

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

**PARAKUAT İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN  
FARELERDE EMBRİYO İMPLANTASYONUNDA  
SİRTUİN 1'İN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Kübra AKSU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

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

**PARAKUAT İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN  
FARELERDE EMBRİYO İMPLANTASYONUNDA  
SİRTUİN 1'İN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Kübra AKSU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Nuray ACAR AYDEMİR**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-2427 proje numarası ile desteklenmiştir

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 24/06/2019

İmza

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



Üye : Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Dr. Öğretim Üyesi Dilek ULUSOY KARATOPUK  
Süleyman Demirel Üniversitesi



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

**Prof. Dr. Narin DERİN**

**Enstitü Müdürü**

## ETİK BEYAN

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

Öğrenci

Kübra AKSU

İmza



Tez Danışmanı

İmza



Doç.Dr. Nuray ACAR AYDEMİR

## TEŐEKKÜR

Sayın danışman hocam Doç. Dr. Nuray ACAR AYDEMİR'e tezimin gerçekteőirilebilmesi için her konuda göstermiş olduğu maddi, manevi ve bilimsel katkılarının yanı sıra adeta bir anne gibi sevgisini ve emeğini benden hiç esirgemediği için,

Katkıları ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Mutay AYDIN ASLAN'a,

Özellikle Prof. Dr İsmail Üstünel'e babacan tavırları ile birlikte maddi ve manevi bu yolculuğumda bana olan desteklerinden dolayı,

Yüksek lisans eğitim sürecimde, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tüm Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri başta olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Ekip arkadaşlarım Ezgi GOLAL ve Cemre Nur BALCI'ya,

Çalışma sürecimde bana her konuda yardımcı olan ve yol gösteren Hakan SOYLU'ya,

Her daim güler yüzlü ve yardıma hazır olan sorularıma yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına,

Eğitim hayatımın tüm aşamasında beni destekleyen, bana inanan ve güvenen, her daim yanımda olan çok kıymetli annem Ganimet AKSU'ya, abim Ömer Ahmet AKSU'ya ve özellikle rahmetli babam Mehmet Haőım AKSU'ya ve ailemin tüm fertlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** İmplantasyon embriyonun maternal uterusu yerleşme sürecidir. Zigotun blastosiste gelişmesi ve uterusun reseptif hale gelmesinin senkronize olması kritik öneme sahiptir. Sirtuinler, yüksek derecede korunmuş histon/protein deasetilazlardır. Sirtuin 1 oksidatif strese direnç, apoptoz, yaşlanma, inflamasyon gibi süreçlerde rol alır. Sirtuin 1 bu fonksiyonları FoxO gibi transkripsiyon faktörlerini deasetile ederek gerçekleştirir. Parakuat, oksidatif stres oluşturan bir ajandır. Çalışmamızda parakuat ve Sirtuin 1 aktivatörü SRT1720 uygulanan gebe farelerde Sirtuin 1, FoxO1 ve FoxO1'in ekspresyonunu düzenlediği antioksidan olan MnSOD miktarını belirlemeyi amaçladık.

**Yöntem:** Gebeliğin 5. günündeki Balb/C ırkı farelerle kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat grupları şöyle oluşturuldu: hiçbir enjeksiyonun yapılmadığı kontrol grubu, gebeliğin 1-4. günlerinde SRT1720 ve parakuatın çözücülerinin enjekte edildiği vehicle grubu, gebeliğin 4. günü 30 mg/kg parakuatın enjekte edildiği parakuat grubu, gebeliğin 1-4. günlerinde 50 mg/kg SRT1720'nin enjekte edildiği SRT1720 grubu, gebeliğin 1-4. günlerinde 50 mg/kg SRT1720 ile gebeliğin 4. gününde 30 mg/kg parakuatın enjekte edildiği SRT1720 + parakuat grubu. Tüm gruplardaki fareler gebeliğin 5. günü sabahı Chicago mavisini enjeksiyonundan sonra sakrifiye edilerek implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterus dokuları alındı. Bu dokularda immünohistokimya ve Western blot ile FoxO1, Sirtuin 1; Western blot ile asetile lizin; ELISA ile ROT/RNT ve MNSOD miktarları belirlendi.

**Bulgular:** Sirtuin 1 nükleer, FoxO1 hem nükleer hem sitoplazmik ekspresyon göstermiştir. Parakuat uygulanan farelerde implantasyon gerçekleşmemiştir. SRT1720 uygulanan gruplarda Sirtuin 1 ve FoxO1 ekspresyonları artmıştır. SRT1720 uygulanan gruplarda Sirtuin 1 aktivasyonuna bağlı FoxO1 deasetilasyonu sonucunda MnSOD miktarı artarak ROT/RNT miktarını azaltmıştır.

**Sonuç:** Parakuat ve SRT1720'nin birlikte uygulandığı farelerin bazılarında MnSOD artışının ROT/RNT'yi ortadan kaldırmasıyla embriyo implantasyonu gerçekleşmiştir. Ancak implantasyon gerçekleşen fare sayısının ve implantasyon bölge sayılarının kontrolden az olması SRT1720 konsantrasyonunun yetersiz olduğunu düşündürmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** İmplantasyon, Oksidatif stres, Sirtuin 1, FoxO1, MnSOD

## ABSTRACT

**Objective:** Implantation is process of embryo placement in maternal uterus. Synchronization of development of zygote to blastocyst and uterus becomes receptive are critical. Sirtuins are highly conserved histone/protein deacetylases. Sirtuin1 is involved in processes such as resistance to oxidative stress, apoptosis, aging and inflammation. Sirtuin1 performs these functions by deacetylating transcription factors such as FoxO. Paraquat is an oxidative stress generating agent. We aimed to determine amount of Sirtuin1, FoxO1 and antioxidant MnSOD regulated by FoxO1 in pregnant mice treated with paraquat and Sirtuin1 activator SRT1720.

**Method:** On 5<sup>th</sup> day of pregnancy, control, vehicle, paraquat, SRT1720 and SRT1720+paraquat groups formed by Balb/C mice were as follows: control group with no injection; vehicle group SRT1720 and paraquat solvents injected on days 1-4 of pregnancy; paraquat group injected with 30 mg/kg of paraquat 4<sup>th</sup> day of pregnancy, SRT1720 group injected with 50 mg/kg SRT1720 on days 1-4 of pregnancy; SRT1720+paraquat group injected with 50 mg/kg SRT1720 on days 1-4 of pregnancy and 30 mg/kg paraquat on 4<sup>th</sup> day of pregnancy. Mice in all groups were sacrificed after Chicago blue injection on day 5 morning of pregnancy, implantation and inter-implantation sites, uteri were taken. FoxO1 and Sirtuin1 were detected with immunohistochemistry and Western blot; acetylated lysine were detected with Western blot; ROS/RNS and MnSOD were detected with ELISA.

**Results:** Sirtuin1 showed nuclear, FoxO1 showed both nuclear and cytoplasmic expression. There was no implantation in paraquat group. Sirtuin1 and FoxO1 expressions were increased in SRT1720 treated groups. As a result of FoxO1 deacetylation due to Sirtuin1 activation in SRT1720 treated groups, increased MnSOD caused ROT/RNT decrease.

**Conclusion:** In some of mice treated with paraquat and SRT1720, embryos implanted with increase of MnSOD by eliminating ROT/RNT. However, number of implanted mice and number of implantation sites were significantly lower than control, suggesting that SRT1720 concentration was insufficient.

**Key words:** Implantation, Oxidative stress, Sirtuin 1, FoxO1, MnSOD

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>iii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Uterus Embriyolojisi	3
2.2. İnsanda Uterus Anatomisi ve Histolojisi	4
2.3. Endometriyumun Menstruasyon Siklusuna Bağlı Değişiklikleri	6
2.4. Dişi Farelerde Genital Sistem Anatomisi	7
2.5. Dişi Farelerde Üreme Fizyolojisi	12
2.6. Farelerde Uterus Histolojisi	15
2.7. Preimplantif Dönem Embriyo Gelişimi	15
2.8. Dişi Farelerde İmplantasyon Penceresi	17
2.9. Farelerde Reseptif Uterusta Vasküler Geçirgenlik Değişiklikleri	18
2.10. İmplantasyon	19
2.10.1. Farelerde Embriyo İmplantasyonu	19
2.10.2. Farelerde İmplantasyon Aşamaları	20
2.10.3. Memelilerde İmplantasyon Tipleri	21



2.11. Reaktif Oksijen Türleri	22
2.11.1. Oksidatif Stres	23
2.11.2. ROT Üretiminin Antioksidan Kontrolü	25
2.11.3. Enzimatik Antioksidan Sistem	25
2.11.4. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistem	26
2.11.5. ROT'nin Dişı Üreme Sistemindeki Fizyolojik Rolü	27
2.12. FoxO Ailesi	28
2.12.1. Fork Head Box O (FoxO) Alt Üyesi	29
2.12.2. FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Post-Translasyonel Modifikasyonlarla Düzenlenmesi	30
2.13. Histon Deasetilazlar	35
2.13.1. Sirtuinler	37
2.13.2. Sirtuin 1	39
2.13.3. Sirtuin 1 Aktivatörleri	40
2.13.4. Sirtuinlerin Dişı Üreme Sistemindeki Rollerini ile İlişkili Bazı Çalışmalar	41
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>43</b>
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması Sırasında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	43
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	44
3.3. Doku Takibi ve Parafine Gömme	47
3.4. İmmünohistokimya	47
3.5. Western Blot	50
3.5.1. Doku Homojenatlarının Elde Edilmesi	50
3.5.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Protokolü	52

3.6. Mangan Süperoksit Dismutaz (MnSOD) ve Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türlerinin (ROT/RNT) Tayini	56
3.6.1. Doku Homojenatlarının Elde Edilmesi	
3.6.2. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türlerinin Tayini	56
3.6.3. MnSOD Tayini	58
<b>4. BULGULAR</b>	<b>60</b>
4.1. İmplantasyon Bölge Sayılarının Karşılaştırılması	60
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	64
4.2.1. Sirtuin 1 İmmünohistokimyası	64
4.2.2. FoxO1 İmmünohistokimyası	73
4.3. Western Blot Bulguları	81
4.3.1. Sirtuin 1 Western Blotu	81
4.3.2. FoxO1 Western Blotu	84
4.3.3. Asetile Lizin Western Blotu	87
4.3.4. Deasetile FoxO1'in Belirlenmesi	89
4.4. ROT/RNT Bulguları	92
4.5. Mangan Süperoksit Dismutaz (MnSOD) Bulguları	94
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>97</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>108</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>110</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>136</b>

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 2. 1.** Sirtuinlerin hücrede yerleşimi, bulunduğu dokular ve enzimatik aktiviteleri 39

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Uterusun embriyolojik gelişiminin şematize gösterimi.	4
<b>Şekil 2.2.</b> Uterusa ait kısımları ve tabakalarını gösteren şekil.	4
<b>Şekil 2.3.</b> Gonadotropinler ve ovaryan hormonlar aracılığı ile ovaryum ve uterus senkronizasyonu.	7
<b>Şekil 2.4.</b> İnsan ve fare uterus karşılaştırması.	8
<b>Şekil 2.5.</b> Dişi farede genital sistem anatomisini gösteren çizim.	8
<b>Şekil 2.6.</b> Dişi farede ovaryum anatomisini gösteren çizim.	9
<b>Şekil 2.7.</b> Dişi farede ovidakt anatomisini gösteren çizim.	9
<b>Şekil 2.8.</b> Dişi farede uterus anatomisini gösteren çizim.	10
<b>Şekil 2.9.</b> Dişi farede serviks anatomisini gösteren çizim.	11
<b>Şekil 2.10.</b> Dişi farede vajina anatomisini gösteren çizim.	11
<b>Şekil 2.11.</b> Dişi farede östrus siklusunun hormonal dağılımı ve sitolojisi.	12
<b>Şekil 2.12.</b> Proöstrus fazında olan dişi fareye ait fizyolojik görüntüler.	13
<b>Şekil 2.13.</b> Östrus fazında olan dişi fareye ait fizyolojik görüntüler.	14
<b>Şekil 2.14.</b> Metöstrus fazında olan dişi fareye ait fizyolojik görüntüler.	14
<b>Şekil 2.15.</b> Diöstrus fazında olan dişi fareye ait fizyolojik görüntüler.	15
<b>Şekil 2.16.</b> İnsan ve farede preimplantif dönem embriyo gelişimini gösteren çizim.	16
<b>Şekil 2.17.</b> Farelerde gebelik günlerine göre uterus reseptivitesini gösteren çizim.	18

<b>Şekil 2.18.</b> Chicago mavisi enjeksiyonundan sonra uterusu mavı bantlar şeklinde görülen implantasyon bölgeleri.	18
<b>Şekil 2.19.</b> Embriyo implantasyonunun aşamalarını gösteren şema.	21
<b>Şekil 2.20.</b> Memelilerde implantasyon tiplerini gösteren şema.	22
<b>Şekil 2.21.</b> Reaktif oksijen türlerine ait örnekler.	23
<b>Şekil 2.22.</b> ROT oluşum basamaklarının şematize görüntüsü.	24
<b>Şekil 2.23.</b> Parakuatın kimyasal yapısını ve ROT oluşumunu gösteren çizim.	25
<b>Şekil 2.24.</b> Fox ailesinin genel yapısını 3 boyutlu olarak şematize eden çizim.	28
<b>Şekil 2.25.</b> FoxO aktivitesi, stabilitesi ve lokalizasyonunun şematize hali.	29
<b>Şekil 2.26.</b> FoxO'ların protein domeynlerini ve post translasyonel modifikasyon bölgelerini gösteren şema.	30
<b>Şekil 2.27.</b> FoxO transkripsiyon faktörlerini düzenleyen temel mekanizmalar.	31
<b>Şekil 2.28.</b> ROT kaynaklı oksidatif stres ile FoxO regülasyonu modeli.	31
<b>Şekil 2.29.</b> FoxO fosforillenmesini ve ubikütinasyonunu gösteren şema.	32
<b>Şekil 2.30.</b> FoxO ve Sirtuin arasındaki ilişkiyi gösteren şema.	34
<b>Şekil 2.31.</b> Embriyonik 9.5 günlük Foxo1 <sup>+/+</sup> , Foxo1 <sup>+/-</sup> ve Foxo1 <sup>-/-</sup> farelere ait yolk keselerinin görüntüsü.	34
<b>Şekil 2.32.</b> Histon asetiletransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC)'lar tarafından kromatin konformasyonu.	35
<b>Şekil 2.33.</b> İnsan HDAC'lerinin domain organizasyonunun şematize hali.	36
<b>Şekil 2.34.</b> Sirtuinlerin enzimatik aktivitesinin şematize hali.	38

<b>Şekil 2.35.</b> Sirtuin 1'i aktive eden bitki türevli polifenoller.	40
<b>Şekil 2.36.</b> Sirtuin 1'in aktivatörlerinden resveratrol ve SRT1720'nin yapıları.	41
<b>Şekil 3.1.</b> Sirtuin 1 aktivatörü SRT1720'nin hazırlanma aşamalarına ait fotoğraflar görülmektedir.	44
<b>Şekil 3.2.</b> Dişi fareye ait vajinal plak ok ile gösterilmektedir.	44
<b>Şekil 3.3.</b> BCA yöntemi için standartların hazırlanmasını gösteren çizim.	51
<b>Şekil 3.4.</b> ROT/RNT kitinin çalışma mekanizması gösterilmektedir.	57
<b>Şekil 3.5.</b> Süperoksit dismutaz analiz kitinin çalışma prensibi gösterilmektedir.	58
<b>Şekil 4.1.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon bölge sayılarını gösteren grafik.	60
<b>Şekil 4.2.</b> Kontrol grubunda gebeliğin 5. günündeki implantasyon bölgeleri kırmızı oklar ile gösterilmektedir.	61
<b>Şekil 4.3.</b> Vehicle grubunda gebeliğin 5. günündeki implantasyon bölgeleri kırmızı oklar ile gösterilmektedir.	61
<b>Şekil 4.4.</b> Parakuat grubunda gebeliğin 5. gününde implantasyonun gerçekleşmediği uterus görülmektedir.	62
<b>Şekil 4.5.</b> Parakuat grubunda gebeliğin 5. gününde bir uterus boynuzunun yıkanması ile elde edilen blastosistler görülmektedir.	62
<b>Şekil 4.6.</b> SRT1720 grubunda gebeliğin 5. günündeki implantasyon bölgeleri kırmızı oklar ile gösterilmektedir.	62
<b>Şekil 4.7.</b> SRT1720 + parakuat grubunda gebeliğin 5. gününde implantasyon bölgeleri kırmızı oklar ile gösterilmektedir.	63

- Şekil 4.8.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların lümen epitellerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu. 65
- Şekil 4.9.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait lümen epitellerinde Sirtuin 1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi. 65
- Şekil 4.10.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların bez epitellerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu. 68
- Şekil 4.11.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait bez epitellerinde Sirtuin 1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi. 68
- Şekil 4.12.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların stromalarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu. 71
- Şekil 4.13.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait stromalarda Sirtuin 1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi. 71
- Şekil 4.14.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların lümen epitellerindeki FoxO1 ekspresyonu. 74
- Şekil 4.15.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait lümen epitellerinde FoxO1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi. 74
- Şekil 4.16.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların bez epitellerindeki FoxO1 ekspresyonu. 77
- Şekil 4.17.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait bez epitellerinde yapılan FoxO1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi. 77

<b>Şekil 4.18.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların stromalarındaki FoxO1 ekspresyonu.	79
<b>Şekil 4.19.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait stromalarda yapılan FoxO1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi.	80
<b>Şekil 4.20.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan Sirtuin 1 ve Aktin Western blot sonuçları.	81
<b>Şekil 4.21.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan Sirtuin 1 ve Aktin Western blot analizi sonuçları.	82
<b>Şekil 4.22.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan FoxO1 ve Aktin Western blot sonuçları.	84
<b>Şekil 4.23.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan FoxO1 ve Aktin Western blot analizi sonuçları.	85
<b>Şekil 4.24.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan Asetile lizin ve Aktin Western blot sonuçları.	87
<b>Şekil 4.25.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan Asetile lizin ve Aktin Western blot analizi sonuçları.	88
<b>Şekil 4.26.</b> Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda deasetile FoxO1 miktarlarını gösteren grafik.	90



**Şekil 4.27.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan ROT/RNT ELISA sonuçlarını gösteren grafik. 92

**Şekil 4.28.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan MnSOD ELISA sonuçlarını gösteren grafik. 94

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>AKT</b>	: Protein Kinaz B
<b>AMPK</b>	: AMP Aktive Edici Kinaz
<b>BCA</b>	: Bikinkoninik Asit
<b>BSA</b>	: Sığır Serum Albümin
<b>C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N</b>	: Bpiridil
<b>[C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>]<sup>2+</sup></b>	: Parakuat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinyum diklorid)
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CDK1</b>	: Kazein Kinaz-1
<b>CBP</b>	: CREB (cAMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein ) Bağlayıcı Protein
<b>CDK2</b>	: Siklin Bağımlı Kinaz 2
<b>DAB</b>	: Diamino Benzidin
<b>DYRK1a</b>	: İkili Spesifik Tirozin Fosforilasyonu ve Düzenleyici Kinaz
<b>DTPA</b>	: Dietilentriaminopenta Asetik Asit
<b>E<sub>2</sub></b>	: Östrojen
<b>EGA</b>	: Embriyonik Genom Aktivasyonu
<b>ELISA</b>	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Yöntemi
<b>ERK</b>	: Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
<b>ESH</b>	: Endometriyum Stroma Hücreleri
<b>FoxO</b>	: Forkhead Transkripsiyon Faktörleri
<b>G6PC</b>	: Glukoz-6-Fosfataz Katalitik Altüitesi
<b>GADD45</b>	: Büyüme Duraklatıcı ve DNA Hasarı Uyarıcı protein 45
<b>GSH</b>	: Glutatyon
<b>GPX</b>	: Glutatyon Peroksidaz
<b>GRX</b>	: Glutatyon Redüktaz

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>HAT</b>	: Histon Asetiltransferaz
<b>HDAC</b>	: Histon Deasetilaz
<b>HSPG</b>	: Heparan Sülfat Proteoglikan
<b>Ig</b>	: İmmüoglobulin
<b>DAB</b>	: 3,3'-Di Amino Benzidin
<b>IgG</b>	: İmmüoglobulin G
<b>IκB</b>	: Kabba B İnhibitörü
<b>IKK</b>	: IκB kinaz
<b>IUGR</b>	: İnter Uterin Gelişme Geriliği
<b>İnsülin/IGF</b>	: İnsülin /İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
<b>IVF</b>	: <i>In Vitro</i> Fertilizasyon
<b>IRS</b>	: İnsülin Reseptör Substratı
<b>JNK</b>	: c-Jun N-Terminal Kinaz
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>MST1</b>	: Memeli Steril 20 Benzeri Kinaz 1
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MnSOD</b>	: Mangan Süperoksit Dismutaz
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorür
<b>NAD</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>NAM</b>	: Nikotinamid
<b>NADH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Hidrit
<b>NES</b>	: Nükleer Eksport Sekansı
<b>NF-κB</b>	: Nükleer Faktör-κB

<b>NLS</b>	: Nükleer Lokalizasyon Sekansı
<b>Nrf2</b>	: Nükleer Faktör Eritroid 2 İlişkili Faktör 2
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit
<b>OH<sup>-</sup></b>	: Hidroksil
<b>OS</b>	: Oksidatif Stres
<b>P<sub>4</sub></b>	: Progesteron
<b>PE</b>	: Preeklampsi
<b>PEG400</b>	: Polietilen Glikol 400
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu
<b>Pİ3K</b>	: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz
<b>PİK</b>	: Proteaz İnhibitör Kokteyli
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	: Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör $\gamma$ Koaktivator 1 $\alpha$
<b>PTEN</b>	: Fosfataz ve Tensin Homolog
<b>PTM</b>	: Post-Translasyonel Modifikasyon
<b>PVDF</b>	: Poliviniliden Florür
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>RNT</b>	: Reaktif Nitrojen Türleri
<b>SIR2</b>	: Sessiz Bilgi Regülatörü
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>SGK</b>	: Serum ve Glukokortikoid Uyarıcı Kinaz
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>TAD</b>	: Transaktivasyon Domeyni
<b>TBS</b>	: Tris Tamponlu Tuz Solüsyonu

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Kısaca implantasyon, embriyonun uterusu yerleşme sürecidir. Memelilerde, embriyonun blastosist aşamasına ve uterusun reseptif evreye senkronize ulaşması kritik öneme sahiptir (Y. Li ve ark., 2015). İmplantasyon, embriyo ve uterus etkileşimlerini içeren, hala tam olarak anlaşılmayan karmaşık bir olgudur (Kolibianakis ve Venetis, 2019). İnsanlarda embriyo ile uterus etkileşimlerini moleküler düzeyde incelemede yaşanan zorluklar ve etik kısıtlamalar embriyo-uterus etkileşimlerinin direk analizini önlemektedir. Bu nedenle bu alandaki bilgilerin çoğu kemirgenlerde özellikle de fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmektedir.

Organizmada serbest radikallerin oluşması ile bunların ortadan kaldırılmasının denge içerisinde olduğu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Bu dengenin bozulması oksidatif stres (OS) olarak adlandırılan durumun ortaya çıkmasına neden olur. Oksidatif stres doku hasarına yol açmaktadır (Kohen ve Nyska, 2002). Ayrıca OS'nin fertilitite üzerinde etkili olduğu ve infertilitenin etiopatogenezinde rol oynadığı bilinmektedir (A. Agarwal ve ark., 2005). Parakuat hücreye girdiğinde elektron redüksiyonu/oksidasyonuna uğrayarak süperoksit anyonları, hidroksil ve peroksil radikalleri gibi ROT'lerin oluşumuna neden olur (Gawarammana ve Buckley, 2011; Blanco-Ayala ve ark., 2014). Bu nedenle birçok organizmada oksidatif stres yaratmak amacıyla kullanılmaktadır.

Sirtuinler, bakterilerden memelilere kadar neredeyse tüm türlerde bulunan yüksek derecede korunmuş protein ailesidir. Sirtuinler, nikotinamid adenin dinükleotit NAD<sup>+</sup> bağımlı histon/protein deasetilazlardır. Sirtuin 1'in strese direnç, apoptoz, senesens, yaşlanma ve inflamasyon süreçlerinde farklı roller oynadıkları bilinmektedir (Chung ve ark., 2010; Rahman ve ark., 2012; Yao ve ark., 2012; Yao ve Rahman, 2012). Sirtuin 1 strese yanıt veren faktörleri deasetile ederek memelilerde oksidatif stresi regüle eder (Y. Li ve ark., 2008; Yao ve ark., 2013). Sirtuin 1, FoxO, p53, p21, p16 ile DNA hasarı ve tamirinde rol alan molekülleri düzenleyerek OS durumunda koruma sağlar (Furukawa ve ark., 2007; Yao ve Rahman, 2012; Xia ve ark., 2015).

Sirtuin 1'in hedef genlerinden biri olan FoxO'lar, yüksek oranda korunmuş ve çeşitli biyolojik fonksiyonları kontrol eden bir gen ailesi üyesidir. FoxO transkripsiyon faktörleri apoptoz, hücre siklusu, DNA hasar tamiri, oksidatif stres, hücre farklılaşması, glukoz metabolizması ve diğer hücresel fonksiyonlarda rol alan genlerin ekspresyonunu düzenlerler (Detlef Weigel, Jürgens, ve ark., 1989; Lehmann ve ark., 2003; Obsil ve Obsilova, 2008; Lam ve ark., 2013). FoxO'ların post translasyonel modifikasyonlarla düzenlenmesi antioksidan aktivitesini etkileyerek ROT/RNT (reaktif oksijen türleri/reaktif nitrojen türleri) seviyesini değiştirmektedir. Sitoplazmada inaktif halde bulunan FoxO'lar oksidatif strese yanıt olarak aktifleşince nükleusa transloke olur ve antioksidan enzim miktarının artırılmasını sağlarlar (Glauser ve Schlegel, 2007; Eijkelenboom ve Burgering, 2013; Zhao ve ark., 2017).

Literatürde sirtuinlerin embriyo implantasyonundaki muhtemel rollerini araştıran *in vivo* bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile oksidatif strese karşı Sirtuin 1'in embriyo implantasyonundaki rolünün klinikte karşılaşılan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıplarının mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada, parakuat uygulamasıyla oksidatif stres oluşumuna yol açılmış ve embriyo implantasyonu engellenmiştir. SRT1720 uygulamasıyla Sirtuin 1 aktive edilmiş ve hedef geni olan FoxO1'in asetilasyonu/deasetilasyonu araştırılmıştır. Oluşan ROT/RNT ile FoxO1'in hedef geni olan MnSOD (mangan süperoksit dismutaz) miktarları araştırılmıştır. Parakuat ve SRT1720 birlikte uygulanarak oksidatif stres varlığında SRT1720 ile aktive olan Sirtuin 1'in embriyo implantasyonundaki rolü moleküler düzeyde aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, parakuat ile oksidatif stres oluşturulan gebe farelerde Sirtuin 1 aktivatörü olan SRT1720 uygulamasının embriyo implantasyonu üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır.

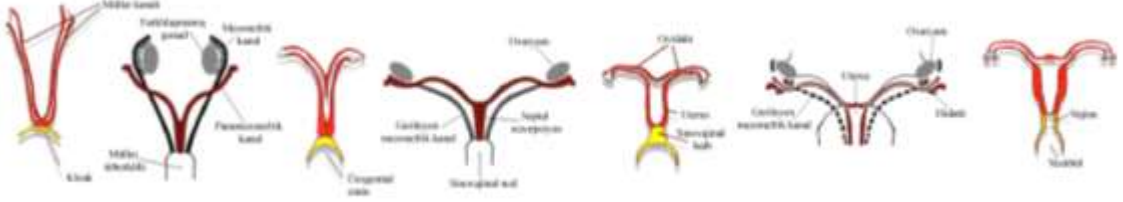
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Uterus Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti fertilizasyon esnasında belirlenmekle birlikte genital sistem gelişiminin erken aşamaları her iki cins için de ortaktır. Bu nedenle genital sistem gelişiminin başlangıç aşaması seksüel gelişimin farklanmamış aşaması olarak değerlendirilir. Mezoderm kökenli genital sistem bu esnada dişi ve erkek embriyolarda iki çift genital kanala sahiptir: mezonefrik ve paramezonefrik. Dişi embriyolarda testosteron hormonunun yokluğu mezonefrik kanalların gerilemesini ve paramezonefrik kanalların gelişmesini sağlar. Dişi genital sistemini oluşturan yapıların büyük bir kısmı paramezonefrik kanallar tarafından oluşturulur. Tuba uterinalar, paramezonefrik kanalların birleşmemiş kranial bölümlerinden gelişir. Paramezonefrik kanalların kaudal birleşmiş kısımlarından ise uterovajinal primordium farklanır. Bu yapı, uterus ve vajinayı oluşturur. Endometriyal stroma ve miyometriyum ise komşu splanik mezenşimden gelişir (Langman, 1993).

Paramezonefrik kanallar ile mezonefrik kanallar birbirine paralel olarak gelişim gösterir. Bununla birlikte paramezonefrik kanallar ürogenital sinusun dorsal duvarına yaklaşırken birleşir ve kaynaşırlar (Witschi, 1959). Kaynaşmanın füzyon derecesine veya füzyonun olmamasına bağlı olarak unikornat uterus (insan) veya bikornat uterus (sıçan, fare) gelişmektedir (Glasser ve ark., 2004). Memelilerde cinsiyet farklılaşması uterovajinal kanal tamamlanmadan önce gerçekleşir. Erkeklerde uterovajinal rudiment geriler. Dişilerde mezonefrik kanallar yaklaşık üçüncü ayda neredeyse ortadan kaybolur. Uterovajinal rudiment yavaş yavaş ürogenital sinüsün dorsal duvarı boyunca aşağı doğru kayar (**Şekil 2.1**) (Witschi, 1959). Oluşan uterovajinal taslaktan uterusun fundus, korpus, istmus ile endometriyum epiteli ve bezleri gelişir. Uterusun ana yapısı 1. trimesterin sonunda oluşur, gebeliğin ortalarında bezlerin ve kas tabakasının gelişimi başlar ve diğer yapıların gelişmesi de 3. trimesterde gerçekleşir (Langman, 1993; Moore ve ark., 2011). Uterus uzunluğu boyunca yanlarda, kalın ligamentler arasında, mezenşim çoğalır, farklılaşarak gevşek bağ dokusu ve düz kastan oluşan perimetriyumu yapar (Langman, 1993; Moore ve ark., 2011).

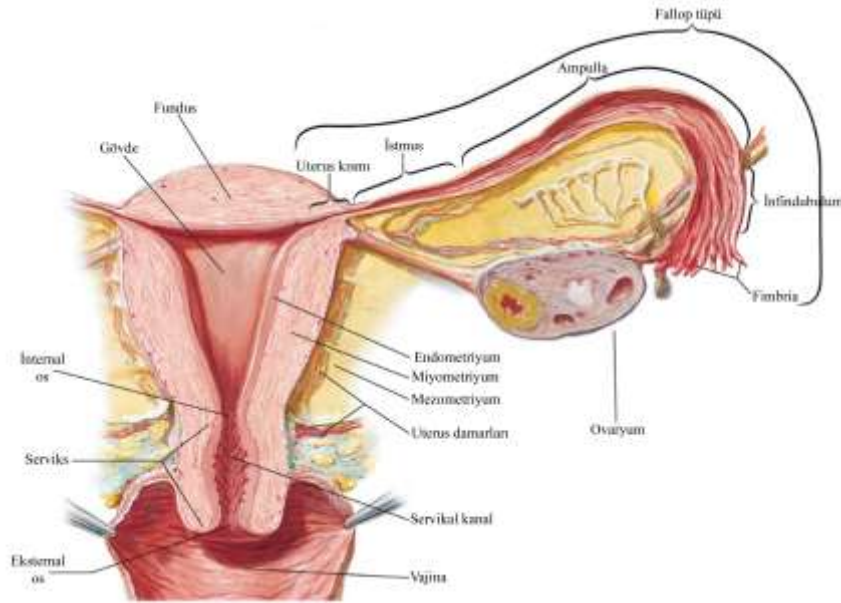
Birleşen paramezonefrik kanallar laterallerinden pelvis duvarına kadar uzanan bir katlantı yapar ve ligamentum latum uteri olarak adlandırılan bu katlantı ile sublumbal bölgeye asılı kalır.



Şekil 2.1. Uterusun embriyolojik gelişiminin şematize gösterimi (Endo).

## 2.2. İnsanda Uterus Anatomisi ve Histolojisi

İnsan uterusu, pelviste mesane ile rektum arasında bulunan armut şeklinde bir organdır. Üst tarafta 5 cm genişliğinde, 7,5 cm uzunluğunda ve 2,5 cm kalınlığındadır. Lümeni yassıdır ve anatomik olarak gövde ve serviks olmak üzere 2 bölgeye ayrılır. Gövde uterusun büyük üst kısmıdır ve gövdenin tuba uterina bağlantısı üstünde genişleyen parçası fundus olarak adlandırılır. Serviks, uterusun alt kısmıdır ve iki ucu dar açıklıklara sahip servikal kanala sahiptir. Servikal kanalının uterus boşluğuna açılan kısmı internal os, vajinaya açılan kısmı ise eksternal os olarak adlandırılır (Şekil 2) (Ross ve Pawlina, 2006).



Şekil 2.2. Uterusa ait kısımları ve tabakalarını gösteren şekil (Gray, 1878).



Uterus, histolojik olarak dıştan lümenine doğru perimetriyum, miyometriyum ve endometriyum olmak üzere 3 tabakadan oluşur (Şekil 2.2).

### **Perimetriyum**

Perimetriyum, uterusu kaplayan visseral periton tabakasıdır. Mezotelyum ve ince bir gevşek bağ dokudan oluşmaktadır. Mezotelyumun altında elastik doku tabakası belirgindir. Perimetriyum posteriyor kısmın tamamını kaplarken anteriyor yüzeyin bir kısmını kaplar. Anteriyor kısmın kalan bölgeleri ise adventisya ile kaplıdır (Ross ve Pawlina, 2006)

### **Miyometriyum**

Miyometriyum uterusun en kalın tabakasıdır. Birbirinden ayırt edilemeyen üç düz kas tabakasından oluşur. İç ve dış tabakalarındaki düz kas demetleri uterusun uzun eksenine paralel düzenlenir. Orta kas tabakası (stratum vaskülaré) çok sayıda büyük kan damarları ve lenfatikler içerir. Gebelik boyunca, büyük ölçüde mevcut düz kas hücrelerinin hipertrofisi ile mevcut kas hücrelerinin bölünerek yeni lif oluşturması sonucunda uterus büyük ölçüde genişler. Gebelik ilerledikçe de uterus duvarı fetüsün büyümesi nedeniyle gerileyerek gittikçe inceler. Doğumdan sonra ise uterus yaklaşık olarak eski boyutuna geri döner. Kas fibrillerinin birçoğu eski boyutlarına geri dönmesine rağmen bazı kas fibrilleri dejenere olur. Gebelik sırasında miyometriyumu sağlamlaştırmak için üretilen kollajen daha sonra kollajeni sentezleyen hücreler tarafından enzimatik yıkıma uğrattılır. Gebelik öncesine göre uterus boşluğu büyük kalır ve müsküler tabaka kalın kalır (Ross ve Pawlina, 2006).

### **Endometriyum**

Endometriyumun bağ dokusu fibroblastlardan zengindir ve bol miktarda temel madde içerir. Bağ dokusu lifleri çoğunlukla tip III kollajenden meydana gelmiştir. Endometriyum salgı hücrelerini ve silli hücreleri içeren tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Yüzey epiteli uterus bezlerini oluşturmak için endometriyal stromanın içine doğru yayılır. Böylece basit tübüler bezler az sayıda silli hücre içerir ve endometriyumun derinlerine doğru dallanırlar.

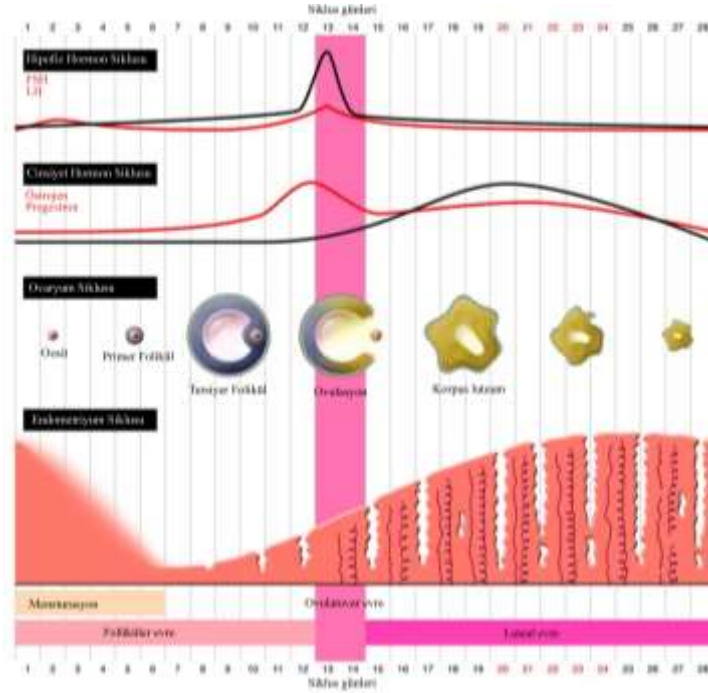
Endometriyum yapısal ve fonksiyonel olarak iki tabakadan oluşur. Miyometriyuma komşu olan bazal tabaka lamina propria ve uterus bezlerinin başlangıç kısmını içerir.

Bununla birlikte menstruasyon boyunca korunur ve fonksiyonalsin rejenerasyonu için kaynaklık eder. Stratum fonksiyonals lamina propriya ve bezlerin geri kalanını ve yüzey epitelini içerir. Ayrıca endometriyumun kalın parçasıdır ve menstrasyon sırasında dökülür. Miyometriyum ile anastomoz yapan radyal arterler endometriyumu besler ve ana kolu endometriyumda lümene yaklaştıkça sarmal haline gelerek spiral arter olarak adlandırılır (Ross ve Pawlina, 2006).

### **2.3. Endometriyumun Menstruasyon Siklusuna Bağlı Değişiklikleri**

Kadınlarda puberteden menopoza kadar cinsiyet hormonlarının etkisiyle her ay kendini embriyo implantasyonuna ve sonrasında gelen embriyonik ve fetal gelişim olaylarına hazırlayan siklik değişiklikler gerçekleşir. Siklus sırasında endometriyumun salgı aktivitesindeki değişiklikler ovaryum foliküllerinin olgunlaşmasıyla korelasyon gösterir. Menstruasyon döngüsü ovaryumun morfolojik değişimi ile foliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre olmak üzere üçe ayrılır (**Şekil 2.3**) (Watanabe ve ark., 1991). Bir siklus yaklaşık 28 gün sürer. Hipofizin ön lobundan salgılanan gonadotropik hormonlar ovaryumda yeni foliküllerin gelişmesini sağlar. Östrojen etkisiyle olgunlaşan foliküllerden biri siklusun 14. gününde ovule olur. Ovulasyondan sonra folikülün salgı hücreleri korpus luteuma dönüşerek progesteron ve östrojen salgırlar. Başarılı bir gebelik gerçekleşmezse yaklaşık 2 hafta sonra korpus luteum geriler ve menstruasyon başlar (Hall, 2015).

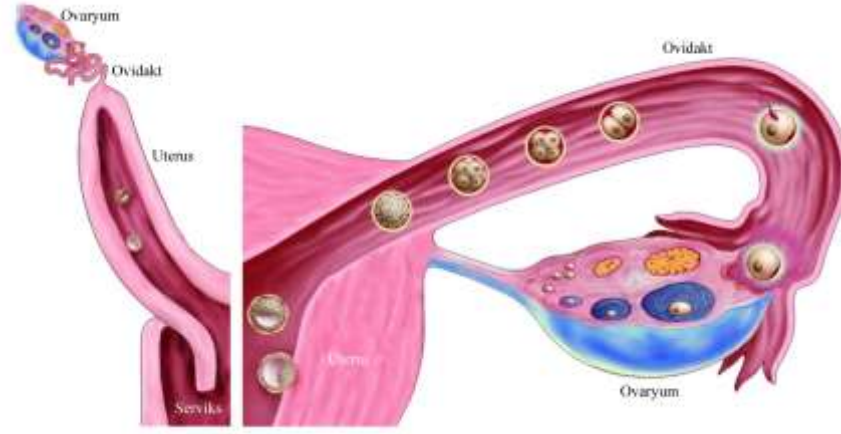
İnsan endometriyal hücrelerinin döngüsel değişimi, hipotalamus, hipofiz bezi ve ovaryum arasındaki etkileşimle kontrol edilir, böylece endometriyum çoğalır, farklılaşır, dökülür ve daha sonra tekrar çoğalır. Endometriyal döngü proliferatif evre, sekretuvar evre ve menstrual evre olmak üzere üçe ayrılır (**Şekil 2.3**) (Watanabe ve ark., 1991).



**Şekil 2.3.** Gonadotropinler ve ovaryan hormonlar aracılığı ile ovaryum ve uterus senkronizasyonu (Lim ve Wang, 2010).

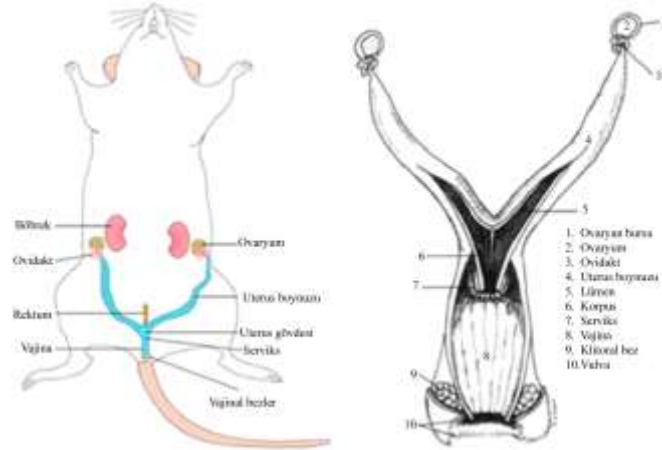
#### 2.4. Dişi Farelerde Genital Sistem Anatomisi

Fareler, araştırmalarda en sık kullanılan türlerden birisidir. Bu nedenle insan ve farelerde benzerliklerin ve farklılıkların karşılaştırılması önemlidir. İnsanlarda dişi üreme kanalı 9. ve 12. haftalarda gelişirken farede uterus oluşumu embriyonik 17. günde görülür. Paramezonefrik kanal oluşum süreci türler arasında korunmuş olsa da uterus morfolojisi paramezonefrik kanalın anterior ucunun füzyonuna bağlı olarak türler arasında farklılık gösterebilmektedir. İnsanlar unikornat uterusu sahipken fareler bikornat uterusu sahiptir. İnsanlarda implantasyon 5-9. günler arasında gerçekleşirken farelerde 5. günde gerçekleşir. İmplantasyon esnasında blastosist insanda iç hücre kitlesinin olduğu bölgeden tutunurken farelerde tam tersidir. Desidualizasyon, insanda blastosist varlığından bağımsız olarak (predesidualizasyon) gerçekleşirken farelerde blastosistin tetiklemesi ile gerçekleşir. Her iki türde de plasenta diskoid yapıda ve hemokoryal tiptedir. Gestasyon süresi insanda 37-42 hafta sürerken farede yaklaşık 19-21 gündür (Şekil 2.4) (Lim ve Wang, 2010; Treuting ve ark., 2011).



Şekil 2.4. İnsan ve fare uterus karşılaştırması (Lim ve Wang, 2010).

