeliğin 5. günü grubu, G6; Gebeliğin 6. günü grubu G8; Gebeliğin 8. günü grubu).

Deney Grupları	Ö (n=6)	Vajinal simirde skuamöz (kabuksu) yapıda büyük, çekirdeksiz epitel hücrelerinin varlığı				
	Gebelik günleri					
		1. gün	4. gün	5. gün	6. gün	8. gün
	G1 (n=6)	Vajinal plak kontrolü; Ovidaktan zigot eldesi; Uterus dokularının toplanması				
	G4 (n=6)	Vajinal plak kontrolü	Uterus boynuzundan blastosist eldesi; Uterus dokularının toplanması			
	G5 (n=6)	Vajinal plak kontrolü		Chicago mavisi enjeksiyonu; İmplantasyon bölgelerinin mavi bant şeklinde görünmesi; İmplantasyon ve inter-implantasyon bölgelerinin toplanması		
	G6 (n=6)	Vajinal plak kontrolü			Chicago mavisi enjeksiyonu; İmplantasyon bölgelerinin mavi bant şeklinde görünmesi; İmplantasyon bölgelerinin toplanması	
	G8 (n=6)	Vajinal plak kontrolü				İmplantasyon bölgelerinin toplanması

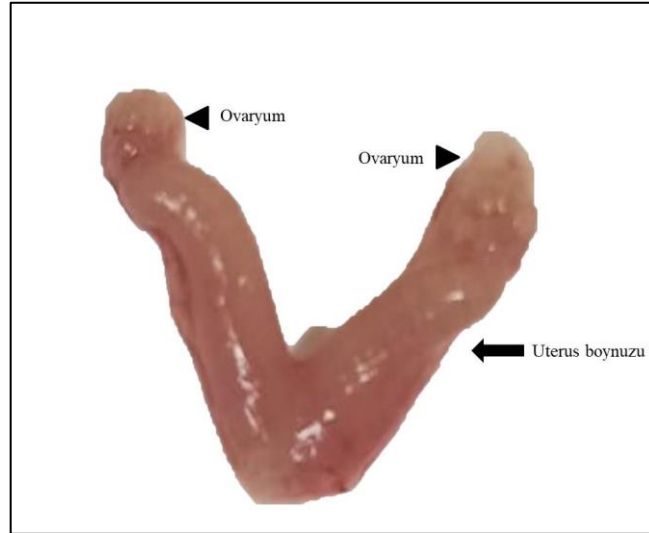
Östrus fazındaki dişi fareler ve belirtilen gebelik günlerinde sakrifiye edilen gebe farelerin uterus ve implantasyon bölgeleri, ayrıca gebeliğin 5. gününde bulunan farelerin implantasyon bölgeleri arasında kalan inter-implantasyon bölgeleri toplanmıştır. Östrus fazı ile gebelik günlerinin seçilme nedeni şu şekildedir: Östrus grubu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Gebeliğin 1. günü östrojen düzeyi yüksektir, embriyo ovidakta bulunmaktadır, uterus henüz pre-reseptif evrededir. Gebeliğin 4. gününde korpus luteumdan salınan progesteron ile 4. gün sabah salınan pre-implantasyon östrojenin etkisi bulunmaktadır. Embriyo uterusu geçmiştir, uterus reseptif evrededir, embriyo ile uterus lümen epiteli karşılıklı konumlanmıştır (apozisyon). Gebeliğin 5. gününde blastosist artık implante olmuştur ve desidualizasyon gerçekleşmeye başlamıştır. Gebeliğin 6. gününde primer desidual bölge (PDB) oluşmuştur. Gebeliğin 8. gününde sekonder desidual bölge (SDB) oluşmuştur.

Östrus grubu (Ö) (n=6): Dişi farelerin östrus fazında olduklarını doğrulamak için vajinal simir yapılmıştır. Simir işlemi, pastör pipetiyle PBS ile birlikte vajinal sıvının toplanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen vajinal sıvı, lam üzerine yayıldıktan sonra krezil viyole boyası ile boyanmıştır (Şekil 3.2). Simir örnekleri ışık mikroskobu altında incelenmiş ve skuamöz (kabuksu) yapıda, çekirdeksiz, büyük epitel hücrelerinin baskın olan fareler deneye dahil edilmiştir.

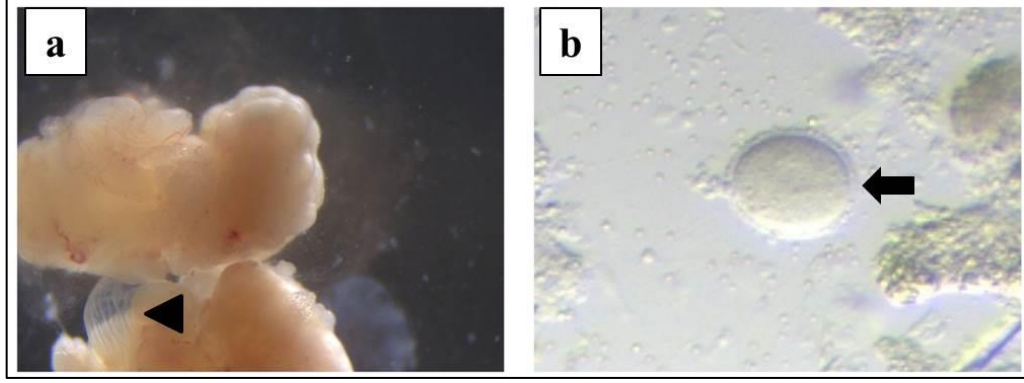


Şekil 3.2. Vajinal simir örneklerinin krezil viyole boyaması sonrası mikroskopik görüntüleri (a: Diöstrus b: Proöstrus c: Östrus d: Metöstrus)

Gebeliğin 1. günü grubu (G1) (n=6): Gebeliğin 1. gününde olduğu kabul edilen dişi farelerin gebe olduklarını kesinleştirmek için sakrifikasyon sonrası ovidaktları PBS içeren petri kabı içerisinde parçalanmıştır. Steryo mikroskop altında 1 hücreli embriyoların (zigot) olup olmadığı gözlenmiştir (**Şekil 3.3 ve 3.4**). Zigot görülmesi ile dişi fareler deney grubuna dahil edilmiştir.

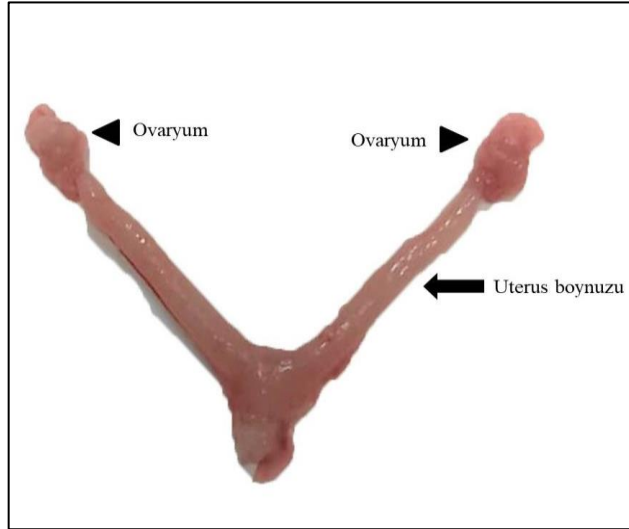


Şekil 3.3. Gebeliğin 1. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü. Gebeliğin 1. gününde uterus ödemlidir (ok başı: ovaryum, ok: uterus boynuzu)

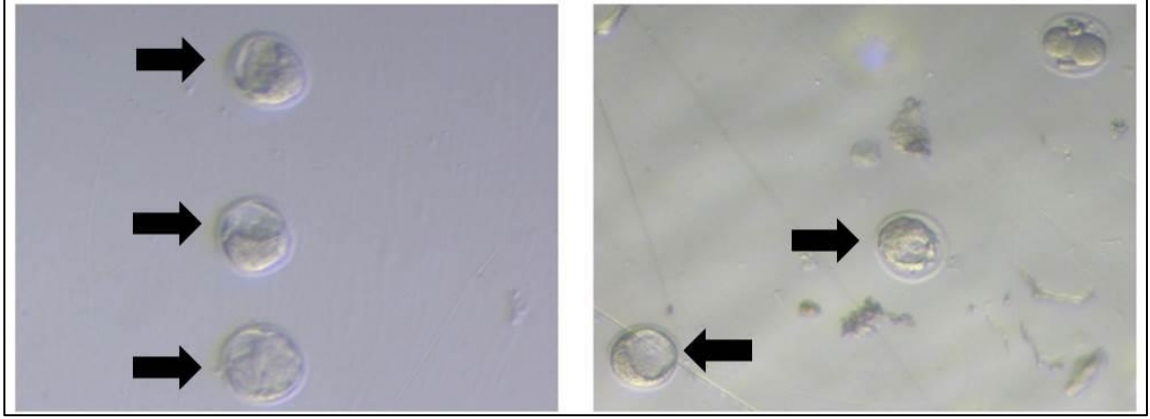


Şekil 3.4. Gebeliğin 1. gününde olan dişi farelerde zigot tespiti (a: Steryo mikroskop altında ovidakt görüntüsü ve genişlemiş ampulla (ok başı), b: Gebeliğin 1. günündeki farelere ait ovidaktlardan elde edilen zigotun (ok) mikroskobik görüntüsü)

Gebeliğin 4. günü grubu (G4) (n=6): Gebeliğin 4. gününde dişi farelerin gebe olduklarını kesinleştirmek için uterus boynuzlarından (Şekil 3.5.) biri PBS ile yıkanmıştır. Sıvı steryo mikroskop altında incelenerek blastosist olup olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.6.). Blastosist görüldüğünde, yıkanmayan diğer uterus boynuzu alınarak gebeliğin 4. günü grubuna dahil edilmiştir.

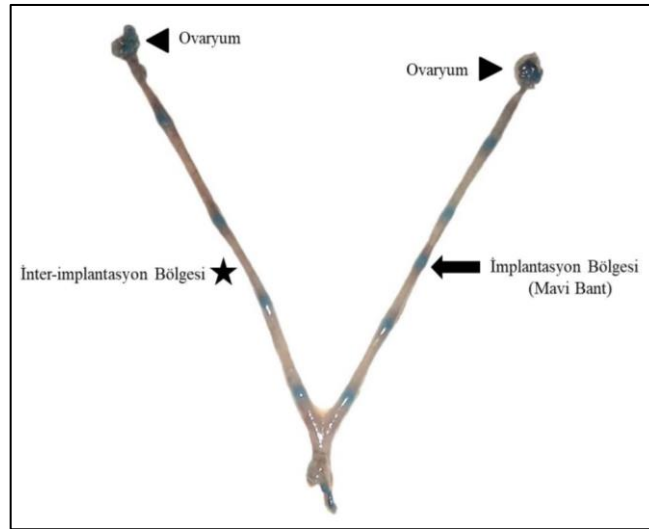


Şekil 3.5. Gebeliğin 4. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü (ok başı: ovaryum, ok: uterus boynuzu)



Şekil 3. 6. Gebeliğin 4. günündeki dişi farelerden elde edilen blastosistlerin mikroskopik görüntüleri (ok: blastosist)

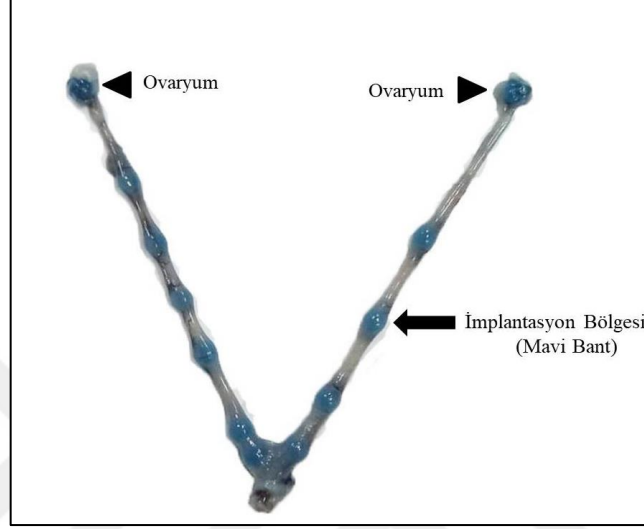
Gebeliğin 5. günü grubu (G5) (n=6): Gebeliğin 5. günündeki dişi farelerin gebe olduklarını kesinleştirmek için 1 gr Chicago mavisinin 100 ml %0,9 NaCl solüsyonu içerisinde çözülmesiyle hazırlanan boya kuyruk veninden 100 mikrolitre enjekte edilmiştir. Mavi bantlar şeklinde implantasyon bölgeleri görülmesi durumunda bu implantasyon bölgeleri alınmıştır. Ayrıca inter implantasyon bölgeleri de alınmıştır (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Gebeliğin 5. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü (ok başı: ovaryum, ok: Chicago mavi boyası enjeksiyonu sonrası mavi bant şeklinde görünen implantasyon bölgesi, yıldız: iki implantasyon bölgesi arasında kalan inter implantasyon bölgesi)

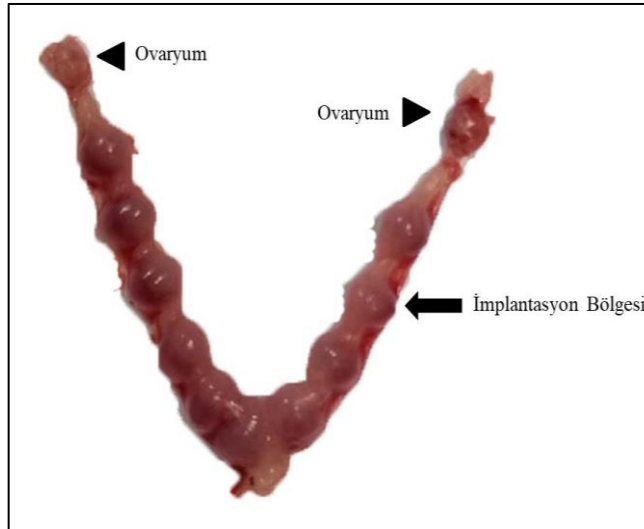
Gebeliğin 6. günü grubu (G6) (n=6): Gebeliğin 6. günündeki dişi farelerin gebe olduklarını kesinleştirmek için 1 gr Chicago mavisinin 100 ml %0,9 NaCl solüsyonu

içerisinde çözülmesiyle hazırlanan boya kuyruk veninden 100 mikrolitre enjekte edilmiştir. Mavi bantlar şeklinde implantasyon bölgeleri görülmesi durumunda bu implantasyon bölgeleri alınmıştır (Şekil 3.8.).



Şekil 3. 8. Gebeliğin 6. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü (ok başı: ovaryum, ok: Chicago mavi boyası enjeksiyonu sonrası mavi bant şeklinde görünen implantasyon bölgesi)

Gebeliğin 8. günü grubu (G8) (n=6): Gebeliğin 8. günündeki farelerde implantasyon bölgeleri çıplak gözle görülmektedir. İmplantasyon bölgeleri görüldüğünde bu bölgeler alınmıştır (Şekil 3.9.).



Şekil 3. 9. Gebeliğin 8. günündeki dişi fareye ait uterus görüntüsü, implantasyon bölgeleri çıplak gözle ayırt edilebilmektedir (ok başı: ovaryum, ok: implantasyon bölgesi)

Sakrifiye edilen farelerden alınan uterus/implantasyon bölgeleri %10'luk formalin içerisine alınmıştır. Dokuların bir kısmı ise kriyotüplere alınarak Western blot yöntemi için sıvı azot tankında muhafaza edilmiştir.

3.2. Doku Takibi ve Parafin Blok Eldesi

%10'luk formalin içerisine alınan dokular 24 saat fikse edilmiştir. Daha sonra dokular 3 saat çeşme suyunda yıkanarak fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Dokular derecesi artan etanolde 24 saat tutulmuştur. Dokular %100'lük etanolde 3 saat tutulup ardından ksilolde 4 dakika boyunca şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra dokular 56°C'lik etüvde parafin 1, parafin 2 ve parafin 3 içerisinde sırasıyla 1 saat, 1 saat ve 45 dakika tutulmuştur. Dokular parafin içeren kalıplara konulup, parafinin donması sağlanarak parafin bloklar elde edilmiştir.

Parafine gömülü uteruslar için trim yapıldıktan sonra uterusun 3 tabakası (endometriyum, miyometriyum, perimetriyum) görüldüğü andan itibaren 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. İmplantasyon bölgelerine ait parafin bloklar ise embriyo görülünceye kadar trim yapılmış ve embriyo görüldüğü andan itibaren 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler su banyosuna aktarıldıktan sonra pozitif yüklü lamalar üzerine alınmıştır.

3.3. İmmünohistokimya Yöntemi

İmmünohistokimya yöntemi sırasında kullanılan solüsyonlar, solüsyonların hazırlanması ve kimyasallar aşağıda açıklanmıştır.

✓ Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (Phosphate Buffer Saline, 1X PBS)

Fosfat tamponlu tuz solüsyonunu hazırlamak için 2000 ml distile suda aşağıdaki kimyasallar çözülmüştür, pH 7.4'e ayarlanmıştır.

- 2.85 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4 , 567547 #; Merck)
- 16 g sodyum klorür (NaCl , 1.06400.1000 #; Merck)
- 0.8 g potasyum hidrojen fosfat (KH_2PO_4 , M1048771000#; Merck)

✓ **Sitrik Asit Tamponu**

Sitrik asit tamponunu hazırlamak için 900 ml distile suda 2.1 g sitrik asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (1.0044.1000#; Merck) çözülmüştür, pH 6,0'ya ayarlanmıştır.

✓ **Bloklama Solüsyonu**

Ultra V Block (TA-125-UB#; Thermo Scientific)

✓ **%3'lük H_2O_2 Solüsyonu**

H_2O_2 solüsyonunu hazırlamak için karanlık ortamda 63 ml metanol (1.06009.2500#; Merck) içerisine 7 ml %30'luk H_2O_2 (18312#; Sigma Aldrich) eklenmiştir.

✓ **Primer Antikorlar**

- NLRP3 tavşan poliklonal antikor (NBP2-12446, Novus Biologicals USA)
- Kaspaz-1 tavşan poliklonal antikor (NBP1-45433, Novus Biologicals USA)
- Gasdermin D tavşan poliklonal antikor (NBP2-80427, Novus Biologicals USA)
- IL-1 β tavşan poliklonal antikor (ab205924, Abcam UK)
- IL-18 tavşan poliklonal antikor (ab191860, Abcam UK)

✓ **İzotip Kontrol**

Normal tavşan serumu (S-5000#; Vector Laboratories)

✓ **Sekonder Antikor**

Biyotinlenmiş keçi anti tavşan IgG (BA-1000#; Vector Lab)

✓ **Streptavidin Peroksidaz Kompleksi**

TS-125-HR; Thermo Scientific /Lab Vision

✓ **Kromojen**

3,3' Diaminobenzidin (DAB) substrat sistemi (#TA-125-HD Thermo Scientific /Lab Vision)

✓ **Mayer Hematoksilen**

1.09249.0500#; Merck

✓ **Entellan**

1.07961.0100#; Merck

3.3.1. İmmünohistokimya protokolü

Deney gruplarından elde edilen uteruslar/implantasyon bölgelerinde NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 proteinlerinin lokalizasyon ve ekspresyonları immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir. Kullanılan primer antikorlara ait dilüsyonlar ve katalog numaraları Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

İmmünohistokimya protokolü aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

- Etüvlenmiş kesitlerin deparafinizasyonu için 10’ar dakika 2 ksilolden ve 5’er dakika azalan etanol serilerinden geçirilmiştir.
- Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra üç kez 5’er dakika PBS ile yıkanmıştır.
- Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 0.01 M sitrik asit tamponu ile (pH:6.0) mikrodalga fırında 10 dakika 750W’ta kaynatılmıştır.
- Daha sonra kesitler PBS’te 5’er dakika yıkanmıştır.
- Endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %3’lük H₂O₂’de 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Kesitler özgül olmayan Immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek için bloklama serumu ile 7 dakika muamele edilmiştir.
- Daha sonra kesitler NLRP3, Kaspaz 1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 primer antikorları ile +4°C’de gece boyu inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün kesitler PBS ile üç kez 5’er dakika yıkandıktan sonra 45 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor ile inkübe edilmiştir.
- Sekonder antikor ile inkübasyon sonrası yıkanan kesitler 20 dakika HRP-konjuge streptavidin kompleksi ile inkübe edilmiştir.
- HRP-konjuge streptavidin kompleksi ile inkübasyon sonrası kesitler PBS ile üç kez 5’er dakika yıkanmıştır.

- Sinyalleri geliştirmek için kesitlere Diaminobenzidine (DAB) kromojeni damlatılmış ve yıkanmıştır.
- Kesitlere Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra dehidratasyon için kesitler sırasıyla artan etanol serilerinden geçirilmiştir. %100 etanolde 3 dakika bekletildikten sonra iki kez 10’ar dakika ksilollerde tutulmuştur.
- Son olarak kesitler entellan ile kapatılmıştır.

NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 immünohistokimyası yapılan kesitler Axioplan (Zeiss, Almanya) ışıık mikroskobunda değeriendirilmiş ve her deney grubuna ait kesitlerden fotoğraflar çekilmiştir.

Tablo 3.2.İmmünohistokimya yönteminde kullanılan antikorlar ve dilüsyonları

Primer Antikor / Dilüsyon	Sekonder Antikor/ Dilüsyon
NLRP3 / 1:500	Biyotinlenmiş Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:500
Kaspaz-1 / 1:100	Biyotinlenmiş Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:500
Gasdermin D / 1:200	Biyotinlenmiş Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:500
IL-1 β / 1:150	Biyotinlenmiş Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:500
IL-18 / 1:350	Biyotinlenmiş Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:500

3.4. İmmünohistokimyasal Image J Analizi

NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 immünohistokimyası yapılan kesitlerin değeriendirilmesi için Image J analiz programı kullanılmıştır. Bunun için her gruptan altı farklı fareye ait kesitten fotoğraflar çekilmiştir. Her kesitin 6 farklı bölgesinin X400 büyütmesine ait fotoğraflarda Image J programı kullanılarak yapılan “color deconvolution” sonrası DAB, hematoksilen ve arka zemin görüntüleri elde edilmiştir. Kesitlerdeki DAB yoğunlukları ölçülmüştür. Tüm grupların DAB yoğunluklarının matematiksel değerieleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

3.5. H-SCORE Analizi

NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 immünohistokimiyalarının değerlendirilmesinde ayrıca H-SCORE analizi kullanılmıştır. İki kişi tarafından her bir uterus veya implantasyon bölgesi için 200X büyütmede 5 farklı alandaki immünopozitif hücre sayımları yapılmıştır. Bütün gruplara ait kesitlerdeki NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 immünohistokimiyalarının yoğunluğu temel alınarak, hücreler aşağıdaki yoğunluklardan birine dahil edilmiştir:

- ✓ Boyanma yok: 0
- ✓ Zayıf fakat kontrole göre görülebilir: 1
- ✓ Boyanma belirgin: 2
- ✓ Boyanma yoğun: 3

Her bir kesit için gözlemlenen H-SCORE değeri, yoğunluk dereceleri ile boyanan hücre yüzdesinin çarpılmasıyla elde edilen sayılarının toplamıdır. $H\text{-SCORE} = \sum P_i (i+1)$, i =boyanmanın yoğunluğu, P_i =boyanan hücrelerin yüzdesi.

3.6. Western Blot Yöntemi

Western blot yöntemi için gruplardan elde edilen uterus ve implantasyon/inter implantasyon bölgeleri kriyotüpler içerisinde sıvı azot tankında muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen dokularda Western blot tekniği uygulanarak NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonları belirlenmiştir. Bunun için protein izolasyonu ve protein konsantrasyonu ölçümü ve SDS PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) yapılmıştır.

3.6.1. Dokulardan Protein İzolasyonu ve Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Tüm deney gruplarına ait uterus ve implantasyon/inter implantasyon bölgelerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Protein izolasyonu için kullanılan solüsyonlar, solüsyonların hazırlanması ve kimyasallar aşağıda açıklanmıştır.

✓ **100X Na- Ortovanadat**

10 ml Tris (pH: 10) içerisinde 0,184 gr Na-ortovanadat çözülerek hazırlanmıştır.

✓ **Liziz Tamponu**

10 ml 0.1 M Tris (pH 7.4) (161-0719#, Bio-Rad)

0.6 g Tris 40 ml distile su içerisinde çözülerek solüsyonun pH'sı HCl ile 7,4'e ayarlanmıştır.

- 90 ml distile su
- 1 ml X100 Na ortovanadat
- 1 g SDS

✓ **Proteaz İnhibitör Kokteyli**

Bir adet proteaz inhibitör kokteyl (PİK) tablet (11697498001#; cOmplete) 2 ml steril su içerisinde çözülmesiyle X25 PİK hazırlanmıştır. X1 PİK hazırlamak için steril su ile dilüye edilmiştir.

Protein izolasyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

- İçerisinde uterus ve implantasyon/inter implantasyon bölgelerinin bulunduğu tüpler sıvı nitrojenden çıkarılarak buz üzerine konulmuştur. Dokular tartılarak 1.5 ml'lik tüpler içerisine alınmıştır.
- Doku örnekleri, 0.2 g dokuya 600 µl liziz tamponu ve 10 µl PİK eklenerek sonikatör yardımı ile homojenize edilmiştir.
- Homojenize edilen dokular +4°C'de 15000 g 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar yeni tüplere alınmıştır.

Protein konsantrasyonu ölçümü sırasında kullanılan kimyasallar, solüsyonlar ve cihazlar aşağıda açıklanmıştır.

- ✓ Bovin Serum Albumin (BSA) (A-420-100#, GoldBio)

- ✓ Bisinkoninik Asit Kit (BCA):
 - Bisinkoninik asit (B9643#, Sigma)
 - Bakır (II) sülfat (C2284#, Sigma)
- ✓ İnkübatör: Nüve EN 500
- ✓ Spektrofotometre: µQuant BioTek Spectrophotometer

Protein konsantrasyonu aşağıdaki şekilde ölçülmüştür.

- Bovine serum albümin (BSA) oranı 1 mg/ml olacak şekilde 5 mg/5 ml distile su içerisinde çözülmüştür.
- BSA'nın farklı dilüsyonları (S0-S7) oluşturulmuştur.
- S0 tüpüne 5 mg/5 ml BSA'dan 1000 µl konulup, diğer tüplere (S1-S7) ise 500 µl liziz tamponu eklenmiştir.
- İlk tüpten (S0) 500 µl alınarak diğer tüpe (S1) ilave edilerek dilüye edilmiştir.
- Bu işlem diğer tüplere sırasıyla uygulanmıştır.
- BCA çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
- Kuyucuklara 25 µl BSA + 200 µl BCA çalışma solüsyonu eklenmiştir.
- Kuyucuklara 25 µl liziz tamponu + 200 µl BCA çalışma solüsyonu eklenmiştir.
- Kuyucuklara 1/50 dilüsyonundaki örnekten 25 µl + 200 µl BCA çalışma solüsyonu eklenmiştir.
- 520 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak protein miktarları belirlenmiştir.

3.6.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Protokolü

SDS-PAGE kullanılan solüsyonlar, solüsyonların hazırlanması ve kimyasallar aşağıda açıklanmıştır.

✓ **%30 Akrilamid-Bisakrilamid**

40 ml distile suda 15.4 g 37,5:1 oranında akrilamid-bisakrilamid (161-01-25#, Bio-Rad) çözülerek hazırlanmıştır.

✓ **4X Tris-HCl/SDS pH: 6,8**

20 ml distile su içerisinde 3,025 gr Tris (#1.08387.2500, Merck) çözölmüştür. Hazırlanan solüsyonun pH'ı 6,8'e ayarlanmıştır. Hacim distile suyla 50 ml'ye tamamlandıktan sonra solüsyon içerisinde 0,2 gr SDS (#161-0301, Bio-Rad) eklenmiştir.

✓ **4X Tris-HCl/SDS pH: 8,8**

40 ml distile suda 18.15 g Tris (1.08387.2500#, Merck) çözölmüştür. Hazırlanan solüsyonun pH'ı 8.8'e ayarlanmıştır. Toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra solüsyon içerisinde 0,4 gr SDS (#161-0301, Bio-Rad) eklenmiştir.

✓ **%10'luk Amonyum Persölfat (APS)**

1 ml distile suda 0.1 g APS (7727-54#; Amresco) çözünerek hazırlanmıştır.

✓ **N, N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)**

T-7024#, Sigma

✓ **Ayrıştırıcı Poliakrilamid Jel**

Ayrıştırıcı poliakrilamid jel hazırlanırken aşğıdaki solüsyonlar/kimyasallar kullanılmıştır.

- %30 Akrilamid-bisakrilamid
- X4 Tris-HCl/SDS pH: 8.8
- dH₂O
- %10 Amonyum persölfat
- TEMED

✓ **Toplayıcı Poliakrilamid Jel**

Toplayıcı poliakrilamid jel hazırlanırken aşğıdaki solüsyonlar/kimyasallar kullanılmıştır.

- %30 Akrilamid-bisakrilamid
- X4 Tris-HCl/SDS pH: 6,8
- dH₂O
- %10 Amonyum persülfat
- TEMED

✓ **5X Elektroforez Solüsyonu**

600 ml distile su içerisinde aşağıdaki kimyasallar çözölmüştür.

- 9 g Tris (161-0719#, Bio-Rad)
- 43.2 g Glisin (161-0718#, Bio-Rad)
- 3 g SDS (L4390#, Sigma)

Hazırlanan stok solüsyon 1X olacak şekilde distile su ile dilöye edilmiştir.

✓ **Transfer Solüsyonu**

700 ml distile su içerisinde aşağıdaki kimyasallar çözölmüştür.

- 14.3 g Glisin (161-0718#, Bio-Rad)
- 3 g Tris (161-0719#, Bio-Rad)

200 ml metanol (1.06.008.2500#, Merck) eklendi ve hacim distile su ile 1000 ml'e tamamlanmıştır.

✓ **10X TBS Tamponu**

800 ml distile su içerisinde aşağıdaki kimyasallar çözölmüştür.

- 60.55 g Tris (161-0719#, Bio-Rad)
- 87.66 g NaCl (368257#, Carlo Erba)

Hazırlanan solüsyonun pH'ı HCl ile 7.4'e ayarlanmıştır. Son hacmi distile su ile 1000 ml'e tamamlanmıştır.

✓ TBS-T Solüsyonu

1 ml Tween-20 (TA-125-TW#, Lab Vision) 1000 ml X1 TBS içerisine eklenerek hazırlanmıştır.

✓ Bloklama Solüsyonu

100 ml TBS-T'de 5 g süt tozu (170-6404#, Bio-Rad) çözülerek hazırlanmıştır.

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) aşğıdaki şekilde uygulanmıştır.

Elektroföze sırasında proteinlerin ağırlıklarına göre belirlenmiş yüzde ile ayrıştırıcı poliakrilamid jel hazırlanmıştır.

