

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

**SİRKADİYEN RİTMİN FAREDE UTERUS
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİPPO SİNYAL
YOLAĞI ÜZERİNDEN GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELAZA ALİYEVA

İSTANBUL-2023

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

**SİRKADİYEN RİTMİN FAREDE UTERUS
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİPPO SİNYAL
YOLAĞI ÜZERİNDEN GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELAZA ALİYEVA

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. AYLİN YABA UÇAR

İSTANBUL-2023

TEZ ONAYI FORMU

Enstitü : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Tez Başlığı : Sirkadiyen Ritmin Farede Uterus Üzerindeki Etkisinin Hippo Sinyal Yolağı Üzerinden Gösterilmesi
Tez Sahibi : Elaza Aliyeva
Sınav Tarihi : 19/07/2023

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)
Tez danışmanı:	Prof. Dr. Aylin Yaba Uçar
Üye:	Prof. Dr. Çiler Çelik Özenci
Üye:	Doç. Dr. Alev Cumbul

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bayram Yılmaz

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Elaza Aliyeva



İTHAF

Dünyamdaki en değerli insana, anneme ithaf ediyorum...



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, tüm bilgi birikimi ile ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, desteğini esirgemediği sabır ve inançla yol gösteren, akademik duruşu ve karakteri ile örnek olan, tezimin hazırlanma sürecinde ve öncesinde göstermiş olduğu bilimsel katkıları için danışman hocam Prof. Dr. Aylin Yaba Uçar’a,

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca, bilgilerinden, tecrübelerinden faydalandığım, güler yüzleri ile her sorumuza ve sorunumuza yürekten destek olan değerli Tuğçe Önel ve Ecem Yıldırım hocalarıma,

Tezimin deneysel sürecinde verdikleri destek için Zeynep Alkan Öztürk ve Cihan Süleyman Erdoğan’a,

Tez yazımımın tüm aşamalarında bana destek olan, Türkçemin yetmediği zamanlarda her zaman yardımını esirgemeyen arkadaşım Serra Nur Ersoy’a,

Çalışma sürecim boyunca yanımda olan ekip arkadaşlarım Ezgi Şahin’e ve İlayda Kaya’ya,

Akademik hayata birlikte adım attığımız, kaderin bizi ısrarla ve iyi ki de ayırmadığı yol ve ev arkadaşım, gerek iş gerek sosyal hayatımda ihtiyaç duyduğum her an benim için elinden gelen ne varsa yapan ve desteğini her daim hissettiğim sevgili Narmin Asadova’ya,

Uzakta olmasına rağmen desteğini her zaman hissettiğim arkadaşım Fidan Babayeva’ya,

Benimle her zaman gurur duyan, varlıklarını her zaman hissettiğim, ömür boyu beni destekleyen canım anneannem ve dedem’e,

Yıllardır süren eğitim hayatımın her aşamasında beni destekleyen, ideallerimi gerçekleştirmemde maddi ve manevi desteğini bir an olsun benden esirgemeyen değerli annem Ayten Aliyeva’ya, her zaman sorunlarımla ilgilenen ve bana yardımcı olan canım kardeşlerim Adil Aliyev’e, küçük kardeşim Zamina Aliyeva’ya ve diğer tüm aile üyelerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iv
İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
ABSTRACT.....	xi
ÖZET.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL LİTERATÜR BİLGİSİ.....	3
2.1. Sirkadiyen Ritim.....	3
2.1.1. Sirkadiyen Ritim Bozulmasına Neden Olan Faktörler.....	4
2.1.2. Sirkadiyen Ritmin Moleküler mekanizması.....	5
2.1.3. Sirkadiyen Ritim ve Metabolik Bozukluklar.....	8
2.2. Dişi Üreme Organları.....	8
2.2.1. Uterus.....	9
2.2.1.1. Uterinal Siklus.....	10
2.2.1.2. İmplantasyon.....	11
2.2.2. Hipotalamik Hipofizar Gonadal Eksen.....	15
2.3. Hippo Sinyal Yolağı.....	16
2.3.1. Uterus Endometriyumunda Hippo Sinyal Yolağı.....	19
2.4. Telomeraz Ters Transkriptaz (TERT) Transkripsiyonu.....	19
2.4.1. mTERT ve Sirkadiyen Ritim.....	20

3. MATERYAL VE METOD.....	22
3.1. Hayvanlar ve Deney Tasarımı.....	22
3.2. Doku Takibi, Hemotoksilen ve Eozin Boyama.....	23
3.3. İmmünofloresan Boyama.....	24
3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polieraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR).....	24
4. BULGULAR.....	29
4.1. Kontrol ve Sirkadiyen Ritmin bozulduğu Deney Grubunda Fare Uterus Dokularının Morfolojik ve Histolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	29
4.2. PER2 Lokalizasyonunun İmmünofloresan Yöntem ile Gösterilmesi.....	32
4.3. Sirkadiyen Ritim Bozulmasında Hippo Sinyal Yolağı Proteinlerinden YAP1 ve TEAD' ün Lolizasyonun İmmünofloresan Yöntem ile Belirlenmesi	35
4.4. Sirkadiyen Ritim Bozulmasında mTERT Lokalizasyonunun Değerlendirilmesi.....	40
4.5. Uterus Dokularında Sirkadiyen Riti Genlerinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi..	43
4.6. Uteus Dokularında Hippo Sinyal Yolağı Proteinlerinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi.....	44
4.7. Sirkadiyen Ritim Bozulmasında mTERT ekspresyonunun mRNA Seviyesinde gösterilmesi.....	45
5.TARTIŞMA.....	47
6. KAYNAKÇA.....	53
7. EKLER.....	70
7.1. ETİK KURUL KARARI.....	70
7.2. Özgeçmiş.....	71

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. cDNA eldesi için hazırlanan karışımın içeriği.....	26
Tablo 2. qRT-PZR deneylerinde kullanılan karışımın içeriği.....	26
Tablo 3. qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan sıcaklık değerleri ve süreleri.....	27
Tablo 4. qRT-PZR deneyinde kullanılan primerler.....	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Sirkadiyen Ritmin bozulmasına neden olan faktörler.....	5
Şekil 2.2 Sirkadiyen saat moleküler mekanizması.....	6
Şekil 2.3 Membran depolarizasyonu sonucunda SKN ve c-AMP sinyalinin ilişkisi.....	7
Şekil 2.4 Menstrual siklus ve hormonal regülasyonu.....	11
Şekil 2.5 Memelilerde uterus farklılıkları.....	12
Şekil 2.6 İnsan uterus endometriyumu.....	13
Şekil 2.7 Fare uterusu enine kesitinde endometrium ve implantasyon bölgesi.....	15
Şekil 2.8 Hippo sinyal yolağı mekanizması.....	18
Şekil 3.1 Deney modelinin şematik tasarımı.....	22
Şekil 3.2 Çalışma dizaynı.....	23
Şekil 4.1 Fare uterus dokularının morfolojik ve histolojik değerlendirilmesi.....	30
Şekil 4.2 Fare uterus dokularının morfolojik ve histolojik değerlendirmelerin istatistiksel olarak gösterilmesi.....	31
Şekil 4.3 Kontrol grubu uterus dokularında PER2 immünofloresan boyama.....	33
Şekil 4.4 Deney grubu uterus dokularında PER2 immünofloresan boyama.....	34
Şekil 4.5 Kontrol ve Deney gruplarında PER2 ekspresyonunun istatistiksel analizi.....	35
Şekil 4.6. Kontrol grubu uterus dokularında YAP1'ün immünofloresan boyama.....	36
Şekil 4.7 Deney grubu uterus dokularında YAP1'ün immünofloresan boyama.....	37
Şekil 4.8 Kontrol grubu uterus dokularında TEAD4'ün immünofloresan boyama.....	38
Şekil 4.9 Deney grubu uterus dokularında TEAD4'ün immünofloresan boyama.....	39
Şekil 4.10 Kontrol ve Deney gruplarında YAP1 ve TEAD istatistiksel analizi.....	40
Şekil 4.11 Kontrol grubu uterus dokularında mTERT immünofloresan boyama.....	41
Şekil 4.12 Deney grubu uterus dokularında mTERT immünofloresan boyama.....	42
Şekil 4.10 Kontrol ve Deney gruplarında mTERT ekspresyonunun istatistiksel analizi	43
Şekil 4.14 Uterus dokularında Sirkadiyen ritim genlerinin mRNA analizi.....	44
Şekil 4.15 Uterus dokularında Hippo sinyal yolağı genlerinin mRNA analizi.....	45
Şekil 4.16 Uterus dokularında mTERT ekspresyonunun mRNA analizi.....	47
Şekil 5.1 Sirkadiyen ritmin bozulduğu fare uterusunda, Hippo sinyal yolağı ve mTERT ilişkisi.....	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BMAL1:	Beyin ve Kas ARNT benzeri Protein 1
PER2:	Periodik Sirkadien Ritim Geni 2
CRY1:	Kriptokrom 1
TEAD4 :	TEA Domain 4
YAP1 :	Yes İlişkili Protein 1
mTERT:	Telomeraz Ters Transkriptaz Transkripsiyonu
TAZ :	PDZ'ye Bağlanan Motifli Transkripsiyonel Koaktivatör
Era:	Östrojen reseptörü alfa
ERE:	Östrojen tepki elemanı
E2:	Estradiol (17 β -estradiol)
H3K27ac:	Histon H3 proteininin 27. lizin kalıntısında asetilasyon

ABSTRACT

Aliyeva, E. (2023). Demonstration of the Effect of Circadian Rhythm on the Mouse Uterus through the Hippo Signaling Pathway. Yeditepe University, Institute of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, Master Thesis, Istanbul.

The circadian rhythm coordinates many physiological functions in all mammals, including humans. The female reproductive system is regulated by the central circadian system. Studies have shown that the synchronization of circadian rhythm genes is critical for reproductive functions, and that any disruption in the light and dark cycle may adversely affect the mother's sleep pattern, early embryonic development, and the development of the fetus. In our thesis, we hypothesized that the relationship between the circadian rhythm and the uterus may be related to the Hippo signaling pathway and telomerase activity. Therefore, we aimed to show the Hippo signaling pathway components and mTERT expression in the uterus of animals with impaired circadian rhythm. In our study, we created two groups (n=10) using a total of 20 BalbC 6-8 weeks old female mice. In the control group, mouse caged on a 12:12 hour light/dark cycle for one week. In the experimental group mice, the circadian rhythm was disrupted by keeping the mice on a 12:12 hour light/light cycle for one week. At the end of the one-week experimental period, mice were dissected and uterine tissues were isolated. While the right uterine horn of the uterus was placed in fixative for tissue processing for morphological analysis and immunofluorescence staining, the left uterus tissue was isolated for use in quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). While PER2, YAP1, TEAD4 and mTERT localization were determined by immunofluorescence method, *YAP1*, *TEAD4* and *mTERT* expressions and circadian rhythm genes *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* and *CRY* were detected at mRNA level by qRT-PCR. All the comparisons between groups were performed using ImageJ and GraphPad programs. The obtained data were statistically evaluated with Student's t test ($p<0.05$). We determined that the thickness of the lumen epithelium of the endometrium decreased in the experimental group compared to the control group, the number of glands and lumen diameter increased, the thickness of the myometrium decreased, and there was no significant difference in endometrial thickness and diameter of vessel lumen. We showed that the expression of the Hippo signaling pathway proteins YAP1 and TEAD4 were increased in the experimental group and the expression of mTERT was decreased. When the expressions of *YAP1*, *TEAD4*, *mTERT*, *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* and *CRY* were evaluated at the mRNA level, it was determined that *YAP1*, *TEAD4*, *BMAL1*, *CLOCK* and *PER2* expressions did not change between groups, *CRY* expression increased and *mTERT* expression decreased in experimental group. In conclusion, we showed that the effect of circadian rhythm disruption on the mouse uterus may be mediated through the Hippo signaling pathway. We thought that the Hippo signaling pathway may be important in regulating the circadian rhythm of the uterus in cases such as night shifts workers, repetitive light/dark changes or jetlag-like conditions in women. We suggested that Hippo signaling pathway components may be considered as therapeutic targets in unexplained infertility as a result of circadian rhythm disruption.

Keywords: Circadian rhythm, Hippo signaling pathway, mTERT, Uterus.

ÖZET

Aliyeva, E. (2023). Sirkadiyen Ritmin Farede Uterus Üzerindeki Etkisinin Hippo Sinyal Yolağı Üzerinden Gösterilmesi. Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Sirkadiyen ritim, insanlar da dahil olmak üzere tüm memelilerde birçok fizyolojik fonksiyonu koordine etmektedir. Dişi üreme sistemi, merkezi sirkadiyen sistem tarafından düzenlenir. Yapılan araştırmalar ile sirkadiyen ritim genlerinin senkronizasyonunun üreme başarısı için kritik olduğu, ışık ve karanlık döngüsünde meydana gelen herhangi bir bozulmanın annenin uyku düzenini, embriyo gelişiminin erken aşamalarını, fetüsün gelişimini olumsuz olarak etkileyebileceği gösterilmiştir. Biz tez çalışmamızda, sirkadiyen ritim ile uterus arasındaki ilişkinin Hippo sinyal yolağı ve telomeraz aktivitesi ile bağlantılı olabileceğini hipotez ettik. Buradan yola çıkarak, sirkadiyen ritmin bozulduğu hayvanların uteruslarında Hippo sinyal yolağı bileşenleri ve mTERT ekspresyonunu göstermeyi amaçladık. Çalışmamızda, toplam 20 adet BalbC türü 6-8 haftalık dişi fare kullanarak iki grup oluşturduk (n=10). Kontrol grubu fareler bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, deney grubu fareler bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutularak sirkadiyen ritmin bozulması sağlanmıştır. Bir haftalık deney süresinin sonunda fareler dikece edilerek uterus dokuları izole edildi. Deneklerin sağ uterus boynuzu morfolojik analiz ve immünofloresan boyama yapmak üzere doku takibi için fiksatif içerisine alınırken, sol uterus dokusu kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yönteminde kullanılmak üzere izole edildi. İmmünofloresan yöntemi ile PER2, YAP1, TEAD4 ve mTERT lokalizasyonu belirlenirken, qRT-PCR yöntemi ile *YAP1*, *TEAD4* ve *mTERT* ekspresyonları ile sirkadiyen ritim genleri *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* ve *CRY*'in ekspresyonları mRNA düzeyinde gösterildi. Gruplar arasındaki tüm değerlendirmeler, ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($p<0.05$). Elde ettiğimiz bulgular ile, bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu uteruslarda; endometriyumun lümen epiteli kalınlığının deney grubunda kontrol grubuna kıyasla azaldığını, bez sayısı ve lümen çapının arttığını, miyometriyum kalınlığının azaldığını, endometriyum kalınlığı ve damar lümeni çapında ise anlamlı bir farklılık olmadığını belirledik. Hippo sinyal yolağı proteinleri YAP1 ve TEAD4'ün ekspresyonlarının deney grubunda arttığını ve mTERT ekspresyonunun azaldığını gösterdik. *YAP1*, *TEAD4*, *mTERT*, *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* ve *CRY*'in ekspresyonları mRNA düzeyinde değerlendirildiğinde, *YAP1*, *TEAD4*, *BMAL1*, *CLOCK* ve *PER2* ekspresyonlarının değişmediği, *CRY* ekspresyonunun arttığı ve *mTERT* ekspresyonunun azaldığı belirlendi. Sonuç olarak, sirkadiyen ritim bozulmasının farede uterus üzerindeki etkisinin, Hippo sinyal yolağı üzerinden gerçekleşebileceğini gösterdik. Tez çalışmamız sonucu elde ettiğimiz verilerin, gece vardiyasında çalışan kadınlarda, tekrarlayan ışık/karanlık değişimi veya jetlag benzeri durumlarda uterusun kendi sirkadiyen ritminin düzenlenmesinde Hippo sinyal yolağının önemli olabileceğini düşünmekteyiz. Sirkadiyen ritim bozulması neticesinde karşılaşılan açıklanamayan infertilitede, Hippo sinyal yolağı bileşenlerinin terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini önermekteyiz.

Anahtar kelimeler: Sirkadiyen ritim, Hippo sinyal yolağı, mTERT, Uterus.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sirkadiyen ritim, birden fazla fizyolojik durumu kontrol eder. Moleküler düzeyde transkripsiyonel-translasyonel geri besleme döngüleri aracılığıyla işler (1). Gece-gündüz döngüsüne uyarlandığında; organizmaların 24 saatlik günlük döngüleri algılamasını sağlar, bu döngüye uyum sağlamak ve ayrıca davranışsal ve fizyolojik tepkiler oluşturmakta rol oynar (2).

Sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık döngüsünü düzenleyerek kardiyovasküler sistem, bağışıklık sistemi, endokrin ve üreme sistemi gibi hem hücreleri hem de organ sistemlerini etkiler (3, 4). Memeli hücrelerinde; Periyot 1 (PER1), Periyot 2 (PER2), Periyot 3 (PER3), Cryptochrome 1 (CRY1), Cryptochrome 2 (CRY2) ve Beyin ve Kas ARNT benzeri Protein 1 (BMAL1) genleri, sirkadiyen ritim düzenleyicileri olarak bilinir ve bazı sinyal yollarında kritik rol oynarlar (5) .

Sirkadiyen ritimin oluşmasında, sirkadiyen ritim proteinleri arasındaki pozitif ve negatif regülasyon mekanizmaları rol oynamaktadır (6). Moleküler saat, hem CLOCK hem de BMAL arttırıcılar ve Periyod proteinleri (PER1, PER2 ve PER3) ve Kriptokromlar (CRY1 ve CRY2) dahil olmak üzere etkileşimli transkripsiyon faktörlerinden oluşur. Sıçan ve farelerde yapılan çalışmalar ile bu genlerde geceleri ışığa maruz kalmanın ritmik azalmaya neden olduğunu göstermiştir. BMAL1, CLOCK, CRY1, PER2 genlerinin suprakiazmatik çekirdekteki mRNA seviyeleri karaciğer ve yağ dokusu gibi dokularda yapılan çalışmalarda bakılmıştır (7).

Hippo sinyal yolunun tümöröenez ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir ve bu nedenle yeni bir araştırma noktası haline gelmiştir (8-10). Hippo sinyal yolu üç bölümden oluşur: yukarı akış aktif bileşenler, çekirdek moleküller ve aşağı akış efektör moleküller. Yukarı akış aktif bileşenler arasında FAT Atipik Cadherin 4 (FAT4, Yağ homolojisi), FEMD6 (Ex homoloji), nörofibroma protein 2 (NF2, Mer homoloji) ve Dachous1/2 (DCHS1/2) bulunur. Aşağı akış efektör molekülleri, “yes” ile ilişkili proteini (YAP) ve PDZ bağlama motifli (TAZ) transkripsiyonel ko-aktivatörü içerir. Transkripsiyonla ilgili kısımlar, EA alanı aile üyelerini (TEAD'ler) içerir (11).

Telomer kısalması, hücrelerin yaşlanma sürecinde önemli bir görev üstlenmektedir. Telomer uzunluğu, kronolojik yaşımızın bilgisini vermenin aksine biyolojik yaşımızı temsil etmektedir. Birçok bilimsel çalışmanın sonucu, kısa telomerler ile hücrel yaşlanma arasında güçlü bir bağlantı olduğunu göstermektedir (12).

Telomeraz enzimi (telomer terminal transferaz, telomer deoksinükleotidil transferaz), telomer bakımından sorumlu, kromozomların terminal DNA dizileri olan telomerleri uzatan bir holoenzimdir (13). Bu işlev çoğunlukla, dahili bir RNA şablonu (TERC) kullanarak telomerik DNA'ya TTAGGG tekrarları ekleyerek çalışan katalitik alt birimi olan TERT tarafından gerçekleştirilmektedir (13).

Tüm bu literatür bilgileri ışığında, çalışmamızda farede sirkadyen ritim bozulmasının uterus üzerindeki etkisinin Hippo sinyal yolağı üzerinden araştırılması amaçlanmaktadır.



2. GENEL LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Sirkadiyen Ritim

Dünya kendi ve güneşin eksenini etrafında döner, sonuç olarak, aydınlık ve karanlık döngüsündeki günlük değişikliklerin en belirgin olduğu, çevrede düzenli olarak yinelenen bir dizi değişiklik sağlar. Canlı organizmalar, düzenli olarak tekrar eden çevresel değişiklikleri, davranışsal ve fizyolojik tepkileri en iyi şekilde kontrol etmek için, yaklaşık 24 saatlik zamanlama sistemleri geliştirmişlerdir (14).

Fizyolojik süreçler, biyolojik saat (zeitgebers) tarafından düzenlenen bir ritme göre gerçekleşir ve sirkadiyen ritim olarak tanımlanır. Sirkadiyen ritim, uyku-uyanıklık zamanı meydana gelen bir çok değişimi kendi içerisinde barındırır (15). Memeli sirkadiyen sistemi, merkezi bir ana saatin periferik dokulardaki davranışsal, fizyolojik ve gen ekspresyon ritimlerini senkronize ettiği, çok osilatörlü, hiyerarşik olarak organize edilmiş bir sistemdir (16). Uyku bozuklukları, uykusuzluk, uyku ile ilişkili solunum bozuklukları ve uyku-uyanıklık zamanı ile ilgili sapmalar sirkadiyen ritim bozuklukları olarak kategorize edilebilir (17).

Sirkadiyen ritimleri oluşturan süreç ve yapılar sirkadiyen saatler olarak adlandırılır. İnsanlardaki birincil sirkadiyen saat, beynin tabanındaki hipotalamusta yer alan ve suprakiazmatik nucleus (SKN) olarak adlandırılan yaklaşık 20.000 sinir hücresinin eşleştirilmiş bir kümesidir (18). Sirkadiyen saatlerin periyodu yaklaşık 24 saattir; gün boyunca günlük ışık maruziyeti, bu periyotları tam olarak 24 saate ayarlar. Çevreye uygun olarak aydınlık-karanlık ritimlerine ayarlanmış sirkadiyen saatlere sahip olmak, fizyoloji ve davranışı optimize eder (19).

Sirkadiyen ritimlerin senkronizasyonu, bir endojen osilatör kompleksinin (biyolojik saat), "zeitgebers" olarak da bilinen çevresel ipuçları olarak hizmet eden dış uyaranlarla düzenlenmesinde rol oynar. Bu anlamda, günlük aydınlık/karanlık döngüsü, sirkadiyen ritmin birincil osilatörünü (zeitgeber) temsil eder (20). Bununla birlikte, kafein (21) ve diyet polifenoller (22) gibi bazı besinlerin fotik olmayan zeitgeberler gibi davrandığı bildirilmiştir (22).

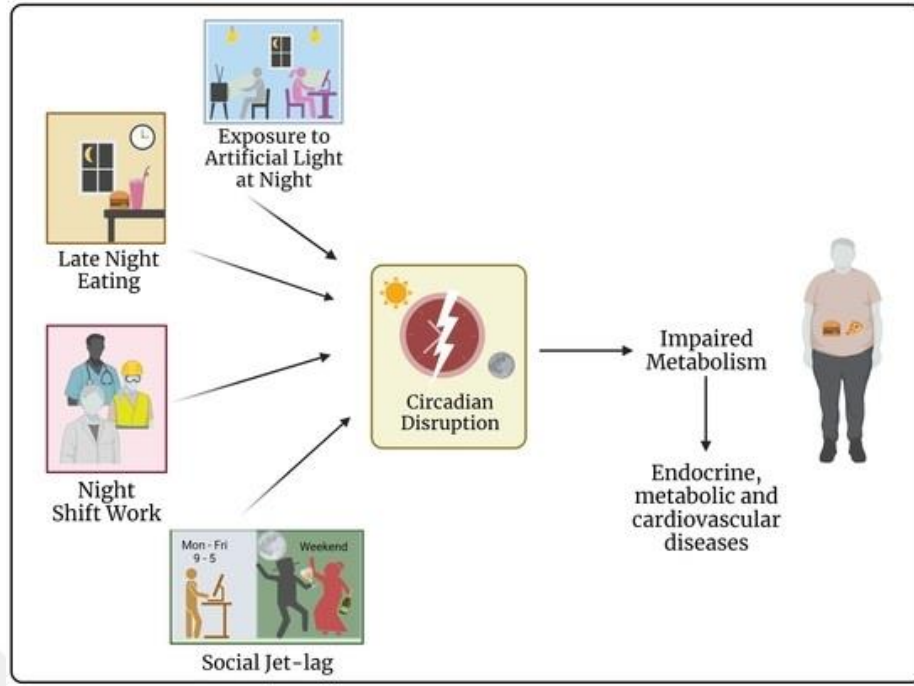
Sirkadiyen saatler, bu gezegendeki yaşamın neredeyse evrensel bir özelliğidir, ancak son 140 yılda elektriğin icadı ve geniş çapta benimsenmesinden bu yana, insanlar hem iç mekanlarda hem de dış mekanlarda ışık süresini ve yoğunluğunu manipüle etmeyi başarmışlardır. Kapalı ortamlar ve bu ortamlarda kullanılan ışık, sirkadiyen ritim

bozulmalarını yaygınlaştırmıştır. Gündüz saatleri dışında ışığa maruz kalma, bu endojen sirkadiyen saatlerin altında yatan genetik mekanizmayı bozmaktadır (23, 24).