Farelerde dişi üreme sistemi gamet üretiminin gerçekleştiği iki gonad (ovaryum) ve gamet taşınması için gerekli olan ovidakt, uterus, serviks ve vajina yapılarına sahiptir (Şekil 2.5).

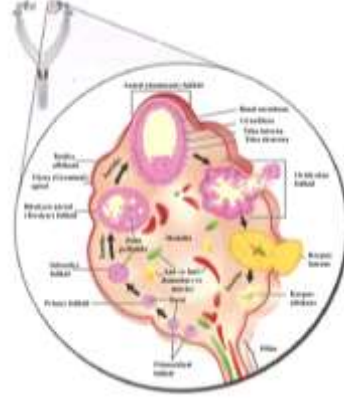


Şekil 2.5. Dişi farede genital sistem anatomisini gösteren çizim (Glasser ve ark., 2004).

## Ovaryum

Ovaryumlar, dorsal vücut duvarından mezovaryum ligamentleri tarafından böbrekler yakınında bulunan küçük oval organlardır (Şekil 2.6). Her bir ovaryum bursa ya da kapsül ile karın boşluğundan kuşatılır. Ovaryan kan akımı, aorttan dallanan ovaryan arterlerden kaynaklanır.

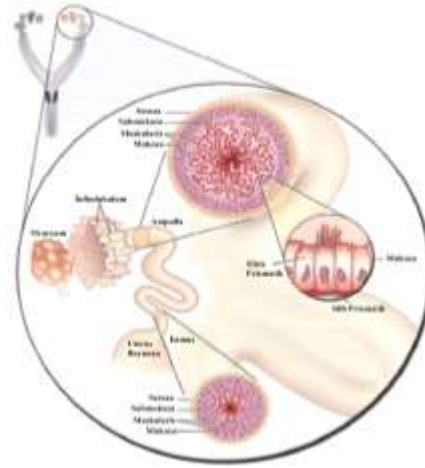
Ovaryum, medulla ve korteks olmak üzere iki kısımdan oluşur. Kan ve lenf damarları ile sinirlerin ovaryuma giriş ve çıkışları hilus bölgesinden gerçekleşir. Ovaryum, germinal epitel olarak bilinen tek katlı kübik epitel tabakası ile kaplıdır (Fox ve ark., 2006).



**Şekil 2. 6.** Dişi farede ovaryum anatomisini gösteren çizim ("Female reproductive anatomy," 2010).

### **Ovidakt**

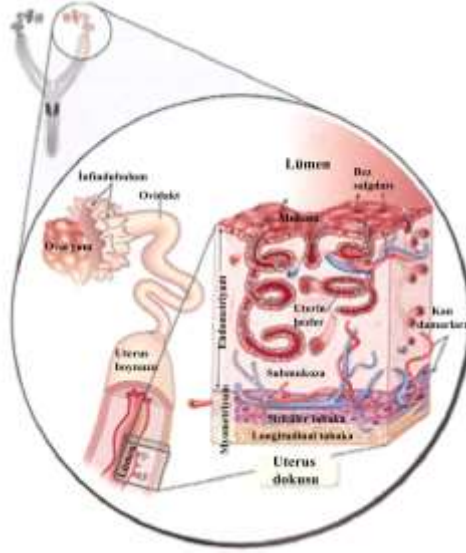
Ovidakt, ovaryum ile uterusun bursası arasındaki periovaryan boşluğu mezotubaryum ligament ile bağlayan ve 1,8 cm uzunluğunda olan dar kıvrımlı bir tüptür. Ovidakt, silli mukoza ve sirküler olarak düzenlenmiş kas tabakası ile çevrelenmiştir. İsthmus, ampulla, infundibulum ile fimbriya kısımlarından oluşur. İsthmus ovidaktın dar kısmını oluşturur ve ampullaya kadar uzanır. Ampulla, infundibulum ile isthmusu birbirine bağlayan kısımdır. İnfundibulumdan itibaren ovidakt fimbriya adı verilen saçak benzeri yapılarla periovaryan boşluğa açılır (Şekil 2.7) (Fox ve ark., 2006; Mara H. Rendi, 2012).



**Şekil 2. 7.** Dişi farede ovidakt anatomisini gösteren çizim ("Female reproductive anatomy," 2010).

## Uterus

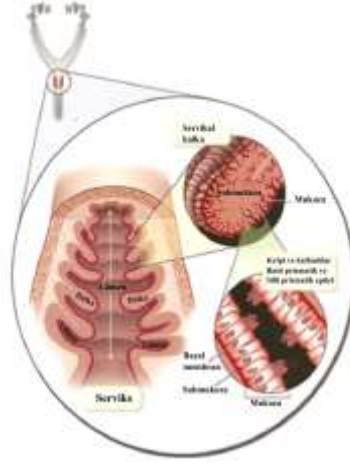
Fare uterusu iki lateral boynuzdan oluşan bikornat yapıdadır ve korpus adı verilen gövdeye bağlanarak 'Y' şeklinde bir görünüm oluşturur. Uterus korpusu mezometriyal ligamentlerle dorsal vücut duvarından asılan mesane yakınına yerleşmiştir. Uterusa ait miyometriyum en dışta longitudinal içte sirküler düzenlenmiş kas tabakasına sahiptir. Endometriyum tabakası ise lamina propriya, uterus bezleri, birçok kan damarı ve epitel tabakasından oluşur. Uterus boynuzları, dorsal vücut duvarından kan, lenf damarları ve sinirlerin bulunduğu geniş ligamentler ya da mezometriyum ile ayrılır. Kan akımı, ovaryan arterin uterus dalı ve internal iliak arterden kaynaklanan uterin arter tarafından sağlanır. Ovidakt gibi uterus da ovaryumdan salgılanan hormonlara cevap vererek östrus siklusunda değişiklik gösterir (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8. Dişi farede uterus anatomisini gösteren çizim ("Female reproductive anatomy," 2010).

## Serviks

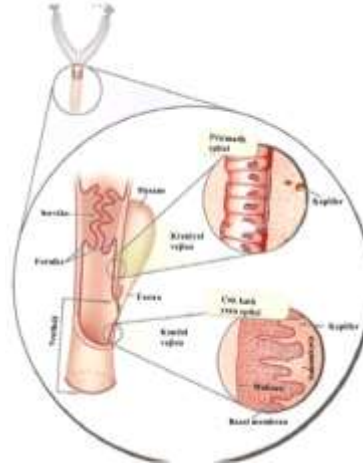
Serviks uterusun korpusu ile devam eder. Serviks büyük oranda bağ dokudan oluşur ve doğum zamanında yeniden yapılanarak yavruların geçmesine izin verecek kadar genişler (Şekil 2.9).



**Şekil 2. 9.** Dişi farede serviks anatomisini gösteren çizim ("Female reproductive anatomy," 2010).

### **Vajina ve Klitoris**

Farelerde vajina kısa, kaslı bir organdır ve servikten vajinal açıklığa kadar uzanır. Vajina dorsalde rektum, ventralde ise üretraya gevşek şekilde bağlanmıştır. Vajina çok katlı yassı epitel hücreleri ile çevrilidir ve östrojen tarafından uyarılmaya bağlı olarak östrus döngüsü esnasında belirgin değişiklikler geçirir. Böylece östrus döngüsünün evresi belirlenebilir (**Şekil 2.10**).



**Şekil 2. 10.** Dişi farede vajina anatomisini gösteren çizim ("Female reproductive anatomy," 2010).

Vajinal açıklığın anterior duvarında, ventrale uzanan küçük yükselti klitoristir. Vajinal açıklığın anterior ve lateral yüzeyleri, deri ve kıl ile kaplıdır. Klitoris ucunda bulunan fazla derin olmayan çöküntü şeklindeki klitoral fossa üretraya açılır. Küçük armut şekilli klitoral bezler, anterolateral olarak subkutan bağ doku içerisine gömülmüştür, her birinden çıkan kanallar klitoral fossanın lateral duvarındaki açıklığa uzanır.

## 2.5. Dişi Farelerde Üreme Fizyolojisi

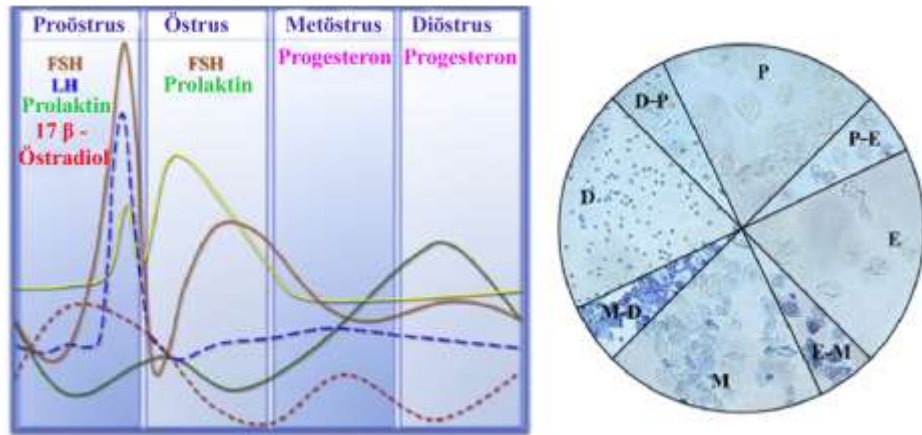
Boyutlarının küçük olması ve kolay çalışılabilmesi, doğurganlığının yüksek olması gibi nedenlerden dolayı üreme araştırmalarında fareler model olarak kullanılmaktadır. Fare östrus siklusu, maksimum doğurganlığı sağlamak için koordine edilen anatomi, endokrinoloji, fizyoloji ve davranış değişikliklerinde kendini gösteren yinelemeli bir olaydır(Croy ve ark., 2013) (Croy ve ark., 2013).

Dişi farelerde, östrus siklusu, hormonların etkisiyle genital organlarda morfolojik ve fizyolojik değişiklikler ile karakterize edilebilen yaklaşık 4 günlük bir süreçtir. Siklusun uzunluğu, soylar içinde ve arasında oldukça değişkendir ve genetik, stres, diyet, feromon gibi çeşitli faktörlerden kolaylıkla etkilenir (Fox ve ark., 2006; Pritchett ve Taft, 2007).

Hipotalamus-hipofiz-gonadal aksın senkronizasyonu, siklusun ritmi ve üremede başarı için çok önemlidir. Östrus siklusu süreklilik gösteren 4 fazdan oluşur: proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus (Şekil 2.11).

Spesifik hormonlar, siklusun her fazı sırasında meydana gelen değişiklikleri yönlendirir ve farenin anatomisinde değişiklikler, vajinal görünümün ve dökülen hücrelerin incelenmesi ile bireysel fazın belirlenmesini mümkün kılar (Pritchett ve Taft, 2007).

Vajinal yaymalarda bulunan hücreler temel olarak lökositler, kornifiye epitel hücreleri ve çekirdekli epitel hücrelerdir. Vajina epitelindeki değişiklikler, epitel tabaka sayısı, kornifikasyon miktarı, yüzey mukusunun varlığı ve polimorfonükleer lökositlerin varlığı veya yokluğu fazların tespit edilebilmesini sağlar (Allen, 1922).

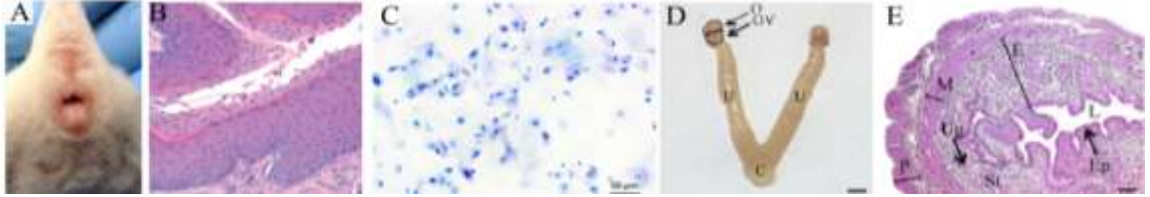


Şekil 2. 11. Dişi farede östrus siklusunun hormonal dağılımı ve sitolojisi (Croy ve ark., 2013).



### Proöstrus Fazı

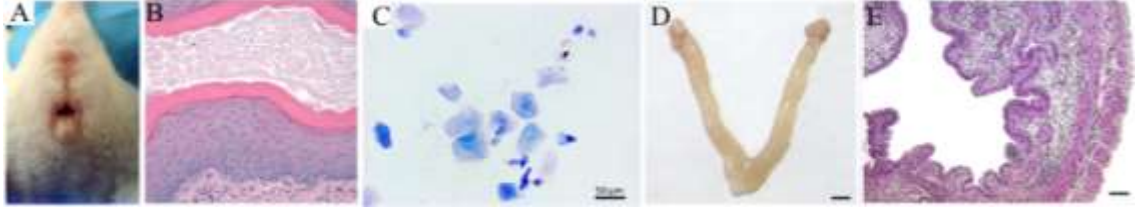
Proöstrus fazında artan östrojen konsantrasyonu, uterus ve vajinadaki hücre bölünmesi ile ovidakt ve uterusu sıvı birikimini uyarır. Dişi farede vajina açıklığı şişmiş ve nemlidir. Vajina mukozası östrus fazına oranla daha koyu renklidir (**Şekil 2.12A**). Vajina mukozası 10–13 hücre kalınlığındadır (**Şekil 2.12B**). Proöstrus sitolojisi, çekirdekli epitel hücrelerinin baskınlığı ile karakterizedir. Birkaç kornifiye epitel hücre bulunabilir (**Şekil 2.12C**). Östrojen seviyeleri proöstrus sırasında artarak ovulasyonu başlatacak bir LH pikini tetikler (**Şekil 2.11**) (Murr ve ark., 1973). Proöstrus ve östrus sırasında uterus kalın ve ödemlidir (**Şekil 2.12D**). Artan östrojen stromal proliferasyonu da artırır (**Şekil 2.12E**) (Fox ve ark., 2006; Treuting ve ark., 2011; Croy ve ark., 2013).



**Şekil 2. 12.** Proöstrus fazında olan dişi fareye ait fizyolojik görüntüler (Croy ve ark., 2013).

### Östrus Fazı

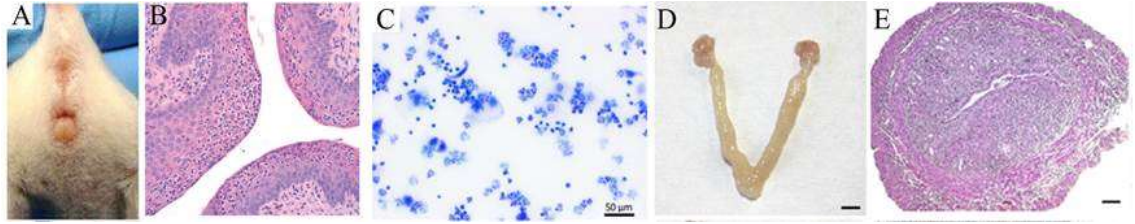
Östrus fazında dişi fare erkek fare ile çiftleşmek için reseptiftir. Dişi farede vajina açıklığı şişmiş ve dorsal bölge belirgin çıkıntılara sahiptir. Vulva daha kırmızımsı renktedir. Mukoza yüzeyinde beyazımsı yumuşak döküntü varsa östrus fazı bitmiştir ve dişi artık üreme için uygun değildir (**Şekil 2.13A**). Vajina mukozası yaklaşık 12 hücre kalınlığındadır. Vajina epiteli maksimum kalınlıktadır (**Şekil 2.13B**). Ovulasyon, östrus sırasında LH'nın yükselmesinden yaklaşık 12 saat sonra ortaya çıkar (**Şekil 2.11**) (Bingel ve Schwartz, 1969). Östrus sitolojisi, kornifiye epitel hücrelerinin baskınlığı ile karakterizedir. Mitoz azalır ve lökosit yoktur (**Şekil 2.13C**). Östrus fazında uterus bezlerinin hiperfonksiyonundan kaynaklı şişkin görünüm görülür (**Şekil 2.13D**). Endometriyum boyunca hücre dışı sıvı artar (**Şekil 2.13E**). Geç östrusta ödem azalmaya başlar (Fox ve ark., 2006; Treuting ve ark., 2011; Croy ve ark., 2013).



**Şekil 2. 13.** Östrus fazında olan dişi fareye ait fizyolojik görüntüler (Croy ve ark., 2013).

### **Metöstrus Fazı**

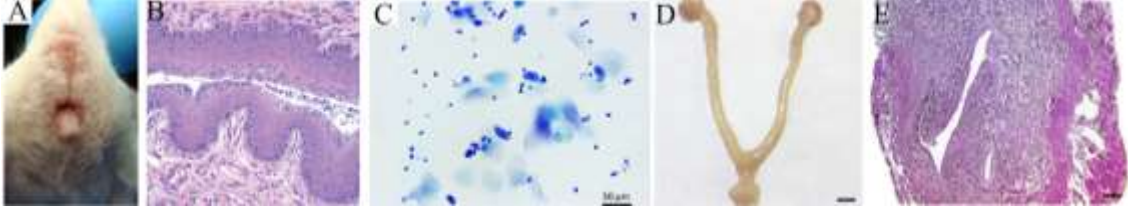
Metöstrus fazındaki dişi farede vajina açıklığı kapanarak küçülür ve vulvaların labiumları şiş değildir (**Şekil 2.14A**). Vajinada kornifiye tabakalar ayrılır ve epitel altında lökositler görünmeye başlar (**Şekil 2.14B**). Östrus döngüsünün en kısa aşaması olan metöstrus fazında sitoloji, birkaç epitel hücrenin varlığı ve artan sayıda polimorfonükleer lökosit ile karakterizedir (**Şekil 2.14C**). Metöstrus fazında östrojen konsantrasyonları azaldıkça, uterusun uçlarında büyüme ve epitel dejenerasyon belirtileri gösterir. Stromal apoptoz en yüksek seviyededir ve ödem belirgin şekilde azalmıştır (**Şekil 2.14D**). Uterus bezleri minimum aktivite gösterir (**Şekil 2.14E**) (Pritchett ve Taft, 2007; Treuting ve ark., 2011; Croy ve ark., 2013).



**Şekil 2. 14.** Metöstrus fazında olan dişi fareye ait fizyolojik görüntüler (Croy ve ark., 2013).

### **Diöstrus Fazı**

Diöstrus fazı siklusun sessiz aşamasıdır. Dişi farede vajina açıklığı küçüktür ve vulva labiyası şiş değildir (**Şekil 2.15A**). Vajina mukozası 4–7 hücre kalınlığındadır. Lümen içinde mukus, lökosit ve dökülen hücreler bulunur (**Şekil 2.15B**). Diöstrus sitolojisi daha küçük polimorfonükleer lökositler ve birkaç büyük epitel hücresi ile karakterizedir (**Şekil 2.15C**). Diöstrus fazında uterus ince ve uzundur (**Şekil 2.15D**). Uterus steroid desteği olmadığı için anemik görünür ve ödem kaybı nedeniyle duvarlar çökmüştür (**Şekil 2.15E**).



Şekil 2. 15. Diöstrus fazında olan dişi fareye ait fizyolojik görüntüler (Croy ve ark., 2013).

## 2.6. Farelerde Uterus Histolojisi

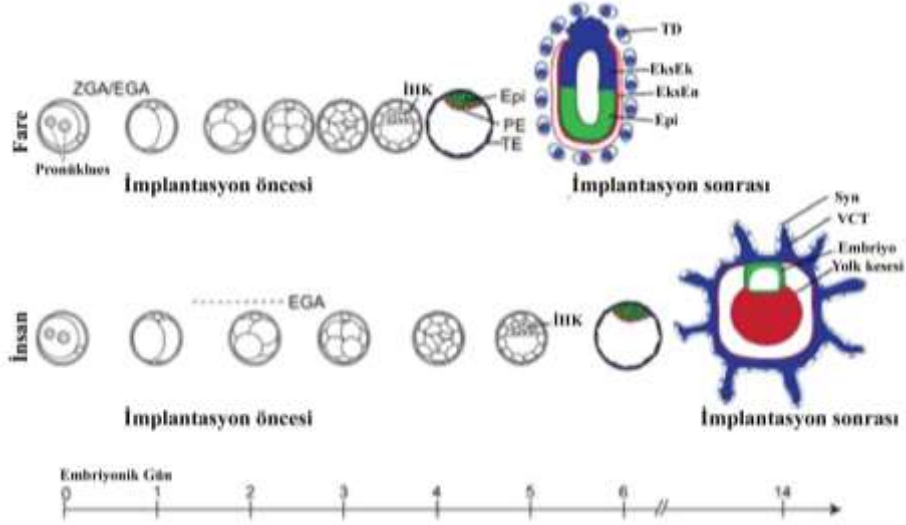
Dişi farelerde uterus boynuzları histolojik olarak 3 tabakaya ayrılır: Perimetriyum, miyometriyum ve endometriyum. En dışta bulunan perimetriyum tabakasında seroza katmanı mezometriyum ile devamlılık gösterir. Miyometriyum kas tabakasıdır ve dışta longitudinal içte sirküler düzenlenim gösterir. Longitudinal ve sirküler kas tabakasının arasında vasküler yapıda olan gevşek bağ dokusu stratum vaskulozum olarak adlandırılır. Endometriyum kan damarları ve sinirleri içerir. Endometriyum epitel basit prizmatik epitel ile döşelidir ve endometriyal stromaya girinti yapan dallı tübüler bezlere uzanır. Endometriyum stromasında birçok küçük polihedral yapıda hücre ve lenfosit içeren retiküler bağ doku yer alır .

Uterus boynuzları orta hatta bir araya geldikçe mediyal duvarları serozayı, stratum vaskulozum ve bazı kas liflerini kaybederler. Uterus gövdesinin anterior kısımları boynuzlardakine benzer şekilde basit prizmatik epitel ile döşelidir ancak diğer bölgelerde ve özellikle medyal duvarlarda çok katlı yassı epitel gözlenir. Uterus gövdesinin serviksine yakın kısımları, serviks ve vajina çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Uterus gövdesinin lamina propriyası boynuzlara göre daha az hücre içerirken daha fazla lifsel eleman içermektedir. Serviksin kranial üçte ikisinin duvarı sirküler yerleşimli düz kas tabakası içerirken kaudal üçte birinin duvarı ise kollajen lif demetleri içermektedir (Croy ve ark., 2013).

## 2.7. Preimplantif Dönem Embriyo Gelişimi

İnsanlarda preimplantif dönem embriyo gelişimine ait ilk gözlemler 1956 yılında Arthur Hertig ve John Rock tarafından yapılmasına rağmen sürecin anlaşılması IVF çalışmaları ile birlikte mümkün olmuştur (Arthur Tremain Hertig ve ark., 1954; Arthur T Hertig ve ark., 1956). İnsanda oositin embriyoya dönüşümü rölatif transkripsiyon sessizliği ile başlar. Sırasıyla oosit-sperm füzyonu, germ hücre pronükleusunun göçü ve füzyonu,

genetik ve epigenetik yeniden programlama ile devam eder. Daha sonra 4 ve 8 hücre aşamaları arasında büyük bir embriyonik genom aktivasyonu (EGA) dalgası ile sonuçlanan yarıklanma bölünmesi geçirir ve embriyo, radyal simetriyi bozan ilk morfolojik belirti olan morulayı oluşturmak için kompaksiyona uğrar (Braude ve ark., 1988). İlerleyen hücre bölünmeleri, trofektoderm hücreleriyle çevrelenmiş, sıvı dolu bir blastosist boşluğu ve bir iç hücre kütesini içeren bir blastosistin oluşmasını sağlar. Blastosistin uterus duvarına tutunmasından hemen önce iç hücre kitlesi, daha erken epiblast ve ilkel endoderm hücrelerine ayrılır. İnsanda gelişimin yaklaşık 7. gününde gerçekleşen implantasyon, embriyonik gelişimin devam edebilmesi için gereklidir (Şekil 2.16) (Niakan ve ark., 2012).



**Şekil 2. 16.** İnsan ve farede preimplantif dönem embriyo gelişimini gösteren çizim (Niakan ve ark., 2012). ZGA: Zigot genom aktivasyonu, EGA: Embriyonik genom aktivasyonu, İHK: İç hücre kitlesi, Epi: Epiblast, PE: Primitif endoderm, TE: Trofektoderm, TD: Trofoblast dev hücresi, EksEk: Ekstra-embriyonik ektoderm, EksEn: Ekstra-embriyonik endoderm, Syn: Sinsityum, VCT: Villözisitotrofoblast

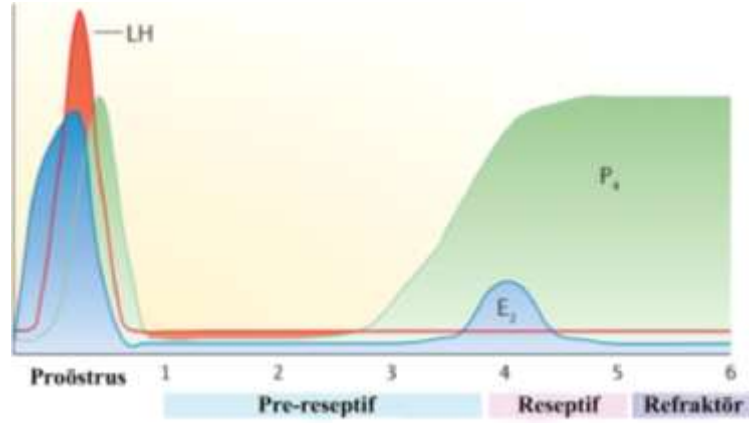
Preimplantif dönem embriyo gelişimi hem insanda hem de farede benzer şekilde iç hücre kitlesi ve trofektodermin ayırt edilebildiği blastosist oluşumuyla sonuçlanan hücre bölünmeleri geçirir. Farelerde EGA 2 hücreli aşamada başlar (Flach ve ark., 1982). İnsanda EGA 2. günde az miktarda olmasına rağmen asıl olarak 3. günde 4-8 hücreli aşamada başlar (Taylor ve ark., 1997; Vassena ve ark., 2011). Kompaksiyon ve blastosist oluşumunun zamanlaması da, insan embriyolarında fare embriyolarına oranla daha geç gelişme göstermesiyle önemli ölçüde farklılık gösterir; fare blastosistleri 3 ve 4 gün arasında oluşurken, insan blastosistleri 5-6. günler arasında oluşur. Hem insan hem

de farede preimplantasyon blastosistleri, plasentada trofoblast soyunu oluşturacak trofoektoderm hücresleri ile dış tabaka ve epiblast ve primitif endoderm tabakalarına ayrılacak bir iç hücre kütesini içerir. Fetüsü oluşturacak tüm dokular epiblast hücrelerinden gelişir. Ekstraembriyonik endoderm primitif endodermden gelişir. Farede trofektoderm, ekstraembriyonik ektodermin proliferatif kök hücre havuzunda artış sağlar ve farklılaşan poliploid trofoblast dev hücreler gelişmeye başlar. Buna karşılık insanda trofektoderm sitotrofoblast, sinsityotrofoblast ve ekstravillöz trofoblast hücrelerinin oluşmasını sağlar (**şekil 2.16**) (Niakan ve ark., 2012).

### **2.8. Dişi Farelerde İmplantasyon Penceresi**

Embriyonun uterusu yerleşme sürecinde blastosist ve uterus lümen epitel arasındaki karşılıklı konuşma memeli üremesi için esastır. Embriyo gelişimi ile uterus farklılaşmasının senkronizasyonu başarılı bir gebelik için gereklidir (Matsumoto, 2017). Memelilerde preimplantif dönem embriyo gelişimi önce ovidakta başlar ve uterusu ulaşınca hatching geçirerek blastosist aşamasındaki embriyolar endometriyum ile ilk fiziksel ve fizyolojik etkileşimi başlatır (H. Wang ve Dey, 2006).

Uterus epitel hücreleri preovulatuvar östrojen etkisi altında gebeliğin 1. gününde yoğun proliferasyona uğrarlar ve bu epitel proliferasyonu 2. günde de devam eder. Yeni oluşan korpus luteumdan salgılanan progesteron gebeliğin 3. gününde stromal hücre proliferasyonunu başlatır (Huet-Hudson ve ark., 1989). Stromal hücre proliferasyonu, 4. gün sabahında salgılanan preimplantasyon östrojeni ile daha da uyarılır. Östrojen ve progesteronun koordine etkileri, uterus epitel hücre proliferasyonunu durdurur ve farklılaşmayı başlatır. İmplantasyon 4. gün gecesi başlandıktan sonra, implante blastosistin etrafını saran stromal hücreler yaygın olarak çoğalmaya başlar ve desidual hücrelere dönüşür (**şekil 2.17**) (Y. M. Huet ve ark., 1989).

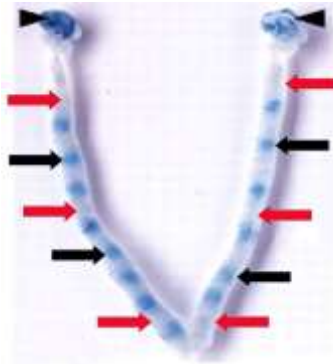


**Şekil 2.17.** Farelerde gebelik günlerine göre uterus reseptivitesini gösteren çizim (H. Wang ve Dey, 2006).

Farelerde gebelik sırasında, uterusu aktif bir blastosistin varlığı implantasyon için uyarıcıdır. Gebe farelerde, 1–3. günlerde uterus prereseptif; 4. günde (implantasyon günü) reseptif; 5'inci günden sonra ise uterus nonreseptif hale gelir. Uterus prereseptif ve nonreseptif haldeyken blastosist implantasyonuna izin vermez (Paria ve ark., 1993). Çok kısa süreli östrojen konsantrasyonunun reseptivite süresini belirlediği kabul edilmektedir. Uterus ancak progesteron mevcudiyetinden 24-48 saat sonra az miktarda östrojene maruz kaldığında blastosist implantasyonuna hazır hale gelir (Y. Huet ve Dey, 1987).

### 2.9. Farelerde Reseptif Uterusta Vasküler Geçirgenlik Değişiklikleri

Farelerde blastosistin endometriyuma yaklaşması proinflatuvar bir reaksiyon olarak kabul edilir ve bu bölgede artan vasküler permeabilite makromoleküler mavi boyanın intravenöz enjeksiyonu ile görülebilir (**Şekil 2.18**) (Matsumoto, 2017).



**Şekil 2.18.** Chicago mavisi enjeksiyonundan sonra uterusu mavi bantlar şeklinde görülen implantasyon bölgeleri. Ok başları ovaryumları, siyah oklar implantasyon bölgelerini, kırmızı oklar inter-implantasyon bölgelerini göstermektedir (Song ve ark., 2002).

Bu boya serum proteinlerine bağlanır ve boya-protein konjugatı, blastosistin yaklaştığı alanlarda vasküler geçirgenliğin arttığı bölgelere sızar (A. Psychoyos, 1961). Bu makromoleküler mavi boya çözeltisinin intravenöz enjeksiyonundan sonra implantasyon bölgeleri uterus boyunca ayrı mavi bantlar olarak gözlemlenebilir (**Şekil 2.18**). Bu artmış vasküler geçirgenlik, blastosist ve uterus lümen epiteli arasındaki tutunma reaksiyonu ile çakışmaktadır (Matsumoto, 2017).

## **2.10. İmplantasyon**

En basit tanımı ile implantasyon embriyonun maternal uterusu yerleşme sürecidir ve embriyonun gelişmesine devam edebilmesi için kritik öneme sahiptir. Embriyo ve uterus arasındaki karşılıklı etkileşim hala merak uyandıran ve sırları tam olarak aydınlatılmamış bir konudur. İnsanlarda embriyo ile uterus arasındaki etkileşimleri moleküler düzeyde incelemenin zor olması, insan implantasyonunun incelenmesindeki etik kısıtlamalar ve deneyim zorlukları embriyo-uterus etkileşimlerinin doğrudan analizini önlemektedir. Bu nedenle bu alandaki bilgilerimizin çoğu kemirgenlerde özellikle de fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiştir (Dey, 1996).

### **2.10.1. Farelerde Embriyo İmplantasyonu**

İmplantasyon sürecinde, embriyo ve uterus hücreleri arasında kompleks etkileşimler gerçekleşir. İmplantasyon sürecinin temel olayları şu şekilde sıralanabilir:

- 1- Preimplantasyon evresindeki embriyonun blastosist aşamasına ve uterusun reseptif evreye senkronize olarak gelmesi, (A Psychoyos, 1973)
- 2- Semiallogenik embriyonun maternal immünolojik yanıtlarından kaçması, (Beer ve Billingham, 1978)
- 3- Blastosistin uterusu yakınlığı alanda artan vasküler permeabilitesi, (A Psychoyos, 1973)
- 4- Blastosistin uterus lümen epiteline ilk tutunduğu alandaki endometriyal stromanın lokal desidualizasyonu (DeFeo, 1967; A Psychoyos, 1973)
- 5- Embriyonik trofoblastların uterusu kontrollü invazyonu (D. R. S. Kirby ve Cowell, 1968)

Bu aşamalarda, hem embriyo hem de uterustaki hücre tiplerinde proliferasyon, farklılaşma, göç ve yeniden şekillenme olayları görülür. Bu kritik olaylar progesteron (P<sub>4</sub>) ve östrojen (E<sub>2</sub>) tarafından aracılık edilen geçici ve hücre tipine spesifik etkileşimlere bağlıdır.

### **2.10.2. Farelerde İmplantasyon Aşamaları**

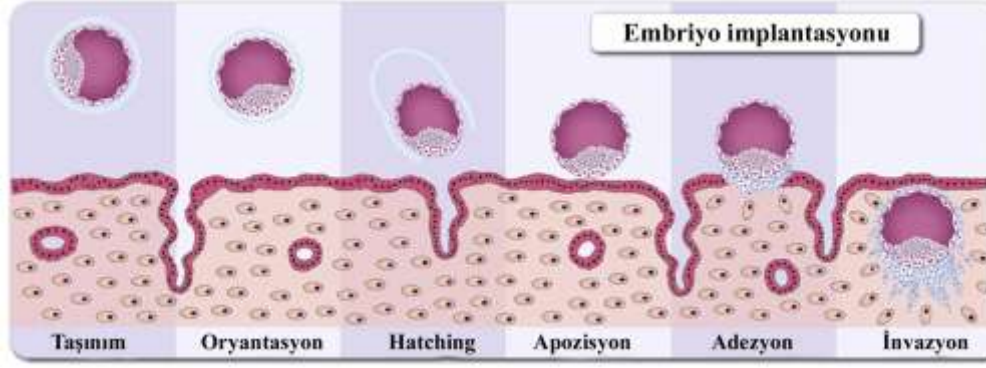
Farelerde implantasyon, lümen epiteli invaginasyonu ile oluşan bir kript (nidus) içinde blastosist yuvarlanması ile gerçekleşir. İmplantasyon blastosist ile uterus endometriyumu arasındaki yakın fiziksel ve fizyolojik temas ile başlar. Enders ve Schlafke yaptıkları gözlemler sonucunda implantasyonu apoziyon, adezyon ve invazyon olmak üzere üç aşamaya ayırmışlardır (Enders ve Schlafke, 1969). Bu aşamalar birbirini takip eden sürekli bir süreçtir. Apozisyon embriyoya ait trofektoderm hücreleri ile lümen epitelinin birbirine yaklaştığı ve karşılıklı etkileşime başladığı aşamadır. Adezyon aşamasında bu etkileşim uterus lümeninin yıkanmasıyla blastosistin uzaklaşamayacağı kadar ilerlemiştir. İnvazyon aşaması ise lümen epitelinin trofektoderm tarafından işgal edilerek embriyonun endometriyuma penetre olduğu aşamadır (**Şekil 2.19**).

Kemirgenlerde, apozisyon öncesi oluşan stromal ödem uterus lümeni daralmasına neden olur. Lümen epiteli daralması ise trofektoderm mikrovillusu ile lümen epitelinin birbirine yakınlaşmasını sağlar. Lümen kapanması blastosist varlığından bağımsız olarak gerçekleşirken progesteron mevcudiyeti gereklidir. Adezyon aşamasında çok sayıda glikoprotein ve karbohidrat ligand ve ligandlara ait reseptörler lümen epiteli ve trofektoderm hücreleri tarafından eksprese edilir. İntegrinler, selektinler, galektinler, heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG'ler), musin-1, kaderinler ve trofinin-tastin-bystin kompleksi bunlara örnektir. Adezyon aşamasında blastosistin olduğu bölgede vasküler permeabilite arttığı için makromoleküler boyaların intravenöz uygulamaları ile implantasyon alanları mavi bant halinde gözlemlenebilir (**Şekil 2.18**) (H. Wang ve Dey, 2006).

Lümenin daralmaya başladığı bölgelerde blastosistler lümen eksenini boyunca lümenin antimezometriyal bölgesine yerleşirler. Lümen daralmasından kısa bir süre sonra zona ile kaplı blastosistler iç hücre kitleleri rastgele olacak şekilde kriptlerde bulunurlar. Ayrıca blastosistler adezyon aşamasında farelerde iç hücre kitleleri mezometriyal kutba



bakacak şekilde konumlanırken insanda iç hücre kitleleri lümen epiteline bakacak şekilde konumlanır. Bu gözlemler sonucunda tüm blastosist yüzeyindeki trofoektodermin lümen epiteline tutunma potansiyeli olduğu ve tutunmanın zona pellusida kaybından hemen sonra gelişigüzel bir şekilde gerçekleştiği yorumu yapılmaktadır. Birçok kanıt blastosistin doğru yönleneşinin iç hücre kitlesinin serbest hareketiyle gerçekleştiğini önermektedir (D.R.S. Kirby, 1971; Finn ve Porter, 1975).

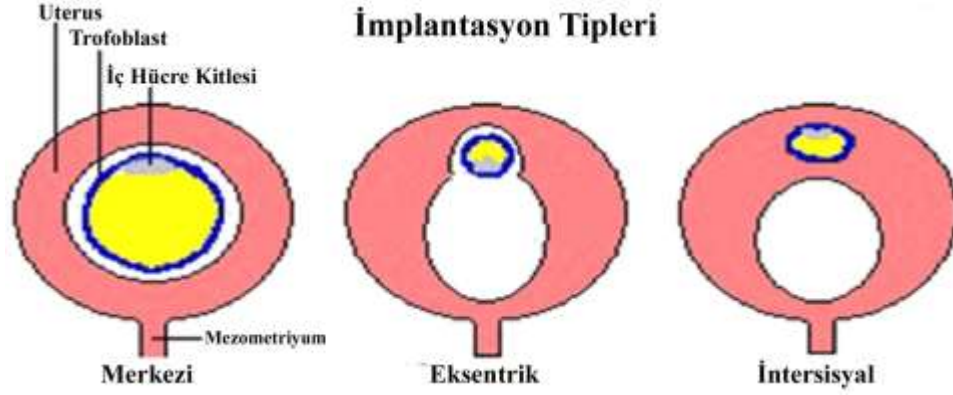


Şekil 2. 19. Embriyo implantasyonunun aşamalarını gösteren şema (Weimar ve ark., 2013).

Farelerde apozisyon aşaması hatch olmuş blastosistte gebeliğin (vajinal plak=1. gün ) 4. günü gece saatlerinde (20.00-24.00) başlar. Adezyon aşaması 5. gün gerçekleşir. Uterus lümen epiteline iki popülasyon oluşur: implantasyon bölgeleri ve inter-implantasyon bölgeleri. Adezyon aşamasından birkaç saat sonra implantasyon bölgesindeki epitel hücreleri trofoektoderm ile etkileşim kurarlar ve hücre ölümü veya entoz ile ortadan kaldırılarak invazyona olanak sağlarlar (Cha ve ark., 2012).

### 2.10.3. Memelilerde İmplantasyon Tipleri

Blastosist ile maternal doku arasında güçlü adezyon implantasyon için gereklidir. Blastosist implantasyonu için maternal dokunun aşındırıldığı invazyon aşaması memeli türleri arasında farklılıklar gösterir. Bonnet ve arkadaşları memelilerde blastosist-uterus etkileşimlerine göre implantasyonu üç kategoriye ayırmışlardır: Merkezi, eksentrik ve intersisyal ( Şekil 2.20) (Bonnet, 1884).



Şekil 2. 20. Memelilerde implantasyon tiplerini gösteren şema (Bowen, 2000).

Merkezi implantasyonda blastosist genişleyerek uterusun merkezinde kalır. Etoburlar, geviş getirenler, atlar ve domuzlar merkezi implantasyon görülen memelilere örnektir. Eksentrik implantasyonda blastosist küçüktür ve genellikle uterusu antimezometriyal kısmından tutunur. Sıçan ve fareler eksentrik implantasyon gösteren memelilere örnektir. İnterstisyel implantasyonda blastosist küçüktür ve endometriyal epitelden subepitelyel bağ dokusuna geçer. Bu tür implantasyon genellikle nidasyon olarak adlandırılır. İnsan ve gine domuzu interstisyel implantasyon görülen memelilere örnektir.

### 2.11. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROT), oksijen metabolizması sonucu üretilen yüksek oranda reaktif moleküllerdir. Serbest radikaller olarak da bilinirler. Serbest radikaller, dış yörüngelerinde en az bir eşlenmemiş elektron içeren oldukça reaktif moleküllerdir (Silva ve Lima, 2015). Hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) ve süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^\cdot$ ) en bilinen serbest radikal örneklerindedir (Şekil 2.21). İndirgeyici koşullar altında moleküler oksijenden türer ve yüksek konsantrasyonları normal hücresel fonksiyonlarında zararlı etkilere neden olabilir (Silva ve Lima, 2015).

<b>Radikaller</b>	
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$
Hidroksil	$OH^{\cdot}$
Peroksil	$ROO^{\cdot}$
Alkoksil	$RO^{\cdot}$
Hidroperoksil	$HO_2^{\cdot}$
Lipid peroksil	$LOO^{\cdot}$

**Şekil 2. 21.** Reaktif oksijen türlerine ait örnekler (Karabulut ve Gülay, 2016).

ROT, normal hücre metabolizması sırasında oluşur. Bağışıklık sisteminin aktivasyonu dahil olmak üzere birçok fizyolojik olayda rol alırlar. Örneğin, bağışıklık sisteminin bir parçası olarak aktive olan fagositler, patojenleri öldürmek için hidrojen peroksit açığa çıkarırlar. Süperoksit anyonunun da enfeksiyonlara karşı mücadelede rolü olduğu bilinmektedir (Frey ve ark., 2009; Silva ve Lima, 2015). Ayrıca fibroblast, endotel hücreleri ve kardiyak miyositler dahil olmak üzere fagositik olmayan hücreler tarafından salınan ROT, farklı hücre içi sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca spermin kapasasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyonunda fizyolojik ROT gereklidir (Ashok Agarwal, Hamada, ve ark., 2012).

### **2.11.1. Oksidatif Stres**

Oksidatif stres (OS), ROT ile antioksidanlar arasında denge olmaması ile karakterize bir durumdur. ROT'ler fizyolojik olarak oksidatif fosforilasyon ve trikarboksilik asit siklusu boyunca elektron sızması ile mitokondride oluşan doğal toksik yan ürünlerdir (Devine ve ark., 2012; Bause ve Haigis, 2013). Normal koşullarda sağlıklı bir kişide ROT üretimi ile antioksidanlar dengededir ve bu durum kararlı redoks hali olarak tanımlanır. Ancak redoks dengesindeki bozukluk OS'ye neden olarak hücrel hasara yol açar (Devine ve ark., 2012; Bause ve Haigis, 2013). OS'nin hem dişi hem de erkek üreme sisteminde normal fizyolojik ve patolojik olaylarda rol aldığı bilinmektedir (A. Agarwal ve ark., 2003; A. Agarwal, Aponte-Mellado, ve ark., 2012; Lavranos ve ark., 2012). ROT'nin uygun miktarlarının üreme sisteminde önemli rolleri vardır ve serbest radikallerin aşırı

üretimi ya da antioksidan savunma mekanizmasının bozulması hücre hasarına yol açar (A. Agarwal ve ark., 2005).

