



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİKLİK GMP AMP SENTAZ / İNTERFERON GENLERİNİN
UYARICISI YOLAĞININ EMBRİYOLOJİK GELİŞİM SÜRECİNDEKİ
YERİ**

GÜLŞAH ALBAYRAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

DANIŞMAN
DOÇ.DR. ELGİN TÜRKÖZ ULUER

MANİSA/2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİKLİK GMP AMP SENTAZ / İNTERFERON GENLERİNİN
UYARICISI YOLAĞININ EMBRİYOLOJİK GELİŞİM
SÜRECİNDEKİ YERİ**

GÜLŞAH ALBAYRAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

DANIŞMAN
DOÇ.DR. ELGİN TÜRKÖZ ULUER

TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ ÜYELERİ
PROF.DR. M. İBRAHİM TUĞLU
DOÇ.DR. SERAP CİLAKER MIÇILI
DOÇ.DR. ELGİN TÜRKÖZ ULUER

MANİSA/2019

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10275597
Yazar Adı / Soyadı	GÜLŞAH ALBAYRAK
T.C.Kimlik No	33569202066
Telefon	5077489054
E-Posta	gulsahalbayrak@outlook.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	SİKLİK GMP AMP SENTAZ / İNTERFERON GENLERİNİN UYARICISI YOLAĞININ EMBRİYOLOJİK GELİŞİM SÜRECİNDEKİ YERİ
Tezin Tercümesi	SİKLİK GMP AMP SENTAZ / İNTERFERON GENLERİNİN UYARICISI YOLAĞININ EMBRİYOLOJİK GELİŞİM SÜRECİNDEKİ YERİ
Konu	Histoloji ve Embriyoloji = Histology and Embryology
Üniversite	Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	75
Tez Danışmanları	DOÇ. DR. ELGİN TÜRKÖZ ULUER
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	cGAS, STING, NLRP14, fertilizasyon=fertilization , implantasyon= implantation , ovaryum= ovary , testis=testis

21.08.2019

İmza:.....

**SİKLİK GMP AMP SENTAZİNTERFERON GENLERİNİN UYARICISI
YOLAĞININ EMBRİYOLOJİK GELİŞİM SÜRECİNDEKİ YERİ**

Öğrenci: Gülşah Albayrak

Danışman: Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

Bu tez çalışması 20/08/2019 tarihinde jürimiz tarafından “Histoloji Embriyoloji Yüksek Lisans Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER
(MCBÜ Histoloji Embriyoloji)

Üye : Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU
(MCBÜ Histoloji Embriyoloji)

Üye: Doç. Dr. Serap CİLAKEK MİÇİLİ
(DÜ Histoloji Embriyoloji)

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından başarılı bulunmuştur. 20/08/2019

Prof. Dr. Ömer FETİK
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından, veri toplanması ve yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı

Gülşah ALBAYRAK

İmza

TEŞEKKÜR

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübesi ile bana her zaman yol gösteren, tez danışmanım Sayın Hocam Doç.Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER'e, Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Bölüm Başkanı Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri; Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Prof.Dr. M. İbrahim TUĞLU' ya , Tez çalışmam boyunca yanımda olup yardımlarını esirgemeyen bölüm asistan arkadaşlarım, Hilal KABADAYI, TUNA ÖNAL ve Meltem Üçöz'e, Hayatım boyunca sonsuz özveri ve sevgileriyle yanımda olan, beni maddi ve manevi her konuda destekleyen ve cesaretlendiren, bugünlere getiren canım AİLEM'e , Her zaman yanımda olan, bana inanan, yüksek lisans tezimin her aşamasında emeği ve yardımı bulunan, Nişanlım Serdar SARI'ya sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

“Bu proje Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2018-045 proje numarası ile desteklenmiştir.” Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi' ne desteğinden ötürü teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

I. BEYAN	I
II. TEŞEKKÜRLER	II
III. İÇİNDEKİLER	III
IV. KISALTMALAR	vi
V. ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
VI. TABLOLAR ve GRAFİK DİZİNİ.....	ix
VII. RESİM DİZİNİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. OVARYUM.....	4
4.2. OVARYUM EMBRİYOLOJİSİ.....	4
4.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar.....	5
4.3. OVARYUM ANATOMİSİ.....	6
4.4. OVARYUM HİSTOLOJİSİ.....	7
4.4.1. Folikül Gelişimi.....	8
4.4.2. Ovulasyon.....	12
4.4.3. Korpus Luteum.....	13
4.4.4. Kapasitasyon Ve Fertilizasyon.....	15
4.4.5. Blastokist.....	20
4.4.6. İmplantasyon Sırasında Uterus.....	18
4.5. TESTİS.....	19
4.5.1. Testis Embriyolojisi.....	19
4.5.2. Testis Histolojisi.....	22
4.6. İNFERTİLİTE.....	28
4.6.1. Açıklanamayan İnfertilite.....	29

4.7.SİKLİK GMP AMP SENTAZ (CGAS) / İNTERFERON GENLERİNİN UYARICISI (STING) YOLAĞI.....	30
4.8. ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİKORLAR.....	32
4.8.1. Siklik Gmp-Amp Sentaz (Cgas).....	32
4.8.2. İnterferon Genlerinin Uyarıcısı (Sting).....	32
4.8.3. Nükleotit Bağlayıcı Oligomerizasyon Domain, Lösin Bakımından Zengin Tekrar Ve Pyrin Domain İçeren Protein 14 (Nlrp14)	33
4.8.4. İnterferon Regülatör Faktör (Irf3).....	34
4.8.5. Ifn Reseptör Beta/Af-1 (Ifn).....	35
5.GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
5.1.DENEY MODELİNİN OLUŞTURULMASI.....	37
5.2.VAGİNAL YAYMA VE BOYAMA PROTOKOLÜ.....	37
5.3.FAREDE ÖSTRUS SIKLUSU.....	38
5.4.SÜPEROVÜLASYON PROTOKOLÜ.....	38
5.5.DENEYİN SONLANDIRILMASI İLE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI.....	39
5.6. EMBRİYOLARIN TOPLANMASI.....	39
5.7.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	40
5.7.1.Dokuların Takibi, Parafin Gömme Ve Kesit Alma.....	40
5.7.2.Hematoksilen Ve Eozin Boyaması.....	41
5.7.3.İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama.....	42
5.7.4.İmmünfloresan Boyama.....	45
5.8. İMMUNOFLORESAN GÖRÜNTÜLERİN IMAGE J ANALİZİ.....	46
6.BULGULAR.....	47
6.1. KONTROL GRUBU HİSTOKİMYA BULGULARI.....	47
6.1.1.Vaginal Yayma Bulguları.....	47
6.1.2. Kontrol Grubu He Bulguları.....	49
6.1.2.1. Proöstrus grubu ovaryum örneklerinin HE bulguları....	49
6.1.2.2. Östrus grubu ovaryum örneklerinin he bulguları.....	50
6.1.2.3. Metöstrus grubu ovaryum örneklerinin he bulguları.....	50
6.1.2.4. Diöstrus grubu ovaryum örneklerinin he bulguları.....	50

6.1.2.5. Testis örneklerinin he bulguları.....	51
6.2.KONTROL GRUBU İMMUNOHİSTOKİMYA	
BULGULARI.....	52
6.2.1. Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının Cgas immunoreaktivite Bulguları.....	52
6.2.2.Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının Sting İmmunoreaktivite Bulguları.....	56
6.2.3.Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının Nlrp14 İmmunoreaktivite Bulguları.....	59
6.2.4.Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının Irf3 İmmunoreaktivite Bulguları.....	62
6.2.5.Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının Ifn İmmunoreaktivite Bulgular.....	65
6.2.6. Testis Örneklerinin İmmunoreaktivite Bulguları.....	68
6.3.İMMUNFLORESAN BULGULARI.....	70
6.3.1. 1 Günlük Embriyoların İmmunofloresan Bulguları.....	70
6.4.4.5 GÜNLÜK EMBRİYOLARIN HİSTOKİMYA VE İMMUNOHİSTOKİMY BULGULARI.....	73
6.4.1. 4,5 Günlük Embriyoların Histokimyasal Değerlendirilmesi.....	73
6.4.2.4,5 Günlük Embriyoların İmmunohistokimyasal Değerlendirilmesi.....	74
7. TARTIŞMA.....	76
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
9. KAYNAKLAR.....	83
10. EKLER.....	87
Ek 1. Yönetim Kurulu Karar Örneği	
Ek 2. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Belgesi	
Ek 3. Tez Orjinallik Belgesi	
11. ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMA VE SİMGELER

AMH	: Antimüllerian Hormon
BMP -4	: Kemik Morfogenetik Protein-4
BSA'lı PBS	: Bovine Serum Albumins- Fosfat Tampon Solüsyonu
Cgamp	: GMP-AMP
CGAS	: Siklik GMP AMP Sentaz
CREBBP	: CREB Bağlayıcı Protein
DAB	: Diaminobenzidine
DAPI	: 4',6-Diamidine-2'-Phenylindole Dihydrochloride
Dsdna	: Çift Sarmallı DNA
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H&E	: Hematoksilen Eozin
IFN-Gama	: İnterferon-Gama
IRF3	: İnterferon Regülatör Faktör
ISRE	: İnterferon İle Uyarılmış Tepki Elemanı
LRR	: Lösin Bakımından Zengin Tekrar
MHC II	: Ana Histouyumluluk Kompleksi II
MIF	: Müllerian İnhibitör Faktör
NLR	: Nod Benzeri Reseptör
Nlrp14	: Nükleotit Bağlayıcı Oligomerizasyon Domain, Lösin Bakımından Zengin Tekrar Ve Pyrin Domain İçeren Protein 14
OMI	: Maturasyonu İnhibitörü
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PYD	: N-Terminal Pyrin Alan
RIG-I	: Retinoik Asit Uyarılabilir Gen 1
SRY	: Sex Determinig Region
STING	: İnterferon Genlerinin Uyarıcısı Yolağı
TBF	: Testis Belirleyici Faktörün

TBK1	: TANK Bağlayıcı Kinaz 1
USG	: Ultrasonografi
ZP-1	: Zona Pellucida Sperm-Binding Protein 1
ZP-2	: Zona Pellucida Sperm-Binding Protein 2
ZP-3	: Zona Pellucida Sperm-Binding Protein 3
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Ovaryumun Anatomik olarak gösterimi.....	7
Şekil 2. Ovaryumun histolojik kesiti.....	8
Şekil 3: Ovaryumun detaylı gösterimi.....	9
Şekil 4: Ovaryum; korteks ve primordiyal ve primer foliküller.....	10
Şekil 5: Ovaryum; korteks ve primordiyal ve primer foliküller.....	10
Şekil 6: Ovaryum; matür folikül.....	12
Şekil 7: Ovaryum; primer oosit ve matür folikül duvarı.....	12
Şekil 8: Korpus Luteum.....	16
Şekil 9: Korpus Luteum; lutein hücreler ve granüloza hücreleri.....	16
Şekil 10: Korpus Luteum ve Korpus Albicans.....	17
Şekil 11: Zona pellusidaya yapışmış spermilerin elektron mikrofilmi....	18
Şekil 12: Oosit penetrasyonunun 3 evresinin şematik görünümü.....	19
Şekil 13: Ovulasyondan sonra evreler.....	19
Şekil 14: Fare uterusunda bulunan 5 günlük embriyo.....	21
Şekil 15: Menstrual Siklus.....	22
Şekil 16: Testis gelişiminin şematik gösterimi.....	24
Şekil 17: Testis gelişimi.....	25
Şekil 18: Erkek genital sistem.....	28
Şekil 19: Testisin yapısı.....	29
Şekil 20: Testis.....	30
Şekil 21: Testis; seminifer tübül.....	30
Şekil 22: Seminifer tübülün bir parçası.....	31
Şekil 23: Sertoli hücreleri.....	32
Şekil 24: CGAS-cGAMP-STING yolu.....	37
Şekil 25: CGAS üç boyutlu dizilimi.....	38
Şekil 26: Sting üç boyutlu dizilimi.....	39
Şekil 27: Nlrp14 üç boyutlu dizilimi.....	40

Şekil 28: IRF3 üç boyutlu dizilimi.....	41
Şekil 29: IFN üç boyutlu dizilimi.....	42

TABLÖLAR ve GRAFİK DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Kadın ve Erkek Bireylerde Görülen İnfertilite Nedenleri.....	34
Tablo 2. Parafin takip protokolü	49
Tablo 3. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü	51
Tablo 4. İndirekt İmmünohistokimya Prosedürü.....	53
Tablo 5. İmmünohistokimya için kullanılan primer antikorlar.....	54
Tablo 6. İmmünoflorasan için kullanılan primer antikorlar.....	56
Tablo 7. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin cGAS immünohistokimyasal analiz sonuçları....	65
Tablo 8: Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin Sting immünohistokimyasal analiz sonuçları.....	68
Tablo 9: Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin NLRP14 immünohistokimyasal analiz sonuçları..	71
Tablo 10: Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin IRF3 immünohistokimyasal analiz sonuçları.....	74
Tablo 11: Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin IFN immünohistokimyasal analiz sonuçları.....	77
Tablo 12. Testis doku örneklerinin CGAS, Sting, IRF3, IFN ve NLRP14 İmmünohistokimya immünreaktivite sonuçları.....	80
Tablo 13: 1 günlük embriyoda CGAS, Sting, IRF3, IFN ve NLRP14 İmmünohistokimya immünreaktivite sonuçları.....	82
Tablo 14: 1. gün embriyoların cGAS, STING, IRF3, IFN ve NLRP14 antikorlarının CTCF ve IntDen değerleri.....	83
Tablo. 15. 4.5 günlük embriyoların cGAS, Sting, IRF3, IFN ve NLRP14 İmmünohistokimya immünreaktivite sonuçları.....	85
Grafik 1. Birinci gün embriyolara ait cGAS, STING, IRF3, IFN ve NLRP14 antikorlarının immünoflorasan yoğunluğu.....	82

RESİM DİZİNİ

Resim 1. Fertilizasyondan sonra 4.5 günde uterusda implantasyon bölgeleri.....	47
Resim 2: 2 Hücreli Embriyolarda, Pronase Uygulaması Öncesi ve Sonrasındaki Görüntüsü.....	55
Resim 3. Proöstrus(A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait vaginal yayma örneklerinin HE boyamaları.....	59
Resim 4. Proöstrus(A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum dokularının HE boyamaları.....	61
Resim 5. Testis (A, B, C) örneklerinin HE boyaması.....	62
Resim 6. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin cGAS immunohistokimyasal analiz görüntüleri.....	64
Resim 7. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin STING immunohistokimyasal analiz görüntüleri.....	67
Resim 8. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin NLRP14 immunohistokimyasal analiz görüntüler doku örneklerinin STING immunohistokimyasal analiz görüntüleri.....	70
Resim 9. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin IRF3 immunohistokimyasal analiz görüntüleri.....	73
Resim 10. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin IFN immunohistokimyasal analiz görüntüleri.....	76
Resim 11: Testis doku örneklerinin CGAS(A), Sting (B), IRF3 (C), IFN (D), NLRP14 (E) ve Kontrol (F) grubunun immunohistokimyasal analiz görüntüleri...	79
Resim 12. 1 günlük embriyoların CGAS(A), Sting (B), IRF3 (C), IFN (D), NLRP14 (E) ve Kontrol (F) grubunun immunfloresan analiz görüntüleri.....	81
Resim 13. 4,5 günlük embriyoların HE boyaması.....	83
Resim 14. 4.5 günlük embriyoların cGAS(A), Sting (B), IRF3 (C), IFN (D), NLRP14 (E) ve Kontrol (F) grubunun immunohistokimyasal analiz görüntüleri	84

Tezin Başlığı: SIKLIK GMP AMP SENTAZ / İNTERFERON GENLERİNİN UYARICISI YOLAĞININ EMBRİYOLOJİK GELİŞİM SÜRECİNDEKİ YERİ
Öğrencinin Adı: Gülşah Albayrak

Danışmanı: Doç. Dr. Elgin Türköz Uluer

Anabilim Dalı: Histoloji Embriyoloji

1.ÖZET

Amaç: Sitozolik DNA'yı tanıyarak inflamatuvar süreçleri aktive eden cGAS/STING yolağıdır. Fertilizasyonda bu yolağın baskılanması beklenmektedir. Eğer bu yolak baskılanmazsa inflamatuvar süreçler aktive olarak fertilizasyon başarısızlığına veya da erken embriyonik gelişimde bozukluğa yol açabilir. Bu çalışmada cGAS/STING yolağının embriyolojik gelişim sürecindeki yerinin belirlenmesi, fertilizasyona ve embriyolojik gelişime etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada Balb/C cinsi farelerden üç grup oluşturulmuştur. Grup 1: Kontrol grubu, Grup 2: Fertilizasyon grubu (Çiftleştirildikten sonra embriyonik 1. gün sakrifiye edilen grup; n:15), Grup 3: İmplantasyon grubu (Çiftleştirildikten sonra embriyonik 4,5. gün sakrifiye edilen grup; n:15). Grup 1 ve Grup 3' de Hematoksilen ve Eozin ile cGAS, STING, NLRP14, IRF3 ve IFN primer antikorları ile indirekt immunohistokimya metodu uygulanmıştır. Grup 2'de ise 1 günlük embriyolar toplanıp, immunflorasan boyama yapılmıştır.

Bulgular: Kontrol grubunda, cGAS/STING yolağının ve bu yolağın negatif regülatörü NLRP14'ün varlığı indirekt immunohistokimya ile gösterilmiştir. Fertilizasyondan sonra 1 ve 4,5. günlerdeki embriyolarda yüksek cGAS ve STING immunoreaktiviteleri ile orta düzeyde IRF3 ve IFN immunoreaktiviteleri, negatif NLRP14 immunoreaktivitesi saptanmıştır.

Sonuç ve Yorum: Kontrol grubu, embriyonik 1 ve 4,5. günlerdeki cGAS/STING yolağına ait moleküllerin ve bu yolağın negatif düzenleyicisi olan NLRP14'ün immunoreaktivite düzeyleri saptanmıştır. Özellikle NLRP14'ün fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminde nükleik asit algılayıcı yolağın suprese edilmesinde önemli olduğu ve açıklanamayan infertilite olgularında göz önüne alınması gerektiği öne çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: cGAS, STING, NLRP14, fertilizasyon, implantasyon, ovaryum, testis

Title: THE ROLE OF THE STIMULATOR PATHWAY OF CYCLIC GMP AMP SYNTHASE / INTERFERON GENES IN EMBRYOLOGICAL DEVELOPMENT PROCESS

Student's Name: Gülşah ALBAYRAK

Supervisor: Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

Department: Histology and Embryology

2. SUMMARY

Aim: It is a cGAS / STING pathway that recognizes cytosolic DNA and activates inflammatory processes. This pathway is expected to be suppressed in fertilization. If this pathway is not suppressed, inflammatory processes can lead to failure of fertilization by activating or impaired early embryonic development. The aim of this study was to determine the place of cGAS / STING pathway in embryological development process and to investigate its effect on fertilization and embryological development.

Material and Methods: Three groups of Balb / C mice were formed in the study. Group 1: Control group, Group 2: Fertilization group (embryonic sacrificed 1st day after mating; n: 15), Group 3: Implantation group (embryonic sacrificed 4.5 days after mating; n: 15). In Group 1 and Group 3, indirect immunohistochemistry with hematoxylin-eosin and cGAS, STING, NLRP14, IRF3 and IFN primary antibodies were applied. In Group 2, 1 day old embryos were collected and immunofluorescent staining was performed.

Results: In the control group, the presence of cGAS / STING pathway and NLRP14, the negative regulator of this pathway, was demonstrated by indirect immunohistochemistry. High levels of cGAS and STING immunoreactivities, moderate IRF3 and IFN immunoreactivities and negative NLRP14 immunoreactivity were detected after fertilization on embryonic day 1 and 4,5.

Conclusion and Comment: In all groups immunoreactivity levels of the cGAS / STING pathway molecules and NLRP14, the negative regulatory of this pathway were determined. In particular, NLRP14 is important in suppressing the nucleic acid-sensing pathway in fertilization and early embryo development and should be considered in unexplained infertility cases.

Keywords: cGAS, STING, NLRP14, fertilization, implantation, ovary, testis

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite günümüzde önemli bir toplumsal sağlık sorununu oluşturmaktadır. İnfertilite sebeplerine yönelik birçok çalışma yapılmakta, fakat hala açıklanamayan infertilite olguları ile karşılaşilmektedir. Fertilizasyon, spermin korono radiata hücrelerine penetre olmasıyla başlamakta, oosit membranından geçtikten sonra maternal ve paternal kromozomların birbirine karışmasıyla sona ermektedir. Fertilizasyon esnasında oosit içine giren spermin DNA'sının yabancı olarak algılanıp algılanmaması fertilizasyonun başarısını belirlemektedir.

Bağışıklık sisteminin patojenleri belirlemesinde en önemli mekanizma mikrobiyal nükleik asitlerin tanınmasıdır. Sitozolik DNA'yı tanıyarak inflamatuvar süreçleri aktive eden siklik GMP AMP sentaz (cGAS)/ interferon genlerinin uyarıcısı (STING) yolağıdır. Hücrenin genel olarak sitoplazmasında DNA bulunmamaktadır. Sitoplazmada DNA'nın bulunması hücrenin DNA virüs veya bakteri tarafından işgal edildiğini göstermektedir. Sitoplazmik DNA sellüler sentaz cGAS'e bağlanır ve endoplazmik retikulum sensörü STING aktivasyonunu tetikleyen siklik dinükleotidleri oluşturur. Bu olaylar adaptif immun cevapları kolaylaştıracak olan sitokinlerin ve tip 1 interferonların salgılanmasına yol açar. Bu sistem genel olarak infeksiyöz ajanlara karşı korumayı sağlamakla birlikte kendi nükleik asitlerinin aşırı tanınmasına bağlı olarak gelişen otoimmün hastalıkların oluşumundan da sorumludur.

Fertilizasyonda cGAS/STING yolağının baskılanması beklenmektedir. Eğer bu yolak baskılanmazsa inflamatuvar süreçler aktive olarak fertilizasyon başarısızlığına veya da erken embriyonik gelişimde bozukluğa yol açabilir.

Bu çalışmada cGAS/STING yolağının embriyolojik gelişim sürecindeki yerinin belirlenmesi, fertilizasyona ve embriyolojik gelişime etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.OVARYUM

İki temel görevi olan ovaryumlar, gametogenez (gametlerin üretilmesi) ve steroidogenez (steroidlerin üretilmesi) üretiminden sorumlu olmaktadır. Dişilerde gametlerin üretilmesine oogeneze denilmektedir. Gelişmekte olan gametler oosit, matür (olgun) gametler ise ovum olarak adlandırılmaktadır. Steroid hormonlardan östrojenler ve progesteronlar ovaryumdan salgılanmaktadır. Bu iki hormon fertilize ovumun implantasyonu için uterusu hazırlayarak menstrual siklusa önemli rol oynamaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

4.2.OVARYUM EMBRİYOLOJİSİ

Dişi üreme hücresi oogoniumlar, mitoz bölünme sonucunda primordiyal germ hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Primordiyal germ hücreleri, primitif çizgi boyunca göç ederek, üçüncü haftada yolk (vitellüs) kesesine ulaşmaktadırlar. Bu hücreler küre şeklindedir ve allantoisten orjinlenen yolk kesesi (umbilikal kese) endodermal hücrelerin aralarında dördüncü haftanın başlarında görülmeye başlamaktadır. Embriyo katlanırken, umbilikal kesenin dorsal parçası embriyoya katılmaktadır. Dördüncü haftada primordiyal germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenterisi boyunca uzanarak beşinci haftada primitif gonadlara ve altıncı haftanın başlarında da genital sırtlara ulaşmaktadır. Primordiyal germ hücrelerinin göçü *fragilis*, *stella* ve *BMP -4* genleri tarafından düzenlenmektedir (Kierszenbaum ve Ark. 2016).

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmalarına yakın genital sırtta bulunan epitel hücreleri proliferasyon olarak altlarındaki mezenşim içine gömülmektedirler ve düzensiz olan primitif cinsiyet kordonlarını oluşturmaktadırlar. Bu evredeki gonad, dişi ve erkekte ayırt edilemediğinden dolayı farklılaşmamış gonad adını almaktadır (Kierszenbaum ve Ark. 2016).

Gonadlar üç farklı yerden gelişmektedir;

1. Posterior karın duvarını kaplayan mezotel (Mezodermal Epitel)
2. Mezenşim (Embriyonik bağ dokusu)
3. Primordiyal Germ Hücreleri

4.2.1.Farklılaşmamış Gonadlar

Gonadal gelişimin ilk aşamaları, mezonefrozun medial bölümünden gelişen mezoteldeki kalınlaşma beşinci haftada oluşmaktadır. Epitelin ve alttaki mezenşimin proliferasyonu gonadal sırtın mezonefrozunun medialinde bir çıkıntı olan primer seks kordonlarını oluşturmaktadır. Parmak benzeri gonadal kordlar kısa sürede alttaki mezenşime doğru gelişmektedir. Altıncı haftada primer hücre kordonlarındaki hücreler dejenere olmaktadır ve yerini oogoniyumların etrafını çevreleyen sekonder seks kordonları almaktadır (Kierszenbaum ve Ark. 2016).

Farklılaşmamış gonadlar; dış korteks ve iç medullayı meydana getirmektedir. XX kromozomuna sahip embriyolarda farklılaşmamış gonadların korteksi ovaryumu oluşturmaktadır (Kierszenbaum ve Ark. 2016).

Dişi embriyolarda, primitif cinsiyet kordonu düzensiz hücre kümelerine ayrılarak overin medullar bölgesinde yerleşmektedirler. Bu hücre kümeleri bir süre sonra kaybolarak yerini vasküler bir stroma olan ovarian medullaya bırakmaktadır (Kierszenbaum ve Ark. 2016).

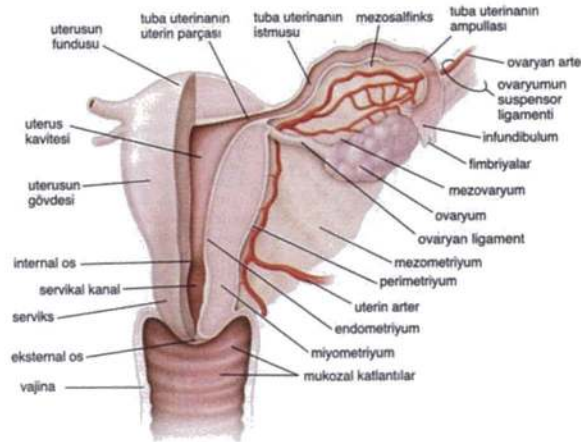
Gelişimin yedinci haftasına kadar gonadlar cinsiyete özgü morfolojik özelliklere sahip değildirler. Embriyonun cinsiyet farklanmasından sorumlu olan SRY geni Y kromozomunda taşınmaktadır. Embriyo, SRY geninin proteini olan testis belirleyici faktörün (TBF) varlığında erkek, yokluğunda ise dişi tipinde gelişmektedir (Kierszenbaum ve Ark. 2016).