Gece vardiyalarını içeren vardiyalı çalışma, vücudun uyku ve uyanıklık zamanlarının düzenlemesini yöneten sirkadiyen biyolojik saati bozar, bu da enerji metabolizmasını etkiler ve kilo alımını arttırabilir (25). Gece uykusu sırasında vücut, glikozun kas enerjisinden ziyade merkezi sinir sistemi tarafından tercihli kullanımına izin vermek için depolanmış glikozun salınması ve nispi insülin direncini (gündüz ile karşılaştırıldığında) destekleyen bir açlık durumundadır (26, 27). Vücudun uykuya programlandığı gece saatlerinde yemek yemek metabolik ortamı bozar (28). Akut deneysel çalışmalar, gece yenen bir yemeğin, gündüz yenen aynı öğüne kıyasla abartılı bir glikoz ve lipid tepkisi oluşturduğunu göstermektedir (29, 30).

2.1.1. Sirkadiyen Ritim Bozulmasına Neden Olan Faktörler

Ulaşım veya endüstriyel tesislerden gelen gürültü gibi gece meydana gelen çevresel gürültü, uyku kalitesinde bozulmalara, metabolic, psikiyatrik ve uyku yapısında değişikliklere neden olabilir (31). Gürültüye maruz kalmanın bir sonucu olarak, (32) farklı uyku evrelerinde harcanan zamanın yeniden dağılımı uyanıklığın ve birinci aşama uykunun artması, yavaş dalga uykusu ve REM uykusunun azalması-kognitif performansı, ruh halini ve enerji restorasyonunu olumsuz etkilerken gündüz uyku durumunu artırmaktadır (33). Gece ortam gürültüsüne maruz kalma, merkezi sirkadiyen saatin düzensizliği ile ilişkilidir ve periferik saat genlerindeki değişimlere neden olabilmektedir (Şekil 2.1.) (34).



Şekil 2.1. Sirkadiyen ritmin bozulmasına neden olan faktörler (32).

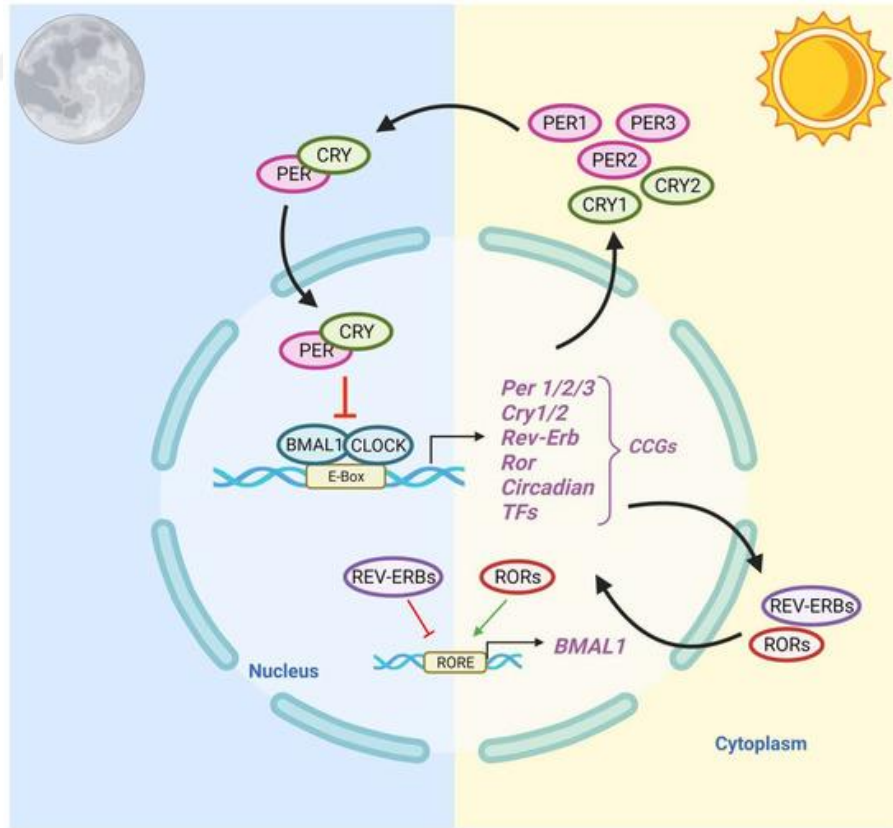
Sirkadiyen ritm bozulması (SRB), jetlag ile prostat kanserine neden olabilir. Daha uzun havada kalma saatleri, çalışma yılı ve radyasyona maruz kalmak artan prostat kanseri riski ile pozitif korelasyon göstermektedir (35, 36). Genel popülasyonda erkek pilotlarda prostat kanseri oluşma riski normal işlerde çalışan erkeklerden en az iki kat daha fazladır. Askeri pilotlar dahil olmak üzere birçok alt grubun prostat kanseri için yüksek riske sahip olduğu gösterilmiştir (37, 38).

Gece vardiyasında çalışmanın kanser riski üzerindeki etkisini ortaya koyan çok sayıda çalışma mevcuttur. 2017'de Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, sirkadiyen bozulmayla bağlantılı olarak vardiyalı çalışmayı olası bir insan kanserojeni olarak tanımlayarak ultraviyole radyasyon, benzo(a)piren ve akrilamid ile aynı risk kategorisine yerleştirmiştir (39, 40).

2.1.2. Sirkadiyen Ritmin Moleküler Mekanizması

1997 yılında yapılan bir araştırmada suprakiazmatik çekirdekte bulunan nöronların 24 saatlik bir moleküler döngü oluşturduğu gösterilmiştir (41, 42). Bu çalışmalarla birlikte, bu alandaki en şaşırtıcı bulgulardan biri, hücresel-moleküler saat mekanizmalarının sadece beyinde değil, vücudun neredeyse tüm hücrelerinde bulunduğu belirlenmiştir (43).

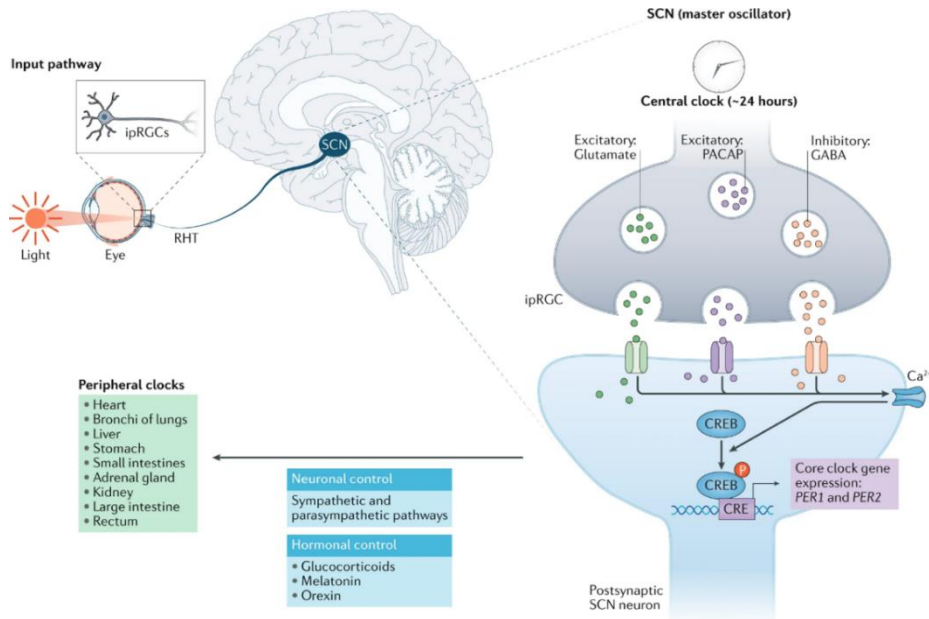
SKN, gündüz-gece döngüsüne öncelikle ışıkla senkronize edilirken, periferik osilatörler hem SKN sinyalleri hem de yemek yeme gibi davranışlarla senkronize edilir. Sirkadiyen ve homeostatik uyku düzenleyici süreçlerin etkileşiminin, uykunun zamanlamasını, süresini ve ilişkili fizyolojiyi kontrol ettiği bilinmektedir, ancak insanlarda uyku ihtiyacının düzenlenmesi ve işlevinin biyolojik ve moleküler temeli tam olarak anlaşılamamıştır (44-46). Memelilerde, sirkadiyen saat sistemi, sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyonuna yol açan, birbirine bağımlı bir dizi pozitif ve negatif transkripsiyon geri besleme döngüsü yoluyla hücresel seviyelerde üretilir. Pozitif döngü, BMAL1 (Beyin ve Kas ARNT benzeri 1) ve CLOCK (Sirkadiyen Lokomotor Çıktı Döngüleri Bozuk) proteinlerinin kodlayan genlerden oluşur. Bu proteinler, sonuçta kendisini Periyod (PER), Kriptokrom (38) genlerinin bir sıklık AMP yanıt elemanına (CRE)/E-box elemanına (E-box) bağlayan ve bunların transkripsiyonunu (47) destekleyen bir heterodimer oluşturur. Öncülleri BMAL1 ve CLOCK'a benzer şekilde, PER ve CRY'de dimerize olabilir, Kazein Kinaz 1'e (CK1) bağlanabilir ve son olarak hücre çekirdeğine geçerek BMAL1/CLOCK dimerine bağlanarak transkripsiyonel aşamayı engeller (negatif döngüler) (48, 49).



Şekil 2.2. Sirkadiyen saat moleküler mekanizması, negatif ve pozitif döngüler (50).

İkinci bir transkripsiyonel döngüde CLOCK/BMAL1, REV-ERB olarak da bilinen nükleer reseptörler için genlerin NR1D1 (Nükleer Reseptör alt ailesi 1, grup D, üye 1). transkripsiyonunu aktive eder. Bu proteinler, hem pozitif (51) hem de negatif (REV-ERB) transkripsiyonel düzenleme sağlayan BMAL1 geni üzerindeki ROR bağlayıcı elementlerin (RORE) bağlanma bölgeleri için retinoik asitle ilişkili orphan reseptörler (51) ile etkileşirler (Şekil 2.2) (48).

Öte yandan, biyolojik saat sadece transkripsiyonel mekanizmalara dayalı değildir, aynı zamanda membran depolarizasyonu, hücre içi kalsiyum akışı ve siklik AMP (52) (Şekil 2.3) sinyalinin aktivasyonu, memeli transkripsiyonel saatinin önemli düzenleyicileri olarak bilinmektedir (53). Buna göre hücre içi kalsiyum, SKN dilimlerinde (54) nöronal aktivasyon ritimleri için esastır ve SKN nöronlarında (55-57) çekirdek saat bileşenlerinin ritmik ekspresyonu için yeterli membran depolarizasyonu, periyodik kalsiyum akışı ve cAMP sinyalinin günlük aktivasyonu gereklidir. Özellikle, bu tür etkilere, DNA üzerindeki kalsiyum/cAMP düzenleyici elementlere (CRE'ler) bağlanan kalsiyum/cAMP yanıt elementi bağlayıcı proteinin (CREB) fosforilasyona bağımlı aktivasyonu aracılık eder. PER1 ve PER2 (57, 58) gibi birkaç sirkadiyen ritim geninin promotörlerinde CRE dizileri bulunmuştur. Membran potansiyeli (59), kalsiyum akışı (54) ve cAMP sinyalinin (55, 57) aktivasyonunun da SKN'de ritmik olduğu rapor edildiğinden, muhtemelen ritim oluşumuna katılan pozitif geri besleme döngüleri kurarak transkripsiyonel saatin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Membran depolarizasyonu sonucunda SKN ve cAMP sinyalinin ilişkisi (53).

SKN, epifiz bezinde ve adrenal kortekste önemli rol oynar. Epifiz bezinden melatonin salgılanmasını ve adrenal kortekste de glukokortikoid ile katekolaminlerin salgılanmasında görev alır. Endokrin sinyaller aracılığıyla hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen (60, 61) sirkadiyen ritim döngüsünü düzenlemektedirler.

2.1.3. Sirkadiyen Ritim ve Metabolik Bozukluklar

Sirkadiyen ritim bozulması (tercih edilenden daha erken veya daha geç uyumak olarak tanımlanır) meme kanseri olan kadınlarda kanserin daha hızlı ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (62). Ayrıca, ABD'de yapılan bir araştırma erkeklerde vardiyalı çalışma ile prostata özgü antijen artışı arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (63).

İnsanlar da dahil olmak üzere tüm memeli türlerinde, dişi üreme sisteminin gelişiminde sirkadiyen ritim önemli rol oynar. Örneğin, düzensiz uyku veya çalışma programlarına sahip kadınların doğurganlığı daha düşük olup, düşük yapma şansı daha yüksektir (64). İnsanlara benzer şekilde sıçanlar, sirkadiyen ritimlerdeki değişikliklerin bir sonucu olarak ovulasyon, doğurganlık ve cinsel dürtüde önemli anormallikler sergiler (65, 66).

Epidemiyolojik çalışmalar, geceleri trafik gürültüsüne maruz kalmanın hipertansiyon, kalp hastalığı ve felç geçirme riskini artırdığını bulmuştur. Gece gürültüsü, kortizol, noradrenalin ve adrenalin dahil olmak üzere endokrin hormonların daha fazla salgılanması ile kardiyovasküler komorbidite riskinin artmasına neden olmaktadır (31).

İspanyol kohortunda, daha uzun çalışma saatleri olan işçilerin kötü prognozlu tümörlere sahip olma olasılığı daha yüksek iken, yapılan başka bir kontrollü vaka çalışması, gece vardiyasında çalışan işçilerin, gece vardiyasında çalışmayan işçilere kıyasla daha yüksek prostat kanseri riskine sahip olduğunu göstermiştir. Bu risk, daha uzun süre ışığa maruz kalındığında artmakta ve yüksek riskli prostat tümörleri için daha belirgin olarak bildirilmektedir (67). Kanada'da yapılan bir popülasyon çalışmasında, çalışma süresinden bağımsız olarak gece çalışanlarında prostat kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir (67, 68).

2.2. Dişi Üreme Organları

Dişilerdeki üreme sistemi, oositin olgunlaşması, ovulasyon, seks hormonlarının üretilmesi, fertilizasyondan sonra gelişen embriyo ve fetusun korunarak doğuma hazır hale gelmesinden sorumludur. Bir dişinin üreme hayatı, puberte ile menopoz arasındaki

süreçtir. Bu dönemde, olgunlaşan oositlerin atılımı gerçekleşir. Oositlerin her ay döngüsel olarak atılmasıyla, ovarial ve menstrüel siklus gerçekleşir (69).

Ovaryumlar; oogenezin, folikülogenezin, ovulasyonun gerçekleştiği ve seks hormonlarının salgılandığı dişi gonadlardır. Ovaryumlar, korteks ve medulla olarak adlandırılan iki kısımdan oluşmaktadır. Kortekste gelişimin farklı aşamalarında bulunan foliküller izlenirken, içteki medullada ise kan damarları ve bağ dokusu bulunur (70).

Fallop tüpleri, oosit veya zigotun ovaryumlardan uterusu taşınmasına yardımcı olan bir organlardır (71). Her bir fallop tüpünün ovaryuma en yakın kısmı fimbria olarak adlandırılır, ovule olan oositin fallop tüpünün içine alınmasına ve taşınmasına yardımcı olan parmak benzeri çıkıntılardır. Tüpün en geniş lümenine sahip kısmı ampulladır ve fertilizasyon burada gerçekleşir. Uterusa doğru ilerledikçe lümen daralır. Fallop tüpü daha sonra interstisyel kısımdan uterusu geçer (72). Bu kısım oositin fallop tüpünden çıkıp uterus boşluğuna girdiği yerdir.

2.2.1. Uterus

Uterus, gövde ve serviks olmak üzere iki kısımdan oluşur. Uterin gövdenin üst kısmı fundus iken, servikse bitişik olan alt kısım isthmus/alt uterin segment olarak adlandırılır. Uterinal duvar; endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç farklı tabakadan oluşmaktadır. Endometriyum uterusun iç kısmını döşeyen lümen epitelidir, kalınlığı ve yapısı hormonal uyarı ile değişir. Miyometriyum düz kas hücrelerinden oluşur ve uterus duvarının orta ve en kalın tabakasıdır. Perimetriyum; uterusun en dış tabakasıdır, bağ dokudan oluşmuştur ve organı dıştan sarar (73).

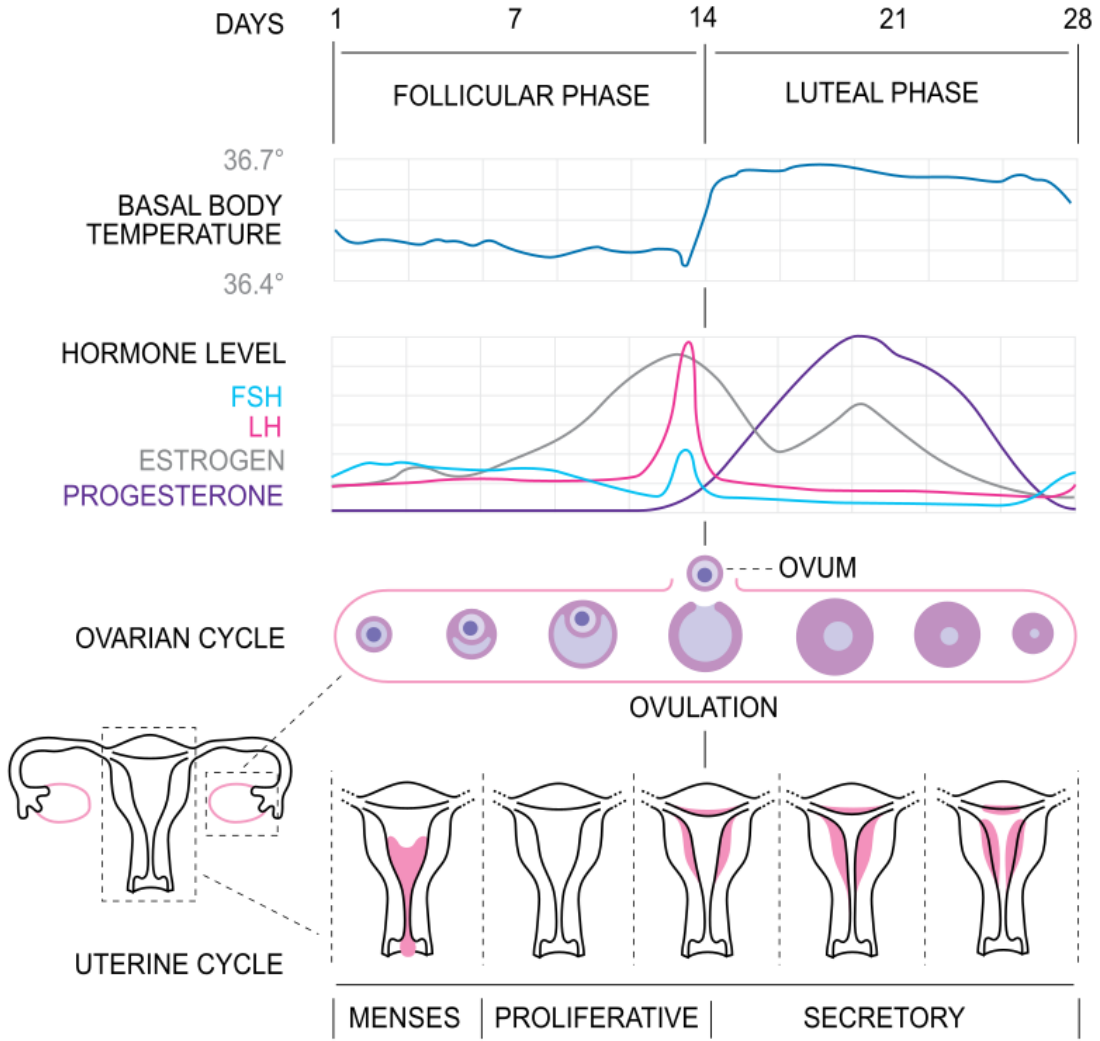
Endometriyum, epitel hücrelerinden, stromal hücrelerden (popülasyonun büyük kısmı), bağışıklık hücrelerinden ve damar sistemini oluşturan endotel hücrelerinden oluşur. Uterusun epitel hücreleri iki çeşittir. Luminal epitel hücreleri uterusun lümenine bakar. Diğerleri uterus bezlerini oluşturmak için endometriyal stromaya miyometriyumun tabanına doğru yayılır. Endometriyumun tamamı, popülasyonunu yenilemek ve böylece sağlığını güvence altına almak için sıkı hormonal düzenleme altında döngüsel olarak dinamik bir şekilde yeniden şekillenmeye maruz kalır (74).

Serviks, uterus boşluğu ve vajina ile bitişik, ikisi arasında bir kanal görevi gören bir yapıdır. Alt serviks servikal osta, üst serviks ise vajinaya açılır. Vajinanın içine doğru çıkıntı yapan serviks kısmına ektoserviks denir ve çok katlı yassı epitelden oluşur. Servikal kanalın içini kaplayan, kolumnar epitelden oluşan endoservikstir (71, 75).

2.2.1.1. Uterinal siklus (Menstural siklus)

Hem kadınlarda hem de erkeklerde hormonal düzenleme hipotalamus ve hipofiz bezi tarafından kontrol edilir. Cinsiyetler arasındaki hormonal düzenlemedeki temel fark, değişimin sıklığıdır, yani kadınlar, yaşamları boyunca meydana gelen değişikliklere ek olarak her ay tam bir dişi üreme döngüsü yaşarken, erkeklerde hormonal değişiklikler yaşamları boyunca meydana gelir. Hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) etkisi altında ön hipofiz bezinde gonadotrop hücreleri uyarılarak ovarial ve uterinal siklus için gerekli iki hormon olan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormonun (36) salınır (76). Bu hormonların konsantrasyonu, estradiol salınımında bir geri bildirim etkisine sahip olduğundan, menstrual döngü sırasında dalgalanma izlenir. Siklusun çoğunda estradiol, GnRH üzerinde homeostatik negatif geri bildirimi uygular (77). Siklusun ortalama uzunluğu 28 gündür (78) ve dört aşamaya ayrılabilir (Şekil 2.4): ilk olarak döngünün 1-5. günleri olarak tanımlanan menstural faz, bu faz için 1. gün mensturasyonun ilk günüdür (mensturasyon siklusunun başlangıcı). İkinci aşama siklusun 5-14. günleri olarak tanımlanan foliküler fazdır (14. gün – ovulasyon). Üçüncü aşama ise döngünün 15-27. günleri olarak tanımlanan luteal fazdır ve son aşama döngünün 27-28. günleri olarak tanımlanan iskemik faz olarak tanımlanmaktadır. Ovulasyon süreci ise tipik olarak 16. günde biter (bir sonraki mensturasyon döngüsünün başlamasından 12-14 gün önce). Bu fazlara estradiol ve progesteron gibi farklı hormonlar etki etmektedir (69). Foliküler fazın sonunda, estradiol seviyeleri yükselir ve bu da pozitif geri bildirim ve GnRH'nin salınmasına yol açar, LH ve FSH'ı stimüle ederek ovulasyonu başlatır. GnRH salınımı, her iki gonadotropinin salınım oranını belirler. Östradiol seviyesinin menstrel siklus sırasında dalgalanma göstermesi ile luteal fazda FSH salgılanması pik seviyeye ulaşır. Böylece folikül gelişimi desteklenir. Yüksek estradiol seviyeleri, pozitif geri bildirim ve LH'nin salınmasına neden olur, bu da sonuç olarak sekresyonunu artırır. Yüksek LH seviyesi ovulasyonu ve dominant folikülün salınmasını tetikler (genellikle 28 günlük bir döngünün 14. gününde) (79) (Şekil 2.4).

Ovulasyon sonrası (14. gün), östradiol seviyesi düştükçe LH seviyesinin düştüğü luteal faz başlar (76). Korpus luteum, estradiol ve progesteron üretir, progesteron seviyesi bu aşamada artmaya başlar ve 21. gün civarında zirveye ulaşır (80) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Menstrual siklus ve hormonal regülasyonu (81).