## Bazı Serbest Radikallerin Özellikleri

### Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ )

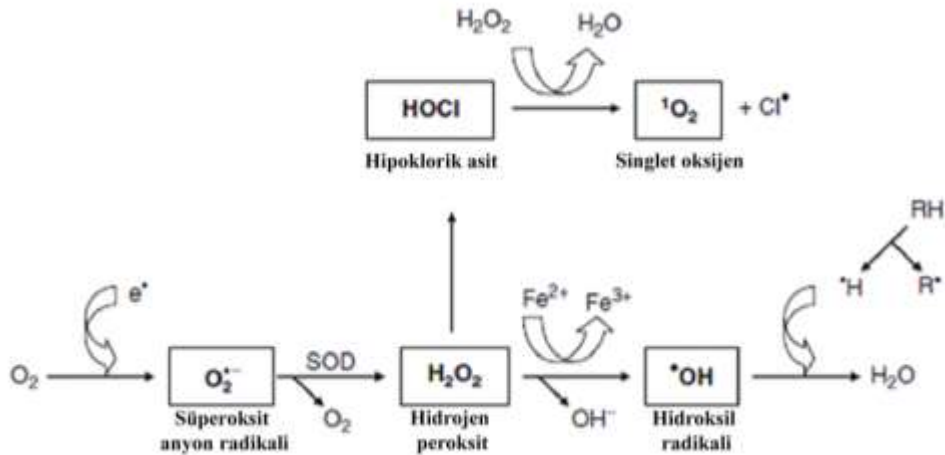
Süperoksit iyonu moleküler oksijene ( $O_2$ ) tek bir elektron aktarımı sonucunda oluşur (Şekil 2.22). Eşlenmemiş çok reaktif elektrona sahip süperoksit iyon radikali ROT'nin hücre içinde ve dışında oluşumunda ve yayılmasında ilk adımdır (Michelson ve ark., 1977).

### Hidroksil ( $OH\cdot$ )

Hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ), hidroksit iyonunun nötr halidir ve oldukça reaktif bir serbest radikaldir [26]. DNA, proteinler, lipidler ve karbonhidratlar gibi organik ve/veya inorganik moleküller ile güçlü bir şekilde reaksiyona girebilir. Hücrelerde diğer ROT'lerden daha fazla ciddi hasara neden olabilir (Barry Halliwell, 1987).

### Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )

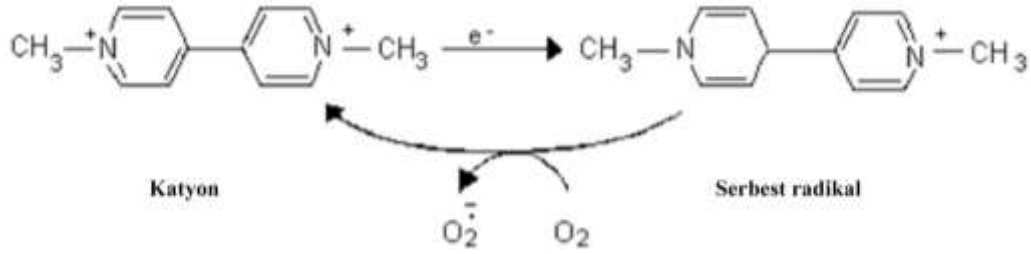
Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit dismutaz enzimi (SOD) ile katalizlenen dönüşüm sonucu oluşur (Şekil 2.22). Serbest radikal değildir ancak geçiş metali iyonlarının varlığında hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ) oluşumu ile DNA'ya zarar verebilir (B. Halliwell ve ark., 2000). Katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksin gibi antioksidan enzimler  $H_2O_2$ 'yi ortadan kaldırabilir (Chae ve ark., 1999; Mates ve ark., 1999).



Şekil 2. 22. ROT oluşum basamaklarının şematize görüntüsü.

ROT oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklar arasında ilaçlar, metal iyonları, çevresel kirleticiler ve radyasyon bulunur. Çevresel kirleticilerden biri olan parakuat oldukça güçlü sistemik bir zehirdir ve deri, gastrointestinal ve/veya solunum yolları ile emilebilir (MERCAN, 2004). Parakuat tarım ve bahçecilik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan hızlı ve etkili bir herbisittir (S. Li ve ark., 2018).

Parakuat ( $[C_{12}H_{14}N_2]^{2+}$ ) yapısal olarak iki piridin halkasına sahip bipiridil ( $C_5H_4N$ ) yapıdadır. Bipiridiller, elektronlarını  $O_2$ 'ye aktararak serbest radikal ve süperoksit radikali oluştururlar (Şekil 2.23). Oluşan radikaller lipid peroksidasyonuna neden olarak tahrip edici etkisini meydana getirir (MERCAN, 2004).



Şekil 2. 23. Parakuatın kimyasal yapısını ve ROT oluşumunu gösteren çizim (Bus ve Gibson, 1984).

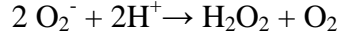
### 2.11.2. ROT Üretiminin Antioksidan Kontrolü

Canlı hücrelerde bulunan lipid, protein, nükleik asit ve karbohidratlar gibi hedef moleküllerdeki oksidatif hasarı, serbest radikalleri nötralize ederek engelleyen veya geciktiren maddelere antioksidan ve bu olaya da antioksidan savunma adı verilir. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif dengenin bozulması ile oluşan OS, doku hasarı ile sonuçlanmaktadır. Enzimatik ve enzimatik olmayan hücrel antioksidan savunma mekanizmaları ROT üretimini kontrol altında tutmaktadır (Nordberg ve Arner, 2001; Pham-Huy ve ark., 2008).

### 2.11.3. Enzimatik Antioksidan Sistem

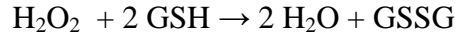
Antioksidan enzimler serbest radikalleri indirgeyerek oluşacak hasarı önlemede rol oynar. ROT ve RNT'nin indirgenmesinde doğrudan rol oynayan başlıca antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon redüktaz (GRX)'dir (Pham-Huy ve ark., 2008).

SOD'lar, O<sub>2</sub><sup>-</sup>'nin ortadan kaldırılmasında rol oynayan ilk enzimdir ve O<sub>2</sub><sup>-</sup>'nin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub>'ye dönüşümünü katalizler (McCord ve ark., 1971). Bakır-çinko içeren SOD (Cu, Zn-SOD veya SOD1) sitozolde dimerik, Mangan içeren SOD (Mn-SOD veya SOD2) mitokondride homotetramerik bulunan proteindir (Tabakoğlu ve Durgut, 2013). Ekstraselüler SOD (EC-SOD veya SOD3) ise bakır ve çinko içeren tetramerik glikoproteindir (Marklund, 1982; Marklund ve ark., 1982). SOD reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminin kontrolü, ROT yayılımına karşı hayati bir rol oynayan ikinci enzimatik adımdır. Hem glutatyon peroksidaz (GPX) hem de katalaz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>O'ya dönüşümünü katalize eder. GPX'ler, selenyum-bağımsız ve selenyum-bağımlı olmak üzere iki gruba ayrılan bir enzim ailesidir. Enzimin %60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. %25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesi eritrositler ve karaciğerde fazladır. GPX, hücrenin sitozolik kompartmanında lipid peroksidasyonuna karşı koruma ile hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur (Mills, 1957).

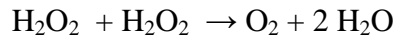
GPX reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



\*GSH : İndirgenmiş glutatyon

\*GSSH : Oksitlenmiş glutatyon

Katalaz ise peroksizomlar içinde bulunur ve yapısında 4 adet “hem” grubu bulunduran bir hemoproteindir (Chance ve ark., 1979). Karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kas ve eritrositlerde aktivitesi yüksektir. Katalaz reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



#### **2.11.4. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistem**

ROT'nin ortadan kaldırılmasında antioksidan vitaminler, eser elementler ve polifenoller rol almaktadır. Antioksidan vitaminler doğrudan ROT'nin ortadan kaldırılmasını sağlar. Antioksidan özellikteki E vitamini, serbest radikallere yapısında bulunan kromanol halkasındaki fenolik gruptan hidrojen vererek nötralize edebilmektedir (Peh ve ark., 2016). Provitamin A'nın öncülü olan karotenoid elektronik olarak uyarılmış molekülleri inaktive edebilir ve serbest radikal reaksiyonlarına katılabilir (Bendich ve Olson, 1989).

C vitamini (askorbik asit) de ROT'yi temizleyebilir ve DNA hasarına karşı koruma sağlayabilir. Askorbik asit tokoperoksil radikalini indirgeyerek tokoferolün yeniden oluşumunu sağlayabilir. Ayrıca, C ve E vitaminleri, lipid peroksidasyon ürünlerinin üretimini kontrol etmek için GSH ile ilişkili enzimlerle etkileşime girebilir (Machlin ve Bendich, 1987).

Glutatyonun serbest radikaller ile reaksiyona girmesi hücrenin oksidatif strese karşı korunmasını sağlamaktadır. Ayrıca glutatyonun diğer protein ve ksenobiyotiklerle olan etkileşimi de oksidatif strese karşı koruma sağlamaktadır (Barry Halliwell ve Gutteridge, 2015).

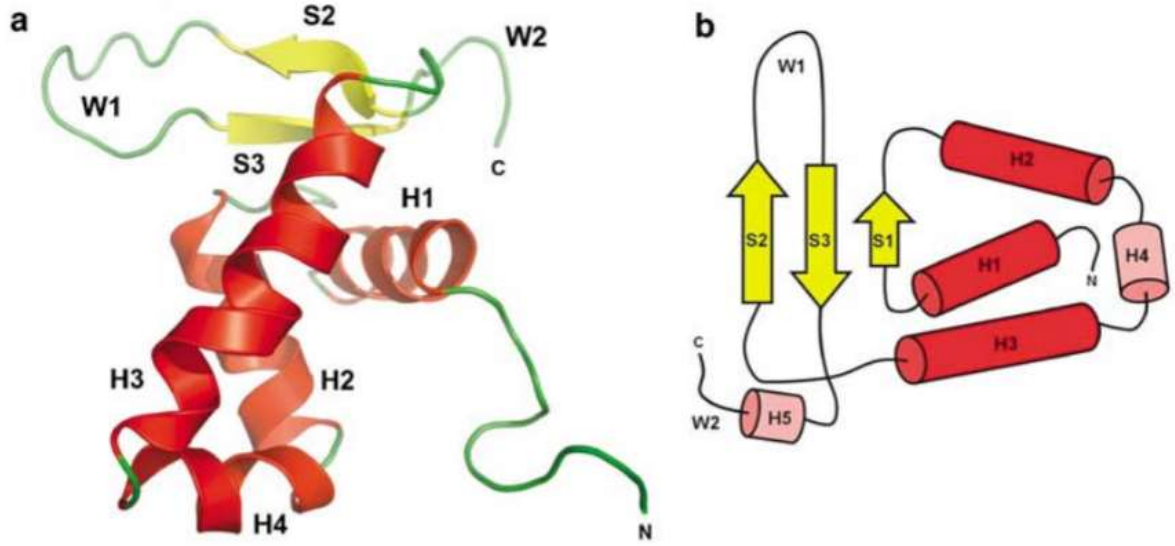
### **2.11.5. ROT'nin Dişi Üreme Sistemindeki Fizyolojik Rolü**

OS'nin hem dişi hem de erkek üreme sisteminde normal fizyolojik ve patolojik olaylarda rol aldığı bilinmektedir (A. Agarwal ve ark., 2003; A. Agarwal, Aponte-Mellado, ve ark., 2012; Lavranos ve ark., 2012). ROT'nin uygun miktarlarının üreme sisteminde önemli rolleri vardır ve serbest radikallerin aşırı üretimi ya da antioksidan savunma mekanizmasının bozulması hücre hasarına yol açacaktır (A. Agarwal ve ark., 2005). ROT iki yüzü keskin bıçak gibidir; fizyolojik süreçlerde anahtar sinyal molekülleri olarak rol alırken aynı zamanda dişi üreme sistemini de içeren patolojik süreçlerde rol alırlar (Ishikawa, 1993; Paszkowski ve ark., 1995; Garcia-Pardo ve ark., 1999; Jozwik ve ark., 1999). ROT'nin fizyolojik seviyeleri folikülogenez, oosit matürasyonu, korpus luteum ve uterus fonksiyonu, embriyogenez, implantasyon ve fetoplental gelişimde çeşitli sinyal iletim transdüksiyonları yoluyla önemli bir düzenleyici rol oynar (A. Agarwal ve ark., 2008).

OS'nin dişi üreme sistemi, preeklampsi (Takagi ve ark., 2004), hidatidiform mol (Harma ve ark., 2003; Harma ve ark., 2004), serbest radikallerin neden olduğu doğum kusurları (Loeken, 2004) ve abortus gibi (Lagod ve ark., 2001) patofizyolojik olaylarda rol oynadığı ile ilgili literatür artmaktadır.

## 2.12. Fox Ailesi

“Fork head box (Fox)” ilk olarak *Drosophila*'da potansiyel bir transkripsiyon düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Detlef Weigel, Jürgens, ve ark., 1989). Fox ailesi, mayalardan insana kadar tüm ökaryotlarda tanımlanmıştır (Lehmann ve ark., 2003). Fox transkripsiyon faktörleri, yaklaşık 110 amino asitten oluşan, 3 tane iyi korunmuş  $\alpha$ -helix, 3 tane  $\beta$ -sheet ve 2 "loop" bölgesinden oluşan kelebek benzeri bir görünüme sahiptir (Şekil 2.24) (Clark ve ark., 1993). Transkripsiyon faktörlerinde bulunan Fox alanı, heliks-dönüş-heliks motifi ile DNA'yı bağlar, bu nedenle bu aile ‘wing heliks’ olarak da adlandırılmıştır (Kaestner ve ark., 2000).



Şekil 2. 24. Fox ailesinin genel yapısını 3 boyutlu olarak şematize eden çizim (Obsil ve Obsilova, 2008)  
H:heliks, S:strand, W:wing like loop.

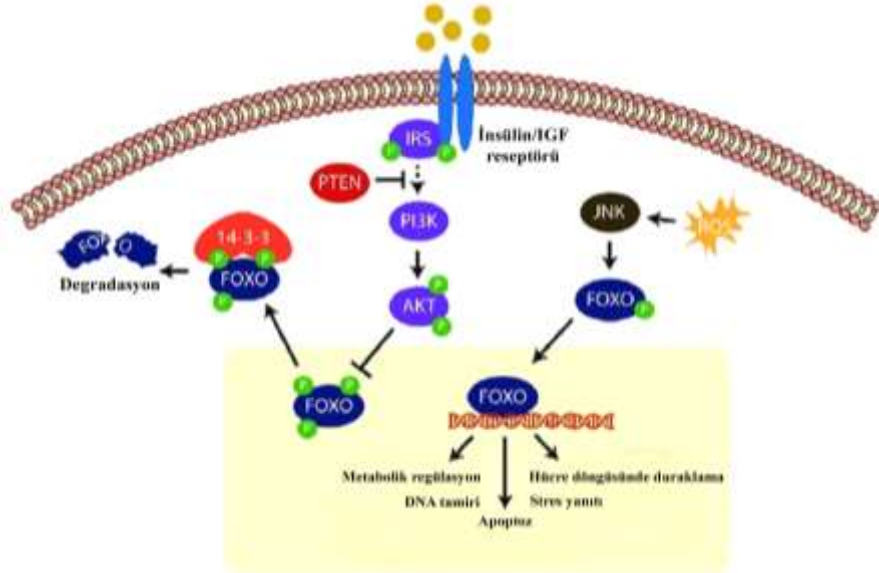
Fox ailesinin ilk üyesi, *Drosophila melanogaster*'de gerçekleştirilen mutagenез çalışmaları sonucunda tanımlanmıştır (D. Weigel, Jurgens, ve ark., 1989). Fox transkripsiyon faktörleri hem gelişim sırasında hem de yetişkin yaşamında geniş ölçüde eksprese edilir ve proliferasyon, farklılaşma, stres direnci, apoptoz ve metabolizmanın kontrolü gibi çok çeşitli biyolojik fonksiyonları kontrol eder (Obsil ve Obsilova, 2008). Fox transkripsiyon faktörleri FoxA'dan FoxS'ye kadar değişen alt sınıflara ayrılmaktadır (Kaestner ve ark., 2000; Jackson ve ark., 2010; J. Wang ve ark., 2017).



### 2.12.1. Fork Head Box O (FoxO) Alt Üyesi

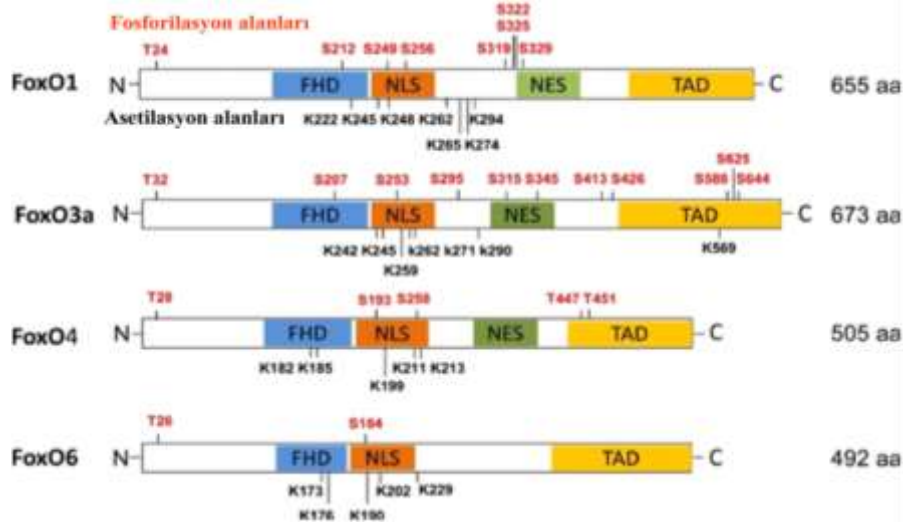
FoxO alt sınıfı metabolizmanın düzenlenmesi, oksidatif stres direnci ve hücre döngüsü duraklatılmasında rol oynar. FoxO'lar genellikle transkripsiyon aktivatörleri olarak işlev görürler, ancak bazı durumlarda inaktivasyonda rol aldığı da gözlenmiştir (Lam ve ark., 2013).

FoxO aktivitesi, stabilitesi ve lokalizasyonu, insülin/IGF (The insulin/insulin-like growth factor) sinyal yolağı ve ROT aracılığı ile düzenlenebilir. İnsülin/IGF, transmembran reseptörlerini aktive eder ve insülin reseptör substratı (IRS) proteinlerini aktive eder. IRS proteinleri PI3K (phosphoinositol-3-kinase) aktivasyonu ile AKT'nin (Protein Kinase B) fosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlar. Aktif AKT, FoxO proteinlerini üç bölgede fosforilleyerek inaktive eder ve nükleus dışına çıkmasını tetikler. AKT ile fosforillenen FoxO sitoplazmada 14-3-3 proteinlerine bağlanır ve degradasyona uğrar. Fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN), FoxO fosforilasyonunu ve PI3K aktivasyonunu inhibe ederek FoxO'nun nükleusta kalmasını destekler. İnsülin/IGF sinyalinin inhibe edici etkisinin tersine, ROT c-Jun N-terminal kinazını (JNK) aktive ederek FoxO'nun nükleusta kalmasını ve aktivasyonunu destekler. JNK, FoxO'ları doğrudan fosforile ederek aktifleştirir. Aktif FoxO'lar hücre homeostazını destekleyen çeşitli hücresel süreçleri düzenler (Şekil 2.25) .



Şekil 2. 25. FoxO aktivitesi, stabilitesi ve lokalizasyonunun şematize hali (Brown ve Webb, 2018).

FoxO transkripsiyon faktörleri TGTTCAC sekansını tanıyan yaklaşık 110 aminoasitlik forkhead DNA bağlanma bölgesi ile karakterizedir. FoxO'lar DNA bağlanma bölgesine ek olarak nükleer lokalizasyon sekansı (NLS), nükleer eksport sekansı (NES) ve C-terminalinde heliks motifi olan LXXLL (L: lösin, X: herhangi bir aminoasit) transaktivasyon domeyni (TAD) içeren motife sahiptir (Şekil 2.26). FoxO ailesi üyeleri bu alanlarda yüksek oranda korunmuş gen dizilerine sahiptir (Brown ve Webb, 2018).

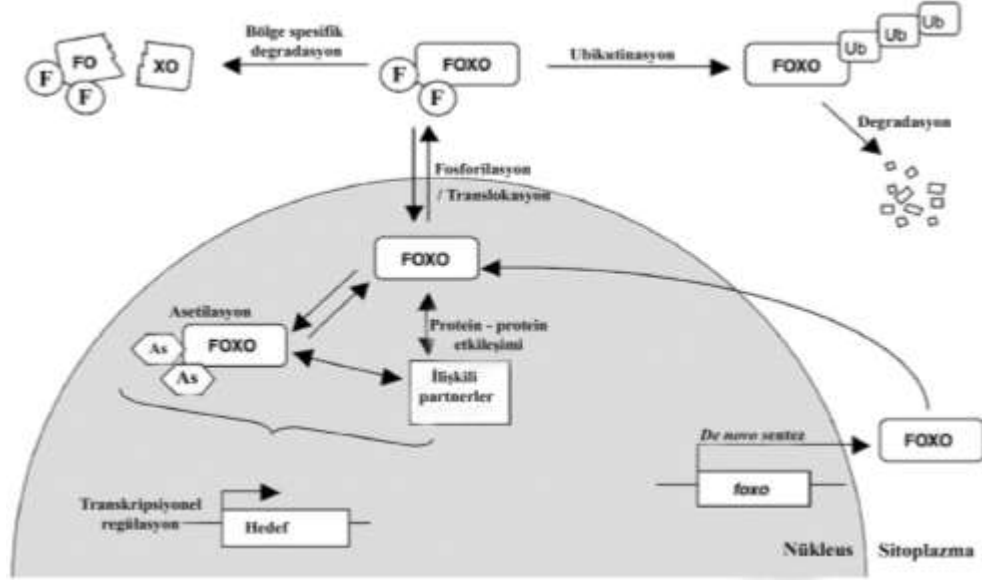


Şekil 2. 26. FoxO'ların protein domeynlerini ve post translasyonel modifikasyon bölgelerini gösteren şema (Ma ve ark., 2018).

Memelilerde, FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX) ve FoxO6 olmak üzere 4 FoxO ailesi üyesi tanımlanmıştır (Şekil 2.26) (Kaestner ve ark., 2000; Hannenhalli ve Kaestner, 2009). FoxO6 sadece erişkin beyninde eksprese edilmesine rağmen FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 dokuya ve gelişim aşamasına göre değişkenlik göstermektedir.

### 2.12.2. FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Post-Translasyonel Modifikasyonlarla Düzenlenmesi

Post-translasyonel modifikasyonlar (PTM) FoxO transkripsiyon faktörlerinin nükleusa giriş/çıkışını ve DNA motifine bağlanma afinitesini etkiler (Tsuchiya ve Ogawa, 2017). FoxO proteinlerinde fosforilasyon, metilasyon, ubikütinasyon, asetilasyon/deasetilasyon, glikozilasyon ve nitrozilasyon dahil olmak üzere 400'ün üzerinde PTM belirlenmiştir (Şekil 2.27) (Z. Wang ve ark., 2016). Bu PTM'ler FoxO'ların lokalizasyon, stabilite veya protein-protein etkileşimlerini etkileyerek FoxO aktivitesini indükler veya inhibe eder (Brown ve Webb, 2018).



Şekil 2. 27. FoxO transkripsiyon faktörlerini düzenleyen temel mekanizmalar (Glaser ve Schlegel, 2007)  
Ub:ubikuitin, P: fosfat grubu, Ac: asetil grubu.

ROT seviyelerindeki değişikliklere cevap veren ve FoxO antioksidan aktivitesini düzenleyen FoxO PTM'leri arasında fosforilasyon, asetilasyon ve ubikütinasyon yer alır (Şekil 2.27). FoxO normalde sitoplazmada inaktif halde bulunmaktadır. Açlık ve oksidatif strese yanıt olarak aktive olunca transkripsiyonel aktiviteyi başlatmak için nükleusa transloke olur (Eijkelenboom ve Burgering, 2013). FoxO aktivasyonu, hedef genleri etkileyerek antioksidan enzimler SOD ve katalaz ekspresyonu ile oksidatif strese karşı direncin artırılmasını sağlar (Şekil 2.28) (Zhao ve ark., 2017).

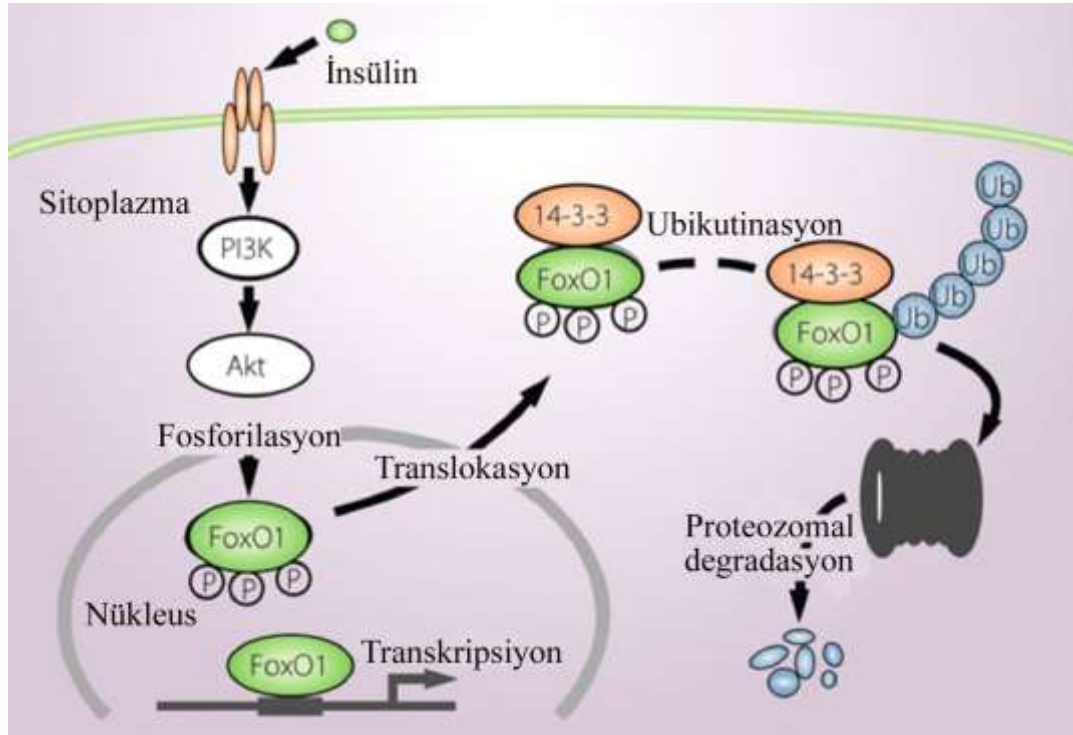


Şekil 2. 28. ROT kaynaklı oksidatif stres ile FoxO regülasyonu modeli (Ponugoti ve ark., 2012).

## FoxO'ların Fosforilasyon ve Ubikütinasyonu

FoxO'lar çeşitli protein kinaz türleri ile farklı bölgelerinden fosforile edilir ve hücre içi lokalizasyonu, DNA'ya bağlanma afinitesi ve transkripsiyon aktivitesi değişir. FoxO'lar AKT fosforilasyonu ile inaktive olurlar (Şekil 2.29). AKT'nin yanısıra SGK (Serum and glucocorticoid-induced kinase), CK1 (Casein kinase-1), CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2), DYRK1a (Dual-specificity tyrosine phosphorylation and regulated kinase 1a), ERK (Extracellular signal-regulated kinase) ve IKK (IκB kinase) gibi diğer kinazlar da FoxO'ları fosforilleyerek inaktive ederler. FoxO'nun fosforilasyonu FoxO'nun nükleus dışına çıkmasına dolayısıyla da apoptozda rol alan hedef genlerinin inhibisyonuna neden olur (Zhu ve ark., 2008; X. Wang ve ark., 2012).

FoxO degradasyonu ubikütin-proteozom sistemi tarafından düzenlenir. FoxO'nun AKT, IκB kinaz (inhibitor of kappa B) ve ERK ile fosforillenmesi poli-ubikütinasyon ve proteozom bağımlı degradasyona neden olarak FoxO protein miktarının düşmesine neden olur (Şekil 2.29) (Matsuzaki ve ark., 2003; Hu ve ark., 2004; J. Y. Yang ve ark., 2008).



Şekil 2. 29. FoxO fosforillenmesini ve ubikütinasyonunu gösteren şema (Tsuchiya ve Ogawa, 2017).

## **FoxO'ların Asetilasyon ve Deasetilasyonu**

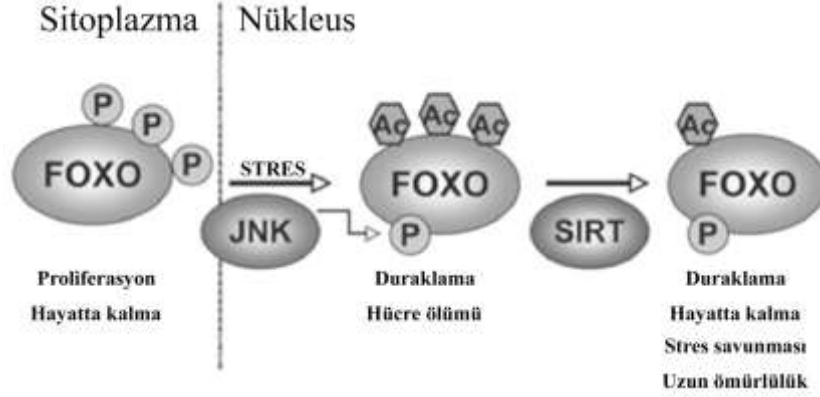
FoxO'ların lizin rezidülerindeki protein asetilasyonu histon asetiltransferazlar (HAT) ve histon deasetilazlar (HDAC) tarafından düzenlenir (Haigis ve Sinclair, 2010; Choudhary ve ark., 2014). FoxO'lar asetillendiğinde transkripsiyonel aktivitesi artabilir veya azalabilir ve böylece biyolojik işlevleri değişir (Tsuchiya ve Ogawa, 2017). FoxO'nun DNA'ya bağlanma aktivitesi asetilasyon ile azaltılabilir ve deasetilasyon ile artırılabilir (Tia ve ark., 2018).

FoxO1 asetilasyonu üç lizin rezidüsünde (Lys242, Lys245 ve Lys262) kalsiyum yanıt elemanı bağlama (CREB) bağlayıcı protein (CBP) ve p300 gibi HAT'lar ile gerçekleştirilir (**Şekil 2.28**) (Matsuzaki ve ark., 2005; van der Heide ve Smidt, 2005).

FoxO'ların asetilasyonu, DNA bağlama yeteneğini azaltarak transaktivasyon aktivitelerini azaltabilmektedir (van der Heide ve Smidt, 2005). Sirtuin 1 FoxO'ları deasetile edebilir ancak FoxO ve Sirtuin 1'in ilişkisi karmaşıktır ve Sirtuin 1'in FoxO fonksiyonu üzerindeki etkisi hedef genlere bağlı olarak değişmektedir (Giannakou ve Partridge, 2004). Sirtuin 1, FoxO'yu deasetile ederek bir çok hücre fonksiyonu düzenlemesine rağmen Sirtuin 1 tarafından FoxO deasetilasyonunun FoxO'nun transkripsiyonel aktivitesi üzerine etkileri ile ilgili çelişkili bulgular bulunmaktadır. Örneğin bazı araştırmalarda Sirtuin 1 tarafından FoxO deasetilasyonunun FoxO transkripsiyonel aktivitesini artırdığı bulunmuştur (Daitoku ve ark., 2004; van der Horst ve ark., 2004). Buna karşın diğer bazı araştırmalar ise Sirtuin 1'in FoxO'nun transkripsiyonel aktivitesini downregüle ettiğini göstermiştir (Motta ve ark., 2004; Y. Yang ve ark., 2005). Bu çelişkiler FoxO protein fonksiyonunun asetilasyon/deasetilasyon aracılığıyla düzenlenmesine ek olarak diğer bazı mekanizmaların da olabileceğini düşündürmektedir.

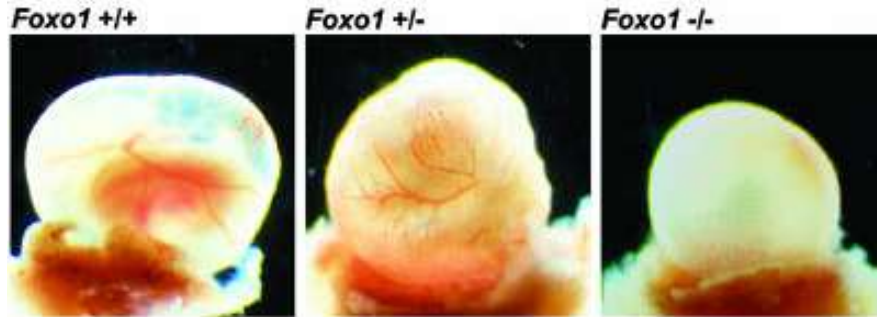
OS ve Sirtuin 1 aktivatörlerinin FoxO1'in deasetilasyonunu ve dolayısıyla nükleusta kalmasını tetikleyerek hücre siklusunun duraklaması, oksidatif stres direnci ve apoptozun baskılanması ile ilgili genlerin aktivasyonunu sağladığı düşünülmektedir (**Şekil 2.30**) (Brunet ve ark., 2004). Sirtuinler, FoxO-bağımlı yanıtları apoptoz yönünden hücre siklusu duraklaması ve stres direnci yönüne değiştirebilir (Furukawa-Hibi ve ark., 2002; Tran ve ark., 2002). Sirtuin 1'in FoxO1 ve FoxO4 aktivasyonu ile p27

ekspresyonunu indükleyerek hücre siklusu duraklamasını sağladığı ve MnSOD ve GADD45 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 45) düzeylerini artırarak oksidatif stres direncini indüklediği bildirilmiştir (Furukawa-Hibi ve ark., 2002; Brunet ve ark., 2004).



Şekil 2. 30. FoxO ve Sirtuin arasındaki ilişkiyi gösteren şema (Lam ve ark., 2006).

FoxO ailesi üyelerinin rollerinin anlaşılması için FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 genleri farelerde silinmiştir. Heterozigot *FoxO1*<sup>+/-</sup> fareler yaşamını sürdürebilirken, homozigot *FoxO1*<sup>-/-</sup> fareler embriyonik olarak letaldir. Bu durum embriyonik gelişim için FoxO fonksiyonunun önemini vurgulamaktadır. *FoxO1*<sup>-/-</sup> fare embriyoları daha küçüktür ve embriyonik 10.5'inci günde ölürlür. *FoxO1*<sup>-/-</sup> farelerin letalitesinin nedeni primer vaskülarizasyon defektidir (Şekil 2.31) (Hosaka ve ark., 2004). Ayrıca FoxO faktörleri doğumdan sonra da vaskülarizasyona katkıda bulunmaya devam ederler (Potente ve ark., 2005).

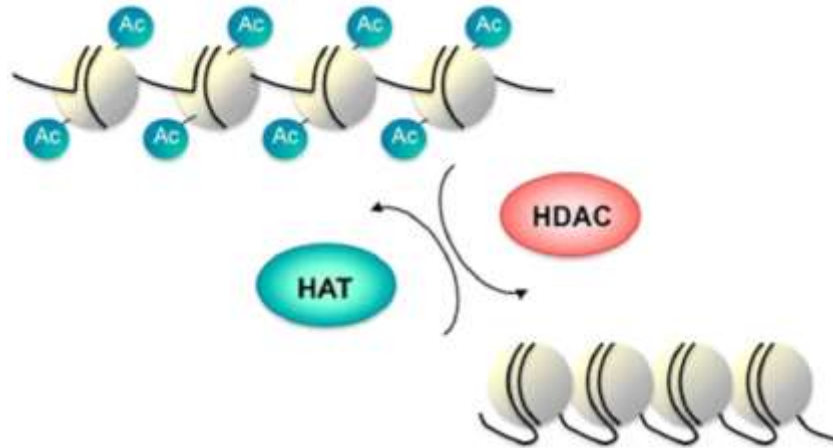


Şekil 2. 31. Embriyonik 9.5 günlük Foxo1<sup>+/+</sup>, Foxo1<sup>+/-</sup> ve Foxo1<sup>-/-</sup> farelere ait yolk keselerinin görüntüsü (Hosaka ve ark., 2004).

*Foxo3<sup>-/-</sup>* dişi fareler daha farklı bir fenotipe sahiptir, başlangıçta fertil iken, 15. haftadan itibaren infertil hale gelmektedirler. Bu ikincil infertilitenin oosit ölümüne ve folikül popülasyonunun tükenmesine neden olan ovaryan folikül aktivasyonuna (prematür ovaryan yetmezlik) bağlı olduğu görülmektedir (Castrillon ve ark., 2003). *FoxO4<sup>-/-</sup>* farelerde belirgin bir fenotip gözlenmemiştir. Ancak *FoxO4<sup>-/-</sup>* farelerde inflamatuvar uyarılara yanıt olarak kolon inflamasyonunun arttığı gözlenlenmiştir (L. Lin ve ark., 2004).

### 2.13. Histon Deasetilazlar

Protein asetilasyonu, DNA tanıma, protein-protein etkileşimi, katalitik aktivite ve protein stabilitesi gibi hücresel fonksiyonları düzenleyen post-translasyonel bir modifikasyondur (Kouzarides, 2000). Asetilasyon, histon asetiltransferazlar (HAT'ler) ve histon deasetilazlar (HDAC'ler) tarafından antagonistik bir mekanizma ile kontrol edilir (Şekil 2.32) (J. Zhang ve Zhong, 2014).



Şekil 2. 32. Histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC)'lar tarafından kromatin konformasyonu (Schneider ve ark., 2013).

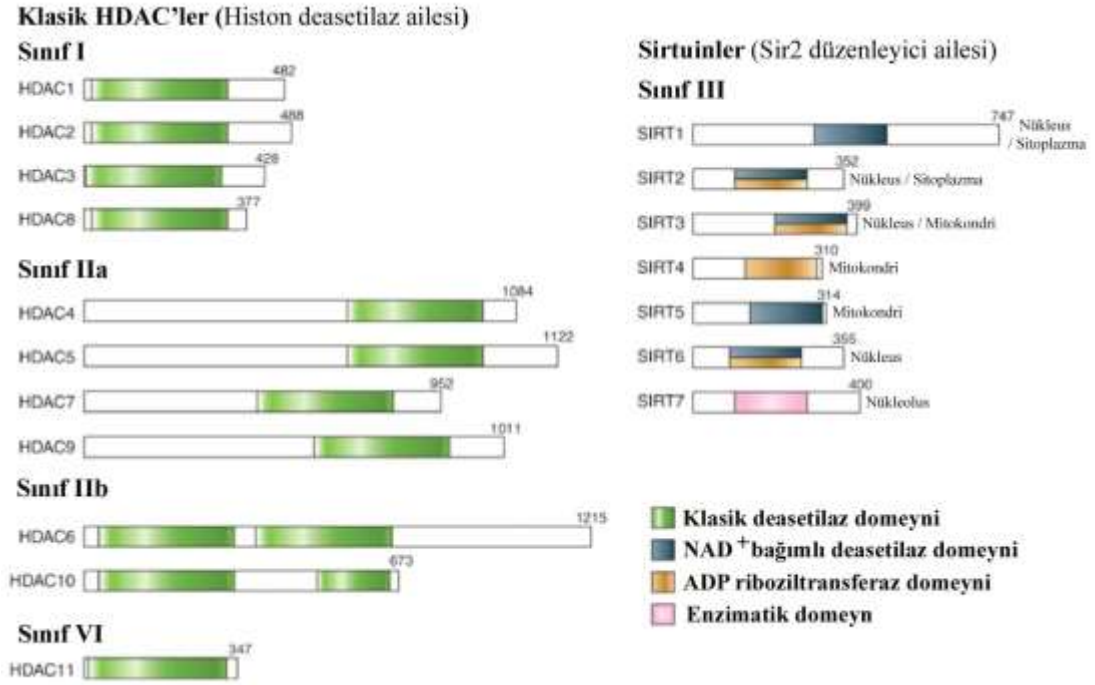
HDAC'ler asetil gruplarının histonlar üzerindeki lizin rezidülerinden uzaklaştırılmasını katalize ederler ve pozitif yükü geri yüklerler, bu da histon-histon ve histon-DNA etkileşimlerinin stabilizasyonu ile sonuçlanır. Sonuç olarak, kromatin yoğunlaşması meydana gelir ve DNA'daki spesifik bağlanma bölgelerine transkripsiyon faktörlerinin erişimi kısıtlanır yani histonların deasetilasyonu genelde transkripsiyonel baskılama ile ilişkilendirilir (Yoon ve Eom, 2016).



HAT'ler histon kuyruklarının N terminallerinin hiperasetilasyonunu indükler. HAT'ler ile histonların asetilasyonu DNA'nın açılmasına neden olarak sonrasında transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II'nin gen transkripsiyonunu başlatmasına izin verir (Takata ve Ishikawa, 2003; Barnes ve ark., 2005). Bu iki antagonistik eylem arasındaki denge, çok sayıda gelişimsel süreci yönetmektedir ve dengenin bozulması da birçok hastalığa neden olabilmektedir (J. Zhang ve Zhong, 2014).

İnsanlarda, HDAC'ler geleneksel olarak dizi benzerliklerine göre sınıflar olarak kategorilere ayrılmıştır (Şekil 2.33). Bunlar sınıf I proteinleri (HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8), sınıf II proteinleri (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 ve HDAC10), sınıf III proteinleri (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 ve SIRT7) ve sınıf IV proteinidir (HDAC11) (Seto ve Yoshida, 2014).

Sınıf I, II ve IV HDAC'ler enzim aktiviteleri için kofaktör olarak çinko kullanır. Sınıf III HDAC'ler, kofaktörü olarak nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) gereksinim duyar ve sınıf I, II ve IV HDAC inhibitörlerine karşı duyarsızdırlar (S. Imai ve ark., 2000b)



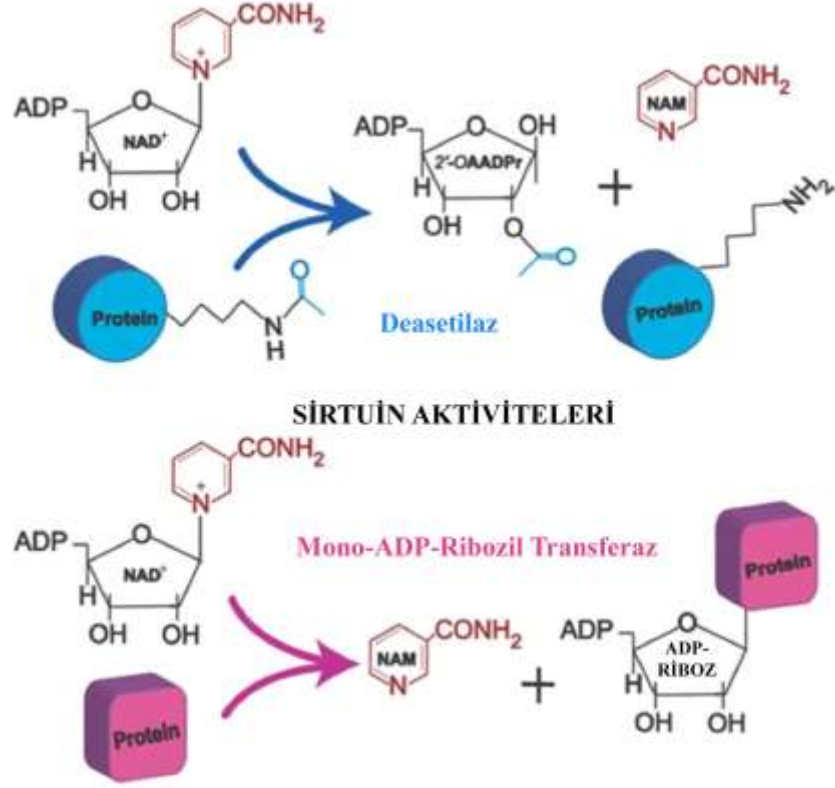
Şekil 2. 33. İnsan HDAC'lerinin domain organizasyonunun şematize hali (Seto ve Yoshida, 2014).