- Her kuyucuğa 8 µl örnek, protein konsantrasyonları eşit olacak şekilde konulmuştur.
- Örneklerin elektrofözezi 100 V, 50 mA 100 dakika gerçekleştirilmiştir.
- Elektroföze bitiminde bir sünger, iki filtre kağıdı, jel, bir membran, iki filtre kağıdı ve bir sünger olacak şekilde sandviç hazırlanmıştır.
- Western blot tankına konan sandviç sistemi üzerine transfer solüsyonu eklendikten sonra proteinlerin membrana transfer olması için +4°C'de gece boyu tranfer sağlanmıştır.
- Proteinlerin transferi sağlandıktan sonra membra TBS-T ile yıkanmış ve sonrasında %5'lik süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır.
- Bloklanan membranlar yıkama yapılmadan NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1β ve IL-18 primer antikörları ile gece boyu +4°C'de çalkalayıcının üstünde inkübe edilmiştir. Kullanılan primer antikörlara ait dilüsyonlar ve katalog numaraları **Tablo 3.3.**'de belirtilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında membranlar 15 dakikada bir TBS-T solüsyonu değıştirilerek 1 saat boyunca yıkanmıştır.
- Membranlar, primer antikörlara uygun bir bloklama solüsyonu içinde hazırlanan horseradish peroksidaz (HRP) konjüge sekonder antikörla oda sıcaklığında çalkalayıcının üstünde bir saat inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon sonrasında membranlar 15 dakikada bir TBS-T solüsyonu değiştirilerek 30 dakika boyunca yıkanmıştır.
- Membran Super Signal Chemiluminisans (CL)-HRP substratla 5 dk inkübe edilmiştir.
- Membrandaki protein bantları Azure C280 görüntüleme sistemi cihazı kullanılarak görüntülenmiştir.
- Her bir membran strip edildikten sonra yani muamele edilen antikor (NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18) uzaklaştırıldıktan sonra membran β -Aktin primer antikoru ile inkübe edilmiştir.
- Primer antikordan sonra yıkama, sekonder antikor uygulaması, yıkama, kemiluminisans uygulaması ve membrandaki protein bantların görüntülenmesi işlemleri tekrarlanmıştır.

Tablo 3.3. Western blot yöntemi sırasında kullanılan antikorlar ve dilüsyonları

Primer Antikor / Dilüsyon	Sekonder Antikor/ Dilüsyon
NLRP3 / 1:500	Peroksidaz İşaretli Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:4000
Kaspaz-1 / 1:500	Peroksidaz İşaretli Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:4000
Gasdermin D / 1:500	Peroksidaz İşaretli Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:4000
IL-1 β / 1:1000	Peroksidaz İşaretli Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:4000
IL-18 / 1:1000	Peroksidaz İşaretli Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:4000

3.6.3. Western Blot Bantlarının Kantitatif Değerlendirilmesi

Western blot bantlarının elde edilmesi sonrası Image J Programı ile ölçülmüştür. Her bir protein (NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18) için ölçülen matematiksel değerler β -Aktin için ölçülen değerlere bölünmüş, istatistiksel analiz uygulanarak gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır.

3.7. İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler sonunda elde edilen verilerin ortanca değerleri, standart sapmaları, ortalama $\pm$ standart hata (SEM) hesaplanmış, Kolmogorov–Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri sonunda dağılımların normal olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analiz one way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi (Tukey's multiple comparisons test) ile yapılmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak belirtilmiştir. $p < 0.05$ 'nin altında olan değerlerin anlamlı olduğu kabul edildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism versiyon 9 ile gerçekleştirildi.



4. BULGULAR

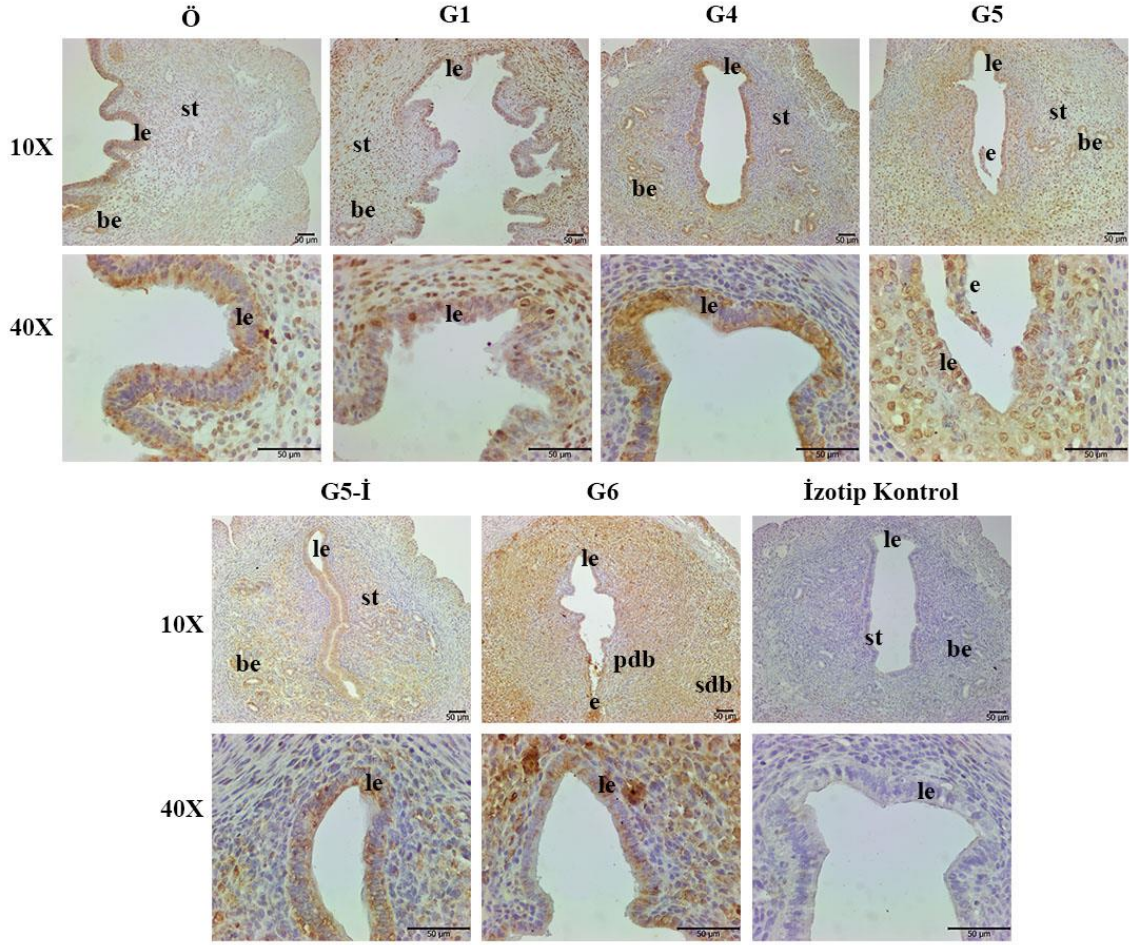
4.1. İmmünohistokimya Bulguları

Östrus fazı uteruslar ve peri-implantif döneme ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 proteinlerinin lokalizasyon ve ekspresyonları immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerine ait lümen epiteli, bez epiteli ve stroma alanlarında NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri Image J ve H-SCORE analizleri ile değerlendirilmiş ve gruplar arası istatistiksel olarak kıyaslanmıştır.

4.1.1. NLRP3 İmmünohistokimyası Bulguları

Endometriyum Lümen Epitelinde NLRP3 İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus fazı uteruslar, gebeliğin 1. ve 4. günü uteruslar, gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde NLRP3 proteini sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir. Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde ise NLRP3 proteini hem sitoplazmik hem de nüklear lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.1). NLRP3 ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında, en yoğun östrus fazı uteruslarına ait lümen epitelinde gözlenmiştir. Peri-implantif dönem gruplarında ise NLRP3 ekspresyonu en yoğun gebeliğin 4. günü uteruslarına ait lümen epitelinde gözlenmiştir. Ayrıca NLRP3 gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde hem sitoplazmik hem nüklear lokalizasyon gösterirken, gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerinde ise sadece sitoplazmik lokalizasyon göstermiş ve ekspresyon yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.1, 4.2).



Şekil 4.1. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki NLRP3 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Image J ile yapılan lümen epitelindeki NLRP3 ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslara ait lümen epitelinde NLRP3 ekspresyonu tüm gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p < 0.0001$).

Gebeliğin 1. gününde lümen epitelinde NLRP3 ekspresyonu, gebeliğin 4. günü uterus ($p = 0.0044$) ve 5. günü implantasyon bölgelerine ($p = 0.0175$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Gebeliğin 1. günü, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epiteli kıyaslandığında, NLRP3 ekspresyonlarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Gebeliğin 4. günü ve 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epiteli kıyaslandığında, NLRP3 ekspresyonlarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 4. gününde lümen epitelinde NLRP3 ekspresyonu, gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 6. gün implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

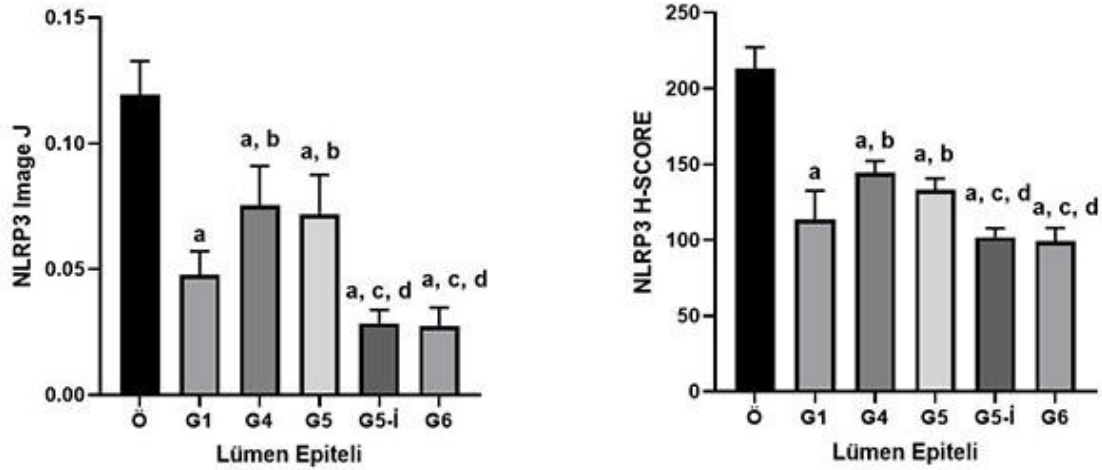
Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde NLRP3 ekspresyonu, 5. gün inter implantasyon bölgeleri ve 6. gün implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. gün implantasyon bölgelerine ait lümen epiteli kıyaslandığında, NLRP3 ekspresyonlarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.2).

Lümen epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen NLRP3 ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelinde NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uterusları ($p<0.0001$) ve 5. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0118$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür.

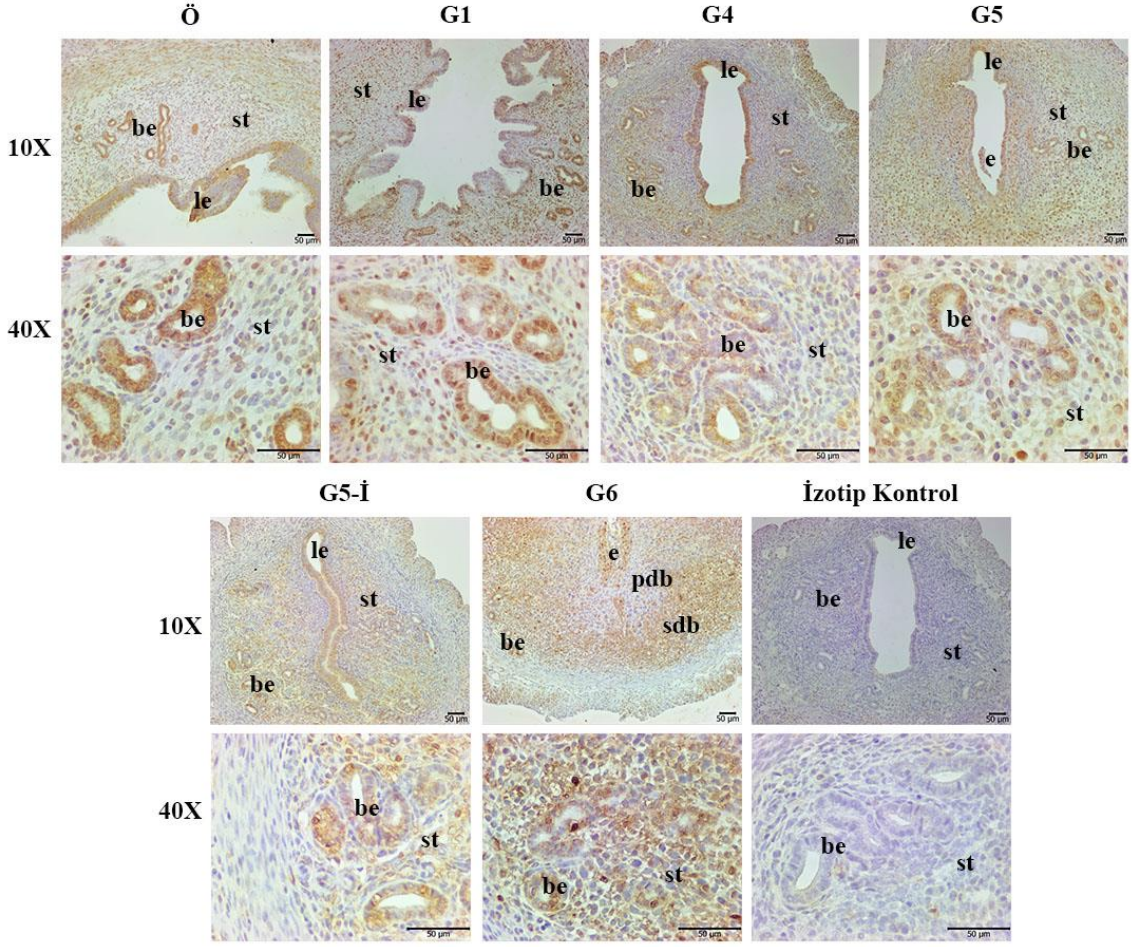
Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde NLRP3 ekspresyonu, 5. gün inter implantasyon bölgeleri ($p=0.0023$) ve 6. gün implantasyon bölgelerine ($p=0.0004$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelindeki NLRP3 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına göre anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına göre anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına göre anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine göre anlamlı).

Endometriyum Bez Epitelinde NLRP3 İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus faz uteruslar, gebeliğin 4. günü uteruslar, gebeliğin 5. ve 6 günleri implantasyon ve 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelinde NLRP3 proteini sitoplazmik lokalizasyon göstermiştir. Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelinde ise NLRP3 proteini hem sitoplazmik hem nüklear lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.3). NLRP3 ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun östrus fazı uteruslarına ait bez epitelinde gözlenmiştir. Peri-implantif dönem gruplarında ise NLRP3 ekspresyonu en yoğun gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelinde gözlenmiştir. Ayrıca gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu 4. güne kıyasla arttığı, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3, 4.4).



Şekil 4.3. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epitel e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Image J ile yapılan bez epitelindeki NLRP3 ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslarda NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 1. günü uteruslar ($p=0.0984$) ve 5. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0003$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir. Ayrıca östrus fazı uteruslara ait bez epitelinde NLRP3 ekspresyonu, gebeliğin 4. günü uteruslar, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p=0.0195$). Gebeliğin 1. günü uterusları ile 5. günü implantasyon bölgelerindeki NLRP3 ekspresyonlarında anlamlı bir

fark göstermemiştir ($p>0.05$). Ayrıca gebeliğin 1. günü bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonunun gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiş olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 4. gününe kıyasla 5. günü inter implantasyon bölgeleri ($p=0.0304$) ile 6. günü implantasyon bölgelerindeki ($p=0.0051$) NLRP3 ekspresyonları anlamlı bir şekilde düşüktür.

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelinde NLRP3 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ($p=0.0018$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0003$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir. Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonlarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.4).

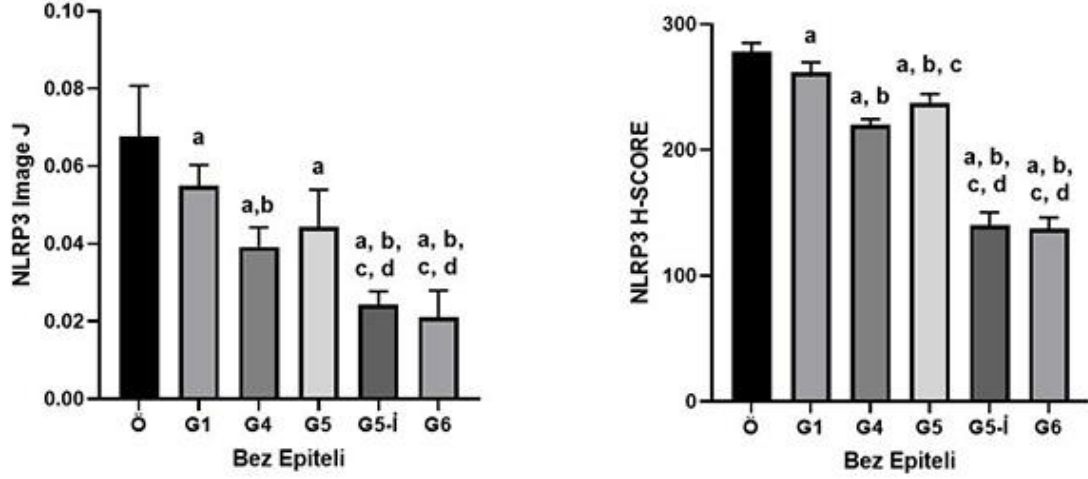
Bez epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen NLRP3 ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

Östrus faz uteruslarına ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 1. günü uterusları ($p=0.0022$) ve diğer gruplara ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uterusları ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine olarak anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.0008$). Ayrıca 4. günü uteruslarına ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonu anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$) (Şekil 4.4).



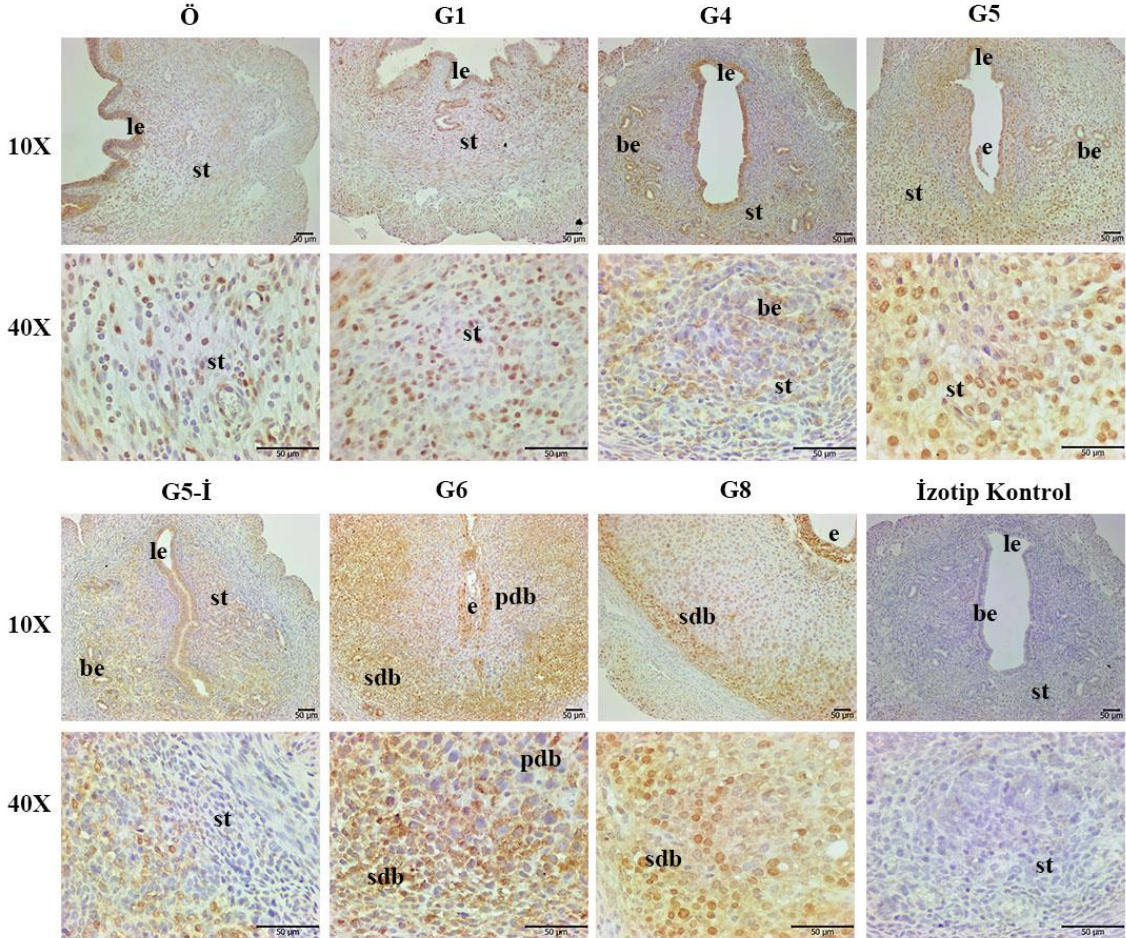
Şekil 4.4. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonunun Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına göre anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına göre anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına göre anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine göre anlamlı).

Endometriyum Stromasında NLRP3 İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus fazı uteruslar ve gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stromada NLRP3 proteini nüklear lokalizasyon göstermiştir. Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stroma ile 6. günü implantasyon ve 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromada NLRP3 sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir. Gebeliğin 5. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait stromada NLRP3 proteini hem sitoplazmik hem de nüklear lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.5). NLRP3 ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait stromada gözlenmiştir. Östrus faz uterusları ve gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stromada NLRP3 ekspresyon yoğunluğunun diğer gruplara göre az olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki NLRP3 ekspresyonunun gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromaya kıyasla yoğun olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerinde primer desidual bölgede NLRP3 ekspresyonu gözlenmezken, sekonder desidual bölgeyi

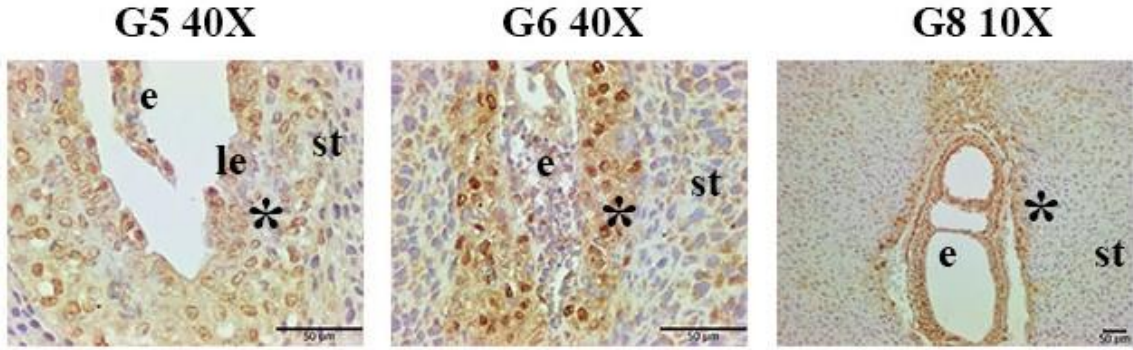
oluşturacak olan stroma hücrelerinde NLRP3 ekspresyonu yoğun bir şekilde gözlenmiştir. Ayrıca gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerinde gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine benzer şekilde sekonder desidual bölgede NLRP3 ekspresyonu yoğun olarak gözlenmiştir (Şekil 4.5, 4.7).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde blastosistin tutunduğu lümen epitelinin hemen altındaki subepitelyal stroma hücrelerinde NLRP3 ekspresyonu gözlenmiştir. Subepitelyal stroma hücrelerindeki bu ekspresyonun gebeliğin 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerinde de devam ettiği gözlenmiştir. Blastosisti çevreleyen stroma hücrelerindeki NLRP3'ün hem sitoplazmik hem de nükleer lokalize olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 5. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki NLRP3 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ:

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).



Şekil 4.6. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki NLRP3 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (G5: Gebeliğin 5. günü, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, e: embriyo, le: lümen epiteli, st: stroma *: blastosisti çevreleyen stroma hücreleri).

Image J ile yapılan stromadaki NLRP3 ekspresyon analizine göre; östrus faz uterusları ve gebeliğin 1. günü uteruslarına ait NLRP3 ekspresyonları 4. gün uterusları, 5., 6., ve 8. günleri implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$). Östrus faz uterusları, gebeliğin 1. günü ve 5. günü inter implantasyon bölgeleri kıyaslandığında NLRP3 ekspresyonlarında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki NLRP3 ekspresyonu, gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$). Gebeliğin 4. günü uterusları ve 8. günü implantasyon bölgeleri kıyaslandığında, NLRP3 ekspresyonlarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

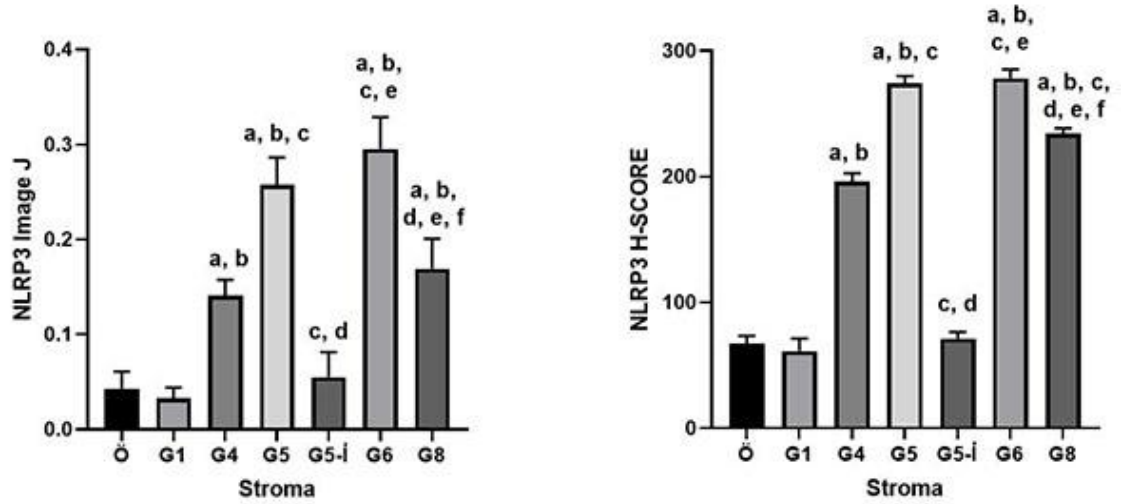
Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki NLRP3 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ve 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgeleri kıyaslandığında, NLRP3 ekspresyonlarında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerinin stromasındaki NLRP3 ekspresyonu, gebeliğin 6. ve 8. günlerine ait implantasyon bölgelerine kıyasla bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$) (Şekil 4.7).

Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen stromadaki NLRP3 ekspresyonları gruplar arasında benzerlik göstermiştir. Ancak Image J analizinden farklı olarak, H-SCORE analizine göre gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.0001$) (Şekil 4.7).

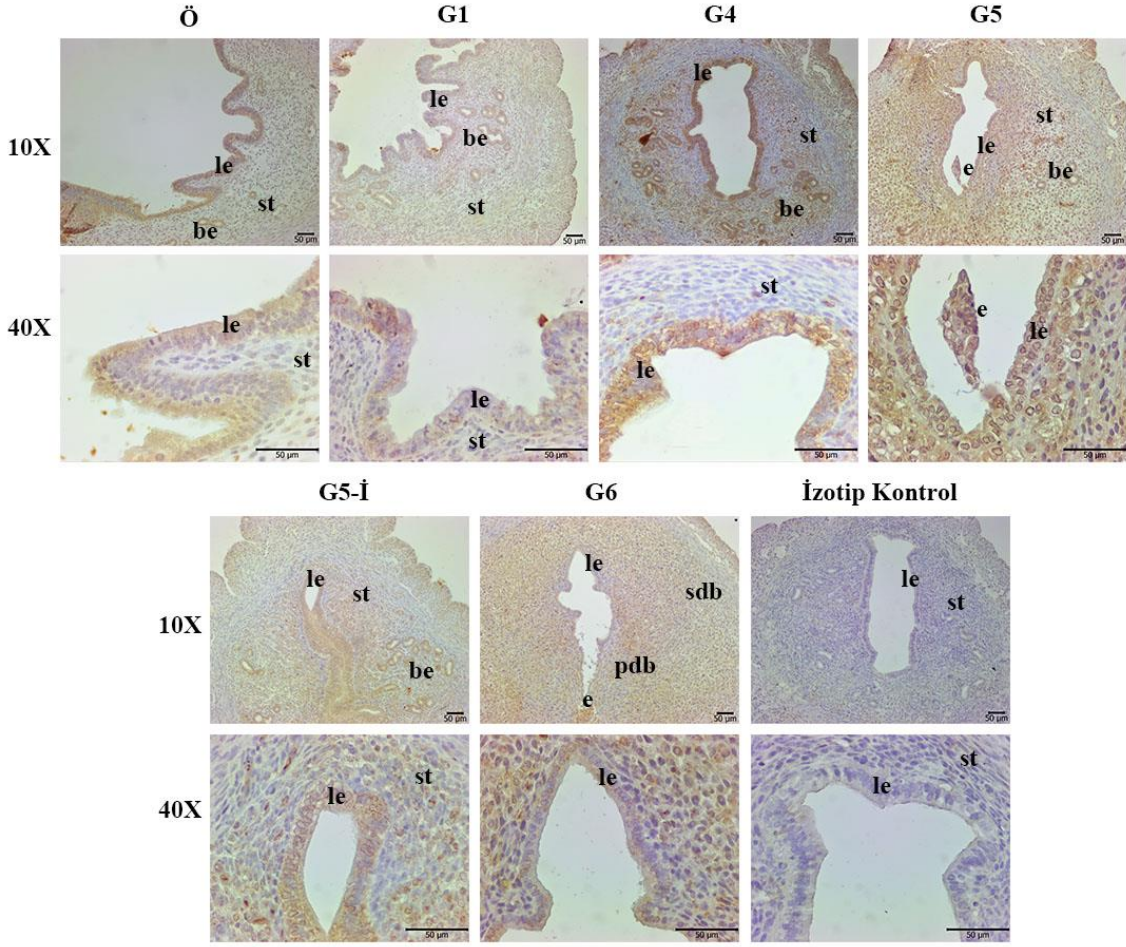


Şekil 4.7. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasındaki NLRP3 ekspresyon düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına göre anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına göre anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına göre anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine göre anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine göre anlamlı, f: Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine göre anlamlı).