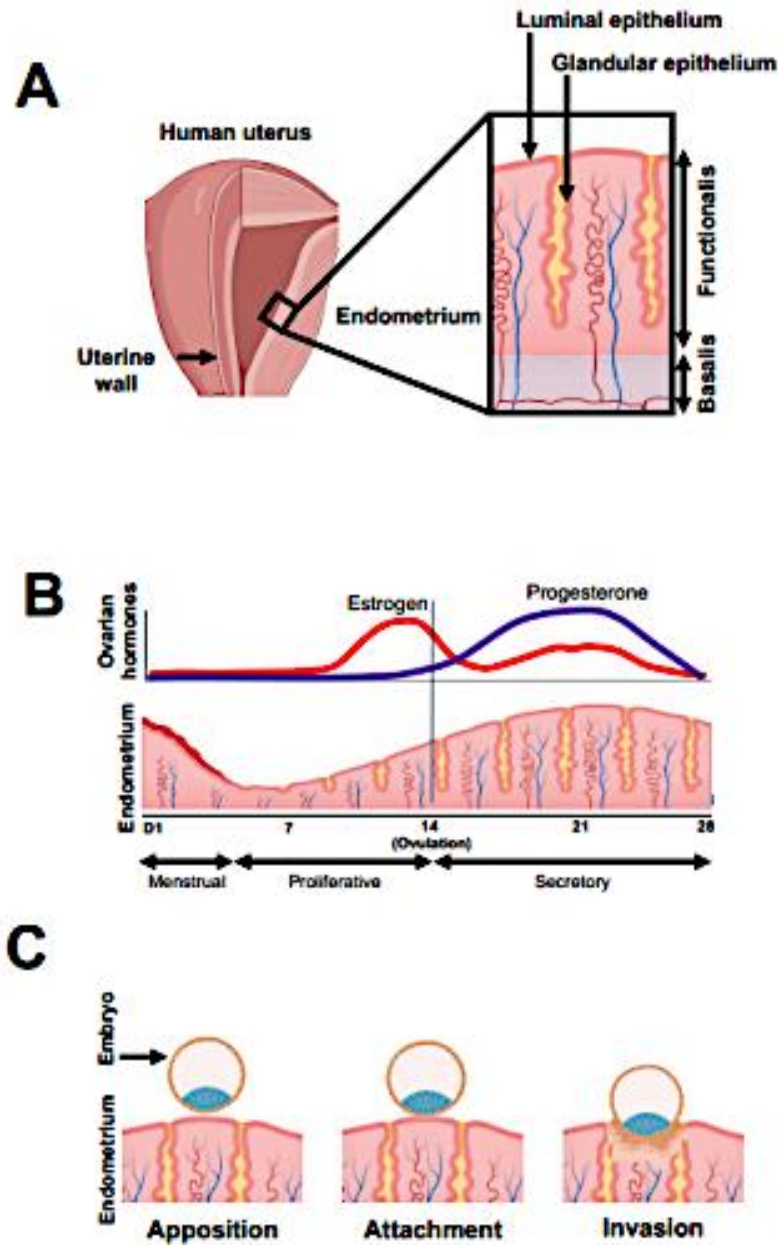
2.2.1.2. İmplantasyon

Endometriyumun temel işlevlerinden biri, embriyoyunun implantasyonunu sağlamak ve ona destek olmaktır. Paradoksal olarak, endometriyum, menstrual siklus boyunca embriyo implantasyonuna dirençlidir (82). Fare, rat, kobay ve insan için uterus anatomisi farklıdır (Şekil 2.5.). Bu hayvanlarda uterus uzun tüp şeklindedir. İnsanlarda ise piramit benzeri bir yapıdadır. Uterus histolojisine baktığımızda yine her canlı için uterusun farklı yapıda olduğunu inceleyebiliriz. Ayrıca bir batında doğan yavru sayısı da farklılık göstermektedir. Bazı literatürlerde bu durumun canlının boyutu ile ters orantılı olduğu söylenir yani, boyut büyüdükçe bir batında doğan yavru sayı azalmaktadır, ancak aksine gebelik süresi uzar.

	mouse	rat	guinea pig	human
uterine anatomy	bicornuate	bicornuate	bicornuate	pyriform
uterine histology	defined muscle layers	defined muscle layers	defined muscle layers	mixed muscle layers
offspring number	4-9 pups	5-12 pups	1-7 pups	1-2 children
gestation length	19-20.5 days	22-23 days	62-71 days	259-294 days

Şekil 2.5. Memelilerde uterus farklılıkları, kas farklılığı, bir batında doğan yavru sayısı ve gebelik süreleri (83).

Endometriyumda, embriyonun yerleşebileceği aşamaya "implantasyon penceresi" denir (Şekil 2.7.). Östrojen ve progesteron etkisi altında oluşan bu pencere, çoğu primatta yaklaşık 3 ila 5 gün, kemirgenlerde ise birkaç saat sürer (82, 84). Reseptif endometriyum, pinopod adı verilen apikal çıkıntıların varlığı ile karakterize edilir (85). Pinopodların varlığının yanı sıra, luminal epitel yalancı çok katlı, kolumnar ve polarizedir. Bezler büyük, oldukça kıvrımlıdır ve çok fazla sıvı salgılar. Endometriyal stroma ödemlidir ve doku oldukça vaskülerizedir.



Şekil 2.6. İnsan uterus endometriyumu, hormon seviyesi ve implantasyon bölgesi (86).

Endometriyal reseptivite, blastosist implantasyonu için bir ön koşuldur. İmplantasyon sırasında, tüy benzeri epitel hücresi mikrovillusları geçici olarak 'pinopod' adı verilen bir yapı halini alır.

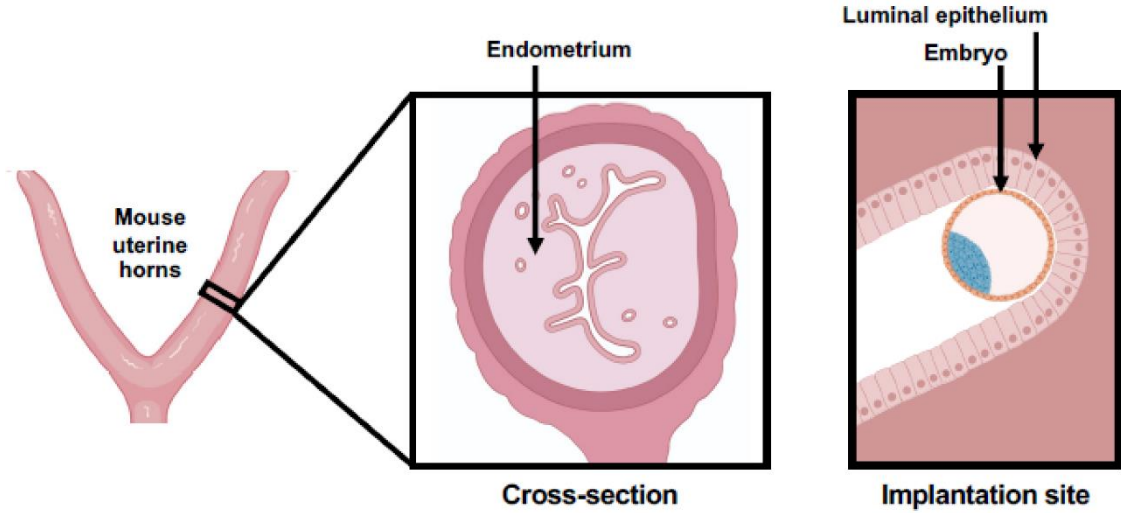
Elektron mikroskobu ile incelendiğinde, pinopodların ovulasyondan yaklaşık 1 hafta sonra ortaya çıktığı ve sadece 2 gün içinde gelişip gerilediği görülmektedir. İlginç bir şekilde, pinopodların ortaya çıktığı siklus günleri, farklı bireyler arasında 5 güne kadar değişebilir. Ortalama olarak, doğal döngülerde 20-21. günlerde; hormon ile uyarılmış döngülerde ise

daha erken (19-20. günlerde) ortaya çıkarlar. Pinopodların fazla sayıda olması, implantasyon başarısı ile ilgilidir ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan birçok hastada pinopod oluşumu gerçekleşemez (85).

Yaygın inanın aksine, hamileliğin başlaması için maternal olarak anne endometriumuna embriyonun kabulü çok yönlü baskılayıcı faktörler bakımından karmaşık bir durumdadır. Embriyo implantasyonunun üç aşamalı bir süreç içerdiği bilinmektedir. (Şekil.2.6.). İlk olarak, alıcı bir endometriumun tanımlanması, ikincisi implantasyondan önce alıcı endometriyuma blastosistin ulaşması, son olarak desidualizasyon ve plasantasyon ile sonuçlanan embriyo ve trofoblast invazyonunun oluşması gerçekleşmektedir. (87).

İmplantasyon birbirine bağımlı ve oldukça karmaşık aşamalardan oluşmaktadır. Başlıca bu aşamalar; apozisyon, adezyon ve invazyondur (88). İnsan blastosisti yaklaşık 1-3 gün boyunca uterin kavite içerisinde bulunmaktadır. İmplantasyonun gerçekleştiği yer uterusun 1/3'lük kısmıdır. İmplantasyon, çoğunlukla morulanın ovuduktı geçerek uterusu girişini takip eder ve 2-4 gün sonra, blastosistin uterusun epiteline karşı pozisyon alması ile başlar. Blastosist endometriyuma implantasyona hazırlanarak implante olacağı alana doğru yönelir. Apozisyon, blastosistin embriyonik kutbuyla endometrium duvarına temas etmesidir (89). Ovulasyondan 6-7 gün sonra ise adezyon yani tutunma fazı, endometriyuma "implantasyon penceresi" (Şekil 2.7.) olarak adlandırılan zamana denk gelmektedir.

Blastosistin trofoektodermi ile endometriumun yüzey epiteli arasında doğrudan temas meydana gelir (90). İnvazyon, gömülme fazı anlamına gelir. Bu fazda trofoblast hücreleri, endometrium epitelinin bazal membranını aşarak buradaki stromaya geçer ve uterus damarlarına ulaşır (91). Blastosist, gelişimin 11-12. gününde endometriyuma tamamen gömülmektedir ve implantasyon bölgesindeki hasar, yüzey epiteli ile örtülmüş durumdadır (88). Plaseenta oluştuğu zaman ise implantasyon tamamlanmış olur (90).



Şekil 2.7. Fare uterusu, enine kesitinde endometriyum ve implantasyon bölgesi (86).

İnsanda implantasyon süreci, oosit matürasyonunun erken dönemlerinde başlayan, embriyo ve endometriyum arasındaki kompleks bir ilişki ile kontrol edilmektedir. İmplantasyonda bazı olaylar inflamatuvar, bazıları da tümör invazyon olayları ile benzerlik gösterir. Ancak bunların aksine, implantasyon tamamen kontrollü ve çeşitli faktörlerle düzenlenen birçok olayı içermektedir (90, 91).

2.2.2. Hipotalamik Hipofizer Gonadal Eksen

Luteinize edici hormon (36) artışı ile ovulasyon döngüsünün oluşumu başlar (92). Hipofiz bezinden gonadotropik hormonların salınması için GnRH pulsatilitesi gereklidir (93-95) ve "GnRH puls üretici" olarak adlandırılan bir mekanizma gerçekleşir. Pulsatil GnRH sekresyonu, arkuat çekirdeğin (ARC) hipotalamik kisspeptin nöronları tarafından üretilir. Bu hücreler, her 90 dakikada bir senkronize GnRH salınımı oluşturarak pulsatil hipofiz gonadotropin salgılanmasını sağlarlar. Plazma gonadal steroid seviyelerindeki pulsatilite geçici olarak pulsatil hipofiz gonadotropin ile bağlantılıdır.

GnRH pulsatilite frekansı, salınan FSH'a karşı LH oranını belirler. GnRH'nin düşük frekans pulsatilitesi FSH sentezini desteklerken yüksek frekans pulsatilitesi LH sentezini kolaylaştırır (96). Her iki cinsiyette de testosteron (T) ve progesteron (P) pikleri, LH pikinin zirvesinden yaklaşık 10–40 dakika sonra ortaya çıkar. Östrojenler T ve P pikleri ile eşzamanlı sentezlenirler. Kadınlarda, LH ve östradiolün (E2) epizodik salgılanması, menstrual döngü boyunca sistematik değişikliklerle ilişkilidir. LH ve E2'nin salınımları arasındaki aralıklar foliküler faz boyunca sürekli olarak azalır ve luteal faz sırasında önemli ölçüde artar (94). Bununla birlikte, GnRH salınımlarının frekansı

ovulasyon sırasında artmaz, bu da ovulatuvar LH artışının altında başka bir mekanizmanın varlığını gösterir (97).

Gonadotropik hormonların ve ovaryum hormonlarının yukarıda belirtilen pulsatilitesi SKN tarafından düzenlenir. SKN, hormonal salınımlarla ilgili bilgileri entegre ederek, LH salınımının pik yaparak ovulasyonun oluşmasında anahtar haline gelir. Çevresel ışık ipuçları, AVP'nin (Arginin Vasopressinin) zamanlamasını ve SKN'den VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) salınımını senkronize eder. Öğleden sonra, yüksek dolaşımdaki E2 koşulu altında, VIP doğrudan GnRH nöronlarını aktive eder. Vasopressin, rostral hipotalamik bölgelerdeki POA/AVPV'de bulunan kisspeptin nöronları üzerinde pozitif geri bildirim sağlar (98). Ek olarak, preoptik alandaki (POA)/anteroventral periventriküler çekirdekteki (AVPV) Kisspeptin nöronları hem erkeklerde hem de kadınlarda GnRH pulsatilitesi üretirken, sadece dişilerde POA/AVPV bölgesindeki kisspeptin nöronları preovulatuvar GnRH/LH artışına aracılık eder. Bu nedenle, anatomik olarak farklı hipotalamik bölgeler ve nöropeptit projeksiyon yolları, LH dalgalanması ve GnRH pulsı zamanlaması için kritik öneme sahiptir.

Kisspeptin, östrojen gibi seks steroidlerinin HPG eksenini yoluyla salgılanmasını düzenler (99). Kisspeptin sinyali, GnRH'nin pulsatil ve mensturasyon döngüsü dahil üreme aktivitesinin zamanlaması için gereklidir (51, 100). GnRH sekresyonunun dolaşımdaki hormonlar, kisspeptin ve nörotransmitterler tarafından düzenlendiği bilinmektedir (101-105). Kisspeptine yanıt veren GnRH salınımındaki günlük değişiklikler de bildirilmiştir (106). GnRH sisteminin kisspeptin stimülasyonuna duyarlılığı gün içinde önemli ölçüde dalgalanma gösterir ve öğleden sonra zirveye ulaşır (107). Kisspeptin nöronları, hipotalamusun AVPV ve ARC çekirdeklerinde bulunur ve SCN, AVPV çekirdeğini kontrol eder. Aktivitesi E2'ye bağımlı bir şekilde SCN sinyalleri tarafından düzenlenen AVPV kisspeptin nöronları, LH artışının kontrolünden sorumludur (108). ARC'deki kisspeptin nöronları, SCN sinyallerinden daha fazla E2 ve leptinden etkilense de (109), infertiliteyi etkileyen bir faktör olarak sirkadiyen düzensizliğin etkileri (örn. kahvaltıyı atlama, vardiyalı çalışma ve transmeridyen seyahat) gözardı edilemez (110-112).

2.3. Hippo Sinyal Yolağı

Hippo sinyal yolağı, hücre proliferasyonu inhibe ve apoptozu aktive ederek organ gelişimini düzenleyen, ilk olarak *Drosophila melanogaster*'da keşfedilen, evrimsel süreç

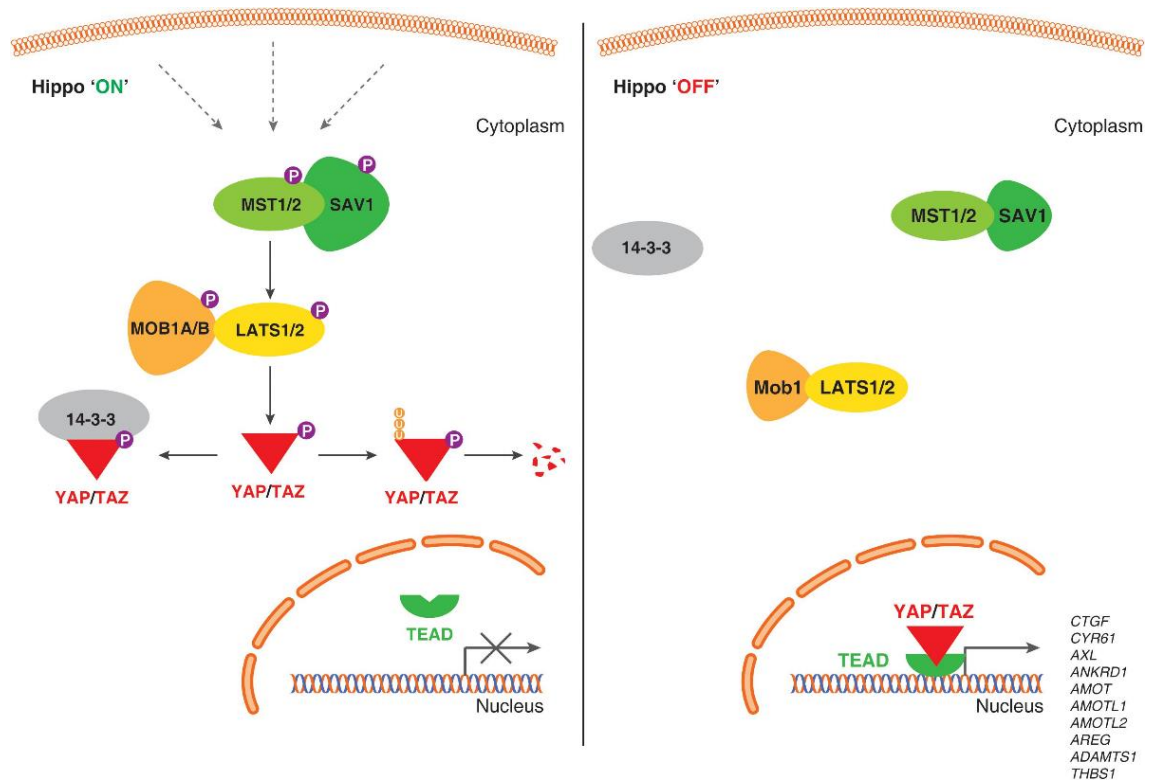
boyunca korunmuş bir sinyal yolağıdır (113). Son yıllarda, Hippo sinyal yolağının tümör oluşumu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiş ve bu nedenle yeni bir araştırma konusu haline gelmiştir (8-10).

Hippo sinyal yolağı yukarı akış efektör bileşenler, çekirdek bileşenleri ve aşağı akış efektör bileşenleri olmak üzere üç bölümden oluşur. Yukarı akış efektör bileşenler arasında FAT Atipik Cadherin 4 (FAT4, Yağ homolojisi), FEMD6 (Ex homoloji), nörofibroma protein 2 (NF2, Mer homoloji) ve Dachous1/2 (DCHS1/2) bulunur. Aşağı akış efektör molekülleri, “YES” ile ilişkili proteini (YAP) ve PDZ bağlama motifli (TAZ) transkripsiyonel ko-aktivatörü içerir. Transkripsiyonla ilgili kısımlar, TEA alanı aile üyelerini (TEAD'ler) kapsamaktadır (11) (Şekil 2.8).

Normal fizyolojik durumda, Hippo sinyal yolağı aktivitesi sıkı bir şekilde düzenlenir. Hippo sinyal yolağı aktif olduğunda, MST1/2 veya MAP4K'ler aktive edilir, bunlar daha sonra LATS1/2 kinazı fosforile eder ve SAV1 ile bir kompleks oluşturur. Daha sonra YAP/TAZ'ı, sitoplazmik 14-3-3 proteinlerini daha fazla bağlayan ve YAP/TAZ'ın sitoplazmik ayrışmasına neden olan başka bir iskele proteini MOB1 ile kompleks halinde fosforile eder. Ardından proteaz tarafından parçalanır ve sonuçta hücre çoğalmasını engeller (114). Hippo sinyali inaktif olduğunda, YAP/TAZ çekirdeğe taşınır ve gen ekspresyonunu düzenlemek için TEAD1-4 ile etkileşime girer (Şekil 2.8). Böylece gen transkripsiyonunu aktive eder, sonuçta doku büyümesini teşvik ederek apoptozu inhibe eder (115). Bu yolaktaki herhangi bir molekül mutasyona uğrarsa veya anormal şekilde eksprese edilirse, hücre proliferasyonu ile apoptoz arasındaki denge bozularak anormal doku proliferasyonu veya tümör oluşumuna yol açar. Yüksek hücre yoğunluğunda hücre-hücre teması, organ gelişimindeki fiziksel kısıtlamalara ve hücre dışı mekanik uyarılara uyum sağlayan ve büyümeyi inhibe eden sinyal ortaya çıkarır (116). Konfluent hücrelerde artan yapıştırıcı bağlantı ve sıkı bağlantılar Hippo sinyal yolağını aktive eder (117). Yolağın aktive edilmesi üzerine, memeli STE20 benzeri kinaz 1 ve 2'nin (MST1/2) (Şekil 2.8.) ana bileşenleri, aşağı akış kinazı, büyük tümör baskılayıcı 1 ve 2'yi (LATS1/2) (118) fosforile eder. Adaptör proteini yardımıyla fosforile edilmiş LATS1/2, Mps bir bağlayıcı 1 (MOB1), ardından fosforile YAP/TAZ, 14-3-3 proteinlerinin tanınması yoluyla sitoplazmik değişimlere katkıda bulunur (119). YAP/TAZ'ın fosforilasyonu, SCF E3 ubiquitin ligazını toplayarak sonraki proteasomal degradasyona yol açar (120, 121). Hücre yoğunluğu düşük olduğunda, LATS1/2 inaktiftir ve fosforile olmayan YAP/TAZ çekirdeğe taşınır (122). DNA bağlama alanının

yokluğunda, YAP/TAZ'ın hedef gen ekspresyonunu ikili olarak düzenlemek için transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel geliştirilmiş ortak alan (TEAD) ailesine bağlanması ve onunla etkileşime girmesi gerekir (123, 124). Nükleer YAP/TAZ-TEAD kompleksi, transkripsiyonu geliştirmek için NCOA6 histon metiltransferaz kompleksini stimüle edebilir (125, 126) veya transkripsiyonu baskılamak için nükleozom yeniden modelleme ve deasetilasyon (NuRD) kompleksini aktive eder (127). Hippo yolağında aşağı akış transkripsiyonel kofaktörler olarak görev yapan YAP/TAZ, yaklaşık %50 amino asit sekans özdeşliği (128) ve TEAD'da (129) aynı bağlanma bölgesini paylaşır (129). Genel olarak, MST1/2 ve LATS1/2 kinaz kaskadı, fosforilasyon yoluyla YAP/TAZ aktivitelerini inhibe ederek farklı biyolojik olaylara neden olur (Şekil 2.8).

Memelilerde, MST1/2'nin NDR1/2 (130) gibi Hippo'nun çekirdekte olmayan diğer bileşenlerini fosforile ettiği görülmektedir. Benzer şekilde MST1/2, LATS1/2'nin tek aktivasyon yolu değildir. Enerji stresine ve besin yoksunluğuna yanıt olarak, mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAP4K'ler), YAP/TAZ'ın sitoplazmik ekspresyonunu stimüle etmek için LATS1/2'yi doğrudan fosforile edebilir ve aktive edebilir (131). Diğer mekanizmaların da LATS kinazını etkilemeden YAP/TAZ'ın hücre altı lokalizasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini doğrudan etkilediği bildirilmiştir (116, 132) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Hippo sinyal yolağı mekanizması (133).

2.3.1. Uterus Endometriyumunda Hippo Sinyal Yolağı

Yapılan çalışmalar ile YAP ekspresyonu, endometriyal stromal hücrelerde ve desidual hücrelerde gösterilmiştir (134). Endometriyal stromal hücrelerin korunması, implantasyon başarısı ve gebeliğin sürdürülmesi için önemlidir. YAP'ın, insan desidual hücrelerinde ekspresyonu artar ve desidual hücrelerdeki YAP ekspresyon seviyesi, gebe olmayan kadınların endometriyal stromal hücrelerinden daha yüksektir (134). Endometriyozisli kadınlarda endometriyal stromal hücrelerde YAP'ın mRNA düzeyi, endometriyozissiz kadınlara kıyasla daha yüksektir (135-137). mTOR'un endometriyal stromal hücrelerde çok fazla eksprese edildiği bilinmektedir. Bu durum otofajinin azaldığını gösterir. YAP ekspresyonunun, endometriyal stromal hücrelerde mTOR-otofaji yoluna aracılık ederek hücrel otofajiyi etkilediği, endometriyal stromal hücrelerin mTOR inhibitörü rapamisin ile tedavisinin, otofajiyi iyileştirdiği ve YAP ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, endometriyal stromal hücrelerde YAP ve otofaji arasında negatif bir düzenleyici ilişki olduğunu düşündürmüştür (135). Bu nedenle YAP, endometriyozis tedavisi için bir biyobelirteç olarak düşünülmektedir (138).

2.4. Telomeraz Ters Transkriptaz (TERT) Transkripsiyonu

Telomerler, kromozomal stabilite ve hücre yaşamı için gerekli olan, kromozom uçlarında bulunan koruyucu başlıklardır. Telomerler, bir katalitik alt birim (TERT), bir RNA şablonu (TERC) ve bazı proteinleri de içeren bir ribonükleoprotein kompleksi olan telomeraz tarafından yenilenir (139). Telomeraz, kromozomların 3' ucuna hekzamerik TTAGGG tekrarları ekleyerek telomer uzunluğunu korumaktadır (140). Çoğu doku ve hücrede TERT, telomeraz kompleksinin sınırlayıcı bir bileşenidir ve telomeraz aktivitesi, TERT mRNA ve protein seviyeleri ile ilişkilidir. İnsanlarda, telomerler yaşlanma saati görevi görür çünkü somatik hücrelerin çoğunda telomeraz yani insan TERT (hTERT) ekspresyonu yoktur. Somatik hücrelerin telomerleri, ardışık hücre bölünmesi ile aşamalı olarak kısalır. Yapılan araştırmalar, telomer kısalmasının insan yaşlanmasında kritik bir faktör olduğunu ve bunun stabilizasyonunun çoğu insan kanserinin gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir (141). hTERT ekspresyonu, kanser hücrelerinin artan proliferatif potansiyeli ile ilişkili olarak, tümör oluşumu sırasında önemli ölçüde artmaktadır (142).