### 2.13.1. Sirtuinler

Sirtuinler,  $\text{NAD}^+$  bağımlı sınıf III histon deasetilaz ailesidir. Sirtuin gen ailesinin kurucu üyesi olan *SIR2* (silent information regulator 2) asıl olarak mayada hücrenin ömür uzunluğu ile ilgili bir gen olarak bulunmuştur (Ivy ve ark., 1986; S. Kim ve ark., 1999). Yüksek oranda korunmuş olan *SIR2* geni homologu olan sirtuin ailesi genleri daha sonra bakteriler, solucanlar, sinekler, bitkiler ve memelilerde de gözlenmiştir (Michan ve Sinclair, 2007). 1999 yılında Roy Frye insanda *SIR2* homologlarını sirtuin adıyla tanımlamıştır ve SIRT2'nin ADP-ribosil transferaz olarak davranabileceğini gözlemlemiştir (Roy A Frye, 1999). 2000 yılında SIRT2'nin histon deasetilaz aktivitesi olduğu; besin ve strese cevap olarak seviyesinin değişebildiği ve redoks reaksiyonları için kofaktör olarak  $\text{NAD}^{++}$ 'a gereksinim duyduğu bildirilmiştir (S.-I. Imai ve ark., 2000a; Landry ve ark., 2000).

Tüm sirtuinler, hücrel proteinlerden asetil gruplarını ayırmaktadır ve bu translasyon sonrası kimyasal modifikasyon, protein lokalizasyonunu ve fonksiyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. Sirtuinler, deasetilasyon için hedef olarak asetile substrattan asetil grubunu  $\text{NAD}$ 'nin ADP-riboz kısmına aktarır ve sonuç olarak 2'-O-asetil-ADP-riboz, nikotinamid (NAM) ve deasetillenmiş substrat oluşur (Verdin, 2014) (**Şekil 2.34**).  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  oranındaki değişim sirtuinlerin aktivitesini kontrol ettiğinden, bu ailenin tüm üyeleri hücrenin enerji durumunu algılamada çok önemli bir role sahiptir (H. Yang ve ark., 2007; Houtkooper ve ark., 2010).



**Şekil 2. 34.** Sirtuinlerin enzimatik aktivitesinin şematize hali (Michan ve Sinclair, 2007).

Memelilerde hücre içi lokalizasyon, doku dağılımı ve protein substratları farklılık gösteren 7 adet Sirtuin (SIRT1-7) bulunur (**Şekil 2.34**) (**Tablo 2.1**) (Michishita ve ark., 2005). Bu yedi izoform, 275 amino asitten oluşan aynı evrensel katalitik çekirdek bölgesini paylaşır ve farklı hücre içi lokalizasyon gösterir (Wakino ve ark., 2015). Sirtuinlerin lokalizasyonu hücrede sitoplazma, nükleus ve/veya mitokondride olabilir (Kucińska ve ark., 2010). SIRT1, SIRT2, SIRT6 ve SIRT7 nükleusta, SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 mitokondride lokalizeyken SIRT1 ve SIRT2 hem nükleus hem de sitoplazmada lokalizedir (**Tablo 2.1**) (Blander ve Guarente, 2004).

Memeli sirtuin ailesinde en güçlü deasetilaz aktivitesini SIRT1, en zayıf deasetilaz aktivitesini ise SIRT5 gösterir (North ve ark., 2003). SIRT4 ve SIRT6, mono-ADP-ribozil tranferazlardır (Liszt ve ark., 2005; Haigis ve ark., 2006). SIRT2 ve SIRT3 için hem deasetilaz hem de mono-ADP-ribozil tranferaz aktiviteleri tespit edilmiştir (Roy A Frye, 1999; North ve ark., 2003).

**Tablo 2. 1.** Sirtuinlerin hücrede yerleşimi, bulunduğu dokular ve enzimatik aktiviteleri (Favero ve ark., 2015; Poulouse ve Raju, 2015).

	Hücresel yerleşim	Doku ekspresyonu	Enzim aktivitesi
<b>SIRT1</b>	Nükleus ve sitoplazma	Yağ dokusu, kalp, böbrek, retina, karaciğer, iskelet kasları, damarlar	Deasetilaz
<b>SIRT2</b>	Sitoplazma (nükleus)	Yağ dokusu, beyin, kalp, karaciğer, iskelet kasları, damarlar	Deasetilaz
<b>SIRT3</b>	Nükleus ve mitokondrial matriks	Yağ dokusu, beyin, kalp, böbrek, karaciğer oosit, iskelet kasları, damarlar	Deasetilaz
<b>SIRT4</b>	Mitokondri	Beyin, kalp, böbrek, karaciğer, damarlar	ADP-ribozil transferaz,
<b>SIRT5</b>	Mitokondri ve sitoplazma	Kalp, karaciğer, damarlar, timus, beyin, böbrek	Deasetilaz, demalonilaz, desüksinilaz, deasilaz,
<b>SIRT6</b>	Nükleus ve endoplazmik retikulum	Beyin, kalp, karaciğer, retina, iskelet kasları, timus, damarlar, böbrek, testis	Deasetilaz, ADP-ribozil transferaz
<b>SIRT7</b>	Nükleus ve nükleolus	Kalp, damarlar, karaciğer, beyin, iskelet kası	Deasetilaz

Sirtuinler amino asit sekanslarına göre sınıf I (SIRT1-3), sınıf II (SIRT4), sınıf III (SIRT5) ve sınıf IV (SIRT6 ve 7) olarak sınıflandırılırlar (R. A. Frye, 2000).

Sirtuinler, apoptoz, lipit metabolizması, stres cevabı ve inflamasyon gibi çeşitli hücresel süreçlerde önemli rol oynarlar (Brunet ve ark., 2004; Motta ve ark., 2004; Purushotham ve ark., 2009; T. F. Liu ve McCall, 2013).

### 2.13.2. Sirtuin 1

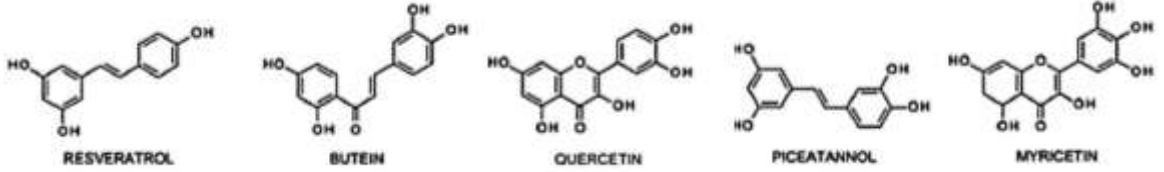
Sirtuin 1, histon ve histon olmayan hedeflerini deasetile edebilen sınıf III histon deasetilazdır (HDAC). Sirtuin 1; apoptoz, gen regülasyonu, genomun sürdürülmesi, DNA onarımı, yaşlanma, kanser ve gelişim gibi süreçlerde rol alır (Rifai ve ark., 2018).

Sirtuin 1'in subselüler lokalizasyonu, hücre tipine, stres durumuna ve moleküler etkileşimlere bağlıdır. Sirtuin 1 hem nükleus hem de sitoplazmada gözlenmiştir (Cohen ve ark., 2004; Michishita ve ark., 2005; Tanno ve ark., 2007). Histonlardaki ve hedef proteinlerdeki asetil grubunun Sirtuin 1 ile uzaklaştırılması hedef gen ekspresyonu ve

protein aktivitelerini düzenler (Cheng ve ark., 2003; McBurney ve ark., 2003; Sequeira ve ark., 2008; Jinping Zhang ve ark., 2009).

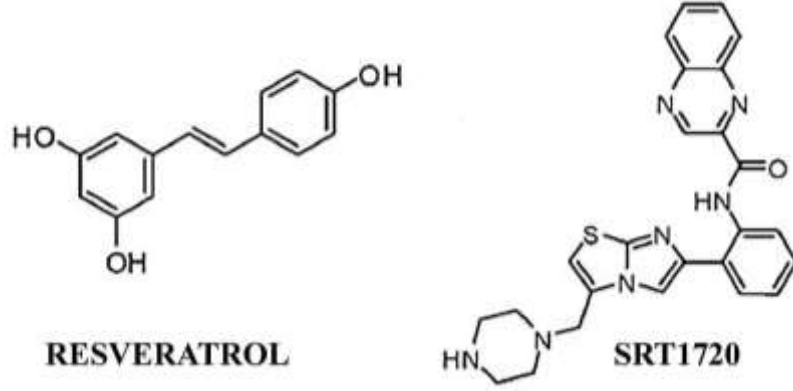
### 2.13.3. Sirtuin 1 Aktivatörleri

Kalori kısıtlamasının memelilerin yaşam süresini uzatmak için etkili olduğu bilinmektedir. Kalori kısıtlamasının sirtuin genleri silinince yaşam süresini uzatmadığı gözlemlenmiştir. Sirtuinlerin uzun ömürlülük üzerindeki etkilerine dayanarak, SIRT1'i aktive eden ilaçların keşfi önem kazanmıştır (S. J. Lin ve ark., 2000; Rogina ve Helfand, 2004). Tanımlanan ilk SIRT1 aktivatörleri resveratrol, bütein, kuersetin, piceatannol gibi bitki türevli polifenollerdir (Şekil 2.35).



Şekil 2. 35. Sirtuin 1'i aktive eden bitki türevli polifenoller (Stunkel ve Campbell, 2011).

Resveratrol, inflamasyon, oksidatif stres, apoptoz, mitokondriyal disfonksiyon ve anjiyogenez gibi çeşitli yollara karşı etkili bir role sahiptir (Şekil 2.36). Şarapta düşük dozlarda bulunan resveratrolün Sirtuin 1 aktivasyonu ile maya ömrünü uzattığı gösterilmiştir. (Pieszka ve ark., 2016). Milne ve arkadaşları Sirtuin 1 aktivatörü olan ve yapısal olarak resveratrole benzemeyen SRT1720'yi tanımlamışlardır (Şekil 2.36). SRT1720'nin resveratrol ile aynı bölgeye bağlandığı ve Sirtuin 1'i aktive ettiği tespit edilmiştir. SRT1720, resveratrole kıyasla daha yüksek etkinlik göstermektedir. SRT1720'nin Sirtuin 1'i resveratrol'den 1000 kat daha fazla aktive ettiği rapor edilmiştir (Milne ve ark., 2007). SRT1720 uygulamasının yüksek yağla beslenen ve yaşlı farelerdeki metabolik defektleri iyileştirdiği gösterilmiştir (Feige ve ark., 2008; Minor ve ark., 2011).



Şekil 2. 36. Sirtuin 1'in aktivatörlerinden resveratrol ve SRT1720'nin yapıları (Baur, 2010).

#### 2.13.4. Sirtuinlerin Dişi Üreme Sistemindeki Rollerine İlişkili Bazı Çalışmalar

*Sir2a*<sup>-/-</sup> fareler, doğumdan sonra normalden daha küçüktür ve çoğu postnatal dönemde ölmüştür. Hem dişi hem de erkek *Sir2a*<sup>-/-</sup> farelerin steril olduğu gözlemlenmiştir. *Sir2a*<sup>-/-</sup> dişi farelerde ovaryumlar küçük, endometriyum incedir, bu farelerde tüm foliküller olmasına rağmen korpus luteumun olmadığı, ovulasyonun olmadığı ve diöstrus fazının kalıcı olduğu gözlemlenmiştir (McBurney ve ark., 2003).

Coussens ve arkadaşları (2008) *Sirt1*<sup>-/-</sup> germ hücrelerini değerlendirmişlerdir. İn vitro fertilizasyon için *Sirt1*<sup>-/-</sup> ve *Sirt1*<sup>+/-</sup> farelerin gametlerini kullanarak embriyolar üretmiş ve canlı yavru sayısını karşılaştırmışlardır. IVF *Sirt1*<sup>-/-</sup> sperm ve/veya oosit ile yapıldığında 2 hücreli zigot ve canlı yavru sayısının azaldığı gözlemlenmiştir (Coussens ve ark., 2008).

Sirtuinlerin ekspresyonu, memeli ovaryumlarında, granüloza hücrelerinde, oositlerde ve embriyolarda gözlenmiştir (Tatone ve ark., 2015). Kwak ve arkadaşları (2012) domuz embriyoları ile yaptıkları çalışmalarında sirtuinin embriyonik gelişimde rol aldığını göstermişlerdir (Kwak ve ark., 2012). *Sirt1*, 2 ve 3 mRNA'larının metafaz oositten blastosiste kadar azalan bir ekspresyon paterni gösterdiğini ve sirtuin inhibitörleri olan NAM (nikotinamid) ve sirtinol uyguladıklarında blastosist gelişiminin azaldığını bulmuşlardır.

Liu ve arkadaşları (2013) farelerde yaşlanmaya bağlı doğurganlığın azalmasına karşı resveratrolün koruyucu etkisini göstermişlerdir (M. Liu ve ark., 2013). Resveratrol

muamelesi, sağlıklı folikül sayısını, telomer uzunluğu ve aktivitesini, oosit miktarı ve kalitesini artırmıştır ve ovaryum yaşlanmasını önlemiştir.

Pacella-Ince ve arkadaşları (2014) düşük ovaryum rezervine sahip ve ileri yaş kadınlardan aldıkları granüloza ve kumulus hücrelerinde Sirtuin 3 ve Sirtuin 5 miktarlarının sağlıklı kadınlara oranla azaldığını göstermişlerdir (Pacella-Ince, Zander-Fox, & Lan, 2014; Pacella-Ince, Zander-Fox, & Lane, 2014).

Fu ve arkadaşları (2014) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidatif stres oluşturdukları insan granüloza hücre kültürlerinde Sirtuin 3 mRNA düzeylerinin upregüle olduğunu göstermişlerdir (Fu ve ark., 2014). İnsan granüloza hücrelerinde Sirtuin 3'ü siRNA ile knockdown ettiklerinde ROT oluşumunun arttığını ve progesteron salınımının azaldığını göstermişlerdir. Araştırmacılar Sirtuin 3, granüloza hücrelerinde ROT oluşumunu düzenleyerek folikülogenez ve luteinizasyonda pozitif bir rol oynuyor olabilir yorumunu yapmışlardır.

Zhou ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada yüksek yağ diyetiyle indüklenen obezitenin folikül gelişimini hızlandırarak folikül kaybına neden olduğunu ancak bu farelere Sirtuin 1 aktivatörü olan SRT1720 uyguladıklarında folikül havuzu rezervinin korunduğunu göstermişlerdir (Zhou ve ark., 2014).

Poidatz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2015) hem IUGR hem PE görülen plasentalardaki Sirtuin 1 mRNA ekspresyon düzeyinin kontrole oranla daha düşük olduğunu göstermişlerdir (Poidatz ve ark., 2015).

Lappas ve arkadaşları (2011) Sirtuin 1 ve Sirtuin 6 ekspresyonlarının doğumdan sonra doğum öncesine göre plasenta, amniyon ve koryonda önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir (Lappas ve ark., 2011). Sirtuin 1 ve 6'nın downregüle olmasının insanda doğum olayının başlaması ile ilişkili olabileceği yorumunda bulunmuşlardır.

Sirtuin 1'in insan endometriyumdaki ekspresyonu Asaka ve arkadaşları (2015) tarafından gösterilmiştir (Asaka ve ark., 2015). İmmünohistokimya yöntemini kullanarak Sirtuin 1'in sitoplazmik olarak bez epiteli hücrelerinde lokalize olduğunu; proliferatif ve postmenapozal fazlara kıyasla sekretuar fazda Sirtuin 1 ekspresyonunun daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması Akdeniz Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 15/02/2017 tarihli B.30.2.AKD.0.05.07.00/23 sayılı etik kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi.

Bu araştırmada Akdeniz Üniversitesi “Deneysel Hayvanları Ünitesi” tarafından temin edilen daha önce hiç deneye girmemiş, çiftleşmemiş ve standart laboratuvar koşullarında beslenen Balb/C ırkı yetişkin 49 adet dişi fare (6-8 haftalık); 20 adet BALB/C ırkı yetişkin erkek fare (12-16 haftalık) kullanıldı.

#### 3.1. Deneysel Gruplarının Oluşturulması Sırasında Kullanılan Solüsyonların

##### Hazırlanması

##### Chicago mavisi hazırlanması

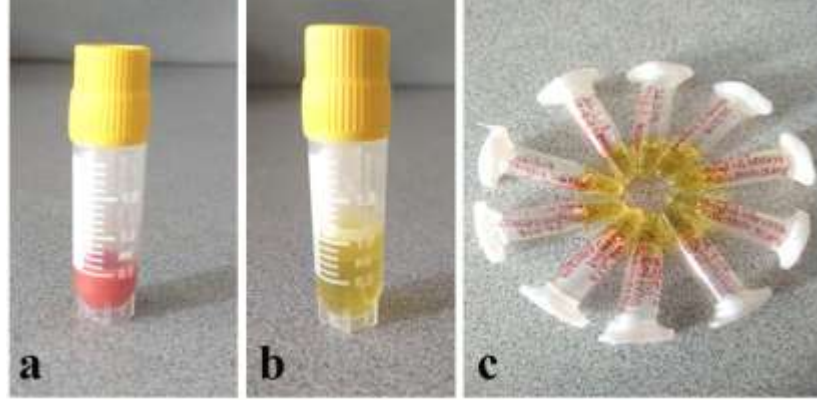
Chicago blue boyası (#C8679 - Sigma) %1’lik hazırlandı. Bunun için 1 gr Chicago blue 100 ml %0.9 NaCl içinde çözüldü .

##### Parakuat hazırlanması

Parakuat diklorit (#36541-Sigma) %0.9 NaCl içinde çözüldü. 90 mg NaCl, 10 ml steril su içerisinde çözülerek %0.9’luk NaCl hazırlandı. Sonra 6 mg parakuat 1 ml % 0.9 NaCl içinde çözüldü ve alikuatlanarak -20°C’ye kaldırıldı. Enjekte edileceğinde oda ısısında erimesi için bekletildikten sonra kullanıldı.

##### SRT1720 hazırlanması

10 mg SRT1720 (A10862- Generon) üzerine 50 µl DMSO eklendi. SRT1720’nin çözünmesi için iyice vortekslendi ve 45°C’lik su banyosunda 45 dakika bekletildi (**Şekil 3.1a**). SRT1720 çözüldükten sonra üzerine 300 µl PEG400 (Polietilen Glikol 400) (#8074850050, Merck) ve 20 µl Tween-80 (#P4780, Sigma) eklendi ve vortekslendi. 630 µl steril su ilave edilerek toplam hacim 1 ml’ye tamamlandı (**Şekil 3.1b**) ve alikuatlanarak -20°C’ye kaldırıldı (**Şekil 3.1c**). Enjekte edileceği zaman -20°C’den alınarak 36°C su banyosunda 5 dakika bekletilip vortekslendikten sonra enjeksiyon için kullanıldı.



Şekil 3. 1. Sirtuin 1 aktivatörü SRT1720'nin hazırlanma aşamalarına ait fotoğraflar görülmektedir.

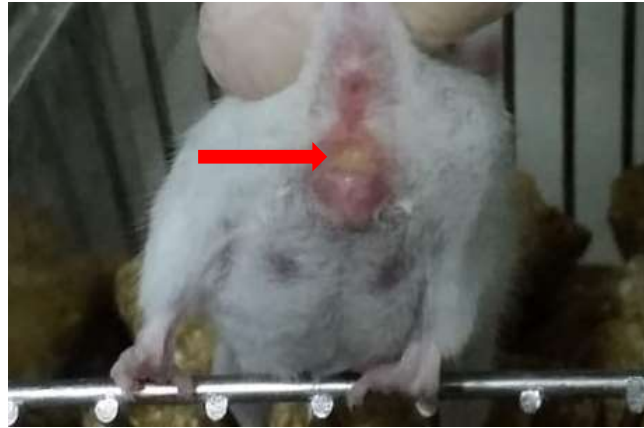
### 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney grupları aşağıdaki gibiydi:

- 1- **Kontrol grubu (n=10)**
- 2- **Vehicle grubu (n=10)**
- 3- **Parakuat grubu (n=10)**
- 4- **SRT1720 grubu (n=10)**
- 5- **SRT1720 + parakuat grubu (n=9)**

#### Kontrol Grubunun Oluşturulması

Kontrol grubunu oluşturmak için (n=10) fare kullanıldı. Bunun için, kendine ait kafeste yaşayan erkek farenin yanına akşam üzeri 2 ya da 3 adet dişi fare konuldu, ertesi sabah dişi farelere vajinal plak kontrolü yapıldı. Vajinal plak görülen dişiler gebeliğin 1. gününde kabul edildi ve ayrı kafeslere alındı (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. Dişi fareye ait vajinal plak ok ile gösterilmektedir.



Blastosistin uterusu yaklaştığı bölgede endometriyal vasküler geçirgenlikteki artış nedeniyle Chicago mavisi gibi makromoleküler boyaların hayvanın sakrifiye edilmesinden 3-5 dakika önce intravenöz olarak enjekte edilmesiyle implantasyon bölgeleri rahatlıkla görülmektedir. Gebeliğin 5. günü sabahı (9<sup>00</sup>) farelere kuyruk veninden Chicago mavisi enjeksiyonu yapıldıktan 3 dakika sonra fareler sakrifiye edilerek implantasyon bölgeleri ve implantasyon bölgeleri arasında kalan inter-implantasyon bölgeleri alındı.

İmplantasyon ve inter-implantasyon bölgelerinin bir kısmı %10'luk formalin içerisine alınıp rutin takibi yapıldıktan sonra parafine gömüldü, bir kısmı -80°C'ye kaldırıldı ve kalan kısmı sıvı azot tankına yerleştirildi.

#### **Vehicle Grubunun Oluşturulması**

Vehicle grubunu oluşturmak için (n=10) fare kullanıldı. Vajinal plağın görüldüğü gebeliğin 1. gününde SRT1720'nin içerisinde çözüldüğü %5 DMSO, %30 PEG400 ve %2 Tween-80 karışımı farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi. Bu işleme gebeliğin 2, 3 ve 4. günlerinde de devam edildi. Gebeliğin 4. gününde %0.9'luk NaCl (parakuatın içinde çözüldüğü) enjeksiyonu yapıldı. Bu gruptaki farelere gebeliğin 5. günü sabahı (9<sup>00</sup>) kuyruk veninden Chicago mavisi enjeksiyonu yapıldıktan 3 dakika sonra fareler sakrifiye edilerek implantasyon bölgeleri ve implantasyon bölgeleri arasında kalan inter-implantasyon bölgeleri alındı.

İmplantasyon ve inter-implantasyon bölgelerinin bir kısmı %10'luk formalin içerisine alınıp rutin takibi yapıldıktan sonra parafine gömüldü, bir kısmı -80°C'ye kaldırıldı ve kalan kısmı sıvı azot tankına yerleştirildi.

#### **Parakuat Grubunun Oluşturulması**

Parakuat grubunu oluşturmak için (n=10) fare kullanıldı. Vajinal plağın görüldüğü gebeliğin 1. gününden gebeliğin 4. gününe kadar farelere herhangi bir müdahalede bulunulmadı. Gebeliğin 4. günü sabahı 30 mg/kg parakuat tek doz intraperitoneal olarak enjekte edildi. Ertesi sabah yani gebeliğin 5. günü sabahı (9<sup>00</sup>) farelere kuyruk veninden Chicago mavisi enjeksiyonundan 3 dakika sonra fareler sakrifiye edildi. Farede dölleme olmaması nedeniyle implantasyonun gerçekleşmemesi olasılığını ortadan

kaldırmak için uterus boynuzlarından biri fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Blastosist gözlenen fareler deneye dahil edilerek PBS ile yıkanmayan boynuzun tamamı alındı.

Boynuzun bir kısmı %10'luk formalin içerisine alınıp rutin takibi yapıldıktan sonra parafine gömüldü, bir kısmı -80°C'ye kaldırıldı ve kalan kısmı sıvı azot tankına konuldu. Blastosist gözlenmeyen fareler deneye dahil edilmedi.

### **SRT1720 Grubunun Oluşturulması**

SRT1720 grubu için (n=10) fare kullanıldı. Vajinal plağın görüldüğü gebeliğin 1. gününden itibaren farelere 50 mg/kg SRT1720 intraperitoneal olarak enjekte edildi. Bu işleme gebeliğin 2, 3 ve 4. günlerinde de devam edildi. SRT1720 grubundaki farelere gebeliğin 5. günü sabahı (9<sup>00</sup>) kuyruk veninden Chicago mavisi enjeksiyonu yapıldıktan 3 dakika sonra fareler sakrifiye edilerek implantasyon bölgeleri ve implantasyon bölgeleri arasında kalan inter-implantasyon bölgeleri alındı.

İmplantasyon ve inter-implantasyon bölgelerinin bir kısmı %10'luk formalin içerisine alınıp rutin doku takibi yapıldıktan sonra parafine gömüldü, bir kısmı -80°C'ye kaldırıldı ve kalan kısmı sıvı azot tankına yerleştirildi.

### **SRT1720 + Parakuat Grubunun Oluşturulması**

SRT1720 + parakuat grubu için (n=9) fare kullanıldı. Vajinal plağın görüldüğü gebeliğin 1. gününden itibaren farelere 50 mg/kg SRT1720 intraperitoneal olarak enjekte edildi. Bu işleme gebeliğin 2, 3 ve 4. günlerinde de devam edildi. Gebeliğin 4. günü sabahı SRT1720'nin enjeksiyonundan 30 dakika sonra farelere 30 mg/kg parakuat tek doz intraperitoneal olarak enjekte edildi. Farelere gebeliğin 5. günü sabahı (9<sup>00</sup>) kuyruk veninden Chicago mavisi enjeksiyonu yapıldıktan 3 dakika sonra fareler sakrifiye edildi.

İmplantasyon gerçekleşmeyen dişilerde döllenme olmaması nedeniyle implantasyonun gerçekleşmemesi olasılığını ortadan kaldırmak için uterus boynuzlarından biri fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ile yıkanarak blastosist varlığı gözlenmiştir. Blastosist görülmeyen dişi fareler deneye dahil edilmemiştir.

İmplantasyon ve inter-implantasyon bölgelerinin bir kısmı %10'luk formalin içerisinde alınıp rutin doku takibi yapıldıktan sonra parafine gömüldü, bir kısmı ise -80°C'ye kaldırıldı ve kalan kısmı sıvı azot tankına yerleştirildi.

### **3.3. Doku Takibi ve Parafine Gömme**

Doku takibi için her gruptaki farelerden elde edilen ve %10'luk formaline alınan implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslar 24 saat boyunca fikse edildi. Ardından fiksatif uzaklaştırmak için 3 saat boyunca çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra dokudan suyu uzaklaştırmak için sırasıyla %70, 80 ve 90'luk etanol serilerinde 24 saat boyunca tutuldu. %100'lük etanolde 3 saat tutuldu. Ksilol içerisinde yaklaşık 5 dakika bekletilip dokudaki alkol uzaklaştırılarak şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Şeffaflaştırma sonrası dokular parafine gömüldü ve bloklar hazırlandı.

### **3.4. İmmünohistokimya**

#### **Kullanılan Solüsyonlar/Kimyasallar**

##### **❖ 1X PBS (Phosphate Buffer Saline-Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu)**

2 litre distile su içerisinde aşağıdaki kimyasallar çözüldü.

- ✓ 2,85 gr Disodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )(#567547; Merck)
- ✓ 0,8 gr Potasyum hidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )(# M1048771000; Merck)
- ✓ 16 gr Sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ )(#1.06400.1000; Merck)

pH=7,2-7,4 olacak şekilde ayarlandı.

##### **❖ Sitrik Asit Tamponu**

900 ml distile su içerisinde 2,1 gr sitrik asit ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (#1.0044.1000; Merck) çözüldü ve 2M NaOH ile pH=6,0 olacak şekilde ayarlandı.

##### **❖ %3'lük $\text{H}_2\text{O}_2$ Solüsyonu**

Şale içerisinde 63 ml metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (#1.06009.2500; Merck) ve 7 ml %30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  (#18312; Sigma Aldrich) karıştırılarak hazırlandı.

##### **❖ Bloklama Solüsyonu**

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

❖ **Primer Antikor**

Sirtuin 1 (tavşan poliklonal) (#15404, Santa Cruz Biotechnology, 1:50)

FoxO1 (tavşan monoklonal) (#2880, Cell Signaling, 1:250)

❖ **Sekonder Antikor**

Biyotin işaretli anti-tavşan IgG (keçide üretilmiş) (#BA-1000; Vector Laboratories)

❖ **İzotip Kontrol**

Tavşan serumu (#S-5000; Vector)

❖ **Streptavidin Peroksidaz Kompleksi**

Streptavidin Peroxidase (# TS-125-HR; Thermo Scientific /Lab Vision)

❖ **Kromojen**

3,3'-Diaminobenzidine (#D4168; Sigma Aldrich)

❖ **Mayer Hematoksilen**

#1.09249.0500; Merck

❖ **Entellan**

#1.07961.0100; Merck

Tüm gruplara ait parafin bloklardan mikrotom ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak su banyosunda düzleşmeleri sağlandıktan sonra süperfrost lamalar üzerine aktarıldı. Kesitler oda ısısında kurutuldu. İmmünohistokimya uygulamadan bir gece önce kesitler 56°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün kesitler deparafinizasyon için 10'ar dakika iki farklı ksilol serisinden geçirildi. Dehidratasyon için 5'er dakika %100, %90, %80, %70 şeklinde azalan alkol serilerinden geçirildi ve sonra 5 dakika distile suda bekletildi. Kesitlerdeki antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla 0.01 M sitrat tamponuna (pH: 6,0) konularak mikrodalga fırında 3 kez 5 dakika 750W'ta kaynatıldı ve 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğuyan kesitler yıkama solüsyonunda (PBS) 3 kere 5 dakika yıkandı. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dakika bekletildi. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Yıkama aşamasındayken dokuların etrafı hidrofobik kalemle (#IM 3580;

Beckman Coulter) çizildi. Spesifik olmayan immünoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla dokular oda ısısında ve nemli ortamda bloklama serumu ile 7 dakika muamele edildi. Serumun fazlası uzaklaştırılarak dokulara Sirtuin 1 (1:50) ve FoxO1 (1:250) primer antikörleri uygulandı ve gece boyu +4°C’de nemli ortamda inkübe edildi. İzotip kontrol kesitlerine primer antikör yerine IgG konsantrasyonu primer antikör ile aynı olacak şekilde hazırlanan tavşan serumu uygulandı. Ertesi gün kesitlerden primer antikör uzaklaştırıldı ve PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkandı. Sonra biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikör uygulanarak oda ısısında nemli ortamda 45 dakika bekletildi. PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkandı ve oda ısısında nemli ortamda HRP-konjuge streptavidin kompleksi ile 20 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkandı. Sinyalleri geliştirmek için kesitler 3,3’-Di Amino Benzidin (DAB) kromojeni ile inkübe edilerek reaksiyon bölgelerinin kahverengi olması beklendi ve kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Kesitlere Mayer’s hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Rehidratasyon için artan alkol serilerinden geçirilerek %100 alkolde 3 dakika bekletildi ve 10’ar dakika 2 kez ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile kapatıldı.

## **Işık Mikroskopik Gözlemler**

### **Histolojik Skorlama (H-Score)**

Sirtuin 1 ve FoxO1 immünohistokimyası yapılan kesitler Nikon Eclipse E200 ışık mikroskopunda incelendi ve H-Score analizi ile değerlendirildi. Bunun için iki kişi tarafından implantasyon bölgesi, inter-implantasyon bölgesi ve uterusların lümen epiteli, bez epiteli ve stroma hücrelerindeki immünoaktiviteler ışık mikroskobu altında 200X büyütmede incelendi. Boyanma yoğunlukları 0 (boyanma yok), 1+ (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma), 2+ (orta şiddetli boyanma) veya 3+ (yoğun boyanma) şeklinde değerlendirildi. Daha sonra bu değerler aşağıdaki formülde kullanılarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir (Hirsch ve ark., 2003; Ishibashi, 2003; John ve ark., 2009).

H-Score=3Xyoğun boyanan hücre yüzdesi + 2Xorta şiddette boyanan hücre yüzdesi + 1Xzayıf şiddette boyanan hücre yüzdesi + 0Xboyanmayan hücre yüzdesi

### 3.5. Western Blot

#### Doku Homojenatlarının Elde Edilmesi İçin Kullanılan Solüsyonlar

##### ❖ 100X Na-Ortovanadat

0,184 gr Na-ortovanadat 10 ml Tris (pH: 10) içinde çözülür

##### • Liziz Tamponu

- ✓ 10 ml 0,1 M Tris (pH: 7,4) (#161-0719, Bio-Rad)

0,6 gr Tris 40 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülür, HCl yardımıyla pH:7,4'e ayarlanır ve son hacim 50 ml'ye tamamlanır.

- ✓ 90 ml dH<sub>2</sub>O
- ✓ 1 ml 100X Na-Ortovanadat
- ✓ 1 gr SDS

##### • Protein İnhibitör Kokteyli

1 adet (#11697498001;cOmplete) proteaz inhibitör kokteyl (PİK) tableti 2 ml steril suda çözülerek 25X'lik PİK hazırlandı. Steril su ile 1X'e dilüye edilip kullanıldı.

#### 3.5.1. Doku Homojenatlarının Elde Edilmesi

Sıvı nitrojende tutulan doku örnekleri cam levha üzerine kondu. Bisturi yardımı ile dokular mekanik olarak iyice parçalandı. Örneklerin üzerine 0.2 gr doku için 600 µl liziz tamponu ve 10 µl proteaz inhibitör kokteyli (PİK) olacak şekilde solüsyonlar eklendi. Bir saat boyunca +4°C'de inkübe edildikten sonra sonikatör yardımı ile homojenize edildi. Tüm örnekler +4°C'de 15000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısımları yeni endorflara alındı. Bu homojenatlar içerdikleri protein konsantrasyonunu belirlemek üzere -80°C'ye kaldırıldı.

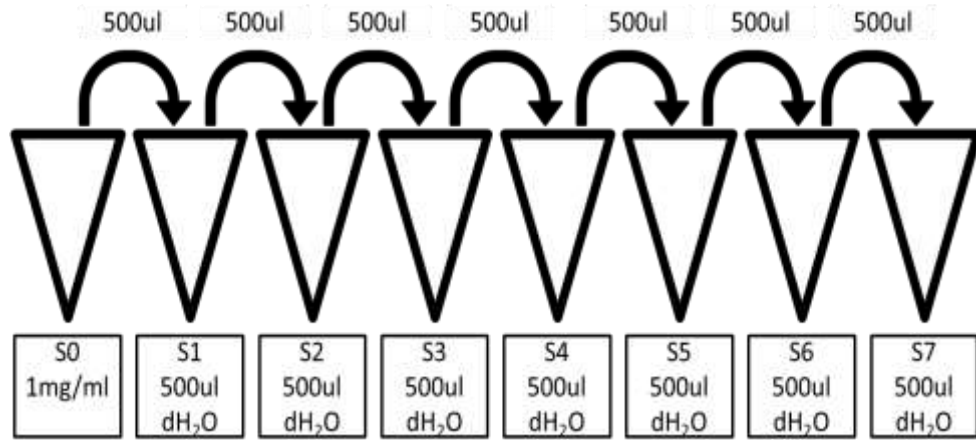
#### Doku Homojenatlarındaki Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi

##### Kullanılan Solüsyonlar, Kimyasallar ve Cihazlar

- ❖ Bovine Serum Albümin (BSA) (#A-420-100, GoldBio)
- ❖ Bicinchoninic Acid Kit (BCA):
  - Bicinchoninic asit solüsyonu (#B9643, Sigma Aldrich)

- Bakır (II) sülfat solüsyonu (#C2284, Sigma Aldrich)
- ❖ İnkübatör: Nüve EN 500
- ❖ Spektrofotometre: µQuant BioTek Spectrophotometer

BCA yöntemi için standart protein olarak BSA kullanıldı. Öncelikle 1 mg/ml BSA (S0) hazırlandı, daha sonra bu BSA'nın dilüye edilmesiyle S1 (500 µg/ml protein), S2 (250 µg/ml), S3 (125 µg/ml), S4 (62,5 µg/ml), S5 (31,3 µg/ml), S6 (15,6 µg/ml), S7 (7,8 µg/ml) standart protein aralığı hazırlandı (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. BCA yöntemi için standartların hazırlanmasını gösteren çizim.

Lizatlar, 1:50 oranında liziz tamponu (600 µl) ve PİK (10 µl) karışımı ile dilüye edildi ve vortekslendi. Blank olarak liziz tamponu-PİK karışımı kullanıldı. BCA kit içeriğindeki Bicinchoninic asit solüsyonundan 1 ml ve bakır (II) sülfat solüsyonundan 20 µl karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Ependorflara 25 µl olacak şekilde standart, blank ve örnekler eklendi. Üzerlerine 400 µl olacak şekilde çalışma solüsyonu eklendi. 96 kuyucuklu plate kuyucuklarına mevcut karışımdan 200 µl eklendi ve üzeri ışığı geçirmemesi için alüminyum folyo ile kaplandı. 60°C'lik inkübatörde 15 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Standartlar ile karşılaştırılarak her bir örneğin protein konsantrasyonu tespit edildi. Örnekler protein konsantrasyonları eşit olacak şekilde lemlı tamponu (#S-3401, Sigma Aldrich) ve steril su kullanılarak hazırlandı. Örnekler 5 dakika kaynatıldıktan sonra kullanıma hazır hale geldi.

### **3.5.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Protokolü**

#### **Kullanılan Solüsyonlar**

##### **❖ %30 Akrlamid-Bisakrilamid**

15,4 gr 37,5:1 oranındaki akrilamid-bisakrilamid (#161-01-25, Biorad) 40 ml distile suda çözüldü.

##### **❖ 4X Tris-HCl/SDS pH: 6,8**

3,025 gr Tris (#1.08387.2500, Merck) 20 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra pH HCl ile 6,8'e ayarlandı. Distile su ile toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı. Üzerine 0,2 gr SDS (#161-0301, Biorad) eklendi.

##### **❖ 4X Tris-HCl/SDS pH: 8,8**

18,15 gr Tris (#1.08387.2500, Merck) 40 ml distile su içerisinde çözüldü. pH HCl ile 8,8'e ayarlandı. Distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı ve 0,4 gr SDS eklendi.

##### **❖ %10'luk Amonyum Persülfat (APS)**

0,1 gr APS (#7727-54; Amresco) 1 ml distile su içerisinde çözüldü.

##### **❖ N,N,N',N''-Tetramethylethylenediamidine (TEMED)**

#T-7024; Sigma Aldrich

##### **❖ 5X Elektroforez Solüsyonu**

- 9 gr Tris (#161-0719, Bio-Rad)
- 43.2 gr Glisin (#161-0718, Bio-Rad)
- 3 gr SDS (#L4390, Sigma Aldrich)
- 600 ml distile Su

Distile su ile 1X olacak şekilde dilüye edilerek kullanıldı.

##### **❖ Transfer Solüsyonu**

- 14.3 gr Glisin (#161-0718, Bio-Rad)
- 3 gr Tris (#161-0719, Bio-Rad)
- 700 ml distile su içerisinde çözüldü.



Bu solüsyona 200 ml metanol (#1.06.008.2500, Merck) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

❖ **Bloklama Solüsyonu**

- 5 gr BSA (#A-420-100, GoldBio) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü.
- 5 gr süt tozu (#170-6404, Bio-Rad) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü.

❖ **10X TBS Tamponu**

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

800 ml distile suda çözüldü. pH HCl ile 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

❖ **TBS-T Solüsyonu**

1 litre 1X TBS içerisine 1000 µl Tween-20 (#TA-125-TW, Lab Vision) eklendi.

- ❖ İlford Multigrade Paper Developer 5L (#1757855,ILFORD)
- ❖ İlford Rapid Film&Paper Fixer 5L (#1984565,ILFORD)
- ❖ Strip solüsyonu
  - 67,5 ml distile H<sub>2</sub>O,
  - 20 ml %10 SDS,
  - 12,5 ml 4X Tris-HCl/SDS pH: 6,8

Hazırlanan solüsyon 30 saniye boyunca mikrodalga fırında ısıtıldı. Sıcaklık 55°C olunca 704 µl β-merkaptolanol eklendi. Membran kapalı kap içinde 30 dakika boyunca strip solüsyonu ile 55°C'lik etüvde her 5 dakikada çalkalanarak inkübe edildi.

Sirtuin 1 (120 kDa), FoxO1 (78 kDa) ve Asetile lizin tespiti için %10'luk ayırıcı poliakrilamid jel hazırlamada kullanılan solüsyonlar ve oranları aşağıdaki gibiydi:

Solüsyon	Miktar
%30 Akrilamid-bisakrilamid	5000 µl
4X Tris-HCl/SDS pH: 8,8	3750 µl
H <sub>2</sub> O	6250 µl
%10 Amonyum persülfat	50 µl
TEMED	10 µl

Hazırlanan jel 1 mm aralıklı iki cam plaka arasına döküldü, yarım saat boyunca jelin donması beklendi ve toplayıcı poliakrilamid jel hazırlandı. Bunun için kullanılan solüsyonlar ve oranları aşağıdaki gibiydi:

Solüsyon	Miktar
%30 Akrilamid-bisakrilamid	650 µl
4X Tris-HCl/SDS pH: 6,8	1250 µl
H <sub>2</sub> O	3050 µl
%10Amonyum persülfat	25 µl
TEMED	5 µl

Hazırlanan toplayıcı jel ayırıcı jel üzerine konan taraklar üzerine döküldü. Jelin donması için yarım saat beklendikten sonra taraklar çıkarılarak jeller cam plakalarla birlikte tanka yerleştirildi ve üzeri 1X elektroforez tamponu ile dolduruldu. 3 µl markır (#RPN800E, Amersham) ve 50 µg/µl protein içeren örnekler (10 µl) jellere yüklendi. 80 volt gücünde 140 dakika boyunca elektroforeze tabi tutuldu. PVDF (#1620177, Biorad) membran 5 dakika metanolle inkübe edildi. Elektroforez aşamasından sonra jeller sünger, filtre kağıdı (#RPN6101M, GE Healthcare) ve PVDF membran arasına alınarak transfer sandviçi hazırlandı ve transfer solüsyonuna alındı. Otuz iki voltta +4°C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlandı. Transfer sonrasında membranlar TBS-T ile yıkandı. Poncoue boyası ile 1 dakika boyanarak membranlara protein transferinin gerçekleştiği gözlemlendikten sonra membranlar TBS-T ile iyice yıkandı. Ardından %5'lik BSA içerisinde oda ısısında 1 saat bloklandı. Bloklamadan sonra %5'lik BSA içerisinde 1:500 dilüsyonda hazırlanan tavşan poliklonal anti-Sirtuin 1 (#15404, Santa Cruz Biotechnology) antikoru, 1:2000 dilüsyonda hazırlanan tavşan monoklonal anti-FoxO1 (#2880, Cell Signaling) antikoru veya 1:500 dilüsyonda hazırlanan tavşan monoklonal anti-Asetil lizin (#9441, Cell Signaling) antikoru ile gece boyu +4°C'de soğuk odada çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ertesi sabah membranlar TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkandı ve sonrasında %5'lik BSA içerisinde 1:2000 oranında hazırlanan peroksidaz konjuge keçi anti-tavşan sekonder antikoru (#PI 1000, Vector Laboratories,) ile oda ısısında 2 saat inkübe edildi. Membranlar TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkandıktan sonra kemiluminisans (#34080, Thermo Fisher Scientific) ile 5 dakika inkübe edildi ve karanlık odada membranlardaki sinyaller hiperfilme (#34089, Thermo Scientific)

aktarıldı. Film, geliştirici (developer) (#1757855, Ilford) ve tespit ediciden (fiksatif) (#1984565, Ilford) geçirildi ve distile su ile yıkanıp kurutuldu. Membranlar, TBS-T içerisinde yıkandıktan sonra proteinlerin eşit yüklenip yüklenmediğini belirlemek amacıyla aktin antikoru uygulandı. Bloklama 30 dakika boyunca %5'lik süt tozu (#170-6404, Bio-Rad) ile yapıldı ve %5'lik süt tozu içerisinde 1:5000 oranında hazırlanan aktin (tavşan monoklonal anti-aktin (#4970, Cell Signaling,) ile +4°C'de soğuk odada çalkalayıcı üzerinde gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah TBS-T ile yıkanan membranlar %5'lik süt tozu içerisinde 1:2000 oranında hazırlanan peroksidaz konjuge keçi anti-tavşan sekonder antikoru (#PI 1000, Vector Laboratories) ile oda ısısında 2 saat inkübe edildi. Daha sonra membranlar TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkandıktan sonra kemiluminisans ile uygun sürelerde inkübe edildi ve karanlık odada membranlardaki sinyaller hiperfilme aktarıldı. Film, geliştirici ve tespit ediciden geçirildi ve distile su ile yıkanıp kurutuldu. Filmler tarayıcıda tarandıktan sonra Image J analiz programı (NIH) ile bantlardaki protein miktarı analiz edildi ve elde edilen değerler aktin bantlarından elde edilen değerlere oranlanarak rakamsal sonuçlar elde edildi.