Gonadal gelişim dişi embriyolarda erkeklere göre daha yavaş gerçekleşmektedir. X kromozomlarında over gelişimi için bulunan otozomal genlerin over organogenezinde de rol oynadığı görülmüştür. Yaklaşık olarak 10 haftalık olana kadar overler histolojik olarak saptanmamaktadır. Gonadal kordlar belirgin hale gelemmez fakat medulla içine uzanmaktadır ve temel bir rete ovariiyi oluşturmaktadır. Bu yapı ve gonadal kordlar genellikle dejenere olmaktadır ve sonunda kaybolmaktadır (Moore ve Ark. 2016).

4.3.OVARYUM ANATOMİSİ

Nulliplarlarda (doğum yapmamış kadın bireylerde) ovaryumlar bir çift, badem şekilli, pembemsi beyaz renkli, 3 cm boyutunda, 1.5 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığındadır. Her bir ovaryum mezovaryum olarak isimlendirilen peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin posteriyor tarafı ile bağlantı kurmaktadır. Ovaryumun superiyor kutbu, ovaryumun sinirlerini ve damarlarını taşıyan suspensor ligament sayesinde pelvis duvarına bağlanmaktadır. Ovaryumun inferior kutbu ise ovaryan ligament sayesinde uterusu bağlanmaktadır. Bu ligament, gelişmekte olan gonadı pelvisin tabanına bağlayan embriyonik fibröz kordon olan gubernakulumun bir kalıntısıdır. Puberteden önce ovaryumun yüzeyi düzgündür fakat üreme çağında tekrar eden ovulasyonlar sebebi ile skarlı ve düzensiz bir hale geçmektedir. Postmenopozal dişi bireylerde ise üreme çağındakinin dörtte biri kadar büyüklüğe ulaşmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Ovaryum, korteks ve medulladan oluşmaktadır. Ovaryumdan kesit alındığında iki ayrı bölümü ortaya çıkmaktadır. Bu bölümlerden biri olan medulla ya da medullar bölge, ovaryumun merkezinde bulunmaktadır ve gevşek bağ dokusu, kıvrımlı kan damarları, lenf damarları ve sinirler içermektedir. Diğer bölge olan korteks ya da kortikal bölge, medullayı saracak biçimde ovaryumun periferik bölgesinde yer almaktadır. Korteks, zengin sellüler bağ doku içinde ovaryum foliküllerini içermektedir. Foliküllerin çevresinde bulunan stromada dağınık düz kas lifleri bulunmaktadır. Medulla ve korteks ayrımı ise belirsizdir (Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 1).

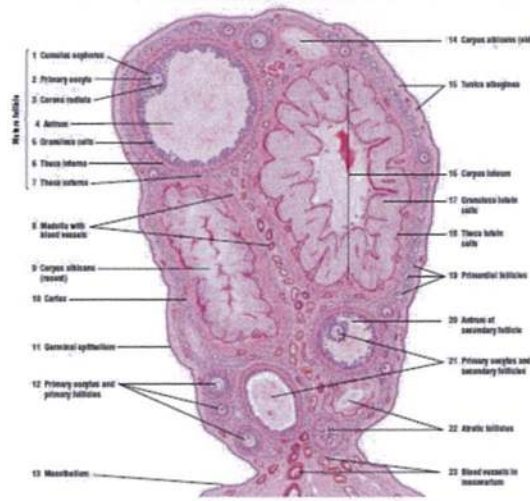


Şekil 1: Ovaryumun Anatomik Olarak Gösterimi (Ross ve Pawlina 2014).

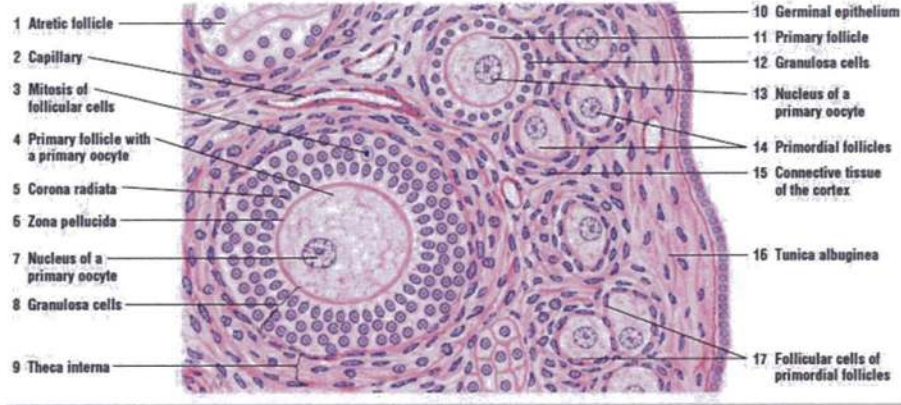
4.4.OVARYUM HİSTOLOJİSİ

Ovaryumun yüzeyi tek katlı kübik ve yer yer yassı epitel ile örtülüdür. Bu tabaka germinal epitel olarak bilinmektedir. Germinal epitel ile korteks arasında sıkı bir bağ tabakası olan tunika albuginea yer almaktadır. Çeşitli boyutlarda tek bir oosit içeren ovaryum folikülleri korteksin stromasında dağılmış halde bulunmaktadır. Folikülün boyutu, oositin gelişimi ile ilgili bilgi vermektedir. Oogenezin erken evreleri fetal dönemde gerçekleşmektedir. Bu dönemde yüksek düzeydeki mitotik bölünmeler oogonyumların sayısını artırmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

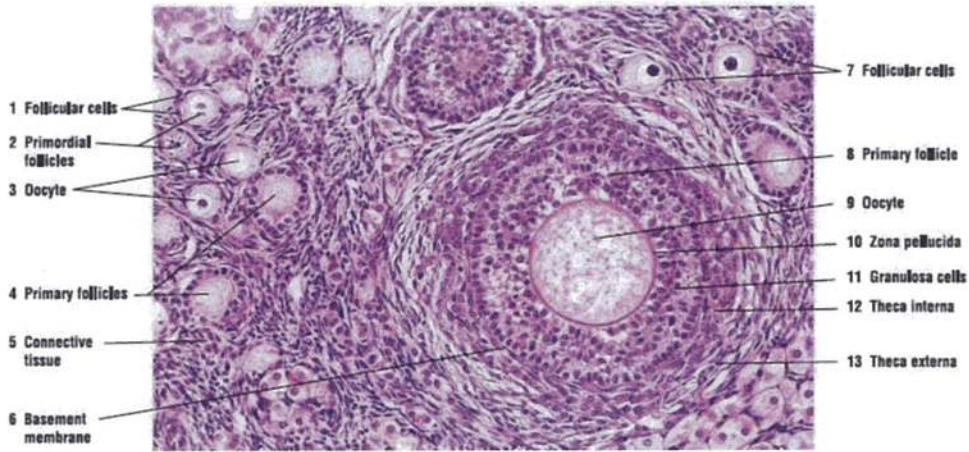
Doğumda var olan oositler gelişimlerinin birinci mayotik bölünmesi ile arreste uğramış olarak kalmaktadır. Puberte sırasında foliküller küçük gruplar halinde siklik büyümeye ve maturasyona uğramaktadırlar. İlk ovulasyon menarştan bir yıl ya da daha fazla süre sonra gerçekleşmektedir. Foliküller maturasyon ve ovulasyondan meydana gelen siklik bir örüntü menstrual siklusa paralellik gösterir. Sadece bir oosit her menstrüel siklusta tam olgunluğa ulaşır ve atılır. Reprodüktif yaşam süresince bir dişi sadece yaklaşık 400 matür ovum üretmektedir. Doğum esnasında mevcut tahmini 600.000-800.000 primer oositin çoğu olgunlaşmasını tamamlayamaz ve bu oositler atreziye uğramaktadırlar. Bu süreç en erken fetal dönemin beşinci ayında başlamaktadır (Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 2 ve Şekil 3).



Şekil 2: Ovaryumun Histolojik Kesiti (Victor ve ark. 2014).



Şekil 4: Ovaryum; Korteks, Primordiyal ve Primer Foliküller (Victor ve ark. 2014).

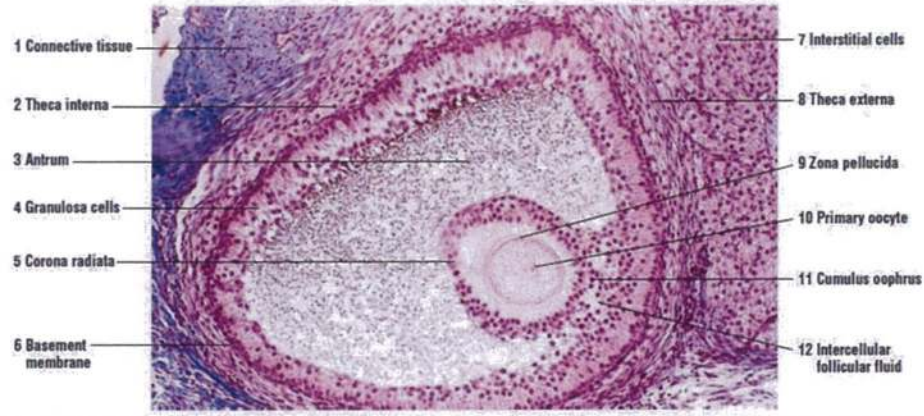


Şekil 5: Ovaryum; Korteks ve Primordiyal ve Primer Foliküller (Victor ve ark. 2014).

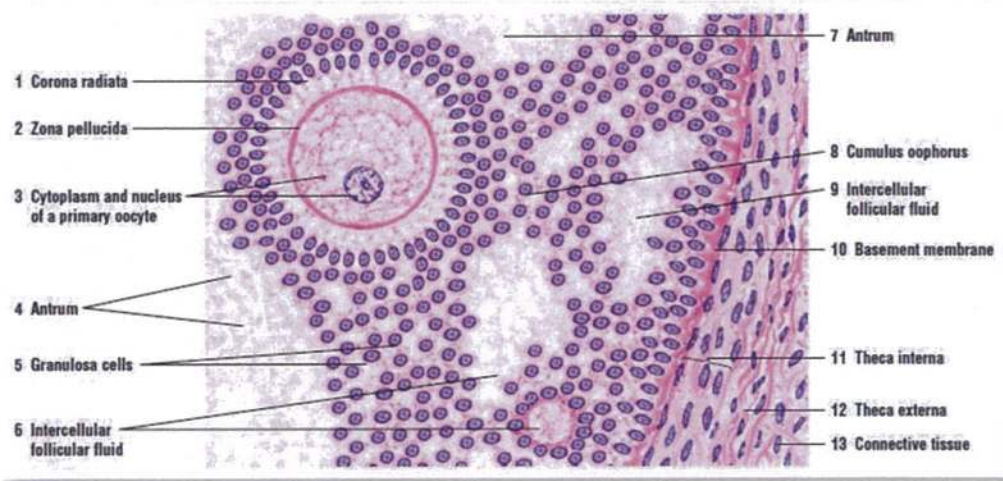
Oosit büyüdükçe özel proteinler salgılanmaktadır ve bu proteinler bir araya gelerek zona pellusidayı oluşturmaktadırlar. Zona pellusida, oosit ile folikül arasında ortaya çıkmaktadır. İnsanda zona pellusida ZP-1, ZP-2 ve ZP-3 olarak adlandırılan glikoprotein sınıfından meydana gelmektedir. Bu üçü arasında ZP-3 glikoproteini en önemlisidir. ZP-3 spermatozoa-bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyonu indükleyicisi olarak fonksiyon göstermektedir. Oositi çevreleyen tek tabakalı folikül hücreleri hızlı bir mitotik proliferasyon ile membrana granuloza adı verilen ve oositi çevreleyen çok katlı bir epiteli oluşturmaktadırlar. Folikül hücreleri bundan sonra granuloza hücreleri olarak adlandırılmaktadır. Folikül büyümesi ile granuloza hücrelerinin aralarında oluklu bağlantılar gelişmeye başlamaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Ovumun ve folikülün gelişimi için besinlerin kandan folikül sıvısının içine geçmesi gerekmektedir. Granüloza hücreleri proliferasyona uğradıktan sonra folikülün etrafında stromal hücreler, bazal laminanın hemen dışında teka folikülü adı verilen bir bağ dokusu hücreleri kılıfı oluşturmaktadır. Teka folikülü iki tabakaya farklılaşmaktadır. Bunlar teka interna ve teka eksternadır. Teka interna vaskülarizedir ve kübik hücrelerden oluşmuş iç tabaka olarak bilinir. Teka interna hücreleri luteinizan hormon reseptörüne sahiptir. Teka eksterna ise dış bağ dokusu hücreleri tabakası olarak bilinmektedir. Düz kas hücreleri ve kollajen lifler içermektedirler. Büyük ölçüde granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile hacimce büyüyen primer folikül kortikal stromanın derinlerine doğru hareket etmektedir. Oosit ve folikül gelişiminde folikül stimulan hormon (FSH), büyüme faktörleri ve kalsiyum iyonları gerekli faktörler arasındadır. Stratum granülozom tabakası 6-12 hücre tabakasına ulaştığında granüloza hücreleri arasında sıvı dolu kaviteler oluşmaktadır. Granüloza hücreleri arasında likör folikül olarak adlandırılan ve hyaluronan bakımından zengin sıvı birikmeye başlayınca kaviteler birleşir antrum adı verilen hilal şeklinde tek bir kavite oluşur. Folikül artık sekonder veya antral folikül olarak adlandırılmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Oositin (yaklaşık 125 μm çapında) büyümesinin inhibisyonu, granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salgılanan oosit maturasyonu inhibitörü (OMI) ile sağlanmaktadır. Sekonder folikülün boyutu arttıkça granüloza hücreleri tarafından döşenen alan, antrum genişlemektedir. Oosit ile ilişkili kısımda bulunan granüloza hücreleri kumulus ooforus adı verilen ve antruma doğru çıkıntı yapan bir tümsek oluşturmaktadırlar. Oositin hemen etrafında ve ovulasyonda oositle beraber kalan kumulus ooforus hücrelerine korona radiata denmektedir. Bu hücreler zona pellusidayı penetre eden mikrovillus gönderirler, oluklu bağlantılar aracılığıyla oositin mikrovillusları ile iletişim kurarlar (Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 6 ve Şekil 7).



Şekil 6: Ovaryum; matür folikül (Victor ve ark. 2014).



Şekil 7: Ovaryum; primer oosit ve matür folikül duvarı (Victor ve ark. 2014).

Graff folikülü olarak bilinen olgun folikülün çapı yaklaşık 10 mm ya da daha büyük olabilmektedir. Folikül en büyük boyuta ulaşmaya başladığında granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalmaktadır. Antrumun boyutu arttıkça stratum granülozum tabakası incelmektedir. Granüloza hücreleri arasında bulunan boşluk genişledikçe oosit ve kumulus hücreleri ile geride kalan granüloza hücreleri arasında yakınlık gevşer ve ovulasyona hazırlanılmaktadır. Oositin hemen çevresindeki kumulus hücreleri korona radiatanın tek hücre tabakasını oluşturmaktadır. Folikül maturasyonunun bu periyodunda teka tabakaları daha belirgin hale gelmektedir (Ross ve Pawlina 2014).

4.4.2.Ovulasyon

Ovulasyon, sekonder oositin Graff folikülünden atıldığı süreçtir. Ovulasyona uğrayacak olan folikül menstrual siklusun ilk birkaç gününde primer oositten oluşan bir grup içerisinde seçilmektedir. Ovulasyon sırasında oosit, germinal epitel de dahil olmak üzere tüm foliküler duvarı geçmektedir (Ross ve Pawlina 2014).

Menstrual siklusun ortalarına doğru sekonder oositin atılmasından, hormonal ve enzimatik değişiklikler sorumludur. Bu değişiklikler; foliküler sıvının hacminin ve basıncın artması, folikül duvarının aktive plazminojen tarafından enzimatik proteolizisi, oosit-kumulus kompleksi ile stratum granulozum arasında hormonal yönlendirmeyle glikozaminoglikanların biriktirilmesi ve teka eksterna tabakasında bulunan düz kas liflerinin prostaglandinler aracılığı ile kasılmasıdır (Ross ve Pawlina 2014).

Ovulasyondan hemen önce folikül çıkıntısının üzerindeki ovaryan yüzeyin küçük bir alanında kan akımı durmaktadır. Germinal epitelin foliküler stigma olarak bilinen bu bölümü rüptüre olmaktadır. Korona radiata ve kumulus ooforus hücreleri tarafından çevrelenmiş olan oosit, rüptüre olan folikülden atılmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Ovulasyon sürecinde tuba uterinanın fimbriyaları ovaryumun yüzeyine yaklaşır ve oositi içeren kumulus kütlesi fimbriyalar tarafından tuba uterinanın abdominal ostiumuna doğru süpürülmektedir. Ovulasyondan sonra sekonder oosit yaklaşık 24 saat canlı kalabilmektedir. Bu zamanda fertilizasyon gerçekleşmez ise sekonder oosit tuba uterinadan geçerken dejenere olmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Primordiyal foliküllerin içindeki primer oositler birinci mayotik bölünmelerine embriyoda başlar fakat bu süreç mayotik profazın diploten evresinde arreste uğramaktadır. Birinci mayotik profaz ovulasyondan hemen öncesine kadar tamamlanamaz. Bu nedenle primer oositler birinci mayotik profazda 12-50 yıl durabilmektedirler (Ross ve Pawlina 2014).

Olgun bir folikülde birinci mayotik bölünme tamamlandığında primer oositin her bir kardeş hücresi eşit miktarda kromatin içermektedir fakat kardeş hücrelerden biri daha fazla sitoplazma almaktadır ve sekonder oosit olmaktadır. Sekonder oositin çapı 150 µm'dir. Diğer kardeş hücre çok az miktarda sitoplazma almaktadır ve birinci polar cisim olmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Birinci mayotik bölünme tamamlandıktan sonra sekonder oosit ikinci mayotik bölünmeye başlamaktadır. Ovulasyon sırasında sekonder oosit folikülü terk ederken

ikinci mayotik bölünme ilerlemektedir. Bu bölünme metafazda arreste uğramıştır ve sadece sekonder oosit bir spermatozoon tarafından penetre edildiğinde tamamlanmaktadır. Eğer fertilizasyon gerçekleşirse sekonder oosit ikinci mayotik bölünmeyi tamamlar ve 23 kromozom seti içeren maternal pronükleuslu ovum oluşmaktadır. Bu bölünmede oluşan diğer hücre ikinci polar cisimdir (Ross ve Pawlina 2014).

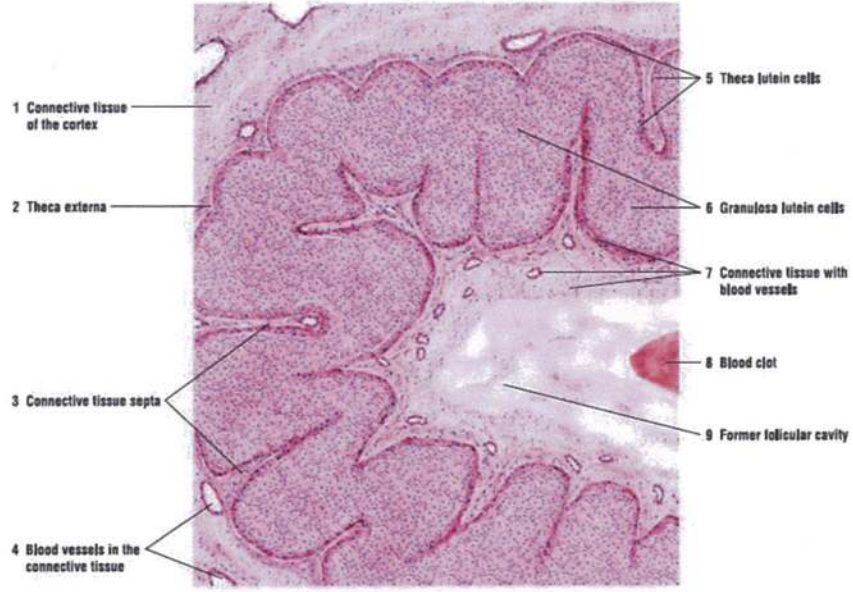
4.4.3.Korpus Luteum

Ovulasyonda geriye kalan granüloza hücreleri ve teka hücrelerinden meydana gelen folikül duvarı, folikül kollabe olduğunda derin katlantılar yapmaktadır ve korpus luteuma ya da luteal beze dönüşmektedir. Granüloza ve teka interna hücreleri luteinizasyon denen bir süreç ile granüloza lutein ve teka lutein hücrelerine dönüşmektedirler (Ross ve Pawlina 2014).

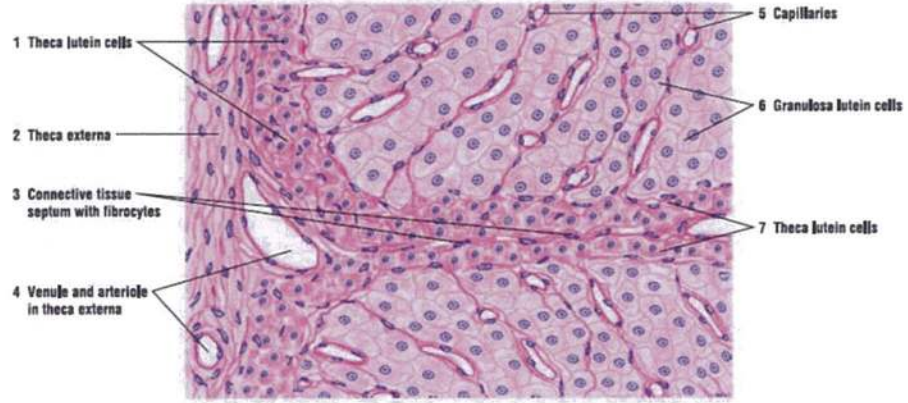
Bu luteal hücreler ani bir morfolojik değişime uğrayarak boyutları artar ve yağ damlacıkları dolar. Bilinen iki tip luteal hücre vardır; granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücreleri. Granüloza lutein hücreleri büyüktür ve merkezi yerleşimli hücrelerdir. Teka lutein hücreleri ise daha küçüktür ve periferik yerleşimli hücrelerdir. Ovaryumun korteksinde yer alan bu yüksek düzeyde vaskülarize yapı progesteron ve östrojenleri salgılamaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşmez ise korpus luteum sadece 14 gün aktif kalabilmektedir. Bu durumda menstruasyon korpus luteumu olarak adlandırılmaktadır.

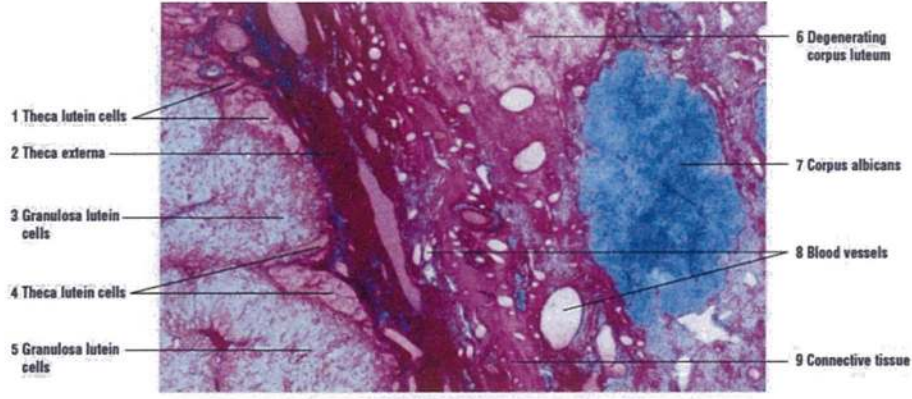
Korpus luteum dejenere olarak gebelik ya da menstruasyon sonrasında yavaşça involüsyona uğramaktadır. Hücreler lipid ile dolmaktadır ve boyutları küçülmektedir ve otolize uğramaktadırlar. Önceki korpus luteumun dejenere hücrelerinden intrasellüler hiyalin materyal birikmesi ile korpus albicans oluşmaktadır. Korpus albicans ovaryumun korteksinin derinlerine doğru gömülerek, birkaç ay içerisinde kaybolmaktadır (Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 8, Şekil 9 ve Şekil 10).



Şekil 8: Korpus Luteum (Victor ve ark. 2014).



Şekil 9: Korpus Luteum; Lutein Hücreler ve Granüloza Hücreleri (Victor ve ark. 2014).



Şekil 10: Korpus Luteum ve Korpus Albicans (Victor ve ark. 2014).

4.4.4.Kapasitasyon ve Fertilizasyon

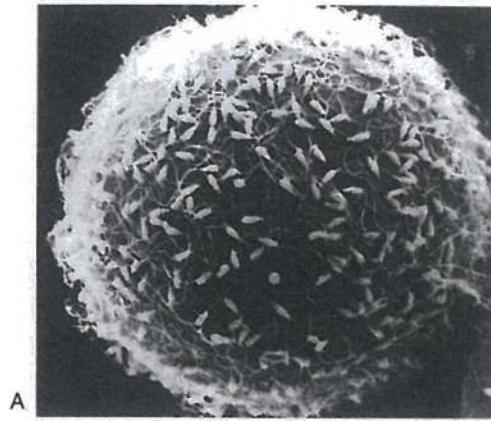
Spermatozoların epididimiste maturasyondan sonra dişi üreme kanalı içerisinde aktive olması gerekmektedir. Kapasitasyon adı verilen bu süreçte spermatazoonda yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelmektedir ve bu değişiklikler zona pellusida reseptörüne bağlanma affinitesini arttırmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Başarılı bir kapasitasyon, spermatozoonların hiperaktivasyonu ile anlaşılabilir. Kapasitasyon ile spermatazoonda ve plazma membranında bazı modifikasyonlar gerçekleşmektedir. Bunlar; adenil siklaz aktivitesinin artması ile cAMP düzeylerinin yükselmesi, tirozin fosforilasyon hızının yükselmesi, Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu sonucunda intrasellüler Ca^{+2} düzeyinin artması, spermatozoonun başının yüzeyinden seminal sıvı glikokonjugatlarının serbestleştirilmesi ve kolesterolün plazma membranından uzaklaştırılması, fosfolipidlerin ve karbonhidrat parçalarının yeniden dağılımı ile membran modifikasyonudur. Genellikle ejakülattaki spermatozoonlardan sadece birkaç milyonu tuba uterinanın ampulla bölgesine ulaşabilmektedir (Ross ve Pawlina 2014). Fertilizasyon, Evre 1, Evre 2 ve Evre 3 olmak üzere üç evrede gerçekleşmektedir. Evre 1'de spermatozoonlar bölgeye geldiklerinde korona radiata tarafından çevrelenmiş sekonder oosit ile karşılaşmaktadırlar.