Telomer uzunluğunun düzenlemesi ve proliferatif yaşlanma mekanizmaları, memeliler arasında evrimsel olarak korunma farklılığını göstermektedir. 60'tan fazla

memeli türünün hücrelerinde telomer uzunluğu ve telomeraz ekspresyonunun karşılaştırmalı bir analizinde Gomes ve arkadaşları, atalarımız olduğu düşünülen memelinin insan benzeri kısa telomerlere sahip olduğu sonucuna varmışlardır (143). Bu hayvanlardaki hücreler, tümörün ilerlemesi için bir bariyer sağlayarak replikatif yaşlanmaya maruz kalırlar. Öte yandan, diğer birçok memelide, özellikle kemirgenler gibi bazı daha küçük ve daha kısa ömürlü hayvanlarda, telomerler çok daha uzun hale gelir ve çoğu somatik dokuda telomeraz bulunur. Bu çalışmalar, memelilerde farklı telomer homeostazını anlamak için kavramsal bir çerçeve sağlamaktadır ve telomerlerin insanda kanser ve yaşlanmadaki rolünü incelemek için uygun modellerin kullanılması ihtiyacını belirlemektedir.

2.4.1. mTERT ve Sirkadiyen Ritim

CLOCK/BMAL1 kompleksi, telomeraz, c-Myc ve benzeri çeşitli genlerin ritmik ifadesini düzenler (144). İnsanlarda ve farelerde telomeraz aktivitesinde CLOCK/BMAL1 heterodimerlerinin, TERT mRNA ekspresyonunun sirkadiyen ritm genlerinin salınımına aracılık ettiği bildirilmiştir. Ayrıca CLOCK gen eksikliğinin farelerde ritmik telomeraz aktivitesini ve TERT mRNA salınımını önleyerek telomer kısalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Telomeraz aktivitesinin sirkadiyen ritim kontrolünün insanlarda ve farelerde benzer olduğu, ancak aralarında halen bazı farklılıkların da olduğu ileri sürülmektedir (144).

Öte yandan, farelerde BMAL1 eksikliğinin, zebra balıklarında ise TERRA ekspresyonunun sirkadiyen ritmi ve telomerik heterokromatin oluşumunu bozduğu gösterilmiştir. Özellikle yaş ilerledikçe bu sirkadiyen ritim bozulmasının telomer bütünlüğünü bozabileceği de ileri sürülmektedir (145). Özellikle zebra balığı insan benzeri telomerler içerdiğinden insanlarda da benzer sonuçlar beklenmektedir. Birçok çalışma BMAL1 transkripsiyonunun farelerde ve insanlarda SIRT1 tarafından pozitif olarak düzenlendiğini bildirmektedir (146, 147). SIRT1'in BMAL1 aracılı ritmik TERRA ifadesine CLOCK geninden daha fazla katkıda bulunabileceğini düşünülmektedir. Bulgular, BMAL1'in hangi molekülle etkileşime girdiğine bağlı olarak TERT ifadesini farklı şekilde etkileyebileceğini düşündürmektedir. c-Myc, telomeraz aktivitesini düzenleyen bir TERT ifadesi indükleyicisidir. c-Myc saat kontrollü bir gen olmasına rağmen, c-Myc'nin hTERT promotörüne bağlanması ritmik olarak gerçekleşmez. CLOCK/BMAL1 sirkadiyen ritim genleri, TERT ekspresyonunda ve telomeraz

aktivitesinde sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde rol oynar. SIRT1, c-Myc stabilitesine ve BMAL1/CLOCK kompleksi oluşumuna katkıda bulunur (144).

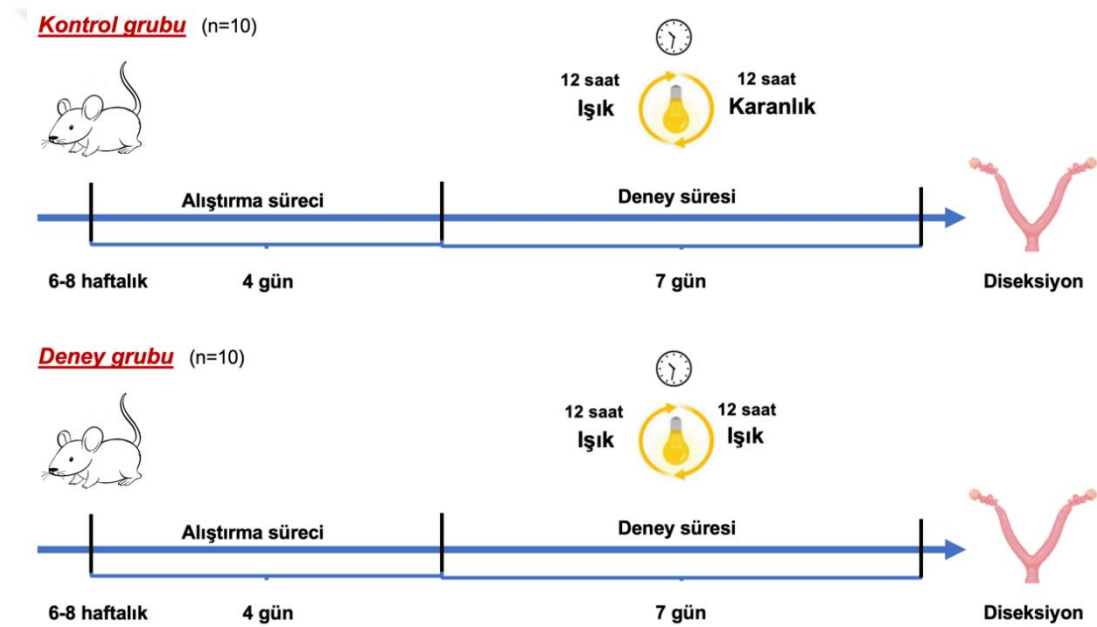
Sonuç olarak SIRT1, c-Myc/BMAL1/CLOCK gen kompleksi telomeraz promotörünün E-kutularına bağlanarak telomeraz aktivitesi ile sirkadiyen ritminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceği yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. SIRT1 veya c-Myc ile gelecekteki sirkadiyen ritim araştırmaları, c-Myc ve CLOCK/BMAL1 arasındaki karmaşık ilişki için bilgi sağlayacaktır (148).

Yaşlanma süreci sirkadiyen ritimleri etkiler. Özellikle melatonin ve kortizoldeki günlük hormonların salınımının yaşlı bireylerde azaldığı belirtilmiştir. Sağlıklı bireylerin ölüm sonrası beyinlerinde ve obez yaşlı hastaların olgun adipositlerinde, transkriptlerde ritmikliğin kaybı veya kazanımı ve sirkadiyen ritim düzenlenmesi ile ilgili sorunlar bildirilmiştir (149). Doğal yaşlanma sürecinde fare ve insan karaciğerinde, SIRT1 ve Per2 arasında ters bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, SIRT1'in doğal yaşlanma sırasında azalabileceğini ve bu nedenle sirkadiyen saatin bozulmasına ve telomer kısalmasına neden olabileceği düşünülmektedir (149).

3. MATERYAL VE METOD

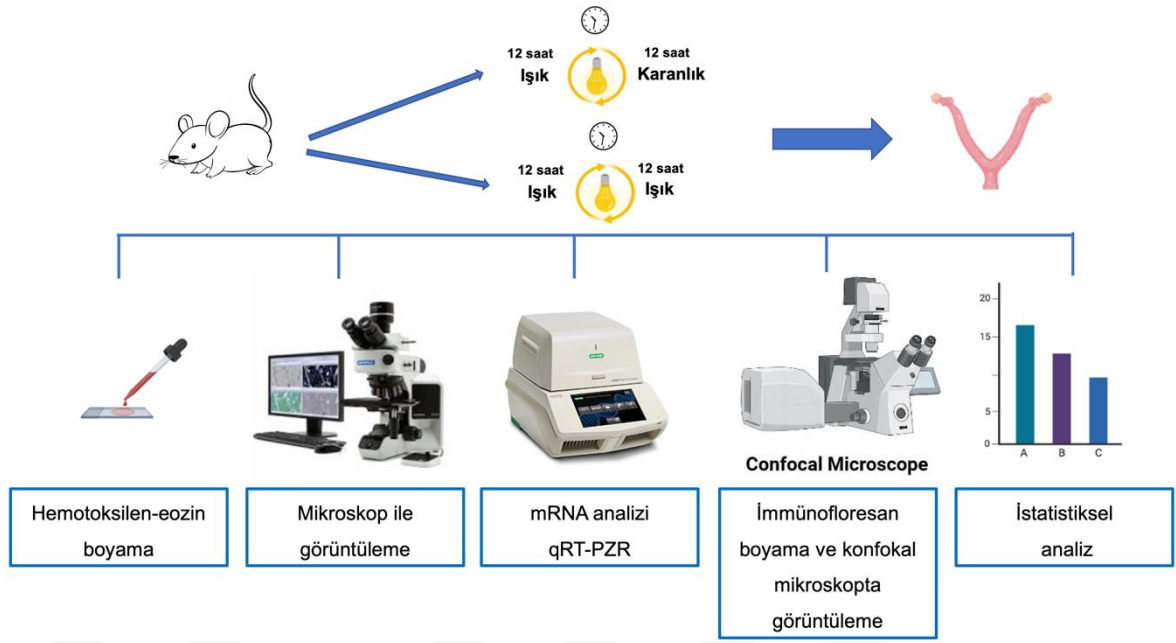
3.1. Hayvanlar ve Deney Tasarımı

Tez çalışmamızda östrus siklusuna giren 6-8 haftalık toplam 20 adet dişi Balb/c fare kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan deney hayvanları Yeditepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile YÜDETAM'dan temin edilmiştir. Hayvanlar 4 günlük alışma sürecinin sonunda rastgele olarak kontrol ve deney olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu (n=10) 1 hafta boyunca 12:12 saat aydınlık:karanlık döngüsünde barındırıldı. Sürekli ışık maruziyeti ile oluşturulan deney grubu (n=10) 1 hafta boyunca sabit ışık koşullarında barındırıldı (Şekil 3.1). Hayvanlar 21-23°C sıcaklıkta tutulmuş, yiyecek ve su ad libitum olarak verilmiştir.



Şekil 3.1. Deney modelinin şematik tasarımı

Bir haftalık deney süresinin sonunda fareler diseke edilerek uterus dokuları izole edildi. Deneklerin sağ uterus boynuzu histolojik analiz ve immüno Floresan boyama yapmak üzere fiksatif içerisine alınırken, sol uterus dokusu kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yönteminde kullanılmak üzere izole edildi (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. Çalışma dizaynı

3.2. Doku takibi, Hematoksilen ve Eozin Boyama ve Morfolojik Değerlendirmeler

İzole edilen fare uterusları, nötral buffer formalin solüsyonunda (Formalin, Tamponlu, %10 (FosfatTampon), Fisher Scientific, SF100-4) 12 saat inkübe edilerek fikse edildi. Fiksasyonu takiben uterus dokuları akan çeşme suyunda yıkandı. Dokular dehidratasyon için artan alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100) geçirilerek 3 kez 10'ar dakika ksilen içerisinde şeffaflaştırıldı. Daha sonra 3 kez 1'er saat parafin infiltrasyonu yapılan dokular temiz parafin içerisinde dik olarak gömüldü (Leica, EG 1160).

Parafine gömülmüş uterus dokularından mikrotom (Leica, RM 2245) ile 5 µm'lik histolojik kesitler alındı. Uterus morfolojisini değerlendirmek amacıyla alınan kesitlerin bir kısmı hematoksilin ve eozin ile boyandı. Kesitler, parafini uzaklaştırmak amacıyla 60°C'lik etüvde 40 dakika inkübe edildi ve ardından ksilen içerisinde 2 kez 20 dakika bekletildi. Daha sonra kesitler azalan alkol serisinden (%100, %96, %90, %80 ve %70) geçirildi. Rehidratasyondan sonra kesitler distile su ile yıkandı ve hematoksilin (Gill's hematoxylin No.3, Bio-Optica, 05-06015/L) ile 2 dakika boyandı. Kesitler daha sonra akan çeşme suyunda yıkanarak eozin (Eosin Y Alkol Solüsyonu, Bio-Optica, 05-10003/L) boyası içerisinde 1 dakika inkübe edildi. Boyamanın ardından kesitler 2 dakika yıkanarak artan alkol serisi ile dehidrate edilerek, ksilende 40 dakika inkübe edildi. Son

olarak kesitler, ksilen bazlı kapatma solüsyonu (Bio Mount HM, Bio-Optica, 05-BMHM500) kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Gruplar arasındaki morfolojik farklılıkları göstermek için, rastgele olarak her gruptan 5 farklı bloktan alınan kesitlerde uterus lümeni genişliği, miyometriyum kalınlığı, endometriyum kalınlığı, epitel kalınlığı ve bez sayısı 3 farklı alanda yapılan ölçümlerin ortalaması alınarak ve ImageJ programı kullanılarak değerlendirildi.

3.3. İmmüno Floresan Boyama

Parafin bloklardan poli-L-Lizin lamalar üzerine alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler, 60°C'deki etüvde 30 dakika inkübe edildi. Ardından ksilende 2 kez 20 dakika bekletilerek azalan alkol serisinden (%100, %90, %80 ve %70) geçirilerek rehidrate edildi. Kesitler önce distile su ile ardından PBS (Phosphate Buffer Saline, pH:7.2-7.4) ile yıkandı. Antijen kazanımı için, tüm kesitler sitrat tamponu (10 mM, pH 6.0) içerisinde mikrodalgada (yaklaşık 600 Watt) kaynatıldı. Ardından oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Bu işlem iki kez tekrar edildikten sonra kesitlerin çevresi hidrofobik bariyer kalemi (Liquid Blocker, Super Pap Pen) ile çizildi. Sonra lamalar PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı. Bloking için %5 normal keçi serumu (0.1%Triton-X-PBS) (Normal Keçi Serum, Chemicon International, S26-100mL) hazırlanarak kesitler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından kesitler bloklama solüsyonu içerisinde hazırlanan primer antikor ile (anti-TERT (ThermoFisher Scientific, #PA5-11446; 1:100 dilüsyon), YAP (Cell Signalling, #1A12-12395, 1:100 dilüsyon), TEAD4 (Abcam, #ab97460, 1:100 dilüsyon), PER2 (PER2 Polyclonal Antibody, Abcam #ab180655, 1:100 dilüsyon) +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Ardından TBS-T (1L TBS içinde 1000 µl tween) ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkanarak bloklama solüsyonunda hazırlanan sekonder anti-rabbit IgG H&L (Alexa Flour 488) (Abcam, #150077, 1:750 dilüsyon) ile oda sıcaklığında 1,5 saat inkübe edildi. Daha sonra çekirdek boyaması için DAPI'li kapama mediumu (Sigma, F6057) ile kapatılarak konfokal mikroskopta görüntülendi (Zeiss, LSM780).

3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

Sirkadiyen ritm genlerinin mRNA seviyelerini göstermek için qRT-PZR yöntemi uygulandı.

3.4.1. RNA İzolasyonu

qRT-PZR yöntemi için, diseke edilen uterus dokuları 300 µL lizis tamponu içerisine alındı. Homojenizasyonun ardından ependorflar 100 µL aktivasyon tamponu ile 30 saniye yıkandı ve 10,000xg'de santrifüj edildi. Ardından örnek süpernatantını içeren ependorfa 300 µL izopropanol eklendi. Filtreli ependorfun dibine çöken aktivasyon bufferi boşaltıldıktan sonra, izo-propanol ilave edilen örnekler eppendorfa aktarıldı ve 30 saniye 10.000 g'de santrifüj edildi. Filtreli ependorfun altında kalan kısım atıldı, örnek RNA'lar bu aşamada filtrede kaldı. RNA içeren filtreli ependorflar 700 µL birincil yıkama solüsyonu ile 30 saniye yıkanarak 10.000xg'de santrifüj edildi. Filtrenin altında kalan ependorf boşaltıldı. Filtrenin üzerine 700 µl sekonder yıkama solüsyonu eklendi ve 30 saniye bekletildi. Ardından 10.000 g'de santrifüj edilerek filtre altındaki tüp boşaltıldı. Daha sonra filtreli bölüm yeni bir tüpe aktararak üzerine 40 µl elüsyon tamponu filtrenin merkezine gelecek şekilde eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA'ların tüpte toplanması sağlandı. Elde edilen RNA örnekleri 20°C'de saklandı.

3.4.2. cDNA sentezi

Örneklerden izole edilen RNA'lardan RNA ölçümü yapıldı, belirlenen miktarda RNA-template, 0.5 µL Oligo-DT ve su karışımı hazırlandı. 70°C'de 10 dakika denatürasyon işlemine tabi tutuldu. cDNA eldesi için hazırlanan karışımın içeriği Tablo 1'de verilmiştir. qRT-PCR reaksiyonu için kullanılan solüsyonlar ve miktarları Tablo 2'de verilmiştir. PZR reaksiyon döngüleri Tablo 3'te verilmiştir. Reaksiyonlarda kullanılan primer dizileri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 1. cDNA eldesi için hazırlanan karışımın içeriği

Bileşen	Reaksiyon başına hacim (µL)
SCRIPT RT Buffer	4
dNTP Mix	1
DTT Stock Solution	1
RNase inhibitor	1
SCRIPT Reverse Transcriptase	0.5
RNase-free Water	2.5
Toplam hacim	10 µl mix

Tablo 2. qRT-PZR deneylerinde kullanılan karışımın içeriği

Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	5 µl
PCR Grade Water	3.5 µl
Forward Primer	0.5 µl
Reverse Primer	0.5 µl
Örnek DNA	1 µl

Bu işlem sonucunda elde edilen mix solüsyonunun 10 µL'si 10 µL numune RNA ile karıştırıldı. Ardından örnekler 50°C'de 45 dakika, 42°C'de 10 dakika PCR cihazında inkübe edildi. cDNA sentezi işlemi tamamlandıktan sonra örnekler -20°C'de saklandı.

Tablo 3. qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan sıcaklık değerleri ve süreleri

Adımlar	Derece (Duration (sec))	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95°C (30)	1
Denatürasyon	95°C (15)	
Annealing	53°C (20)	45
Extension (Uzama)	60°C (20)	

Tablo 4. qRT-PZR deneylerinde kullanılan primerler

Gen	Primer	Primer dizileri
<i>CLOCK</i>	<i>Forward</i>	CTTCCTGGTAACGCGAGAAAG
	<i>Reverse</i>	GTCGAATCTCACTAGCATCTGAC
<i>CRY1</i>	<i>Forward</i>	CTGGCGTGGAAGTCATCGT
	<i>Reverse</i>	CTGTCCGCCATTGAGTTCTATG
<i>BMAL1</i>	<i>Forward</i>	CCAAGAAAGTATGGACACAGACAAA
	<i>Reverse</i>	GCATTCTTGATCCTTCCTTGGT
<i>PER2</i>	<i>Forward</i>	GAAAGCTGTCACCACCATAGAA
	<i>Reverse</i>	AACTCGCACTTCCTTTTCAGG
<i>YAP1</i>	<i>Forward</i>	CGCTCTTCAACGCCGTCA
	<i>Reverse</i>	AGTACTGGCCTGTCGGGAGT
<i>TEAD4</i>	<i>Forward</i>	GGACACTACTCTTACCGCATCC
	<i>Reverse</i>	TCAAAGACATAGGCAATGCACA
<i>β-ACTIN</i>	<i>Forward</i>	ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC

	<i>Reverse</i>	CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG
<i>mTERT</i>	<i>Forward</i>	CCTGCGGCCCATTTGTGAAC
	<i>Reverse</i>	GTGGACTTGGCCTTGGCTATCTCT



4. BULGULAR

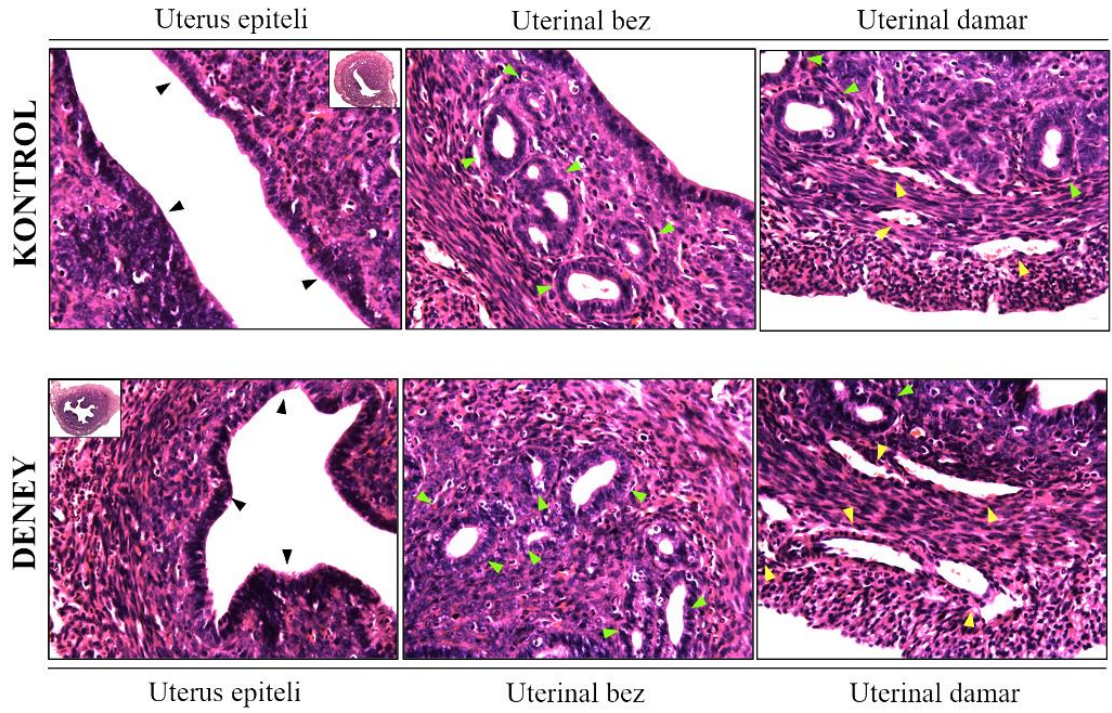
4.1. Kontrol ve Sirkadiyen Ritmin Bozulduğu Deney Grubunda Fare Uterus Dokularının Morfolojik ve Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve 1 hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus kesitlerine rutin H-E boyama yapıldıktan sonra kesitler ışık mikroskobu ile değerlendirildi (Şekil 4.1).

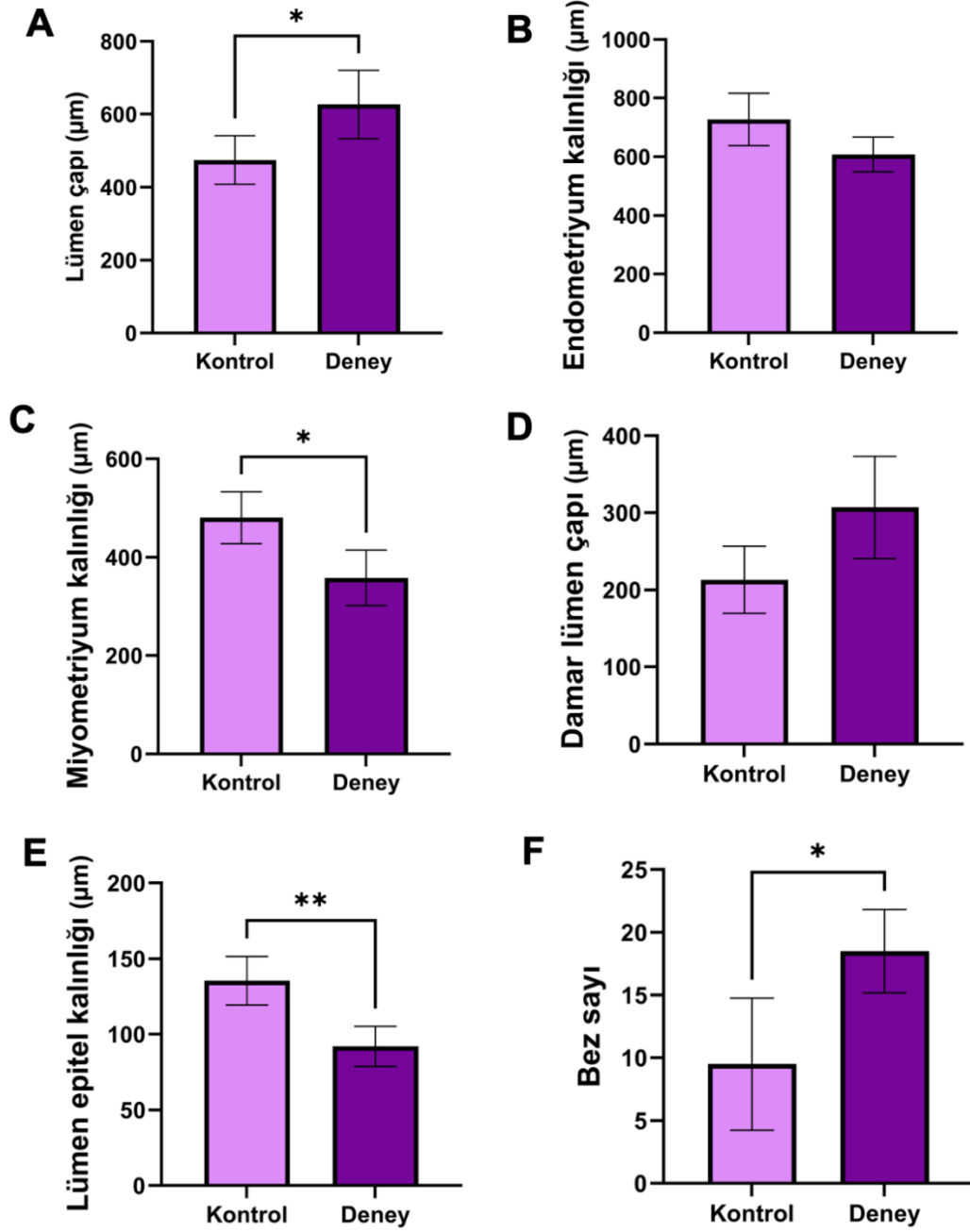
Kontrol grubu uterus kesitlerinde, uterusun endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum tabakaları belirgin olarak belirlendi. Uterus lümeninin tek katlı prizmatik epitel ile döşeli olduğu, endometriyum tabakasındaki uterinal bezler ve uterinal damar yapıları belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 4.1).