Artan oksidatif stresin implantasyon, inter-implantasyon bölgeleri ve uterustaki FoxO1'in asetilasyon durumunu etkileyip etkilemediğini belirlemek amacıyla immünopresipitasyon yapmayı hedeflemiştik. Bu amaçla örneklerdeki FoxO1 proteini immünopresipitasyon yöntemiyle çöktürülecek daha sonra çöktürülen FoxO1 örneklerindeki asetile lizin miktarı Western blot yöntemi ile ölçülecek ve örneklerdeki asetile FoxO1 miktarları karşılaştırılarak deasetile FoxO1 miktarı belirlenecekti. Bunu yapacak olmamızın sebebi piyasada asetile FoxO1'i tespit edecek antikorun bulunmamasıydı. FoxO1'i çöktürmek amacıyla immünopresipitasyon kiti kullandık (#ab206996; Abcam). Elde ettiğimiz çöktürme hem FoxO1 hem asetile lizin Western blotu yaptık. Ancak beklenen kilodaltonda (FoxO1~78 kDa) bant elde edemedik. Deneyin optimizasyonu için bir çok farklı yöntem denememize rağmen istenilen kilodaltonda bant elde edemedik. Amacımız FoxO1'in deasetilasyon miktarını belirlemek olduğu için şu şekilde bir yöntem uyguladık: örneklerdeki FoxO1'i Western blot tekniği ile belirledik. Daha sonra aynı membrana strip solüsyonu uyguladıktan sonra asetile lizin antikoru ile inkübe edip 78 kilodaltonda (FoxO1'in moleküler ağırlığı) asetile lizin bantı elde ettik. Daha sonra aynı membranı aktin antikoru ile inkübe ettik.

Elde edilen filmleri tarayıcıda tarayıp FoxO1, asetile lizin ve aktin bantlarını Image J analiz programı (NIH) ile değerlendirerek matematiksel veriler elde ettik. FoxO1 değerleri aktin değerlerine bölündü; asetile lizin değerleri aktin değerlerine bölündü ve elde edilen FoxO1 miktarından asetile lizin miktarını çıkararak deasetile FoxO1 miktarını elde etmiş olduk.

### **3.6. Mangan Süperoksit Dismutaz (MnSOD) ve Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türlerinin (ROT/RNT) Tayini**

#### **3.6.1. Doku Homojenatlarının Elde Edilmesi**

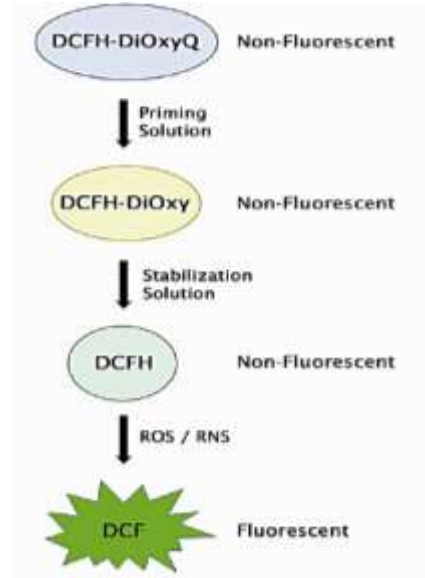
-80°C’de saklanan implantasyon, inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların ağırlıkları ölçüldü ve dokular buz üzerindeyken 1 gr dokuya 10 ml PBS olacak şekilde PBS eklendi. Bıçaklı homojenizatör kullanılarak doku homojenatları elde edildi. Tüm örnekler +4°C’de 10000 g’de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar yeni ependorflara alındı. Örneklerin protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendikten sonra örnekler -80°C’ye kaldırıldı.

#### **Protein Miktarının Belirlenmesi**

Bradford yöntemi için standart olarak protein konsantrasyonu 2 mg/ml olan BSA kullanıldı. BSA, S0 (0 µg/ml), S1 (2 µg/ml protein), S2 (4 µg/ml), S3 (8 µg/ml), S4 (12 µg/ml), S5 (16 µg/ml), S6 (20 µg/ml) olacak şekilde dilüye edilerek standart protein aralığı hazırlandı. Doku örnekleri, 1:100 oranında 1,5 µl örnek 150 µl PBS ile dilüye edilerek hazırlandı ve blank olarak PBS kullanıldı. 96 kuyucuklu plate kuyucuklarına hazırlanan standart, blank ve örneklerden 150 µl eklendi. Her kuyucuğa en son 150 µl Comassie blue ilave edildi ve hemen 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Standartlar ile karşılaştırılarak her bir örneğin protein miktarı tespit edildi.

#### **3.6.2. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türlerinin Tayini**

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerini yani oksidatif stresi belirlemek için OxiSelect™ *In Vitro* ROS/RNS Test Kiti (#STA-347, Cell Biolabs) kullanıldı. Kit, DCFH probunun oksidatif reaksiyonu hızlandıran katalizör ile oksidasyonu sonucunda renk değiştirmesiyle ROT/RNT (reaktif oksijen türleri/ reaktif nitrojen türleri) miktarının belirlenmesini sağlamaktadır (**Şekil 3.4**).



Şekil 3. 4. ROT/RNT kitinin çalışma mekanizması gösterilmektedir.

Kit içerisinde bulunan reaktifler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlandı.

- **1X Stabilization Solution (10X)** (234702)

10X stabilizasyon solüsyonu, 1,5 ml solüsyona 13.5 deiyonize su ile 1:10 oranında seyreltildi. Solüsyon vortekslendi ve kullanılmaya kadar 4°C’de bekletildi.

- **1X Catalyst (250X)** (234703)

250X Katalizör, 1: 250 oranında PBS ile seyreltildi ve vortekslenerek hemen kullanıldı.

- **DCFH Solution**

DCFH solüsyonu, alüminyum folyo kaplı tüpte DCF-DiOxyQ (**234704**) stok çözeltisi ile Priming reaktifinin (**234701**) 1:5 oranında seyreltilmesiyle taze olarak hazırlandı ve vortekslendi. Çözelti oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra, reaksiyon 1:40 oranında 1X Stabilizasyon solüsyonu ile seyreltildi ve homojenizasyon için vortekslendi. Bu aşamada solüsyonun ışıktan korunması önemliydi bu nedenle işlemler karanlıkta yapıldı.

- **DCF Standartları** (234202)

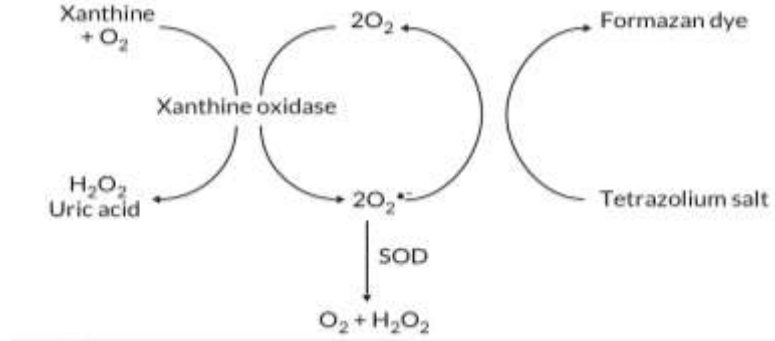
10 µl DCF 990 µl PBS içinde çözüldü ve 1:10 seyreltme serisi ile seyreltilerek 4 tüp daha hazırlandı ve son tüpe 1000 µl PBS koyularak toplam 6 tüp DCF standartı hazırlandı.

### Deney Protokolü

İmplantasyon, inter-implantasyon ve uterus örnekleri 96'lık plate'in kuyucuklarına 50'şer µl eklendi. Sonra kuyucuklara 50 µl katalizör eklenerek karıştırıldı ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklara 100 µL DCFH solüsyonu eklendi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Bu işlem ışıktan korumak için karanlıkta yapıldı. DCF standartları kuyucuklara 200 µl eklendi. Floresan ölçüm, 480 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyonunda yapıldı.

### 3.6.3. MnSOD Tayini

MnSOD miktarının tayin edilmesi için Süperoksit Dismutaz Analiz Kiti (#706002, Cayman) kullanıldı. Süperoksit iyonları, tetrazolyum tuzları ve SOD tarafından kullanılmaktadır. Kit, hipoksantin ve ksantin oksidaz ile oluşan süperoksit iyonlarının tetrazolyum tuzları kullanarak SOD miktarının belirlenmesini sağlamaktadır (Şekil 3.5)



Şekil 3. 5. Süperoksit dismutaz analiz kitinin çalışma prensibi gösterilmektedir.

Kit içerisinde bulunan reaktifler aşağıda yazıldığı gibi hazırlandı.

- **Assay Buffer 10X (706001)**

10X assay buffer, 1:10 oranında 9 ml steril su ile dilüye edildi. 1X assay buffer (50mM Tris/HCl pH: 8.0, 0.1 dietilentriaminopentaasetikasit (DTPA), 0.1 mM hipoksantin) radikal detektör için kullanıldı.

- **Sample Buffer 10X (706003)**

10X sample buffer, 1:10 oranında 9 ml steril su ile dilüye edildi. 1X sample buffer (50mM Tris-HCl, pH: 8,0) SOD standartları ve ksantin oksidaz örneklerini dilüye etmek için kullanıldı.

- **Radikal Detector** (706004)

50 µl tetrazolyum tuz çözeltisi 19,95 ml 1X assay buffer ile dilüye edildi.

- **SOD Standart** (706005)

20 µl SOD standardı 19,98 µl sample buffer ile dilüye edilerek SOD stok solüsyonu hazırlandı. 7 adet (A-G) SOD standart tüpü, SOD stok solüsyonundan sırasıyla 0, 20, 40, 80, 120, 160 ve 200 µl alınarak ve sample buffer ile son hacim 1000 µl'ye tamamlanarak hazırlandı.

- **Ksantin Oksidaz** (706006)

50 µl ksantin oksidaz 19,95 µl 1X sample buffer ile dilüye edildi ve taze olarak kullanıldı.

- **96 well Solid Plate** (400014)
- **96 well Cover Sheet** (400012)

### **Deney Protokolü**

İmplantasyon, inter-implantasyon ve uterus örnekleri PBS ile 1:10 oranında dilüye edildi. Hazırlanan SOD standartları ile implantasyon, inter-implantasyon ve uterus örnekleri 10 µl ve Radikal Detector 200 µl olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Hızlı bir şekilde 20 µl dilüye ksantin oksidaz eklenerek reaksiyon başlatıldı. Birkaç saniye plate dikkatlice sallandı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Spektrofotometrik ölçüm, 440-460 nm dalga boyunda absorbans ölçülerek yapıldı.

Her bir standarttan elde edilen değerlerle LR denklemi elde edildi. İmplantasyon, inter-implantasyon ve uterus örneklerinin SOD (mU/ml) değerleri protein miktarlarına oranlanarak SOD (mU/mg) değerleri hesaplandı.

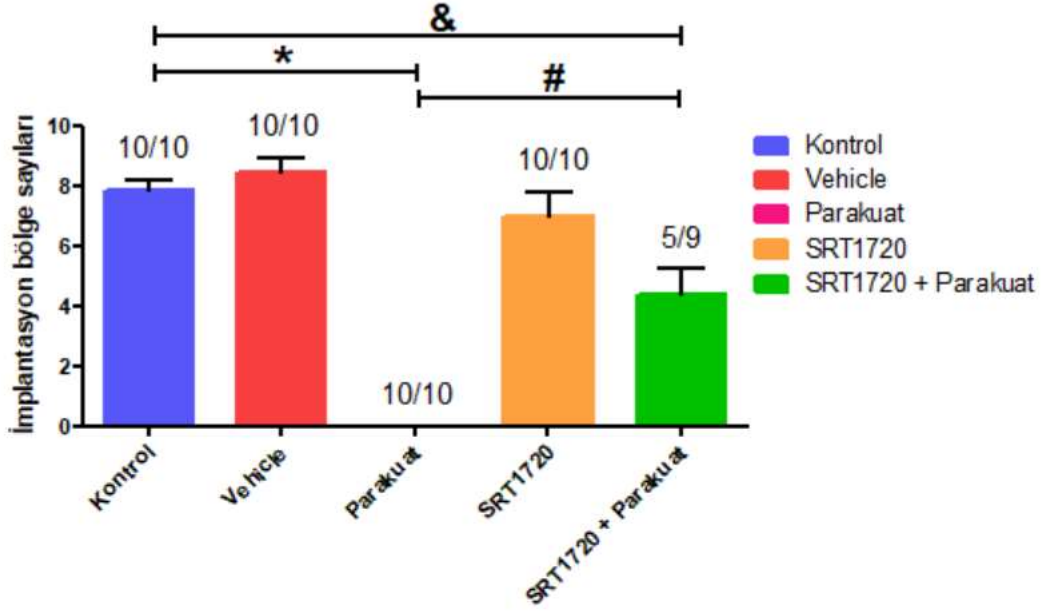
### **İstatiksel Analizler**

Sonuçların istatiksel analizi one way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve post-hoc analizler kullanılarak yapıldı ve  $p < 0.05$  altında bulunan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Tüm değerler ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) olarak ifade edildi. Sonuçların istatiksel analizinde SigmaStat 3.5- Systat Software programı kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İmplantasyon Bölge Sayılarının Karşılaştırılması

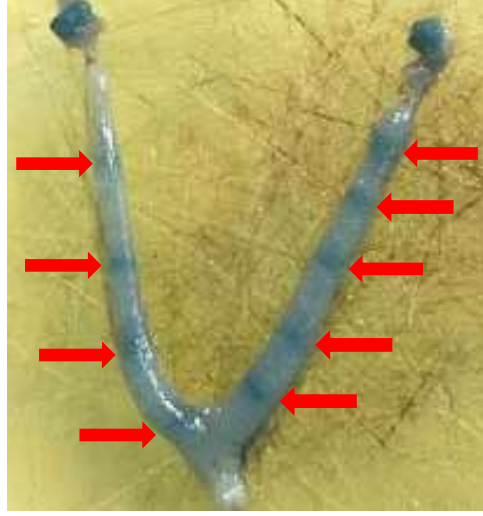
Çalışmamızda kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait gebeliğin 5. günündeki dişi farelerin sağ ve sol uterus boynuzlarındaki implantasyon bölge sayıları hesaplanmış ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Deney gruplarına ait implantasyon bölge sayıları Şekil 4.1’de gösterilmektedir.



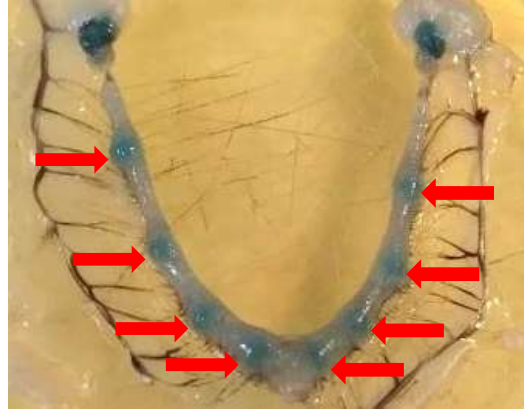
Şekil 4. 1. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon bölge sayılarını gösteren grafik.

Kontrol ( $7.9 \pm 0.3$ ) (Şekil 4.2) ve vehicle ( $8.4 \pm 0.5$ ) (Şekil 4.3) grupları arasında implantasyon bölge sayıları bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.1). Bu durum vehicle grubuna enjekte edilen SRT1720 ve parakuatın içinde çözöldüğü çözücülerin implantasyonu engelleyici bir etkisinin olmadığını göstermektedir.





**Şekil 4. 2.** Kontrol grubunda gebeliğin 5. günündeki implantasyon bölgeleri kırmızı oklar ile gösterilmektedir.

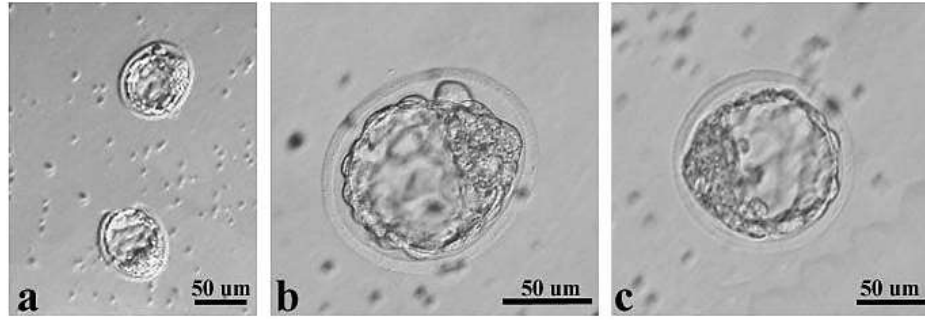


**Şekil 4. 3.** Vehicle grubunda gebeliğin 5. günündeki implantasyon bölgeleri kırmızı oklar ile gösterilmektedir.

Parakuat (30 mg/kg) uygulanan dişi farelerde implantasyon bölgesi gözlenmemiştir (Şekil 4.4). Parakuatın implantasyonu engellediğini göstermek yani farede dölleme olmaması nedeniyle implantasyonun gerçekleşmediği olasılığını ortadan kaldırmak için uterus boynuzlarından biri fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ile yıkanarak blastosist olup olmadığı gözlenmiştir. Blastosist gözlenmeyen fareler deneye dahil edilmemiştir. Deneye dahil edilen gruptaki farelerin düzgün morfolojiye sahip blastosistleri uygulanan parakuat dozunun embriyo gelişimini etkilemediğini göstermiştir (Şekil 4.5). Parakuat (0±0) grubunda implantasyonun gerçekleşmemesi nedeniyle implantasyon bölge sayıları diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır (\*p<0,05) (Şekil 4.1).

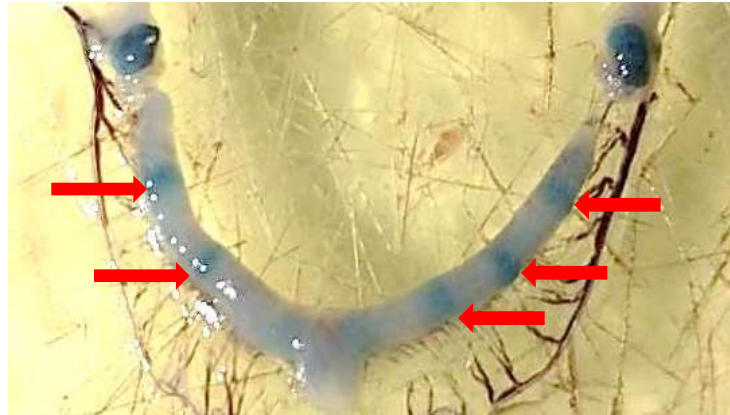


**Şekil 4. 4.** Parakuat grubunda gebeliğin 5. gününde implantasyonun gerçekleşmediği uterus görülmektedir.



**Şekil 4. 5.** Parakuat grubunda gebeliğin 5. gününde bir uterus boynuzunun yıkanması ile elde edilen blastosistler görülmektedir.

SRT1720 ( $7\pm 0,8$ ) (**Şekil 4.6**) ve kontrol ( $7.9\pm 0.3$ ) grupları arasında implantasyon bölge sayıları bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.1**). Bu durum implantasyonun sağlıklı bir şekilde gerçekleştiği kontrol grubu farelere enjekte edilen SRT1720'nin implantasyon üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

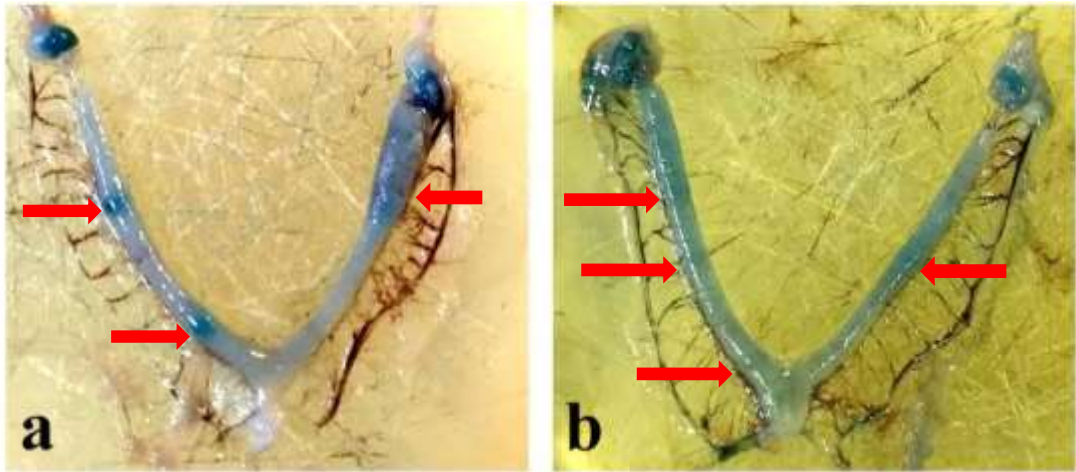


**Şekil 4. 6.** SRT1720 grubunda gebeliğin 5. günündeki implantasyon bölgeleri kırmızı oklar ile gösterilmektedir.

SRT1720 ve parakuatın beraber uygulandığı farelerin bir kısmında implantasyon bölgesi gözlenirken bir kısmında gözlenmemiştir. İmplantasyon bölgesi gözlenmeyen farelerin uterus boynuzunu yıkadığımızda blastosist görmememiz döllenmenin gerçekleşmediğini; blastosist görmemiz ise döllenme gerçekleşmesine rağmen implantasyonun gerçekleşmediğini göstermiştir. İmplantasyonun gerçekleşmediği fareler (4/9) deneye dahil edilmemiştir.

SRT1720 ve parakuatın beraber uygulandığı 9 fareden 5'inde implantasyon bölgesi gözlenmiştir (**Şekil 4.7**). SRT1720 + parakuat ( $4,4 \pm 0,8$ ) grubunda implantasyon bölge sayılarının parakuat grubuna ( $0 \pm 0$ ) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $\#p < 0,05$ ) (**Şekil 4.1**). Ancak SRT1720 + parakuat ( $4,4 \pm 0,8$ ) grubunda gözlenen implantasyon bölge sayılarının kontrol grubu implantasyon bölge sayılarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha az olduğu gözlenmiştir ( $\&p < 0,05$ ) (**Şekil 4.1**).

SRT1720 + parakuat grubunda implantasyonun farelerin bir kısmında gerçekleşip (5/9) bir kısmında gerçekleşmemesi (4/9), parakuatın engel olduğu embriyo implantasyonunun SRT1720 uygulaması sonucu gerçekleşebileceğini göstermiştir. Bazı farelerde implantasyonun gerçekleşmemesi (4/9) ve implantasyonun gerçekleştiği (5/9) farelerde implantasyon bölge sayılarının az olması uyguladığımız SRT1720 dozunun yetersiz olduğunu düşündürmüştür.



**Şekil 4.7.** SRT1720 + parakuat grubunda gebeliğin 5. gününde implantasyon bölgeleri kırmızı oklar ile gösterilmektedir.

#### **4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular**

Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarındaki farelere ait implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ve FoxO1 proteinlerinin varlığı ve lokalizasyonları immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiş ve H-Score analizi ile değerlendirilmiştir.

##### **4.1.1. Sirtuin 1 İmmünohistokimyası**

Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarından elde edilen implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Sirtuin 1 protein yoğunluğunun gruplar arasında farklılık gösterdiği ve nükleer lokalizasyonda olduğu gözlenmiştir.

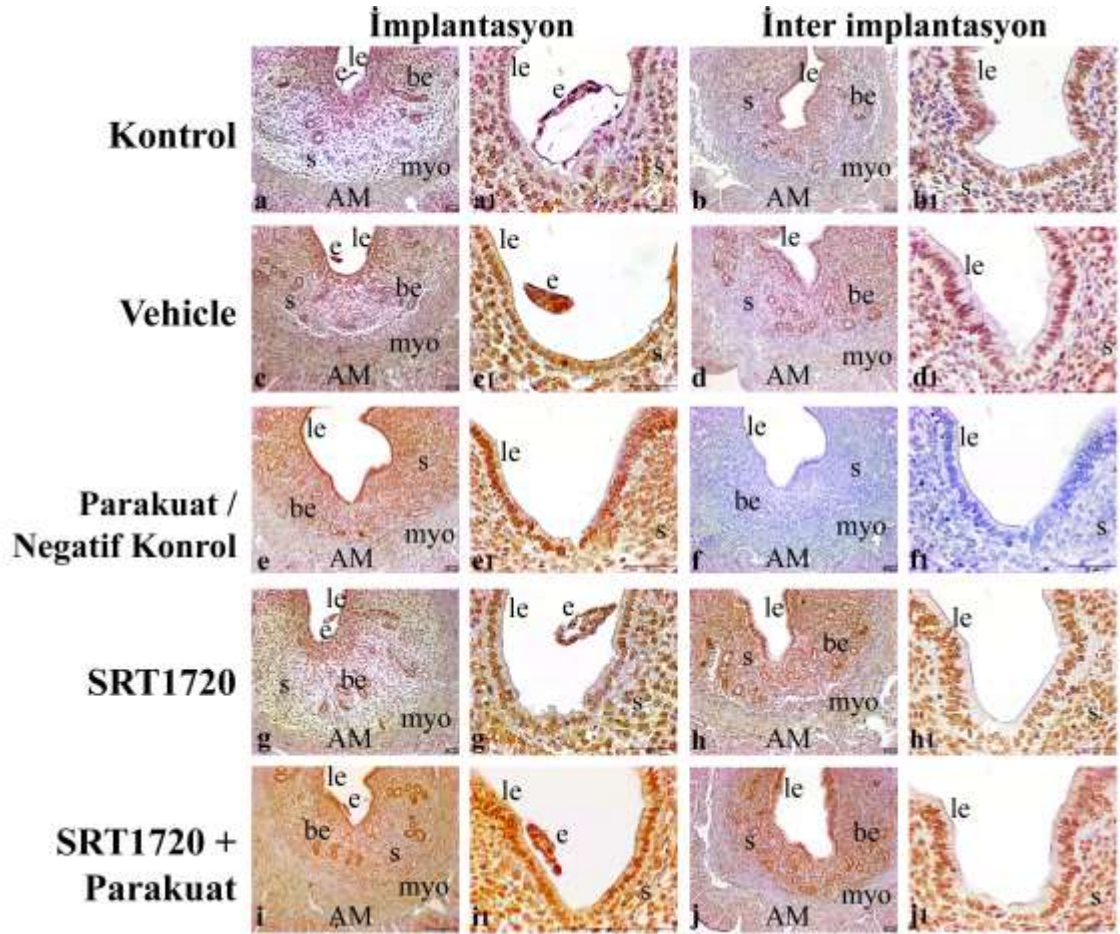
Bütün gruplarda endometriyumun lümen epiteli, bez epiteli ve stroma alanlarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu H-Score analizi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

##### **4.1.1.1. Lümen Epitelinde Sirtuin 1 İmmünohistokimyası**

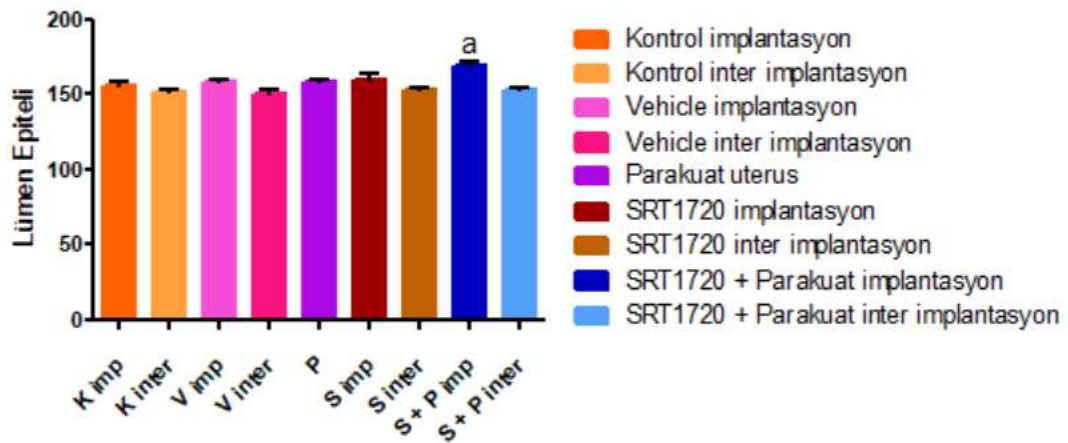
Lümen epitelinde yapılan Sirtuin 1 immünohistokimya sonuçları Şekil 4.8'de ve H-Score analizi sonuçları Şekil 4.9'da gösterilmektedir. Sirtuin 1; kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarının implantasyon bölgeleri veya uterusları ile inter-implantasyon bölgelerinin lümen epitelinde nükleer lokalizasyon göstermiştir.

Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol, vehicle ve SRT1720 gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kendi gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat grubuna ait implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kendi grubuna ait inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.8, Şekil 4.9).





Şekil 4. 8. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların lümen epitellerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu. e: Embriyo, le: Lümen epiteli, be: Bez epiteli, s: Stroma, myo: Miyometriyum, AM: Anti-mezometriyum.



Şekil 4. 9. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait lümen epitellerinde Sirtuin 1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi, a: S+P inter'e göre anlamlı.

Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol (155,8±1,9) ve vehicle (158,8±0,9) gruplarının implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol (151,3±2,1) ve vehicle (150,1±3,2) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.8, Şekil 4.9**).

Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre parakuat (158,3±1,3) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol grubu implantasyon (155,8±1,9) ve inter-implantasyon (151,3±2,1) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.8, Şekil 4.9**).

Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 (159,9±3,4) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol (155,8±1,9) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla daha fazla olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. SRT1720 (153,1±1,3) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol (151,3±2,1) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 grubu implantasyon (159,9±3,4) ve inter-implantasyon (153,1±1,3) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile parakuat (158,8±1,3) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.8, Şekil 4.9**).

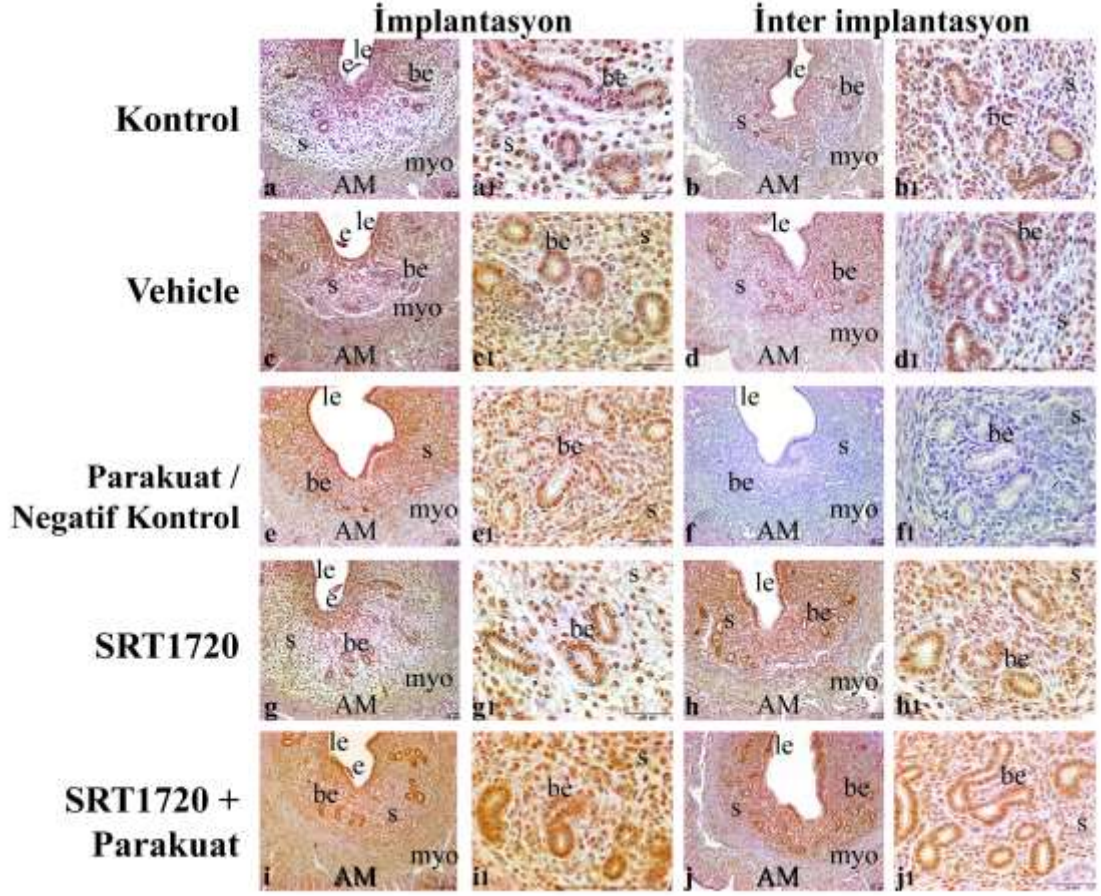
Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 + parakuat (168,5±3,5) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol (155,8±1,9) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla arttığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. SRT1720 + parakuat (168,5±3,5) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile SRT1720 (159,9±3,4) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat (153,1±0,8) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol (151,3±2,1) ve SRT1720 (153,1±1,3) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat (168,5±3,5) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun

parakuat (158,3±1,3) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla arttığı ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. SRT1720 + parakuat (153,1±0,8) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile parakuat (158,3±1,3) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9).

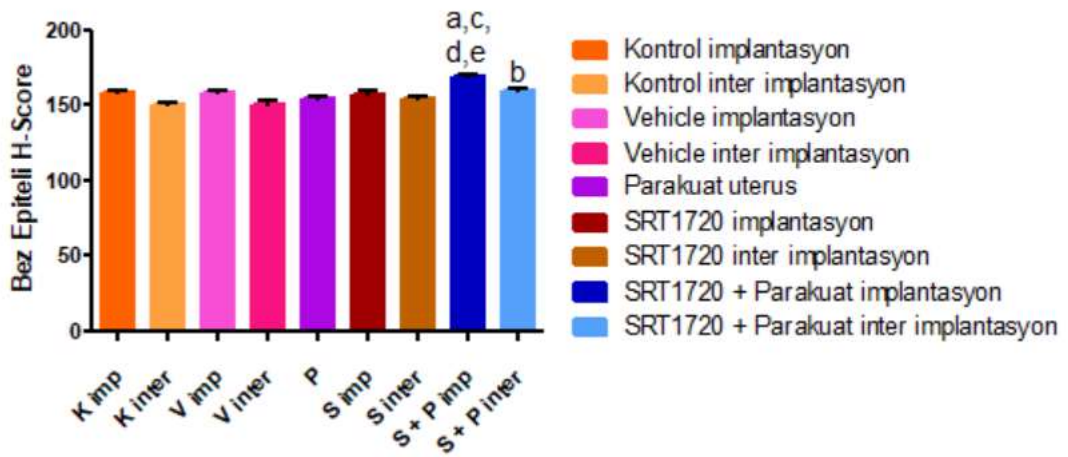
#### **4.1.1.2. Bez Epitelinde Sirtuin 1 İmmünohistokimyası**

Bez epitelinde yapılan Sirtuin 1 immünohistokimya sonuçları Şekil 4.10'da ve H-Score analizi sonuçları Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Sirtuin 1; kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarının implantasyon bölgeleri veya uterusları ile inter-implantasyon bölgelerinin bez epitelinde nükleer lokalizasyon göstermiştir.

Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol, vehicle ve SRT1720 gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kendi gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat grubunun implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kendi grubuna ait inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



Şekil 4. 10. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların bez epitellerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu. e: Embriyo, le: Lümen epiteli, be: Bez epiteli, s: Stroma, myo: Miyometriyum, AM: Anti-mezometriyum



Şekil 4. 11. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait bez epitellerinde Sirtuin 1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi, a: K imp'ye göre, b: K inter'e göre, c: P'ye göre, d: S imp'ye göre ve e: S+P inter'e göre anlamlı.



Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol (158,3±1,5) ve vehicle (158,1±1,4) gruplarının implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol (150,4±1,7) ve vehicle (150,6±1,9) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.10, Şekil 4.11**).

Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre parakuat (154,1±1,3) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol grubu implantasyon (158,3±1,5) ve inter-implantasyon (150,4±1,7) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.10, Şekil 4.11**).

Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 (156,8±3,4) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol (158,3±1,5) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 (154,9±1,0) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol (150,4±1,7) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 grubu implantasyon (156,8±3,4) ve inter-implantasyon (154,9±1,0) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile parakuat (154,1±1,3) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.10, Şekil 4.11**).

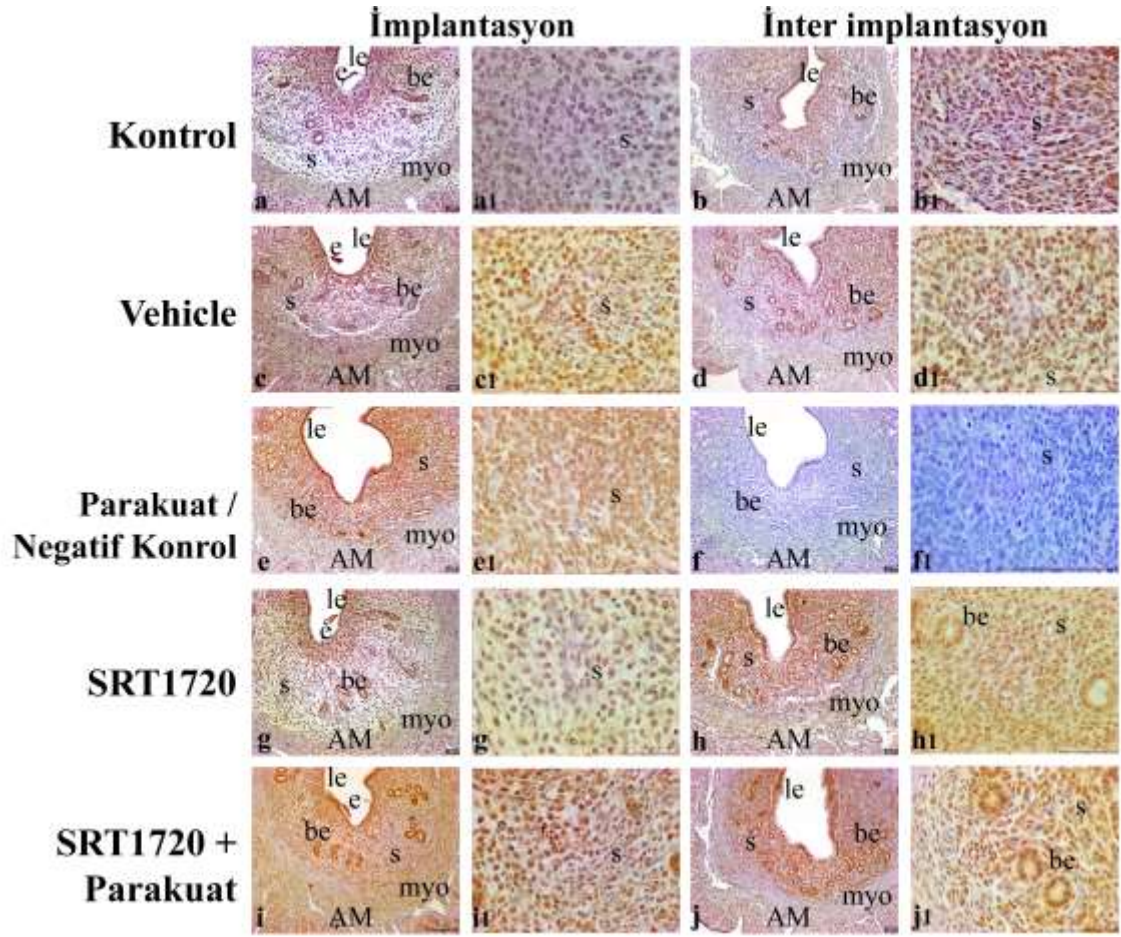
Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 + parakuat (168,9±1,9) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol (158,3±1,5) ( $p<0.001$ ) ve SRT1720 (156,8±3,4) ( $p<0.05$ ) gruplarının implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir. SRT1720 + parakuat (159,0±1,9) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol (150,4±1,7) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). SRT1720 + parakuat (159,0±1,9) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile SRT1720 (154,1±1,0) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat (168,9±1,9) grubu implantasyon bölgelerindeki

Sirtuin 1 ekspresyonunun parakuat (154,1±1,3) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). SRT1720 + parakuat (159,0±1,9) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile parakuat (154,1±1,3) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.10, Şekil 4.11**).