4.1.2. Kaspaz-1 İmmünohistokimyası Bulguları

Endometriyum Lümen Epitelinde Kaspaz-1 İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus faz uteruslar, 1. ve 4. günü uterusları ile 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde Kaspaz-1 proteini sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir. Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde ise Kaspaz-1 proteini hem sitoplazmik hem de nüklear lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.8). Kaspaz-1 ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 4. günü uteruslarına ait lümen epitelinde gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde Kaspaz-1 ekspresyon yoğunluğunun gebeliğin 4. gününe kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde Kaspaz-1 proteini hem sitoplazmik hem nüklear lokalizasyon göstermişken, gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerinde ise sadece sitoplazmik lokalizasyon göstermiş ve ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.8, 4.9).



Şekil 4.8. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epitel e: embriyo, le: lümen epitel, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Image J ile yapılan lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslara ait lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonunun gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla düşük gözlenmiş ancak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Östrus fazı uteruslara ait lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu, gebeliğin 4. günü uterusları ($p<0.0001$) ve 5. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0023$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Östrus fazı uteruslara ait lümen epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu 5. günü inter implantasyon bölgeleri ($p<0.0001$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0019$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.0480$). Gebeliğin 1. gününde lümen epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 1. günü uterusları ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epiteli kıyaslandığında, gebeliğin 1. günü uteruslarında Kaspaz-1 ekspresyonunun düşük olduğu gözlenmiş, ancak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 4. günü uterusları ve 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epiteli kıyaslandığında, gebeliğin 4. günü uteruslarında Kaspaz-1 ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiş, ancak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait lümen epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı olarak yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı olarak yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epiteli kıyaslandığında, Kaspaz-1 ekspresyonlarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.9).

Lümen epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen Kaspaz-1 ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

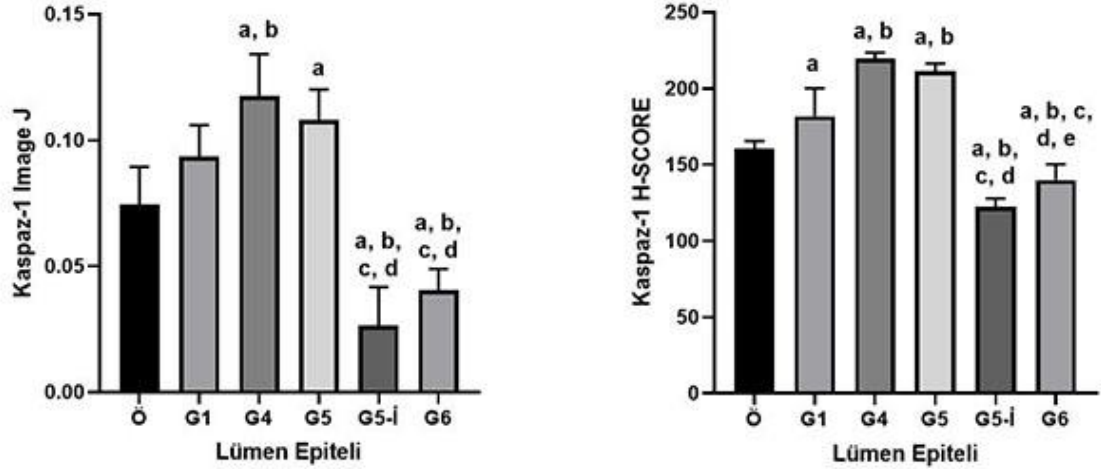
Östrus fazı uteruslara ait lümen epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.0008$). Östrus fazı uteruslara ait lümen epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Östrus faz uteruslara ait lümen epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uterusları ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı olarak yüksektir ($p<0.0001$).

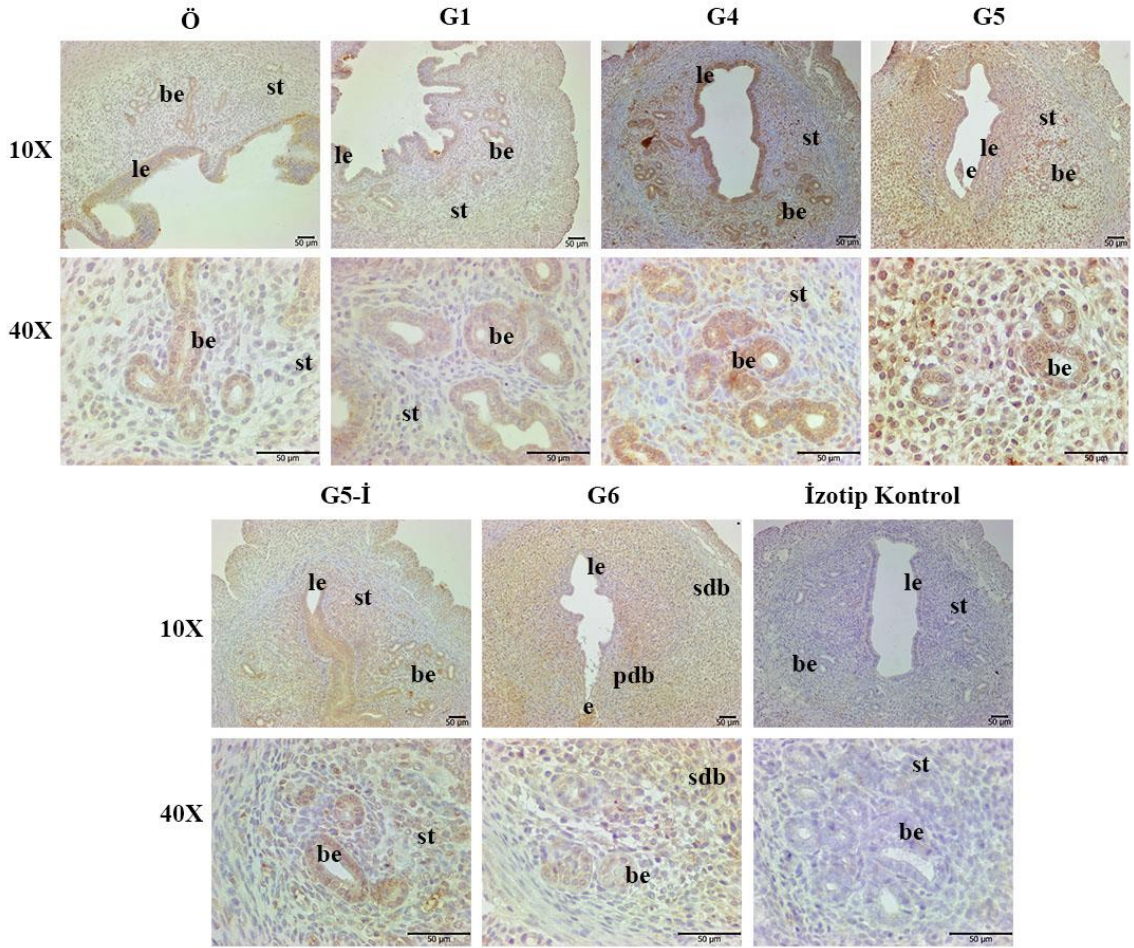
Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı olarak düşüktür ($p=0.0079$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

Endometriyum Bez Epitelinde Kaspaz-1 İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus faz uteruslar ve gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları ile gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelinde Kaspaz-1 proteini sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir (Şekil 4.10). Kaspaz-1 ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelinde gözlenmiştir. Bu ekspresyon gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kadar kademeli olarak azalmış, gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelinde en düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Ayrıca gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelinde Kaspaz-1 ekspresyon yoğunluğunun gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10, 4.11).



Şekil 4.10. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu.

Skala bar: 50 μ m (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Image J ile yapılan bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslar ile gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$). Östrus fazı uteruslarına ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Östrus fazı uteruslarına ait bez epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine göre düşük olduğu gözlenmiştir, fakat anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Östrus fazı uteruslarına ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ($p=0.0230$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0054$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.0003$). Gebeliğin 1. günü uterusları ile 5. günü implantasyon bölgelerine ait bez epiteli kıyaslandığında, Kaspaz-1 ekspresyonlarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ($p=0.0012$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0003$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 4. gününde bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonları, 5. günü implantasyon bölgeleri ($p=0.0003$), 5. günü inter implantasyon bölgeleri ($p<0.0001$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ($p=0.0012$) ve gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0003$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu arasında anlamlı fark yoktur ($p>0.05$) (Şekil 4.11).

Bez epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen Kaspaz-1 ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

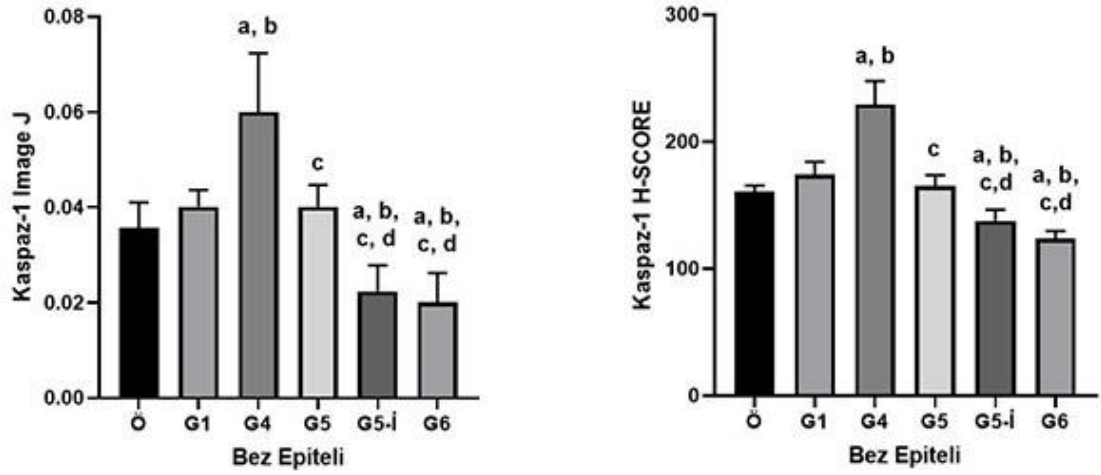
Östrus fazı uteruslarına ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ($p=0.0009$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. gününe ait bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde bez epitelindeki Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$) (Şekil 4.11).

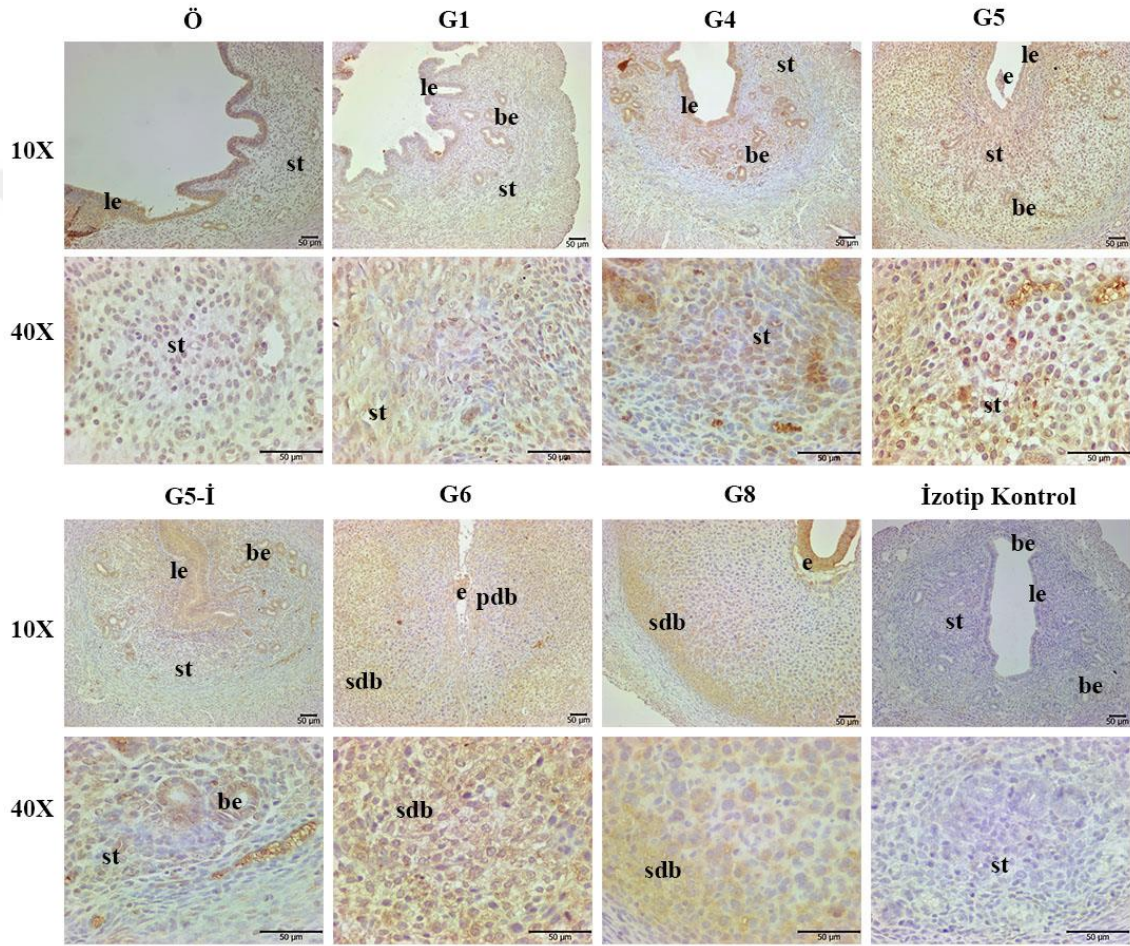


Şekil 4.11. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslara kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

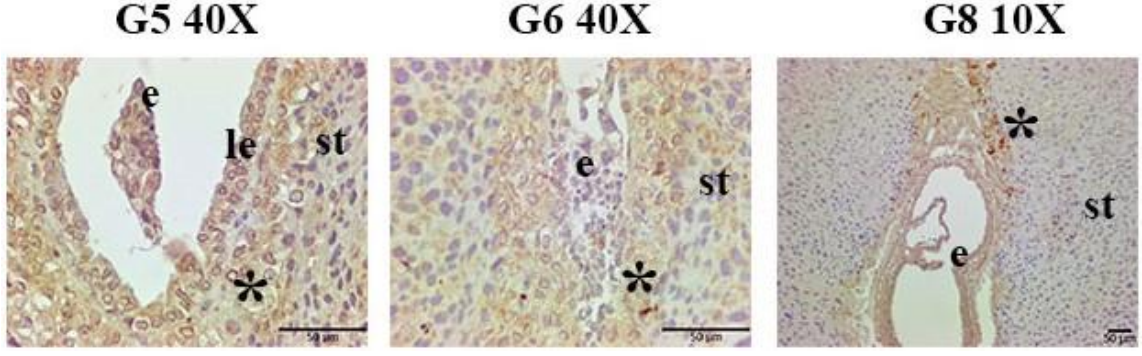
Endometriyum Stromasında Kaspaz-1 İmmünohistokimyası Bulguları

Gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları ile gebeliğin 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromada Kaspaz-1 sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir. Östrus fazı uteruslar ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromada Kaspaz-1 proteini hem sitoplazmik hem de nüklear lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.12). Kaspaz-1 ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromada gözlenmiştir. Östrus faz uterusları ve gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromada Kaspaz-1 ekspresyon yoğunluğunun diğer gruplara kıyasla az olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait primer desidual bölgede Kaspaz-1 ekspresyonu gözlenmezken, sekonder desidual bölgeyi oluşturacak olan stroma hücrelerinde Kaspaz-1 ekspresyonu yoğun bir şekilde gözlenmiştir. Ayrıca gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerinde gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine benzer şekilde sekonder desidual bölgede Kaspaz-1 ekspresyonu yoğun olarak gözlenmiştir (Şekil 4.12, 4.14).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde blastosistin tutunduğu lümen epitelinin hemen altındaki subepitelyal stroma hücrelerinde Kaspaz-1 ekspresyonu gözlenmiştir. Subepitelyal stroma hücrelerindeki bu ekspresyonun gebeliğin 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerinde de devam ettiği ancak kademeli bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).



Şekil 4.13. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (G5: Gebeliğin 5. günü, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, e: embriyo, le: lümen epiteli, st: stroma *: blastosisti çevreleyen stroma hücreleri).

Image J ile yapılan stromadaki Kaspaz-1 ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslarında Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 1. ve 4. günleri uterusları ($p < 0.0001$), 5. ve 6. günü implantasyon ($p < 0.0001$) ve 8. günü implantasyon bölgelerine ($p = 0.0040$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Östrus faz uterusları ve gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark yoktur ($p > 0.05$).

Gebeliğin 1. günü stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p < 0.0001$). Gebeliğin 1. günü uterusları ile diğer peri-implantif dönem gruplara ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Gebeliğin 4. günü stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgelerinden düşük, 8. günü implantasyon bölgelerinden yüksektir ancak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı şekilde yüksektir ($p < 0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ($p < 0.0001$) ve 8. günü implantasyon bölgelerine ($p = 0.0073$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir. Gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgelerine

ait stromalardaki Kaspaz-1 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerinde stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu, 6. ($p<0.0001$) ve 8. günlerine ($p=0.0017$) ait implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Gebeliğin 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerine ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.14).

Stromada Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen Kaspaz-1 ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

Östrus fazı uteruslarına ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ($p=0.0329$) ve 8. günü implantasyon bölgelerine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

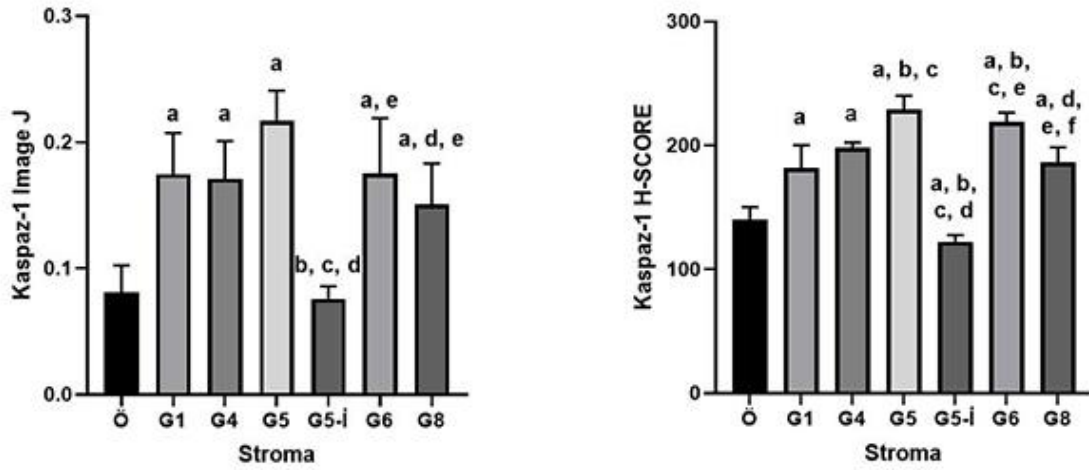
Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 5. günü ($p<0.0001$) ve 6. günü ($p=0.0046$) implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşük olduğu gözlenmiştir.

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu, gebeliğin 6. ve 8. günlerine ait implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerindeki ait stromadaki Kaspaz-1 ekspresyonu gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$) (Şekil 4.14).

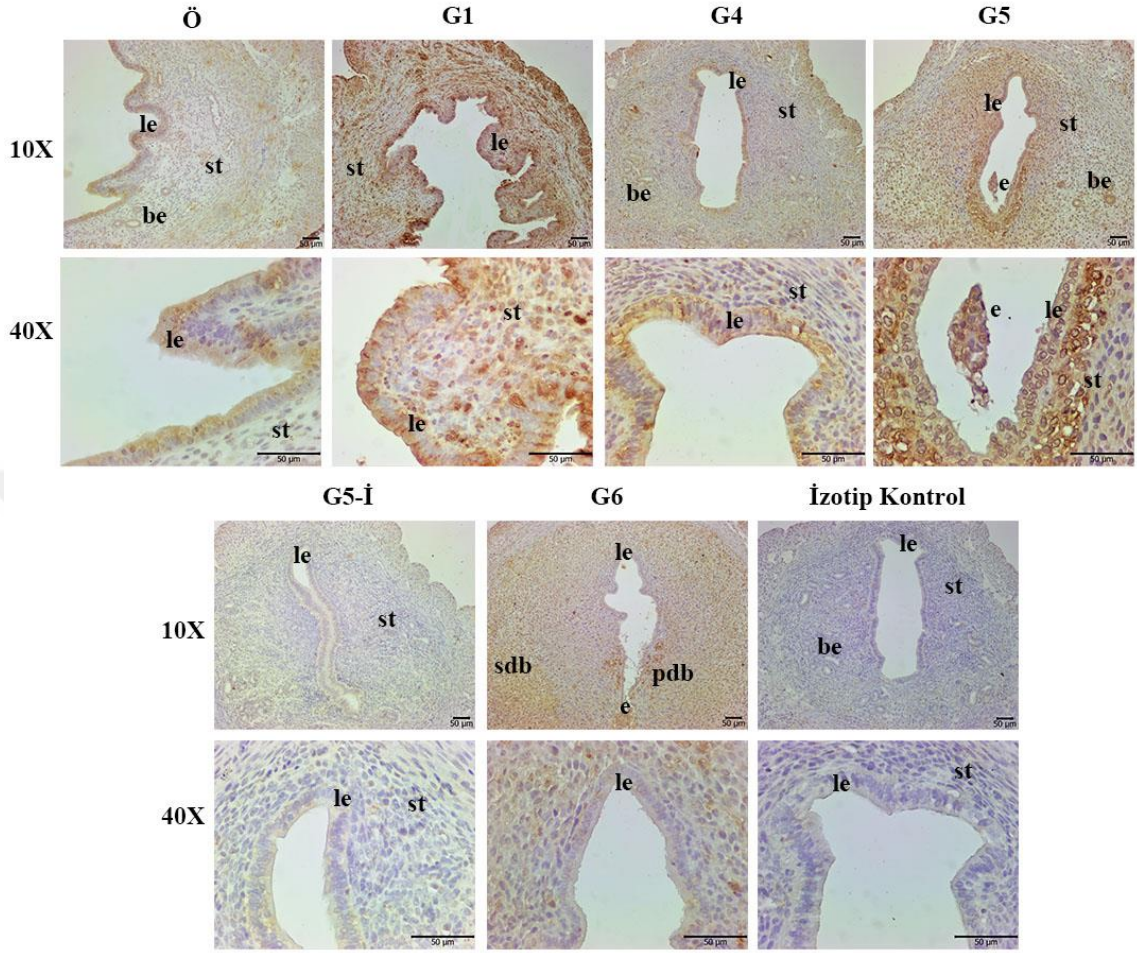


Şekil 4.14. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasında Kaspaz-1 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, f: Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

4.1.3. Gasdermin D İmmünohistokimyası Bulguları

Endometriyum Lümen Epitelinde Gasdermin D İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus faz uterusları ve gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları ile gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde Gasdermin D proteini sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir (Şekil 4.15). Gasdermin D ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelinde gözlenmiştir. Bu ekspresyonun gebeliğin 4. günü uterusları ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde azaldığı gözlenmiştir. Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyon yoğunluğunun peri-implantif döneme ait diğer gruplara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonunun gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla daha yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.15, 4.16).



Şekil 4.15. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Image J ile yapılan lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslarında Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 1. günü ($p < 0.0001$) ve 4. günü ($p = 0.0068$) uteruslarına kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Östrus fazı uteruslarına ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p < 0.0001$). Östrus fazı uterus ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu, 4. günü uteruslar ($p=0.0139$), 5. ve 6. günleri implantasyon ve 5. günü inter implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu, 5. günü implantasyon ($p=0.0260$), 5. günü inter implantasyon ($p<0.0001$) ve 6. günü implantasyon ($p<0.0001$) bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonunun 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı olarak yüksektir ($p<0.0001$).

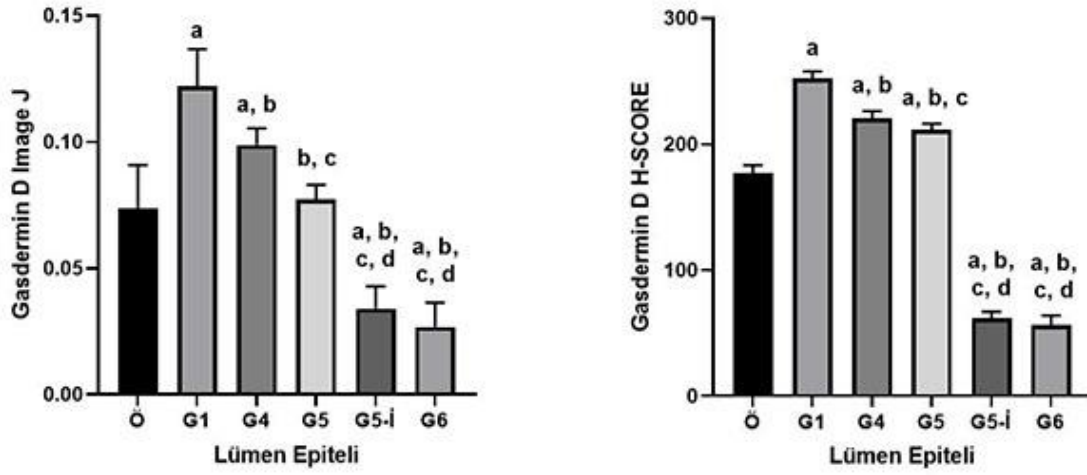
Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark yoktur ($p>0.05$) (Şekil 4.16).

Lümen epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen Gasdermin D ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

Östrus faz uteruslarına ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu, gebeliğin 4. günü uterusları ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

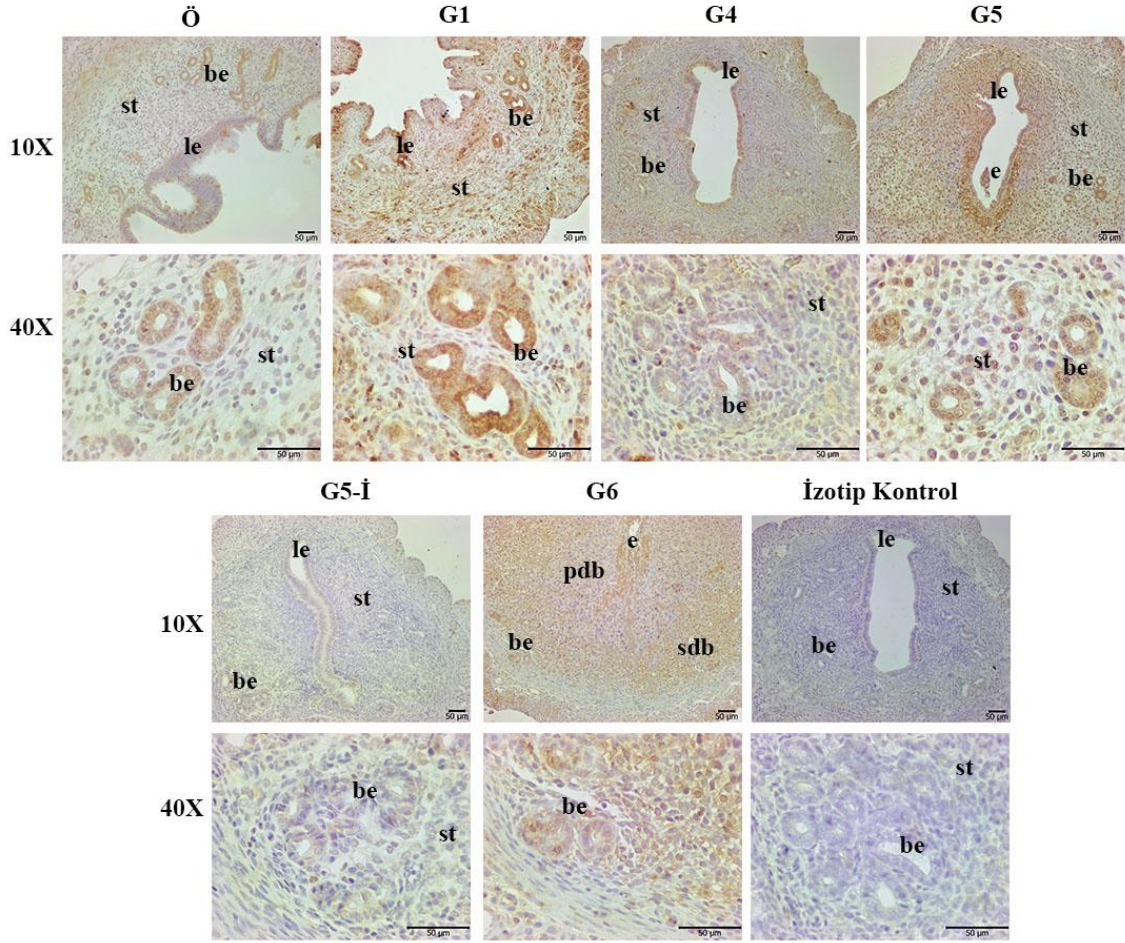
Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p=0.0381$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelinde Gasdermin D ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

Endometriyum Bez Epitelinde Gasdermin D İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus fazı uterusları ve gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları ile gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelinde Gasdermin D proteini sitoplazmik lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.17). Gasdermin D ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelinde gözlenmiştir. Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelinde bu ekspresyon yoğunluğunun dramatik bir şekilde düştüğü gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelinde Gasdermin D ekspresyonunun nispeten tekrar arttığı gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonunun yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyon yoğunluğunun diğer peri-implantif dönem gruplarına kıyasla az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17, 4.18).



Şekil 4.17. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epitel, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Image J ile yapılan bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslarda Gasdermin D ekspresyonu, gebeliğin 1. günü uteruslarındakine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.0002$). Östrus fazı uteruslara ait lümen epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ($p=0.0002$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0452$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Östrus fazı uteruslara ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonunun gebeliğin 4. günü uteruslarındakine kıyasla yüksek olduğu gözlenmiş fakat anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Östrus fazı uterusları ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgeleri kıyaslandığında Gasdermin D ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 1. günü uteruslara ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu, 4. günü uteruslar ($p<0.0001$), gebeliğin 5. günü implantasyon ($p=0.0003$), 5. günü inter implantasyon ($p<0.0001$) ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonunun gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla düşüktür fakat anlamlı fark yoktur ($p>0.05$). Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonunun, 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla yüksek olduğu gözlemlenmiştir ancak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ($p<0.0001$) ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine ($p=0.0338$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon ve gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.18).