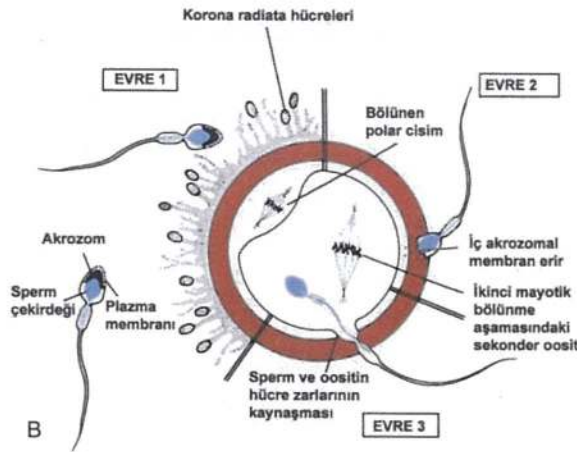
Zona pellusidaya ulaşmak için spermatozoonların korona radiatayı penetre etmesi gerekmektedir. Sadece bir spermatozoon fertilizasyon sürecini tamamlamaktadır. Evre 2 ise spermatozoonlar zona pellusida reseptörüne bağlanma yeteneği kazandıklarında kapasitasyon tamamlanmaktadır (Ross ve Pawlina 2014). Zona pellusidanın üzerinde bulunan ZP-3 reseptörüne bağlanması akrozom reaksiyonunu tetiklemektedir.

Akrozomdan salınan enzimler tek bir spermatozoonun zona pellusidayı penetre edebilmesini sağlamaktadır. Penetrasyon, ilerlemekte olan hipermotil spermatozoonun önünde zona pellusidanın sınırlı proteolizi ile sağlanmaktadır (Sadler TW 2016).

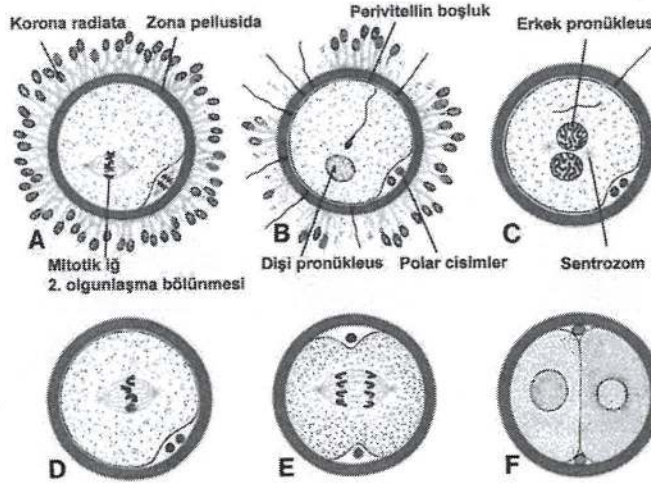
Evre 3 'de spermatozoonun plazma membranı oolemma ile kaynaşır ve spermin başındaki nukleus oositin içine girer. 23 paternal kromozom içeren erkek pronükleusu oluşturmaktadır. Pronükleusun hizalanmasından ve iki pronükleusun nüklear membranlarının ayrışmasından sonra, sonuç olarak diploid, 46 kromozomlu zigot mitotik bölünmeye ya da ilk yarıklanma uğramaktadır. Bu iki hücreli evre embriyonik gelişimin başlangıcıdır (Sadler TW 2016) (Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13).



Şekil 11: Zona Pellusidaya Yapışmış Spermilerin Elektron Mikrofilmi
(Sadler TW 2016)



Şekil 12: Oosit Penetrasyonunun 3 Evresinin Şematik Görünümü
(Sadler TW 2016).

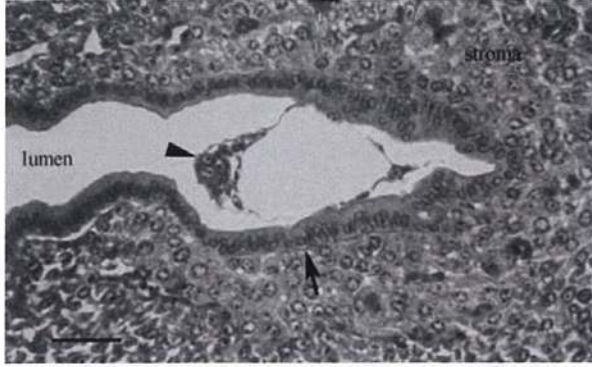


Şekil 13: A. İkinci mayotik bölünme ile birlikte ovulasyonun hemen sonrasında oosit. B. Bir spermatozoon ikinci mayotik bölünmesini tamamlamış olan oositin içine girmiştir. C. Erkek ve dişi pronükleuslar. D ve E. Kromozomlar üzerinde dizilmiş, birbirinden uzunlamasına ayrılmış ve karşı kutuplara doğru hareket etmişlerdir. F. İki Hücre evresi (Sadler TW 2016).

4.4.5.Blastokist

Fertilize olmuş ovum, tuba uterinadan uterusu geçerken değişikliğe uğramaya başlar ve uterusu yerleşmek üzere hazırlanır. Zigot yarıklanma sürecinden sonra mitotik bölünmelere devam eder. Burada, embriyoda hızlı bir şekilde artan hücre büyümesi gerçekleşmeye başlar. En başta embriyo maternal bilgi taşıyan makromoleküllerinin kontrolü altındadır. Gelişimin sonraki evreleri embriyonik genomun aktivasyonuna bağlıdır. Burada bulunan embriyonik genom, blastokist evresinde farklı büyüme faktörleri, hücre bağlantıları ve birçok makromoleküller sayesinde normal bir ilerleme göstermektedir. Mitotik bölünmelerin sonucunda morula ve oluşan hücrelere ise blastomer denilmektedir. Fertilizasyondan yaklaşık üç gün sonra 16 hücre evresine gelen morula uterin kaviteye gelmektedir. Morula, uterusu yaklaşık 24 saat serbest şekilde kalmaktadır. Serbest kaldığı sürede embriyo gelişmeye devam eder. Erken embriyoda blastokist oluşmaktadır. Blastokistin merkezinde bulunan hücre kümesi iç hücre kitlesi adını alıp, embriyonun esas dokularını oluşturmaktadır. Dış hücre kitlesi ise trofoblastları oluşturup, sonrasında ise plasentayı oluşturmaktadır. Bu geçişlerde zona pellusidanın içerisine doğru sıvı

girmeye başlar, bu sıvı dolu boşluk blastokist kavitesi adını almaktadır. Bu durum blastokist başlangıcını oluşturmaktadır. Blastokist uterin lümeninde yaklaşık 2 gün serbest kalarak, ileri mitotik bölünmelere uğrayıp, zona pellusida artık kaybolmaktadır. Bu sürecin ardında iç hücre kitlesi trofoblast, dış hücre kitlesi ise embriyoblast olarak isimlendirilmektedir (Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 14).



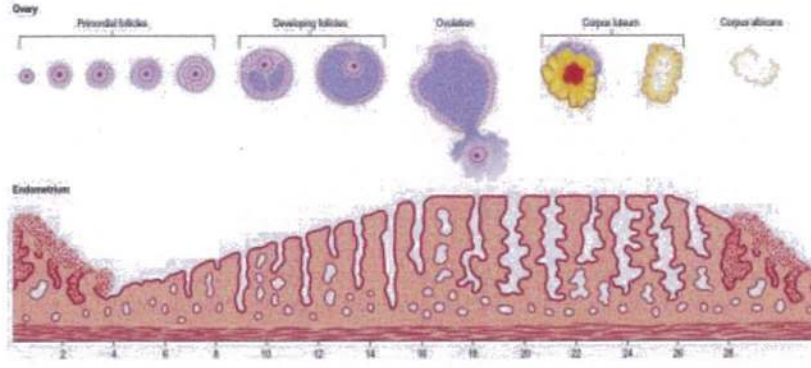
Şekil 14: Fare Uterusunda Bulunan 5 Günlük Embriyonun HE Boyamasının Görüntüsü (Ölçek: A: 20 μ m) (Chen, 2006).

4.4.6.İmplantasyon Sırasında Uterus

Uterus duvarı üç tabakadan oluşmaktadır: iç yüzünü örten mukoza, endometrium; kalın bir düz kas tabakası miyometrium; duvarın en dışını kaplayan periton zarı, perimetriumdan oluşmaktadır. Endometrium tabakası puberte döneminde başlayıp menopoza dönemine kadar her 28 günde bir overlerin kontrolü ile periodik değişiklikler göstermektedir. Menstrüel siklus boyunca, endometrium üç farklı evre geçirmektedir; foliküler veya proliferatif evre, sekreatuar veya progesteron evre ve menstrüel evreler. Proliferatif evre, menstrüel evrenin sonunda başlar ve östrojen hormonunun seviyesine göre ovarian foliküllerin büyümesine paralel seyir halindedir. Sekreatuar evrede korpus luteumun salgılamış olduğu progesterona yanıt olarak ovulasyondan yaklaşık olarak 2-3 gün sonra başlamaktadır. Fertilizasyon gerçekleşmediği durumda endometriumun kompakt ve süngerimsi tabakasının dökülmesi başlar ve menstrüel evre başlamış olur. Fertilizasyon gerçekleşmiş ise endometrium implantasyona yardım eder ve plasenta oluşumuna destek sağlanır. Gestasyonun ileri evrelerinde hormon yapımı plasenta tarafından sağlanır ve korpus luteum dejenere olmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

İmplantasyon sırasında uterusun mukozası, uterus bez ve arterlerin uzayıp kıvrılarak helezoni bir görünüm aldığı ve dokuların olgunlaştığı sekresyon evresindedir. Bu sırada endometrium da üç tabaka belirginleşmektedir; kompakt tabaka, süngerimsi tabaka ve bazal tabaka (Sadler TW 2016).

Oosit fertilize olmadığı takdirde venüller ve sinozodial boşluklar kan hücreleri ile dolup tıkanmaya başlamakta ve diapedezle dokuya çıkmaktadır. Menstrüel evrenin başlaması ile kan yüzeyel arterlerden dışarı çıkmakta ve endometriumun küçük stroma ve bez parçaları kopmaya başlamaktadır. Daha sonra üç ve dördüncü günler içerisinde endometriumun kompakt ve süngerimsi tabakaları tamamen dökülerek uterusun dışına atılmaktadır. Atılım gerçekleştikten sonra endometriumun yalnızca bazal tabakası kalmaktadır. Buradaki tabaka kendi arterleri olan bazal arterler ile beslendiğinden bir sonraki evre olan proliferatif evrede uterus bezleri ve arterlerinin yeniden yapılmasını sağlamaktadır (Sadler TW 2016) (Şekil 15).



Şekil 15: Menstrual Siklus (Greys anatomy 41. Baskı sf 1307. Copyright 2016).

4.5.TESTİS

4.5.1.Testis Embriyolojisi

Cinsiyetin farklanması, bazıları otozomal olan çok sayıda genin rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı kısa kolunda SRY genini (Sex determinig region Y) taşıyan Y kromozomudur. Embriyoda genetik ve kromozomal cinsiyet spermin sahip olduğu X veya Y kromozomuna bağlı olarak fertilizasyonda belirlenir. Fertilizasyonda genetik ve kromozomal cinsiyet belli olmasına rağmen, embriyonun erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri, embriyonikyedinci haftaya kadar gelişime başlamazlar. Genital sistem erken dönemde her iki cinste de birbirine

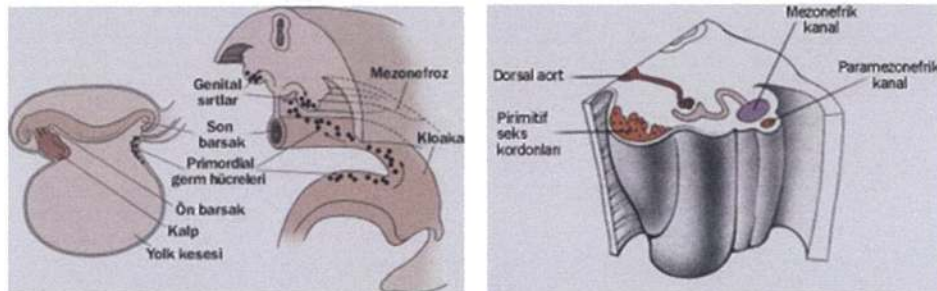
benzer. Bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç periyodu “seksüel gelişimin farklanmamış periyodu” olarak adlandırılır. Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomuna ihtiyaç vardır. Y kromozomu, farklanmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir. Bu kromozom tarafından düzenlenen testis belirleyici faktör (TDF), testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır (Ross ve Pawlina 2014; Victor P ve ark 2013).

Gonadlar;

- Posterior abdominal duvarın mezotel epitelyumu (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücrelerinden kaynaklanır.

Beşinci haftada gonadal gelişimin ilk safhaları ortaya çıkar. Mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma ile başlar. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık, gonadal (genital) kabartı oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar, primer seks kordonları altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler (Şekil 15). Farklanmamış gonad, dışta yer alan bir medulladan oluşmaktadır.

Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe diferansiye olur, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermektedirse, medulla testise farklanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur. Oldukça geniş, yuvarlak primitif seks hücreleri dördüncü hafta başında vitellus kesesi duvarında allantoisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanması sırasında vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Bu olurken, primordial germ hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. Altıncı haftada primordial germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve primer seks kordonlarına dahil olurlar (Moore ve Ark. 2016; Sadler TW 2016) (Şekil 16).



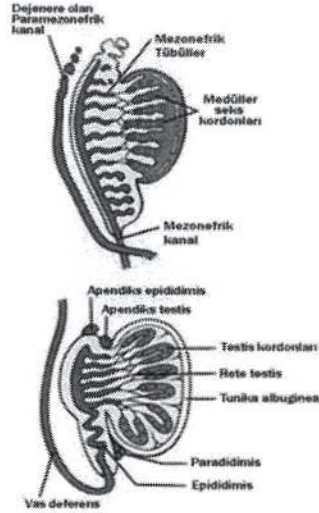
Şekil 16: Testis gelişiminin şematik gösterimi (Sadler TW 2016)

Testislerin gelişimi koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için SRY geni, farklanmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir. Testis belirleyici faktör (TDF), cinsiyet kordonlarını uyararak, onların farklanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur (Moore ve Ark. 2016; Sadler TW 2016).

Cinsiyet kordonlarının kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Yoğun tunika albuginea gelişimi fetusta testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefroza ayrılır ve kendi mezenterisi olan mezorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tübüli rekti ve rete testise farklanırlar. Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar (Moore ve Ark. 2016; Sadler TW 2016).

Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonlar olan testosteron ve aldesteron salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin maskulin olarak farklanmasını indüklerler (Şekil 16).

Testosteron üretimini insan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşmıştır. Testosterona ilave olarak fetal testisler glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya Müllerian İnhibitör Faktör (MIF) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. Antimüllerian hormon, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salgılanması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik duktusların gelişimini baskılar (Moore ve Ark. 2016; Sadler TW 2016) (Şekil 17).



Şekil 17: Testis Gelişimi. Seminifer Kordonların, Seminifer Tübüllere, Tübülü Rekti Ve Rete Testise Farklanması (Moore ve ark. 2016).

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar, puberteden itibaren lümen gelişir. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur.

Sertoli hücreleri: Destek hücreleri olan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler. Spermatogonia: Primordial sperm hücreleri olan bu hücreler, primordial germ hücrelerinden farklıdır.

Fötal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktusları oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübül ile devam eder. Bu duktuslar, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar (Moore ve Ark. 2016; Sadler TW 2016).

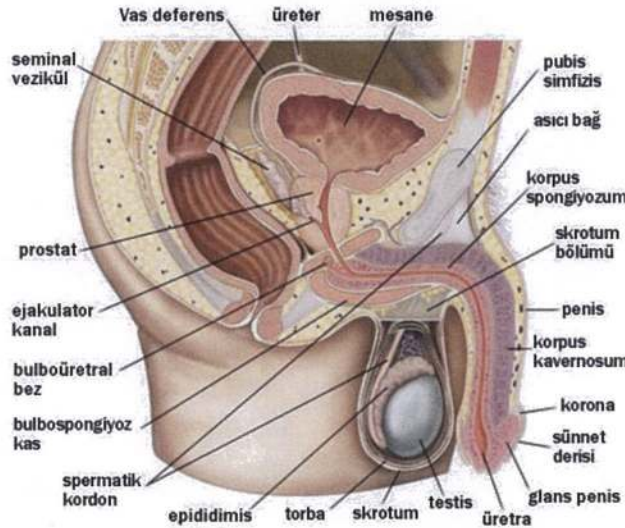
4.5.2. Testis Histolojisi

Testis, epididimis ve duktus deferensin başlangıç kısmı tunika vaginalis denilen mezotelyum döşeli boşluğu içine alan deriyle kaplı bir cep olan skrotal kese içinde yer alır. Bu şekilde yerleşim testislerin normal spermatogenez için gerekli vücut ısısı olan 34°C ila 35°C arasında olmalarını sağlar. Testisler, tunika albuginea adı verilen kalın bağ dokusu kapsülü ile sarılmıştır. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar bezi testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Bu uzantılar tam değildir ve bölmeler çoğunlukla birbiri ile ilişki içindedir. Her

bölmede gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül bulunur. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretir. Leydig hücreleri ise testiküler androjenleri salgılar. Testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluktadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur (Ross ve Pawlina 2014, Kierszenbaum 2016).

Her bir tübül sonlanırken lumeni daralır ve düz tübüller ya da tübülü rekti adıyla bilinen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar (Ross ve Pawlina 2014; Kierszenbaum 2016).

Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete testis, 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmını bağlamıştır (Ross ve Pawlina 2014; Kierszenbaum 2016) (Şekil 18).



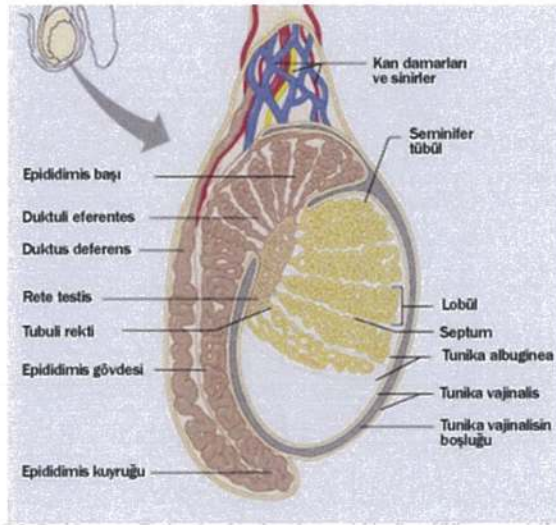
Şekil 18: Erkek Genital Sistem (Sadler TW 2016)

Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur.

Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış myoid hücrelerden oluşur. Epitel iki tip hücreden meydana gelmektedir: Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenik seriyi oluşturan hücreler.

Spermatogenik seri hücreleri bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Bu erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerde bulunabilirler. Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu olay üç evreye ayrılabilir; spermatositogenez olarak adlandırılan evrede spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir.

Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu spermatidlerin oluştuğu evre mayoz adını alır. Spermiyogenez ise spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşma süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safhadır (Ross ve Pawlina 2014; Victor P ve ark. 2013) (Şekil 18).



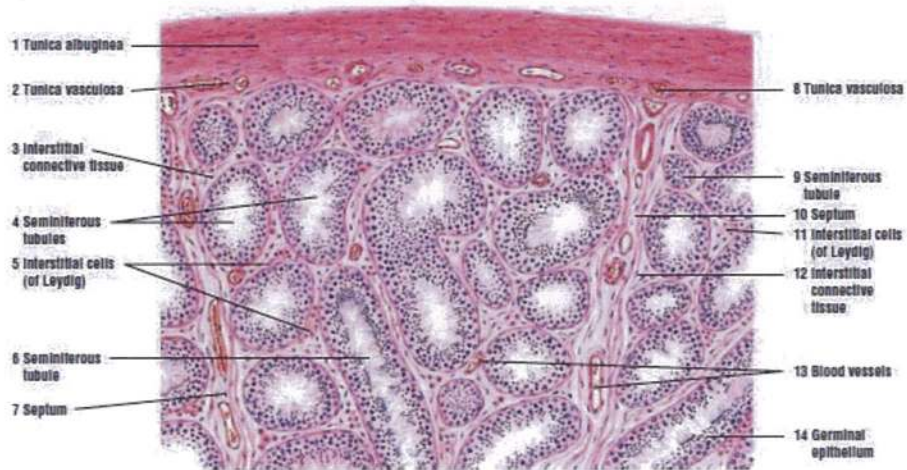
Şekil 19: Testisin Yapısı (Ross ve Pawlina 2014)

Spermatogenez, spermatozoon üretim sürecidir. Süreç ilkel öncül bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyum, yaklaşık 12 µm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan küçük bir hücredir. Ergenlik çağında spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme ile çoğalmaya başlar. Oluşan yeni hücreler iki yoldan birini izlerler. A tipi spermatogonyumlar olarak adlandırılan kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da devam eden mitotik bölünmeler sonucu farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluştururlar. İnsanda morfolojik olarak ayrılabilen 3 tip spermatogonyum vardır: koyu renkli boyanan koyu tip A spermatogonyum, soluk renkli boyanan açık tip A spermatogonyum ve tip B

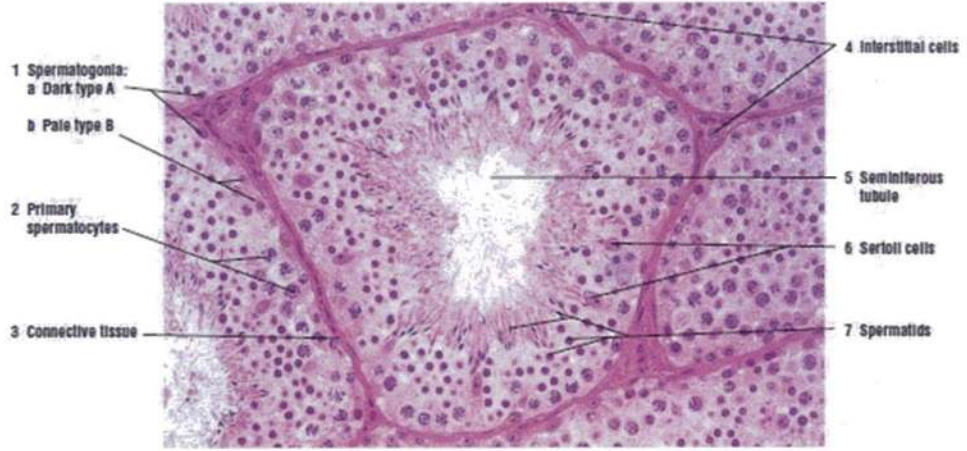
spermatogonyum. Tip A spermatogonyum spermatogenik serinin kök hücreleridir (Ross ve Pawlina 2014; Victor P ve ark. 2013).

Tip B spermatogonyum ise primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositle spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynarlar. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur. İnsanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 64 gündür. Bu süreç dalgalanmalar şeklinde oluşur, her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümünü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonların bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır (Ross ve Pawlina 2014; Victor P ve ark. 2013).

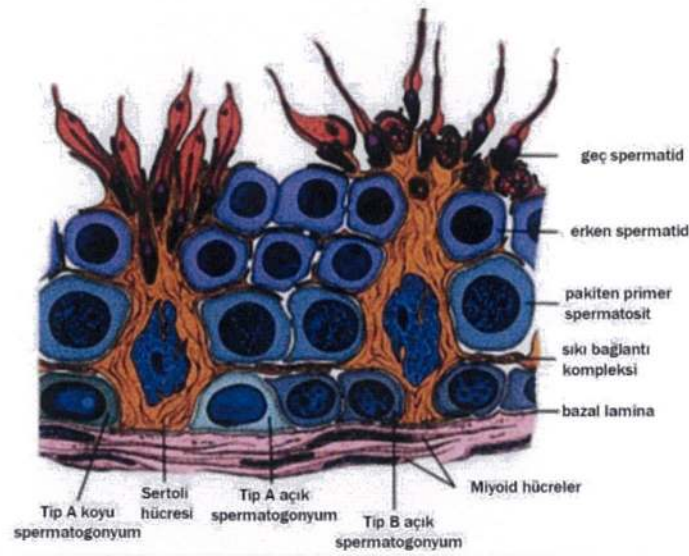
Seminifer epitelyum siklusu germinal epitelyumda belli bir hücre evresinin ardından iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklaşık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenez 4 sıklıktan sonra biter (Ross ve Pawlina 2014; Victor P ve ark. 2013) (Şekil 20, Şekil 21 ve Şekil 22).



Şekil 20: Testis (Victor P ve ark 2013).



Şekil 21: Testis; Seminifer Tübül (Sadler 2016).

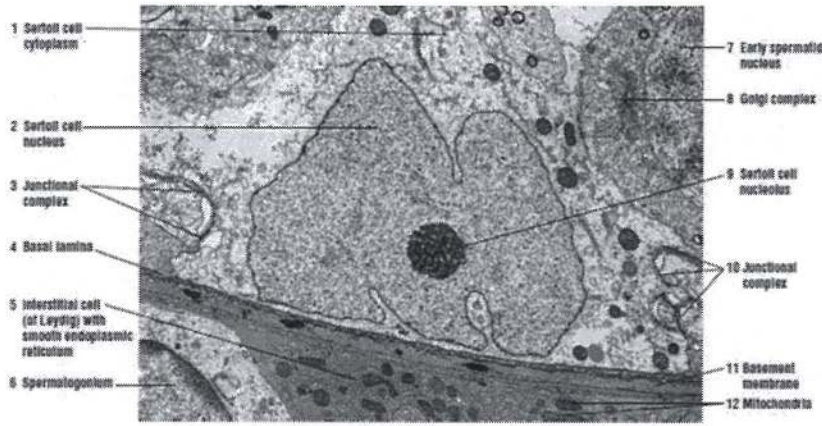


Şekil 22: Seminifer Tübülün Bir Parçası. Seminifer Epitel İki Tip Hücreden Oluşmuştur: Spermatogenik Seri Hücreleri ve Sertoli Hücreleri (Ross ve Pawlina 2014).

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopunda, Sertoli hücrelerinin sınırları belirsiz olarak görülür, çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar kaba endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozom içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdekte

çok sayıda kıvrılmalar, belirgin bir nukleolus ve az miktarda heterokromatin görülür (Ross ve Pawlina 2014).

Seminifer tübüllerde yan yana duran Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu bağlantılar seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartman olmak üzere iki bölmeye ayırır. Spermatogonyumlar, içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal kompartmana çıkar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları, kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur. Spermatositler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir (Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 22 ve Şekil 23).



Şekil 23: Sertoli Hücreleri (Sadler 2016).

Leydig hücreleri büyük eozinofilik hücreler olup lipid içermektedirler. Sıklıkla Reinke kristalleri bulunmaktadır. Histolojik kesitlere bakıldığında Reinke kristalleri reaktif olup boyutları $3 \times 10 \mu\text{m}$ 'dir. Leydig hücrelerinin hem aktiviteleri hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 18. haftasına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden sonra salınan Lüteinizan Hormon (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları puberte

öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (Ross ve Pawlina 2014; Victor P ve Ark 2013).