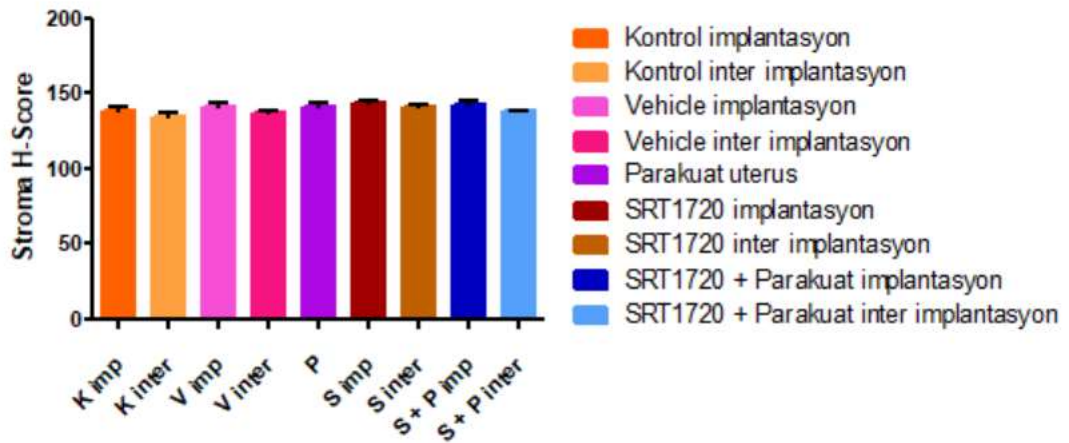
#### **4.1.1.3. Stromada Sirtuin 1 İmmünohistokimyası**

Stromada yapılan Sirtuin 1 immünohistokimya sonuçları Şekil 4.12’de ve H-Score analizi sonuçları Şekil 4.13’te gösterilmektedir. Sirtuin 1; kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarının implantasyon bölgeleri veya uterusları ile inter-implantasyon bölgelerinin stromasında nükleer lokalizasyon göstermiştir.

Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kendi gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.12, Şekil 4.13**).



Şekil 4. 12. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların stromalarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu. e: Embriyo, le: Lümen epiteli, be: Bez epiteli, s: Stroma, myo: Miyometriyum, AM: Anti-mezometriyum



Şekil 4. 13. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait stromalarda Sirtuin 1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi.

Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol (138,8±2,1) ve vehicle (141,5±1,6) gruplarının implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol (134,0±2,9) ve vehicle (136,4±2,2) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.12, Şekil 4.13**).

Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre parakuat (141,1±2,2) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol grubu implantasyon (138,8±2,1) ve inter-implantasyon (134,0±2,9) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.12, Şekil 4.13**).

Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 (143,3±1,3) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol (138,8±2,1) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 (141,1±2,5) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol (134,0±2,9) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 grubu implantasyon (143,3±1,3) ve inter-implantasyon (141,1±2,5) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile parakuat (141,1±2,2) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.12, Şekil 4.13**).

Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 + parakuat (142,6±1,8) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol (138,8±2,1) ve SRT1720 (143,3±1,3) gruplarının implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat (138,1±0,8) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol (134,0±2,9) ve SRT1720 (141,1±2,5) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat grubu implantasyon (142,6±1,8) ve inter-implantasyon (138,1±0,8) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile parakuat (141,1±2,2) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.12, Şekil 4.13**).

#### **4.1.2. FoxO1 İmmünohistokimyası**

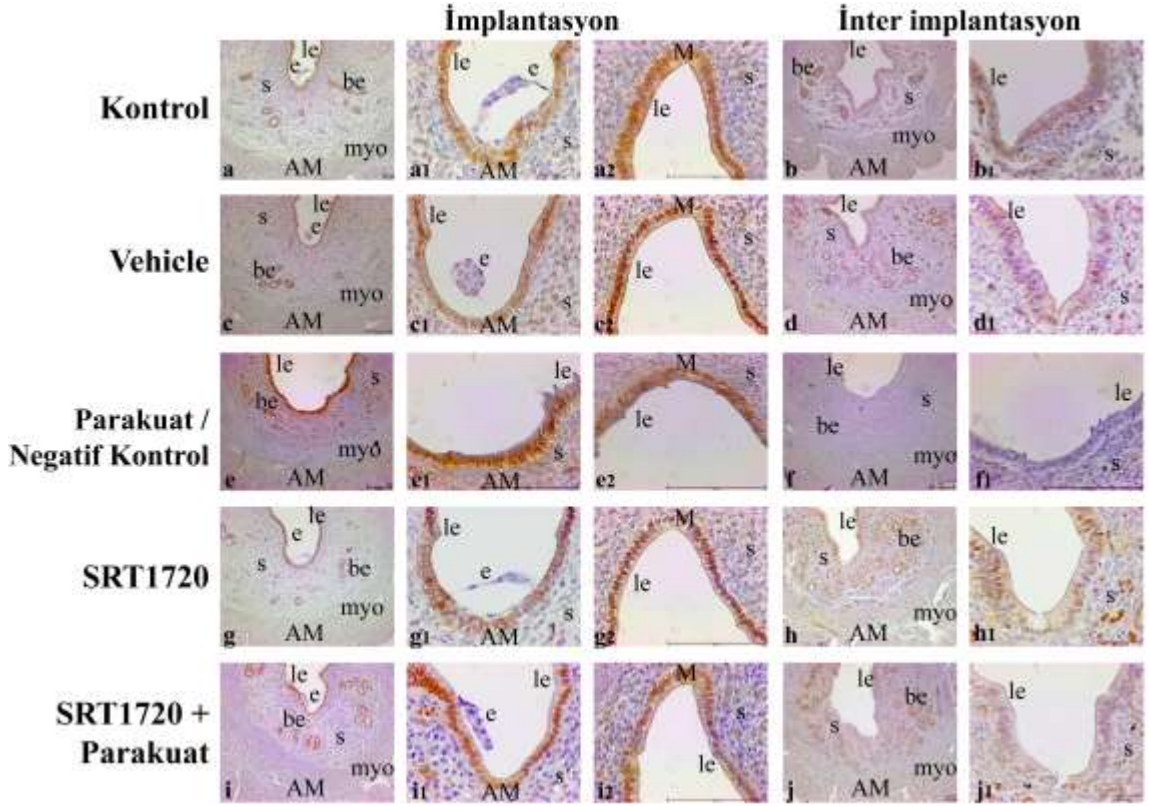
Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarından elde edilen implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. FoxO1 proteininin yoğunluk olarak gruplar arasında farklılık gösterdiği ve hem nükleer hem de sitoplazmik lokalizasyonda olduğu gözlenmiştir.

Bütün gruplarda endometriyumun lümen epiteli, bez epiteli ve stroma alanlarındaki FoxO1 ekspresyonu H-Score analizi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

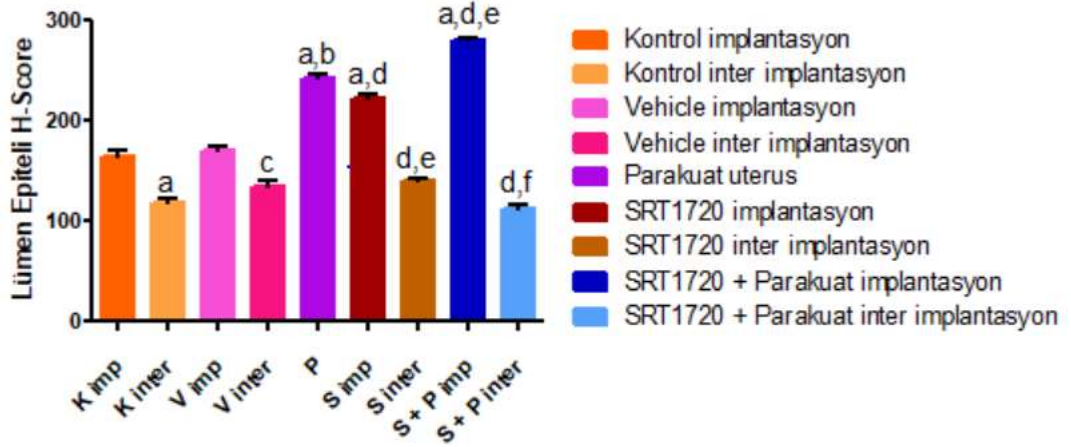
##### **4.1.2.1. Lümen Epitelinde FoxO1 İmmünohistokimyası**

Lümen epitelinde yapılan FoxO1 immünohistokimya sonuçları Şekil 4.14'te ve H-Score analizi sonuçları Şekil 4.15'te gösterilmektedir. FoxO1 lümen epitelinde hem nükleer hem sitoplazmik lokalizasyon göstermektedir. Kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarında implantasyon bölgelerinin lümen epitelinde FoxO1 çoğunlukla nükleer ve daha az sitoplazmik lokalizasyon gösterirken inter-implantasyon bölgelerinin lümen epitelinde FoxO1 çoğunlukla sitoplazmik ve daha az nükleer lokalizasyon göstermiştir. Kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarında embriyonun tutunduğu antimezometriyal bölgenin lümen epitelinde FoxO1 daha çok sitoplazmik lokalizasyon, antimezometriyal bölgenin embriyonun tutunmadığı kısımdaki lümen epiteli ve mezometriyal bölgenin lümen epitelinde daha çok nükleer lokalizasyon göstermiştir. Parakuat grubu uteruslarının lümen epitelinde ise FoxO1'in antimezometriyal bölgede çoğunlukla nükleer olarak lokalize olduğu; mezometriyal bölgelerde çoğunlukla sitoplazmik olarak lokalize olduğu ve ekspresyon şiddetinin anti-mezometriyal bölgeye kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir.

Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun kendi gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p < 0.001$ ) (**Şekil 4.14, Şekil 4.15**).



Şekil 4. 14. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların lümen epitellerindeki FoxO1 ekspresyonu. e: Embriyo, le: Lümen epiteli, be: Bez epiteli, s: Stroma, myo: Miyometriyum, M: Mezometriyum, AM: Anti- mezometriyum.



Şekil 4. 15. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait lümen epitellerinde FoxO1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi, a: K imp'ye göre, b: K inter'e göre, c: V imp'ye göre, d: P'ye göre, e: S imp'ye göre, f: S+P imp'ye göre anlamlı.



Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol (163,0±6,2) ve vehicle (170,1±4,0) gruplarının implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol (118,4±2,8) ve vehicle (134,4±5,0) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.14, Şekil 4.15**).

Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre parakuat (242,3±4,1) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonunun kontrol grubu implantasyon (163,0±6,2) ve inter-implantasyon (118,4±2,8) bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0.001$ ) (**Şekil 4.14, Şekil 4.15**).

Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 (221,3±3,4) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun kontrol (163,0±6,2) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). SRT1720 (138,6±2,3) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (118,4±2,8) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 grubu implantasyon (221,3±3,4) ( $p<0.05$ ) ve inter-implantasyon (138,6±2,3) ( $p<0.001$ ) bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun parakuat (242,3±4,1) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir (**Şekil 4.14, Şekil 4.15**).

Lümen epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 + parakuat (279,6±1,9) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun kontrol (163,0±6,2) ve SRT1720 (221,3±3,4) gruplarının implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). SRT1720 + parakuat (111,3±3,4) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (118,4±2,8) ve SRT1720 (138,6±2,3) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat (279,6±1,9) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun parakuat (242,3±4,1) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). SRT1720 + parakuat (111,3±3,4) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki

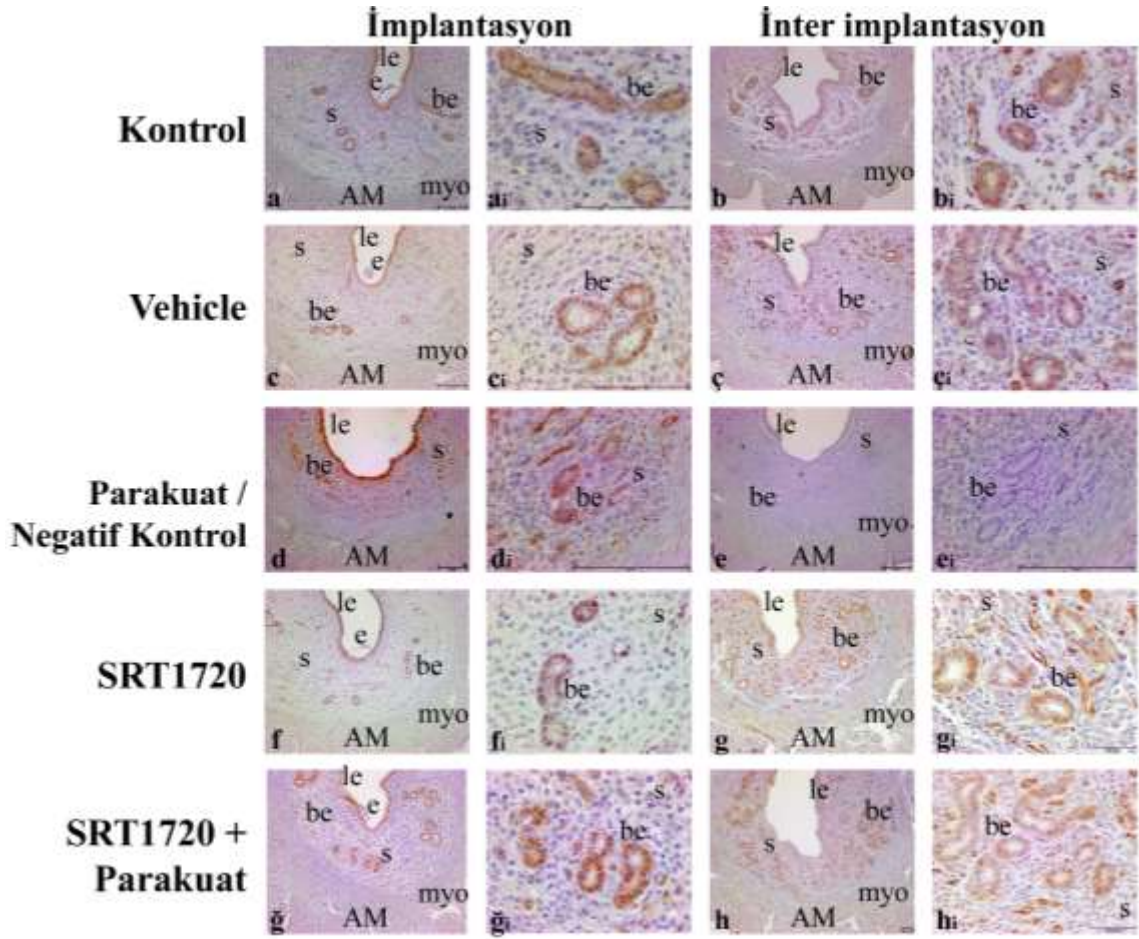
FoxO1 ekspresyonunun parakuat (242,3±4,1) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.14, Şekil 4.15).

#### **4.1.2.2. Bez Epitelinde FoxO1 İmmünohistokimyası**

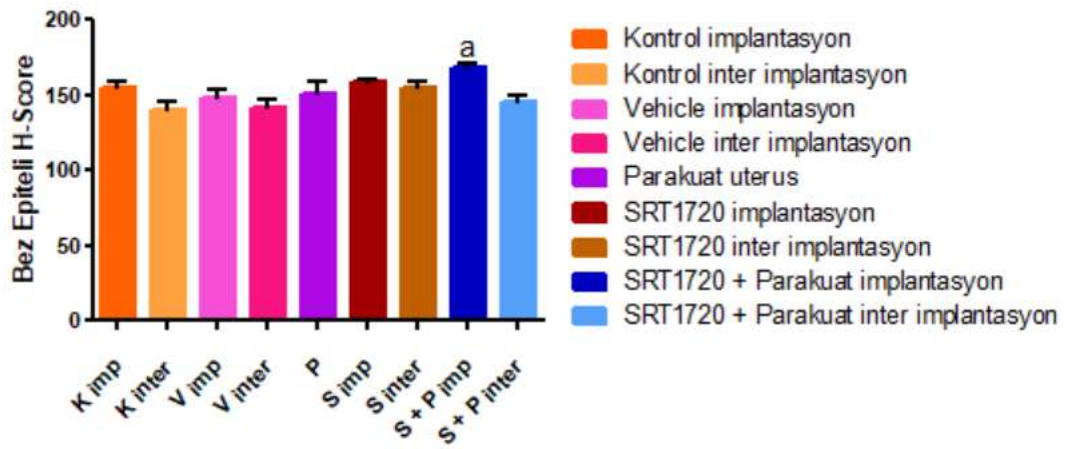
Bez epitelinde yapılan FoxO1 immünohistokimya sonuçları Şekil 4.16'da ve H-Score analizi sonuçları Şekil 4.17'de gösterilmektedir. FoxO1; kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarının implantasyon bölgelerinin bez epitelinde çoğunlukla nükleer ve daha az sitoplazmik olarak lokalizasyon gösterirken aynı grupların inter-implantasyon bölgelerinin bez epitelinde daha çok sitoplazmik ve daha az nükleer lokalizasyon göstermiştir. Parakuat grubu uteruslarının bez epitelinde ise FoxO1'in daha çok sitoplazmik ve daha az nükleer lokalizasyonu gözlenmiştir.

Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol, vehicle ve SRT1720 gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kendi gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun kendi grubuna ait inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.16, Şekil 4.17).





Şekil 4. 16. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların bez epitellerindeki FoxO1 ekspresyonu. e: Embriyo, le: Lümen epiteli, be: Bez epiteli, s: Stroma, myo: Miyometriyum, AM: Anti-mezometriyum.



Şekil 4. 17. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait bez epitellerinde yapılan FoxO1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi, a: S+P inter'e göre anlamlı.

Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol (152,2±4,4) ve vehicle (147,8±6,4) gruplarının implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol (140,3±4,9) ve vehicle (141,8±5,3) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.16, Şekil 4.17**).

Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre parakuat (150,8±7,6) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol grubu implantasyon (152,2±4,4) ve inter-implantasyon (140,3±4,9) bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.16, Şekil 4.17**).

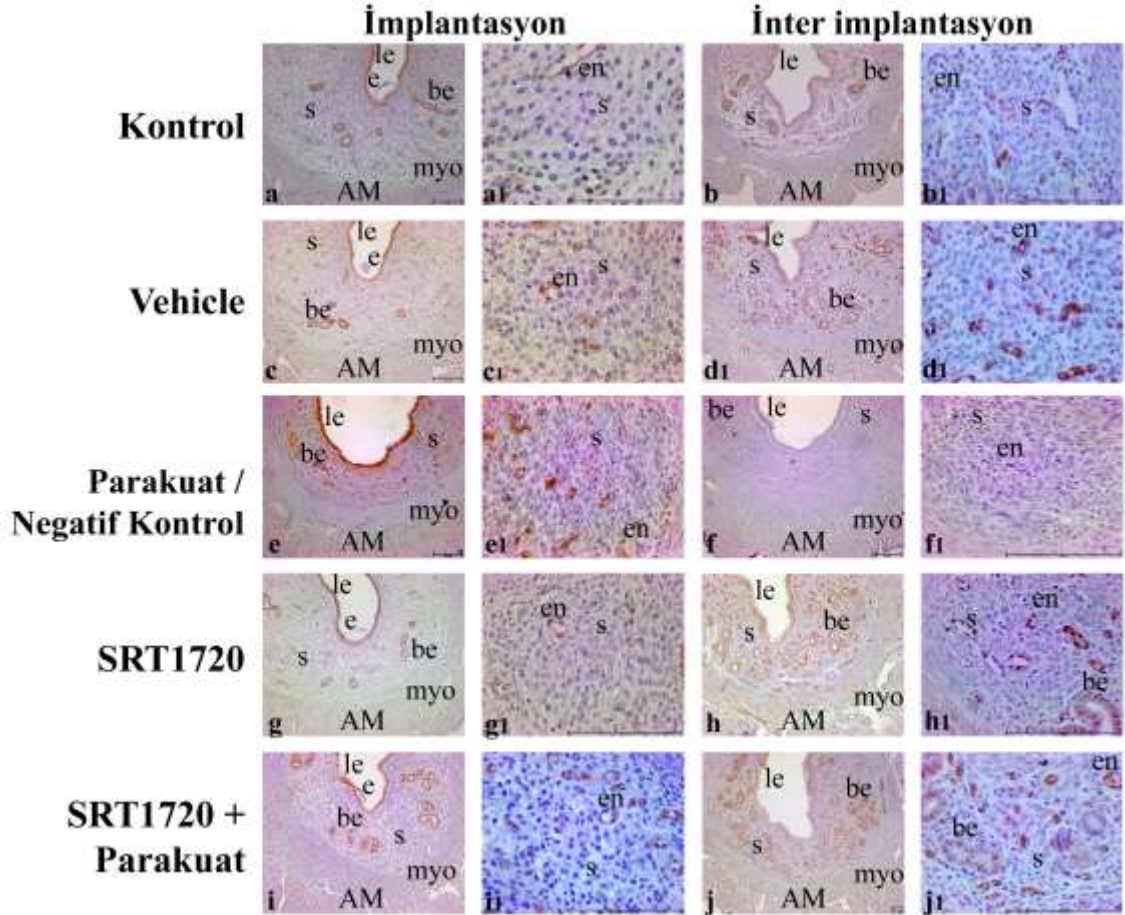
Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 (158,8±1,8) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (152,2±4,4) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 (154,4±4,5) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (140,3±4,9) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 grubu implantasyon (158,8±1,8) ve inter-implantasyon (154,4±4,5) bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile parakuat (150,8±7,6) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.16, Şekil 4.17**).

Bez epitelinde yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 + parakuat (168,1±2,7) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (152,2±4,4) ve SRT1720 (158,8±1,8) gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat (146,3±2,8) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (140,3±4,9) ve SRT1720 (154,4±4,5) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat grubu implantasyon (168,1±2,7) ve inter-implantasyon (146,3±2,8) bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile parakuat (150,8±7,6) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.16, Şekil 4.17**).

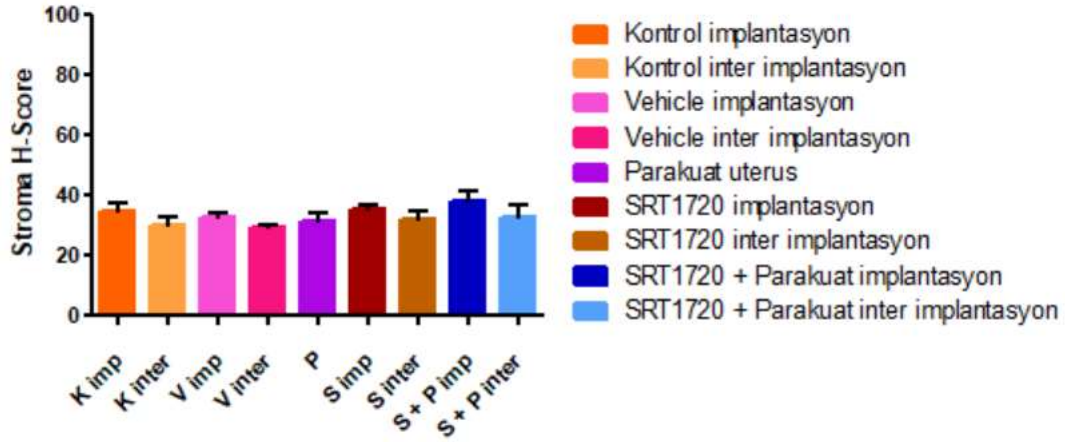
#### 4.1.2.3. Stromada FoxO1 İmmünohistokimyası

Stromada yapılan FoxO1 immünohistokimya sonuçları Şekil 4.18’de ve H-Score analizi sonuçları Şekil 4.19’da gösterilmektedir. Tüm deney gruplarına ait stromalarda çok az hücrenin FoxO1 eksprese ettiği ve bu hücrelerde FoxO1’in nükleer lokalize olduğu gözlenmiştir. Stromada yer alan kan damarlarına ait endotel hücrelerinin FoxO1’i nükleer olarak ekspre ettiği gözlenmiştir.

Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kendi gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.18, Şekil 4.19)



Şekil 4. 18. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uterusların stromalarındaki FoxO1 ekspresyonu. e: Embriyo, le: Lümen epiteli, be: Bez epiteli, s: Stroma, myo: Miyometriyum, AM: Anti-mezometriyum, en: Endotel.



**Şekil 4. 19.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait stromalarda yapılan FoxO1 ekspresyon düzeylerinin H-Score analizi.

Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre kontrol (34,6±2,3) ve vehicle (32,4±1,6) gruplarının implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol (29,5±2,8) ve vehicle (28,9±0,9) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.18, Şekil 4.19**).

Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre parakuat (31,0±2,5) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol grubu implantasyon (34,6±2,3) ve inter-implantasyon (29,5±2,8) bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.18, Şekil 4.19**).

Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 (35,1±1,5) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (34,6±2,3) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 (31,5±3,1) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (29,5±2,8) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 grubu implantasyon (35,1±1,5) ve inter-implantasyon (31,5±3,1) bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile parakuat (31,0±2,5) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.18, Şekil 4.19**).



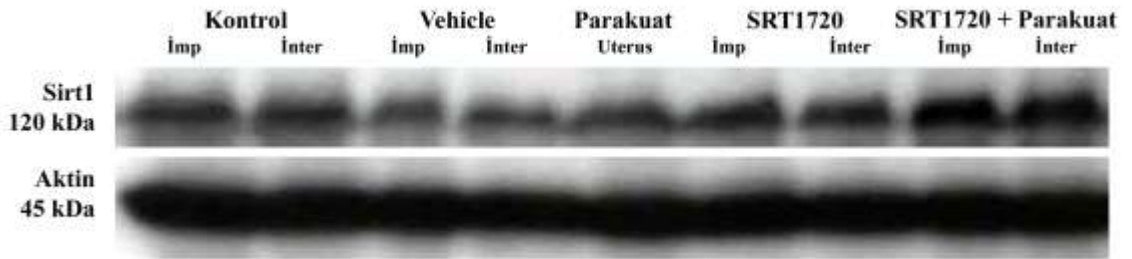
Stromada yapılan H-Score analizi sonuçlarına göre SRT1720 + parakuat (38,1±3,2) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (34,6±2,3) ve SRT1720 (35,1±1,5) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat (32,5±3,7) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol (29,5±2,8) ve SRT1720 (31,5±3,1) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat grubu implantasyon (38,1±3,2) ve inter-implantasyon (32,5±3,7) bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile parakuat (31,0±2,5) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.18, Şekil 4.19).

## 4.2. Western Blot Bulguları

Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarındaki farelere ait implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1, FoxO1 ve asetile lizin proteinlerinin miktarı Western blot yöntemi ile belirlendi ve kantitatif olarak değerlendirildi.

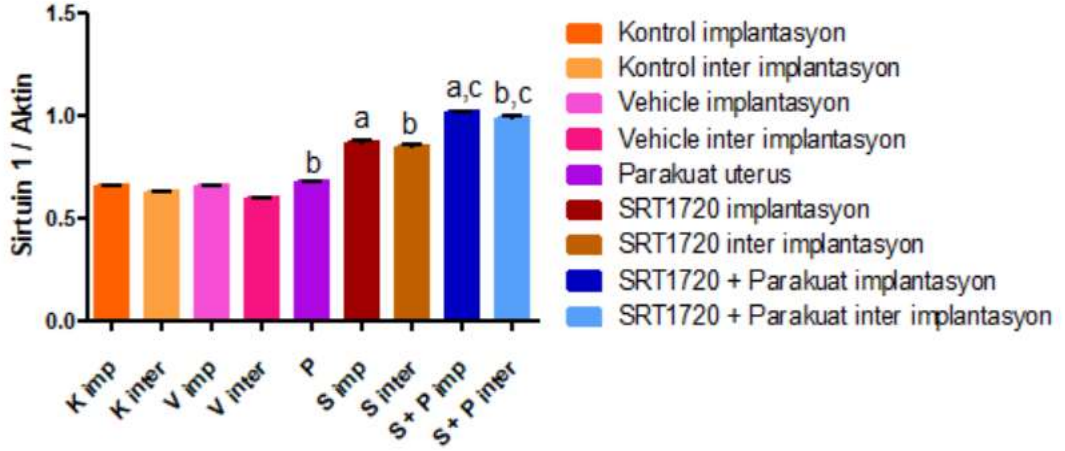
### 4.2.1. Sirtuin 1 Western Blotu

Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarından elde edilen implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Bütün gruplardaki Sirtuin 1 ekspresyonu ImageJ programı ile ölçülerek kantitatif olarak değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. 20. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan Sirtuin 1 ve Aktin Western blot sonuçları (imp: implantasyon bölgesi, inter: inter-implantasyon bölgesi).

Sirtuin 1 Western blot sonuçları Şekil 4.20’de ve analiz sonuçları Şekil 4.21’de gösterilmektedir. Kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kendi gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21).



**Şekil 4. 21.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan Sirtuin 1 ve Aktin Western blot analizi sonuçları (imp: implantasyon bölgesi, inter: inter-implantasyon bölgesi), a: K imp’ye göre, b: K inter’e göre ve c: P’ye göre anlamlı.

Kontrol ( $0,656 \pm 0,001$ ) ve vehicle ( $0,653 \pm 0,001$ ) gruplarının implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol ( $0,624 \pm 0,004$ ) ve vehicle ( $0,594 \pm 0,003$ ) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21).

Parakuat ( $0,679 \pm 0,001$ ) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu ile kontrol grubu implantasyon ( $0,656 \pm 0,001$ ) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Parakuat ( $0,679 \pm 0,001$ ) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol ( $0,624 \pm 0,004$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.20, Şekil 4.21).

SRT1720 (0,871±0,009) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol (0,656±0,001) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0.05). SRT1720 (0,851±0,006) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol (0,624±0,004) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0.05). SRT1720 grubu implantasyon (0,871±0,009) ve inter-implantasyon (0,851±0,006) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile parakuat (0,679±0,001) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.20, Şekil 4.21**).

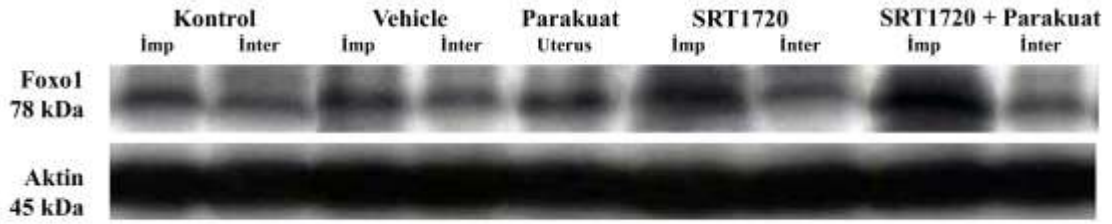
SRT1720 + parakuat (1,017±0,001) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol (0,656±0,001) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0.05). SRT1720 + parakuat (1,017±0,001) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile SRT1720 (0,871±0,009) grubu implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat (0,990±0,003) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol (0,624±0,004) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0.05). SRT1720 + parakuat (0,990±0,003) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu ile SRT1720 (0,851±0,006) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat grubu implantasyon (1,017±0,001) ve inter-implantasyon (0,990±0,003) bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun parakuat (0,679±0,001) grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0.05) (**Şekil 4.20, Şekil 4.21**).

Parakuat grubu uteruslarındaki Sirtuin 1 ekspresyonu kontrol grubu implantasyon ve inter-implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonuna kıyasla artmıştır. Parakuat grubu uteruslarında gerçekleşen Sirtuin 1 ekspresyon artışı parakuatın oluşturduğu oksidatif stresin ortadan kaldırılabilmesi için adaptif bir yanıt olarak gerçekleşmiş

olabilir. Sirtuin 1 aktivatörü olan SRT1720 uygulaması SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarının hem implantasyon hem inter-implantasyon bölgelerinde Sirtuin 1 ekspresyonunu arttırmıştır. Bu durum Sirtuin 1 aktivatörü olan SRT1720'nin Sirtuin 1 aktivitesini artırmanın yanısıra ekspresyonu üzerinde de transkripsiyonel düzeyde etkili olduğunu düşündürmüştür.

#### 4.2.2. FoxO1 Western Blotu

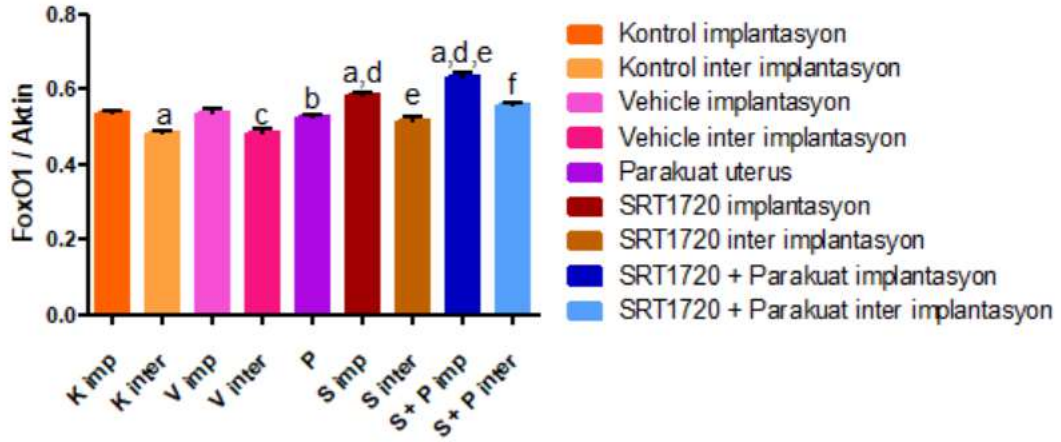
Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarından elde edilen implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Bütün gruplardaki FoxO1 ekspresyonu ImageJ programı ile ölçülerek kantitatif olarak değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



**Şekil 4. 22.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan FoxO1 ve Aktin Western blot sonuçları (imp: implantasyon bölgesi, inter: inter-implantasyon bölgesi).

FoxO1 Western blot sonuçları Şekil 4.22'de ve analiz sonuçları Şekil 4.23'te gösterilmektedir. Kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun kendi gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.22, Şekil 4.23).





**Şekil 4. 23.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan FoxO1 ve Aktin Western blot analizi sonuçları (imp: implantasyon bölgesi, inter: inter-implantasyon bölgesi), a: K imp'ye göre, b: K inter'e göre, c: V imp'ye göre, d: P'ye göre, e: S imp'ye göre, f: S+P imp'ye göre anlamlı.

Kontrol ( $0,540 \pm 0,004$ ) ve vehicle ( $0,540 \pm 0,006$ ) gruplarının implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol ( $0,486 \pm 0,005$ ) ve vehicle ( $0,483 \pm 0,010$ ) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.22, Şekil 4.23).

Parakuat ( $0,527 \pm 0,003$ ) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu ile kontrol ( $0,540 \pm 0,004$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Parakuat ( $0,527 \pm 0,003$ ) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonunun kontrol ( $0,486 \pm 0,005$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.22, Şekil 4.23).

SRT1720 ( $0,586 \pm 0,004$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun kontrol ( $0,540 \pm 0,004$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). SRT1720 ( $0,517 \pm 0,008$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun kontrol ( $0,486 \pm 0,005$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. SRT1720 ( $0,586 \pm 0,004$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun parakuat

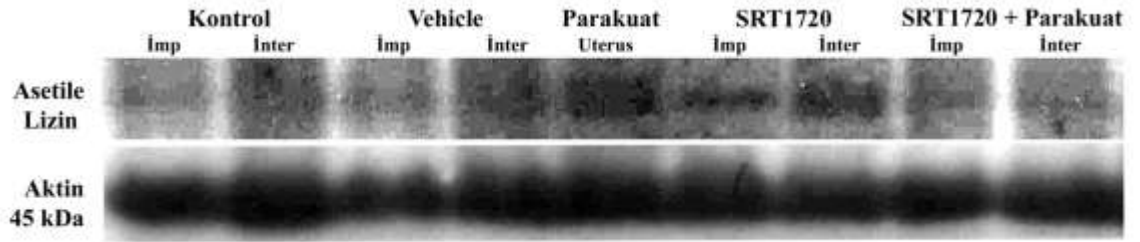
(0,527±0,003) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0.001). SRT1720 (0,517±0,008) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile parakuat (0,527±0,003) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonuna karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.22, Şekil 4.23**).

SRT1720 + parakuat (0,635±0,012) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun kontrol (0,540±0,004) ve SRT1720 (0,586±0,004) gruplarının implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0.001). SRT1720 + parakuat (0,519±0,006) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun kontrol (0,486±0,005) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. SRT1720 + parakuat (0,519±0,006) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile SRT1720 (0,517±0,008) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 + parakuat (0,635±0,012) grubu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonunun parakuat (0,527±0,003) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0.001). SRT1720 + parakuat (0,519±0,006) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu ile parakuat (0,527±0,003) grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.22, Şekil 4.23**).

Kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla azalmıştır. Parakuat grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu kontrol grubu implantasyon ve inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonuna kıyasla artmıştır. Parakuat grubu uteruslarında FoxO1 ekspresyonunun artması parakuatın oluşturduğu oksidatif stresin ortadan kaldırılabilmesi için gerçekleşmiş olabilir. SRT1720 uygulanan gruplarda FoxO1 ekspresyonunun artması Sirtuin 1'in FoxO1 ekspresyonu üzerinde etkili olduğunu ve Sirtuin 1 aktivasyonunun oksidatif stresle mücadele etmek için FoxO1 ekspresyonunu arttırmış olabileceğini düşündürmüştür.

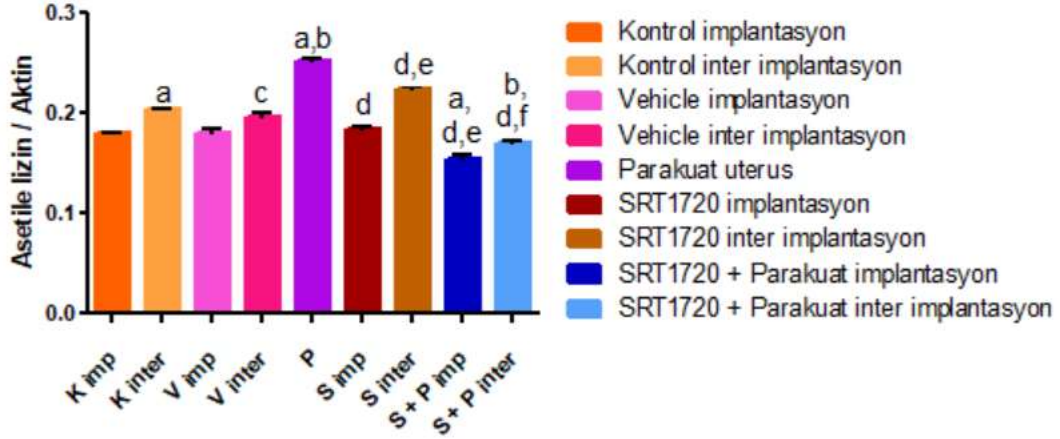
### 4.2.3. Asetile Lizin Western Blotu

Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarından elde edilen implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu Western blot yöntemi ile belirlendikten sonra membranlar strip edilerek asetile lizin antikoru ile muamele edilmiş ve FoxO1 ile aynı kilodaltondaki asetile lizin ekspresyonu belirlenmiştir. Bütün gruplarda FoxO1 hizasındaki asetile lizin ekspresyonu ImageJ programı ile ölçülerek kantitatif olarak değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



**Şekil 4. 24.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan Asetile lizin ve Aktin Western blot sonuçları (imp: implantasyon bölgesi, inter: inter-implantasyon bölgesi).

Asetile lizin Western blot sonuçları Şekil 4.24'te ve analiz sonuçları Şekil 4.25'te gösterilmektedir. Kontrol ( $p<0,001$ ), vehicle ( $p<0,001$ ) ve SRT1720 ( $p<0,05$ ) gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonunun kendi gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir. SRT1720 + parakuat grubu inter-implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonunun kendi grubuna ait implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonuna kıyasla artış gösterdiği ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir (**Şekil 4.24, Şekil 4.25**).



**Şekil 4. 25.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan Asetile lizin ve Aktin Western blot analizi sonuçları (imp: implantasyon bölgesi, inter: inter-implantasyon bölgesi), a: K imp'ye göre, b: K inter'e göre, c: V imp'ye göre, d: P'ye göre, e: S imp'ye göre, f: S inter'e göre anlamlı.

Kontrol (0,180±0,001) ve vehicle (0,180±0,003) gruplarının implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol (0,204±0,001) ve vehicle (0,200±0,003) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.24, Şekil 4.25).

Parakuat (0,252±0,002) grubu uteruslarındaki asetile lizin ekspresyonunun kontrol grubu implantasyon (0,180±0,001) ve inter-implantasyon (0,204±0,001) bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.24, Şekil 4.25).

SRT1720 (0,183±0,002) grubu implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonunun kontrol (0,180±0,001) grubu implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonuna oranla arttığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. SRT1720 (0,195±0,001) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonu ile kontrol (0,204±0,001) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SRT1720 grubunun implantasyon (0,183±0,002) ve inter-implantasyon (0,195±0,001) bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonunun parakuat (0,252±0,002) grubu uteruslarındaki asetile lizin

ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.24, Şekil 4.25).

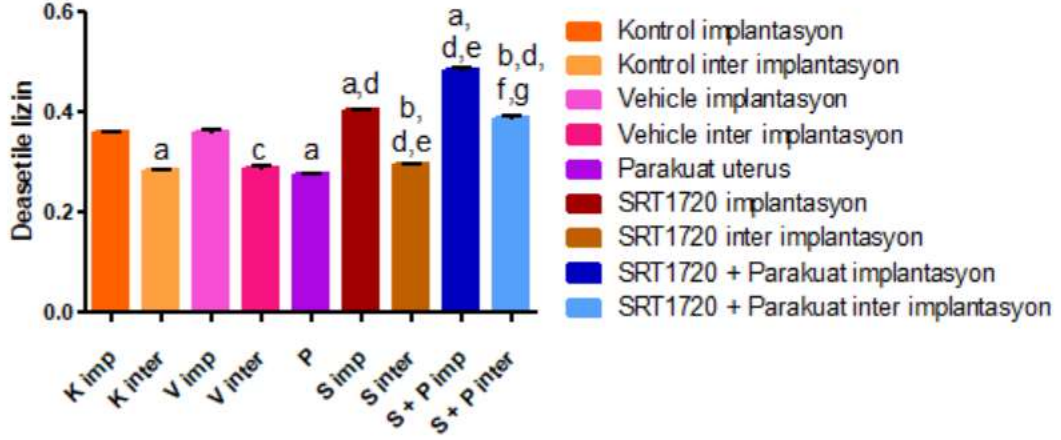
SRT1720 + parakuat ( $0,159\pm0,002$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonunun kontrol ( $0,180\pm0,001$ ) ve SRT1720 ( $0,183\pm0,002$ ) gruplarının implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 + parakuat ( $0,169\pm0,003$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonunun kontrol ( $0,204\pm0,001$ ) ve SRT1720 ( $0,195\pm0,001$ ) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 + parakuat grubu implantasyon ( $0,159\pm0,002$ ) ve inter-implantasyon ( $0,169\pm0,003$ ) bölgelerindeki asetile lizin ekspresyonunun parakuat ( $0,252\pm0,002$ ) grubu uteruslarındaki asetile lizin ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.24, Şekil 4.25).

Parakuat grubu uteruslarındaki asetile lizin (asetile FoxO1) miktarındaki artış parakuatın oluşturduğu oksidatif stresin FoxO1 asetilasyonunu artırdığını göstermiştir. SRT1720 grubundaki asetile FoxO1 miktarı kontrol grubundakine benzerdir. Ancak bu grupta FoxO1 ekspresyonu artmıştır bu da total FoxO1 asetilasyonunun azaldığını göstermektedir. SRT1720 ve parakuatın birlikte uygulandığı grupta asetile FoxO1 miktarının kontrol ve SRT1720 gruplarına göre daha da azaldığı gözlenmiştir. SRT1720 uygulanan gruplarda FoxO1 asetilasyonunun azalması SRT1720 ile aktive olan Sirtuin 1'in FoxO1 deasetilasyonu üzerinde etkili olduğunu düşündürmüştür.

#### **4.2.4. Deasetile FoxO1'in Belirlenmesi**

Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarından elde edilen implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ve aynı kilodaltondaki asetile lizin ekspresyonları Western blot yöntemiyle belirlenmiştir. Bütün gruplardaki FoxO1 ve asetile lizin ekspresyonları ImageJ programı ile ölçülerek kantitatif olarak belirlenmiştir. FoxO1 değerlerinden asetile lizin değerleri çıkarılarak deasetile FoxO1 miktarı elde edilmiştir ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Deasetile FoxO1 miktarının sonuçları Şekil 4.26’da gösterilmektedir. Kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarının kendi gruplarının implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.26).