Sirkadiyen ritmin 1 hafta sürekli ışık maruziyeti ile bozulduğu grupta, kontrol grubuna benzer olarak uterusun üç tabakası belirgin olarak ayırtedilebilir şekilde görüldü.

Uterusun luminal epitelinin kalınlığı, bez sayısı, endometriyum kalınlığı, miyometriyum kalınlığı, damar çapı ve lümen çapı kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırıldı (Şekil 4.2). Sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubunda uterus lümeninin çapının azaldığı, endometriyum ve miyometriyum tabakalarının kalınlığının azaldığı, damar lümeni çapının arttığı, lümen epitelinin boyunun azaldığı ve endometriyal bezlerin sayısının arttığı belirlendi.



Şekil 4.1. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve 1 hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus kesitlerinde uterus lümen epiteli, uterinal bezler ve uterinal damar yapıları H-E boyama ile gösterilmiştir. Siyah oklar uterus lümenini, yeşil oklar uterinal bezleri, sarı oklarla ise uterinal damarları göstermektedir. (Objektif: 40x, 50 µm).

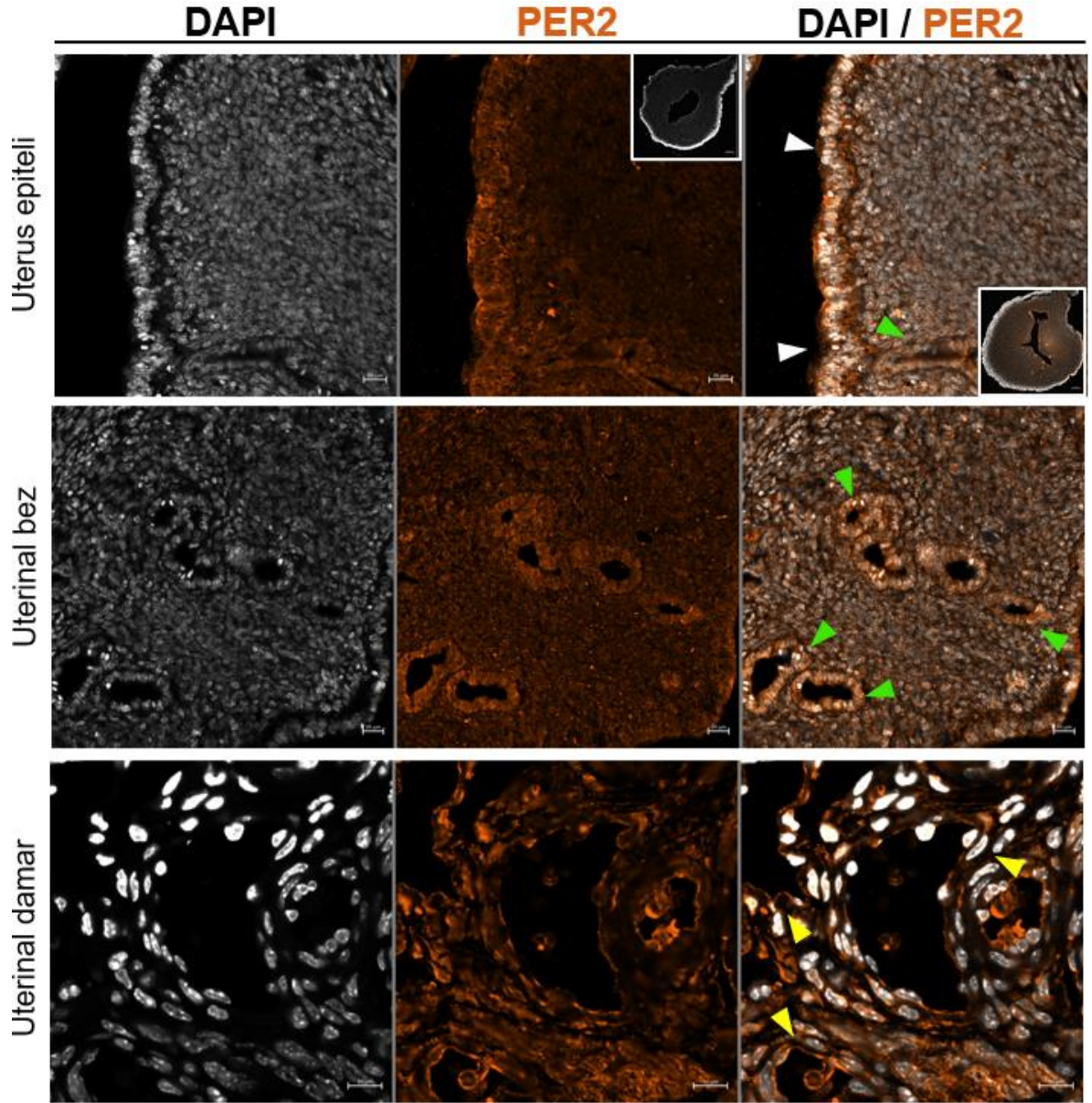


Şekil 4.2. Kontrol ve deney grubu arasında uterus dokularının morfolojik olarak değerlendirilmesi. Gruplar arasında (A) Lümen çapı, (B) Endometriyum kalınlığı, (C) Miyometriyum kalınlığı, (D) Damar lümen çapı, (E) Lümen epitel kalınlığı ve (F) Endometrial bez sayısının değerlendirme grafikleri gösterilmektedir. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. ($p < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

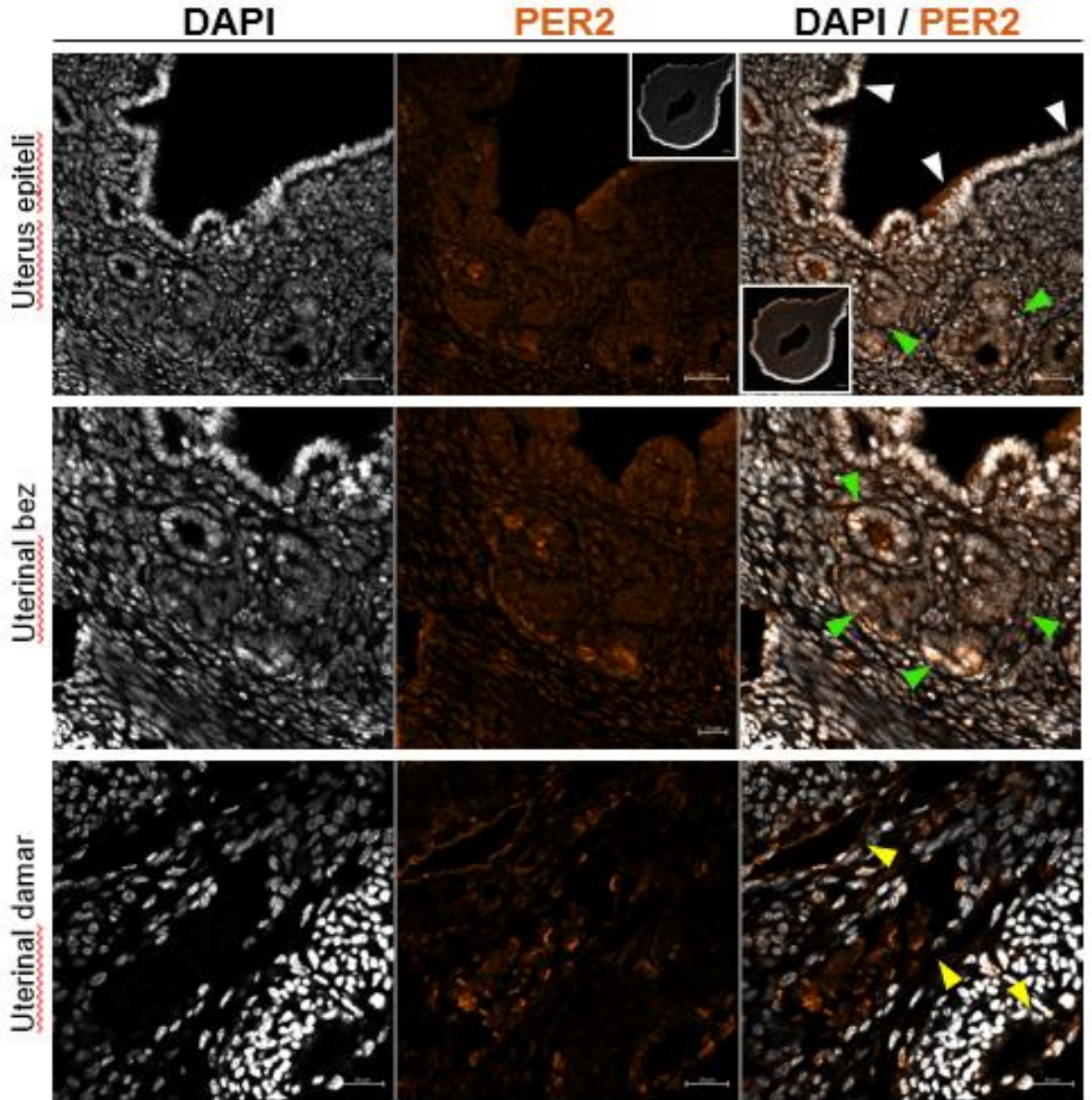
4.2. PER2 Lokalizasyonunun İmmüno Floresan Yöntem ile Gösterilmesi

Sirkadiyen ritim bozulmasını değerlendirmek için, bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve 1 hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan alınan kesitlerde, sirkadiyen ritim geni olan PER2 (Period Circadian Regulator 2) lokalizasyonu değerlendirildi. Sirkadiyen ritim bozulmasını göstermek amacıyla için PER2 antikoru kullanılırken, çekirdek boyaması için DAPI kullanıldı ve elde edilen görüntüler konfokal mikroskop altında incelenmiştir.

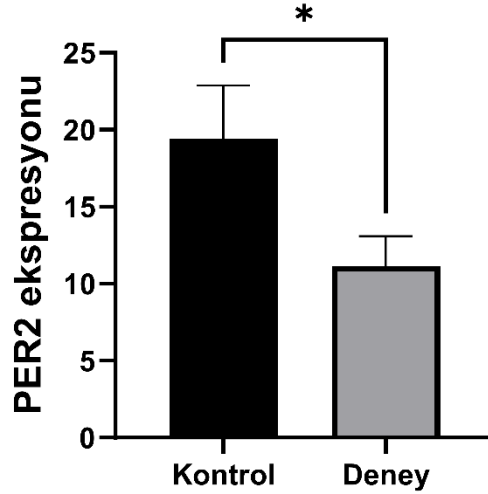
Uterus dokularında uterus lümen epiteli, uterinal bezler ve uterinal damarlar incelendi. Genel olarak kontrol ve deney grubunda uterus dokusunda PER2 ekspresyonunun lümen epitelinde, bez epitelinde ve damarların endotel hücrelerinde olduğu belirlendi. Gruplar arasında PER2'nin ekspresyonu değerlendirildiğinde, 1 hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubunda PER2 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.3., Şekil 4.4.). PER2 sirkadiyen ritmin en önemli genlerinden birisidir ve PER2'nin ekspresyonun azalması, 1 hafta boyunca sürekli ışığa maruz bırakılan hayvanlarda sirkadiyen ritmin bozulduğunu göstermektedir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.3. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu uterus dokusunda immüno Floresan boyama ile PER2 lokalizasyonu gösterilmiştir. PER2: turuncu renk, DAPI: beyaz renk. Uterus lümen epiteli beyaz oklarla, uterinal bez yapıları yeşil oklarla, uterinal damarlar ise sarı oklarla gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus kesitlerinde PER2 lokalizasyonu gösterilmiştir. PER2: turuncu renk, DAPI: beyaz renk. Uterus lümen epiteli beyaz oklarla, uterinal bez yapıları yeşil oklarla, uterinal damarlar ise sarı oklarla gösterilmiştir. Uterus lümen epitelinde, uterinal bez yapısında ve uterinal damarda PER2 ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Küçük resimler, negatif kontrol boyamasını göstermektedir.



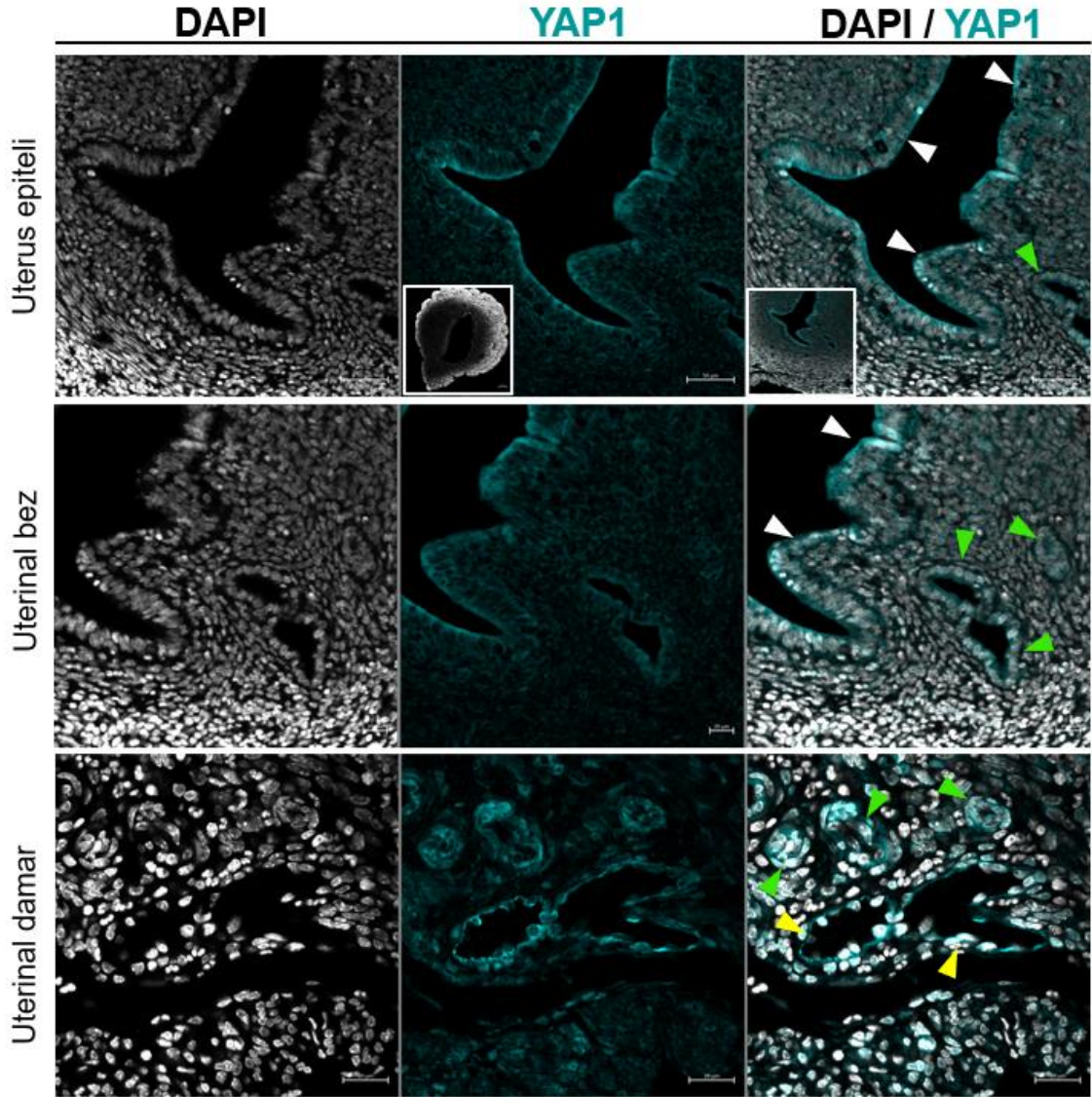
Şekil 4.5. Kontrol ve deney gruplarında PER2 ekspresyonunun değerlendirilmesi gösterilmiştir. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. ($p < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

4.3. Sirkadiyen Ritim Bozulmasında Hippo Sinyal Yolağı Proteinlerinden YAP1 ve TEAD4'ün Lokalizasyonunun İmmünofloresan Yöntem ile Belirlenmesi

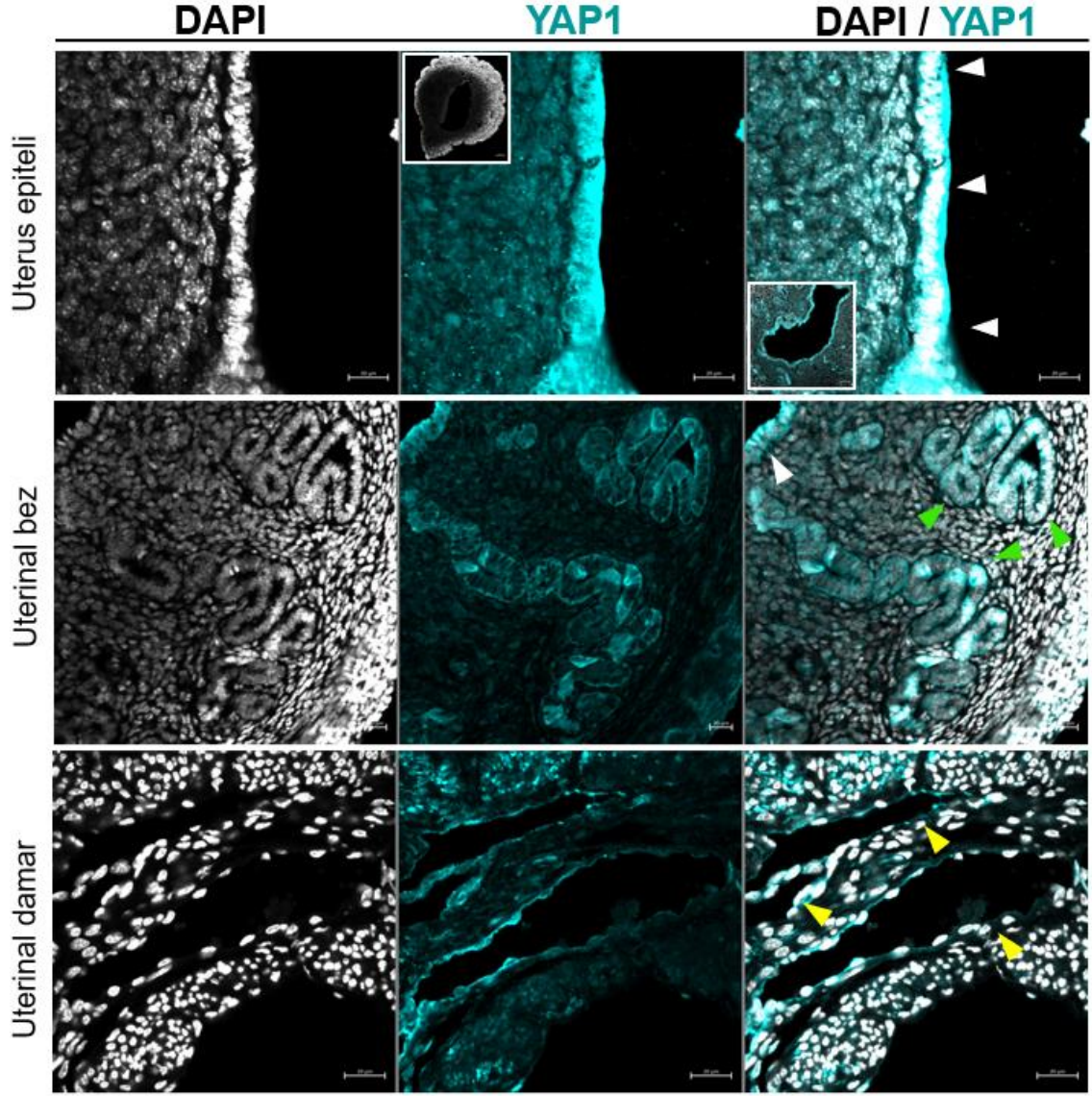
Sirkadiyen ritim bozulmasının Hippo sinyal yolağı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla Hippo sinyal yolağı komponentlerinden olan YAP1 ve TEAD4'ün lokalizasyonları incelendi. Uterus dokusunun tüm bileşenlerinde her iki proteinin de ekspresyonu gözlemlendi.

YAP1 ve TEAD4 ekspresyonları uterusun lümen epiteli, uterinal bez epiteli ve uterinal damarların endotel hücrelerinde değerlendirildi. YAP1 (Şekil 4.6, Şekil 4.7) ve TEAD4 (Şekil 4.8., Şekil 4.9.) ekspresyonları hücrelerin hem çekirdek hemde sitoplazmasında belirlendi. YAP1 (Şekil 4.6, Şekil 4.7) ve TEAD4 (Şekil 4.8., Şekil 4.9.) ekspresyonlarının uterusun lümen epitelinde yoğun olarak eksprese olduğu gözlemlendi. Gruplar arasındaki YAP1 ve TEAD4 ekspresyonları karşılaştırıldığında, kontrol grubuna kıyasla 1 hafta sürekli ışık maruziyeti uygulanan sirkadiyen ritmin bozulduğu grupta YAP1 ve TEAD4'ün daha yoğun bir şekilde eksprese olduğu gösterildi (Şekil 4.10).