Bez epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen Gasdermin D ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

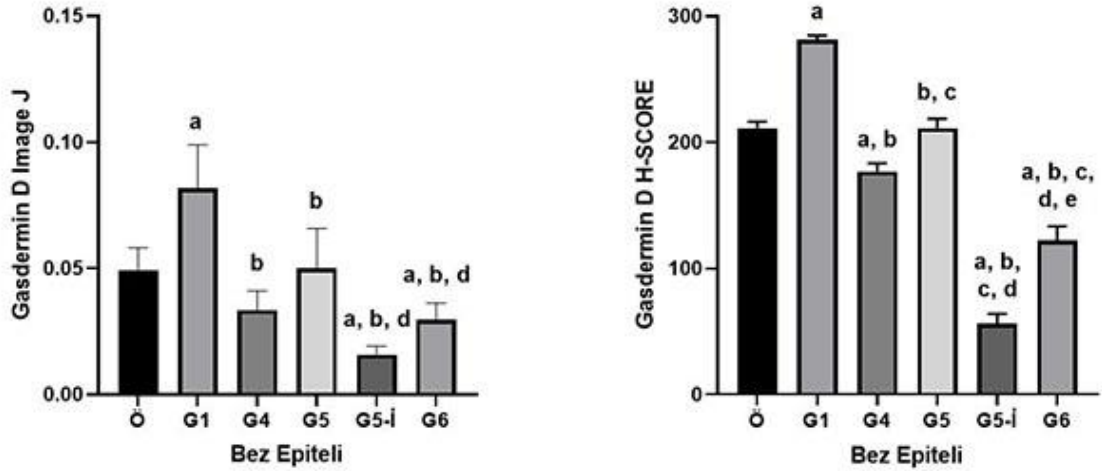
Östrus fazı uteruslara ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 1. günü uteruslarındakine kıyasla anlamlı bir şekilde düşük ($p<0.0001$), 4. günü uterusları, 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşük ($p<0.0001$), 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerindeki bez epitelindeki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$) (Şekil 4.18).



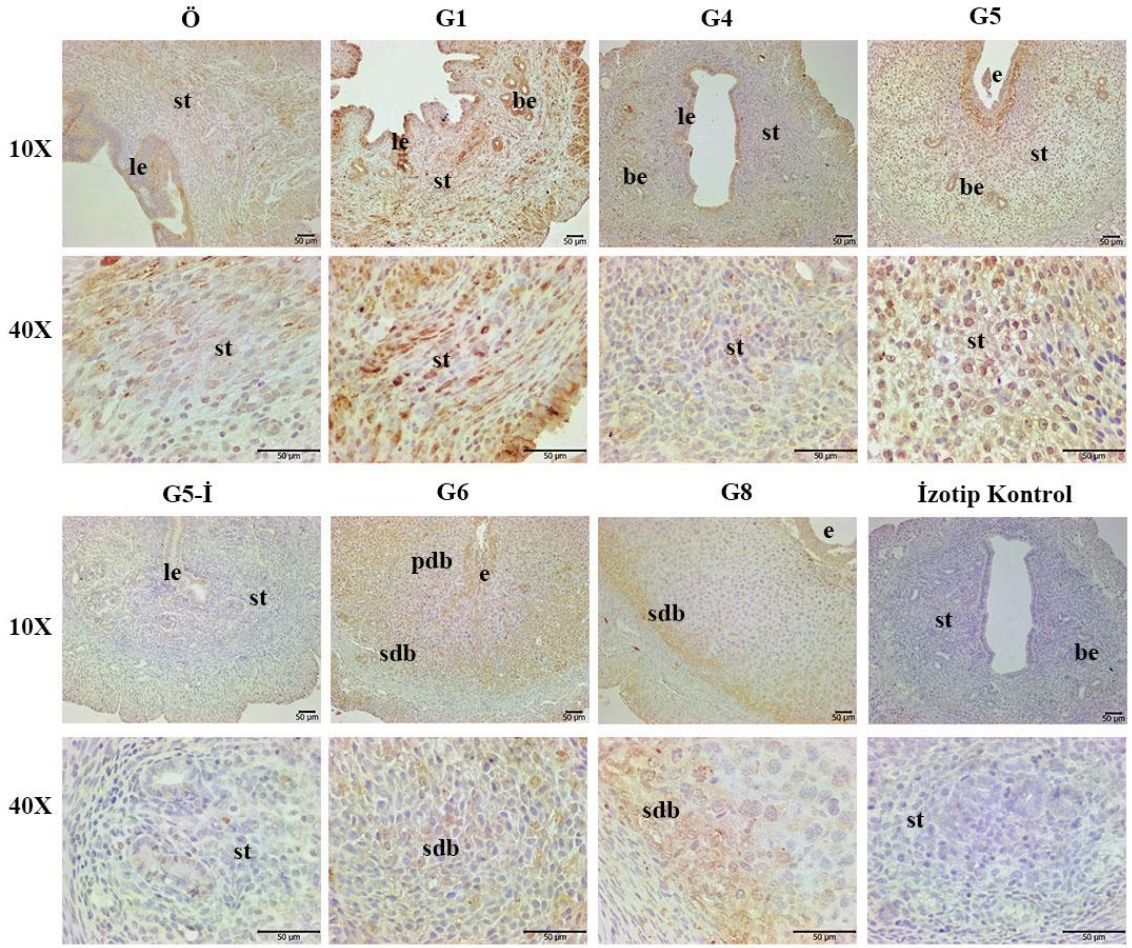
Şekil 4.18. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelinde Gasdermin D ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslara kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

Endometriyum Stromasında Gasdermin D İmmünohistokimyası Bulguları

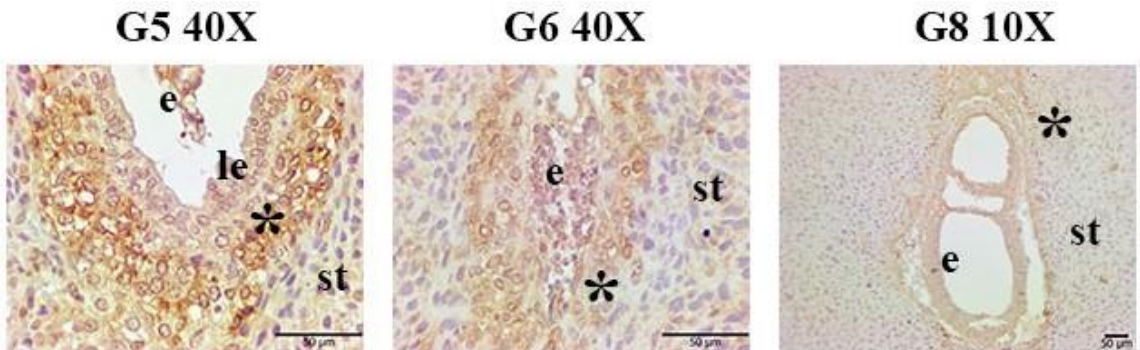
Östrus fazı uteruslara ait stromada Gasdermin D proteini hem sitoplazmik hem de nüklear lokalizasyon göstermiştir. Gebeliğin 1. ve 4. günü uteruslarına ait stroma ile gebeliğin 6. ve 8. günü implantasyon ve gebeliğin 5. günü inter implantasyon

bölgelerine ait stromada Gasdermin D sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir. Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromada Gasdermin D proteini hem sitoplazmik hem de nüklear lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.19). Gasdermin D ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stromada gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerine ait stromada Gasdermin D ekspresyon yoğunluğunun diğer gruplara göre az olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerinde primer desidual bölgede Gasdermin D ekspresyonu gözlenmezken, sekonder desidual bölgeyi oluşturacak olan stroma hücrelerinde gözlenmiştir. Ayrıca gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerinde gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine benzer şekilde sekonder desidual bölgede Gasdermin D ekspresyonu yoğun olarak gözlenmiştir (Şekil 4.19, 4.21).

NLRP3 ve Kaspaz-1 ekspresyonlarına benzer şekilde gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde blastosistin tutunduğu lümen epitelinin hemen altındaki subepitelyal stroma hücrelerinde Gasdermin D ekspresyonu gözlenmiş ve Gasdermin D membranöz lokalizasyon sergilemiştir. Subepitelyal stroma hücrelerindeki bu ekspresyonun gebeliğin 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerinde de devam ettiği ancak kademeli olarak azaldığı gözlenmiştir. Blastosisti çevreleyen stroma hücrelerinde Gasdermin D'nin sitoplazmik ve membranöz lokalizasyon sergilediği gözlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).



Şekil 4.20. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki Gasdermin D ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (G5: Gebeliğin 5. günü, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, e: embriyo, le: lümen epiteli, st: stroma *: blastosisti çevreleyen stroma hücreleri).

Image J ile yapılan stromada Gasdermin D ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslara ait stromada Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 1. günü uteruslar ($p<0.0001$), 5. günü implantasyon ($p=0.0198$) ve 8. günü implantasyon bölgelerindekine ($p=0.0092$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Östrus fazı uteruslara ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$). Östrus fazı uteruslar, gebeliğin 4. günü uteruslar ve 6. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonunun gebeliğin 4. günü uterus, gebeliğin 6. günü implantasyon ve 5. günü inter implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.0001$). Ayrıca gebeliğin 1. günü stromadaki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon ($p=0.0041$) ve 8. günü implantasyon bölgelerindekine ($p=0.0091$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 5. günü imlantasyon ($p=0.0230$) ve 8. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0108$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Gebeliğin 4. günü uterusları ve gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark yoktur ($p>0.05$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonu, gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindeki stromadaki Gasdermin D ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ($p<0.0001$) ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine ($p=0.0024$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir. Gebeliğin 5. günü implantasyon ve 8. günü implantasyon bölgeleri kıyaslandığında istatitksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindeki stromada Gasdermin D ekspresyonu, 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.001$) (Şekil 4.21).

Stromada Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen Gasdermin D ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

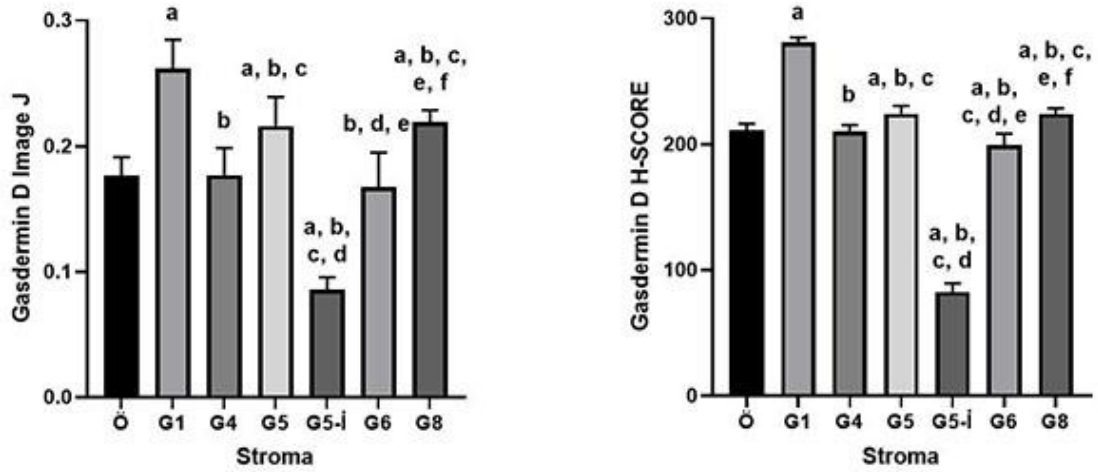
Östrus fazı uteruslara ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.0013$). Östrus fazı uteruslara ait stromadaki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 6. günlerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p=0.0047$).

Gebeliğin 1. günlerinde stromadaki Gasdermin D ekspresyonunun tüm gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günlerinde stromadaki Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.0003$). Ayrıca bu ekspresyon, gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p=0.0156$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindeki stromada Gasdermin D ekspresyonu, 6. günlerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerindeki stromada Gasdermin D ekspresyonu gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.001$) (Şekil 4.21).

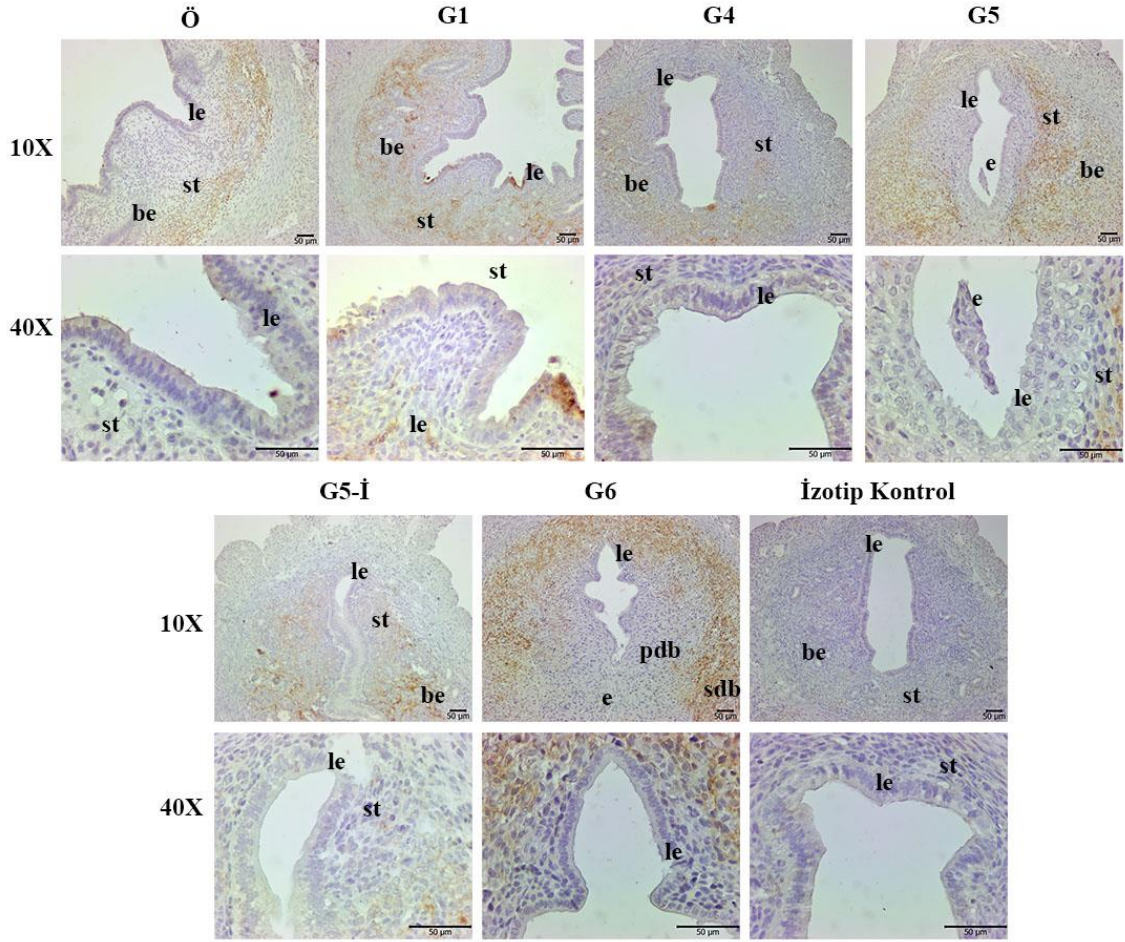


Şekil 4.21. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasında Gasdermin D ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, f: Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

4.1.4. IL-1 β İmmünohistokimyası Bulguları

Endometriyum Lümen Epitelinde IL-1 β İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus fazı uteruslar ve peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde IL-1 β proteini sitoplazmik lokalizasyon sergilemekle beraber ekspresyon yoğunluğunun çok düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.22). IL-1 β protein ekspresyon yoğunluğunun östrus fazı uterus ve gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelinde diğer gruplara göre fazla olduğu gözlenmiştir. IL-1 β ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelinde gözlenmiştir. Bu ekspresyonun gebeliğin 4. günü uterusları ve gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgelerinde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.22, 4.23).



Şekil 4.22. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonu. Skala bar: 50 μ m (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Image J ile lümen epitelinde yapılan IL-1 β ekspresyon analizine göre; östrus fazı uterusları ve gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$). Östrus fazı uteruslara ait lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonu, 4. günü uteruslar ($p=0.0113$), 5. günü implantasyon ($p=0.0210$) 5. günü inter implantasyon ($p=0.0016$) ve gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0100$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 1. günlerinde lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonu tüm gruplara kıyasla en yüksek seviyede olup, gebeliğin 4. günü uteruslar ($p=0.0005$), 5. günü implantasyon

($p=0.0011$) 5. günü inter implantasyon ($p<0.0001$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0005$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

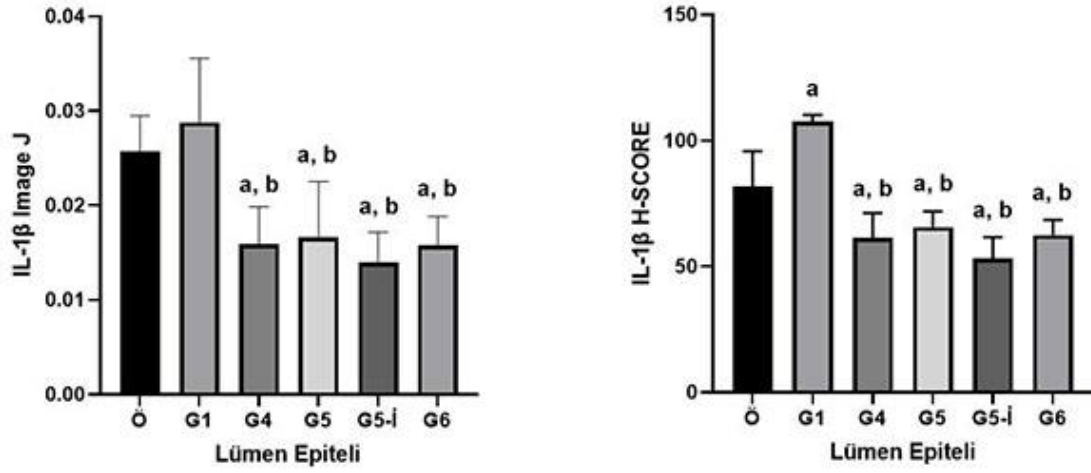
Gebeliğin 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark yoktur ($p>0.05$) (Şekil 4.23).

Lümen epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen IL-1 β ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

Östrus fazı uteruslarına ait lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonu gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Östrus fazlarında lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonu, gebeliğin 4. günü uterusları ($p=0.0003$), 5. günü implantasyon ($p=0.0061$) 5. günü inter implantasyon ($p<0.0001$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p=0.0007$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

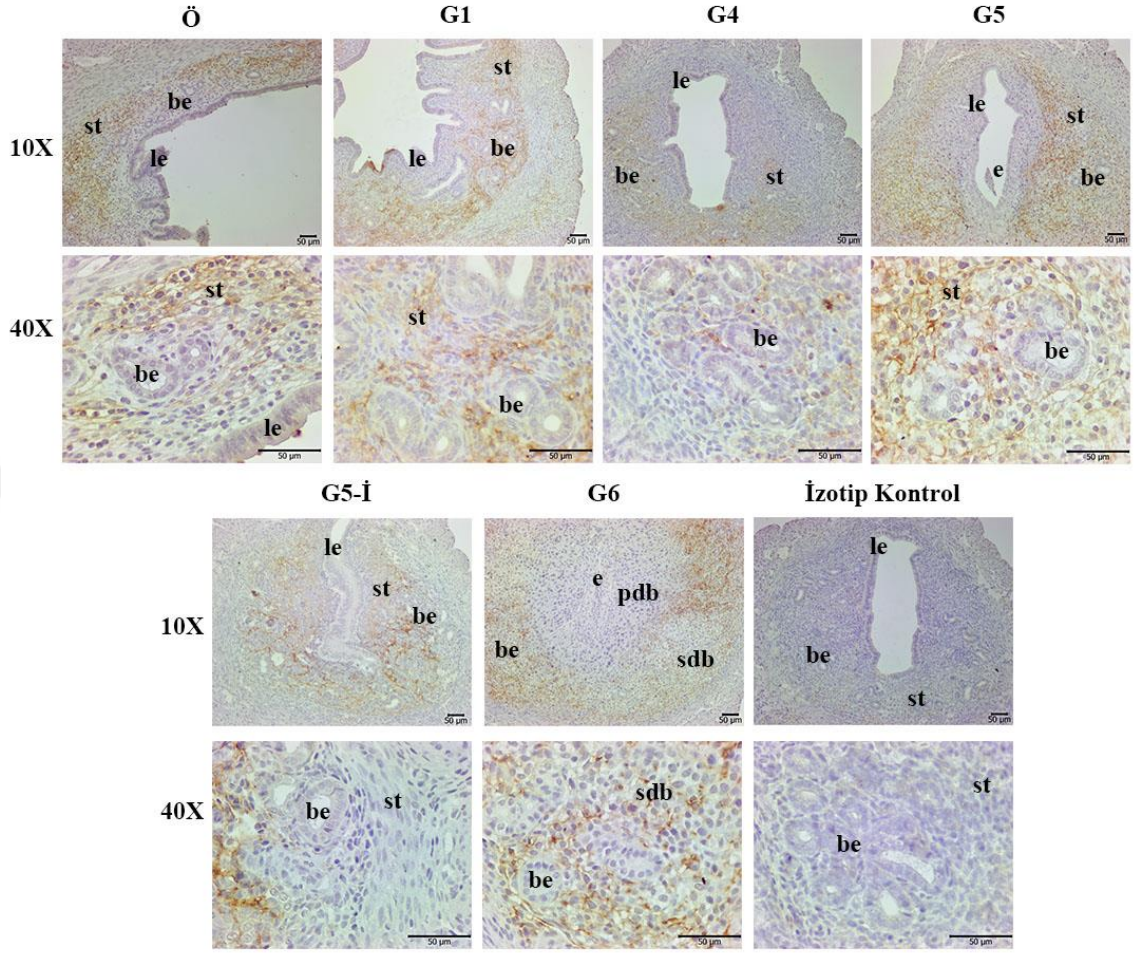
Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonu, gebeliğin 4. günü uterusları, 5. günü implantasyon ve inter implantasyon ile 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$) (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelindeki IL-1 β ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı).

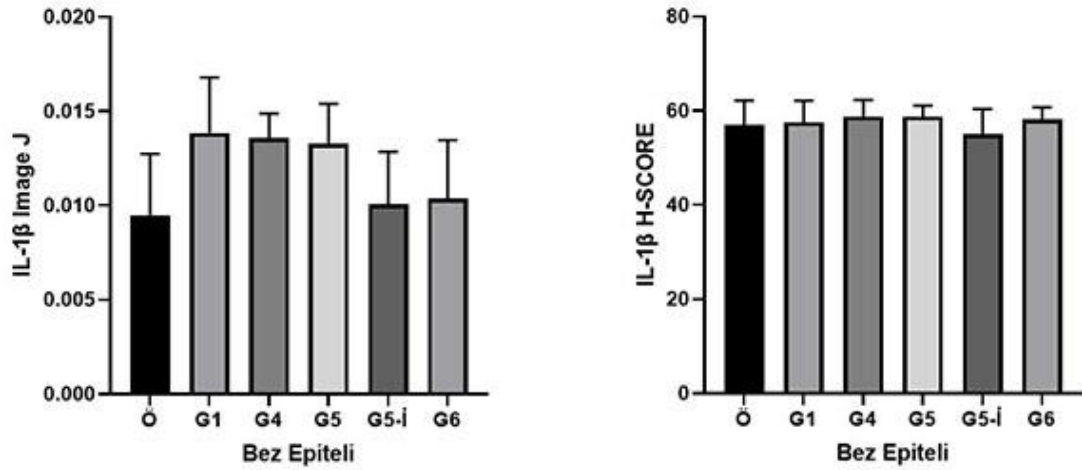
Endometriyum Bez Epitelinde IL-1 β İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus faz uterusları ve peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerine ait bez epitelinde IL-1 β proteini sitoplazmik lokalizasyon göstermekle beraber ekspresyon yoğunlunun çok düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.24). IL-1 β ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 1. günü uteruslara ait bez epitelinde gözlenmiştir (Şekil 4.24, 4.25).



Şekil 4.24. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki IL-1 β ekspresyonu. Skala bar: 50 μ m (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Bez epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen IL-1 β ekspresyonları deney gruplarında birbirine yakın olduğu gözlenmiş ancak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$).



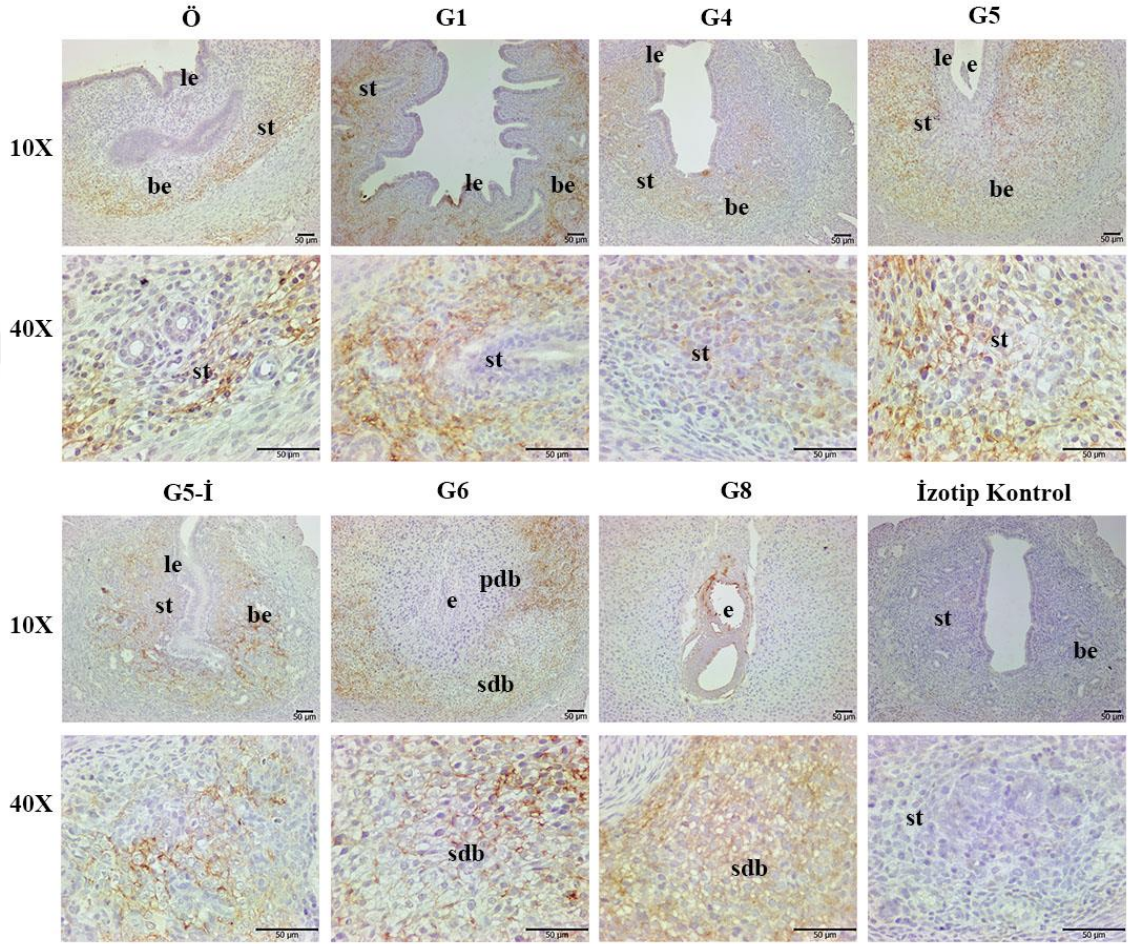
Şekil 4.25. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelinde IL-1 β ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı).

Endometriyum Stromasında IL-1 β İmmünohistokimyası Bulguları

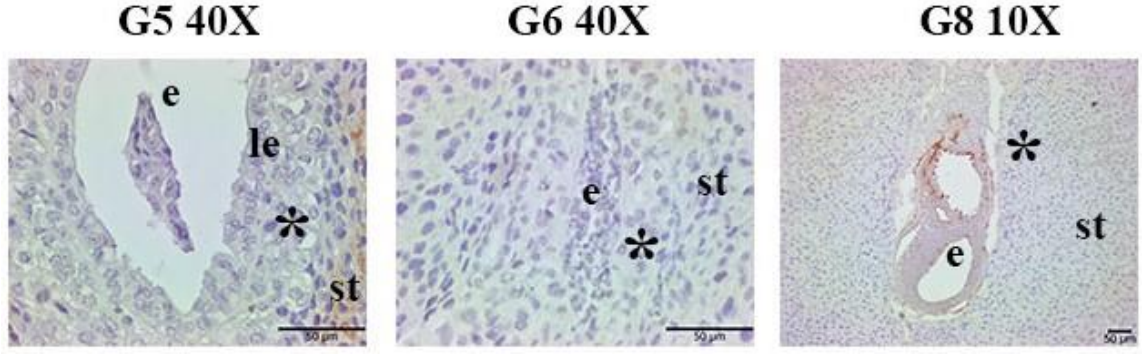
Östrus faz ve peri-implantif dönem gruplarının uteruslar/implantasyon bölgelerine ait stromada IL-1 β proteini sitoplazmik ve hücreler arası (salgısal) lokalizasyon sergilemiştir (Şekil 4.26). Gruplar arasında IL-1 β ekspresyonu kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromada gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-1 β ekspresyon yoğunluğunun diğer gruplara göre az olduğu gözlenmiştir. IL-1 β ekspresyonu gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait primer desidual bölgede gözlenmezken, sekonder desidual bölgeyi oluşturacak olan stroma hücrelerinde gözlenmiştir. Ayrıca gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerinde gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine benzer şekilde sekonder desidual bölgede IL-1 β ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil 4.26, 4.28).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde blastosistin tutunduğu lümen epitelinin hemen altındaki subepitelyal stroma hücrelerinde IL-1 β ekspresyonu gözlenmemiştir. Benzer şekilde gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerinde blastosisti çevreleyen stroma hücrelerinde IL-1 β ekspresyonu gözlenmemiştir. Ancak gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerinde trofoblast hücrelerinde IL-1 β ekspresyonu gözlenmiş,

blastosisti çevreleyen stroma hücrelerinde de az yoğunlukta IL-1 β ekspresyonuna rastlanmıştır (Şekil 4.27).



Şekil 4.26. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1. ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu. Skala bar: 50 μ m (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).



Şekil 4.27. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki IL-1 β ekspresyonu. Skala bar: 50 μ m (G5: Gebeliğin 5. günü, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, e: embriyo, le: lümen epiteli, st: stroma *: blastosisti çevreleyen stroma hücreleri).

Image J ile yapılan stromadaki IL-1 β ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslardaki IL-1 β ekspresyonu gebeliğin 1. günü uteruslar ($p < 0.0001$), 4. günü uteruslar ($p = 0.0056$), 5. günü implantasyon ($p < 0.0001$) ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine ($p = 0.0013$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Östrus faz uteruslara ait stromadaki IL-1 β ekspresyonları ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine ait IL-1 β ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Gebeliğin 1. günü uterusları ile 4. günü uteruslar, 5. ve 6. günlerine ait implantasyon bölgeleri kıyaslandığında IL-1 β ekspresyonlarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarında IL-1 β ekspresyonları, 5. günü inter implantasyon ve 8. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p < 0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ($p = 0.0005$) ve 8. günü implantasyon bölgelerindekine ($p = 0.0066$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir. Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki IL-1 β ekspresyonları gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgelerindekiler ile kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ve 8. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. ve 6. günleri implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-1 β ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ($p=0.0001$) ve 8. günü implantasyon bölgelerindekine ($p=0.0016$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon ve gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-1 β ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.28).