4.6.İNFERTİLİTE

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) infertiliteyi; bir çiftin bir yıl boyunca düzenli korunmasız cinsel ilişkiye girdiği halde gebe kalamama durumu olarak tanımlamaktadır. Üreme çağındaki çiftlerin %10-15'inde infertilite görülmektedir. Çiftlerde kadın kaynaklı infertilite %40-50'sinde mevcutken erkek kaynaklı infertilite durumu %30-40'ında görülmektedir. Bu çiftlerin günümüzdeki mevcut standart tanısal testler ile açıklanamayan infertilite oranı yaklaşık olarak %10-15'dir (Sadler 2016). Daha önce hiç gebelik yaşanmamışsa primer infertilite, en az bir kere gebelik oluşmuşsa sekonder infertilite olarak sınıflanır. İnfertilite sıklığı ve nedenleri popülasyonlara göre değişkenlik gösterir. Fekundabilite, belli bir zaman periyodunda, bir popülasyondaki gebelik oranları olarak tanımlanır. Fekundite ise tek menstrüel siklуста canlı doğum elde edilebilme yeteneği olarak tanımlanır. Normalde her ovulatuvar siklуста %25 gebelik şansı vardır. Bu oran 3 ayda %57'ye, 6 ayda %72'ye, 12 ayda %85'e ve 24 ayda %93'e yükselir. Yine sağlıklı çiftlerde gebeliğin oluşmadığı siklus sayısı ne kadar artar ise fekundabilite oranları da ters orantılı olarak azalır. Otuz bir yaş üstünde, yaş artımı ile fekundabilite oranları azalır (Sadler TW 2016).

Çiftlerin %85'i ilk bir yıl içinde gebe kalabildikleri için bu süre zarfında detaylı bir inceleme yapmak yalancı pozitif test sonuçları ile yararsız tedavi uygulamalarının artmasına yol açacağı ve spontan gebelik şansını kaçırabileceği için gereksizdir (Sadler TW 2016).

İnfertilitenin nedenlerine bakıldığında en fazla ovulatuvar bozukluk, tubal, servikal ve uterin faktörler, erkek infertilite ve nedeni açıklanamayan infertilitedir. Uterin patoloji bu nedenler içerisinde en az rastlanandır. Yaşa bağlı olarak bu nedenlerin görülme sıklığı değişmektedir. Yapılan çalışmalar da en sık ovulasyon bozukluğu genç kadınlarda görülürken, tubal ve servikal faktörler genç ve yaşlılarda eşit sıklıkta görülmektedir. Yaşlı çiftlerde ise erkek faktörü ve açıklanamayan infertilite görülme olasılığı yüksektir (Sadler TW 2016) (Tablo 1).

Tablo 1: Kadın ve Erkek Bireylerde Görülen İnfertilite Nedenleri (Sadler TW 2016).

Kadın Bireylerde Görülen İnfertilite Nedenleri	Erkek Bireylerde Görülen İnfertilite Nedenleri
Vulva ve Vajene Ait Faktörler	Genital Organ Anomalileri
Tubal Faktörler	Sperm Anomalileri ve Fonksiyon Bozuklukları
Servikal Faktörler	Diğer Faktörler
Uterin Faktörler	
Ovulatuvar Faktörler	
Diğer Faktörler	

4.6.1.Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite, 1 yıl korunmasız, düzenli cinsel ilişki sonrası gebelik elde edemeyen çiftlerde yapılan temel değerlendirmede (sperm analizi, ovulasyon testleri, kavite ve tubalarda patoloji olmadığını gösteren histerosalpingografi (HSG)) herhangi bir patolojiye rastlanmaması olarak tanımlanmaktadır (Sadler TW 2016).

Ultrasonografi (USG) değerlendirmesinin temel değerlendirmeye eklenmesi ile açıklanamayan infertiliteye sahip çiftlerin bir kısmında myoma uteri, endometrioma ve azalmış over rezervine ait bulgular tespit edilebilmektedir. Tüm temel infertilite testlerinin sonucunda, çiftlerin yaklaşık olarak %15'inde neden ortaya konamamaktadır (Sadler TW 2016).

Açıklanamayan infertilitenin olası nedenleri şöyle sıralanabilir:

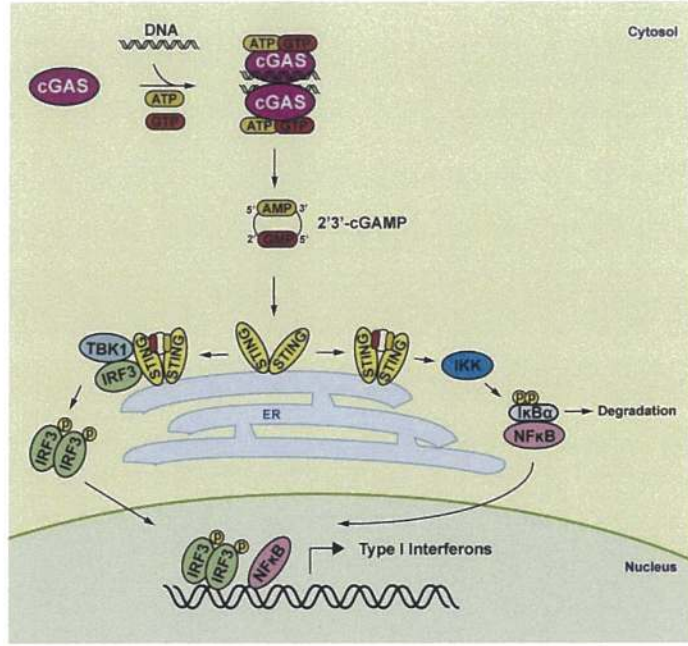
- 1) Antagonist servikal sekresyonlar
- 2) Erken embriyonel implantasyonda defektif endometrial reseptivite
- 3) Anormal tubal siliyal aktivite
- 4) Defektif ovum pick- up mekanizması
- 5) Lütinize unrüptüre folikül sendromu
- 6) Ek hormonal anomaliler (örnek: luteal faz defekti)
- 7) Bozulmuş oosit ve/veya sperm fertilizasyon kapasitesi
- 8) Minimal veya orta düzeyde endometriozis
- 9) İmmünolojik faktörler

- 10) Bozulmuş peritoneal makrofaj aktivitesi
- 11) Bozulmuş peritoneal sıvı antioksidan fonksiyonu (Sadler TW 2016).

4.7.SİKLİK GMP AMP SENTAZ (CGAS) / İNTERFERON GENLERİNİN UYARICISI (STING) YOLAĞI

cGAS - STING yolağı, sitozolik DNA'nın varlığını saptamak ve buna bağlı olarak yaşlanma veya savunma mekanizmalarının aktifleşmesine yol açabilen enflamatuvar genlerin ekspresyonunu tetiklemek için işlev yapan doğal immün sistemin bir bileşenidir (Yang ve ark. 2017). DNA normalde hücrenin çekirdeğinde bulunur. DNA'nın sitozole lokalizasyonu, tümörögenез veya viral enfeksiyon ile ilişkilidir (Watson ve ark. 2015).

cGAS- STING yolağı, sitozolik DNA'yı tespit etmek ve bir immün yanıtı uyarmak için etki eder. DNA ile bağlanma üzerine protein siklik GMP-AMP Sentaz (cGAS), GTP ve ATP'yi siklik GMP-AMP (cGAMP) oluşturmak üzere tetikler. Daha sonra cGAMP, transkripsiyon faktörü İnterferon Regülatör Faktör 3 (IRF3)'ün TANK bağlayıcı kinaz 1 (TBK1) yoluyla fosforilasyonunu / aktivasyonunu tetikleyen endoplazmik retikulumda yer alan interferon genlerinin uyarıcısına (STING) doğrudan bağlanır (Gentili ve ark. 2019) (Şekil 24).



Şekil 24: cGAS-cGAMP-STING Yolu, DNA Hasarından Sonra Sitoplazmik DNA'yı Algılar ve Tip I IFN'leri ve Diğer Sitokinleri Aktive Eder (Cai ve ark. 2014).

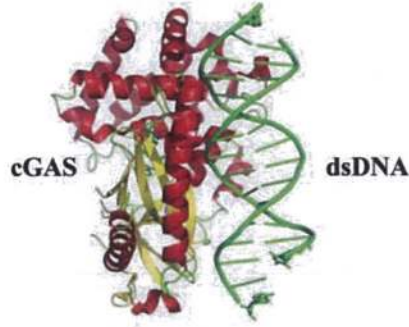
Normal hücrelerde DNA, çekirdek veya mitokondride bulunmaktadır. Sitozolde DNA'nın varlığı hücre hasar veya enfeksiyonun göstergesidir ve immün yanıtla ilişkili genlerin aktivasyonuna yol açar. Bununla birlikte, bu enflamatuvar programlar, kendi nükleik asitlerine anormal tepkileri önlemek için sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. Gerçekten de RNA için sitozolik reseptör olan RIG-I (retinoik asit uyarılabilir gen 1), viral RNA'ya özgü 5'-trifosfat ile etkileşime girerek kendi RNA'sını kendinden olmayandan ayırır (Loo ve Gale 2011, Wu ve Chen 2014, Abe ve ark. 2017).

DNA sitoplazmada fizyolojik olarak bulunmadığı için, STING (interferon genlerinin uyarıcısı) ile cGAS (siklik GMP-AMP sentaz)'ın aracılık ettiği sitozolik DNA'nın algılanması, kendinden ve kendinden olmayan DNA arasındaki farkı ayırt etmez (Nagata ve ark. 2010, Abe ve ark. 2017). Bununla birlikte, fertilizasyon sırasında sperm kaynaklı DNA, oosit sitoplazmasında bulunabilir ve nükleik asit algılayıcı cevaba neden olabilir (Abe ve ark. 2019).

4.8. ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİKORLAR

2.8.1. Siklik Gmp-Amp Ssentaz (Cgas)

Siklik GMP-AMP Sentaz (CGAS) 522 amino asitten oluşan bir protein olup nükleotidiltransferaz ailesinin bir üyesidir. Moleküler ağırlığı 59kDA'dır. Monositik hücre hattı THP1 ektre edilmektedir ve Man-21 ailesi sınıfındadır. ATP ve GTP'den siklik GMP-AMP'nin (cGAMP) oluşumunu katalize eder. Anahtar bir sitozolik DNA sensörü olarak hareket eden antiviral aktiviteye sahiptir, sitoplazmada çift sarmallı DNA (dsDNA) mevcudiyeti, bağışıklık yanıtını tetikleyen bir tehlike sinyalidir. Sitozolik DNA'yı doğrudan bağlar, STING'e bağlanan ve aktive eden, tip I-interferon üretimini tetikleyen ikinci bir mesajcı olan cGAMP'ın aktivasyonuna ve sentezlenmesine yol açar (Anping ve Ark. 2019) (Şekil 25).

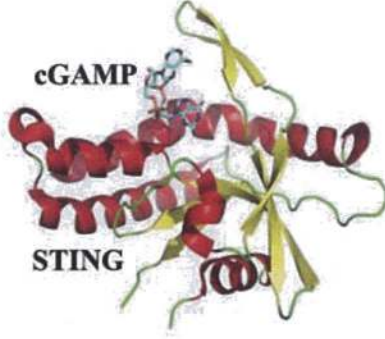


Şekil 25. cGAS Üç Boyutlu Dizilimi (Li ve Ark. 2019).

4.8.2. İnterferon Genlerinin Uyarıcısı (STING)

STING, doğal immüitenin önemli bir bileşeni olarak görev yapan 378 amino asite sahip bir proteindir. TMEM173 geni tarafından kodlanır. Timus, dalak ve plasenta gibi organlarda yüksek ekspresyona sahiptir (Gao ve ark. 2013). Bu sinyalleme proteini, tip I interferonun (IFN-alfa ve IFN-beta) ekspresyonunu indüklemek ve ekspresyonun ardından güçlü bir antiviral durum sergilemek için hem NF-κB hem de IRF3 transkripsiyon yollarını aktive edebilmektedir. STING ilk önce ana histouyumluluk kompleksi II (MHC II) sınıf moleküllerle etkileşime giren bir

protein olarak tanımlanmıştır. Genel olarak endoplazmik retikulum membranı, hücre zarı ve mitokondri dış zarında bulunmaktadır (Kumar ve Ark. 2019) (Şekil 26).



Şekil 26: STING Üç Boyutlu Dizilimi (Li ve Ark. 2019).

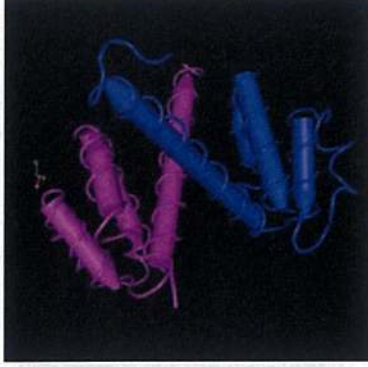
4.8.3. Nükleotit Bağlayıcı Oligomerizasyon Domain, Lösin

Bakımından Zengin Tekrar ve Pyrin Domain İçeren Protein 14 (NLRP14)

Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon domain, lösin bakımından zengin tekrar ve pyrin domain içeren protein 14 (NLRP14) Nod benzeri reseptör (NLR) protein ailesinin bir üyesidir (Tian ve ark. 2009). Son araştırmalar, NLRP genlerinin hem memeli doğal immün sisteminde hem de üreme sisteminde önemli roller oynadığını göstermiştir. NLR protein ailesi, farklı N-terminal etki alanlarına bağlı olarak birkaç alt aileye ayrılır. NLRP alt ailesi (NALP ailesi olarak da bilinir), bir PYRIN alanıyla karakterize edilen yeni tanımlanmış bir NLR grubudur. NLRP14, bir C-terminal lösin bakımından zengin tekrar (LRR) bölgesine, bir N-terminal Pyrin alanına (PYD) ve ardından bir NACHT alanına ve bir NACHT ile ilişkili alana sahiptir. İlk olarak, NLRP proteinlerinin işlevine ilişkin araştırmalar, inflammasom oluşumu ve doğal bağışıklık sistemindeki kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptotik ve enflamatuar sinyal yollarındaki rollerine odaklanmıştır. Birçok araştırma, bazı NLRP genlerinin memeli üremesinde rol oynadığını ortaya koymuştur (Tian ve ark. 2009). Farede fertilize olmuş oositde in vitro knockdown deneyleri fare germ-hücrelerine özgü NLRP14 transkriptlerinin azalmasının, embriyoların bir hücreli ve sekiz hücreli aşamaları arasında gelişimin durmasına yol açtığını ortaya koymuştur (Hamatani ve ark. 2004, Horikawa ve ark. 2005, Tian ve ark. 2009).

Abe ve arkadaşları NLRP14'ün ektopik ifadesinin, sitozolik nükleik asit algılayan yollarlarda sinyal kaybıyla sonuçlandığını ve NLRP14'ün nükleik asit algılama yolu ile fiziksel olarak etkileşime girdiğini ve ubiquinasyon ve degradasyon için TBK1'i

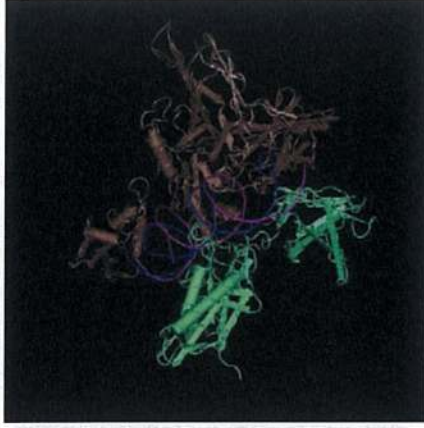
(TANK bağlayıcı kinaz 1) hedeflediğini göstermişlerdir. Bununla birlikte NLRP14 işlevinin kaybı ve nükleik asitlere aşırı duyarlılık ile sonuçlanan erkek sterilitesi ile ilişkili bir insan nonsense germline varyantı belirlemişlerdir (Abe ve ark. 2019) (Şekil 27).



Şekil 27. NLRP14 Üç Boyutlu Dizilimi (Eibl ve Ark. 2014).

4.8.4. Interferon Regülatör Faktör (IRF3)

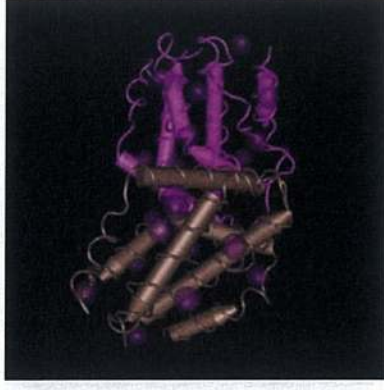
İnterferon regülatör faktörler (IRF'ler), immün hücre gelişimi ve farklılaşma ve patojenlere verilen tepkilerin düzenlenmesi de dahil olmak üzere immün yanıtın birçok basamağında önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörleri ailesidir. IRF3, viral RNA ve DNA'yı tespit eden patojen tanıma reseptörlerinin uyarısı ile tip I interferonların üretimi için kritiktir. IRF3 sitoplazmada latent formda bulunur. TBK1 veya IKKε ile fosforilasyonun ardından, IRF3 bir homodimer oluşturur, ardından çekirdeğe transloke olur. IRF3, 50 -150 amino asitlik sentetik peptitden oluşmaktadır. IRF triptofan pentad içerir, DNA bağlama alanını tekrar eder. İnterferon ile uyarılmış tepki elemanı (ISRE) destekleyici aktivasyonuna aracılık eder. Antiviral aktivite için moleküler bir anahtar olarak işlev görür. Bir viral enfeksiyon sırasında oluşturulan dsRNA, C-terminal serin / treonin kümesi üzerinde IRF3 fosforilasyonuna yol açar. Bu, ISRE'nin kontrolü altında genlerin transkripsiyonunu aktive eden bir kompleks olan dsRNA-aktive edilmiş faktör 1'i (DRAF1) oluşturmak için dimerleşmesine, nükleer lokalizasyonuna ve CREB bağlayıcı proteinle (CREBBP) birleşmesine yol açan bir konformasyonel değişikliği tetikler. Kompleks, sırasıyla IFN-alfa ve IFN-beta promoterleri üzerindeki IE ve PRDIII bölgelerine bağlanır. IRF-3 herhangi bir transkripsiyon aktivasyon alanına sahip değildir (Jefferies ve Ark. 2019) (Şekil 28).



Şekil 28: IRF3 Üç Boyutlu Dizilimi (Panne D. ve Ark. 2006).

4.8.5. İnterferon (IFN)

Tip II sitokin reseptör ailesine aittir. 2 fibronektin tip III alan içerir. Aynı zamanda tip II veya immün interferon olarak da bilinen interferon-gama (IFN-gama), çok çeşitli immünoregülasyon aktiviteleri uygular ve prototip proinflamatuvar sitokin olarak kabul edilir. Olgun insan IFN-gama, 20-25 kDa değişkenlikli glikosile edilmiş alt birimlerin kovalent olmayan bir şekilde bağlı homodimerleri olarak bulunur. IFN-gama dimerleri, daha sonra iki alfa ve iki beta alt birimin fonksiyonel reseptör kompleksini oluşturmak üzere IFN-gama RII (beta alt birimleri) ile etkileşime giren IFN-gama RI'ye (alfa alt birimleri) bağlanır. IFN-gama RII'nin dahil edilmesi, ligand için bağlanma afinitesini ve sinyal iletiminin verimini artırır. IFN-gama, inflamasyon koşulları altında, özellikle T hücreleri ve NK hücreleri tarafından, çeşitli immün hücreler tarafından üretilir. Th1 hücrelerinin gelişimini ve aktivasyonunu, kemoatraksiyonunu ve monositlerin ve makrofajların aktivasyonunu, antijen sunum moleküllerinin regülasyonunu ve B hücrelerinde immünoglobulin sınıf geçişini teşvik ederek konak savunmasında kilit bir rol oynar. Aynı zamanda antiviral, antiproliferatif ve apoptotik etkiler sergiler. Ek olarak, IFN-gama, düzenleyici T hücrelerinin gelişimini teşvik ederek ve Th17 hücre farklılaşmasını inhibe ederek bir anti-enflamatuvar aracı olarak işlev görür. IFN-gammanın pleiotropik etkileri, aterosklerozun çoklu yönlerinin gelişimine katkıda bulunur (Tao ve Ark. 2016). (Şekil 29).



Şekil 29: IFN Üç Boyutlu Dizilimi (Hamming ve Ark. 2009).

5.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'nun 29.12.2017 tarihli 62249 Karar numaralı onayı ile yapılmıştır. Çalışmamızda histokimyasal, immünohistokimyasal inceleme için gerekli malzemelerin alınması Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018-045 numaralı proje ile desteklenmiştir.

5.1.DENEY MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmış olup; toplam 45 adet 35 tanesi 3-4 haftalık dişi, 10 tanesi 3-4 haftalık erkek Balb/C fareler kullanılmıştır. Fareler 3 gün boyunca (adaptasyon için) herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletilmiştir. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar altında (22°C sıcaklık ve %30-70 nem, aydınlık karanlık döngüsü 12/12 saat) tutulmuştur. Kuru pellet yem ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlanmıştır.

Adaptasyon sürecinden sonra fareler gruplara ayrılmıştır. Toplamda üç grup oluşturulmuştur. Erkek farelerden 5 adeti çiftleştirme için kullanılmıştır.

1. Grup 1: Kontrol grubu (Sadece over ve testis dokuları alınmıştır [n:10; 5 adet dişi, 5 adet erkek])
2. Grup 2: Fertilizasyon grubu (Çiftleştirildikten sonra embriyonik 1. günde sakrifiye edilen [n:15])
3. Grup 3: İmplantasyon grubu (Çiftleştirildikten sonra embriyonik 4.5 günde sakrifiye edilen [n:15]).

5.2.VAGİNAL YAYMA VE BOYAMA PROTOKOLÜ

Dişi farelerin vaginasından papiks ile smear (vaginal sıvı) alınarak, her bir hayvandan alınan örnek hayvan numarasına göre etiketlenmiş ve numaralandırılmış

lama yayma yöntemi ile preparatlar yapılmıştır. Preparatlar %70'lik alkol (1.00983.2511, Merck Darmstadt, Almanya) ile 1 dakika tespit edilip ardından 30 saniye suda yıkanmıştır. Sonra önce 30 saniye hematoksilende (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) sonrasında yine su ile yıkandıktan sonra 30 saniye eozinde (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) tutulduktan sonra son kez su ile yıkanarak boya uzaklaştırılmıştır ve mikroskopta incelenmiştir. Mikroskopta pembe renkli çekirdeksiz hücrelerin görülmesi farenin östrusda olduğunu ve çiftleşmeye hazır olduğunu gösterir. Hücrelerin durumuna göre östrus evreleri değerlendirilerek östrus evresindeki dişi farelere süperovulasyon protokolü uygulanmıştır.

5.3.FAREDE ÖSTRUS SIKLUSU

İnsanda gözlenen ortalama 28 günlük östrus siklusunun aksine farelerde östrus siklusu 4-5 günde tamamlanmaktadır ve 4 faza ayrılmaktadır; proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D). Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat ve diöstrus fazı 52-60 saat sürmektedir.

Proöstrus fazında ve östrus fazının başlarında ovaryumda folikül gelişimi izlenirken, östrus fazının ortalarında ovulasyon gerçekleşir, metöstrus fazında korpus luteum oluşur, diöstrus fazı ise dinlenme fazıdır. Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarında meydana gelen siklik değişiklikler vajinal epitelde de histolojik değişikliklere neden olmaktadır. Vajinal smearda üç tip hücre görülmektedir; nükleuslu epitel hücreleri, kornifiye epitel hücreleri ve lökositler (Çoban 2016). Bu üç hücrenin smeardaki yoğunluğuna göre östrus siklusu fazlarının belirlenmesi sağlanmıştır.

5.4.SÜPEROVÜLASYON PROTOKOLÜ

Dişi fareler, intraperitoneal olarak 5 IU PMSG (F40021-2UG, Sigma, USA) enjeksiyonu ve 48 saat sonra intraperitoneal olarak 5 IU hCG (C1063-1VL, Sigma, USA) enjeksiyonu ile süperovüle edildi.

5.5.DENEYİN SONLANDIRILMASI İLE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Fareler, genel anestezi için intraperitoneal olarak 10 mg/kg ksilazin ve 75 mg/kg ketamin uygulamasından sonra servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek over ve testis doku örnekleri alınmıştır.

5.6. EMBRİYOLARIN TOPLANMASI

İkinci gruptaki 15 adet dişi fare, süperovülasyon sonrası bir gece erkek farelerle aynı kafes içerisinde (her kafeste 1 dişi–1 erkek fare olacak şekilde) tutuldular ve böylece hCG (C1063-1VL, sigma, USA) enjeksiyonundan yaklaşık 24 saat sonra vajinal tıkaç kontrolü yapıldı. Sonuç pozitif (+) olan fareler aynı gün sakrifiye edilerek oviduktları M2 medyumuna (M7167, Sigma, USA) içerisine alındı.

Stereo mikroskop (Olympus, SZX2) altında M2 medyumuna alınan oviduktun penset ile sabitlenmesi sağlanarak, ampulla bölgesi 27-gauge enjektör iğnesi ile zedelendi ve embriyoların ovidukt içerisinden dışarıya çıkmaları sağlandı. Medyumaya yayılan yeni fertilize pronükleer aşamadaki embriyolar paraformaldehit (PFA) içerisinde 30 dakika boyunca fiksasyona bırakıldılar. Ardından üç adet fosfat tampon solüsyonu (PBS) (P4417-100TAB, Sigma, USA) damlasından geçirilerek yıkandılar. Embriyoların medyumların birinden diğerine aktarılma işlemleri ucu inceltilmiş cam pastör pipetleri ve ağız pipeti kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından stereo mikroskop altında kısa sürede fotoğrafları çekilen embriyolar, +4° C’de olan buzdolabına kaldırılarak muhafaza edilmiştir.

Üçüncü grupta yer alan 15 dişi fare, ikinci gruptaki yöntemde uygulandığı gibi süperovülasyon sonrası bir gece erkek farelerle aynı kafes içerisinde (her kafeste 1 dişi–1 erkek fare olacak şekilde) tutuldular ve böylece hCG (C1063-1VL, Sigma, USA) enjeksiyonundan yaklaşık 24 saat sonra vajinal tıkaç kontrolü yapıldı. Sonuç pozitif (+) olan fareler 4,5. günde implantasyon bölgesi tayini için Chiago Blue boyaması yapıldı. Farelere %1 Chiago Blue boyası kuyruk veninden enjekte edilip 3 dk bekletilmiştir (Resim1). Ardından farenin uterusu alınıp implante olan bölgeler %10’luk formalin solüsyonu içerisinde 48 saat tespit edilmiştir. Tespit edilen dokular parafin takip işlemi yapıp, parafin bloklara gömülmüştür (Resim 1).



Resim 1. Fertilizasyondan sonra 4.5 günde uterusda implantasyon bölgeleri.

5.7.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

5.7.1.Dokuların Takibi, Parafin Gömme Ve Kesit Alma

Histopatolojik değerlendirme için; farelerin sakrifiye edilmesinin ardından over ve testis dokuları hızlı bir şekilde alınarak %10'luk formalin solüsyonu (2014P6, Türkiye) içerisinde 48 saat tespit işlemi yapılmıştır. Tespit işleminden sonra doku örneklerine rutin takip protokolü uygulanmıştır. Doku örnekleri, her bir doku bir bohça olacak şekilde etiketlenip, bir gece akarsuyun içerisinde tespit solüsyonunun uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Doku örnekleri derecesi giderek artan etil alkol (1.00983.2511, Merck, Almanya) serileri ile (%60-70-80-90-96) dehidratasyonları yapılmıştır, ardından iki değişim ksilen ile şeffaflaştırmaları sağlanıp, parafine emdirme aşamasından sonra parafine gömülmüştür (Tablo 2).