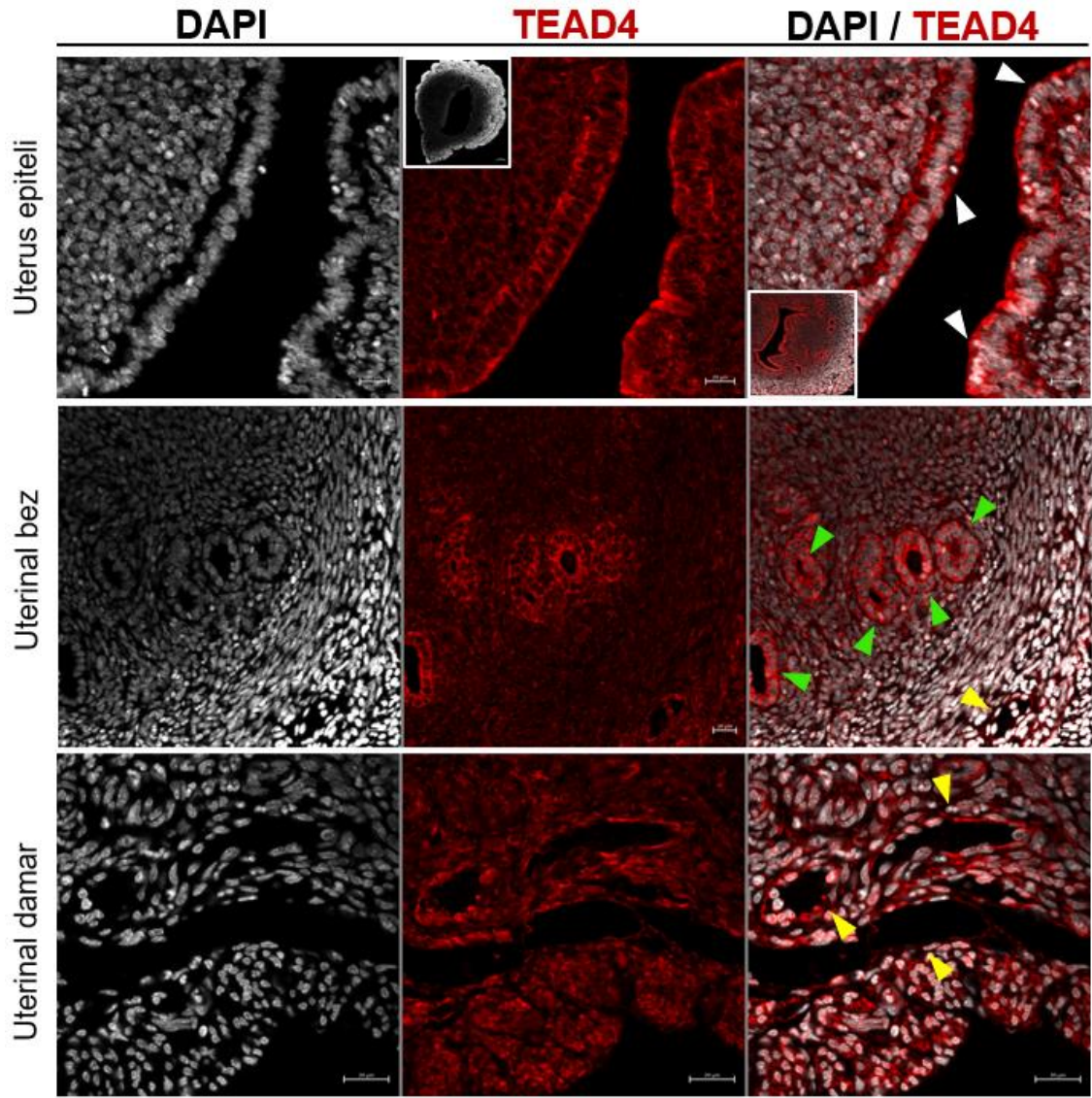
Bulgularımız YAP1 ve TEAD4 aktivasyonunun anlamlı şekilde arttığı yönündedir ve ayrıca bu artış istatistiksel olarakda gösterildi (Şekil 4.10)



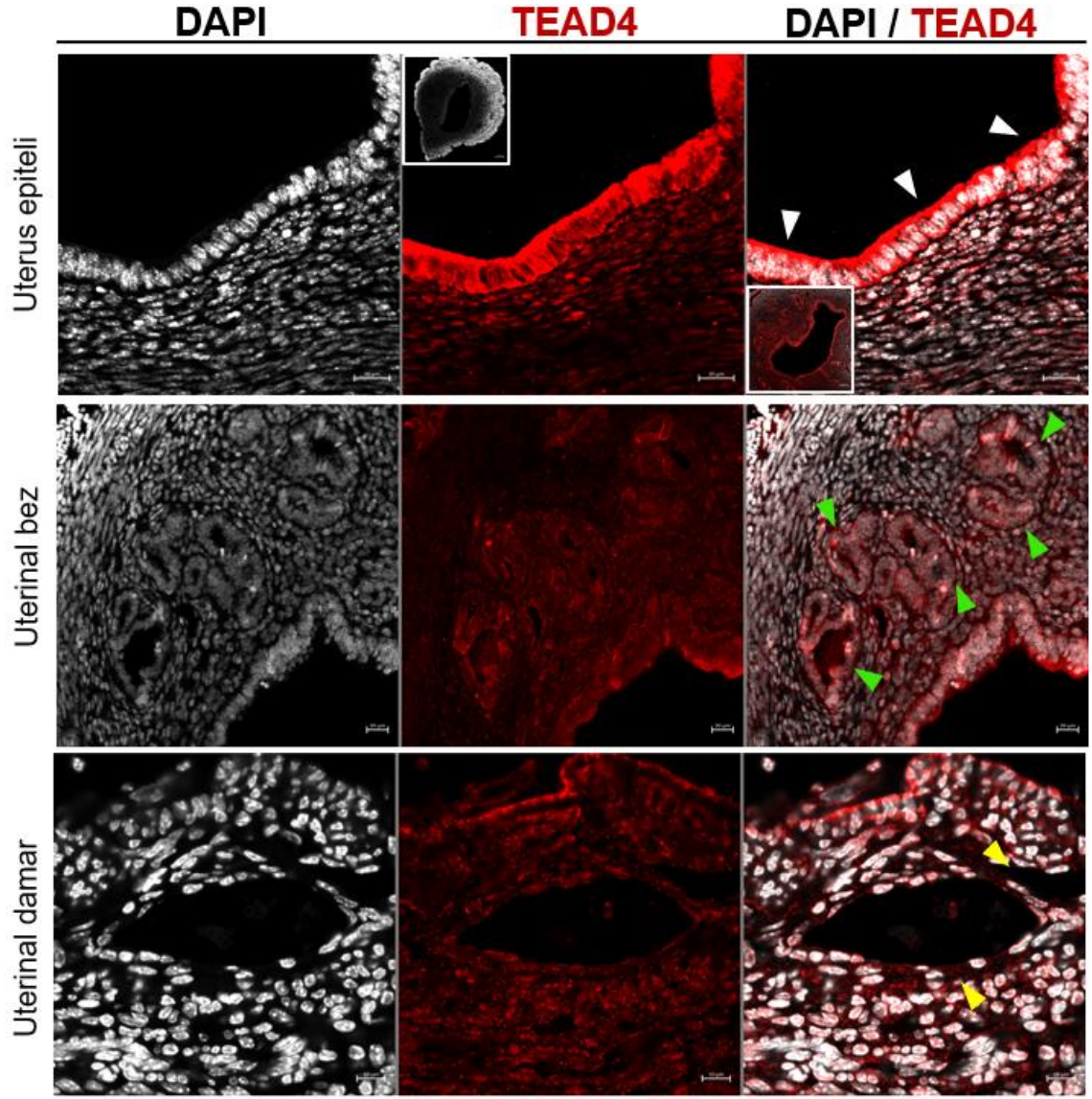
Şekil 4.6. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu uterus dokusunda immüno Floresan boyama ile YAP1 ekspresyonu konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. YAP1: Turkuaz renk, DAPI: beyaz renk. Beyaz oklar lümen epitelinin, yeşil oklar uterinal bezleri, sarı oklar ise uterinal damarları göstermektedir. Uterus epitel yapısı, uterinal bez ve uterinal damarlar gösterilmiştir. Uterinal epitel ve bez 40x objektif ile görüntülenmiştir. Damar yapıları 63x objektif ile görüntülenmiştir.



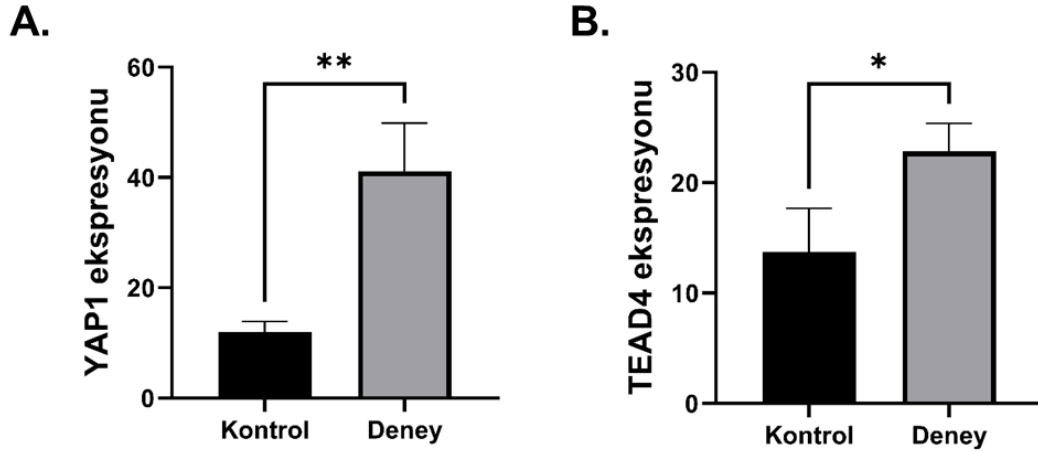
Şekil 4.7. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus kesitlerinde YAP1 ekspresyonu konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Özellikle uterus lümen epitelinde YAP1 ekspresyonunun yoğun olduğu gösterilmiştir. YAP1: Turkuaz renk, DAPI: beyaz renk. Beyaz oklar lümen epitelini, yeşil oklar uterinal bezleri, sarı oklar ise uterinal damarları göstermektedir. Uterus epitel yapısı, uterinal bez ve uterinal damarlar gösterilmiştir. Uterinal epitel ve bez 40x objektif ile görüntülenmiştir. Damar yapıları 63x objektif ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.8. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu uterus dokusunda immüno Floresan boyama ile TEAD4 ekspresyonu konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. TEAD4: kırmızı renk, DAPI: beyaz renk. Beyaz oklar lümen epitelini, yeşil oklar uterinal bezleri, sarı oklar ise uterinal damarları göstermektedir. Uterus epitel yapısı, uterinal bez ve uterinal damarlar gösterilmiştir. Uterinal epitel ve bez 40x objektif ile görüntülenmiştir. Damar yapıları 63x objektif ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.9. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus kesitlerinde TEAD4 ekspresyonu konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Özellikle uterus lümen epitelinde TEAD4 ekspresyonun daha yoğun olduğu gösterilmiştir. TEAD4: kırmızı renk, DAPI: beyaz renk. Beyaz oklar lümen epitelini, yeşil oklar uterinal bezleri, sarı oklar ise uterinal damarları göstermektedir. Uterus epitel yapısı, uterinal bez ve uterinal damarlar gösterilmiştir. Uterinal epitel ve bez 40x objektif ile görüntülenmiştir. Damar yapıları 63x objektif ile görüntülenmiştir.

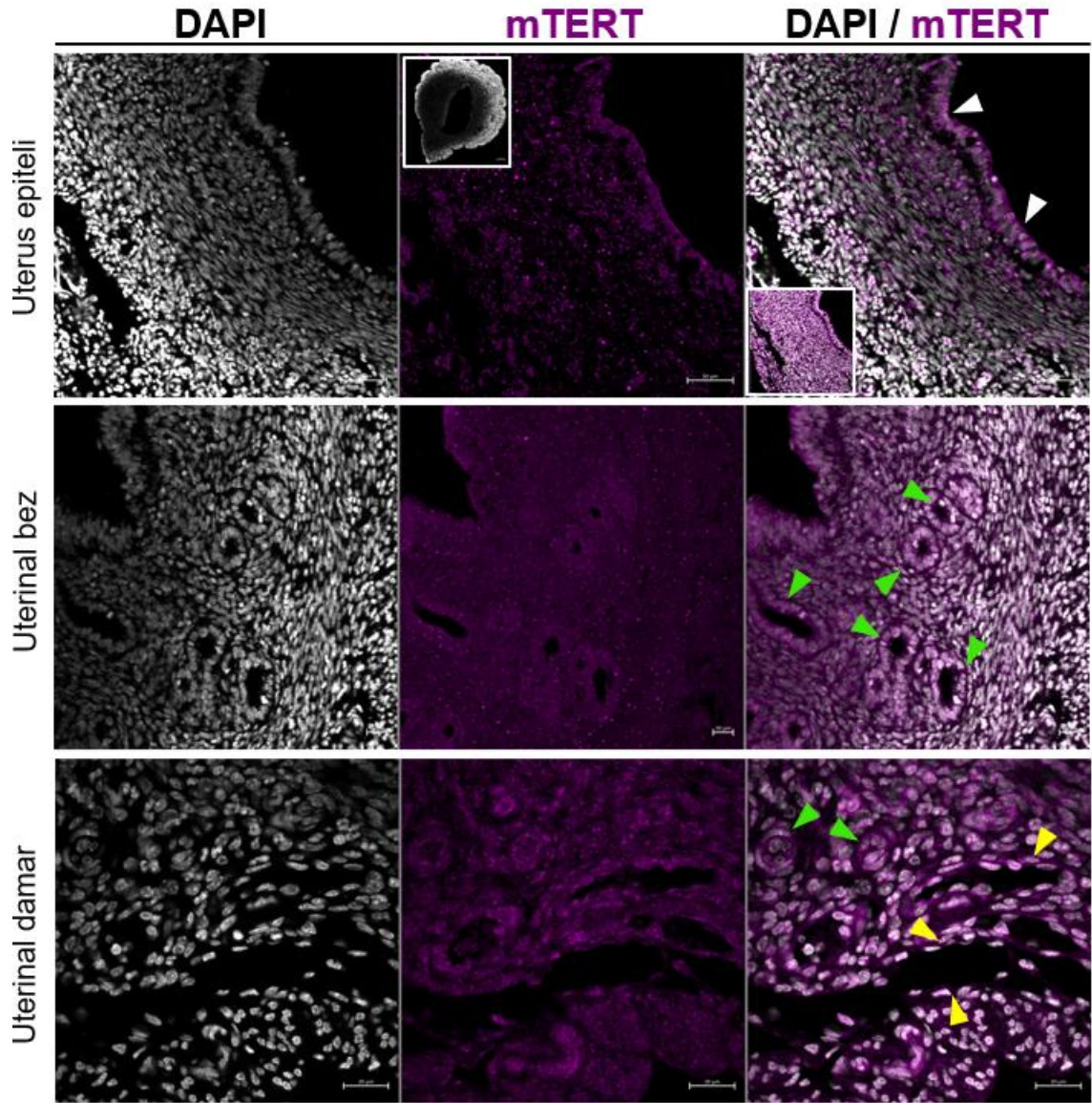


Şekil 4.10. Kontrol ve deney grupları arasında YAP1 ve TEAD4 ekspresyonunun değerlendirilmesi. (A) YAP1 ekspresyonu deney grubunda kontrole kıyasla anlamlı derecede artmıştır. (B) TEAD4 ekspresyonu deney grubunda kontrole kıyasla anlamlı derecede artmıştır. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. ($p < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

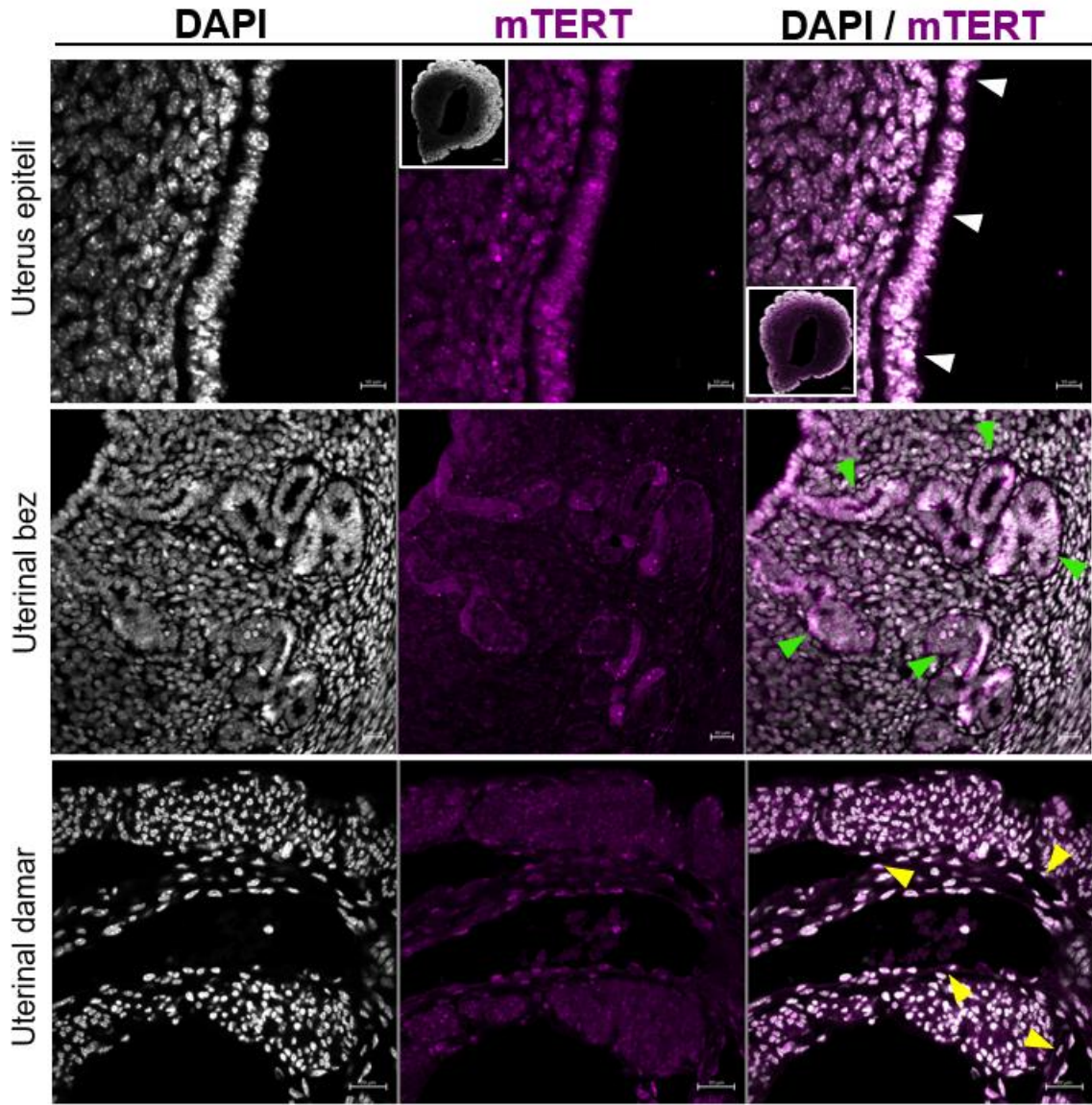
4.4. Sirkadiyen Ritim Bozulmasında mTERT Lokalizasyonunun Değerlendirilmesi

mTERT, kromozomların ucunu uzatan ve kromozomal stabiliteyi koruyan, hücrelölümsüzleşme ve tümör oluşumu ile sonuçlanan telomerazın önemli bir bileşenidir. Sirkadiyen ritimlerdeki kusurlar yaşlanma veya yaşlanmaya bağlı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Tez çalışmamızda, sirkadiyen ritim bozulmasında uterustaki telomeraz aktivitesini belirlemek amacıyla mTERT ekspresyonunu immüno Floresan yöntem ile göstermeyi amaçladık.

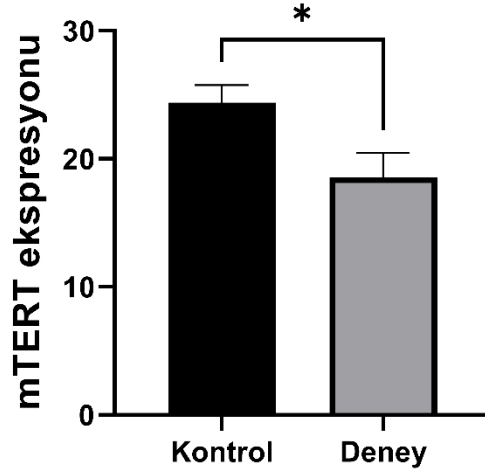
Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritim bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus kesitlerinde mTERT ekspresyonu değerlendirildi. Kontrol grubunda mTERT lokalizasyonu uterus epiteli, bez epiteli ve damarların endotel hücrelerinde hem sitoplazmada hem de çekirdekte görüldü (Şekil 4.11). Buna karşın sirkadiyen ritmin bir hafta sürekli ışık ile bozulduğu grupta mTERT'in sadece çekirdeklerde lokalize olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12). Buna ek olarak, deney grubunda sirkadiyen ritim bozulmasının mTERT ekspresyonunun azalmasına neden olduğu belirlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.11. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu uterus dokusunda immünofloresan boyama ile mTERT ekspresyonu konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. mTERT mor renkle hem sitoplazmada hem de çekirdekte, çekirdek boyaması ise DAPI ile beyaz renkle gösterilmiştir. Uterus epitel yapısı, uterinal bez ve uterinal damarlar gösterilmiştir. Beyaz oklar lümen epitelini, yeşil oklar uterinal bezleri, sarı oklar ise uterinal damarları göstermektedir. Uterus epiteli ve bez için 40x objektifle görüntüleme yapılmıştır. Damar yapıları 63x objektifle çekilmiştir.



Şekil 4.12. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus kesitlerinde mTERT ekspresyonu konfokal mikroskop ile gösterilmiştir. mTERT mor renkle çekirdekte lokalize olmuştur, çekirdek boyaması ise DAPI ile beyaz renkle gösterilmiştir. Uterus epitel yapısı, uterinal bez ve uterinal damarlar gösterilmiştir. Özellikle uterus lümen epitelinde mTERT ekspresyonun daha fazla olduğu gösterilmiştir. Uterus epiteli ve bez için 40x objektifle yapılmıştır. Damar yapıları 63x görüntülemeye çekilmiştir. Beyaz oklar lümen epitelini, yeşil oklar uterinal bezleri, sarı oklar ise uterinal damarları göstermektedir.



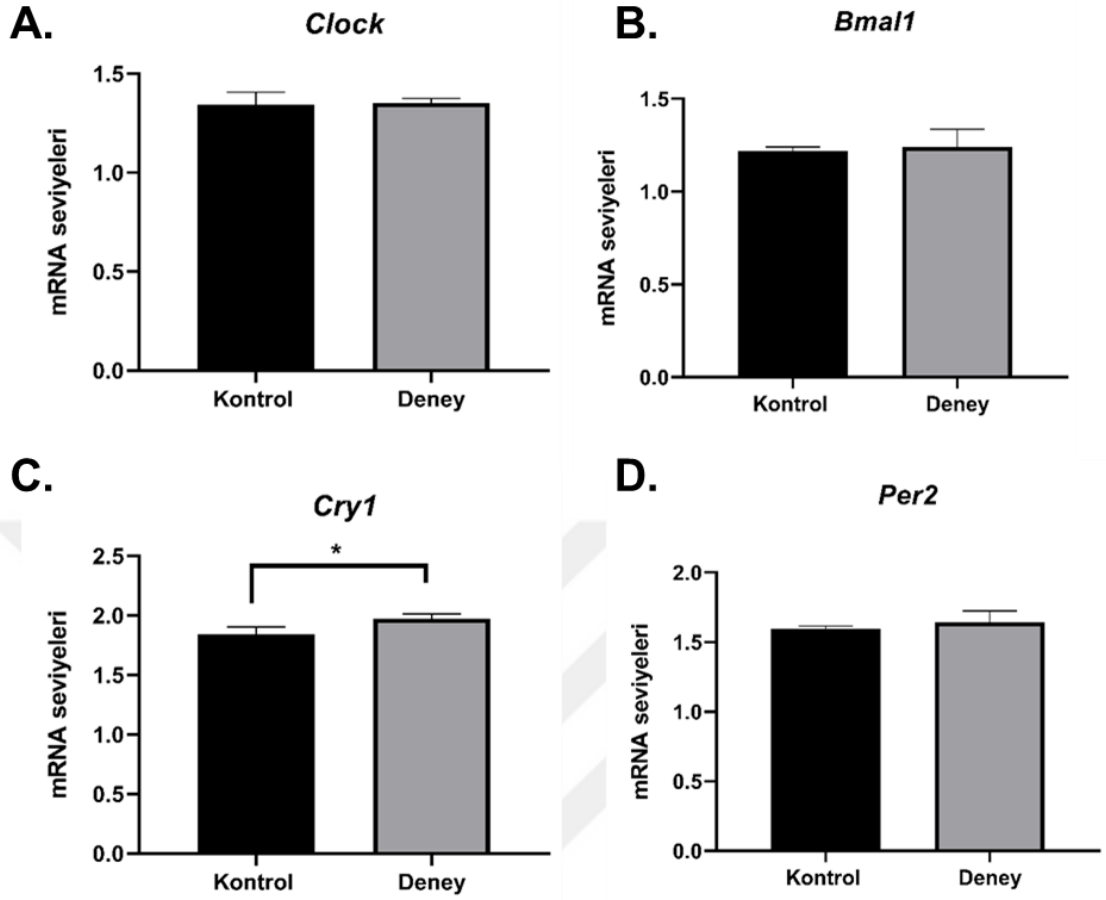
Şekil 4.13. Kontrol ve deney gruplarının mTERT ekspresyonunun değerlendirilmesi. mTERT ekspresyonu deney grubunda kontrole kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. ($p < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

4.5. Uterus Dokularında Sirkadiyen Ritim Genlerinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi

Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus dokularında *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* ve *CRY1* gen ekspresyonları qRT-PZR yöntemi kullanılarak mRNA düzeyinde gösterildi.

Kontrol ve sürekli ışık ile sirkadiyen ritmin bozulduğu gruptan elde edilen uterus örneklerinde *PER2*'nin mRNA seviyesindeki ekspresyonun anlamlı bir farklılık göstermediği gösterildi. Aynı şekilde sirkadiyen ritmin önemli genlerinden olan *CLOCK* ve *BMAL1* için de mRNA düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi.

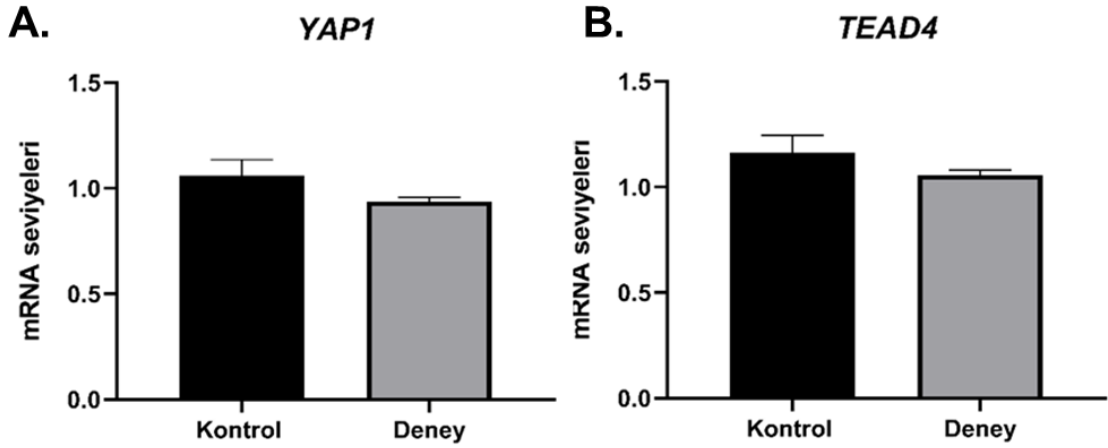
Kontrol ve sürekli ışık ile sirkadiyen ritmin bozulduğu gruplar karşılaştırıldığında, *CRY1* ekspresyonunun deney grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.14.)



Şekil 4.14. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus dokularında BMAL1, CLOCK, PER2 ve CRY1 gen ekspresyonları qRT-PZR yöntemi kullanılarak mRNA düzeyinde gösterilmesi. (A) *CLOCK*, (B) *BMAL1*, (C) *CRY1* ve (D) *PER2* genlerinin mRNA seviyesinde ekspresyonunun belirlenmesi. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. ($p < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

4.6. Uterus Dokularında Hippo Sinyal Yolu mRNA Seviyesinde Gösterilmesi

Sirkadiyen ritim bozulmasının Hippo sinyal yolu ile olan ilişkisini mRNA seviyesinde göstermek amacıyla uterus dokularında *YAP1* ve *TEAD4* ekspresyonları mRNA düzeyinde gösterildi. Yapılan değerlendirmeler ile bir hafta sürekli ışığa maruz kalan deney grubunda *YAP1* ve *TEAD4* ekspresyonlarının azaldığı belirlendi (Şekil 4.15).