Stromada Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen IL-1 β ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

Östrus fazı uteruslarına ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu gebeliğin 4. günü uterusları ($p<0.0001$) ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine ($p=0.0047$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür.

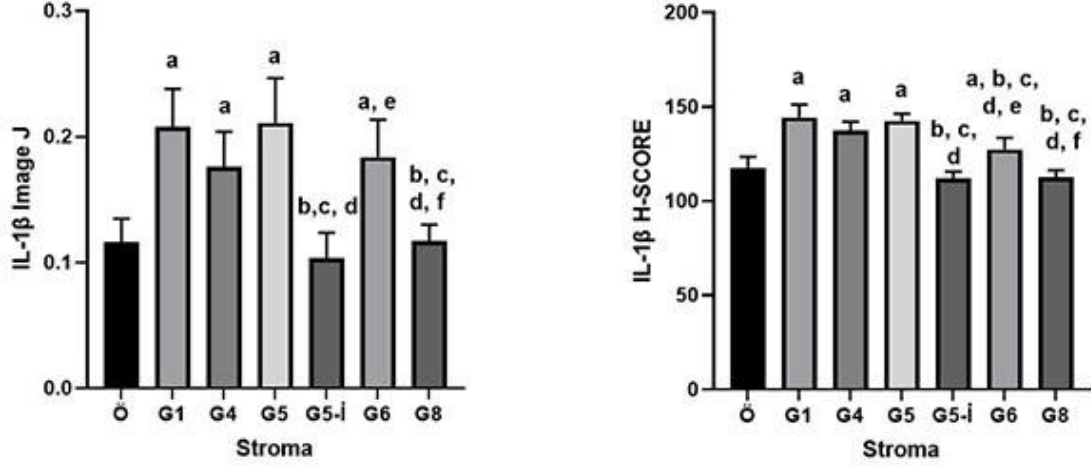
Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stromadaki IL-1 β ekspresyonları 5. günü inter implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ile 8. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu, 6. günlerindeki kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p=0.0047$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindekine ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu, 6. günlerindeki kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-1 β ekspresyonu gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerindeki kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$) (Şekil 4.28).

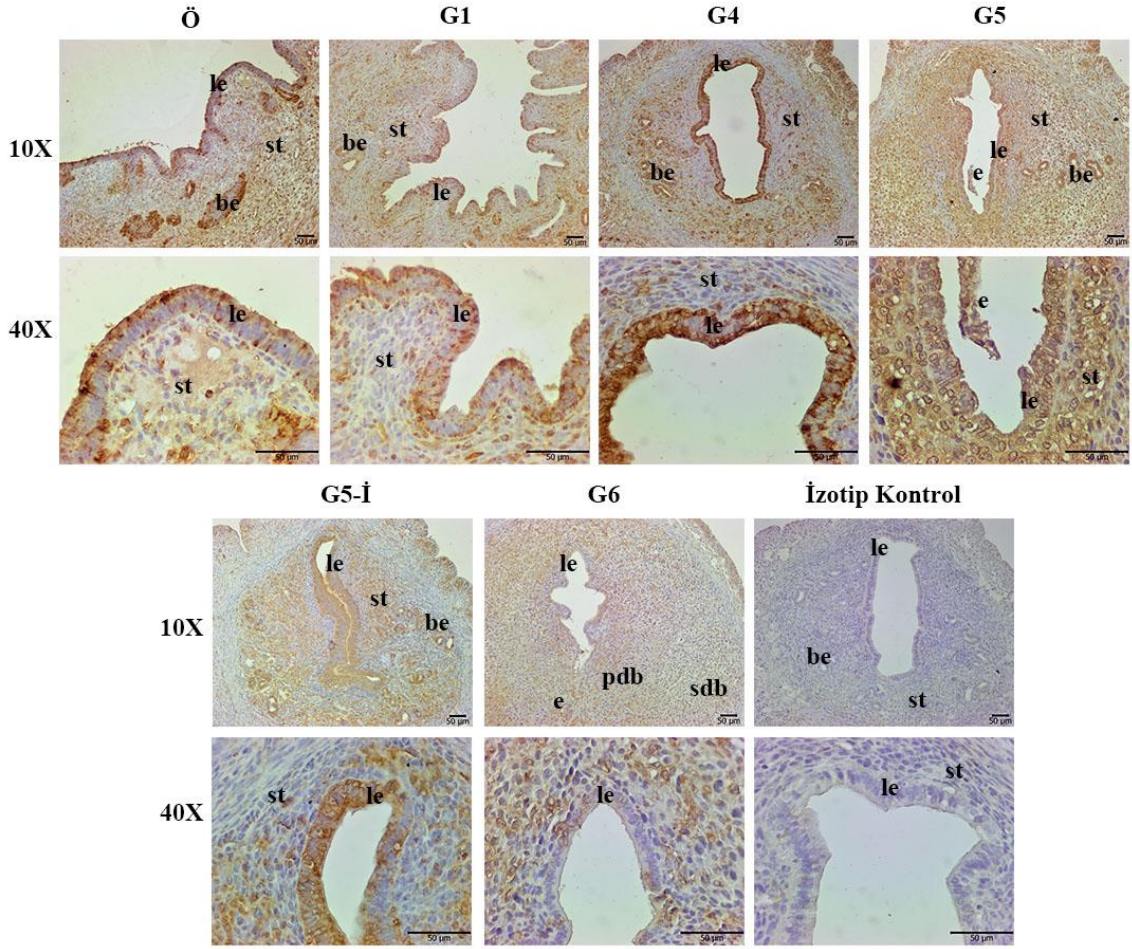


Şekil 4.28. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasında IL-1 β ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, f: Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

4.1.5. IL-18 İmmünohistokimyası Bulguları

Endometriyum Lümen Epitelinde IL-18 İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus fazı uterusları ve peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde IL-18 proteini sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir (Şekil 4.29). IL-18 ekspresyonu östrus fazı, gebeliğin 1. ve 4. günü uteruslarındaki lümen epitelinde yoğun bir şekilde gözlenmiştir. IL-18 ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 4. günü uteruslarına ait lümen epitelinde gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde IL-18 ekspresyon yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Peri-implantif döneme ait gruplar kıyaslandığında en düşük IL-18 ekspresyonunun gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerindeki lümen epitelinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.29, 4.30).



Şekil 4.29. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epitel e: embriyo, le: lümen epitel, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Image J ile lümen epitelinde yapılan IL-18 ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslarına ait IL-18 ekspresyonu gebeliğin 1. günü uterusları ($p=0.0114$) ve gebeliğin 4. günü uteruslarındakine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür.

Östrus fazlarında lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu, 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.0001$). Östrus fazlarında lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindekiyle kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 1. ve 4. günü uterusların lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu, 5. günü implantasyon ($p=0.0049$), 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu tüm gruplara kıyasla en yüksek seviyede olup, gebeliğin 5. günü implantasyon/inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindeki IL-18 ekspresyonu, 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu, 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p=0.0016$) (Şekil 4.30).

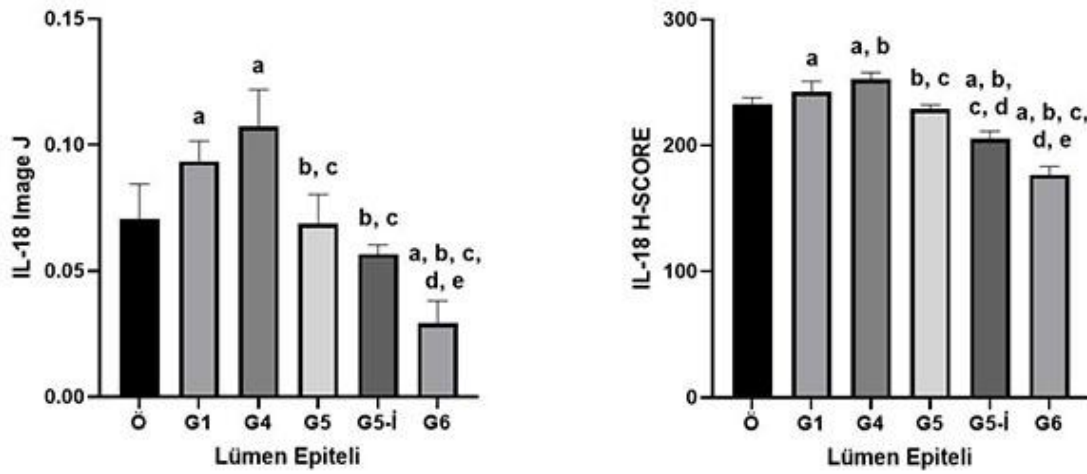
Lümen epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen IL-18 ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

Östrus fazı uteruslarına ait lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 1. günü uteruslarındakine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.0204$). Östrus fazlarında lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p=0.0005$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelindeki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

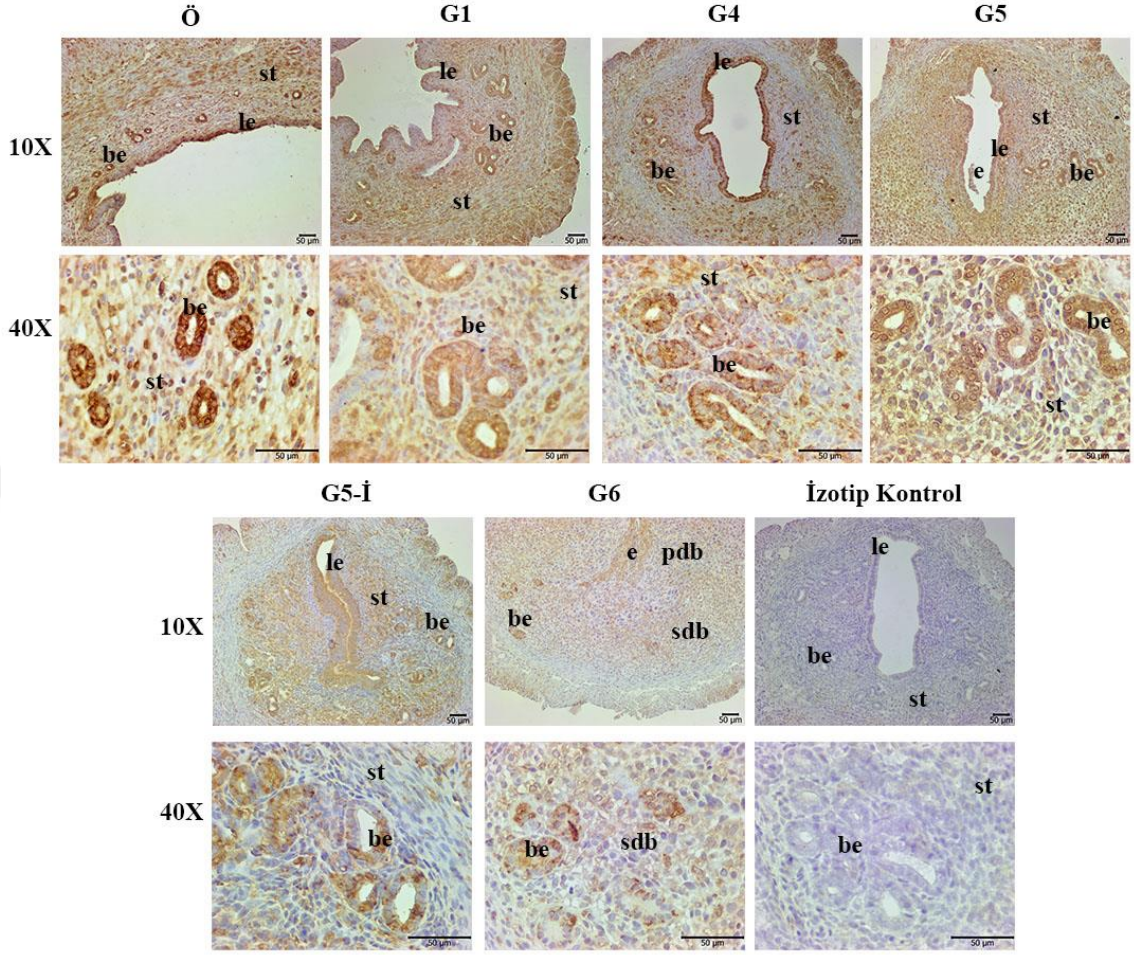
Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindeki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$) (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin lümen epitelinde IL-18 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

Endometriyum Bez Epitelinde IL-18 İmmünohistokimyası Bulguları

Östrus fazı uteruslar ve peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerine ait bez epitelinde IL-18 proteini sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir (Şekil 4.31). IL-18 ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun östrus fazı uteruslarına ait bez epitelinde gözlenmiştir. Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonunun gebeliğin 1. günü uteruslara ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyon yoğunluğunun gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.31, 4.32).



Şekil 4.31. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5. ve 6. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lümen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).

Image J ile bez epitelinde yapılan Gasdermin D ekspresyon analizine göre; östrus fazı uterusların bez epitelindeki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 1. günü uterusları ($p=0.0019$), gebeliğin 4. günü uteruslar ($p<0.0001$), 5. günü implantasyon ($p=0.0115$), 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 1. günü uterusları ile 4. günü uterus ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonları, gebeliğin 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uterusları ve 5. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonları, 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinin bez epitelindeki IL-18 ekspresyonları, 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

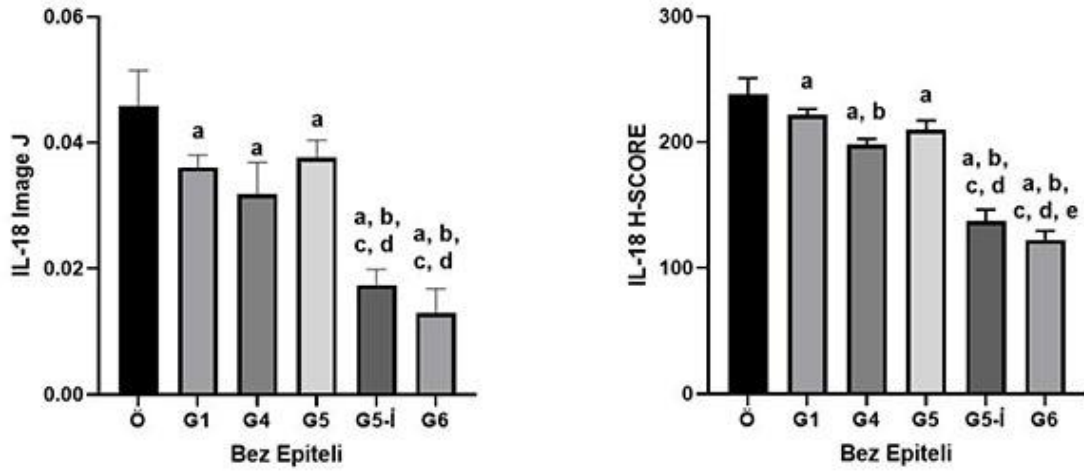
Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ile 6. günü implantasyon bölgelerine ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.32).

Bez epitelinde Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen IL-18 ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

Östrus fazı uteruslarına ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonu, gebeliğin 1. günü uterusları ($p=0.0027$) ve 5. günü implantasyon bölgelerindekine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait bez epitelindeki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uteruslarındakine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerinde bez epitelindeki IL-18 ekspresyonları gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı şekilde yüksektir ($p=0.0067$) (Şekil 4.32).



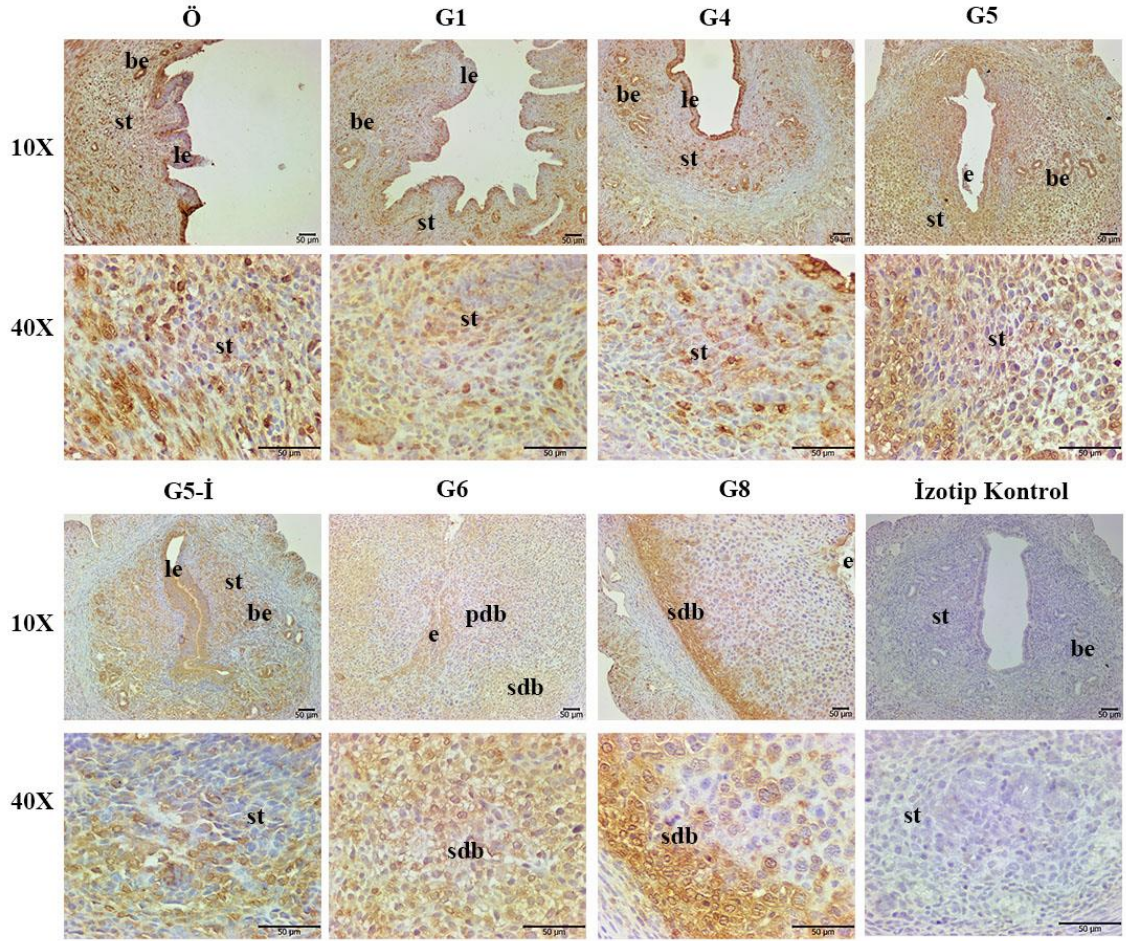
Şekil 4.32. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin bez epitelinde IL-18 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

Endometriyum Stromasında IL-18 İmmünohistokimyası Bulguları

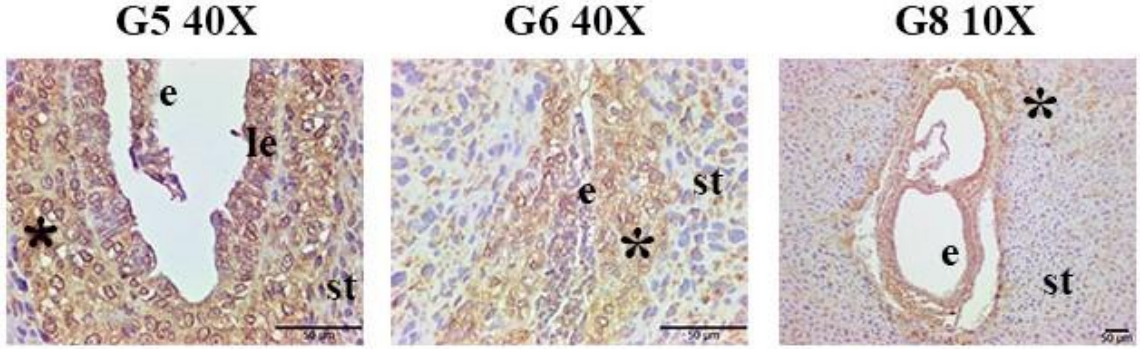
Östrus fazı uteruslar ve peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerine ait stromada IL-18 proteini sitoplazmik lokalizasyon sergilemiştir (Şekil 4.33). IL-18 ekspresyonu gruplar arasında kıyaslandığında en yoğun gebeliğin 1. günü uterusların stromasında gözlenmiştir. Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-18 ekspresyon yoğunluğunun diğer gruplara göre az olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerinde primer desidual bölgede IL-18 ekspresyonun az olduğu, sekonder desidual bölgeyi oluşturacak stroma hücrelerinde ise yoğun olduğu gözlenmiştir. Ayrıca gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerinde sekonder desidual bölgede gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine benzer şekilde IL-1 β ekspresyonu yoğun olarak gözlenmiştir (Şekil 4.33, 4.35).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde blastosistin tutunduğu lümen epitelinin hemen altındaki subepitelyal stroma hücrelerinde IL-18 ekspresyonu gözlenmiştir. Subepitelyal stroma hücrelerindeki bu ekspresyonun gebeliğin 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerinde devam ettiği ancak kademeli bir şekilde azaldığı

gözlenmiştir. Blastosisti çevreleyen stroma hücrelerindeki IL-18'in sitoplazmik lokalize olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.33. Östrus fazı uterus, gebeliğin 1 ve 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-18 ekspresyonu. Skala bar: 50 µm (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, be: bez epiteli e: embriyo, le: lumen epiteli, pdb: primer desidual bölge, sdb: sekonder desidual bölge, st: stroma).



Şekil 4.34. Gebeliğin 5., 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerine ait blastosisti çevreleyen stromadaki IL-18 ekspresyonu. Skala bar: 50 μ m (G5: Gebeliğin 5. günü, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, e: embriyo, le: lümen epiteli, st: stroma *: blastosisti çevreleyen stroma hücreleri).

Image J ile stromada yapılan IL-18 ekspresyon analizine göre; östrus fazı uteruslar ve gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stromadaki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Östrus fazı uteruslarına ait stromadaki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 4. günü uteruslar ($p=0.0003$), 5. günü implantasyon ($p=0.0005$), 5. günü inter implantasyon ($p<0.0001$), 6. ($p=0.0002$) ve 8. ($p=0.0004$) günlerindeki implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stromadaki IL-18 ekspresyonu, gebeliğin 4. günü uteruslar, 5. günü implantasyon/inter implantasyon ile 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uterusların stroması ile gebeliğin 5., 6. ve 8. gün implantasyon bölgelerine ait stromalardaki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p=0.0040$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgeleri stromasındaki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p=0.0021$). Gebeliğin 5. günü ile 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerine ait stromalardaki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-18 ekspresyonu 6. ($p=0.0055$) ve 8. ($p=0.0028$) günleri implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı şekilde düşüktür.

Gebeliğin 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.35).

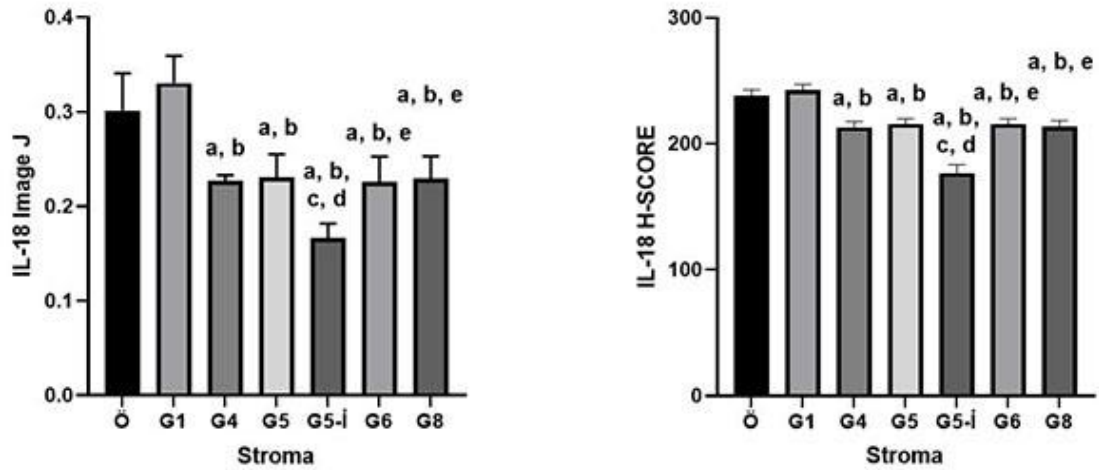
Stromada Image J ve H-SCORE analizleri ile belirlenen IL-18 ekspresyonları her iki yöntemde birbirine benzer bulunmuştur. Ancak Image J ile kıyaslandığında H-SCORE sonuçlarında istatistiksel analizlerde farklılıklar gözlenmiştir:

Östrus fazı uteruslarına ait stromadaki IL-18 ekspresyonlarının gebeliğin 1. günü uterusları hariç diğer gruplara kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait stromadaki IL-18 ekspresyonları gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki IL-18 ekspresyonları gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerinin stromasındaki IL-18 ekspresyonu gebeliğin 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı şekilde düşüktür ($p<0.0001$) (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinin stromasında IL-18 ekspresyonu düzeylerinin Image J ve H-SCORE analizleri. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

4.2. Western Blot Bulguları

Östrus faz ve peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β , IL-18 ve Beta aktin proteinlerinin miktarları Western blot yöntemi belirlenmiştir. Western blot yöntemi sonrası görüntülenen bantlar Image J programı ile analiz edilmiş ve matematiksel veriler elde edilmiştir. NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 proteinlerinin verileri Beta aktin verilerine oranlanmıştır. Bu veriler değerlendirilmiş ve gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır.

4.2.1. NLRP3 Western Blot Analizi

Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde NLRP3 ekspresyonlarını belirlemek için yapılan Western blot yöntemi sonrası elde edilen bantlar ve istatistiksel analizi Şekil 4.36'da gösterilmiştir.

Östrus faz uterusları ve gebeliğin 1. günü uteruslarına ait NLRP3 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Östrus fazına ait NLRP3 ekspresyonu, gebeliğin 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günleri implantasyon ile 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarındaki NLRP3 ekspresyonu, 4. günü uterusları, 5., 6. ve 8. günleri implantasyon ile 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

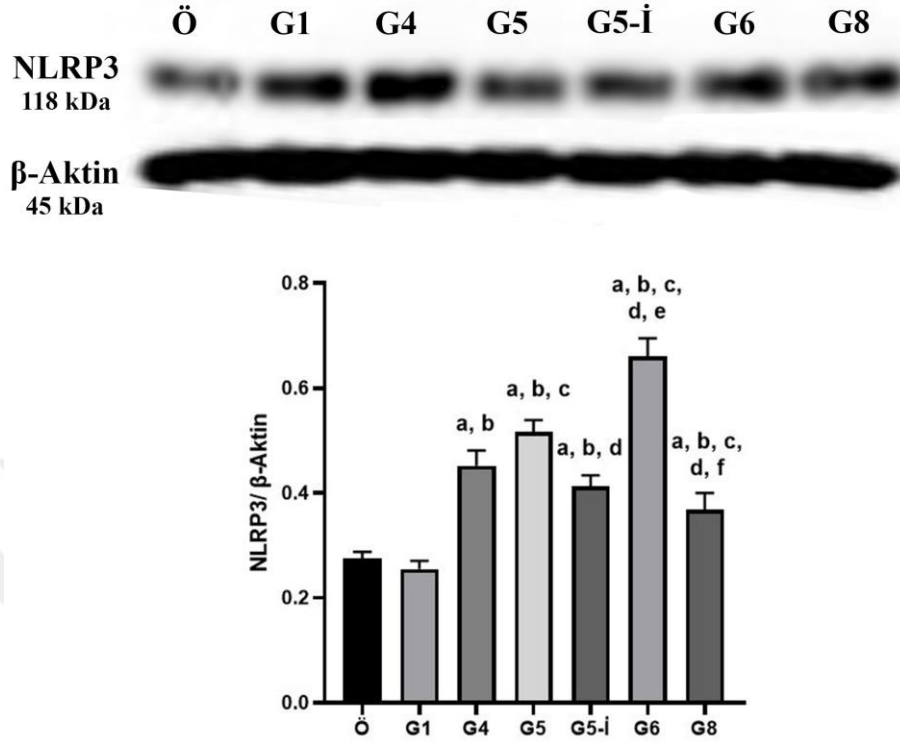
Gebeliğin 4. günü uteruslarındaki NLRP3 ekspresyonu, 5. günü implantasyon ($p=0.0017$) ve 6. günü implantasyon bölgelerine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait NLRP3 ekspresyonu, gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uterusları ve 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait NLRP3 ekspresyonları kıyaslandığında, gebeliğin 4. günü uteruslarındaki NLRP3 ekspresyon seviyesinin fazla olduğu gözlenmiştir ancak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindeki NLRP3 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı şekilde yüksek, gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindeki NLRP3 ekspresyonu, 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$). Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ile gebeliğin 8. günü implantasyon bölgeleri kıyaslandığında NLRP3 ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait NLRP3 ekspresyonu 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).



Şekil 4.36. Östrus fazı uteruslar ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen NLRP3 ve β-Aktin bantları ile istatistiksel analizi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, f: Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

4.2.2. Kaspaz-1 Western Blot Analizi

Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Kaspaz-1 ekspresyonlarını belirlemek için yapılan Western blot yöntemi sonrası elde edilen bantlar ve istatistiksel analizi Şekil 4.37’de gösterilmiştir.