Elde edilen parafin bloklardan rotary mikrotomla (RM2245, Leica Microsystems, Almanya) polilizin ile kaplı lamalara 5 µm kalınlığında alınan kesitlere histokimyasal olarak hematoxilen ve eozin (Tablo 3) ile immunohistokimyasal olarak cGAS, STING, NLRP14, IRF3 ve IFN primer antikorları kullanılarak avidin-biotin-peroksidaz indirek immunohistokimyasal yöntemi uygulanmıştır.

Tablo 2. Parafin Takip Protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
<i>Tespit</i>	<i>%10'luk Formalin</i>	<i>48 saat</i>
<i>Dehidratasyon</i>	<i>%60 Alkol</i>	<i>½ saat</i>
	<i>%70 Alkol</i>	<i>½ saat</i>
	<i>%80 Alkol</i>	<i>½ saat</i>
	<i>%90 Alkol</i>	<i>½ saat</i>
	<i>%100Alkol</i>	<i>1 saat</i>
	<i>%100Alkol</i>	<i>1 saat</i>
<i>Şeffaflaştırma</i>	<i>Alkol–Ksilen</i>	<i>½ saat</i>
	<i>Ksilen</i>	<i>1 saat</i>
	<i>Ksilen</i>	<i>1 saat</i>
<i>İnfiltrasyon</i>	<i>Ksilen–Parafin</i>	<i>½ saat</i>
	<i>Parafin</i>	<i>1 saat</i>
	<i>Parafin</i>	<i>1 saat</i>
<i>Gömme</i>	<i>Parafin</i>	

5.7.2.Hematoksilen ve Eozin Boyaması

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica, Houston) aracılığı ile alınan 5 µm' lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C' lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Cambridgeshire) ile 3 dk. boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk. akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dk. akar su altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dk. eozin (01602E, Surgipath, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk. akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

<i>İŞLEM</i>	<i>KULLANILAN MADDE</i>	<i>SÜRE</i>
<i>Deparafinizasyon</i>	<i>56 °C Etüvde</i>	<i>1 Gece</i>
	<i>Ksilen</i>	<i>1 Saat</i>
<i>Rehidratasyon</i>	<i>%96 Alkol</i>	<i>2 Dakika</i>
	<i>%80 Alkol</i>	<i>2 Dakika</i>
	<i>%70 Alkol</i>	<i>2 Dakika</i>
	<i>%60 Alkol</i>	<i>2 Dakika</i>
<i>Yıkama</i>	<i>Akar su</i>	<i>5 Dakika</i>
<i>Boyama</i>	<i>Hematoksilen</i>	<i>3 Dakika</i>
<i>Yıkama</i>	<i>Akar su</i>	<i>5 Dakika</i>
<i>Diferansiyasyon</i>	<i>Asit-alkol</i>	<i>1 saniye</i>
<i>Yıkama</i>	<i>Akar su</i>	<i>5 Dakika</i>
<i>Boyama</i>	<i>Eozin</i>	<i>2 Dakika</i>
<i>Yıkama</i>	<i>Akar su</i>	<i>5 Dakika</i>
<i>Dehidratasyon</i>	<i>%80 Alkol</i>	<i>1 Dakika</i>
	<i>%96 Alkol</i>	<i>1 Dakika</i>
<i>Şeffaflaştırma</i>	<i>Ksilen</i>	<i>1 Saat</i>
<i>Kapama</i>	<i>Entellan</i>	

5.7.3.İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal boyama için kesitler 60° C’de 1 gece etüvde (FN400, Nüve, ANKARA) bekletildi ve ardından 30’ar dakika 2 değişim ksilen ile deparafinizasyon işlemi yapıldı. Kesitler rehidratasyon işlemi için artan derecelerde (%96 Alkol, %80 Alkol, %70 Alkol, %60) alkol (1.00983.2511, Merck, Almanya) içerisinde 2 şer dakika bekletildi ve ardından distile su içerisinde 10 dakika tutuldu. Kesit etrafi immünohistokimya kalemi (Z377821-1EA, Sigma, USA) ile çizildikten sonra 3 defa tampon solüsyonu ile (PBS) ile 5 dakika yıkandı ve 10 dakika %0,5’lik tripsin (TSS155 ScyTek Lab, USA) solüsyonunda 37°C bekletildi. Ardından tekrar 3 defa PBS ile 5’er dakika yıkandı. Kesitlere Hidrojen Peroksit (%3 oranda) (1.08597. 2500, MERCK, Almanya) ilave edildi ve 5 dakika inkübasyondan sonra PBS ile yıkandı. Kesitlere sekonder kit içerisindeki blok solüsyonu (SHP125, ScyTek Lab., USA) ile 1

saat inkübe edilen örnekler yıkama yapılmadan Anti-cGAS, Anti-STING, Anti-NLRP14, Anti-IRF3 ve Anti-IFN primer antikörleri ile 1 gece +4° C’de bekletildi (Tablo 5).

Negatif kontrol boyaması için örnekler primer antikor ilavesi yapılmadı. Ertesi gün PBS ile yıkanan örnekler anti-rabbit/Mouse biyotinlenmiş sekonder antikor (SHP125, ScyTek Lab., USA) ve streptavidin-HRP (SHP125, ScyTek Lab., USA) ilaveleri yapıldı. Her bir sekonder antikor 30’ar dk tutuldu ve arada PBS ile yıkama yapıldı. DAB (3, 3'-diaminobenzidine) ile boyanan kesitler 3 defa PBS ve 3 defa distile su ile yıkandıktan sonra artalan boyaması için Mayer’s hematoksilin (HMM999, ScyTek Lab USA) ile 1 dakika bekletildi. Tüm örnekler, yıkama işleminin ardından %80 alkol ve %96 alkolde 1’er dakika bekletildikten sonra ksilende 30 dakika tutuldu ve entellan (107961.0500, MERCK, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4. İndirekt İmmünohistokimya Prosedürü

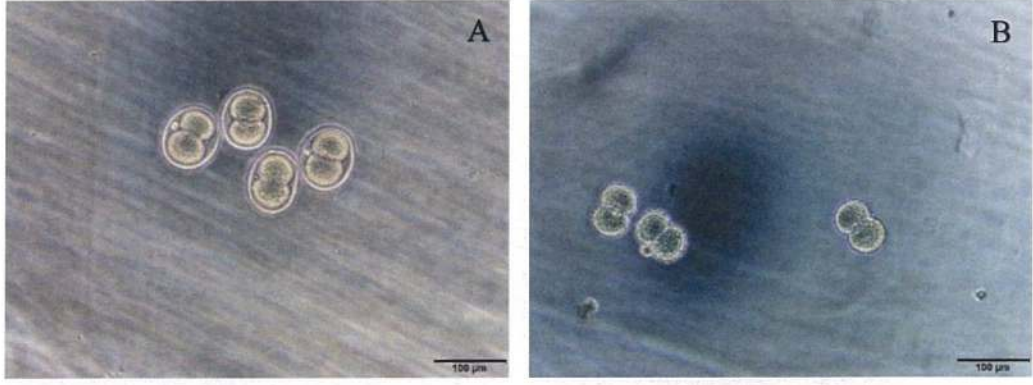
<i>İşlem</i>	<i>Kullanılan Madde</i>	<i>Süre</i>
<i>Deparafinizasyon</i>	<i>60° C Etüvde</i>	<i>1 gece</i>
	<i>Ksilen</i>	<i>1 saat</i>
	<i>Ksilen</i>	<i>1 saat</i>
<i>Rehidratasyon</i>	<i>%96'lık Etil Alkol</i>	<i>2 dakika</i>
	<i>%80'lik Etil Alkol</i>	<i>2 dakika</i>
	<i>%70'lik Etil Alkol</i>	<i>2 dakika</i>
	<i>%60'lik Etil Alkol</i>	<i>2 dakika</i>
<i>Yıkama</i>	<i>Distile su</i>	<i>10 dakika</i>
	<i>Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)</i>	<i>3x5 dakika</i>
<i>Permeablizasyon</i>	<i>%0.5'lik Tripsin Solüsyonu</i>	<i>37° C de 10 dakika</i>
<i>Yıkama</i>	<i>Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)</i>	<i>3x5 dakika</i>
<i>Endojen</i>	<i>%3'lük Hidrojen</i>	<i>5 dakika</i>
<i>Peroksidaz</i>	<i>Peroksit(H₂O₂)</i>	
<i>İnhibasyonu</i>		
<i>Yıkama</i>	<i>Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)</i>	<i>3x5 dakika</i>
	<i>Bloklama Solüsyonu</i>	<i>1 saat</i>
<i>İnkübasyon</i>	<i>Primer Antikor</i>	<i>18 saat +4°C'de</i>
<i>Yıkama</i>	<i>Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)</i>	<i>3x5 dakika</i>
	<i>Sekonder Antikor (Biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz)</i>	<i>30 dakika</i>
<i>Yıkama</i>	<i>Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)</i>	<i>3x5 dakika</i>
<i>İmmünreaktivite</i>	<i>Diaminobenzidine (DAB)</i>	<i>5 dakika</i>
<i>Artalan boyama</i>	<i>Mayer's hematoksilen</i>	
<i>Dehidratasyon</i>	<i>%80'lik Etil Alkol</i>	<i>1 dakika</i>
	<i>%96'lık Etil Alkol</i>	<i>1 dakika</i>
<i>Şeffaflaştırma</i>	<i>Ksilen</i>	<i>1 saat</i>
<i>Kapama</i>	<i>Entellan</i>	

Tablo 5. İmmunohistokimya için kullanılan primer antikorlar

<i>Primer Antikor</i>	<i>Kat No /Marka/Ülke</i>	<i>Dilüsyon</i>
<i>Anti-CGAS</i> (<i>Mouse Monoclonal</i>)	<i>orb2965, Biorbyt, United States</i>	<i>1/200</i>
<i>Anti-STING</i> (<i>Mouse Monoclonal</i>)	<i>19851, AP/proteintech-1, United Kingdom</i>	<i>1/200</i>
<i>Anti-NLRP14</i> (<i>Mouse Monoclonal</i>)	<i>sc-398068, Santa Cruz, USA</i>	<i>1/50</i>
<i>Anti-IRF3</i> (<i>Mouse Monoclonal</i>)	<i>sc-33641, Santa Cruz, USA</i>	<i>1/100</i>
<i>Anti-IFN</i> (<i>Mouse Monoclonal</i>)	<i>STJ93645, SYJOHN, USA</i>	<i>1/200</i>

5.7.4.İmmünfloresan Boyama

Toplanan bir günlük embriyolar BSA'lı PBS (Bovine Serum Albumins- Fosfat Tampon Solüsyonu (ALB001.25, Bioshop, USA) içerisinde 2 kez 30 dk süre ile yıkandı. Ardından %2'lik Pronaz (10165921, Sigma-Aldrich Almanya) içerisinde zona pellusidanın ayrılması inverted mikroskopda (Olympus, SZX2) incelendi (Resim 2). Triton X100 (9002-93-1, Sigma-Aldrich, Almanya) içerisinde 15 dakika bekletildi. BSA'lı PBS ile 3'er defa 10 dk yıkama işlemi yapıldı. Bloking solüsyonu içerisinde 1 gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün Anti-cGAS, Anti-STING, Anti-NLRP14, Anti-IRF3 ve Anti-IFN primer antikorları ilave edilerek 36 saat +4°C'de bekletildi (Tablo 6). BSA'lı PBS ile 3'er defa 10 dk yıkama işlemi yapıldı. Karanlık ortamda 1/200 oranında hazırlanan sekonder antikor (sc-516140, Santa Cruz, USA) içerisinde 1 gece +4°C'de bekletildi. Yine karanlık ortamda BSA'lı PBS ile 3'er defa 10 dk yıkama işlemi yapıldı. 1/10 oranında hazırlanmış olan DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) (sc-3598, Sigma-Aldrich Almanya) solüsyonu içerisinde 45 dakika çekirdek boyaması yapıldı. BSA'lı PBS ile 3'er defa 10 dk yıkama işlemi yapıldı. Floresan ataçmanlı Inverted mikroskop Olympus, SZX2 ile embriyoların fotoğrafları çekildi.



Resim 2: İki Hücreli Embriyolar, Pronase Uygulaması Öncesi (A) ve Sonrasındaki (B) Görüntüsü (Ölçek: 100 µm).

Tablo 6: İmmunflorasan İçin Kullanılan Primer Antikorlar

<i>Primer Antikor</i>	<i>Kat No /Marka/Ülke</i>	<i>Dilüsyon</i>
<i>Anti-CGAS</i> (Mouse Monoclonal)	<i>orb2965, Biorbyt, United States</i>	<i>1/25</i>
<i>Anti-STING</i> (Mouse Monoclonal)	<i>19851, AP/proteintech -1, United Kingdom</i>	<i>1/25</i>
<i>Anti-NLRP14</i> (Mouse Monoclonal)	<i>sc-398068, Santa Cruz, USA</i>	<i>1/25</i>
<i>Anti-IRF3</i> (Mouse Monoclonal)	<i>sc-33641, Santa Cruz, USA</i>	<i>1/25</i>
<i>Anti-IFN</i> (Mouse Monoclonal)	<i>STJ93645, SYJOHN, USA</i>	<i>1/25</i>

5.8. İMMUNOFLORESAN GÖRÜNTÜLERİN IMAGE J ANALİZİ

Immunofloresan boyamaları yapılan oositlerin gruplar arasındaki yoğunluk farkının kantitatif olarak ölçülmesi için Image J (1.50i, National Institutes of Health, USA) görüntü analiz yöntemi kullanıldı. Analiz için her gruptan X20 büyüklükteki 10 embriyonun tiff formatındaki görüntüleri kullanıldı. Görüntüler Image J programında Type sekmesi içindeki Threshold kısmı seçildi. Threshold, her bir embriyonun en iyi tanımlayan bir seviye için manuel olarak ayarlandı. Oval veya Freehand simgesi kullanarak taslak çizildi. Seviye belirlendikten sonra, siyah beyaz

bir görüntü oluşturmak için Apply'a tıklandı ve bunu takiben Analyze sekmesi altında Measure (Cmd +M) kısmına tıklanarak embriyoların yoğunlukları ölçüldü.

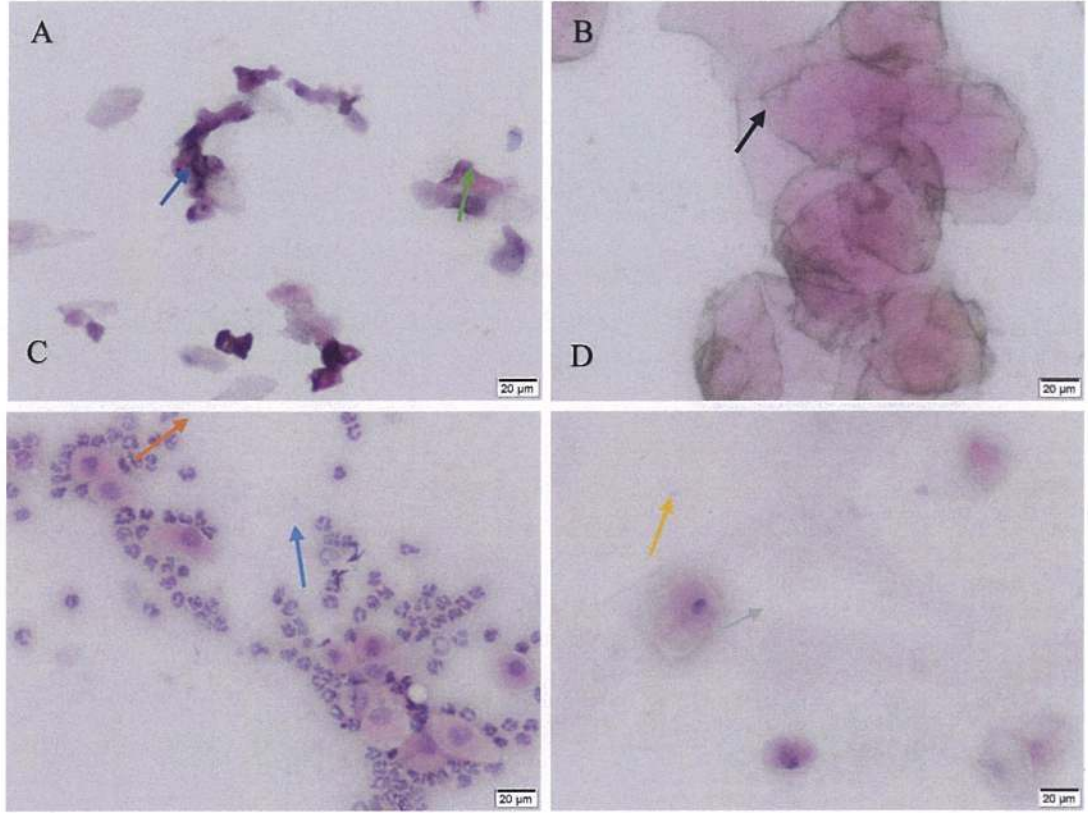
Ölçüm sonunda çıkan değerlerin Düzelmış Total Hücre Floresan Değeri (CTCF) değeri hesaplandı (Rinaldi ve ark.2018; Potapova ve ark. 2011). Hesaplama için; 'Corrected Integrated Density (CTCF) = Integrated Density (Area of selected cell x Mean fluorescence of background readings)' formülü kullanıldı (Potapova ve ark. 2011).

6.BULGULAR

6.1. KONTROL GRUBU HİSTOKİMYA BULGULARI

6.1.1.Vaginal Yayma Bulguları

Farelerden elde edilen vaginal yayma preparatlarının hematoxilen ve eozin ile boyanarak incelenmesi sonucunda keratinleşmenin olmadığı intermedier hücrelerin predominant ve parabazal hücrelerin nadir olduğu ve lökositlerin gözlenmediği örnekler Proöstrus grubu (Resim A), keratinleşme ile grup oluşturan süperfisyal hücrelerin hakim olduğu örnekler Östrus grubu (Resim B), az sayıda keratinleşmenin olduğu süperfisyal hücreler ile lökositin fazla olduğu örnekler Metöstrus grubu (Resim C), az sayıda parabazal ve intermediyer hücreler ile çok sayıda lökositin olduğu örnekler Diöstrus grubu (Resim D) olarak tanımlandı (Resim 3).



Resim 3. Proöstrus(A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait vaginal yayma örneklerinin HE boyamaları, Koyu Mavi Ok: İntermediyer Hücre, Yeşil Ok: Süperfisyal hücre, Siyah Ok: Süperfisyal hücre, Turuncu Ok: Parabazal hücre, Açık Mavi Ok: Lökosit, Sarı Ok: Parabazal hücre göstermektedir (Ölçek:20µm).

6.1.2.Kontrol Grubu He Bulguları

6.1.2.1.Proöstrus grubu ovaryum örneklerinin HE bulguları

Bu gruba ait farelerden elde edilen ovaryum kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, dışta tek sıralı kübik germinal epitel, altında sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea izlendi. Ovaryumun korteksinde primordiyal, primer, sekonder, Graaf follikülleri ve içte gevşek bağ dokusu yapısında medulla normal histolojik yapıda görüldü. Oosit etrafında zona pellusida, granüloza hücrelerinin aralarında antrumun gelişmesi ile sekonder ve Graaf folliküllerinin oluştuğu,

folliküllerin bağ dokusuna komşu kısmında sıkı bağ dokusu yapısında teka eksterna ve iç kısmında kan damarlarından zengin teka interna yapısı gözlemlendi (Resim 4A).

6.1.2.2.Östrus grubu ovaryum örneklerinin he bulguları

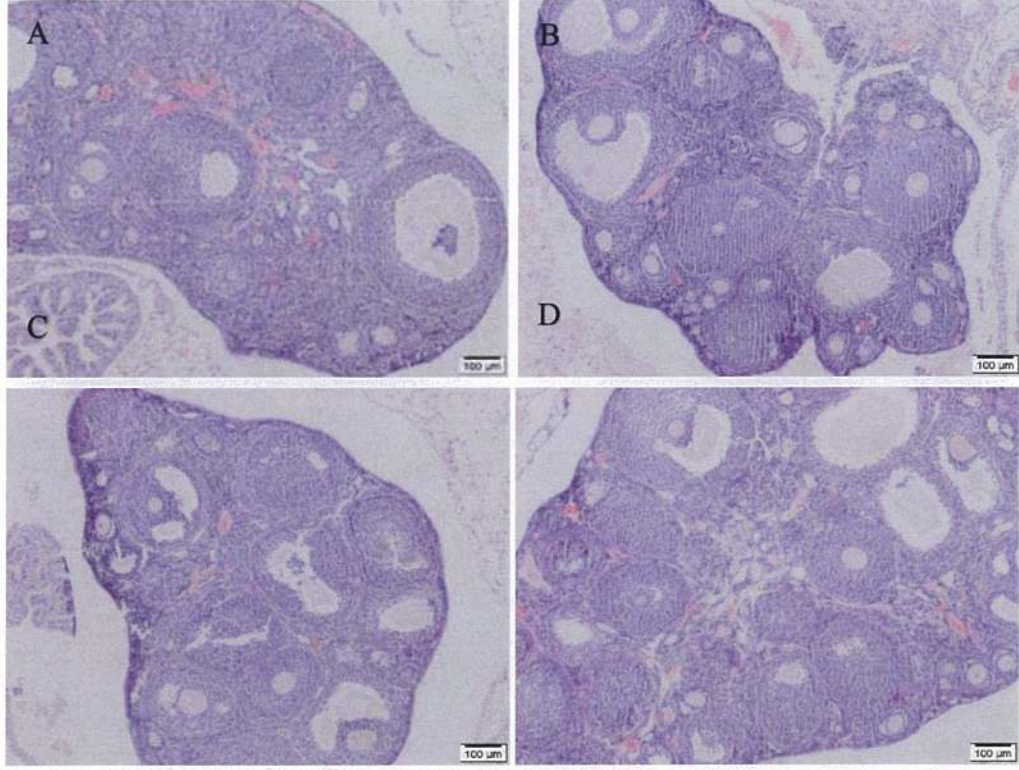
Bu gruba ait farelerden elde edilen ovaryum kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, proöstrus döneminde tanımlanan bulgulara ek olarak, ovulasyonun gerçekleşmesine bağlı olarak Graaf follikülleri ve korpus luteum yapılarında artış izlendi. Büyüyen oositin etrafında zona pellusida yapısı, granüloza hücrelerinin oositi çevrelemesiyle oluşan korona radyata hücreleri, granüloza hücreleri ile devam eden kumulus ooforus yapısı ve gelişmekte olan büyük bir antrum izlendi. Teka internanın geniş kan damarları içerdiği ve teka eksternanın sıkı, fibröz bağ dokusu yapısında olduğu izlendi (Resim 4B).

6.1.2.3.Metöstrus grubu ovaryum örneklerinin he bulguları

Bu gruba ait farelerden elde edilen ovaryum kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, ovaryum örneklerinde korpus luteum yapılarında belirgin artış ile birlikte gelişmekte olan primer ve sekonder follikül yapıları ve az sayıda Graaf follikülü izlendi (Resim 4C).

6.1.2.4. Diöstrus grubu ovaryum örneklerinin he bulguları /histokimyasal değerlendirilmesi

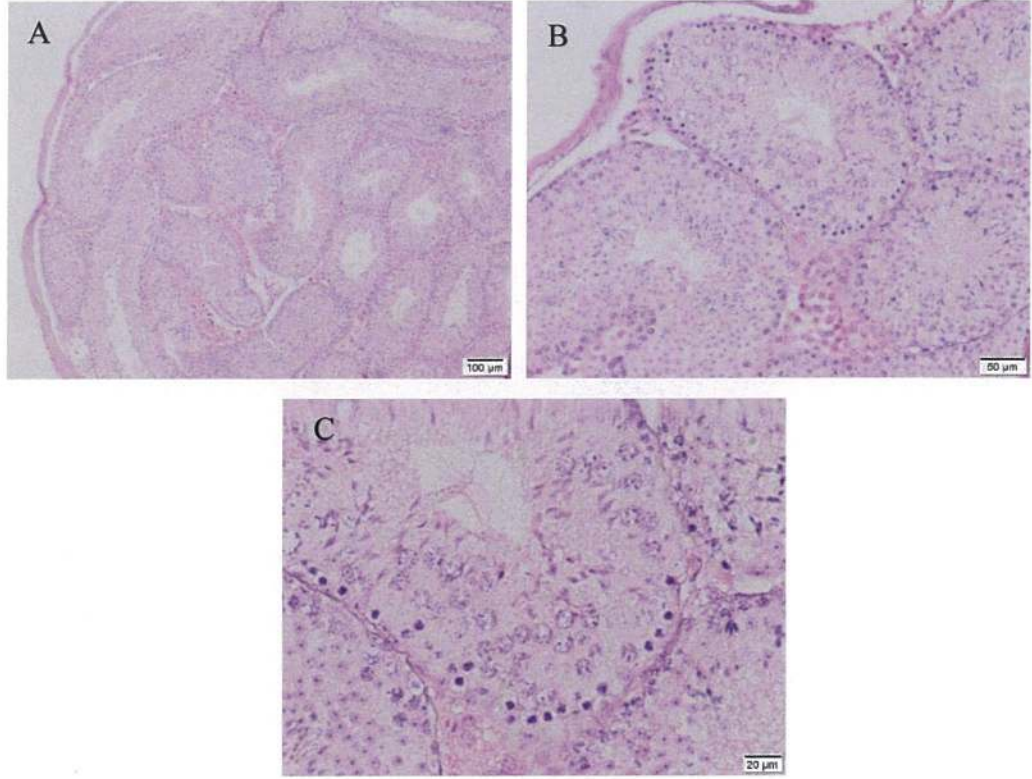
Bu gruba ait farelerden elde edilen ovaryum kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, ovaryum örneklerinde korpus luteumların gerilediği ve primer ve sekonder follikül yapılarında artış izlendi. Gelişmekte olan primer ve sekonder folliküller ve Graaf follikülleri izlendi (Resim 4D).



Resim 4. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum dokularının HE boyamaları (Ölçek:100µm).

6.1.2.5. Testis örneklerinin he bulguları

Testis kesitlerinin HE boyaması değerlendirildiğinde dışta sıkı bağ dokusundan oluşmuş tunika albuginea izlendi. Seminifer tübüllerde sertoli hücreleri, spermatogonyumlar, primer spermatositler ve spermatidlerin bulunduğu gözlemlendi. Seminifer tübüller arasında interstisyel bağ dokuda Leydig hücreleri, kan damarları ve gevşek bağ dokusu saptandı (Resim 5A, 5B, C).



Resim 5. Testis (A, B, C) Örneklerinin HE Boyaması (Ölçek: A:100µm, B:50 µm, C: 20 µm).