**Şekil 4. 26.** Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda deasetile FoxO1 miktarlarını gösteren grafik (imp: implantasyon bölgesi, inter: inter-implantasyon bölgesi), a: K imp’ye göre, b: K inter’e göre, c: V imp’ye göre, d: P’ye göre, e: S imp’ye göre, f: S inter’e göre ve g: S+P imp’ye göre anlamlı.

Kontrol ( $0,360\pm0,001$ ) ve vehicle ( $0,359\pm0,003$ ) gruplarının implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarı karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol ( $0,282\pm0,001$ ) ve vehicle ( $0,283\pm0,003$ ) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarı karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.26).

Parakuat ( $0,275\pm0,002$ ) grubu uteruslarındaki deasetile FoxO1 miktarının kontrol grubu implantasyon ( $0,360\pm0,001$ ) bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). Parakuat ( $0,275\pm0,002$ ) grubu uteruslarındaki deasetile FoxO1 miktarı ile kontrol ( $0,282\pm0,001$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarı karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.26).

SRT1720 ( $0,402\pm 0,002$ ) grubunun implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarının kontrol ( $0,360\pm 0,001$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 ( $0,322\pm 0,001$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarının kontrol ( $0,282\pm 0,001$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 grubu implantasyon ( $0,402\pm 0,002$ ) ve inter-implantasyon ( $0,322\pm 0,001$ ) bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarının parakuat ( $0,275\pm 0,002$ ) grubu uteruslarındaki deasetile FoxO1 miktarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ) (**Şekil 4.26**).

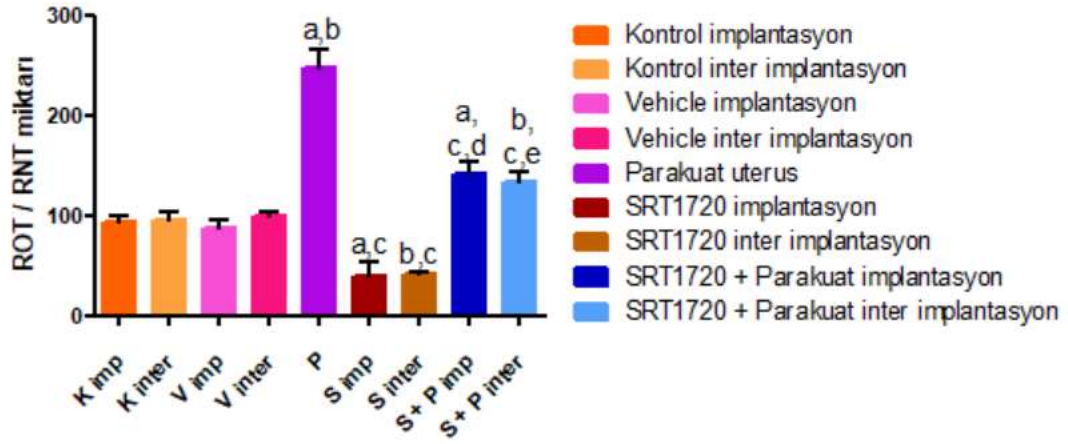
SRT1720 + parakuat ( $0,476\pm 0,002$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarının kontrol ( $0,360\pm 0,001$ ) ve SRT1720 ( $0,402\pm 0,002$ ) gruplarının implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 + parakuat ( $0,350\pm 0,003$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarının kontrol ( $0,282\pm 0,001$ ) ve SRT1720 ( $0,322\pm 0,001$ ) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 + parakuat grubu implantasyon ( $0,476\pm 0,002$ ) ve inter-implantasyon ( $0,350\pm 0,003$ ) bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarının parakuat ( $0,275\pm 0,002$ ) grubu uteruslarındaki deasetile FoxO1 miktarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ) (**Şekil 4.26**).

Parakuat grubu uteruslarındaki deasetile FoxO1 miktarı kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarının implantasyon bölgelerindeki deasetile FoxO1 miktarlarına kıyasla daha düşüktür. Bu durum parakuat grubu uteruslarında oksidatif strese bağlı FoxO1 asetilasyonundaki artış nedeniyledir. SRT1720 uygulanan gruplarda deasetile FoxO1 miktarının artması SRT1720 ile aktive olan Sirtuin 1'in FoxO1 deasetilasyonuna sebep olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte SRT1720 + parakuat grubunda deasetile FoxO1 miktarının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durum oksidatif stres oluşturulup SRT1720 uygulandığında FoxO1 deasetilasyonunun daha fazla indüklenmiş olabileceğini düşündürmüştür.

### 4.3. ROT/RNT Bulguları

Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarındaki farelere ait implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarı ELISA kiti kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiş ve bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

ROT/RNT ELISA sonuçları Şekil 4.27’de gösterilmektedir. Kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarları ile kendi gruplarına ait inter-implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4. 27. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan ROT/RNT ELISA sonuçlarını gösteren grafik. a: K imp’ye göre, b: K inter’e göre, c: P’ye göre, d: S imp’ye göre, e: S inter’e göre anlamlı.

Kontrol (94,0±6,1) ve vehicle (87,4±8,0) gruplarının implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol (95,6±7,6) ve vehicle (99,3±3,4) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarları karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.27).

Parakuat (247,0±19,2) grubu uteruslarındaki ROT/RNT miktarlarının kontrol grubu implantasyon (94,0±6,1) ve inter-implantasyon (95,6±7,6) bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0,001) (Şekil 4.27).



SRT1720 ( $39,6\pm 13,1$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarının kontrol ( $94,0\pm 6,1$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 ( $40,8\pm 2,9$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarının kontrol ( $95,6\pm 7,6$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 grubu implantasyon ( $39,6\pm 13,1$ ) ve inter-implantasyon ( $40,8\pm 2,9$ ) bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarının parakuat ( $247,0\pm 19,2$ ) grubu uteruslarındaki ROT/RNT miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ) (**Şekil 4.27**).

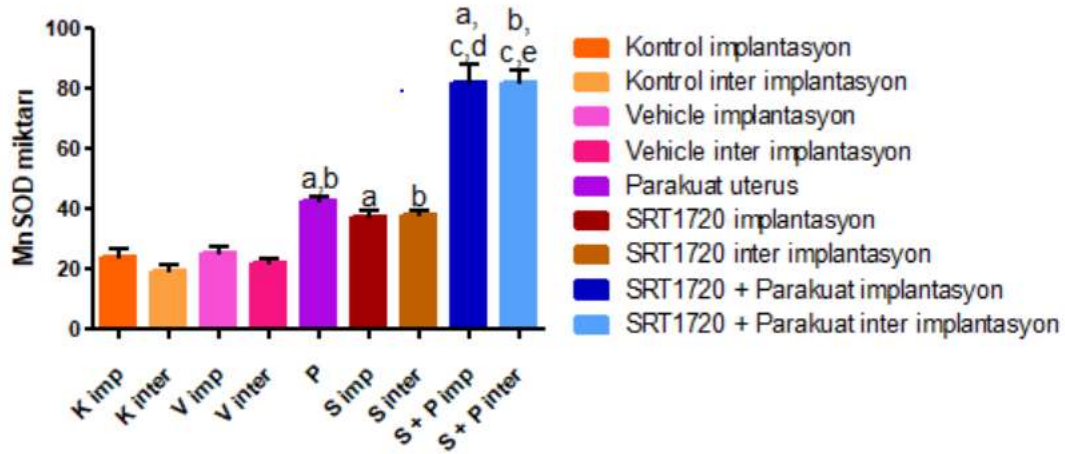
SRT1720 + parakuat ( $142,4\pm 10,5$ ) grubu implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarının kontrol ( $94,0\pm 6,1$ ) ve SRT1720 ( $39,6\pm 13,1$ ) gruplarının implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 + parakuat ( $132,9\pm 10,1$ ) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarının kontrol ( $95,6\pm 7,6$ ) ve SRT1720 ( $40,8\pm 2,9$ ) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). SRT1720 + parakuat grubu implantasyon ( $142,4\pm 10,5$ ) ve inter-implantasyon ( $132,9\pm 10,1$ ) bölgelerindeki ROT/RNT miktarlarının parakuat ( $247,0\pm 19,2$ ) grubu uteruslarındaki ROT/RNT miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ) (**Şekil 4.27**).

Parakuat, oksidatif stres oluşturan bir kimyasal olduğu için uygulandığı grubun uteruslarında reaktif oksijen ve nitrojen türleri beklenildiği gibi artmıştır. SRT1720 + parakuat grubunda da reaktif oksijen ve nitrojen türleri artmış ancak Sirtuin 1 aktivatörü SRT1720 uygulaması nedeniyle bu artış parakuat grubundaki kadar fazla olmamıştır. SRT1720 uygulanan gruptaki reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin kontrol grubundakine oranla daha da az olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar SRT1720 uygulanan gruplarda aktive olan Sirtuin 1'in reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin ortadan kaldırılmasında rol oynadığını ortaya koymuştur.

#### 4.4. Mangan Süperoksit Dismutaz (MnSOD) Bulguları

Çalışmamızda gebeliğin 5. günündeki kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarındaki farelere ait implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarı ELISA kiti kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir ve bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

MnSOD ELISA sonuçları Şekil 4.28’de gösterilmektedir. Kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarları ile kendi gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4. 28. Gebeliğin 5. günündeki deney gruplarına ait implantasyon ve inter-implantasyon bölgeleri ile uteruslarda yapılan MnSOD ELISA sonuçlarını gösteren grafik. a: K imp’ye göre, b: K inter’e göre, c: P’ye göre, d: S imp’ye göre, e: S inter’e göre anlamlı.

Kontrol (23,9±2,4) ve vehicle (25,4±2,0) gruplarının implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol (18,9±2,1) ve vehicle (21,5±1,6) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarları karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.28).

Parakuat (42,4±1,1) grubu uteruslarındaki MnSOD miktarlarının kontrol grubu implantasyon (23,9±2,4) ve inter-implantasyon (18,9±2,1) bölgelerindeki MnSOD miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0,001) (Şekil 4.28).

SRT1720 (36,9±2,5) grubu implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarlarının kontrol (23,9±2,4) grubu implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0,05). SRT1720 (37,8±1,4) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarlarının kontrol (18,9±2,1) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0,001). SRT1720 grubu implantasyon (36,9±2,5) ve inter-implantasyon (37,8±1,4) bölgelerindeki MnSOD miktarları ile parakuat (42,4±1,1) grubu uteruslarındaki MnSOD miktarları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 4.28**).

SRT1720 + parakuat (81,8±5,8) grubu implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarlarının kontrol (23,9±2,4) ve SRT1720 (36,9±2,5) gruplarının implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0,001). SRT1720 + parakuat (81,9±3,9) grubu inter-implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarlarının kontrol (18,9±2,1) ve SRT1720 (37,8±1,4) gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki MnSOD miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0,001). SRT1720 + parakuat grubu implantasyon (81,8±5,8) ve inter-implantasyon (81,9±3,9) bölgelerindeki MnSOD miktarlarının parakuat (42,4±1,1) grubu uteruslarındaki MnSOD miktarlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0,001) (**Şekil 4.28**).

Parakuat grubunda artan oksidatif strese yanıt olarak MnSOD miktarı artmıştır. SRT1720 grubunda da MnSOD miktarı artış göstermiştir. SRT1720 grubundaki MnSOD artışının SRT1720 uygulaması ile Sirtuin 1'in aktive olması sonucunda gerçekleştiğini düşünmekteyiz. SRT1720 ve parakuatın birlikte uygulandığı gruptaki MnSOD miktarı sadece parakuat ya da sadece SRT1720 uygulanan gruplara oranla daha fazla artmıştır. Bu artışın hem oksidatif strese yanıt olarak hem de SRT1720 uygulaması sonucu Sirtuin 1'in aktive olması nedeniyle gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

Parakuat grubunda MnSOD miktarının artması ancak bu artışa rağmen embriyo implantasyonunun gerçekleşmemesi üretilen MnSOD'nin ROT/RNT miktarını ortadan kaldırmada yetersiz kaldığını ve bu nedenle embriyo implantasyonunun gerçekleşmediğini düşündürmüştür. SRT1720 uygulanan gruplarda Sirtuin 1

aktivasyonu sonucu FoxO1'in deasetilasyonunun ve MnSOD ekspresyonunun arttığını ve buna bağlı olarak ROT/RNT miktarının anlamlı olarak azaldığını düşünmekteyiz. Benzer şekilde SRT1720 + parakuat grubunda hem oksidatif strese yanıt olarak hem de Sirtuin 1 aktivasyonu ile FoxO1'in deasetillenmesi sonucu MnSOD ekspresyonunun artması ile ROT/RNT miktarının azaldığını ve bunun sonucunda embriyo implantasyonunun gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

## 5. TARTIŞMA

Memelilerde implantasyon, embriyonun maternal uterusu yerleşmesi sürecidir. İmplantasyon boyunca embriyo ve uterus arasındaki karşılıklı konuşmanın sırları henüz tam olarak aydınlatılamamış ve hala merak edilen bir konudur. İnsanlarda embriyo ile uterus etkileşimlerini moleküler düzeyde incelemede yaşanan zorluklar ve etik kısıtlamalar embriyo-uterus etkileşimlerinin direk analizini önlemektedir. Bu nedenle bu alandaki bilgilerin çoğu kemirgenlerde özellikle de fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmektedir (H. Wang ve Dey, 2006; S. Zhang ve ark., 2013).

Başarılı bir implantasyon için embriyonun blastosist aşamasına ve uterusun reseptif aşamaya senkronize bir şekilde gelmesi kritik bir öneme sahiptir. İmplantasyon için uterus reseptivitesi sınırlı bir zamanda gerçekleşir ve ovaryum steroid hormonları tarafından düzenlenen bu zaman implantasyon penceresi olarak adlandırılır. İmplantasyonda rol alan sinyal moleküllerinin birlikte düzenlenmesi bu sürecin oldukça karmaşık hale gelmesine neden olmaktadır (Matsumoto, 2017).

İnsanlarda özellikle ilk trimesterde birçok gebelik kayıpları yaşanmaktadır (Liang ve ark., 2017; Vasquez ve ark., 2018). Yardımcı üreme teknikleriyle bazı bireylerin infertilite problemleri çözümlenmesine rağmen implantasyon başarısızlığı hala gebelik kayıplarını etkileyen önemli bir sorundur. Bu durum, embriyo implantasyonunda rol alan mekanizmaların araştırılmasını daha da önemli hale getirmektedir (Aplin ve Ruane, 2017; Liang ve ark., 2017; Paul ve ark., 2019).

Organizmada serbest radikallerin oluşması ile bunların ortadan kaldırılmasının denge içerisinde olduğu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Serbest radikallerin oluşumundaki artış ya da yok edilmesindeki düşüş bu dengenin bozularak oksidatif stres (OS) olarak adlandırılan durumun ortaya çıkmasına neden olur. Oksidatif stres serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengesizliği göstermekte olup sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Kohen ve Nyska, 2002).

OS fertilité üzerinde etkilidir ve infertilitenin etiopatogenezinde rol oynar (A. Agarwal ve ark., 2005). Reaktif oksijen türlerinin (ROT) yüksek düzeyleri hem doğal hem

yardımla üremede fertilité potansiyeline zararlıdır (Y. Wang ve ark., 1997). Polak ve arkadaşları (1999) idiyopatik infertilite teşhisi almış kadınların periton sıvılarında lipit peroksidasyon ürünü olan malondialdehitin kontrol grubu kadınlara kıyasla arttığını ve antioksidan konsantrasyonlarının kontrol grubu kadınlara kıyasla azaldığını rapor etmişlerdir (Polak ve ark., 1999).

Liu ve arkadaşları (2014) gebeliğin 1. günündeki farelerde hareketsizlik stresi meydana getirdikleri çalışmalarında gebeliğin 5. gününde implantasyon bölge sayılarının azaldığını, maternal plazma kortikosteron düzeylerinin arttığını, uterusda malondialdehit düzeylerinin artıp glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) miktarlarının azaldığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar hareketsizlik stresinin farede implantasyon başarısının düşmesine neden olduğu yorumunu yapmışlardır (G. Liu ve ark., 2014).

Parakuat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinyum diklorid) yaygın olarak kullanılan bir herbisittir. Parakuat hücreye girdiğinde elektron redüksiyonu/oksidasyonuna uğrayarak süperoksit anyonları, hidroksil ve peroksil radikalleri gibi ROT'lerin oluşumuna neden olur (Gawarammana ve Buckley, 2011; Blanco-Ayala ve ark., 2014). Bu nedenle birçok organizmada oksidatif stres yaratmak amacıyla kullanılmaktadır.

Parakuatın oksidatif stres oluşturarak embriyo gelişimini ve implantasyonunu olumsuz etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hausburg ve ark., 2005; Hirota ve ark., 2010; Ait-Bali ve ark., 2016; Almeida ve ark., 2017). Hirota ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları çalışmada kontrol grubu farelere 30 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanan parakuatın embriyo gelişimine zarar vermeden implantasyonu engellediği gösterilmiştir (Hirota ve ark., 2010). Parakuat uygulanan farelerde düzgün morfolojili blastosistler embriyoların sağlıklı olduğunu ve uygulanan parakuat dozunun embriyo gelişimini etkilemediğini göstermiştir.

Sirtuinler, bakterilerden memelilere kadar neredeyse tüm türlerde bulunan yüksek derecede korunmuş protein ailesidir. Sirtuinler, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)+ bağımlı histon/protein deasetilazlardır. Sirtuin 1'in strese direnç, apoptoz, senesens, yaşlanma ve inflamasyon süreçlerinde farklı roller oynadıkları bilinmektedir (Chung ve ark., 2010; Rahman ve ark., 2012; Yao ve ark., 2012; Yao ve Rahman, 2012). Sirtuin 1

bu fonksiyonları çoğunlukla histon, p53, fork head boxO (FoxO), nükleer faktör-κB (NF-κB), peroksizom proliferatör-aktive reseptör γ koaktivator1α (PGC-1α) ve Ku70 gibi transkripsiyon faktörleri veya ko-aktivatörleri deasetile ederek gerçekleştirir (Sauve ve ark., 2006; Chung ve ark., 2010; Rahman ve ark., 2012; Yao ve ark., 2012; Yao ve Rahman, 2012). Sirtuin 1 strese yanıt veren faktörleri deasetile ederek memelilerde oksidatif stresi regüle eder (Y. Li ve ark., 2008; Yao ve ark., 2013). OS durumunda Sirtuin 1, FoxO, p53, p21, p16 ile DNA hasarı ve tamirinde rol alan molekülleri düzenleyerek koruma sağlar (Furukawa ve ark., 2007; Yao ve Rahman, 2012; Xia ve ark., 2015).

Sirtuinlerin embriyo implantasyonunda rolü olup olmadığıyla ilgili literatürdeki tek yayın Shirane ve arkadaşlarının (2012) *in vitro*da yaptıkları çalışmadır. Literatürde sirtuinlerin embriyo implantasyonundaki muhtemel rollerini araştıran *in vivo* bir çalışma bulunmamaktadır.

Shirane ve arkadaşları (2012) Ishikawa ve RL95-2 endometriyal karsinoma hücrelerini kullanarak yaptıkları çalışmalarında Sirtuin 1'in E-kaderin ekspresyonunu düzenleyerek implantasyonun ilk basamaklarında önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir (Shirane ve ark., 2012).

FoxO'lar forkhead box protein ailesine ait olup oldukça korunmuş DNA bağlanma domeynleri ile karakterizedirler. FoxO transkripsiyon faktörleri apoptoz, hücre siklusu, DNA hasar tamiri, oksidatif stres, hücre farklılaşması, glukoz metabolizması ve diğer hücre fonksiyonlarda rol alan genlerin ekspresyonunu düzenlerler. FoxO'nun hedefleri arasında hücre siklusunun duraklatılması (p21, p27), ROT detoksifikasyonu (MnSOD), programlı hücre ölümü (Fas, Bim) ve glukoz metabolizmasında (G6PC) rol alan genler yer almaktadır (Oellerich ve Potente, 2012). FoxO'ların transkripsiyon ürünleri çeşitli post-translasyonel modifikasyonlarla (PTM) düzenlenir. Bunun sonucunda FoxO'ların transkripsiyonel aktivitesi, DNA'ya bağlanması, hücre içi yerleşimi ve protein stabilitesi düzenlenir. FoxO proteinlerinin Sirtuin 1 bağımlı deasetilasyonu hücre siklusu inhibisyonu ve strese direnci indüklerken pro-apoptotik genlerin aktivasyonunu engeller. FoxO proteinleri doku tipine ve gelişim basamağı ya da

farklılaşma safhasına bağlı olarak eksprese edilir (Kajihara ve ark., 2009; Maiese ve ark., 2009).

Yapılan çalışmalarda *in vivo* ve *in vitro* desidualize olan insan endometriyum stroma hücrelerinde (ESH) FoxO1'in indüklendiği buna karşın FoxO3'ün baskılandığı gösterilmiştir (Christian ve ark., 2002; J. J. Kim ve ark., 2003; Labied ve ark., 2006). OS varlığında FoxO3'ün aktivasyonu apoptoza yol açarken FoxO1 farklılaşma ve strese direnç genlerini aktive etmektedir. Araştırmacılar ESH farklılaşması üzerine FoxO1'in MnSOD ekspresyonunu indükleyerek desidua hücrelerinin OS ile mücadele yeteneğini artırdığını; FoxO3'ün baskılanması ile apoptozun gerçekleşmediği yorumunu yapmışlardır (Kajihara ve ark., 2006).

Tüm bu literatür bilgileri ışığında ve Sirtuin 1'in farelerde embriyo implantasyonunda rol alıp almadığı ile ilgili literatürde *in vivo* bir çalışma bulunmaması nedeniyle hipotezimizi "Sirtuin 1 parakuat ile indüklenen oksidatif strese karşı embriyo implantasyonunu FoxO1 aracılığıyla korur" şeklinde kurmuştuk. Bu hipotezden yola çıkarak çalışmamızın amacı "parakuat ile oksidatif stres oluşturulacak ve Sirtuin 1 aktivatörü SRT1720 uygulanacak gebe farelerde Sirtuin 1, Sirtuin 1 tarafından deasetile edilen ve oksidatif stresi modüle ettiği bilinen FoxO1 transkripsiyon faktörü ekspresyonları ile FoxO1'in ekspresyonunu düzenlediği bir antioksidan olan mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) miktarını belirlemektir" şeklindeydi.

Hipotezimizi test etmek amacıyla deney gruplarımızı şu şekilde oluşturduk: hiçbir enjeksiyon yapmadığımız ve gebeliğin 5. günü sakrifiye ettiğimiz **kontrol grubu**, gebeliğin 1, 2, 3 ve 4. günleri boyunca Sirtuin 1 aktivatörü olan SRT1720'nin içerisinde çözüldüğü %5 DMSO, %30 PEG400, %2 Tween-80 karışımı ve gebeliğin 4. günü parakuatın içerisinde çözüldüğü %0.9 NaCl'nin enjekte edildiği **vehicle grubu**, gebeliğin 4. günü sabahı 30 mg/kg parakuatın enjekte edildiği **parakuat grubu**, gebeliğin 1, 2, 3 ve 4. günleri boyunca 50 mg/kg SRT1720'nin enjekte edildiği **SRT1720 grubu** ve gebeliğin 1, 2, 3 ve 4. günleri boyunca 50 mg/kg SRT1720 ile gebeliğin 4. günü sabahı SRT1720 enjeksiyonundan yarım saat sonra 30 mg/kg parakuatın enjekte edildiği **SRT1720 + parakuat grubu**. Tüm deney gruplarındaki fareler gebeliğin 5. günü Chicago mavisini enjeksiyonunu takiben sakrifiye edilip



implantasyon bölge sayıları not edilmiş ve implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgeleri alınmıştır.

Deney gruplarının implantasyon bölge sayılarını karşılaştırdığımızda parakuat enjekte ettiğimiz farelerde literatür ile uyumlu olarak hiç implantasyon bölgesi gözlemedik (Hirota ve ark., 2010). Uterus boynuzunu yıkadığımızda elde ettiğimiz blastosistler düzgün morfolojili ve sağlıklıydı. Bu da enjekte ettiğimiz parakuat dozunun embriyo gelişimine zarar vermeden implantasyonu engellediğini doğruladı. Hem SRT1720 hem parakuat enjekte ettiğimiz farelerin bazılarında implantasyon gerçekleşmezken bazılarında implantasyon gerçekleşmişti. Bu sonuçlar uyguladığımız Sirtuin 1 aktivatörü SRT1720'nin parakuat ile oksidatif stres oluşturulan farelerin bazılarında implantasyonun gerçekleşmesini sağladığını gösterdi. Ancak farelerin bir kısmında implantasyon gerçekleşmezken implantasyon gerçekleşenlerde de implantasyon bölge sayılarının kontrole oranla daha az olması literatür taraması yaparak belirlediğimiz SRT1720 dozunun (50 mg/kg) yeterli gelmediğini düşündürmüştür.

Sirtuin 1'in aktivasyonunu resveratrol gibi doğal polifenolik bileşenlerin yanısıra sentetik olarak üretilen farmakolojik aktivatörler de sağlamaktadır. Bunlardan birisi SRT1720'dir. SRT1720'nin Sirtuin 1'i resveratrol'den 1000 kat daha fazla aktive ettiği rapor edilmiştir (Milne ve ark., 2007). Bu nedenle biz çalışmamızda Sirtuin 1 aktivatörü olarak SRT1720 kullandık. SRT1720 uygulamasının yüksek yağla beslenen ve yaşlı farelerdeki metabolik defektleri iyileştirdiği (Feige ve ark., 2008; Minor ve ark., 2011), obez dişi farelerde folikül rezervini iyileştirdiğini (Zhou ve ark., 2014) gösteren çalışmaların yanısıra bu aktivatörün kullanıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır.

Sirtuin 1 immünohistokimya sonuçlarımıza göre deney gruplarına ait implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerinde Sirtuin 1'in farklı yoğunlukta olmakla birlikte çoğunlukla lümen, bez epiteli ve stroma hücrelerinde nükleer olarak eksprese edildiği gözlenmiştir. Lümen ve bez epitelinde yapılan H-Score SRT1720 + parakuat grubunda Sirtuin 1 ekspresyonunun arttığını; stromada yapılan H-Score ise Sirtuin 1 ekspresyonu açısından gruplar arasında bir farklılık olmadığını göstermiştir.

Sirtuin 1 Western blot sonuçlarımıza göre SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarına ait implantasyon bölgelerindeki Sirtuin 1 ekspresyonu artış göstermiştir.

Sirtuin 1 için yaptığımız immünohistokimya ve Western blot sonuçlarına göre SRT1720 uygulaması SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarında Sirtuin 1 ekspresyonunun artmasına neden olmuştur. Bu durum SRT1720'nin Sirtuin 1 aktivitesini artırmasının yanı sıra ekspresyonu üzerinde de transkripsiyonel düzeyde etkili olabileceğini göstermiştir.

Sirtuin 1'in çeşitli molekülleri deasetile ederek oksidatif strese yanıtın düzenlenmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir (Y. Li ve ark., 2008; Yao ve ark., 2013). Oksidatif stres ise Sirtuin 1'in aktivitesini gen ekspresyonu, post-translasyonel modifikasyon ve nükleositol plazmik taşınımını düzenleyerek etkiler (Hwang ve ark., 2013). Yapılan bazı çalışmalarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen OS'ye yanıt olarak Sirtuin 1'in sitoplazmik lokalize olduğu gösterilmiştir (Jin ve ark., 2007; Caito ve ark., 2010). He ve arkadaşlarının nükleus pulposus hücrelerinde yaptıkları çalışmada ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonrasında Sirtuin 1'in nükleer lokalize olduğu ve sitoplazmaya translokasyonun olmadığı gösterilmiştir (He ve ark., 2019). Biz de çalışmamızda parakuat uygulaması ile oluşturduğumuz OS sonucunda Sirtuin 1'in nükleer lokalizasyonuna devam ettiğini gösterdik. Bu durum Sirtuin 1'in nükleositol plazmik taşınmasının doku ve hücre spesifik olduğunu doğrulamaktadır.

Li ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2016) parakuat uyguladıkları farelerin akciğerlerindeki Sirtuin 1 ekspresyonunun kontrol grubu farelere kıyasla arttığını, parakuatın yanı sıra Sirtuin 1 aktivatörü resveratrol uyguladıkları grupta Sirtuin 1 ekspresyonunun daha da arttığını göstermişlerdir (S. Li ve ark., 2016). Aynı grup yaptıkları diğer bir çalışmada fare tip 2 alveolar epitel hücrelerine farklı dozlarda parakuat uygulamıştır. Belli bir seviyeye kadar parakuat dozu arttıkça Sirtuin 1 ekspresyonunun arttığını ancak belli bir seviyeden sonra doz artırılrsa bile Sirtuin 1 ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (Ding ve ark., 2016). Çalışmamızda parakuat uyguladığımız gruba ait uteruslarda Sirtuin 1 ekspresyonunda bir artış gözlemlememiz kullandığımız parakuat dozu ile ilgili olabilir.

Sirtuin 1'in hedeflerinden biri olan FoxO'lar oksidatif strese karşı direncin sağlanmasında rol almaktadırlar (Zhao ve ark., 2017). FoxO1 immünohistokimya sonuçlarımıza göre deney gruplarına ait implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerinde FoxO1'in farklı yoğunlukta olmakla birlikte çoğunlukla lümen ve bez epitelinde ekspresyon edildiği, stroma hücrelerinde ekspresyonunun çok az olduğu, stromada yer alan kan damarlarındaki endotel hücrelerinde ekspresyonunun olduğu gözlemlendi. H-Score analizine göre kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarının inter-implantasyon bölgelerinin lümen epitelindeki FoxO1 ekspresyonu implantasyon bölgelerine kıyasla anlamlı olarak azalmıştı. İlginç olarak FoxO1 kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarında embriyonun bulunduğu antimezometriyal bölge lümen epitelinde daha çok sitoplazmik olarak lokalizeyken embriyonun bulunmadığı antimezometriyal bölge lümen epiteli ile mezometriyal bölge lümen epitelinde daha çok nükleer olarak lokalizeydi.

Li ve arkadaşları (2015) implantasyon sırasında lümen epiteli hücreleri ile direkt iletişimde bulunan trofoblast hücrelerinin kaspaz-3 aktivasyonu olmadan yani apoptoz gerçekleşmeden lümen epiteli hücrelerini yuttuğunu yani entoz gerçekleştirdiğini daha sonra lümen epiteli hücrelerinde apoptoz gerçekleştiğini göstermişlerdir (Y. Li ve ark., 2015). Adıgüzel ve arkadaşları (2019) gebeliğin 5. gününde embriyonun bulunduğu bölgelerde FoxO1'in sitoplazmik lokalizasyonunun entoz için gerekli olduğunu ve böylece lümen epiteli hücrelerinin apoptozdan kaçtığı yorumunu yapmışlardır (Adıgüzel ve ark., 2019).

Parakuat grubu uteruslarındaki FoxO1 ekspresyonu antimezometriyal kutupta nükleer ve daha yoğunken mezometriyal kutuptaki sitoplazmik ve yoğunluğu daha azdı.

Qiang ve arkadaşları (2010) HEK-293 hücre hattı ile yaptıkları çalışmada FoxO1'in asetilasyonunun azalmasıyla nükleer olarak alıkonduğunu ve asetilasyon artışıyla ise sitoplazmaya transloke olduğunu göstermişlerdir (Qiang ve ark., 2010). Parakuat grubu uteruslarının mezometriyal kutbundaki sitoplazmik yerleşim asetilasyon artışı nedeniyle olabilir. FoxO1'in anti-mezometriyal kutup lümen epitelinde nükleer lokalize olması buradaki hücrelerin implante olabilecek bir embriyo ihtimaline karşı oksidatif stres ile mücadele için adaptif bir yanıt olarak gerçekleştirdiklerini düşündürmüştür.

FoxO1 için yaptığımız Western blot sonuçlarına göre kontrol, vehicle, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarının inter-implantasyon bölgelerindeki ekspresyon implantasyon bölgelerine oranla azalmıştır ve bu bulgumuz Adıgüzel ve arkadaşlarının (2019) çalışmasıyla uyumludur (Adıgüzel ve ark., 2019). SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarında implantasyon bölgelerindeki FoxO1 ekspresyonu artış göstermiştir. Benzer şekilde He ve arkadaşları (2019) sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + resveratrol uyguladıkları nükleus pulposus hücrelerinde FoxO1 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (He ve ark., 2019). Bu bize Sirtuin 1'in SRT1720 tarafından aktive olmasını takiben oksidatif stresle mücadele için FoxO1 ekspresyonunun arttığını düşündürmüştür.

Memelilerde Sirtuin 1'in FoxO1'i deasetilleyerek transkripsiyonel aktivitesini düzenlediği ve böylece oksidatif strese direnç sağlandığı bilinmektedir (Daitoku ve ark., 2004; Qiao ve Shao, 2006; Banks ve ark., 2008). FoxO proteinleri deasetile olduktan sonra MnSOD gibi genlerin promotörüne bağlanıp transkripsiyonlarını düzenleyerek oksidatif stresin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynarlar (Huang ve Tindall, 2007).

Çalışmamızda deasetile FoxO1 miktarı Western blot ile belirlenmiştir. Parakuat grubu uteruslarında FoxO1 asetilasyonu artmış yani deasetile FoxO1 miktarı azalmıştır. Parakuat grubunda deasetile FoxO1 miktarının azalması parakuat indüklü oksidatif stresin FoxO1 asetilasyonunu artırdığını literatür ile uyumlu bir şekilde göstermiştir. SRT1720 uygulanan grupta deasetile FoxO1 miktarının arttığı, SRT1720 ve parakuatın birlikte uygulandığı gruplarda ise deasetile FoxO1 miktarının daha da arttığı gözlenmiştir. Bu durum hem oksidatif stres oluşturulup hem SRT1720 uygulandığında FoxO1 deasetilasyonunun daha fazla indüklenmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Deney gruplarımızdaki ROT ve RNT miktarlarını ELISA kiti ile belirledik. Parakuat uyguladığımız farelerin uteruslarındaki ROT/RNT miktarı diğer deney gruplarının implantasyon ve inter-implantasyon bölgelerine göre artmıştı. Bu sonuçlar parakuat enjeksiyonunun literatürde belirtildiği gibi oksidatif strese yol açtığını doğrulamıştır. SRT1720 ve parakuatın birlikte uygulandığı gruplarda ROT/RNT miktarının parakuat grubuna kıyasla azaldığını ancak kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğunu gözlemledik. Ayrıca SRT1720 uygulanan gruptaki ROT/RNT miktarının kontrol grubundan bile daha

az olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar enjekte edilen Sirtuin 1 aktivatörü SRT1720'nin ROT/RNT miktarının ortadan kaldırılmasındaki rolünü ortaya koymuş oldu.

Deney gruplarımızda ELISA ile belirlediğimiz MnSOD miktarlarının kontrol grubuna kıyasla parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarında arttığını belirledik. SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarındaki MnSOD artışının bu gruplarda deasetile FoxO1 miktarlarının artmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Deasetillenerek aktivasyonu artan FoxO1 MnSOD transkripsiyonunu arttırmış olabilir. Parakuat grubu uteruslarındaki deasetile FoxO1 miktarının düşük olması bu gruptaki MnSOD artışının başka bir mekanizma ile gerçekleşiyor olabileceğini düşündürmüştür.

Ho ve arkadaşları (1998) SOD<sup>-/-</sup> dişi farelerin fertilitelerindeki azalışın embriyo implantasyonundaki başarısızlık nedeniyle olabileceğini söylemişlerdir (Ho ve ark., 1998). Sugino ve arkadaşları (1996) menstrual siklusun farklı evrelerinde bez epiteli ve stroma hücrelerinde SOD ekspresyonunun yüksek olmasının endometriyum fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceği yorumunu yapmışlardır (Sugino ve ark., 1996). Zhang ve arkadaşları (2018) genç farelere oranla yaşlı farelerde uterus ve ovaryum dahil olmak üzere üreme organlarında SOD aktivitesi ve total antioksidan kapasitesinin azaldığını göstererek yaşlanmayla üreme organlarında aşırı ROT birikiminin üremenin azalmasında etkili faktörlerden biri olduğu yorumunu yapmışlardır (L. Zhang ve ark., 2018).

Daha önce yapılan çalışmalarda Sirtuin 1 ile oksidatif stres arasındaki ilişki farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin, Alcendor ve arkadaşları (2007) Sirtuin 1'in kalpte overeksprese edildiği transgenik farelerde parakuat ile oluşturulan oksidatif strese cevaben Sirtuin 1 aracılığıyla FoxO3 deasetilasyonunun katalaz ekspresyonunu artırarak farelerin kalbini strese karşı koruduğunu göstermişlerdir (Alcendor ve ark., 2007).

Hasegawa ve arkadaşları (2008) oksidatif stres indükleyici ajan olan hidrojen peroksitin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Sirtuin 1 ve katalaz ekspresyonunu upregüle ederek renal tübül hücrelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indüklü apoptoza karşı korunduğunu göstermişlerdir (Hasegawa ve ark., 2008).

Li ve arkadaşları (2015) parakuata maruz bıraktıkları farelerin akciğerlerindeki Sirtuin 1 ve antioksidan Nrf2 ekspresyonunun kontrol grubu farelere kıyasla arttığını, hem parakuat hem Sirtuin 1 aktivatörü resveratrol uyguladıkları grupta Sirtuin 1 ve Nrf2 ekspresyonlarının daha da arttığını ve bu grupta SOD ve katalaz aktivitelerinin artarak oksidatif stresin neden olduğu akciğer hasarının azaldığını göstermişlerdir (S. Li ve ark., 2016). Aynı grup fare tip 2 alveolar epitel hücrelerinde yaptıkları diğer çalışmalarında (Ding ve ark., 2016) Sirtuin 1'in Nrf2'yi deasetile ederek transkripsiyonel aktivitesini artırdığını; Nrf2'nin alt yolağında bulunan SOD ve hemeoksijenaz-1 anti-oksidanlarının ekspresyonuyla ROT düzeylerini azaltarak OS'ye karşı direncin sağlandığı yorumunu yapmışlardır.

Benzer bir diğer çalışmada Yao ve arkadaşları (2014) rat akciğerlerinde sigara dumanının indüklediği oksidatif stresin Sirtuin 1 over-ekspresyonu ve SRT1720 uygulaması ile ortadan kaldırıldığını; bunu da aktive olan Sirtuin 1'in FoxO3 aracılığıyla MnSOD ekspresyonunu artırarak gerçekleştirdiğini söylemişlerdir (Yao ve ark., 2014).

Aşırı oksidatif stres ve artmış hücre ölümünün tekrarlayan birinci trimester gebelik kaybından preeklampsi ve fetal büyüme geriliğine kadar birçok gebelik bozukluğunda rol aldığı bilinmektedir (Sugino ve ark., 2000; Burton ve Jauniaux, 2004; Myatt ve Cui, 2004; Redman ve Sargent, 2005). Klinikte gebelik boyunca bozulan plasental perfüzyon ile ilişkili bozuklukların önlenmesinde antioksidanların kullanılması söz konusudur. Bu yaklaşım, hamilelikte C ve E vitamini takviyesi alan risk altındaki kadınlarda preeklampsi insidansında belirgin bir azalma olduğunu gösteren randomize kontrollü bir klinik çalışmanın bulguları ile desteklenmektedir (Chappell ve ark., 1999).

Bulgularımız Sirtuin 1'in aktive olmasıyla FoxO1 deasetilasyonunun arttığını; bunun sonucunda MnSOD miktarındaki artışa bağlı olarak ROT/RNT miktarının azaldığını ve böylece oksidatif stresin engel olduğu embriyo implantasyonunun gerçekleşebileceğini göstermektedir. Ancak SRT1720 + parakuat grubundaki farelerin bazılarında implantasyonun gerçekleşmesi ve kontrol grubuna kıyasla implantasyon bölge sayılarının daha az olması kullandığımız SRT1720 dozunun yetersiz olduğunu düşündürmüştür. Çalışmamız parakuat ile oksidatif stres oluşturulan gebe farelerde

Sirtuin 1'in embriyo implantasyonundaki rolünü *in vivo* olarak ortaya koyan ilk araştırmadır.

İnfertilite, sosyal ve ekonomik bir sorundur. İnsanda döllennelerin %30'undan fazlası düşükle sonuçlanır. Bazı bireylerde infertilite problemi yardımcı üreme teknikleri ile çözülebilmektedir ancak uterus reseptif değilse embriyo transferi implantasyon başarısızlığı ile sonuçlanmaktadır. Sirtuin 1'in oksidatif strese karşı embriyo implantasyonunu FoxO1-MnSOD aracılığıyla koruyor olabileceği bulgumuzun klinikte karşılaşılan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıplarının mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için önemli olduğunu düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada kontrol, vehicle, parakuat, SRT1720 ve SRT1720 + parakuat deney grupları oluşturulmuş ve gebeliğin 5. gününde sakrifiye edilen bu farelere ait implantasyon bölgeleri veya uteruslar ile inter-implantasyon bölgelerinde;

- ✓ İmmünohistokimya yöntemi ile Sirtuin 1 ve Sirtuin 1'in deasetillemediği bilinen FoxO1 ekspresyonları belirlenmiş ve H-Score ile değerlendirilmiş,
- ✓ Western blot yöntemi ile Sirtuin 1, FoxO1 ve asetile lizin ekspresyonları ile deasetile FoxO1 miktarı belirlenmiş ve değerlendirilmiş;
- ✓ ELISA ile ROT/RNT ve FoxO1'in ekspresyonunu düzenlediği antioksidan MnSOD miktarları belirlenmiş ve değerlendirilmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

- 1- Parakuat ile oksidatif stres oluşturulan farelerde engellenen embriyo implantasyonunun Sirtuin 1 aktivatörü SRT1720 enjeksiyonu ile bazı farelerde gerçekleştiği gösterilmiştir.
- 2- FoxO1'in antimezometriyal bölge lümen epitelindeki sitoplazmik lokalizasyonu bu proteinin sitoplazmik lokalizasyonunun entoz için gerekli olduğunu söyleyen literatür bilgisi ile uyumludur.
- 3- Parakuat grubunda ROT/RNT miktarı artmıştır. SRT1720 + parakuat grubundaki ROT/RNT miktarı parakuat grubuna kıyasla daha azdır.
- 4- Parakuat uygulanan grupta FoxO1 asetilasyonu artmış yani FoxO1 deasetilasyonu azaltmıştır. SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarında FoxO1 deasetilasyonu artmıştır.
- 5- SRT1720 ve SRT1720 + parakuat gruplarında deasetile FoxO1 miktarının artmasına bağlı olarak MnSOD miktarı artış göstermiştir.
- 6- Parakuat grubundaki MnSOD miktarının artışı oksidatif stres ile mücadele etmek için FoxO1'den bağımsız bir yolla gerçekleşiyor olabilir.
- 7- SRT1720 + parakuat grubundaki farelerin bazılarında implantasyonun gerçekleşmesi ve kontrol grubuna kıyasla implantasyon bölge sayılarının daha az olması kullandığımız SRT1720 dozunun yetersiz olduğunu düşündürmüştür.



- 8- Çalışmamız parakuat ile oksidatif stres oluşturulan gebe farelerde Sirtuin 1'in embriyo implantasyonundaki rolünü *in vivo* olarak ortaya koyan ilk araştırmadır.
- 9- Bulgularımız klinikte karşılaşılan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıplarının mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlayacak yeni projeler üretilmesini sağlayacaktır.