Östrus fazı uteruslarına ait Kaspaz-1 ekspresyonu, gebeliğin 1. günü uterusları ($p=0.0033$), gebeliğin 4. günü uterusları ($p=0.0019$) ve 5. günü implantasyon bölgelerindeki ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı şekilde düşüktür. Östrus faz uteruslarına ait Kaspaz-1 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri, 6. ve 8. günü implantasyon bölgelerindeki ile kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

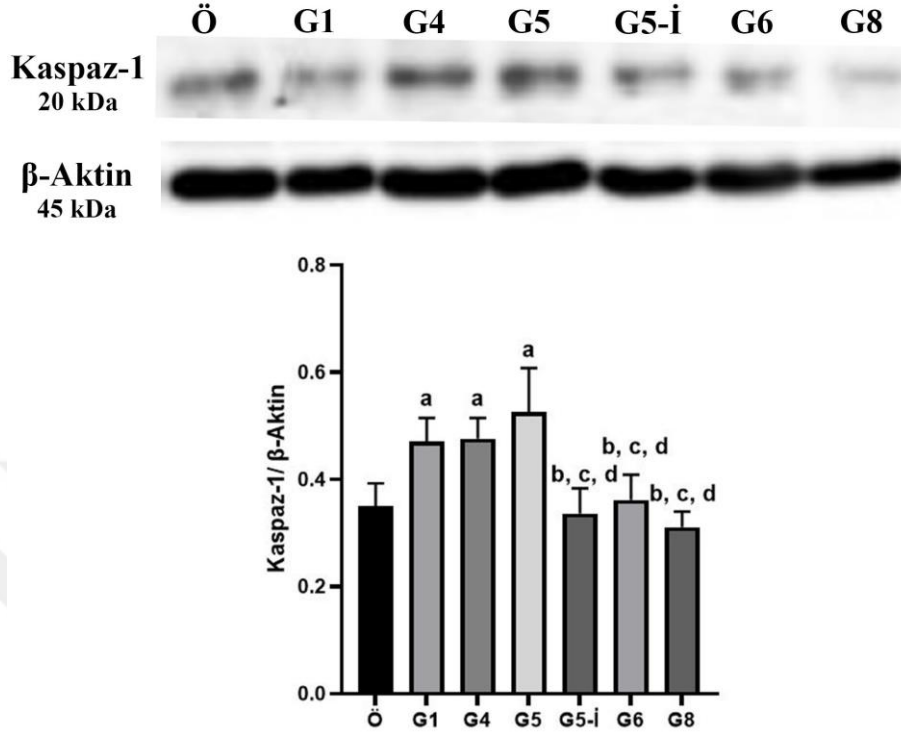
Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait Kaspaz-1 ekspresyonu, 4. günü uterusları ve 5. günü implantasyon bölgelerindeki ile kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir

($p>0.05$). Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait Kaspaz-1 ekspresyonu, gebeliğin 5. günü inter implantasyon ($p=0.0008$), 6. günü implantasyon ($p=0.0094$) ve 8. günü implantasyon bölgelerindekine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 4. günü uterusları ile gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait Kaspaz-1 ekspresyonları kıyaslandığında, gebeliğin 4. günü uteruslarındaki Kaspaz-1 ekspresyon seviyesinin az olduğu gözlenmiştir fakat anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait Kaspaz-1 ekspresyonu, gebeliğin 5. günü inter implantasyon ($p=0.0004$), 6. günü implantasyon ($p=0.0055$) ve 8. günü implantasyon bölgelerindekine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir.

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait Kaspaz-1 ekspresyonu. 5. günü inter implantasyon, 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindeki Kaspaz-1 ekspresyonları, 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerindekiler ile kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.37. Östrus fazı uterusları ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen Kaspaz-1 ve β-Aktin bantları ile istatistiksel analizi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

4.2.3. Gasdermin D Western Blot Analizi

Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Gasdermin D ekspresyonlarını belirlemek için yapılan Western blot yöntemi sonrası elde edilen bantlar ve istatistiksel analizi Şekil 4.38’de gösterilmiştir.

Western blot yöntemi sonrası Gasdermin D’nin inflamatuvar kaspazlar tarafından kesilmesiyle ortaya çıkan Gasdermin D’nin N terminal fragmanı (GSDMD-N) görüntülenmiştir.

İstatistiksel analize göre, östrus fazı uteruslarına ait GSDMD-N ekspresyonu gebeliğin 1. günü uterusları ve gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı şekilde düşüktür ($p < 0.0001$).

Östrus fazı uteruslarda GSDMD-N ekspresyonu gebeliğin 4. günü uterusları, 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Östrus fazı uterusları ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgeleri kıyaslandığında, GSDMD-N ekspresyonlarında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

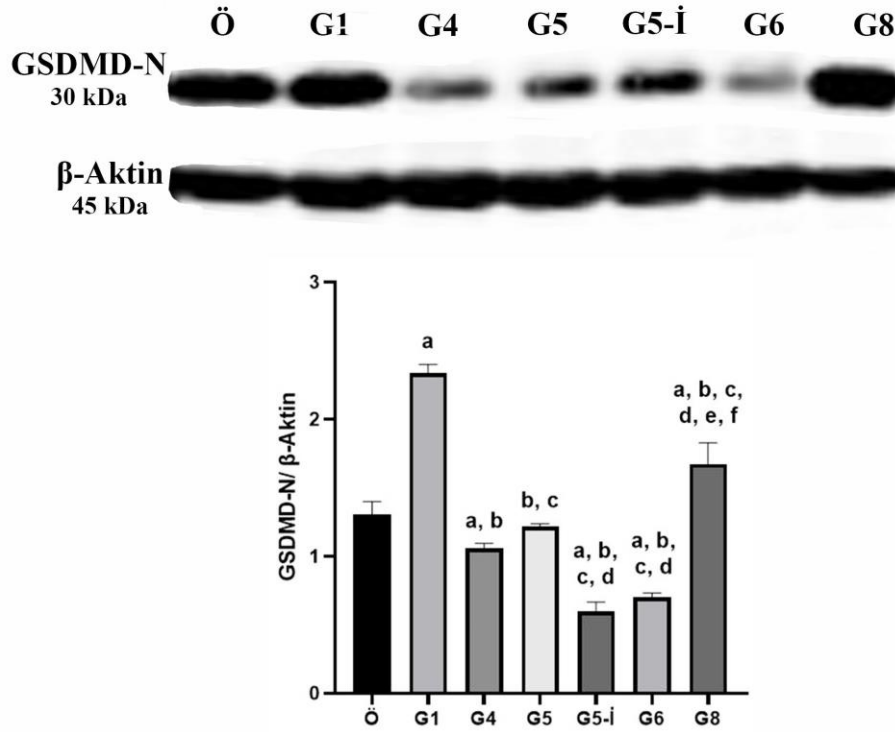
Gebeliğin 1. günü uteruslarda GSDMD-N ekspresyonu tüm gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarında GSDMD-N ekspresyonu, gebeliğin 5. günü implantasyon ($p=0.0193$) ve 8. günü implantasyon bölgelerine ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür. Gebeliğin 4. günü uteruslarda GSDMD-N ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindeki GSDMD-N ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek, gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon ve 6. günü implantasyon bölgelerindeki GSDMD-N ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerindeki GSDMD-N ekspresyonu gebeliğin 5. günü implantasyon bölgeleri ve 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).



Şekil 4.38. Östrus fazı uterusları ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen Gasdermin D-N (GSDMD-N) ve β-Aktin bantları ile istatistiksel analizi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, f: Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

4.2.4. IL-1β Western Blot Analizi

Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde IL-1β ekspresyonlarını belirlemek için yapılan Western blot yöntemi sonrası elde edilen bantlar ve istatistiksel analizi Şekil 4.39’da gösterilmiştir.

Östrus fazı uteruslara ait IL-1β ekspresyonu gebeliğin 1. ve 4. günleri uteruslarındakine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p < 0.0001$).

Östrus fazı uterusları ile gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindeki IL-1β ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Östrus fazı uteruslardaki IL-1β ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p < 0.0001$).

Östrus fazı uteruslarına ait IL-1 β ekspresyonunun gebeliğin 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerindekine göre az olduğu gözlenmiş ancak aralarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 1. günü uteruslardaki IL-1 β ekspresyonu tüm gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

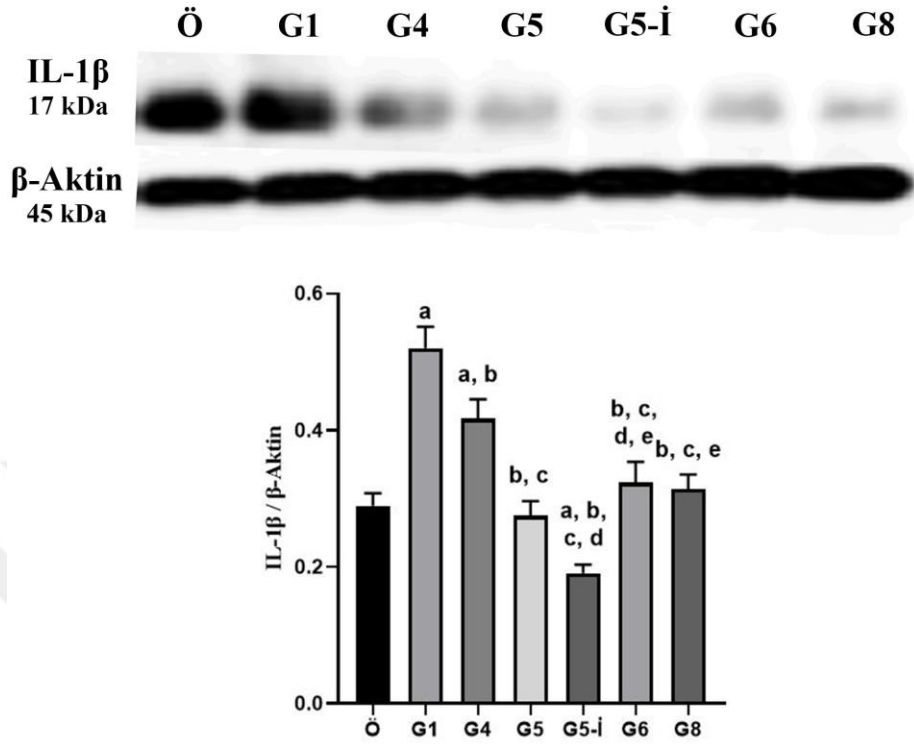
Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait IL-1 β ekspresyonu, gebeliğin 5. günü implantasyon ve inter implantasyon ile 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait IL-1 β ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindeki IL-1 β ekspresyonu gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p=0.0212$). Gebeliğin 5. günü ile 8. günü implantasyon bölgeleri kıyaslandığında IL-1 β ekspresyonlarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine ait IL-1 β ekspresyonu gebeliğin 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0.0001$).

Gebeliğin 6. ve 8. günlerine ait implantasyon bölgelerindeki IL-1 β ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.39. Östrus fazı uterusları ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen IL-1β ve β-Aktin bantları ile istatistiksel analizi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

4.2.5. IL-18 Western Blot Analizi

Deney gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde IL-18 ekspresyonlarını belirlemek için yapılan Western blot yöntemi sonrası elde edilen bantlar ve istatistiksel analizi Şekil 4.40'ta gösterilmiştir.

Östrus fazı uteruslara ait IL-18 ekspresyonu gebeliğin 1. günü uteruslarındakine kıyasla anlamlı bir şekilde düşüktür ($p < 0.0001$).

Östrus fazı uteruslara ait IL-18 ekspresyonunun gebeliğin 4. günü uterusları ve gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindekine göre düşük olduğu gözlenmiş ancak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.005$). Östrus fazı uteruslara ait IL-18 ekspresyonu gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p < 0.0001$).

Östrus fazı uterusları ve gebeliğin 6. gün implantasyon bölgelerindeki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.005$).

Gebeliğin 1. günü uteruslarına ait IL-18 ekspresyonu tüm gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

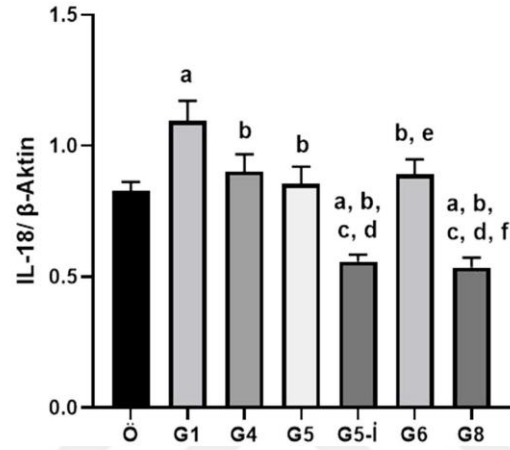
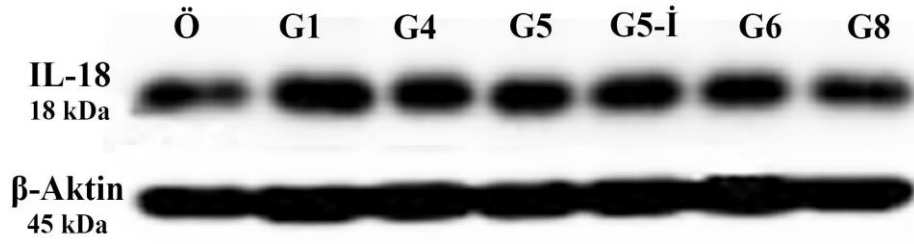
Gebeliğin 4. günü uterusları ile 5. ve 6. günleri implantasyon bölgelerine ait IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında, anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait IL-18 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon bölgeleri ve gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindeki IL-18 ekspresyonu, 5. günü inter implantasyon ve gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine ait IL-18 ekspresyonu, n 5. günü inter implantasyon ve 8. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0.0001$).

Gebeliğin 5. günü inter implantasyon ve 8. günü implantasyon bölgelerindeki IL-18 ekspresyonları kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.40. Östrus fazı uterusları ile peri-implantif dönem gruplarına ait uteruslar/implantasyon bölgelerinde Western Blot yöntemi sonrası elde edilen IL-18 ve β -Aktin bantları ile istatistiksel analizi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (Ö: Östrus, G1: Gebeliğin 1. günü, G4: Gebeliğin 4. günü, G5: Gebeliğin 5. günü, G5-İ: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgesi, G6: Gebeliğin 6. günü, G8: Gebeliğin 8. günü, a: Östrus fazı uteruslarına kıyasla anlamlı, b: Gebeliğin 1. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, c: Gebeliğin 4. günü uteruslarına kıyasla anlamlı, d: Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, e: Gebeliğin 5. günü inter implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı, f: Gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı).

5. TARTIŞMA

Memelilerde gebeliğin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için fertilizasyon sonrası implantasyon ve desidualizasyon süreçlerinin sağlıklı biçimde gerçekleşmesi gerekmektedir. Embriyo implantasyonu sırasında blastosistin endometrium lümen epiteline ve stromaya invaze olmasını kolaylaştıran apoptoz (Pampfer, 1999a), entoz (Li Y. ve ark., 2015) ve otofaji (Su ve ark., 2020) hücre ölümleri meydana gelmektedir.

Gebelik sırasında gerçekleşen trofoblast invazyonu, doku ve vasküler yeniden yapılanma, embriyo büyümesi ve doğumun başlatılması süreçlerinde inflamatuvar yanıtın dengesi önemlidir. Embriyo ve maternal endometrium arasındaki etkileşim kısmen parakrin sitokinler tarafından kontrol edilmektedir (Kauma, 2000). Sitokinler, biyolojik etkilerini spesifik hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla gerçekleştiren ve embriyo-maternal etkileşim sürecindeki işlevleri düzenleyen küçük glikoproteinlerdir (Singh ve ark., 2011). Sitokin ekspresyon seviyelerindeki ve sinyallerindeki dengesizlikler gebelik kayıplarına, erken doğum ve pre-eklampsi gibi gebelik patolojilerine yol açabilmektedir.

İnflamazomlar proinflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-18'in üretiminde ve inflamasyon ilişkili programlı hücre ölümü piroptozun aktivasyonunda rol almaktadır. İnflamazomlar PRR (Patern tanıma reseptörleri) içeren multimoleküler komplekslerdir. PRR ailesinden olan NLR (Nükleotid bağlanma domeyni ve lösin açısından zengin tekrar içeren reseptörleri), ASC (Kaspaz toplama domeyni içeren apoptoz ile ilişkili benek benzeri protein) ile birlikte patojenle ilişkili moleküler paternleri ve hasarla ilişkili moleküler paternleri tanır. NLRP3 inflamazomu NLRP3, ASC ve efektör molekül olarak bir sistein proteaz olan prokaspaz-1'den oluşur. NLRP3 inflamazomu, Kaspaz-1 aktivasyonuna aracılık ederek pro IL-1 β ve pro IL-18'in olgunlaşmasına ve salınmasına yol açar. Olgun inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine ek olarak Gasdermin D aktif Kaspaz-1 tarafından spesifik olarak kesildikten sonra plazma membranında por oluşturur. Gasdermin D'nin plazma membranında por oluşturmasıyla birlikte plazma membranının normal geçirgenlik bariyeri bozulur, sitosolik proteinler bu porlardan hücre dışına salınır, hücre içine su girişi gerçekleşir, hücre hacmi artar, membran yırtılır ve böylelikle programlı hücre ölümü olan piroptoz meydana gelir (Fink ve ark., 2006).

Çalışmamızda, östrus fazı uteruslara ait lümen ve bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonlarının diğer gruplara kıyasla yüksek olduğunu gözlemledik. Ancak östrus fazı uteruslara ait stromadaki NLRP3 ekspresyonunun gebeliğin 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerindekine kıyasla oldukça düşük olduğunu gözlemledik. Çalışmalar farelerde siklusun östrus fazında 17- β östradiyolün (E_2) diğer fazlara kıyasla en yüksek seviyede olduğunu göstermiştir (Wood ve ark., 2007; Caligioni, 2009). Farelerde östrus fazı boyunca E_2 seviyesi sabah saatlerinde pik yapmakta ve öğleden sonra bazal seviyeye inmektedir (Fata ve ark., 2001; Caligioni, 2009). Östrus siklusu boyunca uterus epitel hücrelerinin proliferasyonu, hücre salgılama aktivitelerinin başlaması ve hücre farklılaşmasında E_2 'nin etkisi bulunmaktadır (Zavareh ve ark., 2018). Farelerde östrus fazı sırasında endometriyum lümen epiteli proliferasyonu ve uterus boyutunun diğer fazlara kıyasla yüksek olduğu gösterilmiştir (Wood ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalarda NLRP3'ün aşırı ekspresyonunun mide epitel hücreleri (Li S. ve ark., 2018), akciğer mezotel hücreleri (Moossavi ve ark., 2018) ve glial hücrelerde (Yin ve ark., 2018) proliferasyonu artırarak kansere sebep olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada insan endometrial kanser hücreleri Ishikawa ve HEC-1A'da NLRP3'ün susturulmasının hücre proliferasyonu, hücrelerin koloni oluşturması, invazyon ve migrasyonunu azalttığı, buna karşın NLRP3 aşırı ekspresyonunun bu hücrelerin proliferasyon, migrasyon ve invazyon aktivitelerini indüklediği rapor edilmiştir (Liu S. G. ve ark., 2019). Ayrıca aynı çalışmada Ishikawa ve HEC-1A hücrelerine E_2 uygulamasının NLRP3 aktivasyonu ve hücre proliferasyonunu artırdığı, östrojen reseptörü beta (ER β) inhibitörü tedavisinin ise bu etkileri tersine çevirdiği gösterilmiştir (Liu S. G. ve ark., 2019). Sonuçlarımız östrus fazı uteruslara ait lümen ve bez epitelinde NLRP3 ekspresyonunun E_2 aracılığıyla gerçekleşebileceğini ve epitel hücrelerinin proliferasyon sürecine dahil olabileceğini düşündürmektedir.

Embriyo implantasyonu sırasında hücre proliferasyonu, yeniden şekillenme, farklılaşma ve göç gibi olaylar meydana gelir. Bu kritik olaylar, E_2 ve P_4 'un aracı olduğu hücre tiplerine özgün etkileşimlere bağlıdır. Ovulasyondan hemen önce E_2 salgılanması gebeliğin ilk iki günü boyunca endometrial lümen ve bez epiteli hücrelerinin

proliferasyonu ve farklılaşmasını sağlar. Yeni oluşan korpus luteumdan salgılanan P_4 pre-ovulatuvar E_2 salgısı ile birleşerek gebeliğin 3. gününde proliferasyonun epitelden stromaya geçmesini sağlar. Stroma hücrelerinin proliferasyonu, implantasyonun gerçekleştiği gün olan gebeliğin 4. gününde salgılanan pre-implantasyon ovaryan E_2 salgısı ile etkili hale getirilir. Farelerde blastosistin lümen epiteline tutunması gebeliğin 4. günü gece saatlerinde gerçekleşir. Gebeliğin 5. günü akşamı trofoblast hücreleri endometriyumun stroma tabakasına invaze olur ve implantasyon tamamlanır (Dey ve ark., 2004; Egashira ve ark., 2013). Çalışmamızda östrus fazı uteruslara benzer şekilde gebeliğin 1. günü uterusları lümen ve bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonunun stroma hücrelerindeki kiyasla yüksek olduğunu gözlemledik. Ayrıca östrus fazı uteruslara benzer şekilde gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stroma hücrelerindeki NLRP3 ekspresyonunun gebeliğin 4. günü uterusları, gebeliğin 5., 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerine kiyasla düşük olduğunu gözlemledik. Western blot sonuçlarımızda ise NLRP3 ekspresyonunun gebeliğin 1. gününden 6. gününe kadar kademeli olarak arttığını gözlemledik. Cheng ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada fare endometriyum epitel hücrelerindeki NLRP3 ekspresyonunun gebeliğin 1,5. gününden gebeliğin 5,5. gününe kadar kademeli olarak arttığı rapor edilmiştir (Cheng X. ve ark., 2021). Bu sonuçlar östrus fazı uteruslara benzer şekilde, gebeliğin 1. günü uteruslarına ait lümen ve bez epitelindeki NLRP3 ekspresyonunun E_2 aracılı hücre proliferasyonunda rol alabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda östrus fazı uteruslar ve gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stroma hücrelerinde Kaspaz-1 ve Gasdermin D ekspresyonlarının NLRP3 ekspresyonuna kiyasla yüksek olduğunu gözlemledik. Kanonikal inflamazom yolağında NLRP3 dışında NLRP1, NLRC4 ve AIM2 gibi patern tanıma reseptörleri belirli PAMP'lar ve DAMP'lar ile uyarıldıktan sonra ASC'ler ile birlikte Kaspaz-1'in aktivasyonunda rol almaktadır (Fang ve ark., 2020). Bu nedenle gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stroma hücrelerinde Kaspaz-1 NLRP3 dışında NLRP1, NLRC4 ve AIM2 gibi kanonikal inflamazom yolağının başka patern tanıma reseptörleri tarafından aktive olarak Gasdermin D'nin N ve C terminal fragmanlarına ayrılmasını indüklüyor olabilir.

İmmünohistokimya sonuçlarımıza göre gebeliğin 1. günü uteruslarına ait stromadaki Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonları tüm gruplara kıyasla yüksektir. Ayrıca Western blot bulgularımızda gebeliğin 1. günü uteruslarında Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonlarının tüm gruplara kıyasla en yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 1. günü uteruslarında olgun IL-1 β ve IL-18, Gasdermin D'nin stroma hücrelerinde oluşturduğu membran porlarından hücre dışına salınarak uterusu embriyo implantasyonuna hazırlıyor olabilir.

Kanonikal inflamazom yolağından farklı olarak kanonikal olmayan (non kanonikal) inflamazom yolağı farelerde Kaspaz-11 ve insanlarda Kaspaz-4/5 tarafından tetiklenmektedir. Kaspaz 4/5/11 aktive olarak Gasdermin D'nin yarıklanmasında rol almaktadır (Kayagaki ve ark., 2015). Western blot bulgularımızda Gasdermin D ekspresyonunun gebeliğin 1. gününde tüm gruplara kıyasla en yüksek seviyede olduğu buna karşın Kaspaz-1 ekspresyonunun gebeliğin 1. günü uterusları ile gebeliğin 4. günü uterusları ve 5. günü implantasyon bölgelerinde benzerlik gösterdiği görülmüştür. Farelerde gebeliğin 1. günü uteruslarında gerçekleşen Gasdermin D yarıklanmasında Kaspaz-1'e ek olarak Kaspaz-11'in de rol alabileceğini düşünmekteyiz.

İnsanlarda embriyo implantasyonu sırasında ovaryan hormonlar ve embriyonun endometriyum epitel hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişi indüklediği bilinmektedir (Owusu-Akyaw ve ark., 2019). Epitelyal-mezenkimal geçiş sırasında hücre polaritesi ve hücre-hücre adezyon moleküllerinin azalmasıyla birlikte endometriyum epitel hücrelerinde morfolojik farklılıklar gözlenmektedir (Crha ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda *in vitro* implantasyon modeli sırasında ovaryan hormonlar uygulanan Ishikawa hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişin indüklenerek blastosisti taklit eden JAR sferoidlerin adezyonunun arttığı rapor edilmiştir (Uchida ve ark., 2012; Owusu-Akyaw ve ark., 2019). Ayrıca çalışmalar E-kaderin'in implantasyondan önce lümen epitelinde yüksek oranda eksprese olduğunu, ancak blastosistin stromaya invaze olmasından hemen önce ekspresyonunun azaldığını göstermiştir (Thie ve ark., 1996a; Thie ve ark., 1996b; Thie ve ark., 1998; Paria ve ark., 1999). Bu durum endometriyum lümen epiteli hücreleri arasındaki adezyon moleküllerinin yeniden düzenlenmesinin embriyo implantasyonu sürecinde kritik bir olay olduğunu düşündürmektedir.

Cheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada uteruslarındaki NLRP3 ekspresyonu siRNA ile susturulan farelerde gebeliğin 7.5 günündeki implantasyon bölge sayılarının kontrol grubuna kıyasla azaldığı gösterilmiştir (Cheng X. ve ark., 2021). Ayrıca bu farelere ait endometriyum epitel hücrelerinde E-kaderin, sitokeratin-7 ekspresyonlarının arttığı; N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada E₂ uygulamasının Ishikawa ve insan endometriyum epitel hücrelerinde (hEEC) NLRP3 transkripsiyonunu indüklediği, *in vitro* implantasyon modelinde BeWo sferoidlerin siNLRP3 ile transfekte edilmiş Ishikawa hücrelerine tutunamadığı rapor edilmiştir. Bu çalışma endometriyum epitel hücrelerinde E₂'nin NLRP3 transkripsiyonunu düzenleyebileceği, artan NLRP3 ekspresyonunun epitelyal-mezenkimal geçişi indükleyebileceği, E-kaderin ve sitokeratin-7 ekspresyonlarını azaltarak uterus reseptivitesi ve embriyonun endometriyum lümen epiteline tutunmasını (adezyon) destekleyebileceğini göstermektedir (Cheng X. ve ark., 2021).

Çalışmamızda gebeliğin 4. günü uteruslarına ait lümen epitelindeki NLRP3 ekspresyonunun gebeliğin 1. günü uteruslarındakine kıyasla yüksek olduğunu gözlemledik. Farelerde gebeliğin 4. günü uteruslarına ait lümen epitelinde pre-implantasyon östrojenin etkisi ile NLRP3 ekspresyonunun artması epitelyal-mezenkimal geçişi sağlayarak uterus reseptivitesini indükleyebilir ve embriyonun lümen epiteline tutunmasını kolaylaştırıyor olabilir.

Farelerde gebeliğin 4. gününde blastosistin tutunduğu bölgede vasküler geçirgenlik artmaktadır (Wang H. ve ark., 2006). Anjiyogenez erken implantasyon sırasında başlar ve anjiyogenik faktörler ve dolaşımdaki hormonlar tarafından desteklenmektedir (Ma ve ark., 2001). Farelerde gebeliğin 1. gününden 8. gününe kadar uterus ve implantasyon bölgelerinde ekspre olan vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) vasküler geçirgenlik ve anjiyogenezde rol aldığı bilinmektedir (Chakraborty ve ark., 1995). Ayrıca gebeliğin 4,5. günündeki fare uteruslarında (implantasyon penceresi) VEGF ekspresyonunun arttığı, VEGF'nin embriyo implantasyonunu desteklediği rapor edilmiştir (Tan W. ve ark., 2014).

Yapılan çalışmalarda NLRP3 aktivasyonu ile VEGF ekspresyonu arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Farelerde oluşturulan retinopati modelinde, hipoksinin

NLRP3 inflamazom aktivasyonu aracılığıyla piroptozu başlattığı ve böylelikle VEGF ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (Wang S. ve ark., 2019a). Bir başka çalışmada ise hipoksinin retinal pigment epitel hücrelerinde NLRP3 ve VEGF ekspresyonlarında eşzamanlı bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (Doktor ve ark., 2018). Ayrıca farelerde NLRP3 inflamazom aktivitesinin inhibe edilmesiyle birlikte VEGF ile indüklenen retinal neovaskülarizasyonun azaldığı rapor edilmiştir (Sui ve ark., 2018). Diğer bir çalışmada ise insan retinal endotel hücrelerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonunun hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1) inhibitörü tarafından inhibe edilmesi sonucu VEGF üretiminin azaldığı rapor edilmiştir (Chai ve ark., 2020). Ek olarak, insan meme kanseri hücrelerinde NLRP3 aktivasyonunun inhibe edilmesinin anjiyogenez ve proliferasyonu azalttığı rapor edilmiştir (Kopalli ve ark., 2018).

Peri-implantif dönem farelerin serumunda IL-1 β seviyelerinin en yüksek seviyeye gebeliğin 4-5. günlerinde ulaştığı ve IL-1 antagonist uygulamasının farelerde implantasyonu engellediği rapor edilmiştir (Simón C ve ark., 1998). İnsanlarda orta sekretuvar faza ait endometriyumlarda IL-1 β ekspresyonunun arttığı (Simon C ve ark., 1993), implantasyon penceresine denk gelen orta sekretuvar faza ait endometriyumlarda IL-1 β ekspresyonunun azalmasının abortusa sebep olduğu rapor edilmiştir (von Wolff ve ark., 2000). IL-1 ailesinin inflamasyon ve anjiyogenezde görev aldığı bilinmektedir. IL-1R sinyalizasyonunun çeşitli hücrelerde VEGF ekspresyonunu indükleyerek anjiyogeneze aracılık ettiği rapor edilmiştir (Alagappan ve ark., 2005). IL-1 ailesine üye IL-1 β 'nın kardiyak miyosit ve mikrovasküler endotel hücrelerinde anjiyogenezi başlatan VEGF ve VEGF-reseptörü 2'nin (VEGF2) transkripsiyonunu indüklediği rapor edilmiştir (Maruyama ve ark., 1999). Yapılan bir çalışmada farelerde IL-1 β 'nın nakavt edilmesinin VEGF ekspresyonunu inhibe ederek neovaskülogenezi azalttığı gösterilmiştir (Amano ve ark., 2004). Ek olarak, IL-1 β 'nın p38 mitojenle etkinleşen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı ve HIF1- α 'yı aktive ederek VEGF ekspresyonunu indüklediği ve böylelikle neovaskülogenezde rol aldığı gösterilmiştir (Tanaka ve ark., 2000; Jung ve ark., 2001)

IL-18 spiral arterlerin düz kas hücrelerinde ekspre edilmektedir (Ledee-Bataille ve ark., 2005). IL-1 β ekspresyonuna benzer şekilde IL-18 ekspresyonunun implantasyon

penceresi sırasında arttığı rapor edilmiştir (Huang H. Y. ve ark., 2006). IL-18'in anjiyogenezde görev alan ICAM-1 ve VCAM-1 adezyon molekülleri, kemokinler ve VEGF ekspresyonlarını artırdığı rapor edilmiştir (Gracie ve ark., 1999; Volin ve ark., 2011).