6.2. KONTROL GRUBU İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI

6.2.1. Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının Cgas İmmunoreaktivite Bulguları

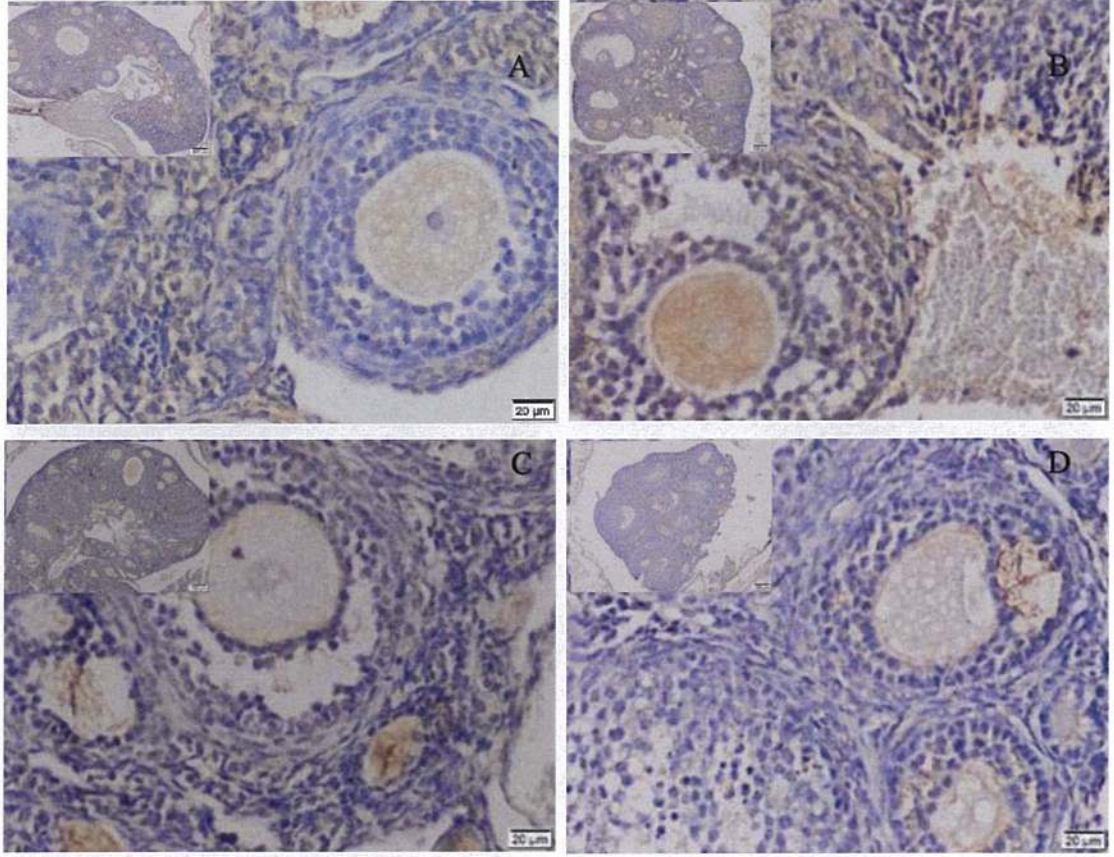
cGAS immunoreaktivitesi proöstrus evresinde primordiyal, primer ve sekonder foliküllerde bulunan oositlerde orta/şiddetli (++/+++) olarak, graaf folikülünde ise şiddetli (+++) olarak gözlendi. Primer folikülde granuloza hücrelerinde zayıf/orta (+/++) iken sekonder ve graaf foliküllerinde ise şiddetli (+++) cGAS immunoreaktivitesi izlendi. Stromal hücreler primordiyal folikülde zayıf (+) cGAS immunoreaktivitesi gösterirken primer folikülde zayıf/orta (+/++), sekonder folikülde teka internada orta/şiddetli (++/++), teka eksternada zayıf/orta (+/++), graaf folikülünde teka internada orta (++), teka eksternada zayıf/orta (+/++) cGAS immunoreaktivitesi saptandı. Graaf folikülünde kumulus ooforus ve korona radiata hücrelerinde cGAS immunoreaktivitesi şiddetli (+++) olarak izlendi (Resim 6A).

Östrus evresinde cGAS immunoreaktivitesi primordiyal folikülün oositinde orta (++) , primer, sekonder ve graaf folikülün oositinde şiddetli (+++) pozitif olduğu izlendi. Zona pellusida da cGAS immunoreaktivitesi primordiyal folikülde zayıf (+), primer ve sekonder folikülde şiddetli (+++), graaf folikülünde ise orta (++) düzeyde saptandı. Granuloza hücrelerinin cGAS immunoreaktivitesi primordiyal ve primer folikülde zayıf/orta (+/++), sekonder ve graaf folikünde ise orta (++) düzeyde gözlemlendi. Stromal hücreler primordiyal ve primer folikülde zayıf (+), sekonder folikülde teka folikülü zayıf/orta (+/++), graaf folikülünde ise orta (++) düzeyde saptandı. Östrus evresinde Graaf folikülünde kumulus ooforus ve korona radiata hücrelerinde cGAS immunoreaktivitesi zayıf/orta (+/++) olarak izlendi (Resim 6B).

Metöstrus evresinde cGAS immunoreaktivitesi primordiyal folikülün oositinde şiddetli (+++), primer, sekonder ve graaf folikülün oositinde zayıf (+) pozitif olduğu izlendi. Zona pellusida da cGAS immunoreaktivitesi primordiyal ve primer folikülde orta (++) , sekonder ve graaf folikülünde ise zayıf (+) düzeyde saptandı. Granuloza hücrelerinin cGAS immunoreaktivitesi primordiyal, primer ve sekonder folikülde zayıf (+) olarak izlenirken graaf folikünde immunoreaktivite saptanmadı.

Stromal hücreler primordiyal, primer ve sekonder folikülde zayıf (+) cGAS immunoreaktivitesi gösterirken, graaf folikülünde ise immunoreaktivite saptanmadı. Metöstrus evresinde Graaf folikülünde kumulus ooforus ve korona radiata hücrelerinde cGAS immunoreaktivitesi zayıf (+) olarak izlendi (Resim 6C).

Diöstrus evresinde cGAS immunoreaktivitesi primordiyal ve graaf folikülün oositinde saptanmaz iken, primer ve sekonder folikülün oositinde zayıf (+) pozitif olduğu izlendi. Zona pellusida da cGAS immunoreaktivitesi primordiyal ve graaf folikülünde saptanmaz iken, primer ve sekonder folikülde ise zayıf (+) düzeyde saptandı. Granuloza ve stromal hücrelerde cGAS immunoreaktivitesi saptanmadı. Diöstrus evresinde Graaf folikülünde kumulus ooforus ve korona radiata hücrelerinde cGAS immunoreaktivitesi saptanmadı (Resim 6D).



Resim 6. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin cGAS immunohistokimyasal analiz görüntüleri (Ölçek: A-D: 20µm, küçük resimler: 100 µm).

Tablo 7: Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) Ve Diöstrus (D) Evrelerine Ait Ovaryum Doku Örneklerinin Cgas İmmunohistokimyasal Analiz Sonuçları.

Cgas	Primordiyal Folikül				Primer Folikül				Sekonder Folikül				Graaf Folikül			
	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs
Oosit	+++	++	+++	-	+++	+++	+	+	+++	+++	+	+	+++	+++	+	-
Zona	+/++	+	++	-	+/++	+++	++	+	+/++	+++	+	+	++	++	+	-
Pellusida																
Granuloza	-/+	+/++	+	-	+/++	+/++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	-	-
Hücreleri																
Stromal	+	+	+	-	+/++	+	+	-	+++	+/++	+	-	+/++	++	-	-
Hücreler																
Antrum									+++	+	+	-	+++	+/+	+	-
Kumulus													+++	+/+	+	-
Ooforus																
Korona													+++	+/+	+	-
Radiata																
Teka									+++	+++	+	-	++	+/+	-	-
İnterna									++	+	+	-	++	+/+	-	-
Teka									++	+	+	-	+/+	+	-	-
eksterna																

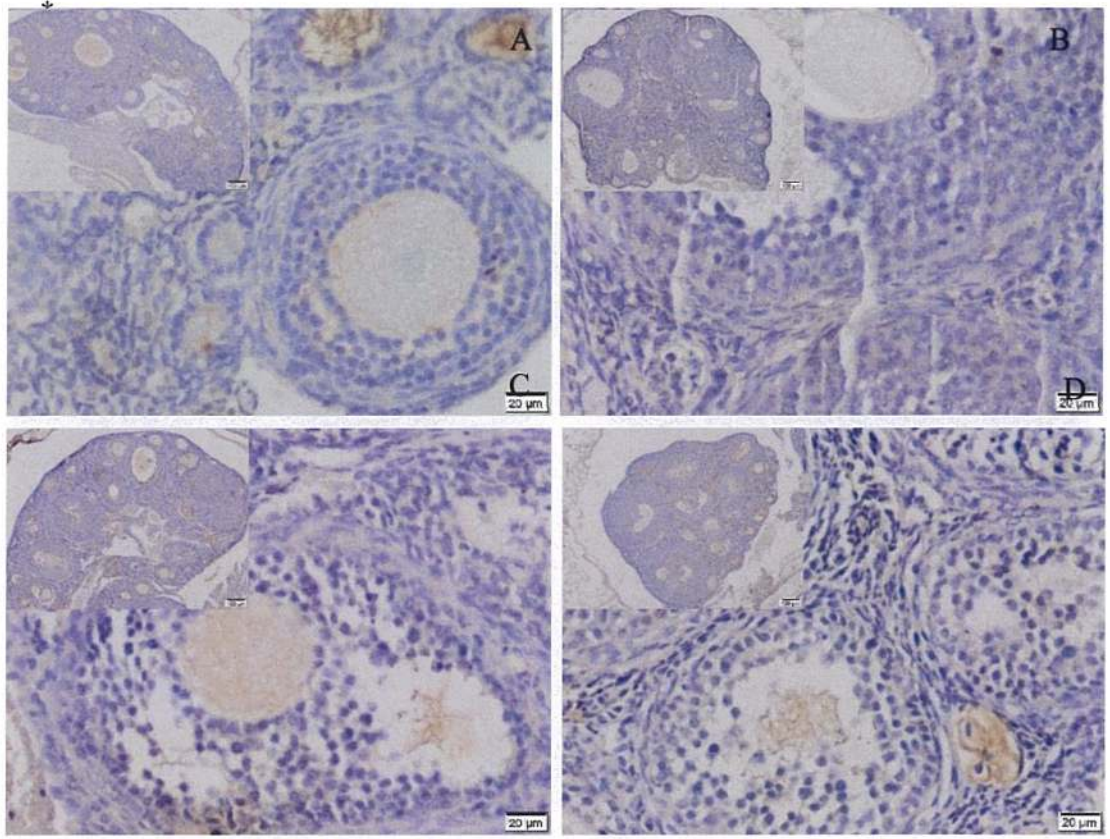
6.2.2.Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının STING İmmunoreaktivite Bulguları

STING immunoreaktivitesi proöstrus evresinde primordiyal ve primer folikülde saptanmaz iken, sekonder ve graaf foliküllerinde bulunan oositlerde zayıf (+) olarak gözlemlendi. Zona pellusida da STING immunoreaktivitesi sekonder ve graaf folikülünde zayıf (+) düzeyde saptandı. Sekonder folikülde granuloza hücrelerinde STING immunoreaktivitesi zayıf (+) iken graaf folikülünde ise zayıf/orta (+/++) düzeyinde izlendi. Stromal hücrelerin tüm foliküllerde STING immunoreaktiviteleri negatifti. Graaf folikülünde kumulus ooforus ve korona radiata hücrelerinde STING immunoreaktivitesi zayıf (+) olarak izlendi (Resim 7A).

Östrus evresinde STING immunoreaktivitesi primordiyal folikülde saptanmaz iken, primer folikülde oositte zayıf/orta (+/++), sekonder ve graaf foliküllerinde bulunan oositlerde orta (++) düzeyde gözlemlendi (Resim 7B).

Metöstrus evresinde STING immunoreaktivitesi, primordiyal folikülde saptanmaz iken, primer, sekonder ve graaf folikülünde oositte zayıf (+) düzeyde izlendi. Zona pellusida da STING immunoreaktivitesi sadece primer folikülde zayıf (+) düzeyde izlendi. Graaf folikülünde bulunan granuloza hücrelerinde zayıf (+) düzeyde STING immunoreaktivitesi gözlemlendi. Graaf folikülünde kumulus ooforus ve korona radiata hücrelerinde STING immunoreaktivitesi zayıf (+) olarak izlendi (Resim 7C).

Diöstrus evresinde STING immunoreaktivitesi, primordiyal folikülde saptanmaz iken, primer ve graaf folikülünde oositte zayıf (+), sekonder folikülde oositte orta (++) düzeyde izlendi. Zona pellusida da STING immunoreaktivitesi sekonder folikülde şiddetli (+++), graaf folikülünde zayıf (+) düzeyde izlendi. Graaf folikülünde bulunan granuloza hücrelerinde, teka foliküli hücrelerinde ve kumulus ooforus ile korona radiata hücrelerinde zayıf (+) düzeyde STING immunoreaktivitesi gözlemlendi (Resim 7D).



Resim 7. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) Evrelerine Ait Ovaryum Doku Örneklerinin STING İmmunohistokimyasal Analiz Görüntüleri (Ölçek: A-D: 20µm, Küçük Resimler: 100 µm).

Tablo 8: Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) Ve Diöstrus (D) Evrelerine Ait Ovaryum Doku Örneklerinin Sting İmmunohistokimyasal Analiz Sonuçları.

Sting	Primordiyal Folikül				Primer Folikül				Sekonder Folikül				Graaf Folikül			
	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs
Oosit	-	-	-	-	-	+/++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+
Zona	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	+	-	-	+
Pellüsida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Granuloza	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+/++	-	+	+
Hücreleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stromal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hücreler	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	+++	-	++	++
Antrum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Kumulus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ooforus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Korona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Radiata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Teka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
İnterna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Teka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
eksterna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

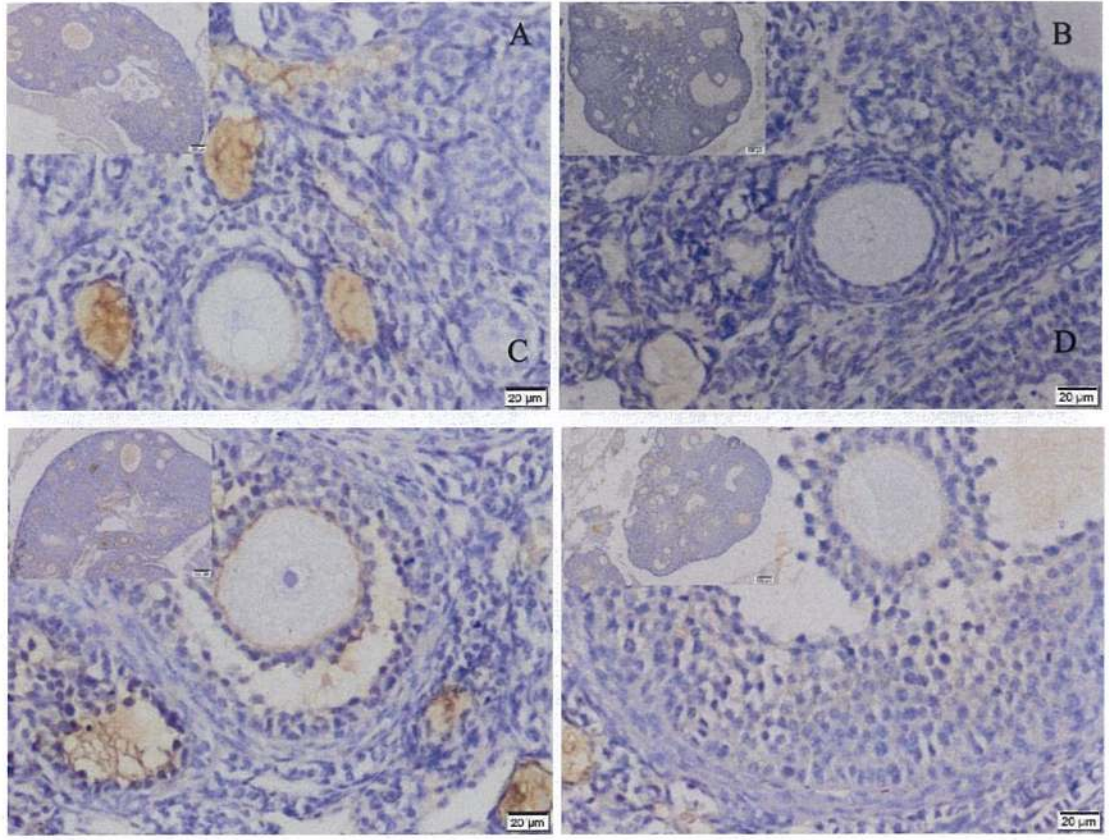
6.2.3.Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının NLRP14 İmmunoreaktivite Bulguları

NLRP14 immunoreaktivitesi proöstrus evresinde primordiyal ve primer folikülde saptanmaz iken, sekonder folikülde oositde negatif, zona pellusida ve granuloza hücrelerinde zayıf (+) düzeyde izlendi. Graaf folikülünde bulunan oosit, zona pellusida, granuloza hücrelerinde ve kumulus ooforus ile korona radiatada zayıf (+) düzeyde gözlendi (Resim 8A).

Östrus evresinde NLRP14 immunoreaktivitesi primordiyal, primer ve graaf foliküllerinde saptanmaz iken sekonder folikülde oosit ve zona pellusidada zayıf (+) düzeyde izlendi (Resim 8B).

Metöstrus evresinde NLRP14 immunoreaktivitesi primordiyal folikülde izlenmez iken, primer folikülde sadece zona pellusidada zayıf (+) düzeyde saptandı. Sekonder folikülde zona pellusidada şiddetli (+++) ve granuloza hücrelerinde orta (++) düzeyde gözlendi. Graaf folikülünde oositte, teka hücrelerinde ve kumulus ooforus ile korona radiatada zayıf (+), zona pellusida ve granuloza hücrelerinde orta (++) düzeyde izlendi (Resim 8C).

NLRP14 immunoreaktivitesi diöstrus evresinde primordiyal folikülde gözlenmez iken primer folikülde zona pellusida da zayıf/orta (+/++), granuloza hücrelerinde zayıf (+) düzeyde saptandı. Sekonder folikülde oositte ve granuloza hücrelerinde zayıf (+), zona pellusida da orta (++) düzeyde izlendi. Graaf folikülünde oositte saptanmaz iken zona pellusida, granuloza hücrelerinde ve kumulus ooforus ile korona radiatada NLRP14 immunoreaktivitesi zayıf (+) düzeyde gözlendi (Resim 8D).



Resim 8. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin NLRP14 immunohistokimyasal analiz görüntüleri (Ölçek: A-D: 20µm, küçük resimler: 100 µm).

Tablo 9: Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) Ve Diöstrus (D) Evrelerine Ait Ovaryum Doku Örneklerinin NLRP14 İmmunohistokimyasal Analiz Sonuçları

Nlrp14	Primordiyal Folikül				Primer Folikül				Sekonder Folikül				Graaf Folikül			
	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs
Oosit	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Zona	-	-	-	-	-	-	+	++/+	+	+	++	++	+	-	++	+
Pellüsida	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	+	+	-	++	+
Granüloza Hücreleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stromal Hücreler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Antrum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	++
Kumulus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Ooforus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Korona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Radiata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Teka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
İnterna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Teka eksterna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

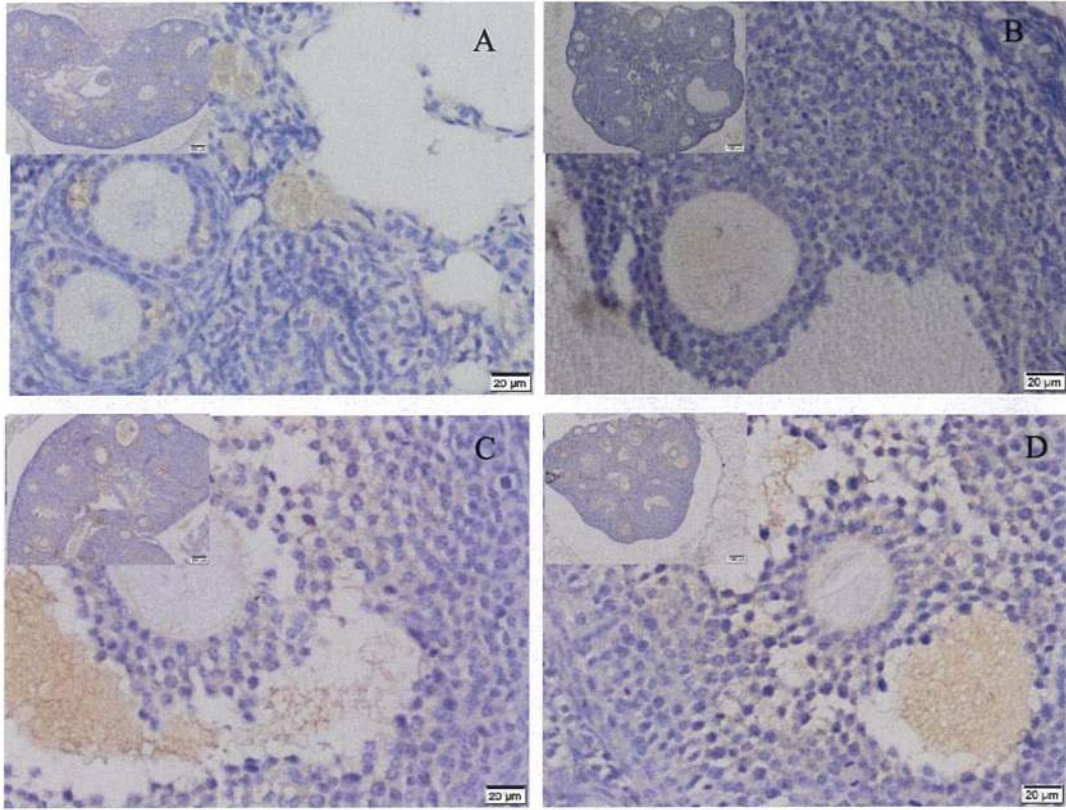
6.2.4.Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının IRF3 İmmunoreaktivite Bulguları

IRF3 immunreaktivitesi proöstrus evresinde primordiyal ve primer foliküllerde immunoreaktivite izlenmedi. Sekonder ve graaf foliküllerde bulunan oositlerde immunoreaktivite gözlenmez iken zona pellusidada sekonder follikülde zayıf (+) ve graaf follikülünde ise şiddetli (+++) IRF3 immunreaktivitesi saptandı. Granüloza hücrelerinde sekonder ve graaf foliküllerinde zayıf (+) düzeyde izlendi. Stromal hücreler sadece graaf folikülünde zayıf (+) düzeyde IRF3 immunreaktivitesi gözlemlendi. Kumulus ooforus ve korona radiata, graaf folikülünde zayıf (+) düzeyde saptandı (Resim 9A).

IRF3 immunreaktivitesi östrus evresinde primordiyal, primer, sekonder ve graaf foliküllerinde saptanmadı (Resim 9B).

Metöstrus evresinde primordiyal folikülde IRF3 immunreaktivitesi gözlenmedi. Oositlerde, primer ve sekonder folliküllerde IRF3 immunreaktivitesi izlenmez iken, graaf folikülünde ise orta (++) düzeyde immunoreaktivite izlenmiştir. Zona pellusidada primer, sekonder ve graaf foliküllerinde şiddetli (+++) IRF3 immunreaktivitesi gözlemlendi. Granüloza hücrelerinde primer folikülde zayıf (+), sekonder ve graaf foliküllerinde ise orta (++) düzeyde immunoreaktivite saptandı. Stromal hücrelerde primer foliküllerde immunoreaktivite izlenmez iken, sekonder ve graaf foliküllerinde zayıf (+) düzeyde gözlemlendi. Korona radiata ve kumulus ooforusda graaf folikülünde orta (++) düzeyde IRF3 immunreaktivitesi saptandı (Resim 9C).

Diöstrus evresinde IRF3 immunreaktivitesi primordiyal folikülde gözlenmedi. Primer ve sekonder foliküllerde bulunan oositlerde zayıf (+) düzeyde izlenir iken graaf folikülünde immunoreaktivite saptanmadı. Zona pellusidada primer, sekonder ve graaf foliküllerinde IRF3 immunreaktivitesi orta (++) düzeyde gözlemlendi. Granüloza hücrelerinde primer folikülde immunoreaktivite gözlenmez iken, sekonder foliküllerde zayıf (+), graaf folikülünde ise orta (++) düzeyde izlendi. Stromal hücrelerde graaf folikülünde zayıf (+) düzeyde IRF3 immunreaktivitesi saptandı. Graaf folikülünde kumulus ooforus ve korona radiatada IRF3 immunreaktivitesi zayıf (+) düzeyde izlendi (Resim 9D).



Resim 9. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin IRF3 immunohistokimyasal analiz görüntüleri (Ölçek: A-D: 20µm, küçük resimler: 100 µm).

Tablo 10: Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovarium doku örneklerinin IRF3 immunohistokimyasal analiz sonuçları.

IrF3	Primordiyal Folikül					Primer Folikül					Sekonder Folikül					Graaf Folikül				
	proöstrüs	östrüs	metaöstrüs	diöstrüs	proöstrüs	diöstrüs	metaöstrüs	östrüs	proöstrüs	diöstrüs	metaöstrüs	östrüs	proöstrüs	diöstrüs	metaöstrüs	östrüs	proöstrüs	diöstrüs	metaöstrüs	östrüs
Oosit	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	++	-
Zona	-	-	-	-	-	++	+++	-	+	++	-	+++	-	++	+++	-	+++	++	++	+
Pellusida	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	++	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Granuloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hücreleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Stromal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hücreler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	-	+	++	-	++	+	++	+
Antrum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kumulus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Ooforus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Korona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Radiata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Teka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
İnterna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Teka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
eksterna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

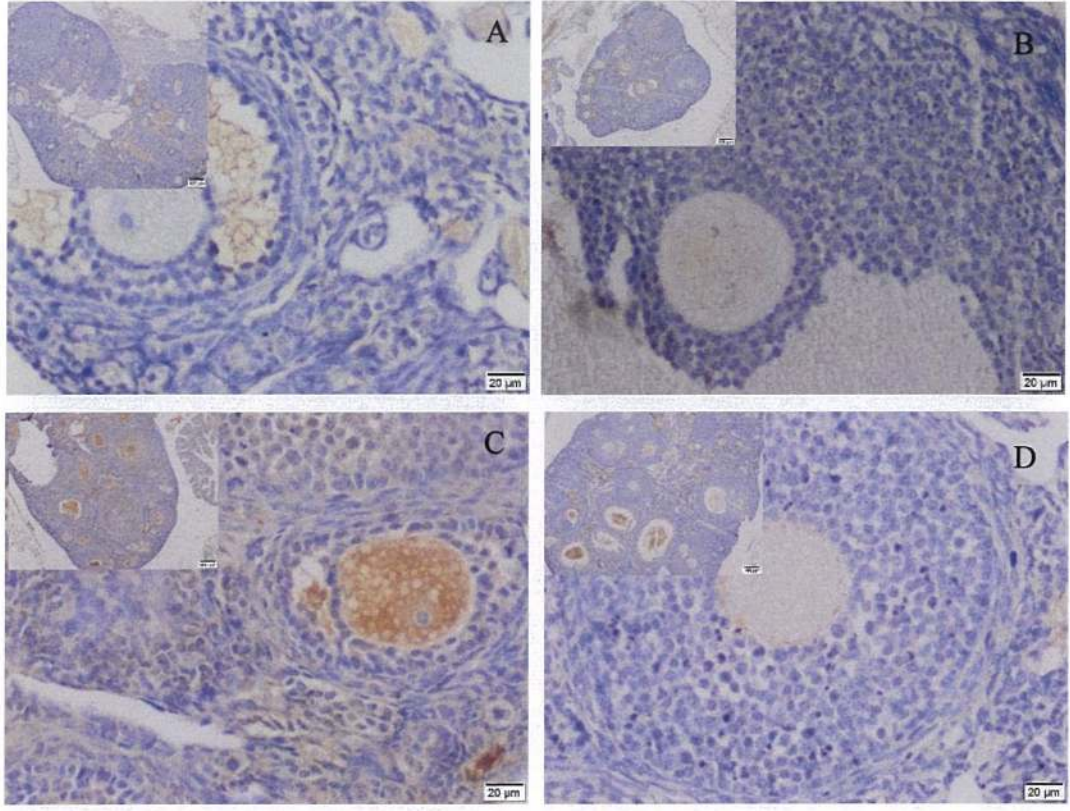
6.2.5.Kontrol Grubu Ovaryum Dokularının IFN İmmunoreaktivite Bulguları

Proöstrus evresinde IFN immunoreaktivitesi primordiyal, primer ve sekonder foliküllerde izlenmedi. Graaf folikülünde zona pellusidada, granuloza ve stromal hücrelerde, kumulus ooforus ve korona radiatada zayıf (+) düzeyde IFN immunoreaktivitesi gözlemlendi (Resim 10A).