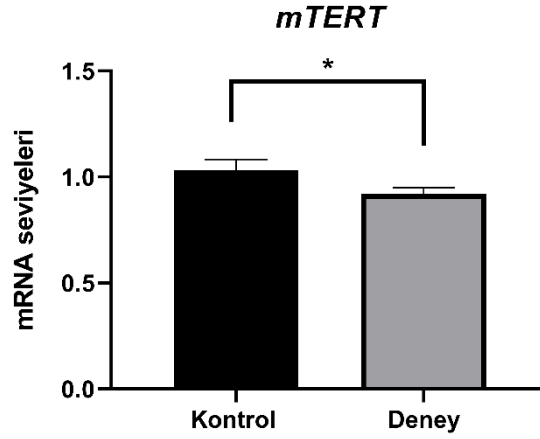


Şekil 4.15. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus dokularında YAP1 ve TEAD4 gen ekspresyonları qRT-PZR yöntemi kullanılarak mRNA düzeyinde gösterilmesi. (A) YAP1 (B) TEAD4 genlerinin mRNA seviyesinde ekspresyonunun belirlenmesi. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. ($p < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

4.7. Sirkadiyen Ritim Bozulmasında mTERT Ekspresyonunun mRNA Seviyesinde Gösterilmesi

Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus dokularında *mTERT* gen ekspresyonu qRT-PZR yöntemi kullanılarak mRNA düzeyinde gösterildi.

Kontrol ve sürekli ışık ile sirkadiyen ritmin bozulduğu gruptan elde edilen uterus örneklerinde *mTERT* ekspresyonu karşılaştırıldığında, sirkadiyen ritmin bozulduğu grupta *mTERT* ekspresyonunun azaldığı değerlendirildi (Şekil 4.16.)



Şekil 4.16. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen uterus dokularında *mTERT* gen ekspresyonunun qRT-PZR yöntemi ile mRNA düzeyinde gösterilmesi. *mTERT* ekspresyonu deney grubunda kontrol grubuna kıyasla azalma göstermiştir. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. ($p < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

5. TARTIŞMA

Sirkadiyen ritim, insanlar da dahil olmak üzere tüm memelilerde birçok fizyolojik fonksiyonu koordine eder. Dişi üreme sistemi, merkezi sirkadyen sistem tarafından düzenlenmektedir. Memelilerde sirkadiyen ritim; hipotalamusun ön kısmında bulunan suprakiazmatik çekirdek haricinde pankreas, karaciğer, kas, böbrek, yağ dokusu, ovaryum ve uterus gibi diğer organlar tarafından da düzenlenmektedir (150, 151). Sirkadiyen ritim; uyku, bilişsel fonksiyonlar, gen ekspresyonları, metabolik düzenlemeler, hormon üretimi/salınımı ve implantasyon gibi fizyolojik süreçlerde kadın üreme sağlığı açısından büyük öneme sahiptir (152). Yapılan araştırmalar ile sirkadiyen ritim genlerinin senkronizasyonunun üreme başarısı için kritik olduğu gösterilmiştir (52, 153, 154). Gece vardiyasında çalışan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda, ekstra maruz kalınan yapay ışığın sirkadiyen ritmi bozarak ovulasyonda ve menstrüal siklusta düzensizliklere neden olduğu, üreme fonksiyonunu azalttığı, tekrarlayan gebelik kayıplarına yol açarak gebelik oranlarını düşürdüğü ve fetusta düşük doğum ağırlığına sebep olduğu gösterilmiştir (155, 156). Işık ve karanlık döngüsünde meydana gelen herhangi bir bozukluğun, annenin uyku düzenini, embriyo gelişiminin erken aşamalarını, fetüsün gelişimini ve doğum sonrası kilo alımını etkileyebileceği de öne sürülmüştür. Bunun aksine, tekrarlayan ışık/karanlık değişimi veya jetlag benzeri durumların, dişi farelerde uterus reseptivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (65, 157, 158).

Hippo sinyal yolağı; hücre çoğalması, apoptoz ve kök hücrelerin kendi kendilerini yenileme mekanizmasını düzenleyerek organ büyüklüğünün belirlenmesinde rol alan, evrimsel süreç boyunca korunmuş bir sinyal yolağıdır (159, 160). Bunun yanı sıra, Hippo sinyal yolağında meydana gelebilecek regülasyon hatalarının kanser gelişimine neden olabileceği gösterilmiştir. Literatürde sirkadiyen ritim ile Hippo sinyal yolağı bileşenlerinin ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur (161-163). Yaşlanmayla ilişkili telomeraz aktivitesinin düzenlenmesinde birçok sistem etkilidir. İnsanlarda yaşlanma sürecinin sirkadiyen ritim ile ilişkili olduğu daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (164). Ancak sirkadiyen ritim ve telomer arasındaki etki mekanizmaları ve potansiyel işlevleri hala belirsizliğini korumaktadır. Tez projemizde tüm bu literatür bilgileri ışığında, sirkadiyen ritim ile uterus arasındaki ilişkinin Hippo sinyal yolağı ve telomeraz aktivitesi ile bağlantılı olabileceğini ortaya koymayı amaçladık. Sirkadiyen ritmin 1 hafta ışık maruziyeti ile bozulduğu farelerin ovaryumları incelendiğinde, total

folikül sayısının azaldığı belirlenmiştir. Buna ek olarak foliküler gelişimde önemli bir role sahip olan mTOR protein ekspresyonu seviyesinde de azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (165, 166). 2022 yılında Das ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sirkadiyen ritmi bozulmuş farelerin uterus lümen epitelinde ve endometriyum tabakasında kalınlaşma olduğu belirlenmiştir (167). Ayrıca çalışmada sirkadiyen ritmin bozulması ile endometriyum kalınlığında belirlenen artışın, ilerleyen süreçte kontrol grubuna yaklaştığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar sürekli ışığa maruz kalmanın belirli bir süre sonunda hayvanlar için normalizasyona ulaştığını göstermektedir (167). Biz de çalışmamızda, endometriyumun lümen epiteli kalınlığının deney grubunda kontrol grubuna kıyasla azaldığını belirledik. Buna ek olarak, miyometriyum kalınlığı, bez sayısı, lümen çapını değerlendirdiğimizde, bez sayısı ve lümen çapının arttığını, miyometriyum kalınlığının azaldığını, endometriyum kalınlığı ve damar lümeni çapında ise anlamlı bir farklılık olmadığını belirledik.

Tez çalışmamızda, Per2 lokalizasyonunu uterus lümen epitel hücrelerinde, uterinal bez epitelinde ve uterinal damar endotelinde gösterdik. Per2 proteinin immüno Floresan yoğunluğunun deney grubu uterus dokularında kontrol grubuna kıyasla azaldığını belirledik. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz Per2 immüno Floresan ve qRT-PZR verileri değerlendirildiğinde, Per2'nin mRNA düzeyinde değişmezken protein düzeyinde değişiklik göstermesi, bize 1 hafta ışık maruziyetinin sirkadiyen ritim genleri üzerinde transkripsiyonel seviyede değil, translasyonel düzeyde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Hippo sinyal yolağı, *Drosophila melanogaster*'den memelilere kadar evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yolağıdır. Hippo sinyal yolağı esas olarak bir kinaz kaskadı, DNA bağlama kompleksleri ve transkripsiyon koaktivatörlerinden oluşmaktadır (168). Hippo sinyal yolağı aktif olduğunda, LATS1/2 kinazlar tarafından YAP ve TAZ'ın fosforilasyonu gerçekleşir ve YAP/TAZ'ın sitoplazmada kalmasını sağlar (169-171). Hippo sinyali hücrelerde inaktif olduğunda YAP/TAZ fosforile edilir ve hücre çekirdeğine geçişi sağlanır. YAP/TAZ'ın hücre çekirdeğine geçişi TEAD ve SMAD genleri gibi onkogenik transkripsiyon faktörler ile birlikte onkogenlerin de transkripsiyonunu teşvik edebilir (172). Ayrıca, Hippo sinyal yolağındaki bozukluklar neoplaziye ve anormal hücre büyümesine neden olur (173). Endometriyal stromal hücreler başarılı bir implantasyon için oldukça

önemlidir ve Hippo sinyal yolağı bileşenlerini gösteren bir çalışmada, endometriyal stromal hücrelerde ve desidual YAP ekspresyonu belirlenmiştir (134). YAP, insanda desidual tabakada eksprese edilir ve ekspresyon seviyesinin gebe olmayan kadınların endometriyal stromal hücrelerine kıyasla desidual hücrelerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (134). Uterus, östrojen ve progesteron tarafından indüklenen endometriyal hücre proliferasyonu ve desidualizasyon dahil olmak üzere dinamik değişikliklere uğramaktadır. Anjiyogenezi, hücre proliferasyonunu, farklılaşmayı ve apoptozu düzenlediği bilinen Hippo sinyal yolağının uterusun döngüsel değişiklikleri sırasında neden olduğu olaylar yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Song ve arkadaşları sağlıklı kadınlara ait endometriyum ile endometriyozlu kadınlara ait eutopik ve ektopik endometriyum örneklerini kullandıkları çalışmalarında normal endometriyuma kıyasla eutopik ve ektopik endometriyumlarda YAP1 ekspresyonunun arttığını, fosforile YAP1 (pYAP)'ın ise azaldığını göstermişlerdir (136). Tez çalışmamızda; sirkadiyen ritmin 1 hafta boyunca sürekli ışık maruziyeti ile bozulması sonrasında Hippo sinyal yolağı ko-aktivatörleri olan YAP1 ve TEAD4 ekspresyonları fare uterusunda immünofloresan ve qRT-PZR yöntemi ile belirlenmiştir. YAP1 ve TEAD4 ekspresyonları endometriyumun lümen epiteli, uterinal bez epiteli ve uterinal damar endotelinde, hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında belirlendi. Genel olarak YAP1 ve TEAD4'ün endometriyal epitel hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese olduğu gözlemlendi. Deney grubundaki YAP1 ve TEAD4 proteinlerinin immünofloresan yoğunluklarını kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda, sirkadiyen ritmin bozulduğu uterusda YAP1 ve TEAD4 ekspresyonunun daha fazla olduğu değerlendirildi. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen uterus dokularında YAP1 ve TEAD4 ekspresyonlarını değerlendirdiğimizde, gruplar arasında mRNA düzeyinde bir farklılığın olmadığını belirledik. Bulgularımız doğrultusunda, sirkadiyen ritmin bir hafta sürekli ışık ile bozulması durumunda, uterusda eksprese olan YAP1 ve TEAD4 Hippo sinyal yolağı bileşenlerinin transkripsiyonel seviyede değil translasyonel seviyede etkilendiğini düşünmekteyiz.

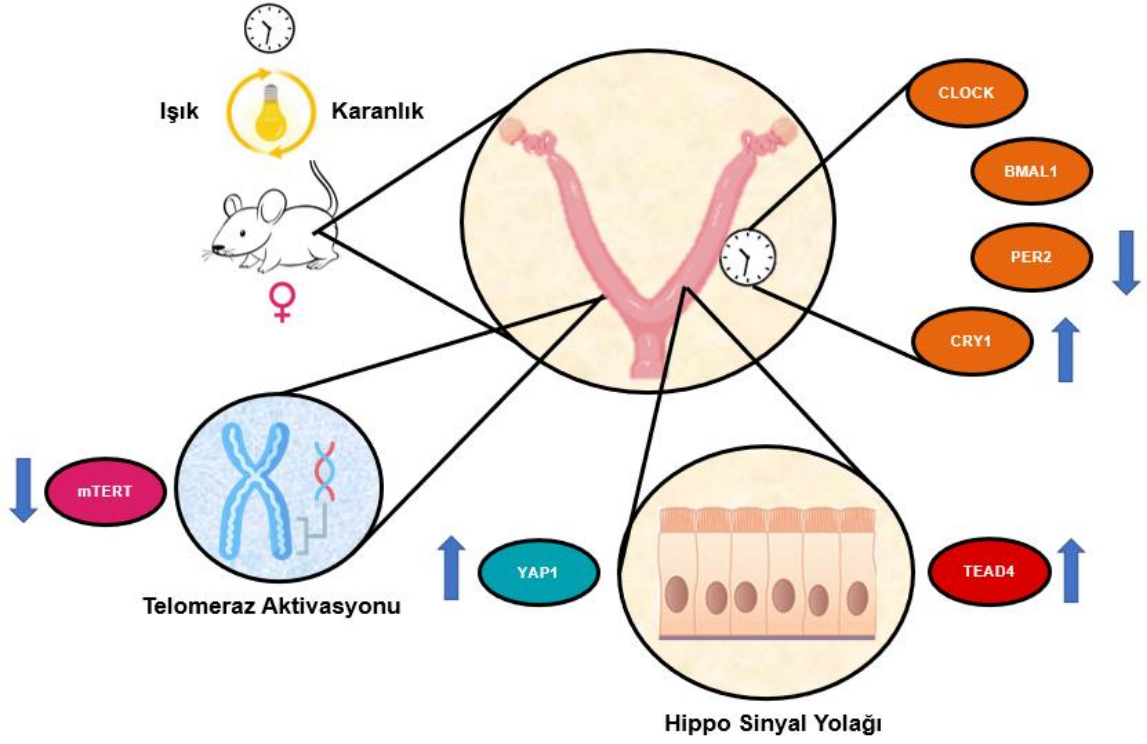
Memelilerde yapılan çalışmalarda, sirkadiyen ritim genlerinin (*PER1*, *PER2*, *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK* ve *BMAL1*) sirkadiyen ritim düzenleyicileri olarak rol aldığı gösterilmiştir. Sirkadiyen ritimde görev alan tüm bu genler, hücrede birçok farklı genler ile iletişim kurarak farklı mekanizmalarda görev almaktadır. Yapılan bir çalışmada, uzun süre ışığa maruz kalmanın, dişi hamsterlarda, merkezi ve periferik sirkadiyen ritim genlerindeki (*BMAL1*, *PER1*, *PER2*, *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK*) ekspresyon farklılıklarının

ve düşük progesteron seviyesinin uterus adenomiyozisine neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmadan elde edilen sonuçlar, farelerde adenomiyozisin endometriyal reseptiviteyi etkilediğini ve subfertilite ile sonuçlandığını göstermektedir (174). Uzun süre ışığa maruz kalmanın gebelikte sirkadiyen senkronizasyon bozukluğuna yol açtığı, kontrol grubuna kıyasla deney gruplarında *Bmal1* ve *Clock* ekspresyonlarını artırdığı; *Per1*, *Per2*, *Cry1* ve *Cry2* sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyonlarını azalttığı belirlenmiştir (174). Çalışmamızda; *Per2*, *Clock*, *Bmal1* ve *Cry1* sirkadiyen ritim genlerinin mRNA seviyesinde ekspresyonu incelendiğinde, bir hafta sürekli ışığa maruz kalan deneklerden izole edilen uterus dokularında sadece *Cry1* ekspresyonunda azalma olduğunu belirledik. Diğer genlerde ise mRNA seviyesinde anlamlı bir değişiklik belirlemedik. *Cry1* mRNA ekspresyon seviyesinde diğer çalışmalara göre bulunan bu farklılığın ve *Clock*, *Bmal1* ve *Per2* transkripsiyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık görülmemesi sebebinin deney modelimizin yalnızca 1 hafta ışık maruziyeti ile oluşturulması olabileceğini düşünmekteyiz. Daha önce yapılan çalışmalarda sirkadiyen ritmin bozulması için oluşturulan modellerde ışık maruziyeti 1 ay süre ile uygulanmıştır. Çalışmamızda kısa süreli ışık maruziyetinin etkisi değerlendirilmiştir. Bu durum bize bir hafta sürekli ışığa maruz kalmanın, diğer genlerin ekspresyon seviyeleri üzerinde etki göstermek için yeterince uzun bir süre olmadığını düşündürdü. Buna ek olarak, *Cry1*'in uterusu fonksiyonel olarak daha etkili bir sirkadiyen ritim geni olabileceğini gösterdi.

Telomerler, kromozomların uç kısımlarında bulunan ve tekrarlayan TTAGGG dizilerinden oluşur. Telomerler, kromozom uçlarını farklı kromozomlar veya kardeş kromatitler arasında meydana gelebilecek füzyondan koruyarak genomik bütünlüğü sağlarlar (175). Telomer uzunluğu her hücre bölünmesi ile kısalır ve hücrelerin büyüme kapasitesini sınırlandırır. Telomeraz aktivitesinin düzenlenmesinde birçok sistem etkilidir. Bunlardan bazıları TERT geninin ekspresyonunun kontrolü, enzimatik fosforilasyon ve telomer kompleksi alt biriminin birikimi ve taşınmasıdır (176). Yapılan araştırmalarda sirkadiyen ritim ile yaşlanma sürecinde meydana gelen fizyolojik değişiklikler arasında bağlantı olabileceği ileri sürülmüştür (164). *Drosophila*'da aydınlık/karanlık döngüsünün bozulması veya sirkadiyen ritim genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda yaşam süresinin kısaldığı gösterilmiştir (177). *BMAL1*, *CLOCK* ve *PER1/2* gen eksikliği olan fareler ile yapılan çalışmalarda, erken yaşlanma süreci izlenmiştir (178). Yaşlı fareler üzerine yapılan çalışmalarda ışık maruziyeti etkilerine karşı sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyelerinin azaldığı

bildirilmiştir (179). Bu bulgular, sirkadiyen ritim ve telomeraz aktivitesi arasında potansiyel olarak önemli bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda, kontrol grubu uterus kesitlerinde mTERT'in uterusun lümen epitelinde, uterinal bez epitelinde ve uterinal damarların endotel hücrelerinde sitoplazma ve çekirdekte lokalize olduğunu gösretdik. Buna karşın deney grubu uterus kesitlerinde, mTERT'in genel olarak çekirdekte lokalize olduğunu belirledik. Ayrıca, kontrol ve deney grubundan elde ettiğimiz qRT-PZR sonuçlarımız ile deney grubunda *mTERT* ekspresyonunun mRNA düzeyinde de azaldığını belirledik. Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler, bir hafta sürekli ışığa maruziyet sonucu sirkadiyen ritim bozulmasının mTERT ekspresyonunun azalmasına neden olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada YAP'ın ektopik ekspresyonunun veya fizyolojik aktivasyonunun hTERT mRNA ve protein seviyelerinde artışa sebep olduğu, YAP'ın aşağı regüle edilmesinin ise hTERT ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Bu durum hTERT'in bir YAP hedef geni olduğunu düşündürmektedir (180). Biz çalışmamızda, sirkadiyen ritmin bir hafta sürekli ışık ile bozulmasında, YAP ekspresyonunun transkripsiyonel seviyedeki artışının mTERT ekspresyonunun azalmasına neden olduğunu ortaya koyduk. Elde ettiğimiz sonuçlarımız, insandan farklı olarak fare uterusunda Hippo sinyal yolağı ile mTERT arasında ters orantılı bir ilişkinin olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu uteruslarda; morfolojik değişikliklerin meydana geldiğini, Hippo sinyal yolağı proteinleri YAP1 ve TEAD4'ün ekspresyonlarının arttığını ve mTERT ekspresyonunun azaldığını belirledik. Elde ettiğimiz bulgular, sirkadiyen ritim bozulmasının farede uterus üzerindeki etkisinin, hippo sinyal yolağı üzerinden gerçekleşebileceğini göstermektedir (Şekil 5.1). Tez çalışmamız sonucu elde ettiğimiz verilerin, gece vardiyasında çalışan kadınlarda, tekrarlayan ışık/karanlık değişimi veya jetlag benzeri durumlarda uterusun kendi sirkadiyen ritminin düzenlenmesinde Hippo sinyal yolağının önemli olabileceğini düşünmekteyiz. Sirkadiyen ritim bozulması neticesinde karşılaşılan açıklanamayan infertilitede, Hippo sinyal yolağı bileşenlerinin terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini önermekteyiz.



Şekil 5.1. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu fare uterusunda, Hippo sinyal yolağı bileşenleri YAP1 ve TEAD4 ve telomeraz katalitik alt ünitesi mTERT arasındaki ilişkinin gösterilmesi.

6. KAYNAKÇA

1. Wu R, Dang F, Li P, Wang P, Xu Q, Liu Z, et al. The circadian protein Period2 suppresses mTORC1 activity via recruiting Tsc1 to mTORC1 complex. *Cell metabolism*. 2019;29(3):653-67. e6.
2. Shuboni D, Yan L. Nighttime dim light exposure alters the responses of the circadian system. *Neuroscience*. 2010;170(4):1172-8.
3. Reinke H, Asher G. Crosstalk between metabolism and circadian clocks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20(4):227-41.
4. Richards J, Gumz ML. Mechanism of the circadian clock in physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2013;304(12):R1053-R64.
5. Brainard J, Gobel M, Scott B, Koeppen M, Eckle T. Health implications of disrupted circadian rhythms and the potential for daylight as therapy. *Anesthesiology*. 2015;122(5):1170-5.
6. Sellix MT, Menaker M. Circadian clocks in the ovary. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2010;21(10):628-36.
7. Fonken LK, Nelson RJ. The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocrine reviews*. 2014;35(4):648-70.
8. Dey A, Varelas X, Guan K-L. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. *Nature reviews Drug discovery*. 2020;19(7):480-94.
9. Yu F-X, Zhao B, Guan K-L. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. *Cell*. 2015;163(4):811-28.
10. Cunningham R, Hansen CG. The Hippo pathway in cancer: YAP/TAZ and TEAD as therapeutic targets in cancer. *Clinical Science*. 2022;136(3):197-222.
11. Wei C, Wang Y, Li X. The role of Hippo signal pathway in breast cancer metastasis. *OncoTargets and therapy*. 2018:2185-93.
12. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiological reviews*. 2008;88(2):557-79.

13. Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nature reviews cancer*. 2008;8(6):450-8.
14. Yao Y, Silver R. Mutual shaping of circadian body-wide synchronization by the suprachiasmatic nucleus and circulating steroids. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2022:168.
15. Zečević K, Popović N, Vuksanović Božarić A, Vukmirović M, Rizzo M, Muzurović E. Timing Is Important—Management of Metabolic Syndrome According to the Circadian Rhythm. *Biomedicines*. 2023;11(4):1171.
16. Archer SN, Oster H. How sleep and wakefulness influence circadian rhythmicity: effects of insufficient and mistimed sleep on the animal and human transcriptome. *Journal of sleep research*. 2015;24(5):476-93.
17. Topaloglu-Ak A, Kurtulmus H, Basa S, Sabuncuoglu O. Can sleeping habits be associated with sleep bruxism, temporomandibular disorders and dental caries among children. *Dent Med Probl*. 2022;20221(10.17219).
18. Kumar V, Sharma A. Common features of circadian timekeeping in diverse organisms. *Current Opinion in Physiology*. 2018;5:58-67.
19. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6(7):544-56.
20. Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Circadian clocks*. 2013:3-27.
21. Sherman H, Gutman R, Chapnik N, Meylan J, Le Coutre J, Froy O. Caffeine alters circadian rhythms and expression of disease and metabolic markers. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2011;43(5):829-38.
22. Hironao K-y, Mitsuhashi Y, Huang S, Oike H, Ashida H, Yamashita Y. Cacao polyphenols regulate the circadian clock gene expression and through glucagon-like peptide-1 secretion. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2020;67(1):53-60.
23. Bonnell EK, Huggins CE, Huggins CT, McCaffrey TA, Palermo C, Bonham MP. Influences on dietary choices during day versus night shift in shift workers: a mixed methods study. *Nutrients*. 2017;9(3):193.

24. Roenneberg T, Merrow M. The circadian clock and human health. *Current biology*. 2016;26(10):R432-R43.
25. Ekmekcioglu C, Touitou Y. Chronobiological aspects of food intake and metabolism and their relevance on energy balance and weight regulation. *Obesity reviews*. 2011;12(1):14-25.
26. Lowden A, Moreno C, Holmbäck U, Lennernäs M, Tucker P. Eating and shift work—effects on habits, metabolism, and performance. *Scandinavian journal of work, environment & health*. 2010;150-62.
27. Nagaya T, Yoshida H, Takahashi H, Kawai M. Markers of insulin resistance in day and shift workers aged 30–59 years. *International archives of occupational and environmental health*. 2002;75:562-8.
28. Morgan L, Arendt J, Owens D, Folkard S, Hampton S, Deacon S, et al. Effects of the endogenous clock and sleep time on melatonin, insulin, glucose and lipid metabolism. *Journal of endocrinology*. 1998;157(3):443-52.
29. Lund J, Arendt J, Hampton S, English J, Morgan L. Postprandial hormone and metabolic responses amongst shift workers in Antarctica. *Journal of Endocrinology*. 2001;171(3):557-64.
30. Onat A, Sarı İ, Yazıcı M, Can G, Hergenç G, Avcı GŞ. Plasma triglycerides, an independent predictor of cardiovascular disease in men: a prospective study based on a population with prevalent metabolic syndrome. *International journal of cardiology*. 2006;108(1):89-95.
31. Halperin D. Environmental noise and sleep disturbances: A threat to health? *Sleep science*. 2014;7(4):209-12.
32. Meléndez-Fernández OH, Liu JA, Nelson RJ. Circadian Rhythms Disrupted by Light at Night and Mistimed Food Intake Alter Hormonal Rhythms and Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(4):3392.
33. Muzet A. Environmental noise, sleep and health. *Sleep medicine reviews*. 2007;11(2):135-42.
34. Patrick DM, Harrison DG. Nocturnal noise knocks NOS by Nox: mechanisms underlying cardiovascular dysfunction in response to noise pollution. *European Heart Journal*. 2018;39(38):3540.