Western blot analizlerimize göre gebeliğin 4. günü uteruslarındaki IL-1 β ve IL-18 ekspresyonları gebeliğin 5. 6. ve 8. günleri implantasyon bölgelerindekine kıyasla daha yüksektir. Literatür bilgileri ve bulgularımız, farelerde implantasyon penceresine denk gelen gebeliğin 4. gününde vasküler geçirgenlik ve anjiyogenez artışında NLRP3 inflamazom aktivasyonunun rol alabileceğini ve Kaspaz-1 aracılığı ile aktif formlarına dönüşen IL-1 β ve IL-18'in anjiyogenik faktörlerin ekspresyonlarını indükleyebileceğini düşündürmüştür. Ayrıca NLRP3 gebeliğin 4.gününde stroma hücre proliferasyonunda rol alıyor olabilir.

Moleküler ve genetik kanıtlar, implantasyon ve desidualizasyon süreçlerinin ovaryum hormonları ile birlikte sitokinler, büyüme faktörleri, homeobox transkripsiyon faktörleri, sinyal molekülleri ve hücre döngüsü proteinleri gibi birçok faktör tarafından düzenlendiğini göstermektedir (Conneely ve ark., 2002; Curtis Hewitt ve ark., 2002; Namiki ve ark., 2018). Lösemi inhibitör faktör (leukemia inhibitory factor, LIF), interlökin-6 (IL-6) ailesi üyesi bir sitokin olup uterus reseptivitesi ve implantasyon için çok önemlidir. LIF, farelerde ilk olarak gebeliğin 4. günü sabahı östrojenin etkisi ile uterus bezlerinden ekspre olur, daha sonra tutunma reaksiyonu boyunca blastosisti çevreleyen stroma hücreleri tarafından ekspre edilir (Stewart ve ark., 1992; Song H. ve ark., 2000; Kelleher ve ark., 2018). *Lif* geni silinen farelerde implantasyonun gerçekleşmediği bildirilmiştir (Stewart ve ark., 1992; Song H. ve ark., 2000). LIF, reseptörü LIFR ve ko-reseptör gp130'a bağlanır, Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) aracılığıyla alt sinyal yolları aktif hale gelir (Niwa ve ark., 1998). *Stat3*'ün uterusda kondisyonel olarak silindiği farelerde (Sun X. ve ark., 2013) ve gp130'un STAT bağlanan bölgelerinin inaktive edildiği farelerde implantasyonun gerçekleşmediği rapor edilmiştir (Ernst ve ark., 2001).

NLRP3 inflamazom yolağı aktivasyonu ve IL-6 ekspresyonu arasında korelasyon olduğunu gösteren bir çalışmada insan umbilikal ven endotel hücrelerine kadmiyum

uygulaması NLRP3 inflamazom aktivasyonunu indüklemiş, Kaspaz-1 aktivasyonu aracılığıyla IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ekspresyonlarını artırmıştır (Chen ve ark., 2016). İnsan kemik iliği stroma hücrelerinde, IL-1 α , IL-1 β , TGF- β ve TNF- α 'nın LIF mRNA transkripsiyonunu artırdığı rapor edilmiştir (Wetzler ve ark., 1991). Bir diğer çalışmada IL-1 β ve TNF- α 'nın fibroblast hücrelerinde LIF ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir (Palmqvist ve ark., 2008). Çalışmamızda gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelinde Kaspaz-1 ekspresyonunun tüm gruplara kıyasla en yüksek düzeyde olduğunu gözlemledik. Gebeliğin 4. günü uteruslarına ait bez epitelinde artan Kaspaz-1 ekspresyonu bez epitelinde IL-1 β aracılığıyla LIF ekspresyonunu indüklüyor olabilir.

Farelerde embriyo implantasyonu kan damarlarından zengin mezometriyum bölgesinin zıt kutbunda bulunan anti-mezometriyal bölgede gerçekleşmektedir (Zhang ve ark., 2013; Croy B.A. ve ark., 2014). Farede blastosist, uterus lümeninin kapanmaya başlamasıyla birlikte uterus eksenini boyunca anti-mezometriyal bölgeye yerleşir (Wang H. ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2013). Blastosistin tutunma reaksiyonundan sonra endometriyum lümen epitelinde hücre ölümü gerçekleşir, stroma hücrelerinde desidualizasyon başlar ve trofektoderm hücrelerinin invazyonu ile blastosist anti-mezometriyal stromaya gömülür (Cha ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2013).

Embriyo implantasyonu sırasında programlı hücre ölümleri apoptoz, entoz ve otofajinin gerçekleştiği ve bu mekanizmaların embriyo tutunmasını ve invazyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir. Fare ve sıçanlarda, elektron mikroskobu ile implantasyon bölgesindeki lümen epiteli hücrelerinin apoptozu gösterilmiştir (Parr, 1987). Kemirgenlerde implantasyon odasına (chamber) en yakın olan uterus stroma hücreleri önce desidua hücrelerine dönüşmektedir ve ardından hızla büyüyen embriyoya yer açmak için ortadan kalkmaktadır (Pampfer, 1999b). Kemirgenlerde, desidua hücresi dejenerasyonu embriyonun yakınından başlayarak (Bulmer, 1961; Katz, 1987), anti-mezometriyal bölge boyunca yayılır (Welsh A. O., Enders, A. C., 1985). Elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler, desidua hücrelerinin otolize uğradığını ve artıkların trofoblastlar tarafından fagosite edildiğini göstermiştir (Katz, 1987). Gebe farelerde yapılan diğer bir çalışmada TUNEL boyaması ile anti-mezometriyal bölgede apoptoz gerçekleştiği yorumu yapılmıştır (Alexander, 1996). Ancak 2015 yılında yapılan bir çalışmada fare

implantasyon bölgesindeki lümen epiteli hücrelerinin entoz mekanizması ile trofoblast hücreleri tarafından endosite edildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, trofoblast kök hücreleri (TSCs) veya blastosistler ile ko-kültüre edilen primer uterus epitel hücrelerinin endositoza uğradığı bildirilmiştir. Ayrıca gebeliğin 5. günü gece yarısı blastosist ile temas halinde olmayan lümen epiteli hücrelerinde apoptoz belirteci aktif kaspaz-3 ekspresyonunun başladığı ve 6. günün sabahında bu bölgedeki epitel hücrelerinin neredeyse tamamında aktif kaspaz-3 ekspresyonunun varlığı rapor edilmiştir (Li Y. ve ark., 2015).

Apoptoz ve entoz mekanizmalarına ek olarak gebe farelerin uteruslarında otofajinin olası rollerini belirlemek için yapılan bir çalışmada, gebeliğin 4., 5. ve 6. günlerinde bazı otofaji belirteçlerinin ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmada otofaji belirteçleri olan LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) ve ATG5 (Autophagy related protein 5) ekspresyonlarında gebeliğin 5. ve 6. günlerinde gebeliğin 4. gününe kıyasla bir azalma rapor edilmiştir. Ayrıca yapay desidualizasyon modeli oluşturulan farelere otofaji inhibitörü 3-metiladenin uygulaması sonrasında desidualizasyon belirteçleri HOXA10 (homeobox A10) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonlarında azalma ve desidualizasyon mekanizmasında bozulma olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar endometriyal otofajinin embriyo implantasyonu ve desidualizasyon için gerekli olabileceğini vurgulamışlardır (Su ve ark., 2020).

Peri-implantasyon periyodunda gerçekleştiği rapor edilen apoptoz, entoz ve otofaji mekanizmalarına ek olarak piroptozun embriyo implantasyonu sırasında rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda NLRP3 inflamazom yolağı üyeleri NLRP3, Kaspaz-1 ve Gasdermin D ekspresyonlarının gebeliğin 4. günü uteruslarındakine kıyasla gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait lümen epitelinde daha düşük olduğunu gözlemledik. Ancak gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki NLRP3, Kaspaz-1 ve Gasdermin D ekspresyonlarının 4. günü uteruslarına ait stromadakine kıyasla yüksek olduğunu gözlemledik. Ek olarak Western blot analizlerimiz ile gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindeki NLRP3, Kaspaz-1 ve Gasdermin D (GSDMD-N) ekspresyonlarının gebeliğin 4. günü uteruslarındakine kıyasla yüksek olduğunu belirledik. Özellikle gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde blastosistin bulunduğu

lümen epitelini çevreleyen subepitelyal stroma hücrelerinde yoğun bir Gasdermin D ekspresyonu olduğunu ve Gasdermin D'nin yoğun olarak membranöz lokalizasyon sergilediğini gözlemledik. Gebeliğin 5. günü inter-implantasyon bölgelerinde yani implantasyonun gerçekleşmediği uterus bölgelerinde ise NLRP3 inflamazom yolağı üyelerinin ekspresyonlarının implantasyon bölgelerine kıyasla oldukça az olduğunu, hatta Gasdermin D ekspresyonunun neredeyse hiç olmadığını gözlemledik. Bu bulgular bize gebeliğin 4. günü uteruslarına ait lümen epitelinde gerçekleşen epitelyal-mezenkimal geçişin embriyo implantasyonunun ilerlemesiyle birlikte gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde giderek azaldığını düşündürmektedir. Ayrıca gebeliğin 5. gününde subepitelyal stroma hücrelerinde yoğun olarak membranöz lokalizasyon sergileyen Gasdermin D ekspresyonu gözlemlememiz bize gebeliğin 5. gününde embriyo implantasyonu sürecinde blastosistin invazyonunu kolaylaştırmak için subepitelyal stroma hücrelerinde inflamasyon-ilişkili programlı hücre ölümü piroptozun gerçekleşiyor olabileceğini düşündürmüştür.

Farelerde gebeliğin 5. gününde, blastosistin tutunma reaksiyonunun tamamlanmasıyla birlikte desidualizasyon mekanizması başlamakta, blastosisti çevreleyen stroma hücreleri gebeliğin 5. günü öğleden sonra avasküler primer desidual bölgeyi oluşturmaktadır (Namiki ve ark., 2018). Primer desidual bölge dışında kalan stroma hücreleri ise vasküler sekonder desidual bölgeyi oluşturmak için prolifer olmaya devam etmektedir (Namiki ve ark., 2018).

Yapılan bir çalışmada NLRP3 aracılı IL-18 ekspresyonunun enterosit farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir (Zaki ve ark., 2011). İdiyopatik pulmoner fibrozis hastalarına ait fibrotik akciğer dokularında NLRP3 ekspresyonunun yüksek olduğu ve akciğer mezenkimal kök hücrelerinde (LR-MSC) NLRP3'n miyofibroblast farklılaşmasını indükleyebileceği rapor edilmiştir. Ayrıca bu hücrelerde NLRP3 aktivasyonunun MCC950 ile inhibe edilmesinin WNT antagonisti olan dickkopf-1'in (DKK1) ekspresyonunu artırdığı ve böylelikle hücre farklılaşmasının baskılandığı gösterilmiştir (Ji ve ark., 2021).

Daha önce bahsettiğimiz literatür bilgilerinden yola çıkarak gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerine ait stromadaki NLRP3 ekspresyonunun primer desidual

bölgeyi oluşturacak stroma hücrelerinin farklılaşmasında, sekonder desidual bölgeyi oluşturacak stroma hücrelerinin ise proliferasyonunda görev alabileceğini düşünmekteyiz.

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde embriyoyu çevreleyen subepitelyal stroma hücrelerinde yani primer desidual bölgeyi oluşturacak olan hücrelerde IL-1 β ekspresyonunun olmadığını gözlemledik. Farelerde gebeliğin 5. gününde farklılaşarak oluşan primer desidual bölge avasküler yapıda olup, sekonder desidual bölge vasküler yapıdadır (Namiki ve ark., 2018). Gebeliğin 5. gününde embriyoyu çevreleyen subepitelyal stroma dışında kalan bölgede (sekonder desidual bölgeyi oluşturacak stroma hücreleri) Kaspaz-1 aracılı IL-1 β salınımının artan vasküler geçirgenlik ve anjiyogeneizde rol alabileceğini düşünmekteyiz.

Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde blastosistin tutunduğu lümen epitelinin hemen altındaki subepitelyal stroma hücrelerinde NLRP3 hem sitoplazmik hem de nüklear lokalizasyon göstermiştir. Gebeliğin 6. ve 8. günleri implantasyon bölgeleri subepitelyal stroma hücrelerindeki NLRP3 ekspresyonunun azalarak devam ettiği gözlenmiş ancak nüklear lokalizasyonun artışı dikkat çekmiştir. Ayrıca gebeliğin 6. ve 8. günlerinde Gasdermin D ekspresyonunun da bu bölgede gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerindekine kıyasla düşük olduğunu gözlemledik. Yapılan bir çalışmada, insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293T) ve fare kemik iliği kaynaklı makrofaj hücrelerinde (BMDM) NLRP3'ün adaptör ASC ile etkileşimini engelleyerek inaktif hale getirmek için NLRP3'ün SUMO ve ubiquitin proteinleri tarafından nükleusa taşınabildiği rapor edilmiştir (Barry ve ark., 2018). Bu bulgular bize embriyo invazyonu ilerledikçe NLRP3 inflamazomunun inhibe olarak nükleusa taşınabileceğini ve böylelikle embriyoyu çevreleyen stroma hücrelerinde programlı hücre ölümü piroptozun azalabileceğini düşündürmüştür.

Farelerde gebeliğin 6. gününde primer desidual bölge (PDB) oluşumu tamamlanmaktadır. Primer desidual bölge avasküler bir yapıda olduğundan maternal immün hücreleri içermemekte ve böylelikle embriyoyu maternal immün yanıtı koruyarak gelişimini desteklemektedir (Tung ve ark., 1986; Tan J. ve ark., 2002; Cha ve ark., 2012). Gebeliğin 6. gününde PDB dışındaki stromal hücreler prolifer olmaya

devam eder ve farklılaşarak vasküler bir sekonder desidual bölgeyi (SDB) oluşturmaya başlar (Huet-Hudson ve ark., 1989; Namiki ve ark., 2018).

Desidualizasyon sırasında endoplazmik retikulum (ER) stresi ve bunun sonucunda katlanmamış protein yanıtı (unfolded protein response/UPR) gerçekleşmektedir (Soczewski ve ark., 2020). ER stresi sırasında implantasyon sürecinde ekspre olan faktörlerin indüklendiği rapor edilmiştir (Byrd ve ark., 2013). Ayrıca ER stresin anjiyogenez ile birlikte inflamasyonu başlattığı bilinmektedir (Binet ve ark., 2015). İnsan endometriyal stroma hücreleri ile yapılan *in vitro* desidualizasyon modelinde ER stresine neden olan ER stres sensörleri (ATF6, PERK ve IRE1 α), katlanmamış protein yanıtı (UPR) belirteçleri (sXBP1 ve CHOP) ve NLRP3, Kaspaz-1 ve IL-1 β ekspresyonlarının desidualize olmayan hücrelere kıyasla arttığı rapor edilmiştir. Desidualize olan hücrelere IRE1 α inhibitörü STF-083010 uygulamasının NLRP3 aktivasyonunu engellediği gösterilmiştir. *In vitro* implantasyon modelinde STF-083010 uygulamasının trofoblast invazyon indeksini düşürdüğü rapor edilmiştir (Grasso E. ve ark., 2018). Aynı çalışmada tekrarlayan implantasyon başarısızlığı görülen kadınlardan elde edilen endometriyum dokularındaki sXBP1, TXNIP ve NLRP3 ekspresyonlarının fertil kadınlara kıyasla düşük olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuçlar ER/UPR ve NLRP3 aktivasyonu ile gerçekleşen inflamatuvar yanıtın endometriyal reseptivite ve trofoblast invazyonunu desteklediğini göstermektedir (Grasso E. ve ark., 2018). Çalışmamızda gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerinde primer desidual bölgeye kıyasla SDB'yi oluşturacak stroma hücrelerinde yoğun NLRP3, Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonları gözlemledik. Western blot sonuçlarımıza göre NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 6. gününde tüm gruplara kıyasla en yüksek seviyededir. Literatür bilgileri ve bulgularımızdan yola çıkarak gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerinde sekonder desidual bölgede aktive olan NLRP3 inflamazomunun sekonder desidual bölgeyi oluşturacak stroma hücrelerinin proliferasyon ve desidualizasyon mekanizmalarında rol alabileceğini ve trofoblast invazyonunu destekleyebileceğini düşünmekteyiz.

Sitokin ekspresyon seviyeleri ve sitokin sinyalindeki dengesizlikler implantasyon başarısızlığı ve anormal plasantasyona yol açarak spontan abortus, pre-term doğum ve pre-eklampsia gibi patolojilere sebep olabilmektedir (Guzeloglu-Kayisli ve ark., 2009).

Aşırı aktive olan NLRP3 inflamazomu ile birlikte gerçekleşen inflamatuvar yanıtın pre-eklampsie sebep olabileceğini rapor eden çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, pre-eklampsie görülen kadınlardan alınan plasentalarda, *Nlrp3*, *kaspaz-1*, *Il-1 β* , *Tnf- α* ve *Hmgb1* mRNA seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla bir artış gözlenmiştir. Ayrıca pre-eklampitik gruba ait plasenta villuslarında NLRP3, Kaspaz-1, IL-1 β ve TNF- α ve HMGB1 seviyelerinin kontrol grubundakine kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (C. Weel ve ark., 2017). Başka bir çalışmada erken başlangıçlı pre-eklampitik plasentalarda Kaspaz-1, Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonlarının kontrol plasentalardakine kıyasla yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca primer insan trofoblastlarının hipoksiye maruz kalmasının NLRP3 inflamazom aktivasyonuna yol açtığı rapor edilmiştir (Cheng S. B. ve ark., 2019). Başka bir çalışmada pre-eklampitik kadınların serumlarındaki kolesterol ve ürik asit düzeylerinin sağlıklı gebe kadınlarınkine kıyasla yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada kolesterol ve ürik asit kristalleri ile kültüre edilen koryonik villus eksplantlarında IL-1 β salınımının arttığı, NLRP3 inhibitörü MCC950 uygulandığında IL-1 β seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir. Bu sonuçlar kolesterol ve ürik aside yanıt olarak oluşan plasental inflamasyonun NLRP3 aktivasyonuna aracılık ederek pre-eklampsie patogeneze sebep olabileceğini düşündürmektedir (Stodle ve ark., 2018).

Farelerde gebeliğin 8. gününde sekonder desidual bölge oluşmuş, primer desidual bölge ortadan kalkmıştır. Gebelik ilerledikçe sekonder desidual bölge ince bir hücre tabakası olan desidua kapsülarise dönüşür. Daha sonra mezometriyal desidual hücreler desidua bazalisi oluştururlar. Diğer bir ifadeyle desidua hücreleri plasenta yapısına katılır (Welsh A. O. ve ark., 1985).

Western blot analizlerimize göre gebeliğin 8. günündeki NLRP3, Kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonlarının diğer gebelik günlerine kıyasla düşük olduğunu ancak Gasdermin D (GSDMD-N) ekspresyonunun gebeliğin 4., 5. ve 6. günlerindeki kıyasla yüksek olduğunu gözlemledik. Ayrıca immünohistokimya bulgularımızda NLRP3'ün gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerine ait sekonder desidual bölgede yoğun olarak nükleusta lokalize olduğunu gözlemledik. Yapılan çalışmalar ve bulgularımız ışığında NLRP3 inflamazom yolağı inaktivasyonunun plasantasyonun sağlıklı şekilde gerçekleşebilmesi

için gerekli olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca gebeliğin 8. günü implantasyon bölgelerindeki yüksek Gasdermin D (GSDMD-N) ekspresyonlarının kanonikal olmayan inflamazom yolağı tarafından indklenebileceğini düşünmekteyiz.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda östrus fazı uteruslar ve peri-implantif dönem uterus/implantasyon bölgelerinde inflamazom ilişkili programlı hücre ölümü piroptozda görev alan NLRP3 inflamazom yolağı üyeleri NLRP3, Kaspaz-1 Gasdermin D, IL-1 β ve IL-18'in lokalizasyon ve ekspresyonlarını immünohistokimya ve Western blot teknikleri ile belirledik. Çalışmamıza ait bulgulardan yola çıkarak elde ettiğimiz sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Fare östrus fazı ve peri-implantif döneme ait uterus/implantasyon bölgelerinde inflamasyon ilişkili programlı hücre ölümü piroptozun rolü ve NLRP3 inflamazom yolağı üyelerinin lokalizasyon ve ekspresyonları bu çalışma ile ilk kez gösterilmiştir.
2. Peri-implantif dönem fare uterus/implantasyon bölgelerinde NLRP3 inflamazom yolağı üyelerinin sergilediği farklı lokalizasyon ve ekspresyon paternleri, embriyo implantasyonu ve desidualizasyon sırasındaki olası rollerini ortaya koymaktadır.
3. NLRP3 ekspresyonu gebeliğin 1. gününden gebeliğin 6. gününe kadar kademeli olarak artmıştır ve gebeliğin 6. günü implantasyon bölgelerinde tüm gruplara kıyasla en yüksek seviyeye ulaşmıştır.
4. Gebeliğin 1. günü uteruslarda Gasdermin D ekspresyonu tüm gruplara kıyasla en yüksek seviyededir.
5. Gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde Kaspaz-1 ekspresyonu tüm gruplar arasında en yüksek seviyeye ulaşmıştır.
6. Farelerde gebeliğin 5. günü implantasyon bölgelerinde embriyoyu çevreleyen subepitelyal stroma hücrelerinde NLRP3, Kaspaz-1 ve Gasdermin D ekspresyonunun yoğun bir şekilde gözlenmesi, embriyo invazyonu sırasında piroptozun görev alabileceğini düşündürmektedir.
7. Bulgularımız embriyo implantasyonu ve desidualizasyon süreçlerinde NLRP3 inflamazom yolağının rol alabileceğini düşündürmektedir.
8. Bu çalışma ile embriyo implantasyonu ve desidualizasyon sırasında gerçekleşen NLRP3 aracılı piroptoz hakkındaki kısıtlı literatür bilgisine katkı sağladığımızı

düşünmekteyiz. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular veri tabanı oluşturarak yeni projelerin ortaya çıkmasına olanak sağlayacaktır.

9. Çalışmamızdan elde edilen bulguların kliniğe yansıtılarak tekrarlayan gebelik kayıpları ve implantasyon başarısızlığı yaşayan hastalar için geliştirilecek terapötik tedavilere katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- Aachoui Y, Sagulenko V, Miao EA, Stacey KJ. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. *Current opinion in microbiology*. 2013; 16: 319-326.
- Abraham M, Shapiro S, Lahat N, Miller A. The role of il-18 and il-12 in the modulation of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in monocytic cells. *International immunology*. 2002; 14: 1449-1457.
- Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *American journal of reproductive immunology*. 2004; 51: 275-282.
- Aglietti RA, Estevez A, Gupta A, Ramirez MG, Liu PS, Kayagaki N , ve ark. Gsdmd p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113: 7858-7863.
- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. Nalp3 forms an il-1 β -processing inflammasome with increased activity in mucklewells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004; 20: 319-325.
- Akbal A, Dernst A, Lovotti M, Mangan MSJ, McManus RM, Latz E. How location and cellular signaling combine to activate the nlrp3 inflammasome. *Cellular & molecular immunology*. 2022; 19: 1201-1214.
- Alagappan VK, McKay S, Widyastuti A, Garrelds IM, Bogers AJ, Hoogsteden HC , ve ark. Proinflammatory cytokines upregulate mrna expression and secretion of vascular endothelial growth factor in cultured human airway smooth muscle cells. *Cell biochemistry and biophysics*. 2005; 43: 119-129.
- Alexander CM, Hansell, E. J., Behrendtsen, O., Flannery, M. L., Kishnani, N. S., Hawkes, S. P., Werb, Z. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. . *Development*. 1996; 122: 1723-1736.
- Amano K, Okigaki M, Adachi Y, Fujiyama S, Mori Y, Kosaki A , ve ark. Mechanism for il-1 β -mediated neovascularization unmasked by il-1 β knock-out mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004; 36: 469-480.
- Anthony AL. Junqueira's temel histoloji: Atlas kitap. S Solakoğlu Ed. 3 ed. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2015.
- Ashworth MD, Ross JW, Stein DR, White FJ, Desilva UW, Geisert RD. Endometrial caspase 1 and interleukin-18 expression during the estrous cycle and peri-implantation period of porcine pregnancy and response to early exogenous estrogen administration. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2010; 8: 33.
- Bao Q, Shi Y. Apoptosome: A platform for the activation of initiator caspases. *Cell death and differentiation*. 2007; 14: 56-65.
- Barry R, John SW, Lippardi G, Tenev T, Jaco I, Chen CH , ve ark. Sumo-mediated regulation of nlrp3 modulates inflammasome activity. *Nature communications*. 2018; 9: 3001.
- Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D , ve ark. Cutting edge: Nf-kappab activating pattern recognition and cytokine receptors

- license nlrp3 inflammasome activation by regulating nlrp3 expression. *Journal of immunology*. 2009; 183: 787-791.
- Beer AE, Billingham RE. Immunoregulatory aspects of pregnancy. *Federation proceedings*. 1978; 37: 2374-2378.
- Bellofiore N, McKenna J, Ellery S, Temple-Smith P. The spiny mouse-a menstruating rodent to build a bridge from bench to bedside. *Frontiers in reproductive health*. 2021; 3: 784578.
- Bergsbaken T, Cookson BT. Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS pathogens*. 2007; 3: e161.
- Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*. 2009; 7: 99-109.
- Bigonnesse F, Labelle Y, Akoum A. Triphasic expression of interleukin-1 receptor type i in human endometrium throughout the menstrual cycle of fertile women and women with unexplained infertility. *Fertility and sterility*. 2001; 75: 79-87.
- Binet F, Sapieha P. Er stress and angiogenesis. *Cell metabolism*. 2015; 22: 560-575.
- Bonnet R. Beitrage zur embryologie der wiederkauer, gewonnen am schafei. *Arc Anat Physiol*. 1884: 170-230.
- Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular microbiology*. 2000; 38: 31-40.
- Bulmer D, Dickson, A. D. The fibrinoid capsule of the rat placenta and the disappearance of the decidua. *J. Anat*. 1961; 95: 300-310.
- Byrd AE, Brewer JW. Micro(rna)managing endoplasmic reticulum stress. *IUBMB life*. 2013; 65: 373-381.
- C. Weel I, Romao-Veiga M, Matias ML, Fioratti EG, Peracoli JC, Borges VT , ve ark. Increased expression of nlrp3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *Journal of reproductive immunology*. 2017; 123: 40-47.
- Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Current protocols in neuroscience*. 2009; Appendix 4: Appendix 4I.
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA , ve ark. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 1992; 256: 97-100.
- Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nature medicine*. 2012; 18: 1754-1767.
- Chai G, Liu S, Yang H, Du G, Chen X. Nlrp3 blockade suppresses pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokine secretion in diabetic retinopathy. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2020; 13: 3047-3058.
- Chakraborty I, Das SK, Dey SK. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mrnas in the mouse uterus around the time of implantation. *The Journal of endocrinology*. 1995; 147: 339-352.
- Chen H, Lu Y, Cao Z, Ma Q, Pi H, Fang Y , ve ark. Cadmium induces nlrp3 inflammasome-dependent pyroptosis in vascular endothelial cells. *Toxicology letters*. 2016; 246: 7-16.
- Cheng SB, Nakashima A, Huber WJ, Davis S, Banerjee S, Huang Z , ve ark. Pyroptosis is a critical inflammatory pathway in the placenta from early onset preeclampsia

- and in human trophoblasts exposed to hypoxia and endoplasmic reticulum stressors. *Cell death & disease*. 2019; 10: 927.
- Cheng X, Zhang Y, Ma J, Wang S, Ma R, Ge X , ve ark. Nlrp3 promotes endometrial receptivity by inducing epithelial-mesenchymal transition of the endometrial epithelium. *Molecular human reproduction*. 2021; 27: gaab056.
- Cockburn K, Rossant J. Making the blastocyst: Lessons from the mouse. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120: 995-1003.
- Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL , ve ark. Mcc950 directly targets the nlrp3 atp-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nature chemical biology*. 2019; 15: 556-559.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent progress in hormone research*. 2002; 57: 339-355.
- Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in microbiology*. 2001; 9: 113-114.
- Crha K, Ventruba P, Zakova J, Jeseta M, Pilka R, Vodicka J , ve ark. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function and receptivity. *Ceska gynekologie*. 2019; 84: 371-375.
- Croy BA, Esadeg S, Chantakru S, van den Heuvel M, Paffaro VA, He H , ve ark. Update on pathways regulating the activation of uterine natural killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *Journal of reproductive immunology*. 2003; 59: 175-191.
- Croy BA, Yamada AT, DeMayo FJ, S.L. A. The guide to investigation of mouse pregnancy. Elsevier; 2014.
- Curtis Hewitt S, Goulding EH, Eddy EM, Korach KS. Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod*. 2002; 67: 1268-1277.
- D'Ippolito S, Tersigni C, Marana R, Di Nicuolo F, Gaglione R, Rossi ED , ve ark. Inflammasome in the human endometrium: Further step in the evaluation of the "maternal side". *Fertility and sterility*. 2016; 105: 111-118 e111-114.
- Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome nlrs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology*. 2011; 29: 707-735.
- de Gassart A, Martinon F. Pyroptosis: Caspase-11 unlocks the gates of death. *Immunity*. 2015; 43: 835-837.
- Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: Is il-1 just the tip of the iceberg? *Cell death & disease*. 2012; 3: e338.
- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T , ve ark. Molecular cues to implantation. *Endocrine reviews*. 2004; 25: 341-373.
- Di Nicuolo F, D'Ippolito S, Castellani R, Rossi ED, Masciullo V, Specchia M , ve ark. Effect of alpha-lipoic acid and myoinositol on endometrial inflammasome from recurrent pregnancy loss women. *American journal of reproductive immunology*. 2019; 82: e13153.
- Di Nicuolo F, Di S, Castellani R, Rossi ED, Masciullo V, Specchia M, Mariani M, Pontecorvi A, Scambia G, Di Simone N. . Effect of alpha-lipoic acid and myoinositol on endometrial inflammasome from recurrent pregnancy loss women. *American journal of reproductive immunology*. 2019; 82: e13153.