Sonuç olarak bu çalışmada Sirtuin 1'in aktive olmasıyla FoxO1 deasetilasyonunun arttığı; bunun sonucunda MnSOD miktarındaki artışa bağlı olarak ROT/RNT miktarının azaldığı ve böylece oksidatif stresin engel olduğu embriyo implantasyonunun gerçekleşebileceği gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

Adiguzel, D., Sahin, P., Kuscu, N., Ozkavukcu, S., Bektas, N. I., & Celik-Ozenci, C. Spatiotemporal expression and regulation of foxo1 in mouse uterus during peri-implantation period. *PloS one*. 2019; 14 (5): e0216814.

Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2012; 10: 49.

Agarwal, A., Gupta, S., Sekhon, L., & Shah, R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*. 2008; 10 (8): 1375-1403.

Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2005; 3: 28.

Agarwal, A., Hamada, A., & Esteves, S. C. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: Part 1. *Nature Reviews Urology*. 2012; 9 (12): 678.

Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*. 2003; 79 (4): 829-843.

Ait-Bali, Y., Ba-M'hamed, S., & Bennis, M. Prenatal paraquat exposure induces neurobehavioral and cognitive changes in mice offspring. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016; 48: 53-62.

Alcendor, R. R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., . . . Sadoshima, J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation research*. 2007; 100 (10): 1512-1521.

Allen, E. The oestrous cycle in the mouse. *Developmental Dynamics*. 1922; 30 (3): 297-371.

Almeida, L. L., Teixeira, A. A. C., Soares, A. F., Cunha, F. M. D., Silva, V. A. D. J., Vieira Filho, L. D., & Wanderley-Teixeira, V. Effects of melatonin in rats in the initial third stage of pregnancy exposed to sub-lethal doses of herbicides. *Acta histochemica*. 2017; 119 (3): 220-227.

Aplin, J. D., & Ruane, P. T. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *Journal of cell science*. 2017; 130 (1): 15-22.

Asaka, R., Miyamoto, T., Yamada, Y., Ando, H., Mvunta, D. H., Kobara, H., & Shiozawa, T. Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: A novel therapeutic target. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2015; 95 (12): 1363-1373.

Banks, A. S., Kon, N., Knight, C., Matsumoto, M., Gutierrez-Juarez, R., Rossetti, L., . . . Accili, D. Sirt1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell metabolism*. 2008; 8 (4): 333-341.

Barnes, P. J., Adcock, I. M., & Ito, K. Histone acetylation and deacetylation: Importance in inflammatory lung diseases. *The European respiratory journal*. 2005; 25 (3): 552-563.

Baur, J. A. Biochemical effects of sirt1 activators. *Biochimica et biophysica acta*. 2010; 1804 (8): 1626-1634.

Bause, A. S., & Haigis, M. C. Sirt3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Experimental gerontology*. 2013; 48 (7): 634-639.

Beer, A. E., & Billingham, R. E. Immunoregulatory aspects of pregnancy. *Federation proceedings*. 1978; 37 (10): 2374-2378.

Bendich, A., & Olson, J. A. Biological actions of carotenoids. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1989; 3 (8): 1927-1932.

Bingel, A. S., & Schwartz, N. B. Timing of lh release and ovulation in the cyclic mouse. *Journal of reproduction and fertility*. 1969; 19 (2): 223-229.

Blanco-Ayala, T., Anderica-Romero, A. C., & Pedraza-Chaverri, J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free radical research*. 2014; 48 (6): 623-640.

Blander, G., & Guarente, L. The sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry*. 2004; 73: 417-435.

Bonnet, R. Beitrage zur embryologie der wiederkauer, gewonnen am schafei. *Arch Anat Physiol*. 1884; 8: 170.

Bowen, R. Attachment and implantation. 2000.

Braude, P., Bolton, V., & Moore, S. Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988; 332 (6163): 459.

Brown, A. K., & Webb, A. E. Regulation of foxo factors in mammalian cells. *Current topics in developmental biology*. 2018; 127: 165-192.

Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., . . . Greenberg, M. E. Stress-dependent regulation of foxo transcription factors by the sirt1 deacetylase. *Science*. 2004; 303 (5666): 2011-2015.

Burton, G. J., & Jauniaux, E. Placental oxidative stress: From miscarriage to preeclampsia. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2004; 11 (6): 342-352.

Bus, J. S., & Gibson, J. E. Paraquat: Model for oxidant-initiated toxicity. *Environmental health perspectives*. 1984; 55: 37-46.

Caito, S., Rajendrasozhan, S., Cook, S., Chung, S., Yao, H., Friedman, A. E., . . . Rahman, I. Sirt1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010; 24 (9): 3145-3159.

- Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W., & DePinho, R. A. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor foxo3a. *Science*. 2003; 301 (5630): 215-218.
- Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nature medicine*. 2012; 18 (12): 1754-1767.
- Chae, H. Z., Kang, S. W., & Rhee, S. G. (1999). Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. In *Methods in enzymology* (Vol. 300, pp. 219-226): Elsevier.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*. 1979; 59 (3): 527-605.
- Chappell, L. C., Seed, P. T., Briley, A. L., Kelly, F. J., Lee, R., Hunt, B. J., . . . Poston, L. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: A randomised trial. *Lancet*. 1999; 354 (9181): 810-816.
- Cheng, H. L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J. P., Gu, Y., Patel, P., . . . Chua, K. F. Developmental defects and p53 hyperacetylation in sir2 homolog (sirt1)-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100 (19): 10794-10799.
- Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E., & Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2014; 15 (8): 536-550.
- Christian, M., Zhang, X., Schneider-Merck, T., Unterman, T. G., Gellersen, B., White, J. O., & Brosens, J. J. Cyclic amp-induced forkhead transcription factor, fkhr, cooperates with ccaat/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277 (23): 20825-20832.
- Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J. W., Arunachalam, G., & Rahman, I. Regulation of sirt1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2010; 501 (1): 79-90.

Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., & Burley, S. K. Co-crystal structure of the hnf-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone h5. *Nature*. 1993; 364 (6436): 412-420.

Cohen, H. Y., Lavu, S., Bitterman, K. J., Hekking, B., Imahiyerobo, T. A., Miller, C., . . . Sinclair, D. A. Acetylation of the c terminus of ku70 by cbp and pcaf controls bax-mediated apoptosis. *Molecular cell*. 2004; 13 (5): 627-638.

Coussens, M., Maresh, J. G., Yanagimachi, R., Maeda, G., & Allsopp, R. Sirt1 deficiency attenuates spermatogenesis and germ cell function. *PloS one*. 2008; 3 (2): e1571.

Croy, B. A., Yamada, A. T., DeMayo, F. J., & Adamson, S. L. *The guide to investigation of mouse pregnancy*: Academic Press; 2013.

Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Aratani, S., Ohshima, T., Miyagishi, M., . . . Fukamizu, A. Silent information regulator 2 potentiates foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101 (27): 10042-10047.

DeFeo, V. J. *Decidualization. Cellular biology of the uterus*. Amsterdam: North Holland; 1967.

Devine, P. J., Perreault, S. D., & Luderer, U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biology of reproduction*. 2012; 86 (2): 27.

Dey, S. *Reproductive endocrinology, surgery, and technology*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996: 421-434.

Ding, Y. W., Zhao, G. J., Li, X. L., Hong, G. L., Li, M. F., Qiu, Q. M., . . . Lu, Z. Q. Sirt1 exerts protective effects against paraquat-induced injury in mouse type ii alveolar epithelial cells by deacetylating nrf2 in vitro. *International journal of molecular medicine*. 2016; 37 (4): 1049-1058.

Eijkelenboom, A., & Burgering, B. M. Foxos: Signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2013; 14 (2): 83-97.

Enders, A. C., & Schlafke, S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *The American journal of anatomy*. 1969; 125 (1): 1-29.

Endo, A. Mulleriosis & embryonic origin.

Favero, G., Franceschetti, L., Rodella, L. F., & Rezzani, R. Sirtuins, aging, and cardiovascular risks. *Age*. 2015; 37 (4): 9804.

Feige, J. N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S. M., Milne, J. C., . . . Auwerx, J. Specific sirt1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell metabolism*. 2008; 8 (5): 347-358.

Female reproductive anatomy. 2010.

Finn, C. A., & Porter, D. G. *The uterus* (Vol. 1): Acton, MA: Publishing Sciences Group; 1975, p:

Flach, G., Johnson, M. H., Braude, P. R., Taylor, R. A., & Bolton, V. N. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *The EMBO journal*. 1982; 1 (6): 681-686.

Fox, J. G., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, C. E., Quimby, F. W., & Smith, A. *The mouse in biomedical research: Normative biology, husbandry, and models* (Vol. 3): Elsevier; 2006, p:

Frey, R. S., Ushio-Fukai, M., & Malik, A. B. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: Role in physiology and pathophysiology. *Antioxidants & redox signaling*. 2009; 11 (4): 791-810.

Frye, R. A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast sir2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999; 260 (1): 273-279.

- Frye, R. A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 273 (2): 793-798.
- Fu, H., Wada-Hiraike, O., Hirano, M., Kawamura, Y., Sakurabashi, A., Shirane, A., . . . Fujii, T. Sirt3 positively regulates the expression of folliculogenesis- and luteinization-related genes and progesterone secretion by manipulating oxidative stress in human luteinized granulosa cells. *Endocrinology.* 2014; 155 (8): 3079-3087.
- Furukawa-Hibi, Y., Yoshida-Araki, K., Ohta, T., Ikeda, K., & Motoyama, N. Foxo forkhead transcription factors induce g(2)-m checkpoint in response to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry.* 2002; 277 (30): 26729-26732.
- Furukawa, A., Tada-Oikawa, S., Kawanishi, S., & Oikawa, S. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of sirt1 by nad<sup>+</sup> depletion. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 2007; 20 (1-4): 45-54.
- Garcia-Pardo, L., Granados, M. D., Gaytan, F., Padilla, C. A., Martinez-Galisteo, E., Morales, C., . . . Barcena, J. A. Immunolocalization of glutaredoxin in the human corpus luteum. *Molecular human reproduction.* 1999; 5 (10): 914-919.
- Gawarammana, I. B., & Buckley, N. A. Medical management of paraquat ingestion. *British journal of clinical pharmacology.* 2011; 72 (5): 745-757.
- Giannakou, M. E., & Partridge, L. The interaction between foxo and sirt1: Tipping the balance towards survival. *Trends in cell biology.* 2004; 14 (8): 408-412.
- Glasser, S. R., Aplin, J. D., Giudice, L. C., & Tabibzadeh, S. *The endometrium: CRC Press; 2004.*
- Glauser, D. A., & Schlegel, W. The emerging role of foxo transcription factors in pancreatic beta cells. *The Journal of endocrinology.* 2007; 193 (2): 195-207.
- Gray, H. *Anatomy of the human body (Vol. 8): Lea & Febiger; 1878.*



Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., . . . Guarente, L. Sirt4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*. 2006; 126 (5): 941-954.

Haigis, M. C., & Sinclair, D. A. Mammalian sirtuins: Biological insights and disease relevance. *Annual review of pathology*. 2010; 5: 253-295.

Hall, J. E. *Guyton and hall textbook of medical physiology e-book*: Elsevier Health Sciences; 2015.

Halliwell, B. Oxidants and human disease: Some new concepts. *The FASEB Journal*. 1987; 1 (5): 358-364.

Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS letters*. 2000; 486 (1): 10-13.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA; 2015.

Hannenhalli, S., & Kaestner, K. H. The evolution of fox genes and their role in development and disease. *Nature Reviews Genetics*. 2009; 10 (4): 233.

Harma, M., Harma, M., & Erel, O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss medical weekly*. 2003; 133 (41-42): 563-566.

Harma, M., Harma, M., Kocyigit, A., & Demir, N. Role of plasma nitric oxide in complete hydatidiform mole. *European journal of gynaecological oncology*. 2004; 25 (3): 333-335.

Hasegawa, K., Wakino, S., Yoshioka, K., Tatematsu, S., Hara, Y., Minakuchi, H., . . . Itoh, H. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008; 372 (1): 51-56.

Hausburg, M. A., Dekrey, G. K., Salmen, J. J., Palic, M. R., & Gardiner, C. S. Effects of paraquat on development of preimplantation embryos in vivo and in vitro. *Reproductive toxicology*. 2005; 20 (2): 239-246.

He, J., Zhang, A., Song, Z., Guo, S., Chen, Y., Liu, Z., . . . Chu, L. The resistant effect of sirt1 in oxidative stress-induced senescence of rat nucleus pulposus cell is regulated by akt-foxo1 pathway. *Bioscience reports*. 2019.

Hertig, A. T., Rock, J., Adams, E., & Mulligan, W. On the preimplantation stages of the human ovum—a description of 4 normal and 4 abnormal specimens ranging from the 2nd to the 5th day of development. *Contributions to Embryology*. 1954; 35 (240): 201-&.

Hertig, A. T., Rock, J., & Adams, E. C. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Developmental Dynamics*. 1956; 98 (3): 435-493.

Hirota, Y., Acar, N., Tranguch, S., Burnum, K. E., Xie, H., Kodama, A., . . . Dey, S. K. Uterine fk506-binding protein 52 (fkbp52)-peroxiredoxin-6 (prdx6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107 (35): 15577-15582.

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

Ho, Y. S., Gargano, M., Cao, J., Bronson, R. T., Heimler, I., & Hutz, R. J. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273 (13): 7765-7769.

Hosaka, T., Biggs, W. H., 3rd, Tieu, D., Boyer, A. D., Varki, N. M., Cavenee, W. K., & Arden, K. C. Disruption of forkhead transcription factor (foxo) family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101 (9): 2975-2980.

Houtkooper, R. H., Canto, C., Wanders, R. J., & Auwerx, J. The secret life of nad<sup>+</sup>: An old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine reviews*. 2010; 31 (2): 194-223.

Hu, M. C., Lee, D. F., Xia, W., Golfman, L. S., Ou-Yang, F., Yang, J. Y., . . . Hung, M. C. Ikappab kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead foxo3a. *Cell*. 2004; 117 (2): 225-237.

Huang, H., & Tindall, D. J. Dynamic foxo transcription factors. *Journal of cell science*. 2007; 120 (Pt 15): 2479-2487.

Huet-Hudson, Y. M., Andrews, G. K., & Dey, S. K. Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: Modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology*. 1989; 125 (3): 1683-1690.

Huet, Y., & Dey, S. Role of early and late oestrogenic effects on implantation in the mouse. *Journal of reproduction and fertility*. 1987; 81 (2): 453-458.

Huet, Y. M., Andrews, G. K., & Dey, S. K. Modulation of c-myc protein in the mouse uterus during pregnancy and by steroid hormones. *Progress in clinical and biological research*. 1989; 294: 401-412.

Hwang, J. W., Yao, H., Caito, S., Sundar, I. K., & Rahman, I. Redox regulation of sirt1 in inflammation and cellular senescence. *Free radical biology & medicine*. 2013; 61: 95-110.

Imai, S.-I., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein sir2 is an nad-dependent histone deacetylase. *Nature*. 2000a; 403 (6771): 795.

Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein sir2 is an nad-dependent histone deacetylase. *Nature*. 2000b; 403 (6771): 795-800.

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

Ishikawa, M. [oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi.* 1993; 45 (8): 842-848.

Ivy, J. M., Klar, A. J., & Hicks, J. B. Cloning and characterization of four sir genes of *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology.* 1986; 6 (2): 688-702.

Jackson, B. C., Carpenter, C., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. Update of human and mouse forkhead box (fox) gene families. *Human genomics.* 2010; 4 (5): 345-352.

Jin, Q., Yan, T., Ge, X., Sun, C., Shi, X., & Zhai, Q. Cytoplasm-localized sirt1 enhances apoptosis. *Journal of cellular physiology.* 2007; 213 (1): 88-97.

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

Jozwik, M., Wolczynski, S., Jozwik, M., & Szamatowicz, M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Molecular human reproduction.* 1999; 5 (5): 409-413.

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

Kajihara, T., Jones, M., Fusi, L., Takano, M., Feroze-Zaidi, F., Pirianov, G., . . . Brosens, J. J. Differential expression of foxo1 and foxo3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization. *Mol Endocrinol.* 2006; 20 (10): 2444-2455.

Kajihara, T., Uchino, S., Suzuki, M., Itakura, A., Brosens, J. J., & Ishihara, O. Increased ovarian follicle atresia in obese zucker rats is associated with enhanced expression of the forkhead transcription factor foxo1. *Medical molecular morphology.* 2009; 42 (4): 216-221.

Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2016; 4 (1).

Kim, J. J., Taylor, H. S., Akbas, G. E., Foucher, I., Trembleau, A., Jaffe, R. C., . . . Unterman, T. G. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 promoter activity by *fkhr* and *hoxa10* in primate endometrial cells. *Biology of reproduction*. 2003; 68 (1): 24-30.

Kim, S., Benguria, A., Lai, C. Y., & Jazwinski, S. M. Modulation of life-span by histone deacetylase genes in *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*. 1999; 10 (10): 3125-3136.

Kirby, D. R. S. *The biology of the blastocysts*. Chicago: University of Chicago Press; 1971.

Kirby, D. R. S., & Cowell, T. P. *Trophoblast-host interactions. Epithelial-mesenchymal interactions.*: Baltimore: Williams&Wilkins; 1968.

Kohen, R., & Nyska, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*. 2002; 30 (6): 620-650.

Kolibianakis, E. M., & Venetis, C. A. *Recurrent implantation failure*. 2019.

Kouzarides, T. Acetylation: A regulatory modification to rival phosphorylation? *The EMBO journal*. 2000; 19 (6): 1176-1179.

Kucińska, M., Piotrowska, H., & Murias, M. Sirtuins--modulation of their activity as a novel therapeutic target. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 2010; 28 (165): 231-235.

Kwak, S. S., Jeung, S. H., Biswas, D., Jeon, Y. B., & Hyun, S. H. Effects of porcine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on porcine in vitro-fertilized embryos. *Theriogenology*. 2012; 77 (6): 1186-1197.

Labied, S., Kajihara, T., Madureira, P. A., Fusi, L., Jones, M. C., Higham, J. M., . . . Brosens, J. J. Progesterone regulates the expression and activity of the forkhead transcription factor foxo1 in differentiating human endometrium. *Molecular endocrinology*. 2006; 20 (1): 35-44.

Lagod, L., Paszkowski, T., Sikorski, R., & Rola, R. [the antioxidant-prooxidant balance in pregnancy complicated by spontaneous abortion]. *Ginekologia polska*. 2001; 72 (12): 1073-1078.

Lam, E. W., Brosens, J. J., Gomes, A. R., & Koo, C. Y. Forkhead box proteins: Tuning forks for transcriptional harmony. *Nature reviews. Cancer*. 2013; 13 (7): 482-495.

Lam, E. W., Francis, R. E., & Petkovic, M. Foxo transcription factors: Key regulators of cell fate. *Biochemical Society transactions*. 2006; 34 (Pt 5): 722-726.

Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., & Sternglanz, R. The silencing protein sir2 and its homologs are nad-dependent protein deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97 (11): 5807-5811.

Langman, S. T. *Medical embryology*; 1993.

Lappas, M., Mitton, A., Lim, R., Barker, G., Riley, C., & Permezel, M. Sirt1 is a novel regulator of key pathways of human labor. *Biology of reproduction*. 2011; 84 (1): 167-178.

Lavranos, G., Balla, M., Tzortzopoulou, A., Syriou, V., & Angelopoulou, R. Investigating ros sources in male infertility: A common end for numerous pathways. *Reproductive toxicology*. 2012; 34 (3): 298-307.

Lehmann, O. J., Sowden, J. C., Carlsson, P., Jordan, T., & Bhattacharya, S. S. Fox's in development and disease. *TRENDS in Genetics*. 2003; 19 (6): 339-344.

Li, S., Zhao, D., Li, Y., Gao, J., & Feng, S. Arterial lactate in predicting mortality after paraquat poisoning: A meta-analysis. *Medicine*. 2018; 97 (34): e11751.

- Li, S., Zhao, G., Chen, L., Ding, Y., Lian, J., Hong, G., & Lu, Z. Resveratrol protects mice from paraquat-induced lung injury: The important role of sirt1 and nrf2 antioxidant pathways. *Molecular medicine reports*. 2016; 13 (2): 1833-1838.
- Li, Y., Sun, X., & Dey, S. K. Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation. *Cell reports*. 2015; 11 (3): 358-365.
- Li, Y., Xu, W., McBurney, M. W., & Longo, V. D. Sirt1 inhibition reduces igf-i/irs-2/ras/erk1/2 signaling and protects neurons. *Cell metabolism*. 2008; 8 (1): 38-48.
- Liang, J., Wang, S., & Wang, Z. Role of micrnas in embryo implantation. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2017; 15 (1): 90.
- Lim, H. J., & Wang, H. Uterine disorders and pregnancy complications: Insights from mouse models. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120 (4): 1004-1015.
- Lin, L., Hron, J. D., & Peng, S. L. Regulation of nf-kappab, th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor foxo3a. *Immunity*. 2004; 21 (2): 203-213.
- Lin, S. J., Defossez, P. A., & Guarente, L. Requirement of nad and sir2 for life-span extension by calorie restriction in *saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 2000; 289 (5487): 2126-2128.
- Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M., & Guarente, L. Mouse sir2 homolog sirt6 is a nuclear adp-ribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 2005.
- Liu, G., Dong, Y., Wang, Z., Cao, J., & Chen, Y. Restraint stress alters immune parameters and induces oxidative stress in the mouse uterus during embryo implantation. *Stress*. 2014; 17 (6): 494-503.
- Liu, M., Yin, Y., Ye, X., Zeng, M., Zhao, Q., Keefe, D. L., & Liu, L. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Human reproduction*. 2013; 28 (3): 707-717.

Liu, T. F., & McCall, C. E. Deacetylation by sirt1 reprograms inflammation and cancer. *Genes & cancer*. 2013; 4 (3-4): 135-147.

Loeken, M. R. Free radicals and birth defects. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2004; 15 (1): 6-14.

Ma, J., Matkar, S., He, X., & Hua, X. Foxo family in regulating cancer and metabolism. *Seminars in cancer biology*. 2018; 50: 32-41.

Machlin, L. J., & Bendich, A. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1987; 1 (6): 441-445.

Maiese, K., Chong, Z. Z., Shang, Y. C., & Hou, J. A "foxo" in sight: Targeting foxo proteins from conception to cancer. *Medicinal research reviews*. 2009; 29 (3): 395-418.

Mara H. Rendi, A. M., Rochelle L. Garcia, Kelly L. Boyd. (2012). Female reproductive system. In *Comparative anatomy and histology* (pp. 253-284).

Marklund, S. L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982; 79 (24): 7634-7638.

Marklund, S. L., Holme, E., & Hellner, L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1982; 126 (1): 41-51.

Mates, J. M., Perez-Gomez, C., & Nunez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999; 32 (8): 595-603.

Matsumoto, H. Molecular and cellular events during blastocyst implantation in the receptive uterus: Clues from mouse models. *The Journal of reproduction and development*. 2017; 63 (5): 445-454.



Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., & Fukamizu, A. Acetylation of foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102 (32): 11278-11283.

Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., & Fukamizu, A. Insulin-induced phosphorylation of fkhr (foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100 (20): 11285-11290.

McBurney, M. W., Yang, X., Jardine, K., Hixon, M., Boekelheide, K., Webb, J. R., . . . Lemieux, M. The mammalian sir2 $\alpha$  protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2003; 23 (1): 38-54.

McCord, J. M., Keele, B. B., Jr., & Fridovich, I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971; 68 (5): 1024-1027.

MERCAN, U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2004; 15 (1): 91-96.

Michan, S., & Sinclair, D. Sirtuins in mammals: Insights into their biological function. *The Biochemical journal*. 2007; 404 (1): 1-13.

Michelson, A. M., McCord, J. M., & Fridovich, I. (1977). *Superoxide and superoxide dismutases*. Paper presented at the EMBO Workshop on Superoxide and Superoxide Dismutases 1976: Banyuls, France).

Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C., & Horikawa, I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human sirt proteins. *Molecular biology of the cell*. 2005; 16 (10): 4623-4635.

Mills, G. C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of biological chemistry*. 1957; 229 (1): 189-197.

Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., . . . Westphal, C. H. Small molecule activators of sirt1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007; 450 (7170): 712-716.

Minor, R. K., Baur, J. A., Gomes, A. P., Ward, T. M., Csiszar, A., Mercken, E. M., . . . de Cabo, R. Sirt1 improves survival and healthspan of obese mice. *Scientific reports*. 2011; 1: 70.

Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. *The developing human e-book*: Elsevier Health Sciences; 2011.

Motta, M. C., Divecha, N., Lemieux, M., Kamel, C., Chen, D., Gu, W., . . . Guarente, L. Mammalian sirt1 represses forkhead transcription factors. *Cell*. 2004; 116 (4): 551-563.

Murr, S. M., Geschwind, H., & Bradford, G. E. Plasma lh and fsh during different oestrous cycle conditions in mice. *Journal of reproduction and fertility*. 1973; 32 (2): 221-230.

Myatt, L., & Cui, X. Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and cell biology*. 2004; 122 (4): 369-382.

Niakan, K. K., Han, J., Pedersen, R. A., Simon, C., & Pera, R. A. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 2012; 139 (5): 829-841.

Nordberg, J., & Arner, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology & medicine*. 2001; 31 (11): 1287-1312.

North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., & Verdin, E. The human sir2 ortholog, sirt2, is an nad<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Molecular cell*. 2003; 11 (2): 437-444.

Obsil, T., & Obsilova, V. Structure/function relationships underlying regulation of foxo transcription factors. *Oncogene*. 2008; 27 (16): 2263-2275.

Oellerich, M. F., & Potente, M. Foxos and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging. *Circulation research*. 2012; 110 (9): 1238-1251.

Pacella-Ince, L., Zander-Fox, D. L., & Lan, M. Mitochondrial sirt3 and its target glutamate dehydrogenase are altered in follicular cells of women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age. *Human reproduction*. 2014; 29 (7): 1490-1499.

Pacella-Ince, L., Zander-Fox, D. L., & Lane, M. Mitochondrial sirt5 is present in follicular cells and is altered by reduced ovarian reserve and advanced maternal age. *Reproduction, fertility, and development*. 2014; 26 (8): 1072-1083.

Paria, B., Huet-Hudson, Y., & Dey, S. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993; 90 (21): 10159-10162.

Paszkowski, T., Traub, A. I., Robinson, S. Y., & McMaster, D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1995; 236 (2): 173-180.

Paul, A. B. M., Sadek, S. T., & Mahesan, A. M. The role of micrnas in human embryo implantation: A review. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2019; 36 (2): 179-187.

Peh, H. Y., Tan, W. S., Liao, W., & Wong, W. S. Vitamin e therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacology & therapeutics*. 2016; 162: 152-169.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science : IJBS*. 2008; 4 (2): 89-96.

Pieszka, M., Szczurek, P., Ropka-Molik, K., Oczkowicz, M., & Pieszka, M. [the role of resveratrol in the regulation of cell metabolism--a review]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*. 2016; 70: 117-123.

Poidatz, D., Dos Santos, E., Duval, F., Moindjie, H., Serazin, V., Vialard, F., . . . Dieudonne, M. N. Involvement of estrogen-related receptor-gamma and mitochondrial content in intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Fertility and sterility*. 2015; 104 (2): 483-490.

Polak, G., Rola, R., Gogacz, M., Koziol-Montewka, M., & Kotarski, J. [malonyldialdehyde and total antioxidant status in the peritoneal fluid of infertile women]. *Ginekologia polska*. 1999; 70 (3): 135-140.

Ponugoti, B., Dong, G., & Graves, D. T. Role of forkhead transcription factors in diabetes-induced oxidative stress. *Experimental diabetes research*. 2012; 2012: 939751.

Potente, M., Urbich, C., Sasaki, K., Hofmann, W. K., Heeschen, C., Aicher, A., . . . Dimmeler, S. Involvement of foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *The Journal of clinical investigation*. 2005; 115 (9): 2382-2392.

Poulose, N., & Raju, R. Sirtuin regulation in aging and injury. *Biochimica et biophysica acta*. 2015; 1852 (11): 2442-2455.

Pritchett, K. R., & Taft, R. A. (2007). Reproductive biology of the laboratory mouse. In *The mouse in biomedical research (second edition)* (pp. 91-121): Elsevier.

Psychoyos, A. [capillary permeability and uterine decidualization]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*. 1961; 252: 1515-1517.

Psychoyos, A. Endocrine control of egg implantation. *Handbook of physiology*. (Vol. 187-215.

Purushotham, A., Schug, T. T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X., & Li, X. Hepatocyte-specific deletion of sirt1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell metabolism*. 2009; 9 (4): 327-338.

Qiang, L., Banks, A. S., & Accili, D. Uncoupling of acetylation from phosphorylation regulates foxo1 function independent of its subcellular localization. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285 (35): 27396-27401.

Qiao, L., & Shao, J. Sirt1 regulates adiponectin gene expression through foxo1-c/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281 (52): 39915-39924.

Rahman, I., Kinnula, V. L., Gorbunova, V., & Yao, H. Sirt1 as a therapeutic target in inflammaging of the pulmonary disease. *Preventive medicine*. 2012; 54 Suppl: S20-28.

Redman, C. W., & Sargent, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005; 308 (5728): 1592-1594.

Rifai, K., Idrissou, M., Penault-Llorca, F., Bignon, Y. J., & Bernard-Gallon, D. Breaking down the contradictory roles of histone deacetylase sirt1 in human breast cancer. *Cancers*. 2018; 10 (11).

Rogina, B., & Helfand, S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101 (45): 15998-16003.

Ross, M. H., & Pawlina, W. *Histology: Lippincott Williams & Wilkins*; 2006.

Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L., & Boeke, J. D. The biochemistry of sirtuins. *Annual review of biochemistry*. 2006; 75: 435-465.

Schneider, A., Chatterjee, S., Bousiges, O., Selvi, B. R., Swaminathan, A., Cassel, R., . . . Boutillier, A.-L. Acetyltransferases (hats) as targets for neurological therapeutics. *Neurotherapeutics*. 2013; 10 (4): 568-588.

Sequeira, J., Boily, G., Bazinet, S., Saliba, S., He, X., Jardine, K., . . . McBurney, M. W. Sirt1-null mice develop an autoimmune-like condition. *Experimental cell research*. 2008; 314 (16): 3069-3074.

Seto, E., & Yoshida, M. Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014; 6 (4): a018713.

Shirane, A., Wada-Hiraike, O., Tanikawa, M., Seiki, T., Hiraike, H., Miyamoto, Y., . . . Taketani, Y. Regulation of sirt1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling e-cadherin expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012; 424 (3): 604-610.

Silva, A. N. d., & Lima, L. C. F. The association between physical exercise and reactive oxygen species (ros) production. 2015.

Song, H., Lim, H., Paria, B. C., Matsumoto, H., Swift, L. L., Morrow, J., . . . Dey, S. K. Cytosolic phospholipase a2 $\alpha$  is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development*. 2002; 129 (12): 2879-2889.

Stunkel, W., & Campbell, R. M. Sirtuin 1 (sirt1): The misunderstood hdac. *Journal of biomolecular screening*. 2011; 16 (10): 1153-1169.

Sugino, N., Nakata, M., Kashida, S., Karube, A., Takiguchi, S., & Kato, H. Decreased superoxide dismutase expression and increased concentrations of lipid peroxide and prostaglandin f(2alpha) in the decidua of failed pregnancy. *Molecular human reproduction*. 2000; 6 (7): 642-647.

Sugino, N., Shimamura, K., Takiguchi, S., Tamura, H., Ono, M., Nakata, M., . . . Kato, H. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Human reproduction*. 1996; 11 (5): 1073-1078.

Tabakoğlu, E., & Durgut, R. Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Derg*. 2013; 3 (1): 69-75.

Takagi, Y., Nikaido, T., Toki, T., Kita, N., Kanai, M., Ashida, T., . . . Konishi, I. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2004; 444 (1): 49-55.

Takata, T., & Ishikawa, F. Human sir2-related protein sirt1 associates with the bhlh repressors hes1 and hey2 and is involved in hes1- and hey2-mediated transcriptional

repression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 301 (1): 250-257.

Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., & Horio, Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the nad<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase sirt1. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282 (9): 6823-6832.

Tatone, C., Di Emidio, G., Vitti, M., Di Carlo, M., Santini, S., Jr., D'Alessandro, A. M., . . . Amicarelli, F. Sirtuin functions in female fertility: Possible role in oxidative stress and aging. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015; 2015: 659687.

Taylor, D. M., Ray, P. F., Ao, A., Winston, R. M., & Handyside, A. H. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three- to four-cell stage. *Molecular reproduction and development*. 1997; 48 (4): 442-448.

Tia, N., Singh, A. K., Pandey, P., Azad, C. S., Chaudhary, P., & Gambhir, I. S. Role of forkhead box o (foxo) transcription factor in aging and diseases. *Gene*. 2018; 648: 97-105.

Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace, A. J., Jr., DiStefano, P. S., . . . Greenberg, M. E. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor foxo3a through the gadd45 protein. *Science*. 2002; 296 (5567): 530-534.

Treuting, P. M., Dintzis, S. M., Liggitt, D., & Frevert, C. W. *Comparative anatomy and histology: A mouse and human atlas (expert consult)*: Academic Press; 2011.

Tsuchiya, K., & Ogawa, Y. Forkhead box class o family member proteins: The biology and pathophysiological roles in diabetes. *J Diabetes Investig*. 2017; 8 (6): 726-734.

van der Heide, L. P., & Smidt, M. P. Regulation of foxo activity by cbp/p300-mediated acetylation. *Trends in biochemical sciences*. 2005; 30 (2): 81-86.

van der Horst, A., Tertoolen, L. G., de Vries-Smits, L. M., Frye, R. A., Medema, R. H., & Burgering, B. M. Foxo4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the

longevity protein hsr2(sirt1). *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279 (28): 28873-28879.

Vasquez, Y. M., Wang, X., Wetendorf, M., Franco, H. L., Mo, Q., Wang, T., . . . DeMayo, F. J. Foxo1 regulates uterine epithelial integrity and progesterone receptor expression critical for embryo implantation. *PLoS genetics*. 2018; 14 (11): e1007787.

Vassena, R., Boue, S., Gonzalez-Roca, E., Aran, B., Auer, H., Veiga, A., & Izpisua Belmonte, J. C. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*. 2011; 138 (17): 3699-3709.

Verdin, E. The many faces of sirtuins: Coupling of nad metabolism, sirtuins and lifespan. *Nature medicine*. 2014; 20 (1): 25-27.

Wakino, S., Hasegawa, K., & Itoh, H. Sirtuin and metabolic kidney disease. *Kidney international*. 2015; 88 (4): 691-698.

Wang, H., & Dey, S. K. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nature reviews. Genetics*. 2006; 7 (3): 185-199.

Wang, J., Li, W., Zhao, Y., Kang, D., Fu, W., Zheng, X., . . . Du, G. Members of fox family could be drug targets of cancers. *Pharmacology & therapeutics*. 2017.

Wang, X., Chen, W. R., & Xing, D. A pathway from jnk through decreased erk and akt activities for foxo3a nuclear translocation in response to uv irradiation. *Journal of cellular physiology*. 2012; 227 (3): 1168-1178.

Wang, Y., Sharma, R. K., Falcone, T., Goldberg, J., & Agarwal, A. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertility and sterility*. 1997; 68 (5): 826-830.

Wang, Z., Yu, T., & Huang, P. Post-translational modifications of foxo family proteins (review). *Molecular medicine reports*. 2016; 14 (6): 4931-4941.



Washington, DC: American Physiology Society; 1973

Watanabe, J., Hata, H., Masuda, K., & Kuramoto, H. The physiological function of human endometrium. *Human cell*. 1991; 4 (3): 230-236.

Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E., & Jackle, H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the drosophila embryo. *Cell*. 1989; 57 (4): 645-658.

Weigel, D., Jürgens, G., Küttner, F., Seifert, E., & Jäckle, H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the drosophila embryo. *Cell*. 1989; 57 (4): 645-658.

Weimar, C. H., Post Uiterweer, E. D., Teklenburg, G., Heijnen, C. J., & Macklon, N. S. Reprint of: In-vitro model systems for the study of human embryo-endometrium interactions. *Reproductive biomedicine online*. 2013; 27 (6): 673-688.

Witschi, E. Embryology of the uterus: Normal and experimental. *Ann N Y Acad Sci*. 1959; 75: 412-435.

Xia, X., Guo, J., Lu, F., & Jiang, J. Sirt1 plays a protective role in intervertebral disc degeneration in a puncture-induced rodent model. *Spine*. 2015; 40 (9): E515-524.

Yang, H., Yang, T., Baur, J. A., Perez, E., Matsui, T., Carmona, J. J., . . . Sinclair, D. A. Nutrient-sensitive mitochondrial nad<sup>+</sup> levels dictate cell survival. *Cell*. 2007; 130 (6): 1095-1107.

Yang, J. Y., Zong, C. S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., . . . Hung, M. C. Erk promotes tumorigenesis by inhibiting foxo3a via mdm2-mediated degradation. *Nature cell biology*. 2008; 10 (2): 138-148.

Yang, Y., Hou, H., Haller, E. M., Nicosia, S. V., & Bai, W. Suppression of foxo1 activity by fhl2 through sirt1-mediated deacetylation. *The EMBO journal*. 2005; 24 (5): 1021-1032.

Yao, H., Chung, S., Hwang, J. W., Rajendrasozhan, S., Sundar, I. K., Dean, D. A., . . . Rahman, I. Sirt1 protects against emphysema via foxo3-mediated reduction of premature senescence in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2012; 122 (6): 2032-2045.

Yao, H., Hwang, J. W., Sundar, I. K., Friedman, A. E., McBurney, M. W., Guarente, L., . . . Rahman, I. Sirt1 redresses the imbalance of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 in the development of mouse emphysema and human copd. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2013; 305 (9): L615-624.

Yao, H., & Rahman, I. Perspectives on translational and therapeutic aspects of sirt1 in inflammaging and senescence. *Biochemical pharmacology*. 2012; 84 (10): 1332-1339.

Yao, H., Sundar, I. K., Ahmad, T., Lerner, C., Gerloff, J., Friedman, A. E., . . . Rahman, I. Sirt1 protects against cigarette smoke-induced lung oxidative stress via a foxo3-dependent mechanism. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2014; 306 (9): L816-828.

Yoon, S., & Eom, G. H. Hdac and hdac inhibitor: From cancer to cardiovascular diseases. *Chonnam medical journal*. 2016; 52 (1): 1-11.

Zhang, J., Lee, S.-M., Shannon, S., Gao, B., Chen, W., Chen, A., . . . Zaghoulani, H. The type iii histone deacetylase sirt1 is essential for maintenance of t cell tolerance in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009; 119 (10): 3048-3058.

Zhang, J., & Zhong, Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014; 71 (20): 3885-3901.

Zhang, L., Zhang, Z., Wang, J., Lv, D., Zhu, T., Wang, F., . . . Liu, G. Melatonin regulates the activities of ovary and delays the fertility decline in female animals via mt1/ampk pathway. *Journal of pineal research*. 2018: e12550.

Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H., & Armant, D. R. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular aspects of medicine*. 2013; 34 (5): 939-980.

Zhao, Y., Hu, X., Liu, Y., Dong, S., Wen, Z., He, W., . . . Shi, M. Ros signaling under metabolic stress: Cross-talk between ampk and akt pathway. *Molecular cancer*. 2017; 16 (1): 79.

Zhou, X. L., Xu, J. J., Ni, Y. H., Chen, X. C., Zhang, H. X., Zhang, X. M., . . . Fu, Y. C. Sirt1 activator (srt1720) improves the follicle reserve and prolongs the ovarian lifespan of diet-induced obesity in female mice via activating sirt1 and suppressing mtor signaling. *Journal of ovarian research*. 2014; 7: 97.

Zhu, S., Evans, S., Yan, B., Povsic, T. J., Tapson, V., Goldschmidt-Clermont, P. J., & Dong, C. Transcriptional regulation of bim by foxo3a and akt mediates scleroderma serum-induced apoptosis in endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2008; 118 (21): 2156-2165.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Kübra	Uyruğu	TC
Soyadı	AKSU	Tel no	05425228015
Doğum tarihi	10.04.1993	e-posta	kubraksu7@gmail.com

### Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	İbrahim Bedrettin Elmalı Fen Lisesi / Fen Bilimleri	2011
Lisans	İstanbul Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi/ Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı	
Doktora		

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Yökdil	68,75

### Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

### Burslar-Ödüller:

### Yayınlar ve Bildiriler:

### **Uluslararası kongre bildirileri:**

- 1- Güler Leyla Satı, Gizem Gamze Taş, **Kübra Aksu**, Nuray Acar. CTCFL expression in mouse uteri and implantation sites during the peri-implantation period, European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Campus Symposium, Current Approaches in Genetics and Reproduction, 26-28 Nisan 2018, Sofya, Bulgaristan.
- 2- Rahime Şekerci, Nuray Acar Aydemir, Eren Öğüt, **Kübra Aksu**, Nigar Keleş Çelik. Tenascin C and type 3 collagen expression in calcaneal (Achilles) tendon therapy. 26. International Symposium on Morphological Sciences, 5-7 Temmuz 2018, Prag, Çek Cumhuriyeti (Bildiri kitabı sayfa 65-66).
- 3- Gizem Gamze Taş, **Kübra Aksu**, Nuray Acar, Güler Leyla Satı. The expression and localization of KIF17 in mouse uteri and implantation sites during peri-implantation period, 26th International Symposium on Morphological Sciences, 5-7 Temmuz 2018, Prag, Çek Cumhuriyeti (Bildiri kitabı sayfa 71).

### **Ulusal kongre bildirileri:**

- 1- **Kübra Aksu**, Mutay Aydın Aslan, Ezgi Golal, İsmail Üstünel, Nuray Acar Aydemir. Parakuat ile oksidatif stres oluşturulan farelerde SRT1720'nin embriyo implantasyonu üzerindeki etkisi. Uluslararası Katılımlı 24. Elektron Mikroskopi Kongresi, 26-28 Nisan 2019, Edirne/ Türkiye (Bildiri kitabı sayfa 159-160).
- 2- Ezgi Golal, **Kübra Aksu**, İsmail Üstünel, Nuray Acar Aydemir. Peri-implantif dönem fare uterus ve implantasyon bölgelerinde hippo sinyal yolağı üyesi aktif YAP' ın (yes ilişkili protein) ekspresyonu. Uluslararası Katılımlı 24. Elektron Mikroskopi Kongresi, 26-28 Nisan 2019, Edirne/ Türkiye (Bildiri kitabı sayfa 161-162).
- 3- **Kübra Aksu**, Ezgi Golal, İsmail Üstünel, Nuray Acar Aydemir. Peri-implantif Dönem Fare Uterus ve İmplantasyon Bölgelerinde Sirtuin 1 Ekspresyonu. Uluslararası Katılımlı 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. 10-13 Mayıs 2018, Antalya (Bildiri kitabı sayfa 209).
- 4- Ezgi Golal, **Kübra Aksu**, İsmail Üstünel, Nuray Acar Aydemir. Peri-implantif Dönem Fare Uterus ve İmplantasyon Bölgelerinde Hippo Sinyal Yolağı Üyesi Fosforile YAP (Yes-associated protein-Yes ilişkili protein) Ekspresyonu. Uluslararası Katılımlı 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. 10-13 Mayıs 2018, Antalya (Bildiri kitabı sayfa 210).
- 5- Celal Akgün, Özlem Özbey Ünlü, Nuray Acar, **Kübra Aksu**, Yetkin Söyüncü, Fatma Ertuğrul, İsmail Üstünel. Sıçanlarda Bupivakain ve Levobupivakain İntraartiküler Enjeksiyonunun Eklem Kıkırdağı Matriksi ve Kondrosit Apoptozu Üzerine Etkisi. Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Çeşme-İzmir (Bildiri kitabı sayfa 622-623).