35. Buja A, Lange JH, Perissinotto E, Rausa G, Grigoletto F, Canova C, et al. Cancer incidence among male military and civil pilots and flight attendants: an analysis on published data. *Toxicology and industrial health*. 2005;21(9):273-82.
36. Gudmundsdottir EM, Hrafnkelsson J, Rafnsson V. Incidence of cancer among licenced commercial pilots flying North Atlantic routes. *Environmental Health*. 2017;16(1):1-10.
37. Raslau D, Summerfield DT, Abu Dabrh AM, Steinkraus LW, Murad MH. RETRACTED ARTICLE: The Risk of Prostate Cancer in Pilots: A Meta-Analysis. *Aerospace medicine and human performance*. 2015;86(2):112-7.
38. Webber BJ, Tacke CD, Wolff GG, Rutherford AE, Erwin WJ, Escobar JD, et al. Cancer Incidence and Mortality Among Fighter Aviators in the United States Air Force. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2022;64(1):71.
39. Peplowska B, Burdelak W, Bukowska A, Kryszka J, Konieczko K. Night shift work characteristics and occupational co-exposures in industrial plants in Łódź, Poland. *International journal of occupational medicine and environmental health*. 2013;26:522-34.
40. Erren TC, Falaturi P, Morfeld P, Knauth P, Reiter RJ, Piekarski C. Shift work and cancer: the evidence and the challenge. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2010;107(38):657.
41. Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell*. 1997;90(6):1003-11.
42. Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, et al. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature*. 1997;389(6650):512-6.
43. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 1998;93(6):929-37.
44. Duffy JF, Abbott SM, Burgess HJ, Crowley SJ, Emens JS, Epstein LJ, et al. Workshop report. Circadian rhythm sleep–wake disorders: gaps and opportunities. *Sleep*. 2021;44(5):zsaa281.
45. Buysse DJ. Sleep health: can we define it? Does it matter? *Sleep*. 2014;37(1):9-17.

46. Borbély AA. A two process model of sleep regulation. *Hum neurobiol.* 1982;1(3):195-204.
47. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, et al. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell.* 1999;98(2):193-205.
48. Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in cell biology.* 2014;24(2):90-9.
49. Nader N, Chrousos GP, Kino T. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2010;21(5):277-86.
50. Dasari SS, Archer M, Mohamed NE, Tewari AK, Figueiro MG, Kyprianou N. Circadian Rhythm Disruption as a Contributor to Racial Disparities in Prostate Cancer. *Cancers.* 2022;14(20):5116.
51. Dror T, Franks J, Kauffman AS. Analysis of multiple positive feedback paradigms demonstrates a complete absence of LH surges and GnRH activation in mice lacking kisspeptin signaling. *Biology of reproduction.* 2013;88(6):146, 1-8.
52. Dolatshad H, Campbell EA, O'Hara L, Maywood ES, Hastings MH, Johnson MH. Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice. *Hum Reprod.* 2006;21(1):68-79.
53. Ruan W, Yuan X, Eltzschig HK. Circadian rhythm as a therapeutic target. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2021;20(4):287-307.
54. Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, Miyawaki A, et al. Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca²⁺ in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron.* 2003;38(2):253-63.
55. Lundkvist GB, Kwak Y, Davis EK, Tei H, Block GD. A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons. *Journal of Neuroscience.* 2005;25(33):7682-6.
56. Nahm S-S, Farnell YZ, Griffith W, Earnest DJ. Circadian regulation and function of voltage-dependent calcium channels in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience.* 2005;25(40):9304-8.

57. O'Neill JS, Maywood ES, Chesham JE, Takahashi JS, Hastings MH. cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science*. 2008;320(5878):949-53.
58. Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(11):7728-33.
59. de Jeu M, Hermes M, Pennartz C. Circadian modulation of membrane properties in slices of rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport*. 1998;9(16):3725-9.
60. Liu AC, Lewis WG, Kay SA. Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nature chemical biology*. 2007;3(10):630-9.
61. Paschos GK, FitzGerald GA. Circadian clocks and vascular function. *Circulation research*. 2010;106(5):833-41.
62. Hahm B-J, Jo B, Dhabhar FS, Palesh O, Aldridge-Gerry A, Bajestan SN, et al. Bedtime misalignment and progression of breast cancer. *Chronobiology international*. 2014;31(2):214-21.
63. Flynn-Evans EE, Mucci L, Stevens RG, Lockley SW. Shiftwork and prostate-specific antigen in the National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(17):1292-7.
64. Mahoney MM. Shift work, jet lag, and female reproduction. *International journal of endocrinology*. 2010;2010.
65. Summa KC, Vitaterna MH, Turek FW. Environmental perturbation of the circadian clock disrupts pregnancy in the mouse. *PloS one*. 2012;7(5):e37668.
66. Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Current biology*. 2004;14(15):1367-73.
67. Parent M-É, El-Zein M, Rousseau M-C, Pintos J, Siemiatycki J. Night work and the risk of cancer among men. *American journal of epidemiology*. 2012;176(9):751-9.
68. Papantoniou K, Castaño-Vinyals G, Espinosa A, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Burgos J, et al. Night shift work, chronotype and prostate cancer risk in the MCC-Spain case-control study. *International journal of cancer*. 2015;137(5):1147-57.

69. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The developing human-e-book: clinically oriented embryology: Elsevier Health Sciences; 2018.
70. Richardson GS. Ovarian physiology. *New England Journal of Medicine*. 1966;274(20):1121-34.
71. Mescher AL. Junqueira's basic histology: text and atlas: New York: McGraw Hill; 2018.
72. Puppo V. Embryology and anatomy of the vulva: the female orgasm and women's sexual health. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011;154(1):3-8.
73. de Ziegler D, Pirtea P, Galliano D, Cicinelli E, Meldrum D. Optimal uterine anatomy and physiology necessary for normal implantation and placentation. *Fertility and sterility*. 2016;105(4):844-54.
74. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine reviews*. 2014;35(6):851-905.
75. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology: a text and atlas with cell and molecular biology. (No Title). 2003.
76. Hawkins SM, Matzuk MM. The menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1135(1):10-8.
77. Moenter SM, Chu Z, Christian CA. Neurobiological mechanisms underlying oestradiol negative and positive feedback regulation of gonadotrophin- releasing hormone neurones. *Journal of neuroendocrinology*. 2009;21(4):327-33.
78. Najmabadi S, Schliep KC, Simonsen SE, Porucznik CA, Egger MJ, Stanford JB. Menstrual bleeding, cycle length, and follicular and luteal phase lengths in women without known subfertility: A pooled analysis of three cohorts. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2020;34(3):318-27.
79. Sadler TW. Langman's medical embryology: Lippincott Williams & Wilkins; 2022.
80. Kierszenbaum AL, Tres L. Histology and Cell Biology: an introduction to pathology E-Book: Elsevier Health Sciences; 2015.
81. Richards JS. The ovarian cycle. *Vitamins and hormones*. 2018;107:1-25.

82. Kirby D. Development of the mouse blastocyst transplanted to the spleen. *Reproduction*. 1963;5(1):1-NP.
83. Malik M, Roh M, England SK. Uterine contractions in rodent models and humans. *Acta physiologica*. 2021;231(4):e13607.
84. de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *Journal of reproductive immunology*. 1998;39(1-2):149-66.
85. Nikas G, Aghajanova L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reproductive BioMedicine Online*. 2002;4:18-23.
86. Shekibi M, Heng S, Nie G. MicroRNAs in the regulation of endometrial receptivity for embryo implantation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(11):6210.
87. Ashary N, Tiwari A, Modi D. Embryo implantation: war in times of love. *Endocrinology*. 2018;159(2):1188-98.
88. Sharma A, Kumar P. Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *Journal of human reproductive sciences*. 2012;5(1):2.
89. Arıcı A, Attar E, Balaban E, Buyru F, Çolgar U. Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul. 2006:249-59.
90. Gardner D, Weissman A, Howles C, Shoham Z. Yardımla üreme teknikleri temel kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2010.
91. Aplin JD, Ruane PT. Embryo–epithelium interactions during implantation at a glance. *Journal of cell science*. 2017;130(1):15-22.
92. Everett JW, Sawyer CH. A neural timing factor in the mechanism by which progesterone advances ovulation in the cyclic rat. *Endocrinology*. 1949;45(6):581-95.
93. Urbanski HF, Pickle RL, Ramirez VD. Simultaneous measurement of gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in the orchidectomized rat. *Endocrinology*. 1988;123(1):413-9.
94. Belchetz P, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 1978;202:631-3.

95. Knobil E, Plant T, Wildt L, Belchetz P, Marshall G. Control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 1980;207(4437):1371-3.
96. Wildt L, Häusler A, Marshall G, Hutchison J, Plant T, Belchetz P, et al. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 1981;109(2):376-85.
97. Adams JM, Taylor A, Schoenfeld DA, Crowley Jr W, Hall JE. The midcycle gonadotropin surge in normal women occurs in the face of an unchanging gonadotropin-releasing hormone pulse frequency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1994;79(3):858-64.
98. Matsuda F, Ohkura S, Magata F, Munetomo A, Chen J, Sato M, et al. Role of kisspeptin neurons as a GnRH surge generator: Comparative aspects in rodents and non-rodent mammals. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2019;45(12):2318-29.
99. Comninou AN, Wall MB, Demetriou L, Shah AJ, Clarke SA, Narayanaswamy S, et al. Kisspeptin modulates sexual and emotional brain processing in humans. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(2):709-19.
100. Putteeraj M, Soga T, Ubuka T, Parhar IS. A “timed” kiss is essential for reproduction: lessons from mammalian studies. *Frontiers in endocrinology*. 2016;7:121.
101. Saedi S, Khoradmehr A, Reza JSM, Tamadon A. The role of neuropeptides and neurotransmitters on kisspeptin/kiss1r-signaling in female reproduction. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2018;92:71-82.
102. Kunimura Y, Iwata K, Ishigami A, Ozawa H. Age-related alterations in hypothalamic kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons and in pulsatile LH release in female and male rats. *Neurobiology of Aging*. 2017;50:30-8.
103. Garcia JP, Guerriero KA, Keen KL, Kenealy BP, Seminara SB, Terasawa E. Kisspeptin and neurokinin B signaling network underlies the pubertal increase in GnRH release in female rhesus monkeys. *Endocrinology*. 2017;158(10):3269-80.
104. Qiu J, Nestor CC, Zhang C, Padilla SL, Palmiter RD, Kelly MJ, et al. High-frequency stimulation-induced peptide release synchronizes arcuate kisspeptin neurons and excites GnRH neurons. *Elife*. 2016;5:e16246.

105. Kalil B, Ribeiro AB, Leite CM, Uchôa ET, Carolino RO, Cardoso TS, et al. The increase in signaling by kisspeptin neurons in the preoptic area and associated changes in clock gene expression that trigger the LH surge in female rats are dependent on the facilitatory action of a noradrenaline input. *Endocrinology*. 2016;157(1):323-35.
106. Adams C, Stroberg W, DeFazio RA, Schnell S, Moenter SM. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron excitability is regulated by estradiol feedback and kisspeptin. *Journal of Neuroscience*. 2018;38(5):1249-63.
107. Williams III WP, Jarjisian SG, Mikkelsen JD, Kriegsfeld LJ. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 2011;152(2):595-606.
108. Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 2009;150(8):3664-71.
109. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS- 1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *Journal of neuroendocrinology*. 2006;18(4):298-303.
110. Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa E, et al. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology*. 2011;152(4):1347-54.
111. Sutton GM, Centanni AV, Butler AA. Protein malnutrition during pregnancy in C57BL/6J mice results in offspring with altered circadian physiology before obesity. *Endocrinology*. 2010;151(4):1570-80.
112. Laposky AD, Bradley MA, Williams DL, Bass J, Turek FW. Sleep-wake regulation is altered in leptin-resistant (db/db) genetically obese and diabetic mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008;295(6):R2059-R66.
113. Kyriazoglou A, Lontos M, Zakopoulou R, Kaparelou M, Tsiara A, Papatheodoridi AM, et al. The role of the hippo pathway in breast cancer carcinogenesis, prognosis, and treatment: A systematic review. *Breast Care*. 2021;16(1):6-15.
114. Meng Z, Moroishi T, Guan K-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & development*. 2016;30(1):1-17.

115. Koontz L, Liu-- Chittenden. F áYin, Y áZheng, J áYu, B áHuang, Q áChen, S áWu, and D áPan. 2013:388-401.
116. Totaro A, Panciera T, Piccolo S. YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nature cell biology*. 2018;20(8):888-99.
117. Yu F-X, Guan K-L. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development*. 2013;27(4):355-71.
118. Yin F, Yu J, Zheng Y, Chen Q, Zhang N, Pan D. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell*. 2013;154(6):1342-55.
119. Ni L, Zheng Y, Hara M, Pan D, Luo X. Structural basis for Mob1-dependent activation of the core Mst–Lats kinase cascade in Hippo signaling. *Genes & development*. 2015;29(13):1416-31.
120. Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang C-Y, Guan K-L. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF β -TRCP. *Genes & development*. 2010;24(1):72-85.
121. Liu C-Y, Zha Z-Y, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, et al. The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(48):37159-69.
122. Shi Z, He F, Chen M, Hua L, Wang W, Jiao S, et al. DNA-binding mechanism of the Hippo pathway transcription factor TEAD4. *Oncogene*. 2017;36(30):4362-9.
123. Crawford JJ, Bronner SM, Zbieg JR. Hippo pathway inhibition by blocking the YAP/TAZ–TEAD interface: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2018;28(12):867-73.
124. Kim M, Kim T, Johnson RL, Lim D-S. Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. *Cell reports*. 2015;11(2):270-82.
125. Qing Y, Yin F, Wang W, Zheng Y, Guo P, Schozer F, et al. The Hippo effector Yorkie activates transcription by interacting with a histone methyltransferase complex through NcoA6. *Elife*. 2014;3:e02564.

126. Oh H, Slattery M, Ma L, White KP, Mann RS, Irvine KD. Yorkie promotes transcription by recruiting a histone methyltransferase complex. *Cell reports*. 2014;8(2):449-59.
127. Valencia-Sama I, Zhao Y, Lai D, van Rensburg HJJ, Hao Y, Yang X. Hippo component TAZ functions as a co-repressor and negatively regulates Δ Np63 transcription through TEA domain (TEAD) transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(27):16906-17.
128. Moroishi T, Park HW, Qin B, Chen Q, Meng Z, Plouffe SW, et al. A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes & development*. 2015;29(12):1271-84.
129. Hau JC, Erdmann D, Mesrouze Y, Furet P, Fontana P, Zimmermann C, et al. The TEAD4–YAP/TAZ protein–protein interaction: expected similarities and unexpected differences. *Chembiochem*. 2013;14(10):1218-25.
130. Tang F, Gill J, Ficht X, Barthlott T, Cornils H, Schmitz-Rohmer D, et al. The kinases NDR1/2 act downstream of the Hippo homolog MST1 to mediate both egress of thymocytes from the thymus and lymphocyte motility. *Science signaling*. 2015;8(397):ra100-ra.
131. Huang Z, Zhou J, Leung WT, Gober HJ, Pan X, Li C, et al. The novel role of Hippo-YAP/TAZ in immunity at the mammalian maternal-fetal interface: Opportunities, challenges. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;126:110061.
132. Enzo E, Santinon G, Pocaterra A, Aragona M, Bresolin S, Forcato M, et al. Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *The EMBO journal*. 2015;34(10):1349-70.
133. Boopathy GT, Hong W. Role of hippo pathway-YAP/TAZ signaling in angiogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019;7:49.
134. Chen H, Song Y, Yang S, Fu J, Feng X, Huang W. YAP mediates human decidualization of the uterine endometrial stromal cells. *Placenta*. 2017;53:30-5.
135. Pei T, Huang X, Long Y, Duan C, Liu T, Li Y, et al. Increased expression of YAP is associated with decreased cell autophagy in the eutopic endometrial stromal cells of endometriosis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2019;491:110432.

136. Song Y, Fu J, Zhou M, Xiao L, Feng X, Chen H, et al. Activated hippo/yes-associated protein pathway promotes cell proliferation and anti-apoptosis in endometrial stromal cells of endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(4):1552-61.
137. Wang Y, Yu M, Yang J-X, Cao D-Y, Zhang Y, Zhou H-M, et al. Genomic comparison of endometrioid endometrial carcinoma and its precancerous lesions in Chinese patients by high-depth next generation sequencing. *Frontiers in Oncology*. 2019;9:123.
138. Moon S, Hwang S, Kim B, Lee S, Kim H, Lee G, et al. Hippo Signaling in the Endometrium. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(7):3852.
139. Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, et al. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*. 2009;323(5914):644-8.
140. Cong Y-S, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2002;66(3):407-25.
141. Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nature medicine*. 2000;6(8):849-51.
142. Akincilar SC, Unal B, Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73:1659-70.
143. Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, et al. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging cell*. 2011;10(5):761-8.
144. Chen W-D, Wen M-S, Shie S-S, Lo Y-L, Wo H-T, Wang C-C, et al. The circadian rhythm controls telomeres and telomerase activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;451(3):408-14.
145. Park J, Zhu Q, Mirek E, Na L, Raduwan H, Anthony TG, et al. BMAL1 associates with chromosome ends to control rhythms in TERRA and telomeric heterochromatin. *PloS one*. 2019;14(10):e0223803.

146. Foteinou PT, Venkataraman A, Francey LJ, Anafi RC, Hogenesch JB, Doyle III FJ. Computational and experimental insights into the circadian effects of SIRT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(45):11643-8.
147. Chang H-C, Guarente L. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell*. 2013;153(7):1448-60.
148. Wang R-H, Zhao T, Cui K, Hu G, Chen Q, Chen W, et al. Negative reciprocal regulation between Sirt1 and Per2 modulates the circadian clock and aging. *Scientific reports*. 2016;6(1):28633.
149. Ahmed R, Ashimori A, Iwamoto S, Matsui T, Nakahata Y, Bessho Y. Replicative senescent human cells possess altered circadian clocks with a prolonged period and delayed peak-time. *Aging (albany NY)*. 2019;11(3):950.
150. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418(6901):935-41.
151. Tasaki H, Zhao L, Isayama K, Chen H, Nobuhiko Y, Yasufumi S, et al. Profiling of circadian genes expressed in the uterus endometrial stromal cells of pregnant rats as revealed by DNA microarray coupled with RNA interference. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:82.
152. Plano SA, Casiraghi LP, García Moro P, Paladino N, Golombek DA, Chiesa JJ. Circadian and Metabolic Effects of Light: Implications in Weight Homeostasis and Health. *Front Neurol*. 2017;8:558.
153. Hsu CN, Tain YL. Light and Circadian Signaling Pathway in Pregnancy: Programming of Adult Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6).
154. Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol*. 2004;14(15):1367-73.
155. Zhu JL, Hjollund NH, Andersen AM, Olsen J. Shift work, job stress, and late fetal loss: The National Birth Cohort in Denmark. *J Occup Environ Med*. 2004;46(11):1144-9.
156. Kaneshi Y, Ohta H, Morioka K, Hayasaka I, Uzuki Y, Akimoto T, et al. Influence of light exposure at nighttime on sleep development and body growth of preterm infants. *Sci Rep*. 2016;6:21680.

157. Goldstein CA, O'Brien LM, Bergin IL, Saunders TL. The effect of repeated light-dark shifts on uterine receptivity and early gestation in mice undergoing embryo transfer. *Syst Biol Reprod Med*. 2018;64(2):103-11.
158. Fernandez RC, Marino JL, Varcoe TJ, Davis S, Moran LJ, Rumbold AR, et al. Fixed or Rotating Night Shift Work Undertaken by Women: Implications for Fertility and Miscarriage. *Semin Reprod Med*. 2016;34(2):74-82.
159. Mo JS, Park HW, Guan KL. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep*. 2014;15(6):642-56.
160. Yildirim E, Bora G, Onel T, Talas N, Yaba A. Cell fate determination and Hippo signaling pathway in preimplantation mouse embryo. *Cell and Tissue Research*. 2021;386(3):423-44.
161. Cha S, Wang J, Lee SM, Tan Z, Zhao Q, Bai D. Clock-modified mesenchymal stromal cells therapy rescues molecular circadian oscillation and age-related bone loss via miR142-3p/Bmal1/YAP signaling axis. *Cell Death Discov*. 2022;8(1):111.
162. Karpowicz P, Zhang Y, Hogenesch JB, Emery P, Perrimon N. The circadian clock gates the intestinal stem cell regenerative state. *Cell Rep*. 2013;3(4):996-1004.
163. Stokes K, Nunes M, Trombley C, Flôres D, Wu G, Taleb Z, et al. The Circadian Clock Gene, Bmal1, Regulates Intestinal Stem Cell Signaling and Represses Tumor Initiation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;12(5):1847-72.e0.
164. Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD. Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10801-6.
165. Brainard J, Gobel M, Scott B, Koeppen M, Eckle T. Health implications of disrupted circadian rhythms and the potential for daylight as therapy. *Anesthesiology*. 2015;122(5):1170-5.
166. Bora G, Önel T, Yıldırım E, Yaba A. Circadian regulation of mTORC1 signaling via Per2 dependent mechanism disrupts folliculogenesis and oocyte maturation in female mice. *J Mol Histol*. 2023;54(3):217-29.
167. Das M, Minocha T, Kumar D, Yadav SK, Haldar C. Continuous artificial light potentially disrupts central and peripheral reproductive clocks leading to altered uterine

physiology and reduced pregnancy success in albino mice. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2022;21(7):1217-32.

168. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*. 2014;141(8):1614-26.

169. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*. 2007;21(21):2747-61.

170. Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, et al. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *Embo j*. 2000;19(24):6778-91.

171. Vassilev A, Kaneko KJ, Shu H, Zhao Y, DePamphilis ML. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev*. 2001;15(10):1229-41.

172. Moroishi T, Hansen CG, Guan KL. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(2):73-9.

173. Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev*. 2016;30(1):1-17.

174. Kay N, Huang C-Y, Shiu L-Y, Yu Y-C, Chang Y, Schatz F, et al. TGF- β 1 neutralization improves pregnancy outcomes by restoring endometrial receptivity in mice with adenomyosis. *Reproductive Sciences*. 2021;28:877-87.

175. Bernal A, Tusell L. Telomeres: implications for cancer development. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(1):294.

176. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(3):407-25, table of contents.

177. Kumar S, Mohan A, Sharma VK. Circadian dysfunction reduces lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Chronobiol Int*. 2005;22(4):641-53.

178. Kondratov RV. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Res Rev*. 2007;6(1):12-27.

179. Brown SA, Schmitt K, Eckert A. Aging and circadian disruption: causes and effects. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(8):813-7.

180. Zhang Q, Liu N, Bai J, Zhou Q, Mao J, Xu L, et al. Human telomerase reverse transcriptase is a novel target of Hippo-YAP pathway. *Faseb j.* 2020;34(3):4178-88.



7. EKLER

7.1.ETİK KURUL KARARI

 YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU	Doküman No : FR83
		Yayın Tarihi : 06.12.2022
		Revizyon No : 00
		Revizyon Tarihi : 00.00.0000
		Sayfa : 1 / 1

ETİK KURUL KARARI				
Protokol No	Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar No	Proje Yürütücüsü
2023-26	18.05.2023	2023/05	2023/05-05	Prof.Dr.Aylin Yaba Uçar
'Sirkadyen Ritmin Farede Uterus Üzerindeki Etkisinin Hippo Sinyal Yolağı Üzerinden Gösterilmesi' isimli proje oy birliğiyle etik açıdan uygun görülmüştür.				
Hayvan Türü / Irkı		Toplam Hayvan Sayısı		Hayvan Cinsiyeti

Görevi	Adı Soyadı	Onay/Ret Durumu	Katılım Durumu
Başkan	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	☐ Onay ☐ Ret	
Başkan Vekili	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	☐ Onay ☐ Ret	KATILMADI
Üye	Dr. Engin SÜMER	☒ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	☒ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. Rukset ATTAR	☒ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE	☐ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. Özlem MALKONDU	☒ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. Aylin YABA UÇAR	☐ Onay ☐ Ret	KATILMADI
Üye	Prof. Dr. Burcu GEMİCI BAŞOL	☐ Onay ☐ Ret	
Üye	Atakan Mücahit YAVUZ	☐ Onay ☐ Ret	
Üye	Ahmet ŞENKARDEŞLER	☐ Onay ☐ Ret	

Hazırlayan YÜDETAM SORUMLU YÖNETİCİ	Sistem Onayı YÜDETAM MÜDÜRÜ	Yürürlük Onayı YÜDETAM MÜDÜRÜ
--	--------------------------------	----------------------------------

7.2.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elaza	Soyadı	Aliyeva
-----	-------	--------	---------

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyoloji	Bakü Devlet Üniversitesi	2021

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
GraphPad Prism	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilimsel Çalışmaları

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifikaları/Ödülleri)

--