- Dickson AD. Trophoblastic giant cell transformation of mouse blastocysts. *Journal of reproduction and fertility*. 1963; 6: 465-466.
- Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human reproduction update*. 2005; 11: 613-630.
- Dinareello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1994; 8: 1314-1325.
- Dinareello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011; 117: 3720-3732.
- Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J , ve ark. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*. 2016; 535: 111-116.
- Doktor F, Prager P, Wiedemann P, Kohen L, Bringmann A, Hollborn M. Hypoxic expression of nlrp3 and vegf in cultured retinal pigment epithelial cells: Contribution of p2y(2) receptor signaling. *Purinergic signalling*. 2018; 14: 471-484.
- Dominguez F, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F, Simon C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: Different processes with similar players? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005; 19: 1056-1060.
- Dower SK, Kronheim SR, Hopp TP, Cantrell M, Deeley M, Gillis S , ve ark. The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical. *Nature*. 1986; 324: 266-268.
- Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG , ve ark. Cryopyrin/nalp3 binds atp/datp, is an atpase, and requires atp binding to mediate inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104: 8041-8046.
- Edgeworth JD, Spencer J, Phalipon A, Griffin GE, Sansonetti PJ. Cytotoxicity and interleukin-1beta processing following shigella flexneri infection of human monocyte-derived dendritic cells. *European journal of immunology*. 2002; 32: 1464-1471.
- Egashira M, Hirota Y. Uterine receptivity and embryo-uterine interactions in embryo implantation: Lessons from mice. *Reproductive medicine and biology*. 2013; 12: 127-132.
- Enders AC, Schlafke S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *The American journal of anatomy*. 1969; 125: 1-29.
- Erlebacher A. Mechanisms of t cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nature reviews. Immunology*. 2013; 13: 23-33.
- Ernst M, Inglese M, Waring P, Campbell IK, Bao S, Clay FJ , ve ark. Defective gp130-mediated signal transducer and activator of transcription (stat) signaling results in degenerative joint disease, gastrointestinal ulceration, and failure of uterine implantation. *The Journal of experimental medicine*. 2001; 194: 189-203.
- Faas MM, de Vos P. Uterine nk cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*. 2017; 56: 44-52.
- Fang Y, Tian S, Pan Y, Li W, Wang Q, Tang Y , ve ark. Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2020; 121: 109595.

- Fata JE, Chaudhary V, Khokha R. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17 β -estradiol during the estrous cycle. *Biology of reproduction*. 2001; 65: 680-688.
- Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, et al. The pyroptosome: A supramolecular assembly of asc dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell death and differentiation*. 2007; 14: 1590-1604.
- Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular microbiology*. 2006; 8: 1812-1825.
- Finn CA, Porter DG. The uterus. *Reprod. Biol. Handbook*. Vol. 1. Acton, Ma.: Publishing Sciences Group Inc.; 1975.
- 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.
- Fox JG. The mouse in biomedical research: Normative biology, husbandry, and models. JG Fox, S Barthold, M Davisson, CE Newcomer, FW Quimby, A Smith Eds. Vol. 3: Elsevier; 2006.
- Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nature immunology*. 2009a; 10: 241-247.
- Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting edge: Tnf- α mediates sensitization to atp and silica via the nlrp3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *Journal of immunology*. 2009b; 183: 792-796.
- Gao P, Zha Y, Gong X, Qiao F, Liu H. The role of maternal-foetal interface inflammation mediated by nlrp3 inflammasome in the pathogenesis of recurrent spontaneous abortion. *Placenta*. 2020; 101: 221-229.
- 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.
- Gonzalez RR, Rueda BR, Ramos MP, Littell RD, Glasser S, Leavis PC. Leptin-induced increase in leukemia inhibitory factor and its receptor by human endometrium is partially mediated by interleukin 1 receptor signaling. *Endocrinology*. 2004; 145: 3850-3857.
- Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, et al. A proinflammatory role for il-18 in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1999; 104: 1393-1401.
- Grasso E, Gori S, Soczewski E, Fernandez L, Gallino L, Vota D, et al. Impact of the reticular stress and unfolded protein response on the inflammatory response in endometrial stromal cells. *Scientific reports*. 2018; 8: 12274.
- Grasso P, Rozhavskaya M, Reichert LE, Jr. In vivo effects of human follicle-stimulating hormone-related synthetic peptide hfsh- β -(81-95) and its subdomain hfsh- β -(90-95) on the mouse estrous cycle. *Biology of reproduction*. 1998; 58: 821-825.
- Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine*. 2015; 21: 677-687.

- Guo X, Xu X, Li T, Yu Q, Wang J, Chen Y , ve ark. Nlrp3 inflammasome activation of mast cells by estrogen via the nuclear-initiated signaling pathway contributes to the development of endometriosis. *Frontiers in immunology*. 2021; 12: 749979.
- 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.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S , ve ark. Decidual nk cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine*. 2006; 12: 1065-1074.
- Harper MJ. Platelet-activating factor: A paracrine factor in preimplantation stages of reproduction? *Biology of reproduction*. 1989; 40: 907-913.
- Hashem A, Al-Mukhtar S, Ibrahim R, Faris M. *Anatomy & physiology of the reproductive system*. 2021.
- He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z , ve ark. Gasdermin d is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell research*. 2015; 25: 1285-1298.
- Hoffman HM, Wright FA, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Identification of a locus on chromosome 1q44 for familial cold urticaria. *American journal of human genetics*. 2000; 66: 1693-1698.
- Hornung V, Latz E. Intracellular DNA recognition. *Nature reviews. Immunology*. 2010; 10: 123-130.
- Huang HY, Chan SH, Yu HT, Wang HS, Lai CH, Soong YK. Interleukin-18 system messenger rna and protein expression in human endometrium during the menstrual cycle. *Fertility and sterility*. 2006; 86: 905-913.
- Huang JC, Liu DY, Yadollahi S, Wu KK, Dawood MY. Interleukin-1 beta induces cyclooxygenase-2 gene expression in cultured endometrial stromal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998; 83: 538-541.
- Huet-Hudson YM, Andrews GK, Dey SK. Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: Modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology*. 1989; 125: 1683-1690.
- Irandoost E, Najibi S, Talebbeigi S, Nassiri S. Focus on the role of nlrp3 inflammasome in the pathology of endometriosis: A review on molecular mechanisms and possible medical applications. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2023; 396: 621-631.
- Ji J, Hou J, Xia Y, Xiang Z, Han X. Nlrp3 inflammasome activation in alveolar epithelial cells promotes myofibroblast differentiation of lung-resident mesenchymal stem cells during pulmonary fibrogenesis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. 2021; 1867: 166077.
- Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological reviews*. 2015; 265: 130-142.
- Jung YD, Liu W, Reinmuth N, Ahmad SA, Fan F, Gallick GE , ve ark. Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleukin-1 beta in human vascular smooth muscle cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Angiogenesis*. 2001; 4: 155-162.
- Kammerer U. Antigen-presenting cells in the decidua. *Chemical immunology and allergy*. 2005; 89: 96-104.

- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G. Intracellular nod-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. 2007; 27: 549-559.
- Katz S, Abrahamson, P. A. . Involution of the anti-mesometrial decidua in the mouse. *Anat. Embryol*. 1987; 176: 251-258.
- Kauma SW. Cytokines in implantation. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. 2000; 55: 31-42.
- Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S , ve ark. Caspase-11 cleaves gasdermin d for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*. 2015; 526: 666-671.
- Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J , ve ark. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011; 479: 117-121.
- Kelleher AM, Milano-Foster J, Behura SK, Spencer TE. Uterine glands coordinate on-time embryo implantation and impact endometrial decidualization for pregnancy success. *Nature communications*. 2018; 9: 2435.
- Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87: 5548-5552.
- Kolb R, Liu GH, Janowski AM, Sutterwala FS, Zhang W. Inflammasomes in cancer: A double-edged sword. *Protein & cell*. 2014; 5: 12-20.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin v for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on b cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84: 1415-1420.
- Kopalli SR, Kang TB, Lee KH, Koppula S. Nlrp3 inflammasome activation inhibitors in inflammation-associated cancer immunotherapy: An update on the recent patents. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*. 2018; 13: 106-117.
- Kovacs SB, Miao EA. Gasdermins: Effectors of pyroptosis. *Trends in cell biology*. 2017; 27: 673-684.
- Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014; 157: 1013-1022.
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews. Immunology*. 2013; 13: 397-411.
- Ledee-Bataille N, Bonnet-Chea K, Hosny G, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertility and sterility*. 2005; 83: 598-605.
- Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Coulomb-L'hermine A, Durand-Gasselini I, Frydman R, Chaouat G. A new role for natural killer cells, interleukin (il)-12, and il-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 2004; 81: 59-65.
- Lei-Leston AC, Murphy AG, Maloy KJ. Epithelial cell inflammasomes in intestinal immunity and inflammation. *Frontiers in immunology*. 2017; 8: 1168.
- Li H, Zhao XK, Cheng YJ, Zhang Q, Wu J, Lu S , ve ark. Gasdermin d-mediated hepatocyte pyroptosis expands inflammatory responses that aggravate acute liver failure by upregulating monocyte chemotactic protein 1/cc chemokine receptor-2 to recruit macrophages. *World journal of gastroenterology*. 2019; 25: 6527-6540.

- Li S, Liang X, Ma L, Shen L, Li T, Zheng L , ve ark. Mir-22 sustains nlrp3 expression and attenuates h. Pylori-induced gastric carcinogenesis. *Oncogene*. 2018; 37: 884-896.
- Li Y, Sun X, Dey SK. Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation. *Cell reports*. 2015; 11: 358-365.
- Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastas N, Sadovsky Y , ve ark. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269: 17125-17131.
- Liston A, Masters SL. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nature reviews. Immunology*. 2017; 17: 208-214.
- Liu SG, Wu XX, Hua T, Xin XY, Feng DL, Chi SQ , ve ark. Nlrp3 inflammasome activation by estrogen promotes the progression of human endometrial cancer. *OncoTargets and therapy*. 2019; 12: 6927-6936.
- Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H , ve ark. Inflammasome-activated gasdermin d causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*. 2016; 535: 153-158.
- Lu A, Li Y, Schmidt FI, Yin Q, Chen S, Fu TM , ve ark. Molecular basis of caspase-1 polymerization and its inhibition by a new capping mechanism. *Nature structural & molecular biology*. 2016; 23: 416-425.
- Lu M, Ma F, Xiao J, Yang L, Li N, Chen D. Nlrp3 inflammasome as the potential target mechanism and therapy in recurrent spontaneous abortions. *Molecular medicine reports*. 2019; 19: 1935-1941.
- Ma W, Tan J, Matsumoto H, Robert B, Abrahamson DR, Das SK , ve ark. Adult tissue angiogenesis: Evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Molecular endocrinology*. 2001; 15: 1983-1992.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*. 1995; 146: 3-15.
- Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the nlrp3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nature reviews. Drug discovery*. 2018; 17: 588-606.
- March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V , ve ark. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary dnas. *Nature*. 1985; 315: 641-647.
- Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP , ve ark. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors asc and ipaf. *Nature*. 2004; 430: 213-218.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proil-beta. *Molecular cell*. 2002; 10: 417-426.
- Maruyama K, Mori Y, Murasawa S, Masaki H, Takahashi N, Tsutusmi Y , ve ark. Interleukin-1 beta upregulates cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptor kdr/flk-1 via activation of protein tyrosine kinases. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1999; 31: 607-617.
- Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA , ve ark. Activation of the nlrp3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a

- mechanism for enhanced il-1beta in type 2 diabetes. *Nature immunology*. 2010; 11: 897-904.
- Maybin JA, Critchley HO. Menstrual physiology: Implications for endometrial pathology and beyond. *Human reproduction update*. 2015; 21: 748-761.
- McMaster MT, Newton RC, Dey SK, Andrews GK. Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *Journal of immunology*. 1992; 148: 1699-1705.
- Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A. Tlr5 and ipaf: Dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Seminars in immunopathology*. 2007; 29: 275-288.
- Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, et al. Innate immune detection of the type iii secretion apparatus through the nlrc4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107: 3076-3080.
- Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews*. 2011; 243: 206-214.
- Mole MA, Weberling A, Zernicka-Goetz M. Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation. *Current topics in developmental biology*. 2020; 136: 113-138.
- Molla MD, Ayelign B, Dessie G, Geto Z, Admasu TD. Caspase-1 as a regulatory molecule of lipid metabolism. *Lipids in health and disease*. 2020; 19: 34.
- Moore KL, Persoud TVN. The developing human: Clinically oriented embryology. I Ozols, M Hyde, K DeFrancesco Eds. 8 ed. London, United Kingdom: Saunders Elsevier; 2008.
- Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the nlrp3 inflammasome in cancer. *Molecular cancer*. 2018; 17: 158.
- Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature reviews. Immunology*. 2017; 17: 469-482.
- Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011; 1221: 80-87.
- Namiki T, Ito J, Kashiwazaki N. Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice. *Reproductive medicine and biology*. 2018; 17: 331-342.
- Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of stat3. *Genes and Development*. 1998; 12: 2048-2060.
- Nunes PR, Mattioli SV, Sandrim VC. Nlrp3 activation and its relationship to endothelial dysfunction and oxidative stress: Implications for preeclampsia and pharmacological interventions. *Cells*. 2021; 10.
- Ochoa-Bernal MA, Fazleabas AT. Physiologic events of embryo implantation and decidualization in human and non-human primates. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21.
- Owusu-Akyaw A, Krishnamoorthy K, Goldsmith LT, Morelli SS. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function. *Human reproduction update*. 2019; 25: 114-133.

- Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hanstrom L, Lerner UH. Il-1beta and tnf-alpha regulate il-6-type cytokines in gingival fibroblasts. *Journal of dental research*. 2008; 87: 558-563.
- Pampfer S, Donnay, I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell death and differentiation*. 1999a; 6: 533-545.
- Pampfer S, Donnay, I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat *Cell Death Differ*. 1999b; 6: 533-545.
- Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: Advances and challenges. *Science*. 2002; 296: 2185-2188.
- Paria BC, Zhao X, Das SK, Dey SK, Yoshinaga K. Zonula occludens-1 and e-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Developmental biology*. 1999; 208: 488-501.
- Parr EL, Tung, H.N., Parr, M.B., Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biology of reproduction*. 1987; 362: 11-25.
- Petitbarat M, Rahmati, M., Sérazin, V., et al. Tweak appears as a modulator of endometrial il-18 related cytotoxic activity of uterine natural killers. *Plos one*. 2011; 6: e14497.
- Plaks V, Birnberg T, Berkutzi T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V , ve ark. Uterine dcs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 3954-3965.
- Prochnicki T, Latz E. Inflammasomes on the crossroads of innate immune recognition and metabolic control. *Cell metabolism*. 2017; 26: 71-93.
- Psychoyos A. Endocrine control of egg implantation in handbook of physiology female reproductive system endocrinology. In.: American Physiological Society; 1973, 2, p. 187–215.
- Pyrillou K, Burzynski LC, Clarke MCH. Alternative pathways of il-1 activation, and its role in health and disease. *Frontiers in immunology*. 2020; 11: 613170.
- Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization: Of mice and men. *Seminars in reproductive medicine*. 2010; 28: 17-26.
- Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: Emerging mechanisms and effector functions. *Cell*. 2016; 165: 792-800.
- Rendi M, Kelly RLG, Boyd L. Female reproductive system. In PM Treuting SM Dintzis (Eds.), *Comparative anatomy and histology: A mouse and human atlas*. Elsevier; 2012, p. 253-284.
- Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A , ve ark. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (asc) modulates asc-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276: 39320-39329.
- Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S , ve ark. Hin-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science*. 2009; 323: 1057-1060.
- Robertson SA, Sharkey DJ. Seminal fluid and fertility in women. *Fertility and sterility*. 2016; 106: 511-519.
- Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. Cleavage of dfna5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to

- secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature communications*. 2017; 8: 14128.
- Ross MK, Pawlina P. *Histoloji konu anlatımı ve atlas*. B Baykal Ed. 6 ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2013.
- Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, Deslex P, Keenan C, Mahrt CR , ve ark. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2003; 55: 91-106.
- Sadler TW. *Langman's medical embryology*. C Taylor, K Horvath, B Martz Eds. 11th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer Health; 2010.
- Saito S, Shima T, Nakashima A, Inada K, Yoshino O. Role of paternal antigen-specific treg cells in successful implantation. *American journal of reproductive immunology*. 2016; 75: 310-316.
- Sawai K, Matsuzaki N, Okada T, Shimoya K, Koyama M, Azuma C , ve ark. Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: Regulation by decidual cytokines and steroid hormones. *Biology of reproduction*. 1997; 56: 1274-1280.
- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010; 140: 821-832.
- Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H , ve ark. Cleavage of gsdmd by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015; 526: 660-665.
- Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nature reviews. Immunology*. 2006; 6: 308-317.
- Silke J, Vince J. Iaps and cell death. *Current topics in microbiology and immunology*. 2017; 403: 95-117.
- Silveira TN, Zamboni DS. Pore formation triggered by legionella spp. Is an nlrc4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infection and immunity*. 2010; 78: 1403-1413.
- Simon C, Piquette GN, Frances A, Polan M. Localization of il1 type 1 receptor and il1 β in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993; 77: 549-555.
- Simón C, Valbuena D, Krüssel J, Bernal A, Murphy CR, Shaw T , ve ark. Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertility and sterility*. 1998; 5: 896-906.
- Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: Network of hormones, cytokines, and growth factors. *The Journal of endocrinology*. 2011; 210: 5-14.
- Smeltz RB, Chen J, Hu-Li J, Shevach EM. Regulation of interleukin (il)-18 receptor alpha chain expression on cd4(+) t cells during t helper (th)1/th2 differentiation. Critical downregulatory role of il-4. *The Journal of experimental medicine*. 2001; 194: 143-153.
- Soares MJ, Hunt JS. *Placenta and trophoblast, methods and protocols*. MJ Soares JS Hunt Eds. 1 ed. Vol. 3. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2006.
- Soczewski E, Grasso E, Gallino L, Hauk V, Fernandez L, Gori S , ve ark. Immunoregulation of the decidualization program: Focus on the endoplasmic reticulum stress. *Reproduction*. 2020; 159: R203-R211.

- Song H, Lim H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Dysregulation of egf family of growth factors and cox-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in lif-deficient mice. *Molecular endocrinology*. 2000; 14: 1147-1161.
- Song L, Pei L, Yao S, Wu Y, Shang Y. Nlrp3 inflammasome in neurological diseases, from functions to therapies. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2017; 11: 63.
- Stewart CL, Cullinan EB. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Developmental genetics*. 1997; 21: 91-101.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F , ve ark. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. 1992; 359: 76-79.
- Stodle GS, Silva GB, Tangeras LH, Gierman LM, Nervik I, Dahlberg UE , ve ark. Placental inflammation in pre-eclampsia by nod-like receptor protein (nlrp)3 inflammasome activation in trophoblasts. *Clinical and experimental immunology*. 2018; 193: 84-94.
- Su Y, Zhang JJ, He JL, Liu XQ, Chen XM, Ding YB , ve ark. Endometrial autophagy is essential for embryo implantation during early pregnancy. *Journal of molecular medicine*. 2020; 98: 555-567.
- Sui A, Zhong Y, Demetriades AM, Lu Q, Cai Y, Gao Y , ve ark. Inhibition of integrin alpha5beta1 ameliorates vegf-induced retinal neovascularization and leakage by suppressing nlrp3 inflammasome signaling in a mouse model. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2018; 256: 951-961.
- Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: Noncytokine maturation roles. *Journal of leukocyte biology*. 2016; 100: 961-967.
- Sun X, Bartos A, Whitsett JA, Dey SK. Uterine deletion of gp130 or stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Molecular endocrinology*. 2013; 27: 1492-1501.
- Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP , ve ark. Critical role for nalp3/cias1/cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*. 2006; 24: 317-327.
- Suzuki T, Sakumoto R, Hayashi KG, Ogiso T, Kunii H, Shirozu T , ve ark. Involvement of interferon-tau in the induction of apoptotic, pyroptotic, and autophagic cell death-related signaling pathways in the bovine uterine endometrium during early pregnancy. *The Journal of reproduction and development*. 2018; 64: 495-502.
- Tackacs L KE, Smith MR et al. . Detection of il-1 α and il-1 β gene expression by in situ hybridization. Tissue localization of il-1 mrna in the normal c57bl/6 mouse. *Journal of immunology*. 1988; 141: 3081-3094.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005; 17: 1-14.
- Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Fang Z, Bulun SE. Interleukin-1beta elevates cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mrna stability in human endometrial stromal cells: An effect mediated by extracellularly regulated kinases 1 and 2. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002; 87: 3263-3273.
- Tan J, Raja S, Davis MK, Tawfik O, Dey SK, Das SK. Evidence for coordinated interaction of cyclin d3 with p21 and cdk6 in directing the development of

- uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation. *Mechanisms of development*. 2002; 111: 99-113.
- Tan W, Chen L, Guo L, Ou X, Xie D, Quan S. Relationship between macrophages in mouse uteri and angiogenesis in endometrium during the peri-implantation period. *Theriogenology*. 2014; 82: 1021-1027.
- Tanaka T, Kanai H, Sekiguchi K, Aihara Y, Yokoyama T, Arai M , ve ark. Induction of vegf gene transcription by il-1 beta is mediated through stress-activated map kinases and sp1 sites in cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000; 32: 1955-1967.
- Thi HTH, S. H. Inflammasome as a therapeutic target for cancer prevention and treatment. *J Cancer Prev*. 2017 22: 62-73.
- Thie M, Fuchs P, Butz S, Sieckmann F, Hoschutzky H, Kemler R , ve ark. Adhesiveness of the apical surface of uterine epithelial cells: The role of junctional complex integrity. *European journal of cell biology*. 1996a; 70: 221-232.
- Thie M, Fuchs P, Denker HW. Epithelial cell polarity and embryo implantation in mammals. *The International journal of developmental biology*. 1996b; 40: 389-393.
- Thie M, Rospel R, Dettmann W, Benoit M, Ludwig M, Gaub HE , ve ark. Interactions between trophoblast and uterine epithelium: Monitoring of adhesive forces. *Human reproduction*. 1998; 13: 3211-3219.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ , ve ark. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 1992; 356: 768-774.
- Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K , ve ark. Caspase-1-independent, fas/fas ligand-mediated il-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity*. 1999; 11: 359-367.
- Tu Z, Ran H, Zhang S, Xia G, Wang B, Wang H. Molecular determinants of uterine receptivity. *The International journal of developmental biology*. 2014; 58: 147-154.
- Tung HN, Parr MB, Parr EL. The permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: An ultrastructural tracer and freeze-fracture study. *Biology of reproduction*. 1986; 35: 1045-1058.
- Uchida H, Maruyama T, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Miyazaki K, Yamasaki A , ve ark. Studies using an in vitro model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287: 4441-4450.
- Vacca P, Cantoni C, Vitale M, Prato C, Canegallo F, Fenoglio D , ve ark. Crosstalk between decidual nk and cd14+ myelomonocytic cells results in induction of tregs and immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107: 11918-11923.
- van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: Cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *Journal of leukocyte biology*. 2009; 85: 4-19.
- Volin MV, Koch AE. Interleukin-18: A mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2011; 31: 745-751.

- von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: Dysregulation in habitual abortion. *Molecular human reproduction*. 2000; 6: 627-634.
- Wallach D, Kang TB, Kovalenko A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: A historical perspective. *Nature reviews. Immunology*. 2014; 14: 51-59.
- Walsh JG, Reinke SN, Mamik MK, McKenzie BA, Maingat F, Branton WG , ve ark. Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in hiv/aids. *Retrovirology*. 2014; 11: 35.
- Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nature reviews. Genetics*. 2006; 7: 185-199.
- Wang S, Ji LY, Li L, Li JM. Oxidative stress, autophagy and pyroptosis in the neovascularization of oxygen-induced retinopathy in mice. *Molecular medicine reports*. 2019a; 19: 927-934.
- Wang Y GW, Shi X, Ding J, Liu W, He H, Wang K, Shao F. . Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. . *Nature*. 2017 547: 99-103.
- Wang YY, Liu XL, Zhao R. Induction of pyroptosis and its implications in cancer management. *Frontiers in oncology*. 2019b; 9: 971.
- Welsh AO, Enders AC. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. *The American journal of anatomy*. 1985; 172: 1-29.
- Welsh AO, Enders, A. C. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the anti-mesometrial decidua and its degeneration. *Am. J. Anat*. 1985; 172.
- Wetzler M, Talpaz M, Lowe DG, Baiocchi G, Gutterman JU, Kurzrock R. Constitutive expression of leukemia inhibitory factor rna by human bone marrow stromal cells and modulation by il-1, tnf-alpha, and tgf-beta. *Experimental hematology*. 1991; 19: 347-351.
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA , ve ark. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*. 1994; 370: 270-275.
- Wood GA, Fata JE, Watson KL, Khokha R. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*. 2007; 133: 1035-1044.
- Xu YJ, Zheng L, Hu YW, Wang Q. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2018; 476: 28-37.
- Yan G, Elbadawi, M., Efferth, T. Multiple cell death modalities and their key features (review). *World Academy of Sciences Journal*. 2020; 2: 39-48.
- Yin XF, Zhang Q, Chen ZY, Wang HF, Li X, Wang HX , ve ark. Nlrp3 in human glioma is correlated with increased who grade, and regulates cellular proliferation, apoptosis and metastasis via epithelial-mesenchymal transition and the pten/akt signaling pathway. *International journal of oncology*. 2018; 53: 973-986.

- Zaki MH, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The nlrp3 inflammasome: Contributions to intestinal homeostasis. *Trends in immunology*. 2011; 32: 171-179.
- Zavareh S, Gholizadeh Z, Lashkarbolouki T. Evaluation of changes in the expression of wnt/beta-catenin target genes in mouse reproductive tissues during estrous cycle: An experimental study. *International journal of reproductive biomedicine*. 2018; 16: 69-76.
- 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.
- Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H , ve ark. The nlrc4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type iii secretion apparatus. *Nature*. 2011; 477: 596-600.
- Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*. 1992; 358: 167-169.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Cemre Nur	Uyruğu	TC.
Soyadı	BALCI	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Konya Erbil Koru Süper Lisesi	2008
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji (İngilizce)	2014
Yüksek Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Histoloji ve Embriyoloji AD	2018
Doktora	Akdeniz Üniversitesi/ Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Histoloji ve Embriyoloji AD	2023

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Stajyer	Bratislava Comenius University, Institute of Histology and Embryology	Nisan-Temmuz 2018

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	80

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Peri-implantif Dönem Fare Uterusunda İnflamasyon İlişkili Programlı Hücre Ölümü Piroptozun Araştırılması	BAP	2021-2023
Farelerde Embriyo İmplantasyonu ve Desidualizasyon Süreçlerinde NLRP3 İnflamazom Yolağının Araştırılması	BAP	2022-2024
Peri-implantif Dönem Fare Endometriyumunda Apelin ve Apelin Reseptörü Ekspresyonlarının İncelenmesi	BAP	2018-2020
LPS ile İndüklenmiş Erken Doğum Modelinde Mast Hücre Etkinlik Mekanizmasının Aydınlatılması ve H1 Histamin Antagonisti Uygulamasının Süreci Önlemeye Yönelik Etkisinin Değerlendirilmesi	TUBİTAK	2022-2023
Ratlarda Deneysel Testis İskemi Reperfüzyon Modelinde, Karvakrolün Olası Etkilerinin Histolojik ve Biyokimyasal Olarak İncelenmesi	BAP	2017-2018

Burslar-Ödüller:

1. LPS ile İndüklenmiş Erken Doğum Modelinde Mast Hücre Etkinlik Mekanizmasının Aydınlatılması ve H1 Histamin Antagonisti Uygulamasının Süreci Önlemeye Yönelik Etkisinin Değerlendirilmesi, Burslu, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, 3501 - ARDEB

2. Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2022 - 1.
3. Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2023 - 1.

Yayınlar:

1. **Balci CN**, Golal E, Ustunel I, Acar N. The investigation of apelin and apelin receptor expressions in mouse endometrium during peri-implantation period. *Ann Anat.* **2023** 246:152027. doi: 10.1016/j.aanat.2022.152027. PMID: 36379349
2. Golal E, **Balci CN**, Ustunel I, Acar N. The investigation of hippo signaling pathway in mouse uterus during peri-implantation period. *Arch Gynecol Obstet.* **2023** 307(6):1795-1809. doi 10.1007/s00404-022-06660-8. PMID: 35708783
3. **Balci CN**, Firat T, Acar N, Kukner A. Carvacrol treatment opens Kir6.2 ATP-dependent potassium channels and prevents apoptosis on rat testis following ischemia-reperfusion injury model. *Rom J Morphol Embryol.* **2021** 62(1):179-190. doi: 10.47162/RJME.62.1.17. PMID: 34609420;
4. Dagistan Y, Kilinc E, **Balci CN**. Cervical sympathectomy modulates the neurogenic inflammatory neuropeptides following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res.* **2019** 01;1722:146366. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146366.
5. Kilinc E, **Balci CN**. An Investigation of Lung Mast Cell Behavior in a Rat Model of Migraine: Implications for Migraine Headache. *Anatolian Clinic Journal of Medical Sciences*, **2018**; 23;3 doi: 10.21673/anadoluklin.429905

6. Avci S, Sahin S, **Balci CN**. Investigation of Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Expression in Cases of Sacrococcygeal Pilonidal Sinus, Medical Records, **2023** 5;3 483-8 doi: 10.37990/medr.1285358

Bildiriler:

Sema Avcı, Sevinç Şahin, Cemre Nur Balcı, Evaluation of IL-18 Expression in Sacrococcygeal Pilonidal Sinus Tissues. **(Oral Presentation)**, 11. International Academic Studies Congress 2-3 May 2023.

Cemre Nur Balci, Kubra Aksu, Ezgi Golal, Nuray Acar Aydemir, The potential role of sirtuin 1 in embryo implantation and decidualization, **(Oral Presentation)**, 15th National and 1st International Congress of Histology and Embryology, 26-28 May 2022.

Nuray Acar Aydemir, **Cemre Nur Balci**, Ezgi Golal, Ismail Ustunel, The investigation of apelin and apelin receptor (apj) expressions in mouse endometrium during periimplantation period, **(Poster Presentation)**, 15th National and 1st International Congress of Histology and Embryology, 26-28 May 2022.

Ezgi Golal, **Cemre Nur Balci**, Nuray Acar Aydemir, Role of sumoylation mechanism in peri-implantation period mouse uterus, **(Oral Presentation)**, 15th National and 1st International Congress of Histology and Embryology, 26-28 May 2022.

Cemre Nur Balci, Nuray Acar Aydemir, Ezgi Golal, Ismail Ustunel, Ozlem Ozbey Unlu, The potential role of Sox9 in embryo implantation and decidualization **(Oral Presentation)**, 1st International Microscopy and Spectroscopy Congress, MSC 2021, 22-24 September 2021

Ezgi Golal, Nuray Acar Aydemir, **Cemre Nur Balci**, Ismail Ustunel, Role of hippo signaling pathway in peri-implantation period mouse uterus **(Oral Presentation)**, 1st International Microscopy and Spectroscopy Congress, MSC 2021, 22-24 September 2021

Tülin Fırat, **Cemre Nur Balci**, Hande Yılmaz Carver, Gizem Dede, Mustafa Şit, Özgür Mehmet Yis, Protective Effect of Protocatechuic Acid on Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in Rats **(Oral Presentation)**, International Health and Sport Sciences Congress, Konya, 11-13 October 2019

Gizem Söyler, **Cemre Nur Balci**, Hande Yılmaz, Tülin Fırat, Aysel Kükner, OPG and RANKL expression in different age groups of female rat femurs **(Poster Presentation)**, 10.5505/2017ichc.PP-64 [Structure and function of the cell]. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry- ICHC 2017, Antalya, 18-21 May 2017