Östrus evresinde IFN immunoreaktivitesi primordiyal, primer ve sekonder foliküllerde izlenmedi. Graaf folikülünde ise sadece oositde zayıf (+) düzeyde IFN immunoreaktivitesi gözlemlendi (Resim 10B).

Metöstrus evresinde IFN immunoreaktivitesi primordiyal folikülde saptanmadı. Primer, sekonder ve graaf foliküllerinde oositde zayıf (+) düzeyde immunoreaktivite gözlemlendi. Zona pellusidada primer folikülde orta (++) , sekonder ve graaf folikülünde şiddetli (+++) immunoreaktivite izlendi. Granüloza hücrelerinde primer folikülde zayıf (+), sekonder ve graaf foliküllerinde orta (++) düzeyde immunoreaktivite gözlemlendi. Teka hücrelerinde sekonder ve graaf foliküllerinde zayıf (+) düzeyde IFN immunoreaktivitesi saptandı. Kumulus ooforus ve korona radiata hücrelerinde, graaf folikülünde orta (++) düzeyde IFN immunoreaktivitesi izlendi (Resim 10C).

Diöstrus evresinde IFN immunoreaktivitesi primordiyal folikülde saptanmadı. Primer, sekonder ve graaf foliküllerinde oositde IFN immunoreaktivitesi zayıf (+) düzeyde izlendi. Zona pellusidada, primer folikülde orta (++) , sekonder ve graaf foliküllerinde şiddetli (+++) immunoreaktivite gözlemlendi. Granüloza hücrelerinde, primer, sekonder ve graaf foliküllerinde zayıf (+) düzeyde IFN immunoreaktivitesi izlendi. Teka hücrelerinde primer ve sekonder foliküllerinde zayıf (+) düzeyde IFN immunoreaktivitesi saptandı. Korona radiata ve kumulus ooforus hücrelerinde, graaf foliküllerinde zayıf (+) düzeyde IFN immunoreaktivitesi gözlemlendi (Resim 10D).



Resim 10. Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) ve Diöstrus (D) evrelerine ait ovaryum doku örneklerinin IFN immunohistokimyasal analiz görüntüleri (Ölçek: A-D: 20µm, küçük resimler: 100 µm).

Tablo 11: Proöstrus (A), Östrus (B), Metöstrus (C) Ve Diöstrus (D) Evrelerine Ait Ovaryum Doku Örneklerinin IFN İmmunohistokimyasal Analiz Sonuçları.

İfn gama	Primordiyal Folikül					Sekonder Folikül					Graaf Folikül				
	proöştürüs	östürüs	metaöstürüs	diöstürüs	proöştürüs	diöstürüs	metaöstürüs	diöstürüs	proöştürüs	diöstürüs	metaöstürüs	diöstürüs	proöştürüs	diöstürüs	metaöstürüs
Oosit	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Zona	-	-	-	-	-	++	++	++	-	+	+	+	+	+	+
Pellüsida	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Granüloza	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Hücreleri	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Stromal	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Hücreler	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Antrum	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kumulus	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Ooforus	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Korona	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Radiata	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Teka	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
İnterna	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Teka	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
eksterna	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+

6.2.6. Testis Örneklerinin İmmunoreaktivite Bulguları

cGAS immunoreaktivitesi spermatogonyum, primer spermatosit, spermatid ve sertoli hücrelerinde orta (++), leydig hücrelerinde ise şiddetli (+++) düzeyde izlendi (Resim 11A) .

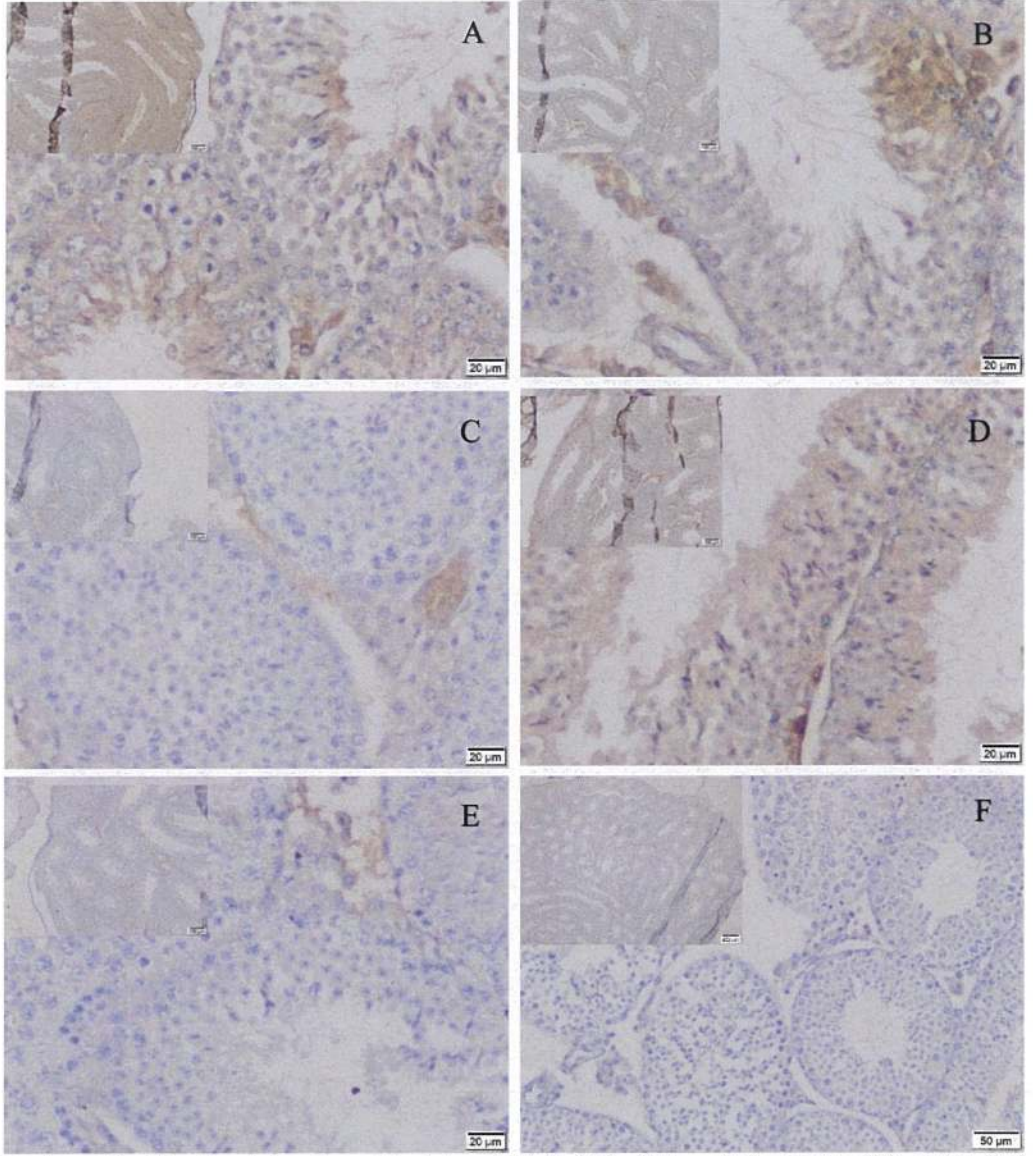
STING immunoreaktivitesi spermatogonyumda zayıf (+), primer spermatosit, spermatid ve sertoli hücrelerinde zayıf/orta (+/++), leydig hücrelerinde ise şiddetli (+++) düzeyde izlendi (Resim 11B).

IRF3 immunoreaktivitesi spermatogonyumda, primer spermatosit, spermatid ve sertoli hücrelerinde izlenmez iken, leydig hücrelerinde ise zayıf/orta (+/++) düzeyde izlendi (Resim 11C).

IFN immunoreaktivitesi spermatogonyumda, primer spermatosit, spermatid ve sertoli hücrelerinde izlenmez iken, leydig hücrelerinde ise şiddetli (+++) düzeyde izlendi (Resim 11D).

NLRP14 immunoreaktivitesi spermatogonyumda, primer spermatosit, spermatid ve sertoli hücrelerinde izlenmez iken, leydig hücrelerinde ise zayıf/orta (+/++) düzeyde izlendi (Resim 11E).

Primer antikor uygulanmayan negatif kontrolde immunreaktivite izlenmemiştir (Resim 11F).



Resim 11: Testis doku örneklerinin cGAS (A), Sting (B), IRF3 (C), IFN (D), NLRP14 (E) ve Negatif Kontrol (F) grubunun immunohistokimyasal analiz görüntüleri (Ölçek: A-F: 20µm, küçük resimler: 100 µm) (Tablo 12).

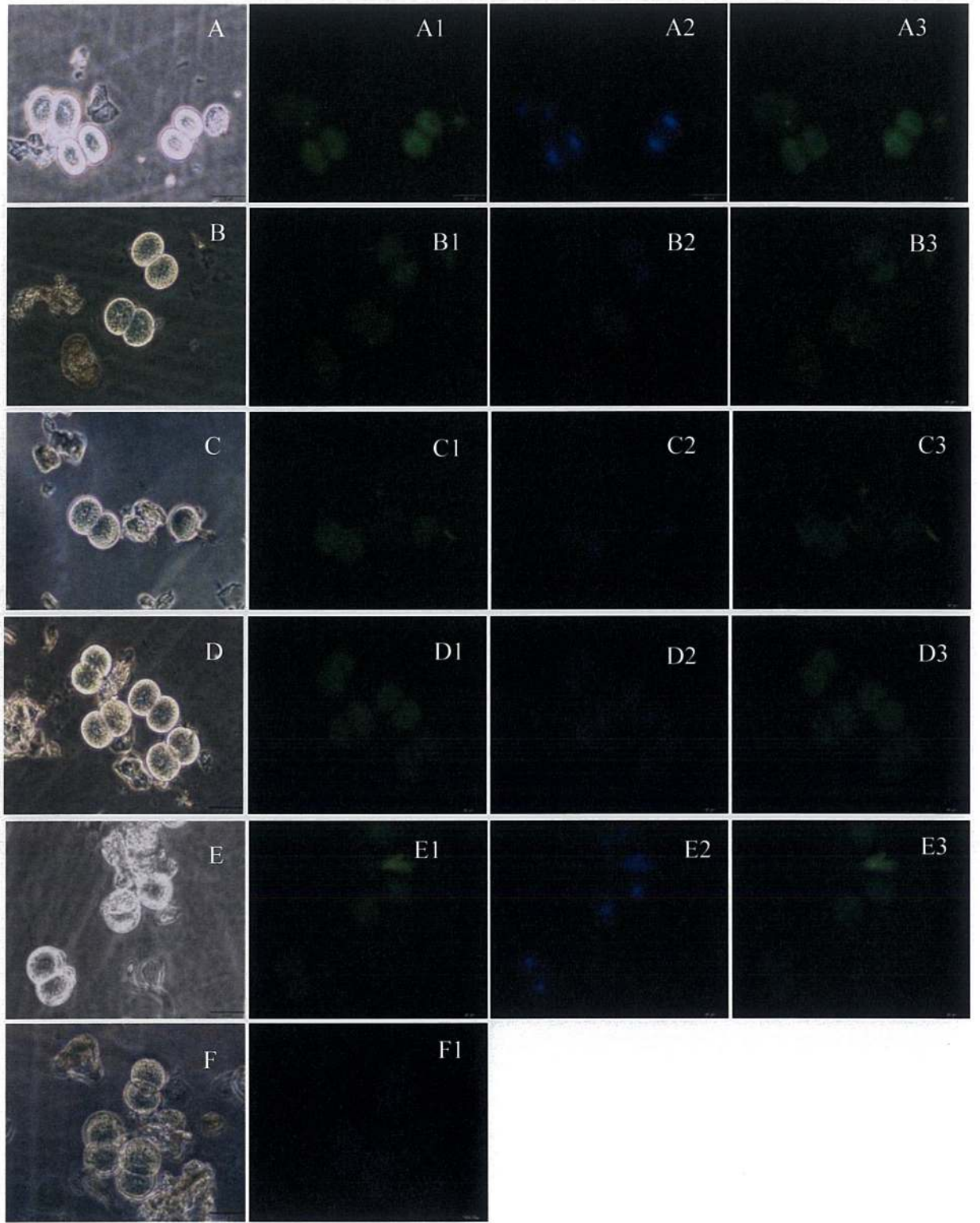
Tablo 12. Testis doku örneklerinin cGAS, Sting, IRF3, IFN ve NLRP14 İmmunohistokimya immunreaktivite sonuçları.

TESTİS	cGAS	STİNG	IRF3	IFN	NLRP14
Spermatogonyum	++	+	-	+	-
Primer					
Spermatosit	++	+/++	-	+	-
Sertoli	++	+/++	-	+	-
Spermatid	++	+/++	-	+	-
Leyding	+++	+++	+/++	+++	+/++

6.3.İMMUNFLORESAN BULGULARI

6.3.1. Bir Günlük Embriyoların İmmunofloresan Bulguları

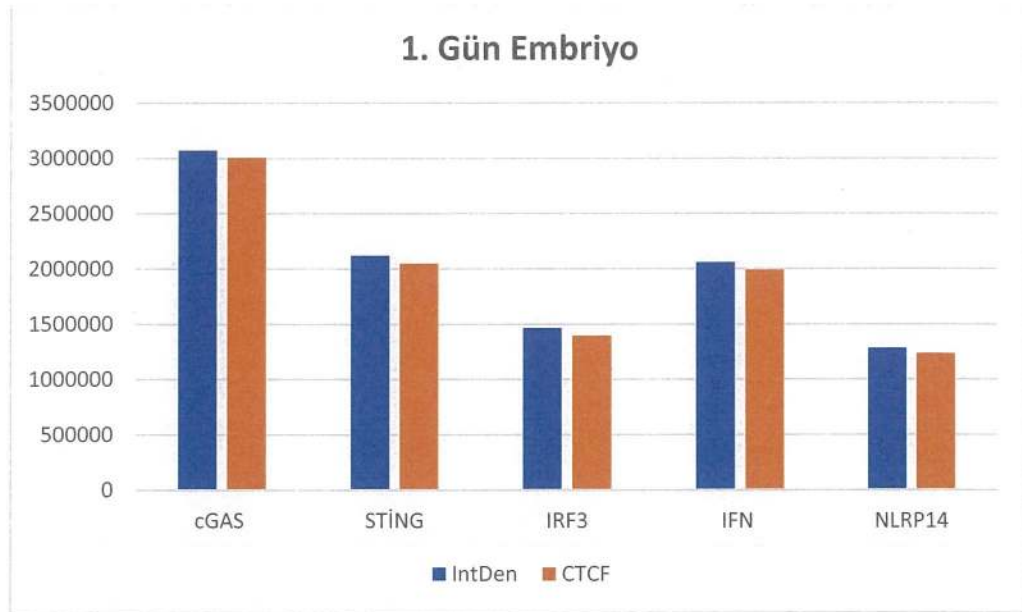
Fertilizasyon sonrası birinci günde elde edilen iki hücreli embriyolarda cGAS immunofloresan yoğunluğu şiddetli (+++), STING, IRF3, IFN immunofloresan yoğunluğu orta (++) ve NLRP14'ün immunofloresan yoğunluğu zayıf (+) düzeyde izlendi (Resim 12 ve 13) (Tablo 13).



Resim 12. Bir günlük embriyoların ışık mikroskobu (A, B, C, D, E, F), Faz Kontrast (CGAS(A1), STING (B1), IRF3 (C1), IFN (D1) ve NLRP14 (E1)), DAPI (A2, B2, C2, D2, E2 ve F1) ve merge (A3, B3, C3, D3, E3) görüntüleri. (Ölçek: A-F1: 20µm).

Tablo 13: Bir günlük embriyoda cGAS, STING, IRF3, IFN ve NLRP14 immunohistokimya immunreaktivite sonuçları.

	1 günlük embriyo
cGAS	+++
STING	++
IRF3	+ / ++
IFN	++
NLRP14	+



Grafik 1: Birinci gün embriyolara ait cGAS, STING, IRF3, IFN ve NLRP14 antikorlarının immunflorasan yoğunluğu.

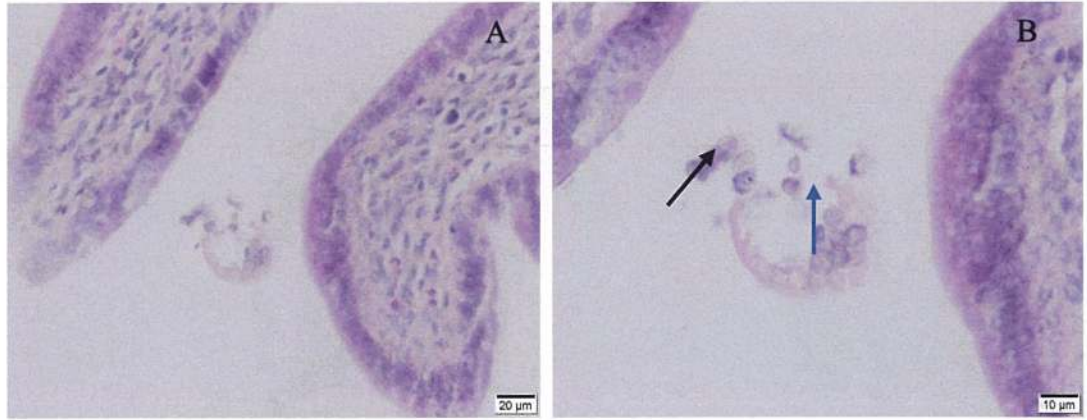
Tablo 14: 1. gün Embriyoların Cgas, STING, IRF3, IFN ve NLRP14 Antikorlarının CTCF ve Intden Değerleri.

	IntDen	CTCF
cGAS	3072022,7	3003230
STING	2118589,3	2046506
IRF3	1463630,3	1394110
IFN	2057920	1990144
NLRP14	1281172,3	1232985
Ortalama	1998667	1933395

6.4. 4,5 Günlük Embriyoların Histokimya Ve İmmunohistokimya Bulguları

6.4.1. 4,5 Günlük Embriyoların Histokimyasal Değerlendirilmesi

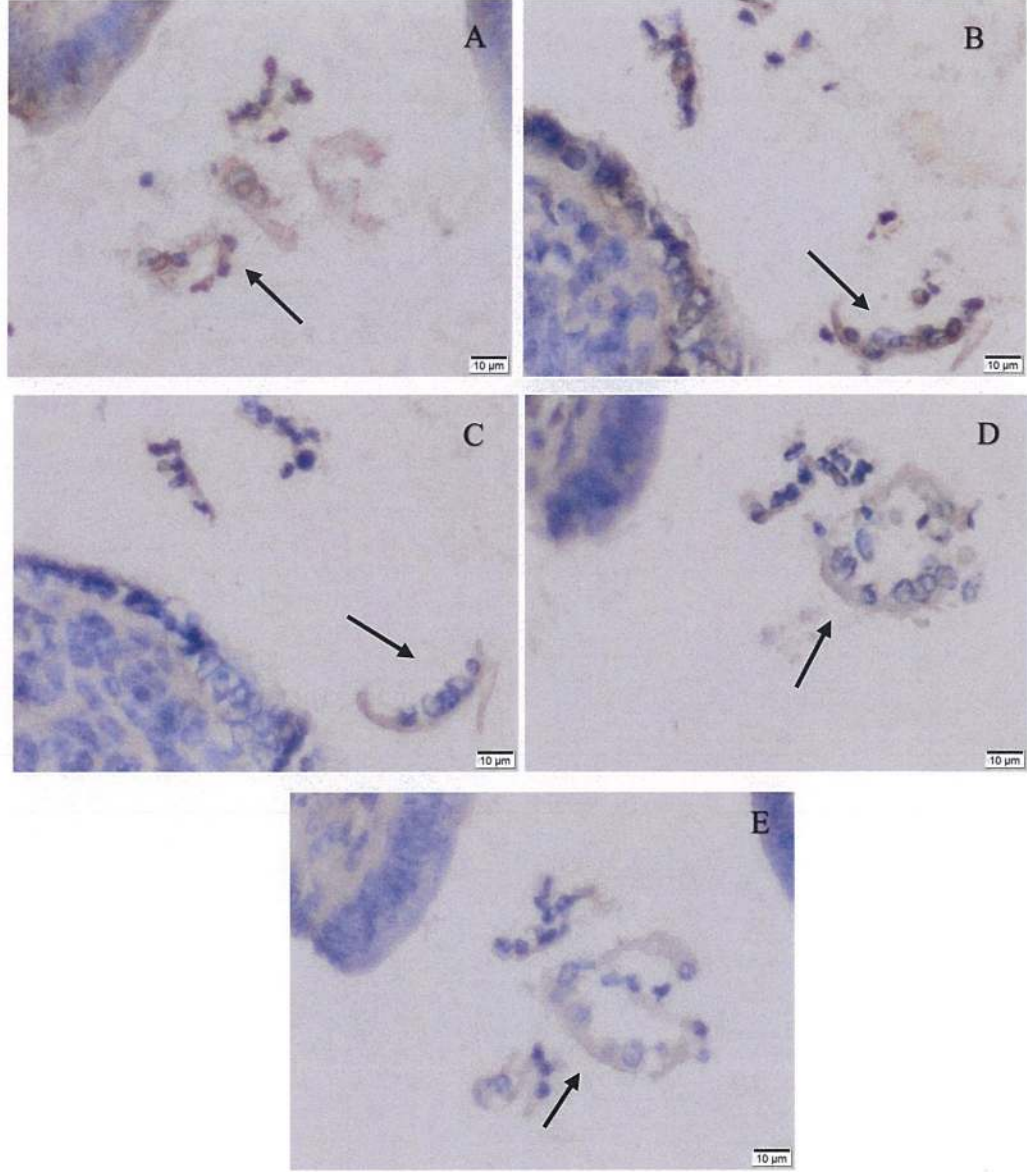
Uterin lümende blastokist benzeri yapıya sahip hücre topluluğu gözlemlendi. Blastokist benzeri yapıda iç hücre kitlesi ve trofoektoderm ayırt edilmekteydi (Resim 13).



Resim 13. 4,5 günlük embriyoların HE boyaması. Mavi Ok (İç hücre kitlesi), Siyah Ok (trofoektoderm) (Ölçek: A:200µm, B: 100µm).

6.4.2. 4,5 günlük embriyoların immunohistokimyasal değ erlendirilmesi

Uterin l umende görülen blastokistte cGAS immunoreaktivitesi orta (++) düzeyde izlendi. STING immunoreaktivitesi zayıf/orta (+/++) düzeyde saptandı. IRF3 immunoreaktivitesi zayıf (+), IFN immunoreaktivitesi zayıf (+) gözlendi. NLRP14 immunoreaktivite izlenmedi (Resim 14) (Tablo 14).



Resim 14. 4.5 günlük embriyoların cGAS(A), Sting (B), IRF3 (C), IFN (D), NLRP14 (E) ve Kontrol (F) grubunun immunohistokimyasal analiz görüntüleri, Siyah Ok (4.5 gün embriyo) ( l ek: A-F: 20 m, küçük resimler: 100  m).

Tablo. 15. 4.5 Günlük Embriyoların Cgas, STING, IRF3, IFN ve NLRP14 İmmunohistokimya İmmunreaktivite Sonuçları.

	4.5 günlük embriyo
cGAS	++
STING	+/++
IRF3	+
IFN	+
NLRP14	-

7. TARTIŞMA

Organizmaların, insanlardan bakterilere kadar kendini kendinden olmayandan ayırma ve yabancı ajanlara uygun tepkiler vermek için çeşitli yöntemleri bulunmaktadır. Neredeyse tüm çok hücreli organizmaların (süngerlerden böceklerle, bitkilere ve omurgalılara kadar) sahip olduğu doğal bağışıklık sistemi şekerler, lipitler, polimerler ve nükleik asitler gibi moleküler paternleri tanıma yeteneğine sahip olan reseptörler ile uygun cevapları oluştururlar (Kumar ve ark. 2011).

Doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin patojenleri belirlemesinde en önemli mekanizma mikrobiyal nükleik asitlerin tanınmasıdır (Wu ve Chen 2014) (Abe ve ark. 2013).

Son on yılda nükleik asitlerin tanınmasında rol oynayan Toll benzeri reseptör yolağı, RIG-I benzeri reseptör yolağı ve STING sinyal yolağını içeren sorumlu hücrel reseptörler belirlenmiştir (Barber 2017), (Kawai ve Akira 2011) (Gao ve ark. 2013). Sitozolik DNA'yı tanıyarak inflamatuvar süreçleri aktive eden siklik GMP AMP sentaz (cGAS)/ interferon genlerinin uyarıcısı (STING) yolağıdır. Hücrenin genel olarak sitoplazmasında DNA bulunmamaktadır. Sitoplazmada DNA'nın bulunması hücrenin DNA virüs veya bakteri tarafından işgal edildiğini ya da mitokondriden DNA'nın sızdığını göstermektedir. Sitoplazmik DNA sellüler sentaz cGAS'e bağlanır ve cGAS ikinci reseptör olarak STING'e bağlanan siklik dinükleotidlerin (siklik GMP-AMP: cGAMP 2'3') sentezini katalize eder (Barber 2017).

Endoplazmik retikulumda bulunan STING aktive olduktan sonra, perinükleer golgiye transloke olarak Tank bağlama kinaz 1 (TBK1) tarafından fosforile edilir ve STING, Interferon düzenleyici faktör 3 (IRF-3) ile etkileşime girer (Liu ve ark. 2015). Yine TBK1'in aracılık ettiği ve endolizozomal kompartmanda gerçekleşen IRF-3'ün fosforilasyonu, gen ekspresyonunu düzenlemek için, STING'den IRF-3 ayrılması, kendi kendine dimerizasyonu ve çekirdeğe IRF-3 translokasyonu ile sonuçlanır. IRF-3'e ek olarak, Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB) de STING sinyal kaskadı içinde anahtar bir moleküldür (Gulen ve ark. 2017).

Bu transkripsiyon faktörleri daha sonra doğal immün gen transkripsiyonunu başlatmak için çekirdeğe translokasyon yapar (Barber 2017). Bu olaylar adaptif immün cevapları kolaylaştıracak olan sitokinlerin ve tip 1 interferonların salgılanmasına yol açar. Bu sistem genel olarak infeksiyöz ajanlara karşı korumayı sağlamakla birlikte kendi nükleik asitlerinin aşırı tanınmasına bağlı olarak gelişen otoimmün hastalıkların oluşumundan da sorumludur (Barber 2017).

Bununla birlikte, fertilizasyon sırasında, oosit içine giren spermin DNA'sı nükleik asit algılayıcı bir tepkiye neden olarak cGAS/STING yolağını aktive edebilir.

Fertilizasyonda cGAS/STING yolağının baskılanması beklenmektedir. Eğer bu yolak baskılanmazsa inflamatuvar süreçler aktive olarak fertilizasyon başarısızlığına veya da erken embriyonik gelişimde bozukluğa yol açabilir.

Bu çalışmada cGAS/STING yolağının embriyolojik gelişim sürecindeki yerinin belirlenmesi, fertilizasyona ve embriyolojik gelişime etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç ile ilk önce cGAS/STING yolağına ait moleküllerin normal ovaryum ve testis dokularındaki ekspresyonları belirlendi. Dişi Balb/C cinsi farelerde vaginal yayma yapılarak östrus siklusu saptandı. Evrelere göre ovaryum doku örnekleri alındı ve indirekt immunohistokimya yöntemi ile cGAS, STING, IRF3, IFN ve NLRP14 primer antikörlerinin immunoreaktivite düzeyleri belirlendi.

Proöstrus ve östrus evrelerinde cGAS immunoreaktivitesi tüm foliküllerde bulunan oositlerde orta/şiddetli immunoreaktivite gösterirken, granuloza ve stromal hücrelerde proöstrus evresinde östrus evresine göre daha fazla olmakla beraber özellikle sekonder ve graaf folikülünde diğer foliküllere göre artmış immunoreaktivite gözlemlendi. Metöstrus ve diöstrus evrelerinde tüm parametrelerde cGAS immunoreaktivitesi ya negatif ya da zayıf düzeyde izlendi.

STING immunoreaktivitesi östrus evresinde sekonder ve graaf foliküllerinde diğer foliküllere göre oosit ve zona pellusidada daha yüksekti. Fakat immunoreaktivite düzeyi cGAS'e göre daha düşüktü.

Fertilizasyondan sonra embriyonik birinci günde elde edilen embriyolarda cGAS immunofloresan yoğunluğu en fazla iken STING'in immunofloresan yoğunluğu orta düzeyde saptandı. Embriyonik 4,5. günde uterus lümeninde bulunan blastokistte cGAS immunoreaktivitesi orta, STING immunoreaktivitesi zayıf/orta düzeyde izlendi.

Bu bulgular ile cGAS ekspresyonunun esas olarak ovaryum dokusunda graaf folikülünde östrus evresinde artmış olması ovulasyonun etkisi ile ilgili olduğunu ve bu

etkinin fertilizasyon ile sperm DNA'sının oosit içine girerek embriyonik 1 ve 4,5. günlerde nükleik asit algılayıcı yolağı aktive ettiğini düşündürdü.

IRF3 immunoreaktivitesi graaf folikülünde proöstrus evresinde zona pellusidada şiddetli pozitif iken östrus evresinde tüm ovaryum dokusunda IRF3 immunoreaktivitesi negatifti. Bununla beraber özellikle metöstrus evresinde graaf folikülünde oosit, zona pellusida, granuloza ve kumulus ooforus hücrelerinde orta/şiddetli immunoreaktivite izlendi. Bunu takip eden evre diöstrusda metöstrusa göre azalan IRF3 immunoreaktivitesi gözlemlendi.

IFN immunoreaktivitesi, graaf folikülünde proöstrus ve östrus evrelerinde zayıf fakat metöstrus ve diöstrus evrelerinde primordiyal hariç tüm foliküllerde bulunan oositde zayıf, zona pellusidada ise şiddetli düzeyde saptandı. Yine graaf folikülünde granuloza ve kumulus ooforus hücrelerinde orta düzeyde IFN immunoreaktivitesi gözlemlendi. Metöstrus evresinde IRF3 ve IFN immunoreaktivitelerinin yüksek olması fakat cGAS ve STING'in buna eşlik etmemesi IRF3'ü etkileyerek aktifleştiren bir başka molekül olabileceğini düşündürdü. Bununla birlikte ovulasyonun kendisi inflamatuvar süreci içermektedir. Foliküller yüksek derecede vaskülarize olur (hiperemik), büyük miktarlarda prostaglandinler (PG'ler) (esas olarak PGE2) üretir ve doku inflamasyonu ve yara onarımı bölgelerinde oluşturulana benzer bir hyaluronan zengin matrisi sentezler. Bu olaylar folikülde LH'nin indüklediği epidermal büyüme faktörü benzeri genleri, matriks ile ilgili genleri, transkripsiyon genlerini ve proteaz genlerinin ekspresyonunu sağlar. Bununla birlikte, son çalışmalar, ovulasyonun inflamatuvar bir reaksiyon olarak görülmesinin çok kısıtlayıcı olduğunu ve doğal immün bağışıklık yanıt sistemini kapsayacak şekilde genişletilmesi gerektiğini göstermektedir (Richards ve ark. 2008), (Shimada ve ark. 2006) .

Ekstrasellüler matriks komponenti olan hyaluronik asitin etkisi ile TLR'lerin (TLR2 ve TLR4) ekspresyonu ve indüksiyonunun, ilişkili adaptor faktörlerin ve sinyal kaskadlarının, ovulasyon ile ilişkili inflamatuvar ve immün işlemlere katkıda bulunan granuloza ve kumulus hücrelerinde spesifik genlerin ekspresyonunu etkilediği saptanmıştır. TLR2 ve TLR4'ün ya direkt olarak ya da MYD88 üzerinden IRF3'ü aktive ettiği ve inflamasyon ve doğal immün hücreler ile ilgili genlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Richards ve ark. 2008),(Shimada ve ark. 2006) .

Bu çalışmada metöstrusda IRF3 ve IFN immunoreaktivitesinin yüksekliğinin hyaluronik asitin aktive ettiği TLR2 veya 4'ün ya direkt olarak ya da MYD88 üzerinden olduğu düşünüldü.

Abe ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, fertilizasyondan sonra azalan germline spesifik transkriptleri araştırmıştır. Bunun için aday olarak IL1beta ve IL8 oluşumundan sorumlu NOD benzeri reseptörleri içeren inflamazom ailesi üyesi NLRP14'ü tanımlamışlardır (Latz ve ark. 2013) (Abe ve Shapira 2019). 293T hücrelerinde NLRP14'ün aşırı ekspresyonunun, STING ve RIG-I sinyalini içeren çeşitli doğal immün sinyal yollarını inhibe ettiğini saptamışlardır. Tersine, NLRP14 ekspresyonunun baskılanmasının, çift sarmallı (ds) DNA gibi agonistlere cevap olarak nükleik asit algılama yollarını arttırdığını bulmuşlardır (Abe ve ark. 2013).

NLRP14 muhtemelen transkripsiyon faktörü IRF3 için anahtar bir kinaz olan TBK1 ile etkileşime girmektedir (Khan ve ark. 2018). Abe ve arkadaşları NLRP14'ün hem STING hem de MAVS ile ilişkili olduğunu ve downstream sinyal iletimini önlediğini göstermişlerdir. Buna karşılık, bu adaptör moleküller, uygun koşullar altında (örneğin oositlerin fertilizasyonundan sonra) kalıcı immünosüpresyonun önlenmesinde ve doğuştan gelen immün yanıtların uygun şekilde uyarılmasının önlenmesinde kritik olabilecek bir geri besleme döngüsü olan NLRP14'ün proteazomal degradasyonunu indükler.

Bu çalışmada, NLRP14 immunoreaktivitesi sekonder ve graaf folikülünde proöstrus ve östrus evrelerinde zayıf düzeyde özellikle metöstrus olmak üzere diöstrusda da diğer evrelere göre artmış olarak saptandı. Fertilizasyondan sonra embriyonik birinci günde elde edilen embriyolarda IRF3'ün immunofloresan yoğunluğu zayıf/orta ve IFN'un immunofloresan yoğunluğu orta düzeyde NLRP14'ün immunofloresan yoğunluğu zayıf olarak saptandı. Embriyonik 4,5. günde blastokistte IRF3 ve IFN immunoreaktivitesi zayıf düzeyde iken NLRP14 immunoreaktivitesi saptanmadı.

Yan ve arkadaşları preimplantasyon embriyolarda RNA sekansı yaptıkları çalışmada NLRP14 mRNA'sının oositte eksprese olduğunu ancak fertilizasyondan sonra bu ekspresyonun giderek azaldığını göstermişlerdir (Yan ve ark. 2013). Bu çalışmada da ovaryum dokusunda NLRP14 immunoreaktivitesi saptanır iken fertilizasyondan sonra embriyonik 1. ve 4,5. günde NLRP14 immunoreaktivite yoğunluğunun azalmış olduğu gözlemlendi. Bu bulgular literatürle uyumlu olarak fertilizasyon ile oosit sitoplazmasına giren sperm DNA'sının nükleik asit algılayıcı

sistem olan cGAS/STING yolağının aktivasyonunu dolayısı ile interferon ve sitokinlerin sentezi ile inflamatuvar yanıtın başlamaması için NLRP14'ün etkili olduğunu ve fertilizasyondan sonra azaldığını göstermektedir. Ayrıca IRF3 ve IFN ekspresyonlarının düşmesi NLRP14'ün etkisine bağlı olduğunu düşündürmüştür.

Abe ve arkadaşları yine yaptıkları çalışmada NLRP14'ün K108X alelinin ektopik ekspresyonunun, TBK1 aracılı sinyalin baskılanmasının azalmasına neden olduğunu bulmuşlardır. Bu alel insan popülasyonunda ortalama%1,7, Doğu Asya ve küçük Amerikan popülasyonlarında küçük bir allel frekansına sahiptir (Consortium 2015), bu genin 10.000 kişiden 3'ünde görülen homozigotluğu ile infertilitenin ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Kadın infertilitesine ilişkin NLRP14 mutasyonları literatürde bulunmamakta ve daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Satie ve arkadaşları (Satie ve ark. 2011), fazla tip I IFN sinyalinin farelerde seminifer tübülleri bozduğunu, germ hücrelerinin kaybına ve infertiliteye yol açtığını bildirmiştir (Satie ve ark. 2011). Ek olarak, intraperitoneal IFN-a enjeksiyonu, kemirgenlerde spermatogenezde bozulmaya neden olmakta (Ulusoy ve ark. 2004) ve infertil erkeklerde semende, yüksek seviyelerde IFN-a, saptanmıştır (Fujisawa ve ark. 1998).

Testis dokusunun immunohistokimyasal sonuçları karşılaştırıldığında cGAS ve STING immunoreaktivitelerinin germinal epitel ve leydig hücrelerinde orta/şiddetli düzeyde olduğu IRF3 ve NLRP14 immunoreaktivitelerinin germinal epitelde bulunmamasına rağmen leydig hücrelerinde zayıf/orta düzeyde olduğu saptandı. IFN immunoreaktivitesi germinal epitelde zayıf düzeyde leydig hücrelerinde ise şiddetli düzeyde izlendi. Bu bulgular testiste nükleik asit algılama sensörü olan cGAS/STING yolağının aktif olduğunu NLRP14'ün varlığının da normal dokuda bu yolağı baskılamak için olduğunu düşündürdü.

Literatür ile birlikte bu çalışmadaki bulgular, bazı NLRP14 mutasyonlarının, testiste uygun olmayan doğal immün yanıtlarla spermatogenez bozukluğuna neden olabileceği fikrini desteklemektedir.

NLRP14'ün in vivo fonksiyonu araştırılmaya devam etsede, NLRP14'ü fare oositlerine hedefleyen siRNA'nın mikroenjeksiyonu, başarısız fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi ile sonuçlandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Hamatani ve ark. 2004). Ayrıca, NLRP14 transkript seviyelerinin yaşla birlikte azaldığı ve fertilitenin de düştüğü görülmüştür (Hamatani ve ark. 2004). Bu bulgular yabancı ve endojen ligandlara karşı doğal bağışıklık tepkilerini kontrol etmenin önemini

vurgulamakta ve bu işlemlerin sıkı bir şekilde düzenlenmesinin germline'de uygun immünolojik homeostazı sürdürmek için kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir. NLRP14, nükleik asitlere uygun olmayan sitozolik tepkilere karşı koruma sağlar ve böyle bir fonksiyonun kazanılması, üremenin ön şartı olabilir (Green ve ark. 2011).

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnfertilite günümüzde önemli bir toplumsal sağlık sorununu oluşturmaktadır. İnfertilite sebeplerine yönelik birçok çalışma yapılmakta, fakat hala açıklanamayan infertilite olguları ile karşılaşilmektedir. Fertilizasyon esnasında oosit içine giren spermin DNA'sının yabancı olarak algılanıp algılanmaması fertilizasyonun başarısını belirlemektedir. Sitozolik DNA'yı tanıyarak inflamatuvar süreçleri aktive eden siklik GMP AMP sentaz (cGAS)/ interferon genlerinin uyarıcısı (STING) yolağıdır.

Bu çalışmada, normal ovaryum ve testis dokularında, embriyonik 1 ve 4,5. günlerdeki cGAS/STING yolağına ait moleküllerin ve bu yolağın negatif düzenleyicisi olan NLRP14'ün immunoreaktivite düzeyleri saptanmıştır.

Bu çalışmada özellikle NLRP14'ün fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminde nükleik asit algılayıcı yolağın suprese edilmesinde önemli olduğu ve açıklanamayan infertilite olgularında göz önüne alınması gerektiği öne çıkmaktadır.

9. KAYNAKLAR

LL. Histology and Cell Biology 4th Edition 2016: Saunders Moore KL, Persaud TVN; Torchia MG. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology.10th Edition 2016: Elsevier.

Ross MH, Wojciech P. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. (Baykal B. Çev.) Palme Yayıncılık, Ankara, 2014, 830-60.

Victor P. Eroschenko diFiore'nin Histoloji Atlası (Demir R.Çev.) Palme Yayıncılık, Ankara,2013,51111.

Ross MH, Wojciech P. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. (Baykal B. Çev.) Palme Yayıncılık, Ankara, 2014, 830-60.

Sadler TW, Langman's Medical Embriyology 13th Edition :2015 Wolters Kluwer riental Embriyology .10th Edition 2016: Elsevier.

Hoffman BL, Schorge JO, Bradshaw KD, Halvarson LM, Schaffer JL, Corton MM. Williams Gynecology. 3th Edition 2016: MC GRAW HİLL.

Çoban Z, Farede östrus siklusu tayininde hızlı, kolay ve etkin bir yöntem, Gülhane Tıp Dergisi 2016;58: 82-87.

Yang, H., et al. (2017). "cGASis essential for cellular senescence." Proceedings of the National Academy of Sciences 114(23): E4612-E4620 (Yang ve ark. 2017).

Watson, R. O., et al. (2015). "The cytosolic sensor cGASdetects Mycobacterium tuberculosis DNA to induce type I interferons and activate autophagy." Cell host & microbe 17(6): 811-819.

Gentili, M., et al. (2019). "The N-terminal domain of cGASdetermines preferential association with centromeric DNA and innate immune activation in the nucleus." Cell Rep 26(9): 2377-2393. e2313.

Li, T. and Z. J. Chen (2018). "The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer." J Exp Med 215(5): 1287-1299.

Gao, P., et al. (2013). "Structure-function analysis of STING activation by c [G (2', 5') pA (3', 5') p] and targeting by antiviral DMXAA." Cell 154(4): 748-762.

Tuo Li, and Zhijian J. Chen, The cGAS–cGAMP–STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer, *J. Exp. Med.* 2018 Vol. 215 No. 5 1287–1299.

Abe, T., et al. (2017). "Germ-Cell-Specific Inflammasome Component NLRP14 Negatively Regulates Cytosolic Nucleic Acid Sensing to Promote Fertilization." *Immunity* 46(4): 621-634.

Xiang Zhou & Zhengfan Jiang, STING-mediated DNA sensing in cancer immunotherapy, *Sci China Life Sci* 60, 563–574.

Anping Li, Ming Yi, Shuang Qin, Yongping Song, Qian Chu, and Kongming Wu, Activating cGAS-STING pathway for the optimal effect of cancer immunotherapy, *J Hematol Oncol.* 2019; 12: 35.

Gao, P., et al. (2013). "Structure-function analysis of STING activation by c [G (2', 5') pA (3', 5') p] and targeting by antiviral DMXAA." *Cell* 154(4): 748-762.

Kumar V, A STING to inflammation and autoimmunity, *J Leukoc Biol.* 2019 Apr 16. 10.1002/JLB.4MIR1018-397RR.

Tian, X., et al. (2009). "Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems." *BMC evolutionary biology* 9(1): 202.

Hamatani, T., et al. (2004). "Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes." *Human molecular genetics* 13(19): 2263-2278.

Horikawa, M., et al. (2005). "The mouse germ-cell-specific leucine-rich repeat protein NALP14: a member of the NACHT nucleoside triphosphatase family." *Biology of reproduction* 72(4): 879-889.

Tian, X., et al. (2009). "Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems." *BMC evolutionary biology* 9(1): 202.

Abe, T., et al. (2017). "Germ-Cell-Specific Inflammasome Component NLRP14 Negatively Regulates Cytosolic Nucleic Acid Sensing to Promote Fertilization." *Immunity* 46(4): 621-634.

Jefferies CA, Regulating IRFs in IFN Driven Disease, *Front Immunol.* 2019 Mar 29;10:325. doi: 10.3389/fimmu.2019.00325.

Tao J1,2,3, Zhou X1,2,3, Jiang Z, cGAS-cGAMP-STING: The three musketeers of cytosolic DNA sensing and signaling. *IUBMB Life.* 2016 Nov;68(11):858-870. doi: 10.1002/iub.1566. Epub 2016 Oct 5.

- Abe, T., et al. (2013). "STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense." Molecular cell **50**(1): 5-15.
- Abe, T. and S. D. Shapira (2019). "Negative Regulation of Cytosolic Sensing of DNA." International review of cell and molecular biology **344**: 91-115.
- Barber, G. N. (2017). "The birds, the bees, and innate immunity." Immunity **46**(4): 521-522.
- Consortium, G. P. (2015). "Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation." Nature **526**(7571): 68-74.
- Fujisawa, M., et al. (1998). "Levels of interferon α and γ in seminal plasma of normozoospermic, oligozoospermic, and azoospermic men." Archives of andrology **40**(3): 211-214.
- Gao, P., et al. (2013). "Structure-function analysis of STING activation by c [G (2', 5') pA (3', 5') p] and targeting by antiviral DMXAA." Cell **154**(4): 748-762.
- Green, R. A., et al. (2011). "A high-resolution C. elegans essential gene network based on phenotypic profiling of a complex tissue." Cell **145**(3): 470-482.
- Gulen, M. F., et al. (2017). "Signalling strength determines proapoptotic functions of STING." Nat Commun **8**(1): 427.
- Hamatani, T., et al. (2004). "Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes." Human molecular genetics **13**(19): 2263-2278.
- Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." Immunity **34**(5): 637-650.
- Khan, N., et al. (2018). "Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome as a potential target for multiple sclerosis induced central neuropathic pain." Inflammopharmacology **26**(1): 77-86.
- Kumar, H., et al. (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." International reviews of immunology **30**(1): 16-34.
- Latz, E., et al. (2013). "Activation and regulation of the inflammasomes." Nature Reviews Immunology **13**(6): 397.
- Liu, S., et al. (2015). "Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation." Science **347**(6227): aaa2630.
- Richards, J. S., et al. (2008). "Immune-like mechanisms in ovulation." Trends in Endocrinology & Metabolism **19**(6): 191-196.

Satie, A.-P., et al. (2011). "Excess type I interferon signaling in the mouse seminiferous tubules leads to germ cell loss and sterility." Journal of Biological Chemistry **286**(26): 23280-23295.

Shimada, M., et al. (2006). "Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: novel evidence for innate immune-like functions during ovulation." Molecular Endocrinology **20**(12): 3228-3239.

Ulusoy, E., et al. (2004). "Interferon α -2B may impair testicular histology including spermatogenesis in a rat model." Archives of andrology **50**(5): 379-385.

Wu, J. and Z. J. Chen (2014). "Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids." Annual review of immunology **32**: 461-488.

Yan, L., et al. (2013). "Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells." Nat Struct Mol Biol **20**(9): 1131.

Cai, X., et al. (2014). "The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling." Molecular cell **54**(2): 289-296.

Ek 1. Yönetim Kurulu Karar Örneği

Evrak Tarih ve Sayısı: 30/01/2018-E.10320



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 77637435-050.04.04-
Konu : Etik Kurul Kararı - Elgin Türköz Uluer -
Siklik GMP AMP sentaz

Sayın Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

"Siklik GMP AMP sentaz / İnterferon genlerinin uyarıcısı yolağının embriyolojik gelişim sürecindeki yeri" başlıklı dosyanız görüşülmüş olup, Etik Kurul Karar Formu ektedir. Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Emin KURT
Kurul Başkanı

Ek: Elgin türköz uluer - sijklik GMP AMP 30.01.2018 karar tutanağı (1 sayfa)

Adres: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Uncubozköy Kampüsü Manisa
Telefon:(0 236) 2338586 Faks:(0 236) 2331466
E-Posta:tip@cbu.edu.tr Elektronik Ağ:http://tip.cbu.edu.tr

Bilgi İçin İsa Köse
Ünvanı: Ven Hazırlama ve Kontrol
İletimci



Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır

EK 1. Yönetim Kurulu Karar Örneği



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
08.12.2017	48	21

Karar 2- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 161350001 numaralı yüksek lisans programı öğrencisi Gülşah ALBAYRAK'ın tez konusunun etik kurul onayı alınması kaydı ile "Siklik GMP AMP Sentaz-Inferferon Genlerinin Uyareısı Yolağının Embriyolojik Gelişim Sürecindeki Yeri" olarak belirlenmesine OY BİRLİĞİ ile karar verildi.

e-imzalıdır Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ Enstitü Müdürü	
e-imzalıdır Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Müdür Yardımcısı	e-imzalıdır Prof. Dr. Necip KUTLU Üye
e-imzalıdır Prof. Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ Üye	Katılmadı Doç. Dr. Murat TAŞ Üye
e-imzalıdır Aynur PALAMUTÇUOĞLU Enstitü Sekreteri Raportör	

Aslı Gibidir
30/01/2018

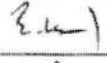
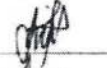
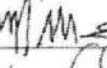
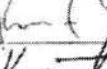
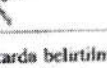
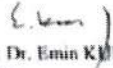
Aynur PALAMUTÇUOĞLU
Enstitü Sekreteri



Scanned by CamScanner

Ek 2. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Belgesi

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	30/ 01 / 2018 / 77.637.435 -		
ARAŞTIRMANIN ADI	Siklik GMP AMP sentaz / Interferon genlerinin uyarıcısı yolağının embriyolojik gelişim sürecindeki yeri		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. Elgin Türköz ULUER - Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Bio. Gülşah ALBAYRAK		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi ☐	Yüksek Lisans/Doktora ☒	Akademik ☐ Eğitim ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	29 / 12 / 2017 / Tarih ve 62249 sayılı; araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.		
Ünvanı /Adı /Soyadı	İmza	Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları AD		☐	☐
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD		☐	☐
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi AD		☐	☐
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM MD		☐	☐
Doç. Dr. Kamel VURAL Farmakoloji AD		☐	☐
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD		☐	☐
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		☐	☐
Saim ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		☐	☐
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.  Prof. Dr. Emin KURT Başkan			

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tez Çalışması Orijinallik Raporu
Histoloji Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı

Siklik Gmp Amp Sentaz / İnterferon Genlerinin Uyarıcısı Yolağının Embriyolojik Gelişim Sürecindeki Yeri

Tezime ilişkin 26/07/2019 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %21'dir.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
26/07/2019

Adı Soyadı : Gülşah Albayrak
Öğrenci No : 101610005
Anabilim Dalı : Histoloji Embriyoloji
Programı : Yüksek Lisans

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

(Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER)

Açıklamalar

1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.

2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)

3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.

Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.

4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)

5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.

6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.

7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.

8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.

9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülşah ALBAYRAK

Doğum Yeri, Tarihi : Karşıyaka / İZMİR, 08 / 02 / 1992

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : Bahçelievler Mah. 1834 Sok. Kardelen Apt. No:34 daire: 3 Karşıyaka /İZMİR

Tel : 0090 507 748 90 54

E-posta : gulsahalbayrak@outlook.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans : Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İngilizce Biyoloji 2010-2015

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji AD 2016-2019

Projeler

Malign Melanom Fare Modelinde Anti Pd-1 Monoklonal Antikoru ve C Novyi-Nt Intramural Uygulamasının Etkinliğinin Değerlendirilmesi (2017,2019), TÜBİTAK Bursiyer.

Sıklık GMP AMP Sentaz -Interferon genlerinin uyarıcısı yolağının embriyolojik gelişim sürecindeki yeri (2018, 2019), BAP.

Ödüller

25.Bilim ve Bahar Şenliği “Sağlık Bilimlerinde Proje “ Yarışması (MCBU-2017 – İkincilik Ödülü) Rubus caesius Kökünün Meme Kanseri Hücre Hatlarına Etkisinin Araştırılması, Mayıs 2017, Manisa, Türkiye

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

II.Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi Talidomid’in 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattında VEGF, Fibronektin ve E-cadherin Dağılımı Üzerine Etkisi (MCBU-2016, Sözlü Bildiri), Mayıs 2017, Manisa, Türkiye

International Symposium on Medicinal, Aromatic And Diye Plant, The Effect of Rubus Caesius As a Medicinal Plant on the Apoptotic Pathway of Breast Cancer Cell Line, İnönü Üniversitesi-Sözlü Bildiri, Eylül 2017, Malatya, Türkiye

2nd International Conference on Natural Products For Cancer Prevention and Therapy, Antiproliferative and Apoptotic Effect Of The Medicinal Plants on Breast Cancer Cell Line (Erciyes Universitesi-2017, Poster), Kasım 2017, Kayseri, Türkiye

2nd International Conference on Natural Products For Cancer Prevention and Therapy, Anticancer Effects Of Oleocanthal and Pinus Pinaster on Breast Cancer Cell Culture (Erciyes Universitesi-2017, Poster), Kasım 2017, Kayseri, Türkiye

24.Ulusal Biyoloji Kongresi (MCBU-2018, Sözlü Bildiri) Melanin Pigmentli Dokularda Demelanizasyon Yöntemi, Eylül 2018, Manisa, TÜRKİYE

2nd International Cell Death Research Congress, Cyclophosphamide inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in mice kidneys (HÖAD-2018, Poster), Kasım 2018, İzmir, Türkiye